

ТОМ XXXIV

ВЫПУСК 6

НОЯБРЬ — ДЕКАБРЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

# ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



МОСКВА · МЕДИЦИНА · 1988



## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

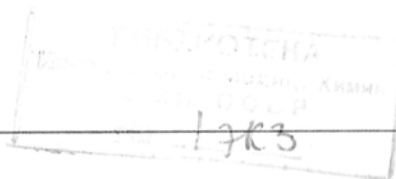
Главный редактор С. С. ДЕБОВ

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

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

БАЕВ А. А. (Москва)  
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)  
ШАПОТ В. С. (Москва)  
ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)  
ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)



В. В. Соколовский

# ТИОЛОВЫЕ АНТИОКСИДАНТЫ В МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМАХ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ ОРГАНИЗМА НА ЭКСТРЕМАЛЬНОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ (Обзор)

Ленинградский санитарно-гигиенический медицинский институт

Сопrotивляемость организма влиянию неблагоприятных для здоровья факторов и вероятность возникновения болезни во многом определяются состоянием физиологических систем неспецифической резистентности.

Адаптация, или способность живой системы приспосабливаться к изменениям среды, «является, вероятно, наиболее отличительной чертой жизни» [36], одним из самых важных свойств всех биологических систем [65]. Это свойство состоит в способности организма отвечать общими, неспецифическими реакциями на разнообразные в качественном и количественном отношении нормальные и патогенные воздействия среды. Биологический смысл и характер таких реакций заключаются в мобилизации функциональных резервов организма, необходимых для поддержания гомеостаза, т. е. в обеспечении относительного динамического постоянства живой системы на основе автоматической саморегуляции [11, 14, 18].

Конечный результат мобилизации адаптационных механизмов — приспособление организма к новым условиям внешней и внутренней среды или несостоятельность системы неспецифической защиты, имеющая следствием развитие болезни, — зависит от ряда условий и факторов: от силы и продолжительности действия раздражителя, индивидуальных, возрастных, половых, видовых особенностей организма и др.

Механизмы неспецифической резистентности включают разные уровни структурной организации биосистемы: субмолекулярный, молекулярный, надмолекулярный, субклеточный, клеточный, органотканевый и организменный, изучаются эти механизмы соответственно с помощью биохимических, фи-

зиологических и морфологических методов исследования.

Ведущую роль в механизмах адаптации играет нейроэндокринная регуляторная система. Вызванное экстремальным фактором возбуждение высших вегетативных центров и активация адренергической и гипоталамо-гипофизарно-адреналовой систем [26] приводят к биохимическим сдвигам, значение и цель которых состоит в мобилизации резервов организма, позволяющих ему противостоять повреждающему действию фактора. Эти процессы всегда сопряжены с увеличением энергетических затрат. Поэтому поддержание постоянства энергетического потенциала биосистемы считают необходимым условием адаптации [29].

Помимо энергетического обмена, в биохимический механизм адаптационных реакций на определенной стадии включается пластический обмен. В связи с этим следует иметь в виду существование двух этапов таких реакций: начальный этап срочной, но несовершенной адаптации и последующий этап долговременной адаптации [26]. Срочный этап развивается непосредственно после действия раздражителя на основе готовых физиологических механизмов. Характерной чертой этого этапа является почти полная мобилизация функционального резерва, которая не в состоянии обеспечить цельный адаптационный эффект. Для перехода срочной адаптации в долговременную необходимо увеличение мощности функциональной системы до уровня, диктуемого средой. Поэтому в механизм долговременной адаптации включается генетический аппарат, активируется синтез нуклеиновых кислот и различных белков, в том



числе ферментов, участвующих в неспецифической защите.

Один из конкретных путей реализации этих биохимических изменений становится очевидным в свете приводимых ниже сведений.

В 80-е годы в рамках представлений о молекулярных механизмах неспецифических реакций организма на экстремальное воздействие сформировалась концепция, согласно которой «усиление свободнорадикального окисления, вызванное действием на организм неблагоприятных факторов, ведет к ответной реакции гидрофильной и гидрофобной частей антиоксидантной системы, которая рассматривается как система, принимающая непосредственное участие в молекулярных механизмах неспецифической резистентности организма к повреждающим факторам внешней среды» [43].

*Окислительно - восстановительные процессы при действии патогенных факторов.* Во многих работах, опубликованных за последние 15—20 лет, можно обнаружить сведения об изменениях содержания в тканях человека и животных тиоловых соединений и аскорбиновой кислоты при действии на организм разнообразных патогенных факторов. При этом обращает на себя внимание тот факт, что в начальный период действия разных по своей природе агентов содержание сульфгидрильных групп в крови и других тканях организма, как правило, снижается. Эта закономерность, в равной степени характерная как для низкомолекулярных тиоловых соединений, так и для белков, наблюдалась при болевом раздражении [28] и травматическом шоке [24], эпидемическом гепатите [39], ревматоидном артрите [58, 63], аллергических заболеваниях [31], действии вибрации [46] и т. д. О том, что причиной снижения содержания SH-групп в биосубстрате является их окислительная модификация, свидетельствует одновременное увеличение количества дисульфидных групп: оно было установлено при развитии атеросклероза [4], поздних токсикозов беременных [23], черепно-мозговой травме [1], обострении заболеваний нервной системы [20], ишемии миокарда [3], аллергиях [15, 31], шумовом воздействии [13]. Аналогичные изменения соотношения восстановленных и окисленных тиолов развиваются при ста-

рении [10, 40]. Все эти факты позволяют говорить о неспецифическом характере изменения содержания тиоловых соединений (в тканях) при действии на организм экстремальных факторов. Такой вывод был сделан, в частности, в работах [50, 19]. Авторы [19], используя в качестве внешнего воздействия магнитное поле, обнаружили зависимость содержания SH-групп в плазме крови от характера развивающейся адаптационной реакции и сделали вывод, что стресс характеризуется низким содержанием SH-групп, которые могут рассматриваться в качестве показателя, отражающего уровень неспецифической резистентности организма. В пользу такой точки зрения свидетельствуют в свою очередь фазовые изменения содержания небелковых SH-групп в надпочечниках на разных этапах развития стресса [72] и в различных тканях при воздействиях стрессора, отличающихся по силе [13, 45].

Вместе с тем, поскольку неспецифические реакции связаны с превращением SH-групп в дисульфидную форму, следует подчеркнуть роль обратной тиолдисульфидной системы в механизмах адаптации. Значение этой системы в регуляции процессов жизнедеятельности и, в частности, в поддержании окислительно-восстановительного гомеостаза обсуждается в работах [41, 42]. В многочисленных публикациях описано влияние окислительно-восстановительного состояния тиолдисульфидной системы на процессы клеточного деления [2], диссоциацию оксигемоглобина [60, 67, 69], агрегацию тромбоцитов [61], активность ферментов [41, 42, 60, 64, 68, 78], проницаемость клеточных мембран [41, 42] и др. Интересно и предположение, согласно которому обратимое образование дисульфидных связей может служить для защиты чувствительных мембранных структур от необратимого окислительного разрушения [59].

Специального внимания заслуживает также вопрос об индивидуальной химической природе тиоловых соединений, ответственных за неспецифическую резистентность. К их числу относятся низкомолекулярные вещества — глутатион, эрготионеин [57, 10], цистеин и, возможно, гомоцистеин, липоевая кислота. Вместе с тем есть осно-

вания отнести к ним и некоторые белки [43, 48, 53, 54, 57].

В состав другой обратимой окислительно-восстановительной системы организма человека и животных, реагирующей на внешние воздействия и притом тесно связанной с обменом SH-соединений низкомолекулярной природы, входят аскорбиновая и дегидроаскорбиновая кислоты.

При дефиците аскорбиновой кислоты в организме снижается его сопротивляемость действию патогенных факторов, и в то же время содержание аскорбиновой кислоты в тканях и органах уменьшается под влиянием этих факторов. К числу последних относятся токсические вещества экзогенного и эндогенного происхождения [73, 74], заболевания разной природы, болевые раздражители [27] и другие агенты. Как и в случае SH-соединений, причиной уменьшения содержания аскорбиновой кислоты является ее окисление, о чем свидетельствует накопление в тканях дегидроаскорбиновой и дикетогулоновой кислот [1, 13, 15, 22, 23, 73].

Имеются прямые указания на защитную роль аскорбиновой кислоты в условиях как физиологического стресса, так и стресса, возникающего при заболеваниях внутренних органов, и делается попытка связать этот факт с ее антигистаминным влиянием [74]. Подчеркивается также участие аскорбиновой кислоты в реакциях неспецифического иммунитета [32].

Заслуживает внимания связь между балансом аскорбиновой кислоты и состоянием симпатико-адреналовой системы. Последняя мобилизует тканевые депо аскорбиновой кислоты, способствуя ее освобождению. В свою очередь аскорбиновая кислота расходуется на восстановление адреналина, окисляющегося в процессе его действия [70, 76].

Наряду с SH-соединениями и аскорбиновой кислотой окислительной модификации при действии различных раздражителей подвергаются и субстраты липидной природы. Это действие приводит к усилению процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) клеточных мембран и накоплению продуктов окисления — перекисей липидов, в свою очередь проявляющих свойства окислителей [6, 8, 9, 10, 26, 30]. Многообразие патогенных факто-

ров, вызывающих ПОЛ, и широкий спектр повреждающего действия его продуктов определяют место и значение этого процесса в механизмах неспецифических реакций организма на внешнее воздействие. По мнению Ф.З. Меерсона [26], активация ПОЛ составляет общее звено стрессорных повреждений.

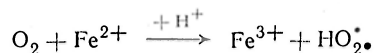
*Образование свободных радикалов и перекисей в тканях организма в физиологических условиях и при действии экстремальных факторов.* Таким образом, реакция организма на разные раздражители на молекулярном уровне характеризуется окислением ряда важных биосубстратов — SH-соединений небелковой и белковой природы, аскорбиновой кислоты, липидов, и, надо полагать, ряда других веществ.

Важные для понимания молекулярных механизмов адаптации вопросы о причинах и биологическом значении этого явления находят ответ в представлениях о цепных процессах свободнорадикального окисления (СРО) в биологических системах — представлениях, во многом связанных с работами Б. Н. Тарусова и его последователей [17]. Как известно, свободный радикал — это молекула или ее часть, имеющая неспаренный электрон на молекулярной или на внешней атомной орбите. Присутствие такого электрона наделяет радикал двумя характерными свойствами: очень высокой окислительной способностью, обусловленной сильнейшей электрофильностью, и наличием магнитного момента, обусловленного нескомпенсированным спином неспаренного электрона [21].

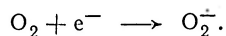
Свободные радикалы являются активными участниками большого числа химических реакций, протекающих в живых клетках, играют важную роль в ферментативных процессах. Поэтому СРО при достаточно низкой его интенсивности относится к нормальным метаболическим процессам [17]. СРО происходит, в частности, при окислительном фосфорилировании и микросомальном окислении, т. е. в ходе процессов, связанных с участием молекулярного кислорода и с транспортом электронов [18].

Один из возможных путей образования свободных радикалов состоит в одноэлектронном восстановлении мо-

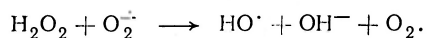
лекулярного кислорода ионами двухвалентного железа [26]:



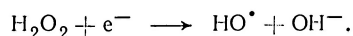
Одноэлектронное восстановление кислорода может приводить и к появлению другого свободного радикала — супероксидного аниона  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , имеющего дополнительный электрон [18]:



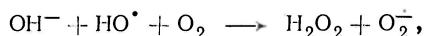
Супероксидный анион-радикал может реагировать с перекисью водорода и образовывать высокоактивный гидроксильный радикал ( $\text{HO}^\bullet$ ):



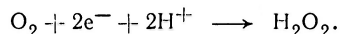
Образование радикала  $\text{HO}^\bullet$  возможно также в результате реакции:



Взаимодействие иона и радикала гидроксила приводит к появлению перекиси водорода:



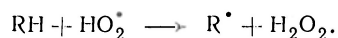
которая может также являться продуктом двухэлектронного восстановления кислорода:



К ферментам, продуцирующим супероксидный анион-радикал, синглетный кислород, перекись водорода в клетках, относятся L-гулонолактоноксидаза, альдегидоксидаза, ксантиноксидаза, моноаминоксидаза, диаминоксидаза, НАДФ·Н-цитохром с-редуктаза, НАД·Н-цитохром с-редуктаза, уратоксидаза, супероксиддисмутаза, простагландинсинтетаза и некоторые другие [25].

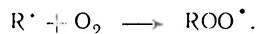
Отмечена возможность образования супероксидного и гидроксильного радикалов при неферментативном окислении адреналина [49].

Свободные радикалы инициируют цепные реакции окисления субстратов, среди которых наиболее известными в настоящее время являются липиды. Остатки ненасыщенных жирных кислот (RH) в молекулах липидов атакуются свободными радикалами, что приводит к образованию жирнокислотных радикалов ( $\text{R}^\bullet$ ):



На следующем этапе взаимодействие жирнокислотных радикалов с молеку-

лярным кислородом приводит к их превращению в перекисные радикалы  $\text{RO}_2^\bullet$ :

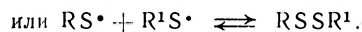
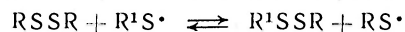
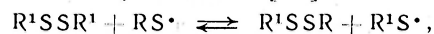


В результате последующей реакции между перекисными радикалами и новыми остатками жирных кислот образуются гидроперекиси и новые жирнокислотные радикалы  $\text{R}_1^\bullet$ :



Таким образом, при развитии этой цепной реакции количество радикалов поддерживается на неизменном уровне, а количество гидроперекисей возрастает.

Субстратами СРО могут являться тиоловые соединения, при этом образуются радикалы  $\text{RS}^\bullet$ ,  $\text{RSO}_2^\bullet$ , участвующие в реакциях с дисульфидами или в их образовании [55]:



Образующиеся свободные радикалы и перекисные соединения органической и неорганической природы в силу высокой электрофильности способны вызывать окислительную модификацию различных биосубстратов и оказывать тем самым свое повреждающее действие на клетку. Следствием окисления функциональных групп биологически активных веществ могут явиться дегградация структурных белков и липидов клеточных мембран, модификация нуклеиновых кислот, ингибирование ферментов, изменение структуры и свойств гормонов и их рецепторов. При этом следует отметить, что среди ферментов наиболее чувствительными к СРО являются сульфгидрильные ферменты [17].

Исследования последнего времени, выполненные с помощью ряда разных методических подходов, позволяют считать доказанным тот факт, что при действии на организм различных химических, физических и иных стрессовых факторов реакции СРО в клетках резко усиливаются [10, 17, 26, 35].

Можно полагать, что усиленное образование первичных свободных радикалов является побочным результатом возрастания интенсивности биохимических реакций в ответ на действие экстремального фактора, опосредован-

ное через нейроэндокринные регуляторные механизмы. В свою очередь каскадный механизм цепного процесса СРО биосубстратов позволяет на примере ПОЛ понять природу эффекта многократного усиления первичного повреждающего воздействия.

*Антиоксидантная система: природа, состав, механизмы гомеостаза.* Проявлению повреждающего действия свободных радикалов и перекисных соединений препятствует сложная многокомпонентная антиоксидантная система (АОС), которая обеспечивает связывание и модификацию радикалов, предупреждение образования или разрушение перекисей. В ее состав входят гидрофильные и гидрофобные органические вещества с восстановительными свойствами; ферменты, поддерживающие гомеостаз этих веществ и антиперекисные ферменты. Структура и механизмы функционирования АОС рассмотрены, например в обзоре [10].

По мнению J. Glavind [57], к числу биоантиоксидантов относятся: а) жирорастворимые вещества, например токоферол; б) водорастворимые диализуемые вещества, такие, как глутатион, эрготионеин, аскорбиновая кислота; в) белки, содержащие тиоловые группы.

В более поздних работах эти представления получили дальнейшее развитие. Так, перечень естественных антиоксидантов сегодня включает липофильные соединения (стероидные гормоны, витамины А, Е, К, флавоноиды или полифенолы, убихинон) и водорастворимые (низкомолекулярные SH-соединения, аскорбиновая кислота) вещества, которые либо являются «ловушками» свободных радикалов, либо обезвреживают перекисные соединения [10, 17, 26, 47, 66]. Что же касается упомянутой выше возможности участия тиолсодержащих белков в механизмах антиоксидантной защиты, то ее, по-видимому, следует рассматривать в свете данных о том, что значительная часть низкомолекулярных SH-соединений находится в клетке в связанном с белками состоянии в виде смешанных дисульфидов, высокая концентрация которых важна для поддержания буферной окислительно-восстановительной системы, антиоксидантной активности и модуляции специфической активности некоторых

белков (ферментов, иммуноглобулинов, мембранных белков) [54].

То обстоятельство, что одна часть тканевых антиоксидантов имеет гидрофильный, а другая — гидрофобный характер, делает возможной одновременную защиту от окисляющих агентов функционально важных молекул как в водной, так и в липидной фазе. Например, свое антицинготное действие аскорбиновая кислота проявляет в сочетании с флавоном [56]. Вместе с тем некоторые антиоксиданты, преимущественно растворимые в одной из фаз, могут быть погружены частью своей молекулы в другую фазу, что, по-видимому, обеспечивает такому веществу бифункциональную активность.

Общая сумма биоантиоксидантов создает в тканях «буферную антиоксидантную систему» [17], обладающую определенной емкостью, а соотношение прооксидантных и антиоксидантных систем определяет так называемый «антиоксидантный статус организма» [26].

Есть все основания полагать, что среди тканевых антиоксидантов тиолы занимают особое место. Аргументами в пользу этого мнения служат следующие факты: 1) высокая реакционная способность сульфгидрильных групп, благодаря которой некоторые тиолы окисляются с очень высокой скоростью [41, 42, 43]; 2) зависимость скорости окислительной модификации SH-групп от их радикального окружения в молекуле [55], что позволяет выделить из множества тиоловых соединений особую группу легко окисляющихся веществ, выполняющих специфические функции антиоксидантов; 3) обратимость реакции окисления сульфгидрильных групп в дисульфидные [41—43], что предполагает возможность энергетически выгодного поддержания гомеостаза тиоловых антиоксидантов в клетке без активации их биосинтеза; 4) способность тиолов проявлять как антирадикальное, так и антиперекисное действие [8, 9, 30, 47, 52, 55]; 5) гидрофильными свойствами тиолов обусловлены их высокое содержание в водной фазе клетки и возможность защиты от окислительного повреждения биологически важных молекул ферментов, нуклеиновых кислот, гемоглобина и др. Вместе с тем присутствие в тиоловых соединениях неполярных группировок обеспечивает

им возможность проявления антиоксидантной активности в липидной фазе клетки [55]. Известна способность тиоловых веществ ингибировать как неферментативное [48], так и ферментативное ПОЛ [52].

Таким образом, наряду с веществами липидной природы тиоловые соединения принимают широкое участие в защите клеточных структур от действия окисляющих факторов. Подобное мнение высказано, в частности в работе [5], авторы которой, изучавшие реакцию АОС на облучение, считают, что «уровни антиокислительной активности липидов и эндогенных тиолов отражают разные стороны клеточного метаболизма и оба параметра являются существенными в определении устойчивости организма к действию облучения». Поэтому в настоящее время вряд ли есть основания полагать, что эффективность антиоксидантов определяется только их активностью в ингибировании ПОЛ [6].

Как уже указывалось выше, окислению в тканях организма, находящегося в экстремальных условиях, подвергается аскорбиновая кислота. Она, как и тиолы, входит в состав АОС, участвуя в связывании свободных радикалов и разрушении перекисей [10, 66]. В этом своем качестве аскорбиновая кислота, молекула которой содержит и полярные, и неполярные группировки, проявляет тесное функциональное взаимодействие с SH-глутатионом и вместе с тем с липидными антиоксидантами, усиливая действие последних и препятствуя ПОЛ [56].

По всей видимости, липидные антиоксиданты играют главенствующую роль в защите основных структурных компонентов биологических мембран, таких, как фосфолипиды или погруженные в липидный слой белки. В свою очередь водорастворимые антиоксиданты — тиоловые соединения и аскорбиновая кислота — проявляют свое протекторное действие преимущественно в водной среде: в цитоплазме клетки или плазме крови. При этом следует иметь в виду, что система крови «представляет собой внутреннюю среду, которая играет решающую роль в неспецифических и специфических реакциях защиты организма, влияя на его резистентность и реактивность» [14].

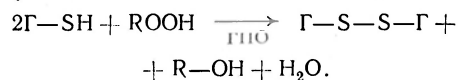
Исключительное значение для стабилизации гомеостаза антиоксидантов имеют ферментативные механизмы восстановления их окисленных форм. Центральное звено этих механизмов — каталитическое дегидрирование субстратов биологического окисления, осуществляемое в первой фазе пентозофосфатного цикла (цитоплазма, ядро), в цикле трикарбоновых кислот и процессе  $\beta$ -окисления высших жирных кислот (митохондрии) [10].

Уровень биоантиоксидантов в тканях и активность дегидрогеназ тесно связаны между собой. Изучение этих взаимосвязей, их органотканевых и субклеточных особенностей представляется одним из перспективных путей исследования молекулярных механизмов адаптации.

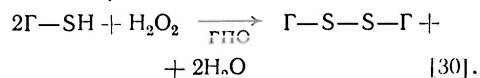
Другая часть системы антиоксидантной защиты организма представлена группой антиперекисных ферментов. К ним относятся:

а) супероксиддисмутаза, которая обеспечивает превращение высокоактивного супероксидного аниона ( $O_2^-$ ) в менее активный окислитель — перекись водорода ( $H_2O_2$ );

б) глутатионпероксидазы, которые катализируют реакцию между восстановленным глутатионом и гидроперекисями жирных кислот, обезвреживая последние путем их превращения в жирные оксикислоты:



Кроме того, одна из глутатионпероксидаз (Se-зависимая) разрушает перекись водорода:



Окисленный глутатион восстанавливается глутатионредуктазой с использованием НАДФ·Н, образующегося в пентозофосфатном цикле;

в) каталаза и пероксидаза, разрушающие  $H_2O_2$ .

Воздействие экстремальных факторов сказывается на состоянии как неферментной, так и ферментной части АОС: снижается активность глутатионредуктазы, супероксиддисмутазы, пероксидазы [7, 13, 15, 16, 34], наблюдаются фазовые изменения активности каталазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [7, 15].

Поступление антиоксидантов в организм оказывает воздействие на разные звенья АОС: повышает концентрацию эндогенных SH-соединений и активность глутатионредуктазы [51], нормализует окислительно-восстановительный гомеостаз тиоловых соединений и аскорбатной системы [23].

Следует подчеркнуть, что функционирование неферментного и ферментного звеньев механизма антиоксидантной защиты зависит от фонда доноров водорода [10]. Поэтому срыв работы АОС, снижение ее буферной емкости могут быть вызваны не только падением уровня антиоксидантов или ингибированием антиперекисных ферментов, но и блокированием поставляющих водород процессов при действии метаболитических ядов или иных факторов.

В механизме функционирования ферментного звена АОС тиоловые соединения тоже принимают непосредственное и широкое участие, поскольку дегидрогеназы пентозофосфатного и трикарбонового цикла, глутатионредуктаза, каталаза являются тиоловыми ферментами [41, 60, 80]. Кроме того, следует иметь в виду зависимость активности оксидоредуктаз, в том числе ферментов АОС, от величины редокс-потенциала среды [77], который в значительной степени определяется уровнем SH-соединений [44].

Итак, если экстремальные воздействия на организм приводят к усилению СРО, то адаптация к этим воздействиям подразумевает использование возможностей антиоксидантной защиты. Иными словами, АОС имеет прямое отношение к молекулярным механизмам неспецифической резистентности организма к стрессовым воздействиям.

*Флюктуации состояния АОС.* Очевидно, что для нормального функционирования живой системы необходимо сохранение определенного соотношения между донорами и акцепторами электронов. Эти доноро-акцепторные взаимодействия относятся, по мнению А. Сент-Дьердьи [37], к числу «самых распространенных и самых важных биологических взаимодействий», а некое равновесие между их участниками является одним из основных параметров жизни. Изменение этого равновесия в определенных пределах используется для регуляции как различных функций, так и физического состояния клетки, а выход за эти пределы при-

водит к развитию патологических изменений.

Проблема «здоровье или болезнь», «адаптация или дезадаптация» — это во многом проблема сохранения или нарушения оптимального соотношения между восстановленными и окисленными формами компонентов АОС. В принципе существенное отклонение в ту или в другую сторону дестабилизирует систему, однако состояние «перекисленности» клеточной среды значительно более опасно, нежели состояние «перевосстановленности» [75].

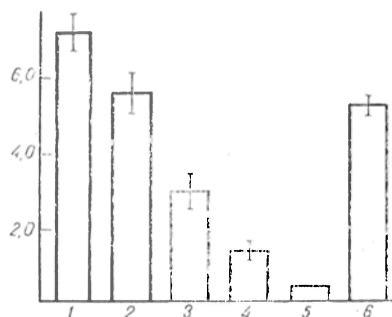
Увеличение интенсивности свободно-радикальных реакций при действии на организм экстремальных факторов вызывает напряжение АОС. В этих условиях появление в крови и других тканях больших количеств катехоламинов, характерное для стрессовых ситуаций, может приводить к накоплению продуктов их окисления, которые в свою очередь будут способствовать окислительной модификации биосубстратов и истощению АОС [9, 26]. Как быстро наступит это истощение, зависит, с одной стороны, от силы раздражителя и продолжительности его действия, а с другой — от величины «буферной емкости» АОС, на которую оказывает влияние ряд различных факторов, в том числе: а) генетические, ответственные за биосинтез компонентов АОС в необходимом организму составе и количестве. Их влияние определяет существование видовых и индивидуальных особенностей состояния АОС, ее реакцию на внешние воздействия и особенности адаптивных механизмов. Вероятно, генетически обусловленную способность АОС противостоять действию повреждающих агентов, ее максимальную в данных условиях буферную емкость следует иметь в виду при попытке истолковать материальную природу «энергии адаптации» на молекулярном уровне; б) возрастные, под которыми в настоящее время есть основания понимать продукты СРО, накопление которых в ходе онтогенеза постепенно снижает буферную емкость АОС [10]; в) сезонные, связанные с временем года качественные и количественные изменения состава пищевого рациона, которые сказываются на обеспеченности организма веществами, необходимыми для формирования структуры и функционирования АОС [33];



г) гелиофизические, о возможности влияния которых на АОС позволяют говорить, в частности, результаты наших многолетних исследований, в которых была установлена зависимость скорости окисления низкомолекулярных SH-соединений от уровня солнечной активности [42]. Можно предположить, что ускорение окисления тиоловых и иных антиоксидантов в периоды возмущения солнечной активности повлечет за собой уменьшение буферной емкости АОС и, следовательно, снижение неспецифической резистентности организма. Признаки существования такого влияния можно обнаружить также в сообщениях о связи изменений интенсивности ПОЛ эритроцитарных мембран с флуктуациями напряженности геомагнитного поля или о синхронном с повышением солнечной активности снижении неспецифической резистентности организма при ее оценке по состоянию белой крови или по иммунологическим показателям [38].

Таким образом, состояние АОС в тот или иной период времени определяется совместным влиянием ряда различных факторов.

*Возможность оценки способности к адаптации и разработки способов ее повышения.* Концепция об участии АОС в механизмах адаптации позволяет вплотную подойти к решению важных практических задач. Одна из них — объективная оценка адаптивных сил организма. Реальная возможность решения такой задачи является весьма сложной проблемой, при этом измерение буферной емкости АОС —



Соотношение SH/S—S-групп в крови беременных женщин с различными клиническими формами позднего токсикоза [23].

1 — здоровые небеременные женщины; 2 — нормально протекающая беременность (28—40 нед); 3 — поздний токсикоз, отеки; 4 — то же, нефропатия III степени; 5 — то же, эклампсия; 6 — то же, лечение унитиолом.

один из конкретных путей к достижению этой цели [43].

Очевидна необходимость поисков соответствующих методических подходов и оценка перспективности их использования. Учитывая роль тиолов в структуре АОС, а также значение крови в механизмах неспецифической резистентности и в лабораторной диагностике, по-видимому, заслуживает внимания в этом плане измерение соотношения SH/S—S-групп в клетках крови, плазме (см. рисунок) [1, 15, 23]. Технически более сложное определение в тканях антиоксидантной активности соединений липидной природы в свою очередь также может стать источником полезной информации.

Количественный контроль буферной емкости АОС как меры оценки неспецифической резистентности в существенной мере может способствовать решению на научной основе другой задачи: разработке способов их повышения в профилактических или лечебных целях. Весьма существенным и менее всего разработанным в области представлений о сопротивляемости живых организмов действию повреждающих агентов считают авторы обзора [32] вопрос об использовании природных факторов в целях коррекции измененной реактивности организма у лиц с пониженной резистентностью и повышенным риском развития заболеваний.

Успешное применение димеркаптопропансульфоната натрия и пенициллина при лечении некоторых заболеваний [1, 23] подтверждает справедливость мнения о том, что тиоловые антиоксиданты являются мощными неспецифическими факторами повышения резистентности организма [12]. Вместе с тем использование в качестве «адаптогенов» антиоксидантов липидной природы также оказалось эффективным при неспецифической терапии [6].

Можно ожидать, что наиболее эффективным будет комплексное применение антиоксидантов с гидрофильными и гидрофобными свойствами.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Александров М. В., Лекарь П. Г., Соколовский В. В. // Журн. невропатол. и психиатр. — 1980. — № 5. — С. 672—676.
2. Алов И. А., Аспиз М. Е., Зусева Л. П.,

- Уриваева И. В. // Бюл. экспер. биол. — 1969. — № 2. — С. 88—90.
3. Алютова Т. В. // Тиоловые соединения в биохимических механизмах патологических процессов. — Л., 1979. — С. 74—76.
4. Антонов Г., Златева М. // Арх. пат. — 1969. — № 4. — С. 66—70.
5. Бурлакова Е. Б., Иваненко Г. Д., Конрадов А. А. и др. // Радиобиология. — 1982. — Т. 22, № 3. — С. 301—306.
6. Бурлакова Е. Б. // Всесоюзный биохимический съезд, 5-й: Тезисы симпозиальных докладов. — М., 1986. — Т. 1. — С. 85.
7. Верболович В. П., Подгорный Ю. К., Петренко Е. П., Подгорная Л. М. // Там же: Тезисы стендовых сообщений. — М., 1986. — Т. 2. — С. 33—34.
8. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М., 1972.
9. Владимиров Ю. А., Оленев В. И., Суслова Т. Б., Патапенко А. Я. // Молекулярная патология мембранных структур. — М., 1975. — С. 56—117.
10. Воскресенский О. Н., Жутаев И. А., Бобырев В. Н., Безуглый Ю. В. // Вопр. мед. химии. — 1982. — № 1. — С. 14—27.
11. Гаркави Л. Х., Квакуина Е. Б., Уколова М. А. Адаптационные реакции и резистентность организма. — Ростов н/Д., 1979.
12. Гевонян В. С. // Мед. паразитол. — 1974. — № 3. — С. 319—324.
13. Гончарова Л. Л., Кадыкина Е. П., Макарова И. Н., Родионова Л. П. // Антиоксиданты и адаптация. — Л., 1984. — С. 22—26.
14. Горизонтов П. Д., Белоусова О. И., Федотова М. И. Стресс и система крови. — М., 1983.
15. Джангулова Н. Э., Баскович Г. А., Барышникова Г. В. и др. // Антиоксиданты и адаптация. — Л., 1984. — С. 26—34.
16. Дудник Л. Б., Тихадзе А. К., Алексенко А. В. и др. // Бюл. экспер. биол. — 1981. — № 4. — С. 451—453.
17. Журавлев А. И. Биоантиоксиданты в регуляции метаболизма в норме и патологии. — М., 1982. — С. 3—36.
18. Казначеев В. П., Михайлова Л. П. Бионформационная функция естественных электромагнитных полей. — Новосибирск, 1985.
19. Квакуина Е. Б., Тарасьянц Ф. М., Шихлярова А. И. // Применение магнитных полей в клинике. — Куйбышев, 1976. — С. 108—110.
20. Клочева Е. Г. // Тиоловые соединения в биохимических механизмах патологических процессов. — Л., 1979. — С. 72—74.
21. Козлов Ю. П. Свободные радикалы и их роль в нормальных и патологических процессах. — М., 1973.
22. Костючек Д. Ф., Рыжова Р. К. // Антиоксиданты и адаптация. — Л., 1984. — С. 41—43.
23. Костюшов Е. В. // Тиоловые соединения в биохимических механизмах патологических процессов. — Л., 1979. — С. 77—84.
24. Луганский Н. И., Лобода Ю. И., Локанцев Д. С. // Фармакология и токсикология. — Киев, 1966. — С. 223—226.
25. Лукьянова Д. Л., Балмуханов Б. С., Уголев А. Т. Кислородзависимые процессы в клетке и ее функциональное состояние. — М., 1982.
26. Меерсон Ф. З. Адаптация, стресс и профилактика. — М., 1981.
27. Мережинский М. Я. // Хирургия. — 1960. — № 11. — С. 75—78.
28. Оганесян С. С., Егиян В. Б. // Вопросы высшей нервной деятельности и компенсаторных приспособлений. — Ереван, 1961. — Вып. 3. — С. 149—155.
29. Панин Л. Е. Биохимические механизмы стресса. Новосибирск, 1983.
30. Петрович Ю. А., Гуткин Д. В. // Пат. физиол. — 1981. — № 5. — С. 76—78.
31. Плешкова С. М., Курманова К. Б. Окислительно-восстановительные процессы при аллергии. — Алма-Ата, 1981.
32. Природные факторы и резистентность организма. — М., 1982.
33. Родионова Л. П., Гончарова Л. Л. // Антиоксиданты и адаптация. — Л., 1984. — С. 19—22.
34. Рубина Х. М., Романчук Л. А. // Вопр. мед. химии. — 1965. — № 1. — С. 27—31.
35. Свободно-радикальные процессы в биологических системах. — М., 1966.
36. Селье Г. Очерки об адапционном синдроме: Пер. с англ. — М., 1960.
37. Сент-Дьердьи А. Биоэлектроника: Пер. с англ. — М., 1971.
38. Сидякин В. Г., Темурьянц П. А., Макеев В. Б., Тишкин О. Г. // Успехи соврем. биол. — 1983. — Т. 96, № 1 (4). — С. 151—160.
39. Скворцов В. М. // Патогенез, клиника и лечение кишечных инфекций. — М., 1965. — С. 161—164.
40. Соколовский В. В., Лизлуп Т. Б., Новикова Е. Ф. // Журн. эволюц. биохимии. — 1974. — Т. 10, № 4. — С. 336—339.
41. Соколовский В. В. // Тиоловые соединения в биологических механизмах патологических процессов. — Л., 1979. — С. 5—9.
42. Соколовский В. В. // Проблемы космической биологии. — М., 1982. — Т. 43. — С. 180—197.
43. Соколовский В. В. // Антиоксиданты и адаптация. — Л., 1984. — С. 3—19.
44. Сумаруков Г. В. Окислительное равновесие и радиочувствительность организмов. — М., 1970.
45. Ткемаладзе Л. М. // Труды НИИ курортологии и физиотерапии им. И. Г. Концашвили. — Тбилиси, 1968. — Т. 28. — С. 283—388.
46. Antov G., Ivanovich E. // Acta med. bulg. — 1979. — Vol. 6, N 2. — P. 66—71.
47. Armstrong D., Buchanan J. // Photochem. Photobiol. — 1978. — Vol. 28, N 45. — P. 743—755.
48. Bindoli A., Cavallini L., Siliprandi N. // Chem. Biol. Interact. — 1977. — Vol. 19, N 3. — P. 383—386.
49. Bors W., Michel Ch., Saran M., Longfelder E. // Biochim. biophys. Acta. — 1978. — Vol. 540, N 1. — P. 162—172.
50. Chakrabarti B., Basu A. // J. exp. med. Sci. — 1960. — Vol. 4, N 2. — P. 67—71.
51. Clement Y. // Life Sci. — 1984. — Vol. 34, N 25. — P. 2501—2506.
52. Fairhurst S., Horton A. // Biochem. Soc. Trans. — 1982. — Vol. 10, N 4. — P. 235—236.
53. Fedorcsak I., Harms-Ringdahl M., Ehrenberg L. // Exp. Cell. Res. — 1977. — Vol. 108, N 2. — P. 331—339.



54. Freedman R. // FEBS Lett. — 1979. — Vol. 97, N 2. — P. 201—210.
55. Friedman M. The Chemistry and Biochemistry of the Sulfhydryl Group in Amino Acids, Peptides and Protein. — Oxford, 1973.
56. Gazave J. // Fruits. — 1977. — Vol. 32, N 4. — P. 275—284.
57. Glavind J. // Acta chem. scand. — 1963. — Vol. 17, N 6. — P. 1635—1640.
58. Haataja M., Kalliomäki J. // Z. Rheum. — 1977. — Bd 36, N 3—4. — S. 73—76.
59. Haest C., Kamp D., Deuticke B. // Biochim. biophys. Acta. — 1979. — Vol. 557, N 2. — P. 363—371.
60. Hermel H., Havemann R. // Ibid. — 1966. — Vol. 128, N 2. — P. 272—282.
61. Hofmann J., Losche W., Hofmann B. et al. // Biomed. biochim. Acta. — 1983. — Vol. 42, N 5. — P. 479—487.
62. Horejsi J., Komarkova A. // Clin. chim. Acta. — 1958. — Vol. 3, N 2. — P. 131—136.
63. Hrnčir Z., Tichý M. // Vnitřní Lek. — 1979. — N 11. — P. 1060.
64. Jacob H., Jandl J. // J. biol. Chem. — 1966. — Vol. 241, N 18. — P. 4243—4250.
65. Koshland D. Bacterial Chemotaxis as a Model Behavioral System. — New York, 1980.
66. Lake B., Harris R., Phillips J., Gangolli Sh. // Toxicol. appl. Pharmacol. — 1981. — Vol. 60, N 2. — P. 229—240.
67. Okonjo K., Taiwo A., Balogun M., Ekisola O. // Biochim. biophys. Acta. — 1979. — Vol. 576, N 1. — P. 30—38.
68. Paetkau V., Lardy H. // J. biol. Chem. — 1967. — Vol. 242, N 9. — P. 2035—2042.
69. Rosemeyer M., Huehns E. // J. molec. Biol. — 1967. — Vol. 25, N 2. — P. 253—273.
70. Rostan S. // Nature. — 1962. — Vol. 194. — P. 1079.
71. Scornik O., Hoagland M., Pfeffer-Korn L., Bishop E. // J. biol. Chem. — 1967. — Vol. 242, N 1. — P. 131—139.
72. Sedlak J., Hanus L. // Endocr. exp. — 1982. — Vol. 16, N 2. — P. 103—109.
73. Sengupta K., Chatterjee A., Ghosh cB. // Int. J. Vitam. — 1978. — Vol. 48, N 2. — P. 152—158.
74. Subramanian N. // Agents a. Actions. — 1978. — Vol. 8, N 5. — P. 484—487.
75. Szabo I., Prager P., Zsoldos T. et al. // Acta physiol. Acad. Sci. hung. — 1980. — Vol. 56, N 1. — P. 132.
76. Tse D., McCreery R., Adams R. // J. med. Chem. — 1976. — Vol. 19, N 1. — P. 37—40.
77. Williams R. // Biochem. Soc. Trans. — 1978. — Vol. 6, N 6. — P. 1123—1126.
78. Witt I. // Z. Kinderheilk. — 1972. — Bd 113, N 1. — P. 71—80.
79. Zanetti G. // Arch. Biochem. — 1979. — Vol. 198, N 1. — P. 241—246.

Поступила 04.06.87

УДК 616-008.932.84-074

С. П. Аникеева

## ОРГАНОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ЧЕРТЫ МЕТАБОЛИЗМА КЕТОНОВЫХ ТЕЛ В ТКАНЯХ (Обзор)

Всесоюзный научно-исследовательский центр по охране здоровья матери и ребенка  
Минздрава СССР, Москва

В настоящее время накоплен обширный фактический материал, доказывающий большое физиологическое значение кетоновых тел (КТ) ацетоацетата и  $\beta$ -оксибутирата в энергетическом обмене в качестве субстратов для целого ряда тканей. Помимо этого, КТ могут выступать в качестве регуляторов метаболизма, но в литературе этот аспект освещен недостаточно. Рассмотрим особенности метаболизма КТ в жировой ткани, тканях мозга, почках, мышцах и эмбриональных тканях.

**Жировая ткань (ЖТ).** Ацетоацетат является субстратом окисления для жировых бляшек эпидимальной ткани крыс, способным обеспечить до 50 % тканевого дыхания. На изолированных адипоцитах из подкожной жировой клетчатки человека, крыс и мышей показано включение радиоактивного уг-

лерода из меченого ацетата и  $\beta$ -оксибутирата в  $\text{CO}_2$  и жирные кислоты. Кроме того, ацетоацетат способен увеличивать включение метки из  $\text{U-C}^{14}$ -глюкозы (ГЛ) в  $\text{CO}_2$  и в триглицериды.

Интерес к метаболизму КТ в ЖТ в основном касается контроля обратной связи кетогенеза, индуцированного инсулином (ИН), и влияния КТ на липолиз. Гиперкетонемия у различных видов животных по-разному сказывается на секреции ИН. У собак она сопровождается увеличением секреции ИН, что приводит к снижению липолиза. У человека, крыс и мышей гиперкетонемия не приводит к повышению уровня ИН, хотя при этом концентрация свободных жирных кислот (СЖК) в плазме снижается. Последнее, по-видимому, может расцениваться как результат торможения КТ ли-

полиза в ЖТ. На эпидемальной ЖТ высокие концентрации КТ снижали скорость липолиза, индуцированного адреналином.

На введение ацетоацетата сытые, голодные и больные диабетом крысы реагируют однотипной реакцией — понижением концентрации СЖК в плазме. У крыс с диабетом и голодавших содержание глюкозы не изменилось, тогда как у здоровых (сытых и голодных) возросло содержание ИН. Очевидно, только у крыс с диабетом снижение СЖК является следствием прямого ингибирования липолиза. Голодание ведет к уменьшению синтеза и включения КТ в адипоциты. Таким образом, КТ являются регулятором липолиза по принципу обратной связи.

Следует учитывать роль ацетоацетата в метаболизме лейцина, который может выступать в качестве предшественника липидов в ЖТ крыс и мышей [4]. В ЖТ человека, крыс и мышей [8] ацетоацетат оказывает влияние на транспорт комплексов ацетил — КоА из митохондрий в цитозоль, способствуя контролю над липогенезом.

Такая альтернатива транслокации цитрата является важной видовой особенностью ЖТ человека и мыши, где активность АТФ — цитратлиазы низка и где в отличие от ЖТ крысы глюкоза не является основным предшественником при липогенезе [1].

При гиперкетонемических состояниях включение КТ в жирные кислоты адипоцитов с физиологической точки зрения является нежелательным, так как ресинтез жирных кислот в адипоцитах из КТ при таких обстоятельствах — энергетически расточительный цикл.

**Мозг.** В мозге больных, страдающих ожирением, при продолжительном голодании возникает значительная артериовенозная разница по КТ [21]. Катетеризация сосудов мозга показала, что скорость окисления глюкозы составляет 24 г в день, а КТ — 37 г в день. В этих условиях до 75 % всего потребленного мозгом  $O_2$  используется на окисление КТ.

У крыс при голодании потребление  $O_2$  в 5 раз ниже, чем у человека. На окисление КТ мозг крысы расходует от 14 до 25 % всего потребленного мозгом  $O_2$  [20].

Ферменты утилизации КТ в тканях головного мозга

Фермент	Активность, мкмоль/мин на 1 г сырой массы при 25 °C	
	мозг человека	мозг крысы
3-Оксibuтиратдегидрогеназа	0,31	0,57
3-Кетокислота-КоА-трансфераза	1,63	2,53
Ацетоацетил-КоА-тиолаза	1,88	2,40

В утилизации КТ в мозге крысы и человека участвует ряд ферментов (см. таблицу).

Поглощение КТ в мозге человека и крысы пропорционально их концентрации в артериальной крови [24]. Потребление ацетоацетата преобладает над 3-гидроксibuтиратом [10].

Проницаемость сосудов мозга для КТ не является величиной неизменной, она может увеличиваться после жировой диеты или голодания свыше 3-х суток [13]. Этим, возможно, объясняется ускоренное поглощение  $\beta$ -гидрооксibuтирата при перфузии мозга у голодных крыс независимо от его концентрации в артериальной крови.

У взрослой собаки, свиньи и овцы [13] мозг не использует КТ, что связывают с малым его размером относительно общей массы тела.

КТ важны в неонатальном периоде развития мозга, когда с материнским молоком поступает большое количество жира и концентрация КТ в крови высока [14]. Поглощение КТ мозгом крыс-сосунков в 3—4 раза выше, чем у взрослых крыс [5], что было показано на срезах и гомогенатах [31]. Потребление КТ мозгом новорожденных и детей в 4 раза выше, чем у взрослых [24]. Активность  $\beta$ -гидрооксibuтират дегидрогеназы,  $\beta$ -оксоацил-КоА трансферазы и митохондриальной ацетоацетил-КоА тиолазы низка в мозге эмбриона крысы, но после рождения она повышается, достигая максимума в период молочного вскармливания, а после его прекращения снижается, приближаясь к уровню активности у взрослых крыс [32]. Аналогичный процесс происходит с проницаемостью сосудов мозга крысы для КТ.

У человека активность ферментов утилизации КТ в мозге в период между детством и зрелостью изменяется в незначительной степени [6]. Можно рассматривать пониженную утилизацию КТ мозгом человека в течение всего периода детства как результат уменьшения проницаемости сосудов мозга для КТ.

Данные о совпадении периода наивысшей скорости утилизации КТ с периодом высокой скорости синтеза жирных кислот и холестерина приводят к предположению, что КТ могут быть важным субстратом синтеза липидов в развивающемся мозге [32]. Меченый гидроксибутират включается в стеролы, фосфолипиды и жирные кислоты в мозге эмбрионов крысы и крысят-сосунков (в возрасте от 9 до 18 дней). Ацетоацетат и гидроксибутират включались в липиды срезов коры мозга крысят-сосунков [2] и эмбрионов человека [27]. Ацетоацетат может образовывать ацетил-КоА в цитозоле через реакции, катализируемые ацетоацетил-КоА синтетазой и ацетоацетил-КоА тиолазой при синтезе жирных кислот и холестерина. В период развития нарастает активность как этих двух цитозольных ферментов, так и синтетазы жирных кислот [29], в отличие от АТФ цитратлиазы, активность которой остается постоянной в течение всего периода развития мозга [4]. Включение ацетоацетата в липиды в цитозоле не требует образования цитозольного ацетил-КоА из цитрата [22].

Присутствие в качестве единственного субстрата КТ, ГЛ или пирувата повышает потребление  $O_2$  в срезах мозга в одинаковой степени, при этом КТ в основном подвергаются окислению [6, 23]. ГЛ увеличивает включение КТ в липиды мозговой ткани и обычно стимулирует их окисление. КТ не тормозят потребление ГЛ мозгом. Под их действием превращение ГЛ в  $CO_2$  и в липиды снижается, окисление пирувата ингибируется, а образование лактата из ГЛ возрастает. При голодании выход лактата из мозга крысы увеличивается, а активность пируватдегидрогеназы в гомогенатах мозга снижается. Между торможением пируватдегидрогеназы в мозге человека после 15—20-часового голодания, потреблением КТ и долей ГЛ, превращающейся в лактат и пируват, имеет-

ся корреляция [11]. Снижение крутизны линейного соотношения между потреблением и концентрацией глюкозы в перфузируемом мозге крысы под действием  $\beta$ -гидроксибутирата свидетельствует о том, что КТ ответственны, по крайней мере частично, за снижение общего потребления ГЛ мозгом крысы.

Таким образом, метаболизм КТ в тканях мозга имеет выраженную видовую специфичность. При гиперкетонемических ситуациях возможно использование КТ для энергообеспечения мозга. В период усиленной миелинизации нервной ткани КТ используются на синтетические процессы. Состояние гематоликворного барьера является существенным моментом в формировании метаболических процессов в мозге.

**Эмбрион.** Считают, что основным субстратом окисления у эмбриона млекопитающих — ГЛ, поставляемая матерью [25]. Однако у человека концентрация КТ в крови матери увеличивается в последней трети беременности и может достигать значительного уровня в период родов, особенно продолжительных [30]. Концентрация КТ в крови крыс при беременности обычно не увеличивается. У крыс при голодании на 18—19-й день беременности наблюдается более быстрое развитие гиперкетонемии, чем в контрольной группе небеременных крыс. Как у человека, так и у крысы имеется выраженная корреляция между концентрацией КТ в крови матери и плода, при этом трансплацентарный градиент указывает, что транспорт КТ от матери к плоду происходит с такой же легкостью, как и транспорт глюкозы.

В поздние сроки беременности, когда масса эмбриона быстро возрастает, активность ферментов утилизации КТ увеличивается в плаценте, а также в мозге, почках и печени плода человека и крыс [17, 23], выявлена возможность окисления  $\beta$ -гидроксибутирата печенью и мозгом плода, а также плацентой. Печень плода частично обладает свойствами внепеченочных тканей, однако последние окисляют КТ с меньшей скоростью, чем ткани взрослого человека. В опытах с введением  $3-^{14}C$ -гидроксибутирата беременным крысам (21 день) было показано, что меченые КТ, пройдя через плаценту,

используются для синтеза жирных кислот и холестерина в различных тканях плода. С точки зрения тканевой специфичности направленности движения КТ заслуживает внимания тот факт, что включение радиоактивной метки в липиды плода в несколько раз превышает таковое в липиды матери [25]. Поскольку эмбрионы и человека и крысы [6, 16] обладают низкой способностью к кетогенезу и образованию ГЛ, то возможно, что КТ, поступившие из сосудистого русла матери, являются важным субстратом, поддерживающим скорость роста плода при 48-часовом голодании. Напротив, жирные кислоты не могут выполнять подобной метаболической роли у плода, так как они не проникают через плаценту человека и крысы, и их концентрация в крови эмбриона крысы низка. Измерения трансплацентарной артериовенозной разницы у человека показали, что в норме энергия, образованная за счет КТ, составляет только около 6 % от энергии, образованной при окислении ГЛ.

**Почки.** Показано снижение потребления ГЛ при перфузии переживающей почки ацетоацетатом [18]. Для почек крыс и человека КТ могут служить субстратом окисления. На срезах коркового вещества почки крысы установлено, что ацетоацетат легко поглощается и до 80 % его способно окисляться. При использовании в качестве субстрата  $\beta$ -оксипутирата на окисление расходуется до 50 % потребленного органом кислорода [21].

Лактат и пируват увеличивают потребление ацетоацетата в перфузируемой почке [22].

При хронических патологических состояниях, когда в почках имеет место торможение сукцинатдегидрогеназы, в митохондриях только  $\beta$ -оксипутират и  $\alpha$ -глицерофосфат способны восстановить деятельность дыхательной цепи. Ацетоацетат может усиливать процесс образования ГЛ в почке из различных его предшественников (глицерина, лактата, пирувата).

В почках имеется полный набор липолитических ферментов, а также ферментов, обеспечивающих синтез КТ. Интенсивная утилизация КТ сопровождается повышением концентрации ацетил-КоА и цитрата, тогда как количество фруктозофосфата и аденинуклеотидов не изменяется. Тем самым

подтверждается положение, что торможение фосфофруктокиназы возросшей концентрацией цитрата может увеличивать синтез глюкозы и снижать ее потребление [28].

При голодании суммарное потребление КТ почкой возрастает [19]. Печеночный глюконеогенез важен для поддержания определенной концентрации ГЛ при голодании [23]. ИН вызывает дефосфорилирование и активацию гликогенсинтетазы, гидроксиметилглутарил-СоА-редуктазы и аминоксил РНК-синтетазного комплекса, что важно для синтеза гликогена, КТ в почечной ткани. Рецепторы ИН принадлежат к числу протеинкиназ, которые могут фосфорилировать остатки кетогенной аминокислоты тирозина. Нефрэктомия снижает скорость исчезновения ИН из крови на  $2/3$ . В опытах на крысах, подвергнутых нефрэктомии, установлено, что за счет почек экстретируется до 30 % КТ [25]. Почка также может сохранять КТ путем увеличения скорости их реабсорбции.

**Мышца.** Функциональные различия мышц определяют различия в их метаболической активности и в реакции на КТ, что может быть частично связано с содержанием митохондрий в мышечных клетках [2].

При перфузии сердца крысы ацетоацетат поглощается и полностью окисляется. Глюкоза не влияет на утилизацию ацетоацетата сердцем, тогда как ацетоацетат снижает утилизацию ГЛ [27]. При действии ацетоацетата отмечается повышение концентрации цитрата и глюкозо-6-фосфата в сердце, а транспорт ГЛ и фосфорилирование наряду с окислением пирувата снижается.

Хотя КТ и способны уменьшать расход ГЛ в сердце человека, но при их физиологических концентрациях предпочтительным субстратом окисления являются СЖК. Использование жирных кислот как субстрата, альтернативного ГЛ, сердцем крысы ведет к изменениям его метаболизма, подобным тем, которые вызываются КТ. В условиях достаточного питания концентрация КТ мала, поэтому ГЛ и СЖК являются основными субстратами окисления для сердца. При увеличении количества КТ сердце способно утилизировать их, но при этом снижается потребление ГЛ и СЖК.

Диафрагма является специализиро-

ванной красной мышцей с высокой окислительной способностью, которая, подобно сердечной мышце, сокращается постоянно [16]. Диафрагма потребляет и окисляет  $\beta$ -гидрооксibuтират и ацетоацетат, причем 30 % последнего переходит в  $\beta$ -гидрооксibuтират [26];  $\beta$ -гидрооксibuтират снижает окисление ГЛ, но не влияет на общее потребление ГЛ диафрагмой.

Жирные кислоты вызывают изменения утилизации ГЛ и пирувата в диафрагме, характер которых подобен изменениям в мышце сердца, хотя степень выраженности последних существенно меньше. Можно предположить, что механизм контроля утилизации ГЛ КТ в диафрагме напоминает таковой в миокарде [20].

В скелетных мышцах человека и крыс КТ относительно легко поглощаются и могут влиять на потребление ГЛ [16, 21]. Бедренная мышца крысы составляет по весу около 75 % всех мышц животного, а скорость потребления ацетоацетата ею равна лишь 10 % скорости его потребления миокардом [12]. Для полного окисления КТ затрачивается 77 % всего  $O_2$ , потребленного бедренной мышцей крысы, подвергнутой 48-часовому голоданию. Ни ацетоацетат, ни жирные кислоты не влияют на потребление ГЛ или концентрацию цитрата в бедренной мышце крысы, хотя окисление лактата снижается, а пируватдегидрогеназа тормозится [3]. Даже в условиях, более близких к тем, которые имеют место в сокращающемся сердце (а именно, при повышении потребления ГЛ путем стимуляции седалищного нерва), ацетоацетат не оказывает значительного влияния на потребление ГЛ в бедренной мышце крысы [27]. Последняя представляет собой смесь мышечных волокон красного и белого типа. Ацетоацетат по-разному действует на камбаловидную мышцу — красную мышцу медленного сокращения, и длинный разгибатель пальцев — мышцу, состоящую на 50 % из красных волокон быстрого сокращения и на 50 % из белых волокон. В камбаловидной мышце крысы и мышце ацетоацетат и  $\beta$ -гидрооксibuтират ингибируют потребление ГЛ в присутствии ИН, причем концентрация цитрата и глюкозо-6-фосфата увеличивается. Однако в длинном разгибателе пальцев, где скорость гликолиза ниже, а

скорость потребления ацетоацетата та же, что и в камбаловидной мышце, ацетоацетат не влияет на потребление ГЛ и лишь незначительно снижает концентрации цитрата и глюкозо-6-фосфата.

Способность КТ ингибировать потребление ГЛ может быть связана со скоростью гликолиза, и поэтому при перфузии бедренной мышцы с ее смесью мышечных волокон различного типа влияние на медленные красные волокна (высокая скорость гликолиза) маскируется отсутствием влияния на волокна другого типа [19].

При изучении утилизации КТ скелетной мышцей человека использовали определение артериовенозной разницы в предплечье и голени. КТ могут быть важным субстратом для скелетной мышцы при кратковременном голодании, о чем свидетельствует тот факт, что у тучных людей, голодавших в течение 3 дней, для усвоения КТ мышцами предплечья потребовалось 50 % всего потребленного  $O_2$  [21]. Поглощение КТ мышцами предплечья у человека при кратковременном голодании пропорционально их артериальной концентрации. Доказательством того, что КТ способствуют экономии ГЛ, является линейная корреляция между поглощением КТ и долей поглощенной ГЛ, выделившейся в виде лактата и пирувата. При продолжительном голодании (24 дня) утилизация КТ снижается, несмотря на то что КТ и СЖК в крови становятся энергетическим субстратом для мышц. Это может отражать снижение активности ферментов утилизации КТ в мышце. КТ потребляются работающими мышцами предплечья и голени, но основным субстратом окисления в этих условиях являются ГЛ и СЖК; даже у больных диабетом, сопровождающимся гиперкетонемией, утилизация КТ требует лишь 4 % потребленного кислорода [15]. Возможно, что при диабете у человека имеет место снижение потребления КТ мышцами, подобное тому, которое существует у крыс. Увеличение способности скелетных мышц крыс к окислению КТ, как проявление адаптации к физической нагрузке, могло бы, при условии увеличения их концентрации, служить косвенным свидетельством того, что КТ являются «полезным топливом» для работающих мышц. Подобная

адаптация имеет место у человека, о чем свидетельствует снижение степени пострабочего кетоза у тренированных субъектов [8]. Вместе с тем, пострабочий кетоз может частично отражать повышение синтеза КТ в связи с возросшей концентрацией СЖК, что объясняется снижением их утилизации в момент прекращения работы с одновременным повышением кровоснабжения органов брюшной полости.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Angielski S., Lukowicz J.* // Amer. J. clin. Nutr. — 1978. — Vol. 31. — P. 1635—1641.
2. *Aklano M. A. et al.* // J. Histochem. — 1978. — Vol. 21. — P. 51—58.
3. *Berger M. S. A. et al.* // Biochem. J. — 1976. — Vol. 158. — P. 191—202.
4. *Buckey B. M., Williamson D. H.* // Ibid. — 1973. — Vol. 132. — P. 653—659.
5. *Dahlquist G., Persson B.* // Pediatr. Res. — 1976. — Vol. 10. — P. 910—917.
6. *Edman J., Nancy A. et al.* // Fed. Proc. — 1985. — Vol. 44. — P. 2359—2364.
7. *Clark Andea Res. Resour. Rep.* — 1987. — Vol. 11, № 3. — P. 1—5.
8. *Fets P. W.* // Med. Clin. N. Amer. — 1983. — Vol. 67. — P. 831—843.
9. *Francoise F., Edmond B.* // Amer. J. Physiol. — 1983. — Vol. 245. — P. E—318—E—325.
10. *Hanson R. W.* // Arch. Biochem. — 1965. — Vol. 109. — P. 98—103.
11. *Hawkins R. A., Williamson D. H., Krebs H. A.* // Biochem. J. — 1971. — Vol. 122. — P. 13—18.
12. *Haymanal H. et al.* // Amer. J. Physiol. — 1983. — Vol. 245. — P. E-373—E-378.
13. *Jedde G., Crone C.* // Ibid. — 1975. — Vol. 229. — P. 1165—1169.
14. *Ingebrigtson T. S., Gilson D. M.* // Molecular Aspects of Cellular Regulation / Ed. P. Cohen. — Amsterdam, 1980. — Vol. 1. — P. 63—93.
15. *Kisseban A. H., Tulloch B. R., Fraser T. R.* // Diabetologia. — 1974. — Vol. 10. — P. 69—75.
16. *Klug C. A. et al.* // J. biol. Chem. — 1985. — Vol. 257. — P. 4688—4691.
17. *Kummel I.* // Biosci. Rep. — 1983. — Vol. 3. — P. 643—646.
18. *Meikle D., Klain G. I.* // Amer. J. Physiol. — 1972. — Vol. 222. — P. 1246—1250.
19. *Meizel S. et al.* // Biochem. J. — 1977. — Vol. 162. — P. 557—568.
20. *Ньюсхолм Э., Старт К.* Регуляция метаболизма: Пер. с англ. — М., 1977. — С. 276.
21. *Owen O. E., Reichard G. A.* // Israel. J. med. Sci. — 1975. — Vol. 11. — P. 250—270.
22. *Pater M. S., Ovven O. E.* // Biochem. J. — 1976. — Vol. 154. — P. 319—325.
23. *Pascal F. et al.* // Ibid. — 1983. — Vol. 214. — P. 937—942.
24. *Parker P. J., Caudwell F., Cohen P.* // Europ. J. Biochem. — 1983. — Vol. 130. — P. 227—257.
25. *Persson B. G., Settergren S., Dahlquist G.* // Acta paediat. scand. — 1972. — Vol. 61. — P. 272—278.
26. *Sescombe D. W., Harding P. G. R., Possamayer Y. J.* // Biochim. biophys. Acta. — 1977. — Vol. — 488. — P. 402—416.
27. *Soling H. D. et al.* // Horm. Metab. Res. — 1970. — Vol. 2. — P. 56—61.
28. *Taegtmeyer H.* // Basic Res. Cardiol. — 1983. — Vol. 78. — P. 435—450.
29. *Underwood A. H., Newsholme E. A.* // Biochem. J. — 1967. — Vol. 104. — P. 300—303.
30. *Volpe J. J., Kishimoto Y.* // J. Neurochem. — 1972. — Vol. 19. — P. 739—753.
31. *Williamson D.* // Fed. Proc. — 1985. — Vol. 44. — P. 2342—2346.
32. *Yeh Y.-Y., Streuli V. L., Lee P.* // Lipids. — 1977. — Vol. 12. — P. 957—964.
33. *Yeh Y.-Y., Sheehar P.* // Fed. Proc. — 1985. — Vol. 44. — P. 2352—2358.

Поступила 25.05.87

УДК 616.89-07:616.153.1:577.152.14.042.2]-074

Л. Н. Овчинникова

### ПРИРОДНЫЕ МОДУЛЯТОРЫ ФУНКЦИЙ АМИНОКСИДАЗ (Обзор)

Всесоюзный научный центр медико-биологических проблем наркологии Минздрава СССР, Москва

За последние годы резко возрос интерес исследователей к изучению природы и свойств аминоксидаз [47]. Особенно большое внимание в связи с медицинскими проблемами уделяется флавиновым аминоксидазам — моноаминоксидазам (МАО), а также медьсодержащим — диаминоксидазам (ДАО) и бензиламиноксидазам плазмы крови. Специфические, избирательно действующие синтетические ингибиторы МАО находят все более широкое применение в медицинской практи-

ке [1]. Одновременно во многих лабораториях развиваются исследования еще малоизученных природных модуляторов (активаторов и в особенности ингибиторов) аминоксидаз.

Целью настоящего обзора является обсуждение современных достижений в этой области. Мы не останавливаемся на вопросах гормональной регуляции функций аминоксидаз, которые были рассмотрены в другой обзорной статье [6].



В истории изучения аминоксидаз как ферментов известны попытки обнаружения в биологических объектах природных факторов, воздействующих на функции МАО [5, 34]. Так, термолабильный природный ингибитор МАО (субстратом служил дофамин) в митохондриях печени крысы был обнаружен в каротидном синусе, а также в мозговом слое надпочечника (но не в верхнем шейном симпатическом ганглии) кошки [48].

Современные достижения в разработке этой проблемы связаны с изучением медико-биологических аспектов психиатрии и невропатологии. После вызвавших большой интерес [54] сообщений о снижении при шизофрении активности МАО в тромбоцитах [27] были предприняты исследования с целью проверить предположение о возможном появлении природного ингибитора МАО в крови тех больных шизофренией, у которых активность МАО в тромбоцитах была снижена [19]. Было обнаружено, что инкубация тромбоцитов крови здорового человека с обедненной тромбоцитами плазмой крови больных с хронической формой шизофрении, у которых активность МАО в тромбоцитах значительно уменьшена по сравнению с нормой, сопровождалась существенным снижением величин максимальной скорости реакции ( $V_m$ ) и кажущейся константы Михаэлиса ( $K_m$ ) в пробах с дофамином или N,N-диметилтриптамином в качестве субстратов. При этом отношение  $K_m/V_m$  не изменялось; на графиках зависимости скорости реакции от концентрации субстрата, построенных методом двойных обратных величин по Лайнуиверу — Берку, все линии были взаимно параллельны, что указывает на бесконкурентный тип ингибирования. Предварительный диализ (против 200-кратного объема 0,9 % раствора хлорида натрия pH 5,5 в течение 3 ч при комнатной температуре) предотвращал воздействие плазмы крови на активность МАО в тромбоцитах [19], что свидетельствует о низкомолекулярной природе возможного эндогенного ингибитора МАО. Если предположить, что такой ингибитор образует трудно диссоциирующие комплексы со структурами биомембран и (или) с молекулами МАО, то можно легко объяснить известные факты невозможности нормализации активности тромбоцитарной МАО

больных шизофренией путем диализа или гель-фильтрации [34].

Предположение о существовании у больных шизофренией со сниженной активностью МАО в тромбоцитах природных ингибиторов МАО в плазме крови [19] было встречено критически. Отмечали, что плазма крови клинически здоровых людей также ингибирует активность МАО в тромбоцитах [29], подобно плазме крови больных шизофренией. Сообщалось о стимуляции активности тромбоцитарной МАО под влиянием плазмы крови человека [55]. Наконец, были указания и на невозможность обнаружения каких-либо воздействий плазмы крови как клинически здоровых людей, так и больных с различными формами шизофрении на активность тромбоцитарной МАО [52]. Это объясняли, в частности, различиями в индивидуальной чувствительности тромбоцитарной МАО клинически здоровых людей к воздействию эндогенных ингибиторов плазмы крови больных с хроническими формами шизофрении [51].

В сыворотке крови человека, вероятно, одновременно присутствуют как относительно термостабильные (в течение 30 мин при 56 °C), но кислотолабильные (в присутствии 4 % хлорной кислоты при 4 °C в течение 20 мин) активаторы [4, 55], так и термолабильные, но кислотостабильные ингибиторы [4]. Соотношения между этими природными модуляторами активности мембраносвязанных МАО могут изменяться при патологических состояниях. Так, среди больных хроническим алкоголизмом выявлены 2 группы: 1) больные, сыворотка крови которых в относительно небольшой степени (менее чем на 50 %) обнаруживала активирующее действие на МАО (субстратом служил *n*-нитрофенилэтиламин) в гомогенате печени крысы, что, по-видимому, обусловлено повышенным содержанием в сыворотке крови термолабильного природного ингибитора; 2) больные, сыворотка крови которых в статистически достоверно большей степени по сравнению с сывороткой крови клинически здоровых людей активировала МАО в печени крысы (более чем на 50 %), что связано с повышенным содержанием термостабильных ингибиторов МАО. При абстинентном синдроме свойство сыворотки крови активировать МАО было выражено относительно

но слабо, что, по-видимому, обусловлено увеличением содержания природных ингибиторов. В пределириозном и делириозном состояниях свойства сыворотки крови стимулировать активность МАО либо резко снижены (за счет повышения содержания природных ингибиторов), либо умеренно повышены (за счет повышения содержания активаторов). Интересно, что, как показала Н. Б. Гамалея [4], у таких больных активаторы МАО были, по-видимому, качественно измененными, поскольку они утрачивали свою термостабильность.

В ходе дальнейшей разработки этой проблемы удалось получить новые свидетельства в пользу существования целого ряда природных белковых ингибиторов МАО типов А и В. Такие ингибиторы, обладающие относительно высокой молекулярной массой (от 4 до 30 кД), удалось обнаружить в плазме крови [17, 28, 29] и спинномозговой жидкости [18] человека.

В системах с тромбоцитами крови человека внесение в пробы общим объемом 700 мкл небольших количеств (100 мкл) плазмы крови человека приводило к стимуляции активности МАО (субстратом служил триптамин) [29]. Внесение больших количеств (500 мкл) плазмы крови человека в такие пробы сопровождалось ингибированием активности МАО, которое носило бесконкурентный характер по отношению к триптамину. Отделение путем ультрафильтрации через мембрану РМ 30 плазменных белков с молекулярной массой, превышавшей 30 кД, частично лишало плазму крови свойства ингибировать МАО в тромбоцитах; полное предотвращение ингибирования активности тромбоцитной МАО в подобных системах наблюдали после осаждения белков 0,4 н. хлорной кислотой [29]. Эти данные свидетельствовали о том, что альбумин крови человека (мол. масса 67 кД) не мог быть главным действующим началом в данных экспериментах. На это указывал факт стимулирования низкими концентрациями (1 мг/450 мкл) и, наоборот, ингибирования высокими концентрациями (45 мг/450 мкл) альбумина сыворотки крови быка активности МАО в пробах с тромбоцитами крови человека.

В системах с тромбоцитами циркулирующей крови человека ингибирование активности МАО (субстратом служил

триптамин) природным ингибитором из сыворотки крови человека носило бесконкурентный характер. В аналогичных системах с митохондриальными МАО из corpus striatum головного мозга быка ингибирование дезаминирования триптамина было неконкурентным и полностью предотвращалось ультрафильтрацией через мембрану РМ 30; ингибирование дезаминирования 5-окситриптамина (серотонина) также было неконкурентным и не предотвращалось ультрафильтрацией [29].

Было установлено далее, что плазма крови клинически здоровых людей и больных с хроническими формами шизофрении в практически равной мере ингибировала активность МАО (субстратом служил триптамин или серотонин) в тромбоцитах циркулирующей крови человека или митохондрий из с. striatum головного мозга быка [17]. При этом плазма крови клинически здоровых людей или больных шизофренией в меньшей мере снижала величины  $K_m$  и  $V_m$  в системах с МАО (субстратом служил триптамин) в тромбоцитах циркулирующей крови человека в тех случаях, когда активность тромбоцитной МАО была высокой по сравнению с теми клинически здоровыми или больными шизофренией людьми, у которых активность МАО в тромбоцитах была снижена или соответствовала норме. В опытах с митохондриальной МАО (субстратом служил серотонин) из с. striatum головного мозга быка было обнаружено, что плазма крови больных шизофренией в несколько меньшей мере снижала величины  $V_m$ , чем плазма крови клинически здоровых людей [17].

Методом гель-фильтрации через колонку с сефадексом G-50 удалось выделить из спинномозговой жидкости человека эндогенные белковые ингибиторы МАО типа А (субстратом служил серотонин) и МАО типа В (субстратом служил триптамин) [18]. Ингибиторы МАО типа А имели мол. массы порядка 35 или 3 кД; ингибиторы МАО типа В имели мол. массы 35, 14 или 7 кД. Обычно в спинномозговой жидкости клинически здоровых людей содержание ингибиторов МАО типа А было в 6 раз выше, чем содержание ингибиторов МАО типа В. Установили, что в тканях головного мозга человека или крысы также имеются избирательно действующие эндогенные ингибиторы



МАО типов А и В, близкие по величинам молекулярных масс к тем ингибиторам, которые были обнаружены в спинномозговой жидкости или в плазме крови человека. Местом биосинтеза природных белковых ингибиторов МАО, по-видимому, является печень, хотя не исключена возможность образования этих соединений не только на периферии, но и в ЦНС [28].

Для очистки эндогенных белковых ингибиторов МАО из плазмы крови человека были использованы методы гель-фильтрации, ионообменной и биоспецифической хроматографии [28]. Ингибитор МАО типа А, в 900 раз более очищенный, чем плазма крови, имел мол. массу 4 кД. В системах с разрушенными ультразвуком митохондриями из с. striatum головного мозга величина  $K_i$  для данного ингибитора составляла 4 мкМ (субстратом служил серотонин). Препараты ингибитора МАО типа А из плазмы крови человека термостабильны (в течение 5 мин при 95 °С), утрачивают ингибиторные свойства после инкубации в присутствии трипсина, не содержат остатков маннозы.

В значительно меньших концентрациях по сравнению с ингибиторами МАО типа А в плазме крови человека присутствуют также эндогенные белковые ингибиторы МАО типа В. Эти вещества характеризовались величинами мол. масс порядка 7, 14 и более 30 кД. В системах с МАО в тромбоцитах циркулирующей крови клинически здоровых людей эти ингибиторы проявляли конкурентные свойства по отношению к использованному в качестве субстрата трипсину, повышали величины  $K_m$ , но не изменяли величины  $V_m$  [28].

Полученные результаты указывают, таким образом, на наличие в плазме крови человека белковых факторов, неидентичных альбуминам, и обладающих свойствами не только ингибиторов МАО, но также, по-видимому, и стимуляторов активности этих ферментов. Такие природные факторы можно, следовательно, считать естественными модуляторами активности МАО в организме человека в норме и при патологических состояниях. Полагают, в частности, что характерное для алкоголизма, шизофрении, депрессивных состояний снижение активности тромбоцитарной МАО [27] может быть обусловлено по-

вышением концентрации эндогенных белковых модуляторов МАО в крови [28].

Наряду с эндогенными факторами белковой природы функции модуляторов активности МАО, по-видимому, могут выполнять и биологически активные пептиды [3, 9, 12]. В связи с этим представляются важными не только сведения о действии пептидов на активность препаратов МАО, но и данные о способности пептидов предотвращать (модулировать) качественное модифицирование каталитических свойств МАО типа А [5] в организме при патологических состояниях, сопровождающихся стимуляцией перекисного окисления липидов. Принципиальную возможность такого модулирующего эффекта биологически активных пептидов удалось показать в экспериментах с 9-членным пептидом дельта-сна [10].

Известно, что при холодовом стрессе, сопровождающемся стимуляцией перекисного окисления липидов в организме, не только происходит снижение активности МАО типа А (субстрат: серотонин) в митохондриях головного мозга крыс, но и отмечается предотвращаемое избирательным ингибитором МАО типа А хлоргилипом модифицирование свойств МАО типа А, о чем можно судить, в частности, по резкому (в 17 раз) повышению скорости дезаминирования глюкозамина [7]. Такое качественное модифицирование каталитических свойств МАО типа А, заключающееся в появлении способности катализировать дезаминирование аминсахаров и некоторых других азотистых соединений, имеет важное патогенетическое значение при повреждениях структуры и нарушениях проницаемости биомембран [8].

Оказалось, что введение крысам пептида дельта-сна (120 мкг/кг внутривентриально) предотвращало стимуляцию дезаминирования глюкозамина в митохондриях головного мозга при холодовом стрессе [10], не изменяя активность МАО типа А (субстратом служил серотонин). Такая защита МАО типа А при помощи пептида дельта-сна от качественного модифицирования каталитических свойств фермента при холодовом стрессе сопровождалась позитивными физиологическими эффектами.

Низкомолекулярный (мол. масса менее 0,5 кД) природный ингибитор(ы)

МАО был обнаружен в моче человека [23, 32]. Методами экстракции этилацетатом при различных величинах pH и ВЭЖХ были получены [23] очищенные препараты веществ, которые ингибировали активность МАО (субстратом служили  $\beta$ -фенилэтиламин, серотонин, тирамин) печени крысы, но не изменяли активность семикарбазидчувствительной бензиламиноксидазы (субстратом служил  $^{14}\text{C}$ -бензиламин) плазмы или сыворотки крови человека [38]. В исследованной системе с МАО печени крысы ингибирование окисления тирамина было конкурентным; реакция окисления серотонина обнаруживала несколько более высокую чувствительность к действию ингибитора, чем реакция окисления  $\beta$ -фенилэтиламина [23]. Одновременно исследуемый природный ингибитор МАО воздействовал на связывание бензодиазепинов (клоназепам, Ro 5-4846) с рецепторами ЦНС (головной мозг) и периферических органов (почки) [44]. В ходе применяемых для очистки процедур выделить природные ингибиторы активности МАО от соединений, воздействующих на рецепторы для бензодиазепинов, не удавалось [23]. Эти данные указывали на то, что ингибирование активности МАО и воздействие на рецепторы для бензодиазепинов обусловлены одним и тем же веществом, для обозначения которого был предложен [44] термин «трибулин» (от английского слова tribulation — страдание, несчастье).

Химическая природа трибулина еще не установлена. Имеются основания предполагать, что трибулин относится к числу индолов или их производных, например  $\beta$ -карболинов [31]. Трибулин экстрагируется из водной среды этилацетатом или гептаном, не разрушается при 100 °C (pH 1,0; 7,0 или 13,0) или при инкубации с папаином [23]. Трибулин широко распространен в биологических объектах [15]. Особенно высокая концентрация трибулина была обнаружена в симпатических нервных ганглиях (в противоположность надпочечникам!), значительно меньшая — в тканях головного мозга и сердца. Наличие трибулина было отмечено также в плазме крови и в продуктах секреции молочных желез человека, в тканях головного мозга крысы и быка, в моче коровы и крысы. Имеются данные о сходстве препаратов трибулина, полученных

из мочи человека и из мозга крысы, по ряду свойств (низкая молекулярная масса, экстрагируемость в нейтральной среде этилацетатом из водных растворов, поведение при ВЭЖХ) [33].

Установлено, что содержание трибулина в моче возрастает при стрессе и состояниях тревоги [23]. Так, в эксперименте на крысах было отмечено частично устраняемое бензодиазепинами нарастание содержания трибулина в моче при холодном или иммобилизационном стрессе [30]. У человека повышение уровня трибулина в моче обнаруживали при алкогольной абстиненции [20], а также после отмены назначений бензодиазепинов [41]. Полагают, что при стрессорных воздействиях повышение содержания трибулина в организме может играть роль защитного механизма, препятствующего истощению резервов катехоламинов [23].

Низкомолекулярными природными ингибиторами МАО являются [39] некоторые продукты обмена триптофана по кинурениновому пути, фармакологическая активность которых привлекает внимание исследователей на протяжении последних 10—15 лет [11, 35—37].

Так, было установлено [39], что хинолиновая (2,3-пиридиндикарбоновая) кислота угнетает активность МАО (субстратом служил кинурамин) в митохондриях синапсом из головного мозга человека, а также в митохондриальной фракции из печени человека. При ингибиторном анализе, проведенном с применением хлоргелина и депренила как специфических ферментактивируемых избирательных ингибиторов МАО типов А и Б [47], выявлено, что хинолиновая кислота, не изменяя активности МАО типа А, избирательно ингибировала функции МАО типа Б. С этим заключением согласуется тот факт, что хинолиновая кислота практически не ингибирует активность МАО в митохондриальной фракции плаценты человека, где содержится почти исключительно МАО типа А, тогда как содержание МАО типа Б относительно незначительно [13].

Хинолиновая кислота оказалась обратимо действующим ингибитором МАО, конкурентно, по данным кинетических исследований, блокировавшим реакцию дезаминирования кинурамина [39]. Величина  $K_i$  реакции окислительного дезаминирования кинурамина в системе с хинолиновой кислотой и со-

Влияние хинолиновой кислоты и родственных ей соединений на активность МАО типа Б митохондрий синапсом из головного мозга человека [39, 40]

Соединение	$K_i$ , мкМ
Хинолиновая (2,3-пиридиндикарбоновая) кислота	$1410 \pm 25$
Пиколиновая (2-пиридинкарбоновая) кислота	Нет ингибирования
Никотиновая (3-пиридинкарбоновая) кислота	$3970 \pm 110$
2,5-Пиридиндикарбоновая кислота	$1820 \pm 170$
2,6-Пиридиндикарбоновая кислота	$7500 \pm 120$
2-Пиридинкарбоксальдегид	$1870 \pm 135$
4-Пиридинкарбоксальдегид	$653 \pm 11$
3-Оксиантралиловая кислота	$935 \pm 40^*$
Ксантуреновая (4,8-диоксихинолин-2-карбоновая) кислота	$160 \pm 24^*$
Хинолин	$1360 \pm 181^*$
Хинальдин	$633 \pm 73^*$
Изохинолин	$61 \pm 5^*$
Хиназолин	$52 \pm 10^*$
Каиновая кислота	Нет ингибирования
Иботеновая кислота	То же

Примечание. Субстратом служил кинурамин, пробы содержали 1 мкМ хлоргелин. Представлены средние ( $M \pm m$ ) данные 3—4 измерений. Звездочка — ингибирование было неконкурентным по отношению к субстрату.

любиллизированными октил- $\beta$ -D-глюкопиранозидом митохондриями синапсом из головного мозга человека составляла  $565 \pm 35$  мкМ. В аналогичных опытах с несолубилизованными митохондриями  $K_i$  была равна  $1410 \pm 25$  мкМ, что обусловлено, по-видимому, затруднением проникновения хинолиновой кислоты через биомембраны [39].

Известно, что хинолиновая кислота, как один из природных метаболитов триптофана, была идентифицирована в тканях головного мозга человека [53]. Она весьма токсична [37, 49] и имеет такие фармакологические свойства, которые позволяют предполагать ее участие в механизме развития судорог [37], в повышении возбудимости ЦНС [49], в дегенерации нейронов, напоминающей явления, характерные для хореи Хантингтона [26, 45]. В механизме действия хинолиновой кислоты на активность МАО, по-видимому, важное значение имеет изменение конформации активного центра фермента [39]. С этим предположением согласуются данные об изменении физико-химических свойств биомембран под влиянием хинолиновой кислоты [24].

Из числа родственных ей соединений пиколиновая (2-пиридинкарбоновая) кислота не ингибирует активность МАО типа Б, но никотиновая (3-пиридинкарбоновая) обладает этим свойством, хотя и в меньшей мере, чем хинолиновая (см. таблицу).

Ксантуреновая кислота, а также хинолин, хинальдин и в особенности изохинолин и хиназолин обнаружили свойство угнетать активность МАО типа Б из митохондрий синапсом головного мозга человека, но ингибирование не было конкурентным в системах с кинурамином в качестве субстрата [39, 40]. Можно предположить, что подобное действие оказывала бы и кинуреновая кислота, свойство которой избирательно защищать мозг крыс от нейротоксического эффекта хинолиновой кислоты (но не каиновой или иботеновой кислот) было описано ранее [25]. Однако это предположение пока не проверено экспериментально.

Интересно отметить, что хинолин и хинальдин, которые, как известно, встречаются в каменноугольной смоле, оказались мощными конкурентными, избирательно действующими ингибиторами МАО типа А митохондрий синапсом головного мозга человека ( $K_i$   $31,7 \pm 1,5$  и  $14,1 \pm 0,6$  мкМ соответственно) [40]. Аналогичные результаты были получены также в опытах с митохондриальными МАО типа А плаценты человека [40].

Полученные результаты указывают, что такие природные метаболиты триптофана, как кинуренины, среди которых наиболее подробно изучены кинуренин, 3-окскикинуридин, 3-оксиантралиловая, антралиловая, хинолиновая, пиколиновая, ксантуреновая, пикотиновая кислоты и никотинамид [36], могут участвовать в регуляции активности МАО в организме.

Природные ингибиторы медьсодержащих аминоксидаз еще мало изучены. Имеются отдельные сообщения о существовании в растительных объектах факторов белковой или липопротеидной природы, ингибирующих активность аминоксидазы проростков гороха [43]. В ряде биологических объектов аминоксидазы не удавалось обнаружить, если природные ингибиторы не были предварительно разрушены добавлением неионного детергента тритона X-100 [46]. Имеется сообщение о наличии природного ингибитора бензил-

аминоксидазы в плазме крови человека [22]. Среди возможных низкомолекулярных ингибиторов ДАО внимание исследователей привлекали такие соединения, как оксалоацетат и пируват [42], ансерин и карпозин [21], а также гистамин [16].

Природный ингибитор активности ДАО (субстратом служил путресцин или гистамин) почек свиньи и растворимой аминоксидазы (субстратом служил бензиламин или спермидин) плазмы крови быка, но не МАО (субстратом служил триптамин) печени крысы удалось обнаружить в экстрактах индуцируемой метилхолантеном саркомы крыс [50]. Этот природный ингибитор, который был термостабилен, резистентен к действию трипсина, проникал сквозь диализационную мембрану (мол. масса 1,5—6 кД; по данным гель-фильтрации через сефадекс G-50), не был обнаружен в соединительной ткани здоровых крыс, но был найден в опухолевых тканях человека [50].

Дальнейшее изучение природных модуляторов аминоксидаз в норме и при патологических состояниях представляется актуальной проблемой, в частности в связи с изучением нейрохимических основ патогенеза алкоголизма и наркоманий [14]. Комплексная оценка состояния высоко- и низкомолекулярных модуляторов активности аминоксидаз может служить одним из подходов к раскрытию механизмов нарушений метаболизма дофамина и функций МАО, имеющих важное значение для наркологии [2].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Андреева Н. И., Горкин В. З., Машковский М. Д. // Хим.-фарм. журн. — 1985. — № 6. — С. 650—657.
2. Анохина И. П., Коган Б. М. // Теоретические основы поиска средств для лечения алкоголизма / Под ред. А. В. Вальдмана. — М., 1984. — С. 151—178.
3. Ашмарин И. П., Доведова Е. Л. // Докл. АН СССР. — 1980. — Т. 255, № 6. — С. 1501—1503.
4. Гамалей Н. Б. // Алкоголизм / Под ред. Г. В. Морозова. — М., 1981. — С. 75—81.
5. Горкин В. З. Аминоксидазы и их значение в медицине. — М., 1981.
6. Горкин В. З. // Вестн. АМН СССР. — 1986. — № 8. — С. 8—13.
7. Горошинская И. А. // Укр. биохим. журн. — 1985. — Т. 57, № 2. — С. 41—46.
8. Горошинская И. А. // Бюл. экспер. биол. — 1985. — № 6. — С. 672—674.
9. Доведова Е. Л., Ашмарин И. П. // Там же. — 1982. — № 5. — С. 56—58.
10. Кричевская А. А., Бондаренко Т. И., Горошинская И. А. и др. // Нейрохимия. — 1986. — Т. 5, № 4. — С. 408—412.
11. Лапин И. П. // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева. — 1976. — Т. 21, № 2. — С. 151—157.
12. Мышлякова Н. В., Клуша В. Е., Чипенс Г. И. // Хим.-фарм. журн. — 1981. — № 1. — С. 10—20.
13. Пеккель В. А., Куркель А. З. // Биохимия. — 1985. — Т. 50, № 2. — С. 189—299.
14. Anokhina I. P., Ivanetz N. N., Burov Yu. V., Kogan B. M. // Brit. J. Addict. — 1987. — Vol. 82. — P. 23—30.
15. Armando I., Glover V., Sandler M. // Life Sci. — 1986. — Vol. 38. — P. 2063—2067.
16. Beaven M. A., Shaff R. E. // Biochem. Pharmacol. — 1975. — Vol. 24. — P. 979—984.
17. Becker R. E., Giambalvo C. T. // Amer. J. Psychiat. — 1982. — Vol. 139. — P. 1567—1570.
18. Becker R. E., Giambalvo V., Fox R. A., Macho M. // Science. — 1983. — Vol. 221. — P. 476—478.
19. Berrellini W. H., Vogel W. H. // Amer. J. Psychiat. — 1978. — Vol. 135. — P. 605—607.
20. Bhattacharaya S. K., Glover V., Sandler M. et al. // Biol. Psychiat. — 1982. — Vol. 17. — P. 829—836.
21. Bieganski T., Osinska Z., Maslinski Cz. // Agents a. Actions. — 1982. — Vol. 12. — P. 41—46.
22. Buffoni F., Banchelli G., Ignesti G. et al. // Biochem. J. — 1983. — Vol. 211. — P. 767—769.
23. Elsworth J. D., Dewar D., Glover V. et al. // J. Neural Transm. — 1986. — Vol. 67. — P. 45—56.
24. Farmer B. I., Butterfield D. A. // Life Sci. — 1984. — Vol. 35. — P. 501—509.
25. Foster A. C., Vezzani A., French E. D., Schwarcz R. // Neurosci. Lett. — 1984. — Vol. 48. — P. 273—278.
26. Foster A. C., Whetsell W. O., Bird E. D., Schwarcz R. // Brain Res. — 1985. — Vol. 336. — P. 207—214.
27. Fowler C. J., Sääf J. // Structure and Functions of Amine Oxidases / Ed. B. Mondovi. — Boca Raton, Florida, 1985. — P. 249—261.
28. Giambalvo C. T. // Biochem. Pharmacol. — 1984. — Vol. 33. — P. 3929—3932.
29. Giambalvo C. T., Becker R. E. // Life Sci. — 1981. — Vol. 29. — P. 2017—2024.
30. Glover V., Bhattacharaya S. K., Sandler M., File S. E. // Nature. — 1981. — Vol. 292. — P. 347—349.
31. Glover V., Liebowitz J., Armando I., Sandler M. // J. Neural Transm. — 1982. — Vol. 54. — P. 209—218.
32. Glover V., Reveley M. A., Sandler M. // Biochem. Pharmacol. — 1980. — Vol. 29. — P. 467—470.
33. Glover V., Segarajasinghe C. E., Clow A. et al. // J. Pharm. Pharmacol. — 1984. — Vol. 36. — P. 12—13.
34. Gorkin V. Z. Amine Oxidases in Clinical Research. — Oxford, 1983.
35. Lapin I. P. // Pharmacopsychiatry. — 1973. — Bd 6. — S. 273—279.
36. Lapin I. P. // Trends pharm. Sci. — 1980. — Vol. 1. — P. 410—412.
37. Lapin I. P. // Epilepsia. — 1981. — Vol. 22. — P. 257—265.

38. Lewinsohn R., Böhm K. H., Glover V., Sandler M. // Biochem. Pharmacol. — 1978. — Vol. 27. — P. 1857—1863.
39. Naoi M., Ishiki P., Nomura Y. et al. // Neurosci. Lett. — 1987. — Vol. 74. — P. 232—236.
40. Naoi M., Nagatsu T. // Life Sci. — 1987. — Vol. 40. — P. 1075—1082.
41. Petursson H., Bhattacharaya S. K., Glover V. et al. // Brit. J. Psychiat. — 1982. — Vol. 140. — P. 7—10.
42. Quash G., Calogero H., Fossar N. et al. // Biochem. J. — 1976. — Vol. 157. — P. 599—608.
43. Rinaldi A., Floris G., Giartosio A. // Structure and Functions of Amine Oxidases / Ed. B. Mondovi. — Boca Raton, Florida, 1985. — P. 51—62.
44. Sandler M. // Trends pharm. Sci. — 1982. — Vol. 3. — P. 471—472.
45. Schwarcz R., Foster A. C., French E. D. et al. // Life Sci. — 1984. — Vol. 35. — P. 19—32.
46. Sindhu R. K., Desai H. V. // Phytochemistry. — 1980. — Vol. 19. — P. 317—321.
47. Singer T. // J. Neural Transm. — 1987. — Vol. 23. — P. 1—23.
48. Starlinger H. // Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. — 1977. — Bd 358. — S. 491—497.
49. Stone T. W., Parkins M. N. // Europ. J. Pharmacol. — 1981. — Vol. 72. — P. 411—412.
50. Szajko K., Bieganski T. // Recent Progress in Polyamine Research / Ed. L. Selmeci et al. — Budapest, 1985. — P. 339—347.
51. Vogel W. H., Ladman R. K., Berrettini W. H. // Schizophr. Bull. — 1980. — Vol. 6. — P. 232—234.
52. Wise C. D., Potkin S., Bridge P., Wyatt R. J. // Amer. J. Psychiat. — 1979. — Vol. 136. — P. 1336—1337.
53. Wolfensberger M., Amsler U., Cuenod M. et al. // Neurosci. Lett. — 1983. — Vol. 41. — P. 247—252.
54. Wyatt R. J., Potkin S. G., Bridge T. P. et al. // Schizophr. Bull. — 1980. — Vol. 6. — P. 199—207.
55. Yu P. H., Boulton A. A. // Life Sci. — 1979. — Vol. 25. — P. 31—36.

Поступила 28.01.88

УДК 616.63-008.6-07:[616.15:577.2]-074:543.594

Я. Ф. Ковалишин, В. Г. Николаев, Е. Я. Баран, И. А. Дударь,  
Л. А. Юшко

## ИССЛЕДОВАНИЕ СРЕДНЕМОЛЕКУЛЯРНОЙ ФРАКЦИИ ПЛАЗМЫ КРОВИ БОЛЬНЫХ С УРЕМИЕЙ С ПОМОЩЬЮ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ВЫСОКОГО ДАВЛЕНИЯ И ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Институт проблем онкологии АН УССР, НИИ урологии и нефрологии Минздрава  
УССР, Киев

Известно, что хроническая почечная недостаточность (ХПН) сопровождается накоплением в крови ряда низкомолекулярных веществ, таких, как мочевины, мочевая кислота, креатинин, гуанидин, амины, аминокислоты, фенолы и др., а также так называемых «средних молекул» (СМ) — веществ с мол. массой 300—5000 Д.

Механизм образования СМ и их избыточного накопления в плазме крови больных ХПН до сих пор полностью не выяснен. С накоплением СМ в крови связывают ряд таких тяжелых осложнений, сопровождающих болезнь, как перикардит, полинейропатия, психические нарушения, анемия, расстройства гемодинамики, сердечной деятельности и т. д. Химический состав СМ весьма разнообразен — он представлен пептидами, олигосахаридами, производными глюкуроновых кислот, органическими кислотами, спиртами [7—13]. Наиболее исследованным компонентом фракции СМ плазмы крови является пептид-

ный. Из плазмы крови больных ХПН, диализной жидкости и мочи выделен ряд пептидов, установлена их структура, исследовано биологическое действие. Именно с этим компонентом связывают симптомы, сопровождающие болезнь [5—10]. Некоторые авторы [1—3], называя СМ эндотоксинами пептидной природы, указывают на повышение их уровня на 1,5—2 порядка при различных патологических состояниях. Однако в большинстве публикаций, посвященных вопросу о СМ, основное внимание уделялось их фракционированию, изучению биологического действия, установлению структуры отдельных компонентов. Что касается количественной оценки, то проводилась она главным образом спектрофотометрически для всего пула среднемолекулярной фракции, без учета содержания отдельных компонентов. Самым распространенным методом фракционирования СМ является гель-фильтрация. В последнее время фракцию СМ плаз-

мы крови стали изучать с помощью ВЭЖХ, что позволяет улучшить разрешение фракционирования при одновременном сокращении времени анализа.

В настоящей работе СМ исследовали с помощью ВЭЖХ и ТСХ, при этом основное внимание уделяли выявлению пептидного компонента и его количественной оценке в плазме крови больных с ХПН.

### Методика

Исходным материалом для исследований служила кровь больных в терминальной стадии ХПН, находившихся на лечении программным гемодиализом в отделении трансплантации почек НИИ урологии и нефрологии Минздрава СССР. В контрольных исследованиях использовали плазму крови доноров. Плазму получали путем центрифугирования гепаринизированной крови при 3000 об/мин в течение 20 мин. Среднемолекулярную фракцию выделяли методом ультрафильтрации на приборе модели 8 МС («Amicon», США). В качестве мембран использовали диски, вырезанные из мембран клинических гемофильтров марки Sm 40003 фирмы «Sartorius» (ФРГ) с диапазоном пропускания пор 20 кД. Перед фильтрацией плазму разбавляли водой в 5 раз. Рабочее давление фильтрации составляло 1—1,5 атм. Хроматографическое исследование ультрафильтрата проводили сразу после фильтрации или после хранения его в замороженном состоянии в течение 1—2 нед. Предварительно было установлено, что хроматографическая картина от этого не изменяется.

ВЭЖХ проводили на приборе фирмы «Waters» (США), используя колонку «Protein» pak 1-60». В качестве подвижной фазы применили 0,02М трис-НСl (рН 7,0—7,2), скорость элюции составляла 1 мл/мин. Пептидные фракции регистрировали при длине волны 229 нм. Для сравнительной количественной оценки величины пиков на хроматограммах провели количественную калибровку системы по синтетическим пептидам ала-гли-гли, гли-лей и гли-тир. Величину и площадь пиков оценивали автоматически с помощью интегратора «Data module 730». Для накопления материала каждой фракции проводили 20 аналогичных разгонок, хроматографируя в общей сложности 5 мл ультрафильтрата, что соответствует в конечном счете 1 мл исходной плазмы. Элюаты пиков собирали в колбочки, выпаривали досуха на роторном испарителе при 40 °С. Сухой остаток растворяли в 1 мл воды и раствор рехроматографировали. Хроматографически гомогенные фракции собирали, выпаривали и снова растворяли в 1 мл деионизированной воды. Этот раствор использовали в дальнейшем для ТСХ, которую проводили на стеклянных пластинках размером 9×12 см с тонким слоем микрорекристаллической целлюлозы ЛТ («Chemapol», ЧССР). Пластины готовили наливным способом из суспензии — 1 г целлюлозы на 5 мл воды. В качестве свидетелей использовали растворы синтетических пептидов ала-гли-гли, гли-лей, гли-тир и аминокислот — глицина, аспарагиновой кислоты, фенилаланина, тирозина и лейцина. Хроматографию проводили восходящим

способом в системе растворителей изопропанол — уксусная кислота — вода (20:1:5). После высушивания в потоке теплого воздуха пластину опрыскивали 0,4% раствором нингидрина в этаноле.

Количественную оценку хроматографических пятен на пластинках осуществляли следующим способом: на пластину наносили по 20 мкл раствора исследуемых фракций и параллельно — растворы, содержащие по 1 и 5 мкг контрольных пептидов-свидетелей. Для гидролизатов фракций маркерами служили растворы перечисленных выше аминокислот. После ТСХ и проявления о приблизительном количестве исследуемых веществ судили по интенсивности пятен на пластинках. Часть раствора (0,5 мл) каждой фракции переносили в стеклянную ампулу и выпаривали на роторном испарителе досуха. Сухой остаток заливали 2 мл 5,7 н. НСl, ампулу запаивали и гидролизовали при 105 °С в течение 18—24 ч. Гидролизат переносили в колбочку и выпаривали досуха. Остаток растворяли в 2 мл деионизированной воды и снова выпаривали досуха, операцию проводили 2—3 раза для удаления следов кислоты. Далее остаток растворяли в 0,5 мл воды и использовали для дальнейших исследований.

### Результаты и обсуждение

В отличие от ультрафильтратов плазмы крови доноров, в хроматографической картине которых доминирует один четкий пик с временем удерживания 7,9—8,0 мин, ультрафильтраты плазмы крови больных ХПН в терминальной стадии делятся на 4 основные фракции (рис. 1). Пик 1 с временем удерживания 6,20—6,30 мин выходит в том же объеме элюции, что и вещества с мол. массой 10—15 кД; пик 2 (время удерживания 7,0—7,10 мин) соответствует веществам с мол. массой 5—10 кД; пик 3 (время удерживания 8,0—8,10 мин) — веществам с мол. массой до 5 кД; пик 4 (время удерживания 10,30—10,40 мин) соответствует элюционному объ-

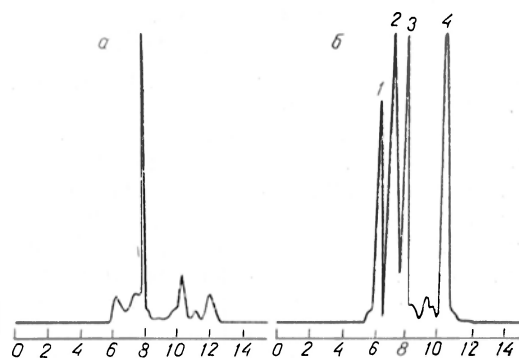


Рис. 1. Профиль элюции ультрафильтратов плазмы крови здоровых людей (а) и больных ХПН (б).

По оси абсцисс — время удерживания (в мин).  
Объем образца — 250 мкл.



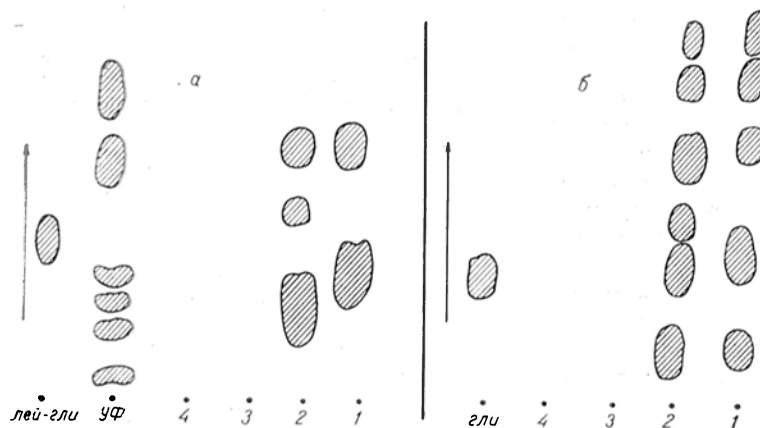


Рис. 2. Тонкослойная хроматография фракций (1—4) ультрафильтратов плазмы крови больных ХПН, полученных с помощью ВЭЖХ (а) и гидролизатов этих фракций (б).

ему соединений с мол. массой до 1 кД.

Аналогичная картина получена нами более чем для 30 больных. Не изменяется она качественно и после гемодиализа, однако отмечается количественное снижение на 40—50 % фракций 3 и 4; количество фракций 1 и 2 также снижается, но с большими индивидуальными колебаниями (20—60 %), мало зависящими от типа применяемой мембраны: купрофан, диалцель, ультрацель [4]. По объему элюции пик 4 соответствует креатинину, пик 3 нами не идентифицирован, в пике 2 присутствует мочевиная кислота, пик 1, как будет показано далее, представляет собой смесь соединений. По-видимому, профиль элюции среднемолекулярных фракций плазмы крови больных ХПН типичен для данной болезни.

Как уже отмечалось некоторыми исследователями [6, 15], гель-фильтрация на сефадексах такой сложной смеси, как ультрафильтрат плазмы крови, не может служить абсолютным критерием для определения молекулярной массы фракций, так как, помимо фракционирования по размеру молекул, существенный вклад вносят другие факторы, например, степень гидрофобности, ионные взаимодействия и др. Эти положения справедливы также и в случае разделения на колонках типа «Protein pak 1-60». Дополнительное применение других методов исследования, например изотохофореза, ВЭЖХ, ГЖХ и масс-спектрометрии [11, 14], показывает, что фракции СМ после гель-фильтрации содержат значительное количество низкомолекулярных веществ.

Для обнаружения пептидов во фракциях, полученных после ВЭЖХ, провели их анализ с использованием ТСХ. В результате обнаружены пятна аминокислот

в ультрафильтрате исходной плазмы (УФ) и по 2—3 слабых нингидринположительных пятна в фракциях 1 и 2. Фракции 3 и 4 нингидринположительных пятен не дают. С целью получения дополнительных данных о наличии или отсутствии пептидов в исследуемых фракциях проводили анализ их гидролизатов. Увеличение количества и интенсивности пятен на хроматограмме свидетельствовало бы о наличии пептидов. Однако после кислотного гидролиза отмечено увеличение количества пятен на хроматограмме фракций 1 и 2 без заметного увеличения их интенсивности. Во фракциях 3 и 4 нингидринположительные пятна отсутствуют (рис. 2). Средняя площадь пиков 1 и 2, полученная при хроматографии 250 мкл ультрафильтрата, равняется соответственно 10362 и 41919 усл. ед. Так как в пике 2 присутствует значительное количество мочевиной кислоты, светопоглощение которой близко к светопоглощению пептидов, для количественной оценки содержания последних

#### Результаты калибровки колонки «Protein pak 1-60»

Количество пептидов, нкг	Площадь пика, усл. ед	
	ала-гли-гли или гли-лей	гли-тир
500	24 453	—
250	12 087	—
125	6 524	—
50	3 308	72 607
25	1 620	39 791
12,5	—	21 804
5	—	9 647
2,5	—	4 738
1,25	—	2 539
0,5	—	1 239
0,25	—	497

более корректно использовать площадь пика 1. Как видно из результатов, представленных в таблице, площадь пика 1 соответствует площади пиков, содержащих примерно 200 мкг пептидов алифатических аминокислот, или площади пептида гли-тир, включающего ароматическую аминокислоту в количестве 5—6 мкг. Если допустить, что пик 1 содержит только пептиды, состоящие из алифатических аминокислот, то в итоге концентрация их в плазме крови составляет приблизительно 4 мг/мл, а с учетом материала пика 2 она равна 8 мг/мл, что не подтверждается результатами ТСХ. Если же предположить ароматический характер аминокислот в пептидах, то концентрация их в плазме крови больных ХПН должна составлять 100—200 мкг/мл. Однако и эти цифры, вероятно, завышены, так как во фракциях 1 и 2, кроме пептидов, содержатся, несомненно, и другие оптически активные компоненты.

Приблизительную оценку количества пептидов и аминокислот можно получить из визуального сравнения пятен на тонкослойных хроматограммах исследуемых фракций и стандартных пептидов. Таким образом, определено, что нингидринположительные зоны фракций 1 и 2 были слабее зон, содержащих 1 мкг любого из маркерных пептидов. Следовательно, содержание пептидов в плазме крови больных с уремией по результатам количественной оценки с помощью ТСХ составляет 40—60 мкг/мл. Эти величины представляются наиболее соответствующими реальному содержанию пептидов в исследуемом материале.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Галактионов С. Г., Николайчик В. В., Цейтин В. М., Михнева Л. М. // Хим.-фарм. журн. — 1983. — № 11. — С. 1386—1290.
2. Галактионов С. Г., Николайчик В. В., Михнева Л. М. и др. // Сорбционные методы детоксикации и иммунокоррекции в хирургии. — Ташкент, 1984. — С. 49—50.
3. Галактионов С. Г., Цейтин В. М., Леонова

- В. И. // Биоорг. химии. — 1984. — Т. 10, № 1. — С. 5—10.
4. Ковалышин Ф. Я., Баран Е. Я., Кремень М. Г. // Новые средства и сферы клинического применения сорбционной детоксикации организма. — Днепрпетровск, 1985. — С. 59—60.
5. Abiko T., Onodera I., Sekino H. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1979. — Vol. 89. — P. 813—822.
6. Asaba H., Bergström J., Fürst P. // Clin. Nephrol. — 1977. — Vol. 8. — P. 329—334.
7. Cuelli G., Man N. K., Sousse A. et al. // Artific. Organs. — 1980. — Vol. 4. — P. 28—32.
8. Dzurik R., Hupkova V., Černaček P. et al. // Clin. chim. Acta. — 1973. — Vol. 46. — P. 77—83.
9. Funk-Erentano J. L., Man N. K., Sousse A. et al. // Trans. Amer. Soc. artific. intern. Organs. — 1976. — Vol. 22. — P. 163—275.
10. Fürst P., Bergström J., Gordon A. et al. // Kidney int. — 1975. — Vol. 7. — P. 272—275.
11. Grof J., Menyhart J. // Analytical Isolachophoresis / Ed. F. M. Eversacts. — Amsterdam, 1981. — P. 99—107.
12. Le Moel G., Sirecker G., Cueille G. et al. // Artific. Organs. — 1980. — Vol. 4. — P. 17—21.
13. Le Moel G., Sirecker G., Troupe S. et al. // Ibid. — P. 37—41.
14. Menyhart H., Grof J. // Clin. Chem. — 1981. — Vol. 27. — P. 1712—1716.
15. Schoots C., Mikkers F. E. P., Claessens H. A. et al. // Ibid. — 1982. — Vol. 28. — P. 45—49.

Поступила 03.02.87

#### ANALYSIS OF MIDDLE MOLECULAR FRACTION IN BLOOD PLASMA OF PATIENTS WITH UREMIA BY MEANS OF HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY AND THIN LAYER CHROMATOGRAPHY

J. F. Kovalyshin, V. G. Nikolaev, E. J. Baran, I. A. Dudar, L. A. Jushko

Institute for Oncology Problems, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Institute of Urology and Nephrology, Ministry of Public Health of the Ukrainian SSR, Kiev

Detection and quantitative estimation of peptides were carried out in the middle molecular fraction of blood plasma from patients with uremia using high performance liquid chromatography and thin-layer chromatography. The middle molecular fraction was separated into four fractions after ultrafiltration through a column of Protein Pak i-60. As low as 40—60 mcg/ml of the peptides were detected in the first and second fractions.



В. В. Банкова, Т. М. Никанорова, С. Д. Поляков, Т. А. Тагиева

# ДЕГРАДАЦИЯ МАЛОНОВОГО ДИАЛЬДЕГИДА В ЭРИТРОЦИТАХ И ЕЕ ВОЗРАСТНЫЕ, СЕЗОННЫЕ И СУТОЧНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ

НИИ педиатрии АМН СССР, Москва

Образование малонового диальдегида (МДА), продукта перекисного окисления липидов (ПОЛ), сопровождается и его распадом [3]. Содержание МДА в эритроцитах крови и тканях зависит от скоростей его образования и метаболизма [2, 3, 5, 15]. Повышение содержания МДА в организме может быть следствием не только высокой интенсивности его образования, но и уменьшения скорости его распада.

МДА при его введении в организм быстро метаболизируется в тканях до  $\text{CO}_2$  и ацетата [13, 15]. В митохондриях печени *in vitro* отмечается его распад при участии альдегиддегидрогеназы (КФ 1.2.1.3) [7, 14, 15]. В эритроцитах имеется цитозольная форма альдегиддегидрогеназы [10]. В настоящей работе исследована интенсивность деградации МДА в эритроцитах, изучены ее возрастные, сезонные и суточные изменения у здоровых людей.

## Методика

Обследовано 20 здоровых новорожденных детей первых 5 дней жизни, 20 детей 5—6-летнего возраста, 18 детей 8—14 лет, 8 взрослых 18—28 лет и 6 взрослых 35—49 лет. Последняя группа обследована неоднократно в разное время года.

МДА был приготовлен из синтезированного в Московском институте тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова на кафедре органической химии 1, 1, 3, 3-тетраметоксипропана кислотным гидролизом 0,1 н.  $\text{HCl}$  в течение 3 мин с последующей нейтрализацией [12] и разведен в трис- $\text{HCl}$ -буфере pH 7,4 так, чтобы в 10 мкл содержалось 10 мкмоль МДА.

Периферическую кровь (4—5 капель) помещали в смесь цитрата натрия с физиологическим раствором (20 мл 0,2 н. цитрата натрия и 80 мл физиологического раствора) и после двукратного промывания эритроцитов физиологическим раствором готовили 5% взвесь в 25 мМ трис- $\text{HCl}$ -буфере pH 7,4 с добавлением  $\text{KCl}$  [1]. К 0,4 мл этой взвеси добавляли 0,45 мл буфера и 10 мкл раствора МДА. Параллельно готовили пробу эритроцитов без добавления экзогенного МДА и контрольную пробу, в которой МДА добавляли в 0,85 мл трис- $\text{HCl}$ -буфера. Все три пробы инкубировали в течение 2 мин при 37°C. По нашим данным, МДА преимущественно распадается в течение первых 10 с; после 1—2 мин инкубации кинетическая кривая распада МДА

переходит в плато. После инкубации проводили реакцию с тиобарбитуровой кислотой и спектрофотометрировали на СФ-26 при 2 длинах волн: 532 и 600 нм. Необходимость проведения измерений при 600 нм показана в работе [9]. Интенсивность деградации МДА вычисляли по формуле

$$D = \frac{M_0 - M_1 + M_2}{M_0} \cdot 100,$$

где  $D$  — интенсивность деградации МДА, %;  $M_0$  — величина, пропорциональная концентрации МДА в контрольной пробе без эритроцитов (оптическая плотность);  $M_1$  — суммарное содержание экзо- и эндогенного МДА (оптическая плотность);  $M_2$  — содержание эндогенного МДА в эритроцитах (оптическая плотность). Кроме того, вычисляли индекс  $D/M$  [интенсивность деградации МДА/содержание МДА в эритроцитах (нмоль/10<sup>6</sup> эритроцитов)]. В части исследований был определен деформационный индекс (или индекс фильтруемости) по способности эритроцитов растекаться по фильтру Simpor с диаметром пор 5 мкмикронов. Деформационный индекс вычисляли по формуле  $\left[ \frac{a-b}{b} \right]$ , где  $a$  — диаметр растекания второго пятна в 1 мин,  $b$  — диаметр растекания первого пятна в 1 мин [16].

Полученные данные обработаны методом вариационной статистики по Стьюденту, проведен корреляционный анализ.

## Результаты и их обсуждение

Полагают, что в метаболизме МДА участвует низкоспецифическая альдегиддегидрогеназа [7, 14, 15]. Мы обнаружили, что при сниженной интенсивности деградации МДА ее увеличение может происходить даже при добавлении в содержащие эритроциты пробы и других дегидрогеназ (Г-6-ФДГ и алкогольдегидрогеназы). Добавление продуктов метаболизма МДА — малоновой и уксусной кислот — в пробу в количестве 50—200 мкмоль (что не изменяло pH среды) достоверно уменьшало интенсивность деградации от  $29,9 \pm 3,6$  до  $17,5 \pm 3,93$  %;  $p < 0,05$ ). Возможно, что в процессе деградации МДА участвуют и неферментативные факторы.

Интенсивность деградации МДА в эритроцитах людей в зимний или ранне-весенний периоды имела возрастные особенности (см. таблицу). У новорож-

# Возрастные изменения степени деградации МДА

Возраст обследованных	Число обследованных	МДА, нмоль/10 <sup>6</sup> эритроцитов	Степень деградации, МДА, %	Индекс Д/М
1-й день	11	1,21±0,17	26,8±2,79	18,55±3,13
4—5-й день	9	0,87±0,20	21,6±4,5	28,8±4,38
5—6 лет	20	1,73±0,17*	36,0±3,42*	21,7±2,27
8—12 лет	8	1,69±0,15*	40,3±1,13*	25,2±3,29
18—28 лет	8	1,34±0,20	27,9±4,7	21,7±4,3
35—49 лет	6	2,88±0,26**	14,7±1,6**	5,5±1,13**

Примечание. Одна звездочка — различие достоверно по сравнению с группами новорожденных детей ( $p<0,05$ ); две — различие достоверно по сравнению со всеми другими возрастными группами.

денных детей интенсивность деградации МДА достоверно ниже, чем у детей 5—6 и 8—12 лет, но выше, чем у взрослых людей 35—49 лет. У людей последней возрастной группы обнаружены наибольшее содержание МДА и наименьшая интенсивность его деградации в эритроцитах.

Корреляционный анализ выявил возрастные различия во взаимосвязях между содержанием МДА и интенсивностью его метаболизма. Так, у новорожденных, детей 5—6 и 8—14 лет существует достоверная корреляционная зависимость между этими показателями (соответственно  $r=+0,57$ ,  $p<0,05$ ,  $r=+0,53$ ,  $p<0,05$  и  $r=+0,56$ ,  $p<0,05$ ). Интенсивность деградации МДА возрастала с увеличением содержания МДА в эритроцитах. У взрослых людей до 30-летнего возраста эта связь становится недостоверной ( $r=+0,36$ ), а в возрасте 35—49 лет исчезает. Возможно, у взрослых людей последней возрастной группы содержание МДА определяется степенью его связывания с аминокруппами белков и фосфолипидов. Установлено, что с возрастом увеличивается концентрация шиффовых оснований, липофусциноподобных пигментов, представляющих собой в основном связанные с белками и липидами МДА [4, 6, 17].

Тесная связь между интенсивностью деградации МДА и его содержанием указывает на то, что интенсивность метаболизма МДА может варьировать в зависимости от скорости образования МДА (скорости ПОЛ). Поэтому представляло интерес вычислить индекс Д/М, который указывал бы на истинную способность клетки «избавляться» от МДА: чем выше этот индекс, тем активнее процессы деградации МДА. Оказалось, что у новорожденных первого дня жизни индекс Д/М несколько

ниже, чем у новорожденных 4—5 дней, несмотря на более высокую интенсивность деградации. Это указывает на некоторую недостаточность деградации МДА у новорожденных 1-го дня жизни. Индекс Д/М менее подвержен возрастным изменениям по сравнению с величиной МДА и интенсивностью его метаболизма. Лишь у людей в возрасте 35—49 лет этот показатель существенно снижен.

Тот факт, что интенсивность деградации МДА может изменяться в зависимости от концентрации МДА в эритроцитах, подтверждается при обследовании школьников 8—12 лет ранним утром в летний период: в их эритроцитах обнаружены низкое содержание МДА, низкая интенсивность его деградации, но высокий индекс Д/М (соответственно  $0,88\pm0,17$  нмоль/10<sup>6</sup> эритроцитов,  $28,5\pm3,58\%$  и  $54,3\pm15,4$ ) по сравнению с этими показателями у детей того же возраста, обследованных в зимний период.

Интенсивность деградации МДА изучена у взрослых людей в разное время года. Как видно на рис. 1, были обнаружены сезонные колебания в исследуемых показателях. Так, наибольшее содержание МДА, наименьшая интенсивность деградации и индекс Д/М выявлены зимой, а наибольший процент деградации МДА — летом.

Были обнаружены и суточные колебания интенсивности деградации МДА и индекса Д/М (рис. 2). У новорожденных детей имеют место разнонаправленные изменения содержания МДА и интенсивности его деградации в 9 и 13 ч. Индекс Д/М изменялся в зависимости от его исходного уровня. У взрослых же людей до 30-летнего возраста наблюдался упорядоченный суточный ритм: уменьшение содержания МДА и интенсивности его деграда-

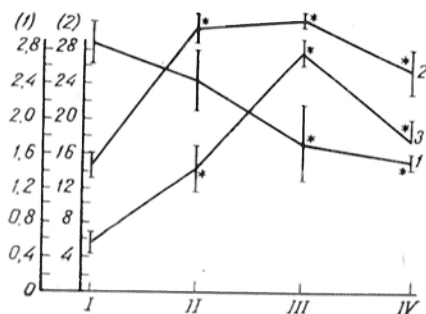


Рис. 1. Сезонные изменения содержания МДА (1), степени его деградации (2) и индекса Д/М (3) в эритроцитах взрослых людей.

По оси абсцисс — время года; I — зима; II — весна; III — лето; IV — осень; по оси ординат: слева — МДА (в нмоль/10<sup>9</sup> эритроцитов); справа — % деградации. Звездочка — различие достоверно ( $p < 0,05$ ) между показателями в зимний и любой другой сезон.

ции к 13 ч. К этому же времени повышается и деформационный индекс эритроцитов (от  $0,135 \pm 0,03$  до  $0,200 \pm 0,02$ ).

Таким образом, нами изучена интенсивность деградации МДА в эритроцитах людей в зависимости от возраста, сезона года и времени суток. Очевидно, в норме у детей и в меньшей степени у взрослых функционирует механизм, ограничивающий содержание

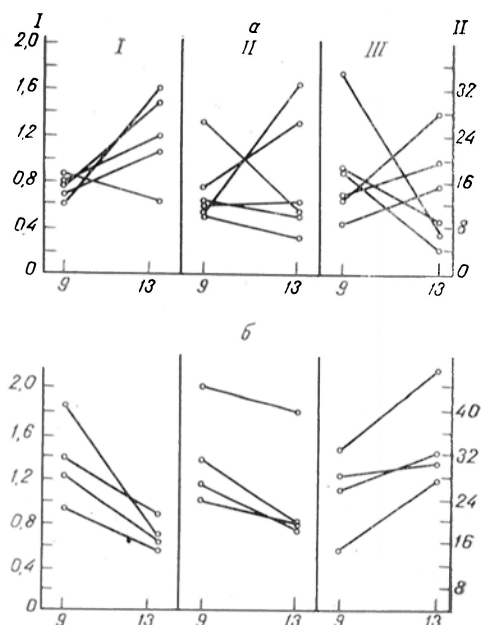


Рис. 2. Суточная динамика содержания МДА, интенсивности его метаболизма и индекса Д/М в эритроцитах новорожденных детей (а) и взрослых людей 18—28 лет (б).

По оси абсцисс — время (в ч); по оси ординат: I — МДА (в нмоль/10<sup>9</sup> эритроцитов); II — % деградации; III — индекс Д/М.

МДА в организме путем повышения его деградации при нарастании скорости его образования. Индекс Д/М, связывающий эти два показателя, указывает на истинную способность клетки «избавляться» от МДА: он может быть высок даже при низкой интенсивности метаболизма МДА, если содержание МДА снижено.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М., 1982.
2. Воскресенский О. Н., Жутнев И. А., Бобырев В. И., Безуглый В. В. // Вopr. мед. химии. — 1982. — № 1. — С. 14—27.
3. Каган В. Е., Орлов О. Н., Прилипка Л. Л. Проблема анализа эндогенных продуктов перекисного окисления липидов. — М., 1986.
4. Лемешко В. В., Калиман П. А., Белостоцкая Л. И. // Биофизика. — 1982. — Т. 27, № 2.
5. Храпова Н. Г. // Биантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии. — М., 1982. — С. 59—73.
6. Csallany A., Saari K. L., Su L. C. // J. Nutr. — 1977. — Vol. 107. — P. 1792—1799.
7. Hjelle J. J., Petersen D. R. // Toxicol. appl. Pharmacol. — 1983. — Vol. 70. — P. 57—66.
8. Hochstein P., Jain S. K. // Fed. Proc. — 1981. — Vol. 40. — P. 183—188.
9. Hunter J. S., Mohamed J. B. // Clin. chim. Acta. — 1986. — Vol. 155. — P. 123—132.
10. Inoue K., Fukunaga M., Yamasawa K. // Life Sci. — 1982. — Vol. 30. — P. 419—424.
11. Jain S. K., Mohandas N., Clark M. R., Shohet S. B. // Brit. J. Haemat. — 1983. — Vol. 53. — P. 247—255.
12. Pfafferoth C., Meiselman H. J., Hochtein P. // Blood. — 1982. — Vol. 59. — P. 12—15.
13. Placer Z., Veselková A., Rath R. // Experimentia (Basel). — 1965. — Vol. 21. — P. 19—20.
14. Recknagel R. O., Ghoshal A. K. // Lab. Invest. — 1966. — Vol. 15. — P. 132—140.
15. Siu G. M., Draper H. H. // Lipids. — 1982. — Vol. 17. — P. 349—355.
16. Tannert C., Lux W. // Acta biol. med. germ. — 1981. — Bd 40. — S. 739—742.
17. Tappel A. L., Eletcher B., Deamer D. // J. Geront. — 1973. — Vol. 28. — P. 415—424.

Поступила 17.09.87

## DEGRADATION OF MALONIC DIALDEHYDE IN ERYTHROCYTES AND ITS AGE-, SEASON- AND CIRCADIAN-DEPENDENT ALTERATIONS

V. V. Bankova, T. M. Nikanorova, S. D. Polyakov, T. A. Tagieva

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

A rate of malonic dialdehyde (MDA) degra-

duction was studied in erythrocytes of newborns within the first and 4-5<sup>th</sup> days of life, of 5-6 and 8-14 years old children and of 18-28 and 35-49 years old adult persons by means of introduction of exogenous MDA into the mixture containing erythrocytes and estimation of the aldehyde elimination during incubation. Intensity of MDA degradation correlated with its content in erythrocytes. Age-, season- and circadian-dependent alterations were detected in the rate of MDA degradation as well as in the

ratio of this value to the total content of MDA (index D/M). The lowest rate of MDA degradation and the index D/M value were observed in the persons of the older age group (35-49 years old). Either in 8-14 years old children or in adult persons the index D/M exhibited higher values in summer time as compared with other seasons. Distinct circadian alterations of the patterns studied were found in 18-28 years old persons but these patterns were dissimilarly directed during a day in newborns.

УДК 616.36-002-022.7:578.891]-092:616.153.915-39

Г. З. Абакумов, Г. К. Новицкий, Л. Ф. Легонькова

## К ВОПРОСУ О РОЛИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА

Гродненский медицинский институт, Институт биохимии АН БССР, Гродно

В патогенезе острого вирусного гепатита (ВГ) важное место занимают цитолитические процессы, сопровождающиеся выходом в кровь внутриклеточных метаболитов и ферментов [8]. В развитии этого синдрома ряд авторов [9, 11] значительную роль отводят интенсификации процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) клеточных мембран, приводящих к нарушению их проницаемости. Однако другие исследователи [1, 2] не обнаружили заметного нарастания промежуточных продуктов ПОЛ (диеновых конъюгатов) в сыворотке крови больных с увеличением тяжести заболевания. На основании этих данных авторы высказали сомнение о роли ПОЛ в патогенезе синдрома цитолиза при ВГ. Однако использованный авторами метод определения активности ПОЛ по накоплению диеновых конъюгатов не может целиком отразить интенсивность ПОЛ [3].

В связи с этим мы предприняли попытку исследовать у больных ВГ взаимосвязь между нарастанием тяжести заболевания и увеличением в крови свободнорадикальных процессов, регистрируемых хемилюминесцентным методом, признанным наиболее адекватным способом обнаружения интенсивности процессов ПОЛ [3, 4].

### Методика

Исследования проведены у 68 больных ВГ (А и В) и 20 доноров. О тяжести заболевания ВГ судили по содержанию в крови билирубина [6], а также по активности аланинаминотрансферазы (КФ 2.6.1.2) [7] и глутатион-S-трансферазы (КФ 2.5.1.18) [9], отражающих нарушение структуры и функции

мембран гепатоцитов, в частности их проницаемости.

Интенсивность ПОЛ в плазме крови определяли хемилюминесцентным методом [3, 5] на хемилюминометре ХЛМ1Ц-01. Плазму крови объемом 0,5 мл разводили до 10 мл 25 мМ трис-НСl (рН 7,4). Этот раствор помещали в кювету хемилюминометра. После инкубации в течение 5 мин при 37 °С в кювету вводили раствор FeSO<sub>4</sub> в конечной концентрации 10<sup>-3</sup>М и регистрировали свечение («быстрая» вспышка). Об интенсивности свободнорадикальных процессов судили по светосумме хемилюминесценции (ХЛ) за 1 мин.

Антиокислительную активность (АОА) плазмы крови определяли по способности ее подавлять ХЛ окисленной олеиновой кислоты, индуцированную Fe<sup>2+</sup>. К 1,8 мл 0,14% спиртового раствора окисленной олеиновой кислоты добавляли 0,1 мл 25 мМ трис-НСl (рН 7,4) и 0,1 мл плазмы крови. После инкубации крови в течение 5 мин при 37 °С добавляли раствор FeSO<sub>4</sub> (в конечной концентрации 10<sup>-4</sup>М) и регистрировали светосумму ХЛ в течение 10 с (время, в течение которого наблюдается «быстрая» вспышка свечения). Контрольная проба содержала 1,8 мл окисленной олеиновой кислоты и 0,2 мл трис-НСl. АОА плазмы крови рассчитывали по формуле, аналогичной для определения АОА методом электрохемилюминесценции [3]:

$$АОА = \frac{S_K - S_0}{S_K} \cdot 100 \%,$$

где S<sub>K</sub> и S<sub>0</sub> — светосумма ХЛ соответственно контрольной и опытной проб.

### Результаты и обсуждение

Из таблицы видно, что в плазме крови больных легкой степенью ВГ уровень общего билирубина возрос по сравнению с его уровнем у здоровых людей в 3,3 раза, при средней и тяжелой формах — соответственно в 6,8 и 11,4 раза, содержание свободного билирубина увеличилось соответственно в

Содержание билирубина, активность аланинаминотрансферазы, глутатион-S-трансферазы и перекисного окисления в плазме крови доноров и больных ВГ ( $M \pm m$ )

Показатель	Доноры	Больные ВГ		
		легкая форма	среднетяжелая форма	тяжелая форма
Билирубин, мкмоль/л:				
общий	$14,4 \pm 0,84$ (20)	$48,3 \pm 4,7^*$ (24)	$98,6 \pm 8,09^*$ (20)	$167,0 \pm 19,7^*$ (11)
свободный	$9,3$ (10)	$16,7$ (23)	$27,38^*$ (18)	$53,7^*$ (10)
связанный	$5,1 \pm 0,56$ (10)	$31,6 \pm 4,24^*$ (23)	$71,22 \pm 7,92^*$ (18)	$113,3 \pm 13,5^*$ (10)
Аланинаминотрансфераза, ммоль ПВК/ч/л	$1,15 \pm 0,17$ (9)	$4,59 \pm 0,36^*$ (24)	$6,3 \pm 0,13^*$ (19)	$6,26 \pm 0,01^*$ (11)
Глутатион-S-трансфераза, нмоль кХДНБ/мин/мл	$3,24 \pm 0,58$ (8)	$23,72 \pm 3,7^*$ (10)	$33,18 \pm 9,1^*$ (9)	—
Светосумма «быстрой» вспышки $Fe^{2+}$ -индуцируемой ХЛ, имп/мин	$787 \pm 176$ (20)	$1480 \pm 147^*$ (27)	$2038 \pm 215^*$ (28)	$2736 \pm 221^*$ (13)
Антиокислительная активность, %	$74,28 \pm 1,68$ (10)	$33,3 \pm 1,74^*$ (23)	$25,2 \pm 2,94^*$ (14)	$22,3 \pm 3,29^*$ (9)

Примечание. кХДНБ — конъюгат 1-хлор-2,4-динитробензола; ПВК — пировиноградная кислота. Уровень свободного билирубина определяли по разности средних величин общего и связанного билирубина. В скобках — число исследований. Звездочка —  $p < 0,05$  по сравнению с группой доноров.

1,7, 2,9 и 5,7 раза, связанного — в 6,2, 13,9 и 22,2 раза.

Активность аланинаминотрансферазы повысилась в 4—5,4 раза, глутатион-S-трансферазы — в 8—10 раз. Одновременно с этим в зависимости от тяжести заболевания в плазме крови наблюдалось возрастание процесса перекисного окисления соответственно в 1,9, 2,6 и 3,5 раза и снижение ее АОО в 2,2, 2,9 и 3,3 раза.

Представленные результаты исследования свидетельствуют о важной роли в патогенезе ВГ интенсификации перекисных процессов. Механизм активации этих процессов неясен. Снижение АОО крови этих больных, по-видимому, является вторичным и обусловлено истощением антиоксидантных резервов организма.

В связи с этим применение фармакологических веществ с антиоксидантными свойствами, в частности витаминов А, Е, ниацина, может быть рекомендовано для включения в комплексную фармакотерапию больных ВГ.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Блюгер А. Ф., Дудник Л. Б., Майоре А. Я. и др. // Бюл. Экспер. биол. — 1985. — № 2. — С. 166—168.

2. Блюгер А. Ф., Дудник Л. Б., Майоре А. Я. и др. // Вопр. мед. химии. — 1985. — № 5. — С. 35—37.
3. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М., 1972.
4. Владимиров Ю. А. // Изв. АН СССР. Сер. биол. — 1972. — № 4. — С. 489—501.
5. Владимиров Ю. А., Шаров А. П., Малиюгин Э. Ф. // Биофизика. — 1973. — № 1. — С. 148—152.
6. Колб В. Г., Камышников В. С. Справочник по клинической химии. — Минск, 1982. — С. 251—254.
7. Колб В. Г., Камышников В. С. // Там же. — С. 110—114.
8. Нисевич Н. И., Учайкин В. Ф., Молева Т. П. // Педиатрия. — 1978. — № 6. — С. 44—48.
9. Учайкин В. Ф., Молева Т. П. // Болезни печени и поражения желчевыводящих путей у детей. — М., 1977. — С. 18—23.
10. Habig W. H., Pabst M. J., Jakoby W. B. // J. biol. Chem. — 1974. — Vol. 249. — P. 7130—7139.
11. Suematsu T., Kamada Y., Kikuchi S. et al. // Clin. chim. Acta. — 1977. — Vol. 79. — P. 267—270.

Поступила 13.06.87

#### ROLE OF LIPID PEROXIDATION IN PATHOGENESIS OF VIRUS HEPATITIS

G. Z. Abakumov, G. K. Novitsky, L. F. Legon'kova

Medical School, Institute of Biochemistry, Aca-

Content of blood bilirubin was increased 3.3-11.4-fold as well as 4-10-activation of alanine aminotransferase and glutathione S-trans-

ferase was found in patients with virus hepatitis as compared with normal state. At the same time, lipid peroxidation was activated 1.9-3.5-fold in blood plasma as shown by means of chemoluminescence procedure, while the antioxidative activity was decreased 2.2-2.3-fold.

УДК 612.825.26.015.1:577.152.2].06:612.391:612.648

*А. Н. Фараджев*

## **ВЛИЯНИЕ ГОЛОДАНИЯ НА АКТИВНОСТЬ ГАМК-ТРАНСАМИНАЗЫ И ГЛУТАМАТДЕКАРБОКСИЛАЗЫ В МИТОХОНДРИЯХ СТРУКТУР ЛИМБИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ МОЗГА СОБАК В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ**

Химико-биологический факультет Азербайджанского педагогического института  
им. В. И. Ленина, Баку

В регуляции пищевого поведения участвуют холино-адренореактивные структуры мозга [5, 11, 17, 18], а также ГАМК- и глутаматергические системы. При исследовании влияния недостатка белка в пище выявлено резкое снижение содержания ГАМК и активности глутаматдекарбоксилазы (ГДК) в тканях мозга [19].

Изучение локализации в отдельных структурах лимбической системы мозга центров, участвующих в формировании и регуляции пищевого поведения, роли тормозного (ГАМК) и возбуждающего (глутаминовая кислота — ГК) нейромедиаторов в условиях пищевой депривации представляет определенный интерес, так как в разных отделах головного мозга превращение ГАМК и ГК включает цикл реакций от глутамата до сукцината через ГК, ГАМК и сукцинилсеминальдегид, которые катализируются ферментами ГАМК-трансаминазой (4-аминобутират-2-оксиглутарат аминотрансфераза; КФ 2.6.1.19; ГАМК-Т) и l-глутамат-l-карбоксилазой (ГДК; КФ 4.1.1.15). Поскольку ГАМК, ГК и ферменты (ГДК и ГАМК-Т), участвующие в их метаболизме, локализуются в основном в ГАМК-ергических тормозных нейронах и глутаматергических синапсах [8, 15, 16, 21], правомерно полагать, что изменение количества синапсов и других субклеточных структур при пищевой депривации, а также перестройка обменных процессов в синапсах в этих условиях тесно связаны с обменом ГК и ГАМК, который в системе зрительного анализатора и разных областях коры головного мозга и мозжечка в постнатальном онтогенезе уже был исследо-

ван [1—3]. В структурах лимбической системы мозга собак в постнатальном онтогенезе и в условиях голодания эти параметры не изучены.

Целью настоящей работы явилось изучение в митохондриях структур лимбической системы мозга собак в постнатальном онтогенезе при различных сроках голодания активности ферментов ГДК и ГАМК-Т, участвующих в обмене нейромедиаторов — ГАМК и ГК.

### **Методика**

Исследовали митохондрии лимбической коры (поля  $I_1$  и  $I_2$ ), гиппокамп, гипоталамуса, миндалы и ретикулярной формации (РФ) среднего мозга собак. Границы изучавшихся структур мозга разделяли в соответствии с координатами атласа [4]. Подопытными животными служили 3-месячные и годовалые собаки, содержавшиеся в условиях 5-, 12- и 20-суточного голодания. Контролем служили собаки такого же возраста, содержавшиеся при нормальных условиях питания. Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования в 0,32 М сахарозе [12].

В выделенных фракциях митохондрий определяли активность ГАМК-Т по методу [7]. Инкубационная среда состояла из 0,5 мл 0,005 М  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты, 0,5 мл 0,05 М ГАМК и митохондрий. Инкубация длилась 30 мин в атмосфере азота. Активность ГАМК-Т выражали в микромолях ГК, образующейся в митохондриях, выделенных из 1 г свежей ткани за 1 ч. Активность ГДК определяли в исходной митохондриальной фракции по методу [20], модифицированному [9]. В опытах с пиридоксаль-5-фосфатом (ПАЛФ) его конечная концентрация была 0,1 мМ. Об активности ГДК судили по увеличению количества ГАМК в процессе инкубирования с l-ГК в течение 30 мин при 37°C в атмосфере азота [22] и выражали в микромолях ГАМК, образовавшейся в расчете на массу митохондрий, выделенных из 1 г свежей ткани за 1 ч. Содержание ГК и ГАМК определяли с помощью метода высоковольтного электрофореза [6]. Все данные обработаны статистически.

Изменение общей активности ГАМК-Т в митохондриях структур лимбической системы мозга собак в постнатальном онтогенезе при различных сроках голодания (в мкмоль ГК на массу митохондрий, выделенных из 1 г свежей ткани за 1 ч;  $M \pm m$ )

Структура мозга	Возраст животных, мес	Норма	Срок голодания, сут		
			5	12	20
Лимбическая кора: поле I <sub>1</sub>	3	156±0,68	111±0,80	84±0,73	62±1,25
	12	115±0,80	95±0,75	82±0,68	67±1,11
	%	73,71	85,58	97,62	108,06
	3	141±0,93	115±0,77	80±0,68	66±1,23
	12	122±0,70	107±0,72	92±1,03	75±1,62
	%	86,52	93,04	115,00	113,63
Гиппокамп	3	161±0,77	146±0,81	151±0,68	77±0,88
	12	158±1,69	141±0,96	114±0,85	87±1,13
	%	98,13	96,57	75,49	113,08
Гипоталамус	3	150±1,07	137±0,77	131±0,72	64±0,57
	12	167±1,01	135±0,70	122±0,63	97±1,25
	%	111,33	98,54	93,12	151,56
Амигдала	3	185±0,96	184±2,12*	191±0,98*	122±0,77
	12	172±1,14	196±0,87	135±0,77	90±1,11
	%	92,97	106,52	70,68	73,77
РФ среднего мозга	3	240±0,92	202±1,26	162±1,26	83±1,11
	12	195±0,81	209±0,87	153±0,98	105±0,88
	%	92,85	103,46	94,44	126,50

Примечание. % — процентное соотношение между показателями двух возрастных групп в норме и после голодания. Звездочка — недостоверность различий по сравнению с нормой. Здесь и в табл. 2 представлены средние данные 7—8 опытов.

### Результаты и обсуждение

Данные табл. 1 свидетельствуют о том, что в условиях 5-суточного голодания у развивающихся собак в 3-месячном и годовалом возрасте общая активность ГАМК-Т достоверно снижается в митохондриях лимбической коры (поля I<sub>1</sub> и I<sub>2</sub>), гиппокампе и гипоталамусе. При этом степень снижения общей активности ГАМК-Т более существенна в митохондриях лимбической коры (поля I<sub>1</sub> и I<sub>2</sub>) в 3-месячном, а в гипоталамусе и лимбической коре (поле I<sub>1</sub>) в годовалом возрасте. В отличие от этих структур лимбической системы мозга собак в митохондриях амигдалы и РФ среднего мозга собак при 5-суточном голодании общая активность ГАМК-Т не изменяется в 3-месячном и достоверно повышается в годовалом возрасте.

Наиболее отчетливо общая активность ГАМК-Т уменьшается при 12-суточном голодании в митохондриях лимбической коры (поля I<sub>1</sub> и I<sub>2</sub>), РФ среднего мозга, гипоталамусе и гиппокампе (соответственно на 46,1, 43,1, 32,9, 12,6 и 6,3 %) в 3-месячном возрасте, а в лимбической коре (поля I<sub>1</sub> и I<sub>2</sub>), гиппокампе, гипоталамусе, РФ среднего моз-

га и амигдале (соответственно на 28,0, 25,1, 28,1, 26,5, 21,9 и 21,5 %) в годовалом возрасте, исключение составляет амигдала, где общая активность ГАМК-Т не изменяется.

Следует отметить, что при удлинении срока пищевой депривации до 20 сут общая активность ГАМК-Т резко уменьшается в митохондриях структур лимбической системы мозга у 3-месячных собак. При этом отмеченные сдвиги наиболее существенны в лимбической коре (поле I<sub>1</sub>), РФ среднего мозга, гипоталамусе, лимбической коре (поле I<sub>2</sub>), гиппокампе и амигдале (соответственно на 60, 60,5, 57,4, 53,2, 52 и 34 % по сравнению с нормой). Такая же закономерность отмечена при 20-суточном голодании в митохондриях исследованных образований лимбической системы мозга у годовалых собак, но в меньшей степени, чем у 3-месячных. При этом общая активность ГАМК-Т в митохондриях амигдалы, РФ среднего мозга, гиппокампа, гипоталамуса и лимбической коры (поля I<sub>1</sub> и I<sub>2</sub>) уменьшается соответственно на 47,9, 46,1, 45, 41,5, 41,8 и 38,5 % по сравнению с нормой. Сопоставляя данные по общей активности ГАМК-Т в митохондриях структур лимбической системы мозга



собак при 20-суточном голодании видно, что в 3-месячном возрасте в лимбической коре (поля  $I_1$  и  $I_2$ ) и гипоталамусе, а в годовалом возрасте в амигдале и РФ среднего мозга происходят наиболее существенные изменения, что обусловлено большими изменениями в синаптических структурах и пластичностью отдельных образований лимбической системы мозга собак в процессе постнатального развития при различных сроках голодания.

Характерен тот факт, что по сравнению с 3-месячными у годовалых собак (обе группы — интактные животные) активность ГАМК-Т достоверно уменьшается в лимбической коре (поля  $I_1$  и  $I_2$ ) и незначительно повышается в гипоталамусе; в остальных исследованных структурах лимбической системы мозга активность ГАМК-Т в митохондриях почти не изменяется.

Сопоставляя данные для 3-месячных и годовалых собак, можно отметить, что 5-суточное голодание почти в одинаковой степени влияет на активность ГАМК-Т в митохондриях гиппокампа, гипоталамуса, амигдалы и РФ среднего мозга. В отличие от этих структур в лимбической коре (поля  $I_1$  и  $I_2$ ) общая активность фермента в большей степени уменьшается в митохондриях у 3-месячных щенков.

Следует отметить, что в отличие от 5-суточного при 12-суточном голодании активность ГАМК-Т в митохондриях лимбической системы мозга собак в 3-месячном возрасте по сравнению с годовалыми животными характеризуется своеобразной динамикой изменения. Так, у 3-месячных щенков активность фермента резко уменьшается в митохондриях амигдалы и гиппокампа, а у годовалых собак — в лимбической коре (поле  $I_2$ ). При этом 12-суточное голодание почти в одинаковой степени подавляет активность ГАМК-Т в митохондриях лимбической коры (поле  $I_1$ ), гипоталамуса и РФ среднего мозга у 3-месячных и годовалых животных. В годовалом возрасте при 20-суточном голодании активность ГАМК-Т значительно подавляется в митохондриях гипоталамуса, РФ среднего мозга, гиппокампе и лимбической коре (поля  $I_1$  и  $I_2$ ) — соответственно на 51,6, 26,5, 13,1, 13,6 и 8,1 % по сравнению с таковой у 3-месячных щенков, за исключением амигдалы, где общая активность ГАМК-Т в митохондриях на 26,2 % больше подавляется у 3-месячных животных.

Результаты проведенных исследований показывают (табл. 2), что в условиях 5-суточного голодания общая активность ГДК с добавлением и без до-

Таблица 2

Изменение общей активности ГДК митохондрий структур лимбической системы мозга 3-месячных щенков в норме и в различные сроки пищевой депривации (в мкмоль ГАМК на массу митохондрий, выделенных из 1 г свежей ткани за 1 ч, с добавлением ПАЛФ — конечная концентрация 0,1 мМ;  $M \pm m$ )

Структура мозга	Условия определения	Норма	Срок голодания, сут		
			5	12	20
Лимбическая кора (поле $I_1$ )	Без ПАЛФ	$85 \pm 0,73$	$68 \pm 0,71$	$62 \pm 0,60$	$39 \pm 1,25$
	С ПАЛФ	$106 \pm 0,97$	$82 \pm 0,90$	$75 \pm 0,92$	$50 \pm 0,72$
	%	126	121	119	129
Лимбическая кора (поле $I_2$ )	Без ПАЛФ	$81 \pm 1,44$	$47 \pm 0,68$	$42 \pm 0,72$	$29 \pm 0,60$
	С ПАЛФ	$95 \pm 0,77$	$77 \pm 0,82$	$72 \pm 0,60$	$40 \pm 0,82$
	%	117	165	173	138
Гиппокамп	Без ПАЛФ	$87 \pm 0,71$	$68 \pm 1,13$	$49 \pm 0,82$	$26 \pm 0,82$
	С ПАЛФ	$101 \pm 0,90$	$91 \pm 0,90$	$83 \pm 0,82$	$37 \pm 0,81$
	%	117	134	169	148
Гипоталамус	Без ПАЛФ	$77 \pm 0,71$	$53 \pm 1,23$	$39 \pm 0,82$	$23 \pm 0,92$
	С ПАЛФ	$120 \pm 1,00$	$102 \pm 0,82$	$59 \pm 0,72$	$42 \pm 0,82$
	%	156	196	151	191
Амигдала	Без ПАЛФ	$68 \pm 0,77$	$51 \pm 0,92$	$36 \pm 0,56$	$32 \pm 0,72$
	С ПАЛФ	$110 \pm 0,85$	$88 \pm 1,03$	$52 \pm 0,93$	$45 \pm 0,86$
	%	161	172	141	145
РФ среднего мозга	Без ПАЛФ	$41 \pm 0,88$	$80 \pm 0,93$	$50 \pm 0,66$	$32 \pm 1,30$
	С ПАЛФ	$74 \pm 0,86$	$96 \pm 0,71$	$65 \pm 0,93$	$61 \pm 0,93$
	%	180	118	128	190

Примечание. Везде  $p < 0,05$ — $0,001$  по сравнению с нормой. % — процентное соотношение показателей в опытах с добавлением ПАЛФ и без ПАЛФ.



бавления ПАЛФ в митохондриях во всех исследованных структурах лимбической системы мозга у 3-месячных щенков достоверно уменьшается, исключение составляют митохондрии РФ среднего мозга, где активность фермента без добавления ПАЛФ повышается на 95 %, а с добавлением — на 29,2 %.

Наблюдаемые снижения активности ГДК в опытах без добавления ПАЛФ в большей степени выражены в митохондриях лимбической коры (поле  $I_2$ ), гипоталамуса и амигдалы мозга 3-месячных щенков (при 5-суточном голодании).

Сопоставляя полученные данные, следует отметить, что при 5-суточном голодании активность ГДК в отсутствие ПАЛФ ниже, чем при его добавлении. При этом ПАЛФ в условиях 5-суточного голодания более интенсивно активирует общую активность ГДК в митохондриях гипоталамуса, амигдалы и лимбической коры (поле  $I_2$ ) — соответственно на 96, 72 и 65 %, а затем в остальных исследованных структурах мозга 3-месячных щенков — от 18 до 34 % по сравнению с таковыми без добавления ПАЛФ.

Существенно, что все закономерности изменений общей активности ГДК с добавлением и без добавления ПАЛФ при 5-суточном голодании сохраняются и при 12-суточном голодании с несколько своеобразной динамикой в митохондриях структур лимбической системы мозга у 3-месячных щенков. При этом общая активность фермента ГДК по сравнению с тем, что наблюдается при 5-суточном голодании, достоверно уменьшается в 3-месячном возрасте у голодавших в течение 12 сут щенков с добавлением и без добавления ПАЛФ в митохондриях всех исследованных структур лимбической системы мозга. При 12-суточном голодании в среде с добавлением 0,1 мМ ПАЛФ в неодинаковой степени активируется активность ГДК в митохондриях структур лимбической системы мозга 3-месячных щенков.

ПАЛФ наиболее интенсивно увеличивает общую активность ГДК в митохондриях лимбической коры (поле  $I_2$ ), гиппокампа и гипоталамуса — соответственно на 73, 69 и 51 %. При удлинении срока депривации до 20 сут у 3-месячных щенков общая активность фермента ГДК в митохондриях исследованных структур лимбической систе-

мы мозга с добавлением и без добавления в среду ПАЛФ резко уменьшается по сравнению с таковой у животных с 12-суточной пищевой депривацией. При этом особенно резко подавляется активность ГДК в среде без добавления ПАЛФ (от 3 до 4 раз) в митохондриях отдельных образований лимбической системы мозга по сравнению с этим показателем в контроле.

ПАЛФ при 20-суточном голодании активирует активность ГДК в большей степени в митохондриях гипоталамуса и РФ среднего мозга (соответственно на 91 и 90 %), а в митохондриях остальных структур лимбической системы — в меньшей степени (от 29 до 48 %).

Представленные данные свидетельствуют о том, что в процессе постнатального развития голодание не в одинаковой степени подавляет активность ГАМК-Т и ГДК в митохондриях исследованных образований лимбической системы мозга собак.

Подавление активности ГАМК-Т при удлинении срока депривации в большей степени связано с особенностями нейромедиаторной функции ГАМК, участвующей в адаптационно-компенсаторных процессах, в лимбической системе мозга в постнатальном онтогенезе и в условиях голодания. Изменения могут касаться и реакций образования семиальдегида янтарной кислоты и ГОМК из ГАМК [10]. Подавление расщепления ГАМК в постнатальном онтогенезе при пищевой депривации в митохондриях лимбической системы мозга собак связано с перестройкой некоторых сторон тормозных процессов в нейронах лимбической коры (поля  $I_1$  и  $I_2$ ), а также в других структурах лимбической системы мозга собак при различных сроках голодания, за исключением амигдалы при 5-суточном голодании. Снижение уровня активности ГДК в митохондриях структур лимбической системы мозга собак в условиях голодания связано с изменением глутаматергических синапсов в этих образованиях мозга на раннем этапе постнатального развития, о чем свидетельствуют данные о локализации ГДК в тяжелых и легких синапсосомах [1, 14, 15]. В 3-месячном возрасте у собак в условиях голодания скорость образования ГАМК резко подавляется в митохондриях исследованных структур лимбической системы мозга, что находится

в зависимости от сроков голодания. Это позволяет предположить, что снижение уровня ГДК при голодании (ГДК — как маркер ГАМК-ергического нейрона [8]) способствует задержке в формировании связей между группами функционирующих нейронов лимбической системы мозга собак на раннем этапе постнатального развития.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Агаев Т. М. // Укр. биохим. журн. — 1979. — Т. 51. — С. 31—34.
2. Агаев Т. М., Пугарева З. Д. // Нейрохимия. — 1982. — № 2. — С. 180—188.
3. Агаев Т. М., Ибраимова З. Н. // Изв. АН АзССР. Сер. биол. наук. — 1984. — № 6. — С. 65—70.
4. Адрианов О. С., Меринг Т. А. Атлас мозга собаки. — М., 1959.
5. Гасанов Г. Г., Рубцова В. В. // Изв. АН АзССР. Сер. биол. наук. — 1969. — № 6. — С. 118—122.
6. Козлов Э. А., Алиев Т. В. // Укр. биохим. журн. — 1972. — Т. 44. — С. 263—267.
7. Нилова Н. С. // Докл. АН СССР. — 1966. — Т. 166, № 2. — С. 483—485.
8. Робертс Ю. // Журн. эволюц. биохимии. — 1973. — № 5. — С. 445—463.
9. Шатунова М. Ф., Сытинский И. А. // Нервная система. — Л., 1962. — Вып. 3. — С. 12—16.
10. Bessman S. P., Rossen I., Layne E. C. // J. biol. Chem. — 1953. — Vol. 201. — P. 385—396.
11. Camargo L., Yashuda I., Saad W., Cabral A. // Pharmacol. Res. Commun. — 1975. — Vol. 7, N 2. — P. 189—197.
12. De Robertis E., Sellinger O. Z., Rodriguez H. et al. // J. Neurochem. — 1967. — Vol. 14, N 1. — P. 81—89.
13. De Robertis E. // Science. — 1967. — Vol. 156. — P. 907—914.
14. De Robertis E. // Ibid. — 1971. — Vol. 171. — P. 963—971.
15. De Robertis E. // The Nervous System. — New York, 1975. — Vol. 1. — P. 541—552.
16. Haber B., Kuriyama R., Roberts E. // Brain Res. — 1970. — Vol. 22, N 1. — P. 105—112.
17. Heffner T., Hartman Y., Seiden L. // Science. — 1980. — Vol. 208. — P. 1168—1170.
18. Leibowitz S. P. // Pharmacol. Biochem. Behav. — 1978. — Vol. 8. — P. 163—175.

19. Rajalakshmi R. R., Covindarajan R. R., Ramakrishnan C. V. // J. Neurochem. — 1969. — Vol. 12. — P. 261—267.
20. Roberts E., Frankel S. // J. biol. Chem. — 1950. — Vol. 187, N 1. — P. 55—63.
21. Roberts E., Kuriyama R. // Brain Res. — 1968. — Vol. 8, N 1. — P. 1—12.
22. Sytinsky I. A., Priyatkina T. N. // Biochem. Pharmacol. — 1966. — Vol. 15, N 1. — P. 49—56.

Поступила 03.02.88

#### EFFECT OF STARVATION ON GABA-TRANSAMINASE AND GLUTAMATE DECARBOXYLASE ACTIVITIES IN MITOCHONDRIA OF DOG BRAIN LIMBIC STRUCTURES DURING POSTNATAL ONTOGENESIS

A. N. Faradjev

Chemo-Biological Faculty, Pedagogic Institute, Baku

Activities of GABA-transaminase (GABA-TA) and glutamate decarboxylase (GDC) were estimated in mitochondria of limbic cortex (L<sub>1</sub> and L<sub>2</sub> areas), hypothalamus, hippocampus, amygdala and midbrain reticular formation (RF) of 3 months and 1 year old dogs during 5, 12 and 20 days of starvation. Total activity of GABA-TA and GDC was distinctly decreased in mitochondria of limbic cortex, hippocampus, hypothalamus and amygdala. At the same time, after 5 days starvation activity of GDC, in presence of 0.1 mM PALP or without it was increased in RF mitochondria of 3 months old dogs, while GABA-TA was activated in the mitochondria of 1 year old dogs. The rate of GDC activation by PALP was dissimilar in certain structures of brain limbic areas during various periods of starvation in 3 months old dogs, which occurred due to difference of the GDC mitochondrial forms in synaptic structures of the dog brain limbic system. Activity of GABA-TA in 3 months and 1 year old dogs as well as activity of GDC, in presence of PALP or without it, in 3 months old dogs were distinctly decreased in mitochondria of all the dog brain limbic structures studied after long-term deprivation within 12 and 20 days. The decrease in activity of GABA-TA and GDC was related to duration of starvation as well as to morpho-functional alterations and adaptation of the brain structures studied during postnatal ontogenesis.

УДК 616.366-002.1-07:[616.36+616.155.32]-008.944.53-033

П. П. Голиков, Н. Ю. Николаева, И. В. Спиридонов,  
В. В. Склярский

#### ГЛЮКОКОРТИКОИДНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ ПЕЧЕНИ И ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ПРИ ОСТРОМ ХОЛЕЦИСТИТЕ

НИИ скорой помощи им. И. В. Склизосовского, Москва

Острый холецистит, одно из частых заболеваний панкреатодуоденальной зоны, несмотря на лечение нередко за-

канчивается летальным исходом или серьезными осложнениями. Нарушение гомеостаза является важнейшей

причиной неблагоприятного исхода острого холецистита. Современное представление о патогенетических механизмах нарушения гомеостаза неразрывно связано с изменениями метаболизма, обусловленными стрессорной реакцией всего организма [16]. Центральное звено стрессорной реакции составляет гипоталамо-гипофизарно-адреналовая система, ее периферическое звено — глюкокортикоидная функция надпочечников, определяющая метаболический эффект в печени и характер нарушений гомеостаза [7—9].

Реализация глюкокортикоидного эффекта на уровне печени определяется состоянием специфических глюкокортикоидных цитоплазматических рецепторов типов II и III [11, 18]. Глюкокортикоидные рецепторы печени типа II (истинные глюкокортикоидные рецепторы) ответственны за реализацию гормонального эффекта на уровне генетического аппарата клетки, а глюкокортикоидные рецепторы типа III (транскортиноподобные рецепторы) определяют стероид-рецепторное взаимодействие гормона с истинными глюкокортикоидными рецепторами [13]. В литературе отсутствуют данные о глюкокортикоидных рецепторах печени при остром холецистите.

Целью настоящего исследования явилось изучение механизмов регуляции метаболического эффекта глюкокортикоидов на уровне цитоплазматических глюкокортикоидных рецепторов печени у больных острым холециститом.

#### Методика

Исследования проведены у 31 больного. При поступлении с помощью эхографии, ра-

диоизотопной холецистографии с ТСК-15 и лапароскопии у всех больных диагностирован острый обтурационный флегмонозный холецистит. С целью декомпрессии проводили чрескожную транспеченочную микрохолецистостомию с последующей холсистохолангиографией. После стихания острых явлений под воздействием комплексного консервативного лечения на 5—7-е сутки осуществляли холецистэктомию.

Во время холецистэктомии производили биопсию печени из ложа желчного пузыря и левой доли печени для гистологических исследований. Часть биопсийного материала использовали для изучения глюкокортикоидных рецепторов. Одновременно из кубитальной вены забирали кровь, в плазме которой исследовали уровень метаболитов, а в лимфоцитах — содержание глюкокортикоидных рецепторов. Глюкокортикоидные рецепторы типа II в высокоскоростном цитозоле печени выявляли путем 20-часового насыщения рецепторов меченым ацетонидом триамцинолона [19], глюкокортикоидные рецепторы типа III в печени — с помощью меченого кортизола [14]. Уровень глюкокортикоидных рецепторов типа II в лимфоцитах определяли методом насыщения рецепторов ацетонидом триамцинолона при 37 °C [17], а кортизола в плазме — стандартным тест-набором фирмы «Sogin» (Франция). Содержание метаболитов в плазме крови определяли унифицированными методами. Контрольную группу составили 38 доноров.

#### Результаты и обсуждение

Данные о содержании глюкокортикоидных рецепторов типов II и III в цитозоле печени больных острым холециститом после чрескожной транспеченочной микрохолецистостомии представлены в табл. 1. Различия в содержании глюкокортикоидных рецепторов типа III в ткани левой доли печени и ложа желчного пузыря оказались статистически достоверными ( $p < 0,05$ ).

Число глюкокортикоидных рецепторов типа II в одном лимфоците периферической крови составило 1223, что

Таблица 1

Содержание глюкокортикоидных рецепторов в ткани печени и лимфоцитах крови больных острым холециститом

Тип рецептора	Локализация	Содержание рецепторов		
		фмоль на 1 мг белка	в одной клетке	в 1 мм <sup>3</sup>
II	Печень:			
	левая доля	20,1±6,5	—	—
III	Печень:			
	левая доля	268±12	—	—
II	Лимфоциты	—	1223±482	2,0±0,3 (·10 <sup>6</sup> )

Таблица 2  
Биохимические показатели сыворотки крови  
больных острым холециститом

Показатель	Контроль	Острый холецистит
Общий белок, г/л	80,2±1,25	79,2±3,0
Альбумины, г/л	43,7±1,2	46,2±4,1
Глобулины, г/л	36,5±1,5	33,0±2,0
Белковый коэффициент	1,2±0,08	1,4±0,06
Холестерин, ммоль/л	4,50±0,25	6,22±0,77*
Креатинин, мкмоль/л	99,9±26,4	71,3±5,3
Глюкоза, ммоль/л	4,38±0,11	5,03±0,28*
Мочевина, ммоль/л	4,43±0,28	6,38±0,83*
Кортизол, нмоль/л	291±19	593±55*

Примечание. Звездочка —  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

более чем в 3 раза ниже ( $p < 0,05$ ) соответствующего показателя у доноров (4100). Абсолютное число глюкокортикоидных рецепторов типа II в лимфоцитах периферической крови больных также достоверно снижено. Если у доноров число рецепторов составляет  $8,3 \cdot 10^6$  в  $1 \text{ мм}^3$  крови, то у больных острым холециститом —  $2,0 \times 10^6$ . Концентрация кортизола в сыворотке крови больных существенно повышалась по сравнению с контролем (табл. 2). Уровни холестерина, глюкозы и мочевины при остром холецистите были достоверно выше, чем в контроле (см. табл. 2).

Согласно данным литературы [1, 11], уровень глюкокортикоидных рецепторов типа II в печени человека составляет 29 фмоль на 1 мг белка (хронический холецистит в стадии ремиссии) и 67 фмоль на 1 мг белка (практически здоровые люди). Следовательно, в печени больных острым холециститом с предварительной чрезкожной транспеченочной микрохолецистостомией наблюдается снижение уровня глюкокортикоидных рецепторов типа II, основной причиной которого является повышение концентрации глюкокортикоидов в крови [16]. Повышение концентрации глюкокортикоидов в крови отмечено и в наших исследованиях. Характерной особенностью эффекта глюкокортикоидов в печени следует считать усиление процессов метаболизма [10]. Глюкокортикоиды связываются с глюкокортикоидными рецепторами типа II цитоплазмы клеток печени, транслируются

в ядро клетки, стимулируют синтез матричной РНК, а последняя транспортируется в цитоплазму клетки и служит матрицей для биосинтеза специфических белков, принимающих непосредственное участие в метаболизме [20].

Более высокий уровень глюкокортикоидных рецепторов типа III в печеночной ткани ложа желчного пузыря, по-видимому, связан с компенсаторным восполнением рецепторов либо за счет биосинтеза новых молекул, либо за счет более активной стимуляции процессов чрезмембранного транспорта транскортина из крови в локально измененную ткань печени. Известно [4], что транскортиноподобные рецепторы цитоплазмы, к числу которых причисляют и глюкокортикоидные рецепторы типа III, выполняют антиглюкокортикоидную функцию, направленную на снижение взаимодействия истинных рецепторов с глюкокортикоидами. Не исключено, что более высокий уровень глюкокортикоидных рецепторов типа III в цитоплазме ткани при патологии может пролить свет на сложную проблему снижения уровня транскортина в крови при различных экстремальных воздействиях [5]. Ранее это связывали только с протеолитическим действием ферментов, уровень которых в крови при стрессе возрастает. Возможна кумуляция транскортина не только в межклеточных пространствах, но и в самой цитоплазме [2].

Хотя механизм реализации глюкокортикоидного эффекта на уровне стероид-рецепторного взаимодействия в цитоплазме лимфоцитов существенно не отличается от такового для печени, конечный метаболический эффект глюкокортикоидов в лимфоидной ткани принципиально отличается от гормонального эффекта в печени. Так, под влиянием глюкокортикоидов блокируется транспорт глюкозы в клетку, угнетается превращение глюкозы в глюкозо-6-фосфат [12], ингибируется бласттрансформация лимфоцитов [2]. Эти эффекты глюкокортикоидов опосредованы воздействием на рецепторы [15]. Под влиянием глюкокортикоидов снижается уровень глюкокортикоидных рецепторов типа II, которые также транслируются в ядро лимфоцита и реализуют упомянутые выше метаболические процессы.

Таким образом, уровень глюкокортикоидных рецепторов типа II в лимфоцитах является важным критерием ингибирования метаболизма в этих клетках под влиянием глюкокортикоидов. В лимфоцитах крови исследованных больных обнаружено резко сниженное число глюкокортикоидных рецепторов типа II не только в одном лимфоците, но и в общем пуле лимфоцитов периферической крови. Из этого следует, что у больных острым холециститом с предварительной чрескожной транспеченочной холецистостомией, несмотря на проводимое консервативное лечение, уровень метаболизма в лимфоцитах периферической крови резко снижен. Это обстоятельство требует особого внимания к мероприятиям по профилактике гнойно-септических осложнений у таких больных. Наиболее перспективными средствами для снижения и предупреждения лимфотического эффекта глюкокортикоидов являются природные и синтетические антиглюкокортикоиды, активно конкурирующие с глюкокортикоидами за связывание на глюкокортикоидных рецепторах типа II лимфоцитов [3, 15].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Голиков П. П., Бобкова А. И., Бобкова А. С., Енелев Р. Х. // *Вопр. мед. химии.* — 1980. — № 2. — С. 248—252.
2. Голиков П. П., Федорова И. В., Николаева Н. Ю., Сыромятникова Е. Д. // *Пробл. гематол.* — 1980. — № 9. — С. 46—48.
3. Голиков П. П., Бобкова А. С. // *Вопр. мед. химии.* — 1981. — № 5. — С. 654—658.
4. Голиков П. П., Кириллова Е. Г., Николаева Н. Ю., Енелев Р. Х. // *Там же.* — 1983. — № 1. — С. 130—134.
5. Голиков П. П., Николаева Н. Ю., Кириллова Е. Г. // *Там же.* — № 4. — С. 27—30.
6. Горизонтов П. Д. // *Гомеостаз.* — М., 1981. — С. 3—20.
7. Меерсон Ф. З. *Адаптация, стресс и профилактика.* — М., 1981. — С. 11—12.
8. Мороз Б. Б., Кендыш И. Н. *Радиобиологический эффект и эндокринные факторы.* — М., 1975.
9. Ньюсхолм Э., Старт К. *Регуляция метаболизма.* Пер. с англ. — М., 1977. — С. 101—109.
10. Baxter J.-D., Forsham P. H. // *Amer. J. Med.* — 1979. — Vol. 52. — P. 573—589.
11. Bojar R., Westerhamp S. // *Hepato-Gastroenterology.* — 1980. — Vol. 27. — P. 178—182.
12. Gidlowski J., Munch A. // *J. Steroid Biochem.* — 1976. — Vol. 7. — P. 1141—1145.
13. Funder J. M. // *Endocrinology.* — 1973. — Vol. 93. — P. 1300—1308.
14. Golikov P. P. // *Endokrinologie.* — 1981. — Bd 77. — S. 105—108.
15. Homo F., Picard F. // *J. Steroid Biochem.* — 1980. — Vol. 12. — P. 433—443.
16. Ichii S. // *Endocr. Jap.* — 1981. — Vol. 28. — P. 293—304.
17. Kontula A. // *J. clin. Endocr.* — 1980. — Vol. 51. — P. 654—657.
18. Omrani G. R., Rosner M. // *J. Steroid biochem.* — 1980. — Vol. 13. — P. 719—722.
19. Rosner W., Polimeni S. T. // *Steroids.* — 1978. — Vol. 31. — P. 427—436.
20. Rousseau G. G. // *Molec. Cell Endocr.* — 1984. — Vol. 26. — P. 1—11.
21. Roch B., Sakly M. // *Ibid.* — 1981. — Vol. 22. — P. 169—178.

Поступила 17.07.87

#### LIVER TISSUE GLUCOCORTICOID RECEPTORS IN PATHOGENESIS OF ACUTE CHOLECYSTITIS

P. P. Golikov, N. Yu. Nikolaeva, I. V. Spiridonov, V. V. Sklyarevsky

Institute of Urgent Medicine, Ministry of Public Health of the RSFSR, Moscow

Cholecystectomy was carried out in 31 patients with acute cholecystitis within 5-7 days after percutaneous transliver microcholecystotomy. During the operation biopsy was taken from bed of gallbladder and liver left lobe for histological studies. In a part of the biopsy material glucocorticoid receptors of the II and III types were studied, simultaneously with detection of some metabolites and cortisol in blood plasma. Glucocorticoid receptors of the II type were estimated in lymphocytes. Content of glucocorticoid receptors of the II type constituted  $20.1 \text{ fmole} \cdot \text{mg}^{-1}$  of protein and  $16.0 \text{ fmole} \cdot \text{mg}^{-1}$  of protein in liver cytosol and in liver bed of gallbladder, respectively; content of the receptors of the III type was equal to  $268.0 \text{ fmole} \cdot \text{mg}^{-1}$  and  $329.0 \text{ fmole} \cdot \text{mg}^{-1}$  of protein in liver tissue and in liver bed of gallbladder, respectively. In lymphocytes 1223 glucocorticoid receptors of the II type were estimated as compared with 4100 receptors in the cells of healthy persons. Distinct increase in the level of cortisol, cholesterol, glucose and urea was observed in the patients, while total protein and protein fractions were similar to control values. Possible role of glucocorticoid receptors in pathogenesis of acute cholecystitis is discussed.

В. И. Шишкин, Г. В. Кудрявцева, С. А. Макаров

## ПЕНТОЗОФОСФАТНЫЙ ПУТЬ ОБМЕНА УГЛЕВОДОВ ПРИ НЕКОТОРЫХ СИСТЕМНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

Институт усовершенствования врачей им. С. М. Кирова Минздрава СССР, Ленинград

Системные заболевания соединительной ткани — ревматоидный артрит (РА), системная красная волчанка (СКВ) и системная склеродермия (ССД) — характеризуются сложным иммунопатогенезом, отличаются характером и степенью выраженности воспалительного процесса [1, 5]. Важная роль пентозофосфатного пути обмена углеводов (ПФП) в тканевом метаболизме как источника экстрамитохондриального НАДФ·Н, участвующего в разнообразных восстановительных биосинтезах, и пентозофосфатов — строительных блоков нуклеотидов и нуклеиновых кислот, хорошо известна [6]. Менее изученными остаются вопросы участия ПФП в развитии различного рода воспалительных реакций, хотя установлено, что воспалительный процесс сопровождается резким нарушением углеводного метаболизма, проявляющимся, в частности, в интолерантности к глюкозе, резистентности к эндогенному и экзогенному инсулину и т. п. [6, 11]. В литературе неоднократно подчеркивалось важное значение ПФП при фагоцитозе и синтезе антител [26, 28]. По некоторым данным [2], выявляется корреляция между активностью транскетолазы (ТК) и продукцией антител к корпускулярному антигену. Так, снижение активности ТК в селезенке крыс сопровождается снижением титра агглютининов в индуктивной фазе иммунорезиса.

В свете изложенного значительный интерес представляет исследование активности ферментов ПФП в плазме и форменных элементах крови в патогенезе некоторых системных заболеваний соединительной ткани.

### Методика

Нами были обследованы 120 больных РА в возрасте от 25 до 50 лет, из них 100 женщин и 20 мужчин. РА был классическим или определенным по критериям АРА. Активность РА соответствовала II—III степени, стадия II—IV. В группе больных СКВ было

76 человек в возрасте от 17 до 45 лет, из них 71 женщина и 5 мужчин. Диагноз заболевания был достоверным, согласно критериям В. А. Насоновой. Активность СКВ соответствовала II—III степени, при этом у 10 больных течение заболевания было острым, у 10 — подострым, у остальных — хроническим. Обследовано также 54 больных ССД. Все они — женщины в возрасте 21—49 лет. Активность заболевания I—III степени, течение подострое или хроническое. Во время экспериментов больные не получали противовоспалительных и гормональных средств. В качестве контрольной группы было обследовано 75 здоровых доноров.

Форменные элементы крови извлекали путем дифференциального центрифугирования 20 мл венозной крови, используя в качестве антикоагулянта 3,8% раствор цитрата натрия. Эритроциты и тромбоциты выделяли, согласно рекомендациям Х. Бергмейера, с внесением соответствующих модификаций [10, 16, 18]. Лимфоциты и гранулоциты выделяли по методам [15, 19], основанным на фракционировании клеток в градиенте плотности верографи-на — фиколла. Препараты лимфоцитов и гранулоцитов достигали 95% чистоты. Контроль за последней проводили с помощью фазово-контрастной и световой микроскопии.

Лизаты форменных элементов крови получали путем обработки их 1% раствором дигитонина (15 мин при 4°C) с последующим центрифугированием в соответствующих скоростных режимах [10, 15, 16, 19].

Определение активности ферментов и интермедиатов окислительных и неокислительных реакций ПФП в плазме и лизатах форменных элементов крови проводили при оптимальном pH 7,4, оптимальной температуре 37°C, насыщающей концентрации субстрата и в зоне линейной зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации ферментного белка в пробе [8]. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы — Г-6-ФД (КФ 1.1.1.49) и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы — 6-ФГД (КФ 1.1.1.44) определяли по методу [23]. В качестве исходного субстрата неокислительных реакций ПФП использовали препарат монофосфорного эфира рибозы, содержащий около 20% рибулозо-5-фосфата. По скорости убыли рибозо-5-фосфата в среде инкубации, содержащей анализируемый материал, характеризовали суммарную активность пентозофосфатметаболизирующих ферментов, обусловленную каталитическим действием изомеразы (КФ 5.3.1.6) и эпимеразы (КФ 5.1.3.1) пентозофосфатов, а также транскетолазы (КФ 2.2.1.1), определяя рибозо-5-фосфат орциновым методом [24]. Седогептулозо-7-фосфат определяли по цветной реакции с цистеином при нагревании проб с концентрированной серной кислотой [20, 21] и судили об активности транскетолазы.



Активность ферментов ПФП в плазме крови человека в норме и при некоторых системных заболеваниях соединительной ткани

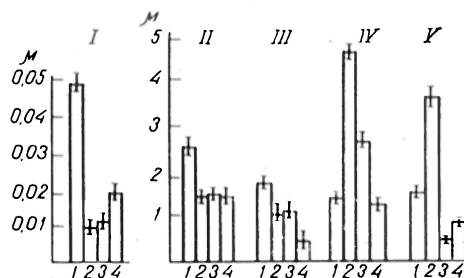
Условия опыта	Г-6-ФД	6-ФГД	ТК	Пентозофосфат-метаболизирующая активность
	нмоль НАДФ · Н/мин · мл		нмоль седогентулозо-7-фосфата/мин × мл	нмоль рибозо-5-фосфата/мин · мл
Норма	0,16±0,02	0,12±0,01	1,25±0,14	5,96±0,43
РА	0,32±0,05	0,31±0,08	13,0±0,43	87,9±1,4
$p$	<0,01	<0,02	<0,001	<0,001
СКВ	0,48±0,03	0,44±0,07	17,4±0,3	89,6±1,7
$p$	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
ССД	0,19±0,01	0,12±0,03	2,47±0,11	18,9±0,3
$p$	>0,05	>0,05	<0,001	<0,001
$p_{РА-СКВ}$	<0,01	>0,05	<0,001	>0,05

Гемоглобин определяли гемоглобинцианидным методом с применением ацетон-циангидрина [13]. Белок анализировали по методу [25].

Экспериментальные данные обработаны статистически, при этом был принят 95% уровень достоверности.

## Результаты и обсуждение

При РА и СКВ значительно возрастает активность ферментов ПФП в плазме крови (табл. 1). При этом активность Г-6-ФД и 6-ФГД при РА увеличивается в среднем в 2—2,5 раза, а при СКВ соответственно в 3—3,7 раза. Особенно возрастает активность неокислительных ферментов ПФП в плазме крови при этих заболеваниях: так, активность ТК при РА и СКВ увеличивается соответственно в 13—17 раз, а общая активность ферментов метаболизма пентозофосфатов возрастает при этом в среднем в 15 раз.



Соотношение активности окислительных и неокислительных ферментов в плазме и форменных элементах крови.

По оси абсцисс: 1 — в норме; 2 — при РА; 3 — при СКВ; 4 — при ССД. По осям ординат: соотношения суммарной активности дегидрогеназ ПФП и общей пентозофосфатметаболизирующей активности (μ). I — плазма крови; II — эритроциты; III — тромбоциты; IV — лимфоциты; V — гранулоциты.

Напротив, при ССД не было выявлено статистически достоверных отличий активности дегидрогеназ ПФП от уровня нормы, а активность неокислительных ферментов при этом оказывается повышенной в 2—3 раза (см. табл. 1).

Соотношение активности ключевых ферментов ПФП окислительного и неокислительного звена Г-6-ФД/ТК в плазме крови больных РА и СКВ примерно в 5 раз ниже наблюдаемого у здоровых людей и в 3 раза ниже, чем у больных ССД. Эти данные свидетельствуют об интенсификации процесса утилизации фосфорных эфиров пентоз в крови преимущественно за счет увеличения содержания неокислительных ферментов ПФП (см. рисунок), происходящего, по-видимому, вследствие выхода их из пораженных тканей. Известно, например, что различные заболевания, в патогенезе которых участвует иммунопатологический компонент (РА, СКВ, ССД, ревматизм и др.), отличаются вовлечением в патологический процесс целых систем органов, прежде всего сердечно-сосудистой системы, печени, почек.

Возможно, что накапливающиеся в крови больных РА и СКВ продукты деградации тканей, медиаторы воспаления и другие факторы активируют ферментные системы форменных элементов крови. В эритроцитах больных РА и СКВ наблюдается повышенная (в среднем в 2—3 раза) активность дегидрогеназ ПФП и ТК (табл. 2). Активность ферментов окислительного звена ПФП является важным фактором поддержания структурной целостности эритроцитов. Нормальная актив-

Активность ферментов ПФП в эритроцитах человека в норме и при некоторых системных заболеваниях соединительной ткани

Условия опыта	Г-6-ФД	6-ФГД	ТК	Пентозофосфатметаболизирующая активность
Норма	9,3±0,4	8,6±0,3	3,6±0,4	7,2±0,3
РА	18,5±0,4	8,0±0,3	6,5±0,4	21,5±0,7
<i>p</i>	<0,001	>0,05	<0,001	<0,001
СКВ	21,1±0,7	9,4±0,1	9,7±0,9	23,6±0,4
<i>p</i>	<0,001	>0,01	<0,001	<0,001
ССД	11,01±0,6	9,2±0,3	4,5±0,7	16,2±0,7
<i>p</i>	<0,02	>0,05	>0,05	<0,001

Примечание. Активность выражена: для дегидрогеназ ПФП — в нмоль НАДФ·Н за 1 мин на 1 мг гемоглобина; для ТК — в нмоль седогептулозо-7-фосфата за 1 мин на 1 мг гемоглобина; пентозофосфатметаболизирующая активность — в нмоль рибозо-5-фосфата за 1 мин на 1 мг гемоглобина.

ность Г-6-ФД, глутатионредуктазы и метгемоглобинредуктазы предотвращает преждевременный гемолиз эритроцитов, интенсивно восстанавливая метгемоглобин в гемоглобин даже при введении ядов, химических агентов или лекарственных препаратов сильного окислительного действия, таких как сульфаниламиды, салицилаты, целый ряд других нестероидных противовоспалительных агентов, применяемых в терапии системных заболеваний соединительной ткани, а также при бактериальной и вирусной инфекции, диабетическом ацидозе и уремии. Фактически уровнем активности дегидрогеназ ПФП эритроцитов, а точнее, степенью их устойчивости к ингибирующему эффекту НАДФ·Н и АТФ определяется способность красных кровяных клеток участвовать в генерации НАДФ·Н для поддержания необходимой концентрации глутатиона [7, 22].

Соотношения суммарной активности дегидрогеназ ПФП и общей пентозо-

фосфатметаболизирующей активности (величины  $\mu$ ) являются, по нашему мнению, одним из возможных показателей соотношения окислительных и неокислительных реакций ПФП. Так, в эритроцитах больных РА, СКВ и ССД величина  $\mu$  примерно вдвое ниже нормы (см. рисунок). Такое состояние ферментного аппарата ПФП в эритроцитах при РА, СКВ и ССД, возможно, неблагоприятно для резистентности эритроцитов и вносит определенные изменения в соотношения зрелых и старых форм эритроцитов. По-видимому, этим можно объяснить, отчасти, появление анемий, которые нередко могут сопровождать системные заболевания соединительной ткани [12], а также возникновение различных нарушений реологических характеристик крови (замедление или стагирование кровотока, внутрисосудистая агрегация эритроцитов).

Тромбоциты, как известно, «являются связующим звеном между системой

Таблица 3

Активность ферментов ПФП в тромбоцитах человека в норме и при некоторых системных заболеваниях соединительной ткани

Условия опыта	Г-6-ФД	6-ФГД	ТК	Пентозофосфатметаболизирующая активность
Норма	26,5±8,6	5,76±0,9	7,12±0,45	20,5±0,9
РА	52,4±1,3	10,7±0,5	15,9±0,1	70,1±1,2
<i>p</i>	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001
СКВ	62,4±0,9	12,4±0,3	19,9±0,2	77,9±2,4
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
ССД	28,9±0,7	9,4±0,5	8,94±0,35	127,7±9,6
<i>p</i>	>0,05	<0,001	<0,01	<0,001

Примечание. Активность здесь и в табл. 4 и 5 выражена: для дегидрогеназ ПФП — в нмоль НАДФ·Н за 1 мин на 1 мг белка; для ТК — в нмоль седогептулозо-7-фосфата за 1 мин на 1 мг белка; пентозофосфатметаболизирующая активность — в нмоль рибозо-5-фосфата за 1 мин на 1 мг белка.

Активность ферментов ПФП в лимфоцитах человека в норме и при некоторых системных заболеваниях соединительной ткани

Условия опыта	Г-6-ФД	6-ФГД	ТК	Пентозофосфатметаболизирующая активность
Норма	197,5±21,9	54,8±2,7	90,6±8,5	210,1±8,4
РА	610,0±37,5	165,0±9,7	120,9±8,9	176,1±9,7
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,02	<0,02
СКВ	721,7±49,6	207,9±10,6	154,8±11,6	422,5±34,7
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01
ССД	269,9±27,1	117,6±17,9	104,6±23,1	416,7±29,3
<i>p</i>	<0,05	<0,001	>0,05	<0,01
<i>p</i> <sub>РА-СКВ</sub>	>0,05	<0,01	<0,05	<0,001

комплемента и гуморальными факторами гемостаза» [9]. Активность ферментов ПФП в норме в тромбоцитах в 10—20 раз выше, чем в эритроцитах, хотя доля участия ПФП в общем метаболизме глюкозы в тромбоцитах составляет не более 12—25 % [27]. По нашим данным (табл. 3), активация дегидрогеназ ПФП, а также неокислительных ферментов ПФП приводит к достоверному снижению значения  $\mu$  в тромбоцитах при РА и СКВ (см. рисунок). При ССД статистически достоверно возрастает только общая пентозофосфатметаболизирующая активность тромбоцитов (см. табл. 3). Так, если при РА и СКВ скорость метаболизма фосфопентоз увеличивается в тромбоцитах в среднем в 3,5 раза, то при ССД она возрастает в 6 раз по сравнению с уровнем нормы, при этом значение  $\mu$  снижается втрое (см. рисунок). Следовательно, при РА, СКВ и ССД суммарная активность дегидрогеназ ПФП в тромбоцитах оказывается меньше, чем соответствующая им суммарная активность ферментов метаболизма пентозофосфатов. Следствием активации дегидрогеназ ПФП в тромбоцитах при РА и СКВ является интенсивное включение НАДФ·Н в це-

лый ряд восстановительных биосинтезов, в том числе таких важнейших именно для кровяных пластинок, как биосинтез жирных кислот — потенциальных источников энергии тромбоцитов, биосинтез простагландинов, простациклинов и др.

Полученные нами данные согласуются с клиническими наблюдениями о наличии у больных ревматологическими заболеваниями гиперкоагуляции разной степени выраженности, активации тромбопластина, повышенной агрегации тромбоцитов в микроциркуляторном русле. Высокая активность ферментов обмена пентозофосфатов в тромбоцитах при ССД может быть следствием и происходящих глубоких изменений во всех фазах свертывания крови с превалированием гиперкоагуляционных сдвигов, позволяющих считать, что при ССД происходит диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови [3].

При общем возрастании активности ферментов ПФП в лимфоцитах при РА, СКВ и ССД (табл. 4) отмечается статистически достоверное изменение соотношения окислительных и неокислительных реакций ПФП только при РА и СКВ (см. рисунок). Причем ве-

Т а б л и ц а 5

Активность ферментов ПФП в гранулоцитах человека в норме и при некоторых системных заболеваниях соединительной ткани

Условия опыта	Г-6-ФД	6-ФГД	ТК	Пентозофосфатметаболизирующая активность
Норма	220,4±45,6	79,3±2,1	102,4±21,7	239,8±13,9
РА	780,5±51,4	517,6±11,9	356,1±27,3	386,3±29,4
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
СКВ	1035,9±94,2	935,4±9,7	401,7±27,9	6571,0±197,6
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01
ССД	280,4±23,7	100,7±9,4	122,7±9,8	614,7±24,3
<i>p</i>	>0,05	<0,05	>0,05	<0,001

личина  $\mu$  при РА в лимфоцитах возрастает в среднем в 3,7 раза, а при СКВ — соответственно в 2 раза. По-видимому, это связано с общей стимуляцией эффекторных механизмов лимфоцитов периферической крови, происходящей в ходе иммуновоспалительного процесса при РА и СКВ. В частности, активация ПФП в лимфоцитах при РА и СКВ вызвана усилением антителогенеза, участием лимфоцитов в реакциях гиперчувствительности замедленного типа в ответ на иммунокомплексную патологию, в ходе которых происходит продукция лимфокинов.

При общем возрастании активности ферментов ПФП в форменных элементах крови при РА и СКВ наиболее резкие сдвиги активности этих ферментов наблюдаются в гранулоцитах (табл. 5). Объясняется это прежде всего активацией фагоцитарной деятельности указанных клеток, которая всегда сопровождается резким возрастанием скорости протекания окислительно-восстановительных реакций, усиленной продукцией ряда высокоактивных форм кислорода (супероксидный радикал,  $H_2O_2$ , гидроксильный радикал и др.) и возрастанием скорости утилизации глюкозы по ПФП. По некоторым данным [17], при РА наблюдается значительная интенсивность хемилюминесценции полиморфонуклеаров под воздействием иммунных комплексов, которые в дальнейшем дестабилизируют клеточные и лизосомальные мембраны и способствуют выходу в кровь катионных белков.

При ССД, однако, в гранулоцитах обнаруживается высокая пентозофосфатметаболизирующая активность, превышающая норму в 2,6 раза. Уровень активности других исследованных ферментов ПФП при этом практически не отличается от контрольных значений. Расчет величины  $\mu$  показал, что при РА она возрастает в 2,7 раза, а при СКВ и ССД снижается соответственно в 4,2 и 2 раза. По-видимому, объяснить названные факты можно за счет различия лейкоцитарных свойств гранулоцитов при данных заболеваниях. Так, при РА происходит усиление агломерации этих клеток, а при СКВ и ССД реакция агломерации снижается [14].

Итак, в настоящей работе установлены особенности протекания окислительных и неокислительных реакций

ПФП в плазме и форменных элементах крови при изучаемых системных патологиях соединительной ткани. При РА и СКВ отмечена корреляция между нарастанием активности ферментов ПФП в плазме и форменных элементах крови (см. табл. 1—5) и степенью выраженности воспалительного процесса.

Можно рекомендовать использовать вычисление значения  $\mu$  для лимфоцитов и особенно для гранулоцитов больных РА, СКВ и ССД в клинической практике для постановки дифференциального диагноза.

Объяснение полученных нами экспериментальных данных по активности ферментов ПФП при рассмотренных системных патологиях соединительной ткани следует искать, исходя из патогенетических механизмов перестройки нейрогормональной регуляции метаболизма при РА, СКВ и ССД. Ведущая роль в патогенезе системных заболеваний соединительной ткани принадлежит, по-видимому, парасимпатическим механизмам [5].

Есть основания считать, что симпатическая и парасимпатическая нервные системы оказывают реципрокное регулирующее влияние на ферменты ПФП, о чем свидетельствуют разнонаправленные сдвиги активности окислительных ферментов ПФП, наблюдаемые в печени при десимпатизации и ваготомии [4]. Симпатическая нервная система (более молодая филогенетически) ингибирует ПФП, а парасимпатическая (более древняя) стимулирует.

Было бы ошибочным, однако, считать, что между симпатической и парасимпатической нервными системами всегда существуют антагонистические взаимоотношения. При протекании определенных физиологических или же патологических процессов эти системы, поддерживая гомеостаз, действуют как синергисты и в отношении ферментов ПФП.

Обсуждая регулируемость ферментов ПФП со стороны нервной системы, следует отметить важную роль лимбической системы в регуляции вегетативных функций. Лимбическая система (или висцеральный мозг), включая эффекторную зону-гипоталамус, в значительной мере ответственна за поддержание гомеостаза в организме, что достигается посредством регуля-

ции висцеро-рецептивной импульсации, осуществляющей деятельность внутренних органов и рефлекторную связь между ними, и секреторной активности эндокринных желез. Биохимическая основа этих церебро-висцеральных взаимоотношений хорошо прослеживается для ферментов ПФП при иммунопатологических нарушениях, в частности, при исследованных нами системных заболеваниях соединительной ткани.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гусева Н. Г. // Ревматология. — 1983. — № 2. — С. 3—10.
2. Дворянинович Л. И. // Пентозофосфатный путь превращения углеводов и его регуляция. — Гродно, 1978. — С. 49.
3. Иванова А. В., Якимова Н. Я. // Вопр. ревмат. — 1981. — № 2. — С. 50—53.
4. Ильин В. С., Емельянец А. М., Комаров Г. П. и др. // Журн. эволюц. биохим. — 1972. — Т. 8, № 3. — С. 240—247.
5. Кайнова А. С. // Вопр. ревмат. — 1974. — № 3. — С. 64—70.
6. Кудрявцева Г. В. // Успехи совр. биол. — 1978. — Т. 86, вып. 3. — С. 315—330.
7. Кудрявцева Г. В. // Там же. — 1980. — Т. 88, вып. 1. — С. 74—89.
8. Кудрявцева Г. В., Царенко Э. П. // Биохимия. — 1980. — Т. 45, № 4. — С. 594—599.
9. Кузник Б. И., Цыбиков Н. Н. // Актуальные проблемы гемостазиологии. — М., 1981. — С. 186—197.
10. Макаров С. А., Колотилова А. И. // Вопр. мед. химии. — 1983. — № 1. — С. 69—71.
11. Моренкова С. А., Светухин А. М. // Простагландины в эксперименте и клинике. — М., 1978. — С. 154—155.
12. Петров В. И. Физиология и патология обмена железа. — Л., 1982. — С. 187—199.
13. Пименова Л. М., Дервиз Г. В. // Унифицированные методы клинических лабораторных исследований. — М., 1974. — Вып. 6. — С. 11—12.
14. Съякте П. М. Клинико-иммунологические исследования при коллагенозах: Дис. ... канд. мед. наук. — Рига, 1967.
15. Фрик Г., Прейснер Э. // Иммунологические методы / Под ред. Х. Фримеля: Пер. с нем. — М., 1979. — С. 328—332.
16. Черняк Н. Б., Евлентьева Н. Е., Гуртовой И. М. // Пробл. гематол. — 1979. — № 11. — С. 54—56.
17. Brand S., Maly F., Müller W. // European Congress of Rheumatology, 10-th: Abstracts. — Moscow, 1983. — P. 62.
18. Bergmeyer H. // Methods of Enzymatic Analysis. — New York, 1965. — P. 744.
19. Boyum A. // Scand. J. clin. Lab. Invest. — 1968. — Suppl. 97. — P. 28.

20. Brownstone Y., Denstedt O. // Canad. J. Biochem. Physiol. — 1961. — Vol. 39. — P. 527—540.
21. Dische Z. // J. biol. Chem. — 1953. — Vol. 204. — P. 983—997.
22. Eggleston L., Krebs H. // Biochem. J. 1974. — Vol. 138. — P. 425—437.
23. Glock G., McLean P. // Ibid. — 1953. — Vol. 55. — P. 400—408.
24. Horecker B. // Meth. Enzymol. — 1957. — Vol. 3. — P. 105—118.
25. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
26. Reed P. // Ibid. — 1969. — Vol. 244. — P. 2459—2464.
27. Utulin N. // The Platelets: Fundamentals and Clinical Applications. — New York, 1978. — P. 7—37.
28. Zila L., Gergely P. // Immunopharmacology. — 1983. — Vol. 6. — P. 167—175.

Поступила 17.11.87

## PENTOSE PHOSPHATE PATHWAY OF CARBOHYDRATE METABOLISM IN SOME SYSTEMIC IMPAIRMENTS OF CONNECTIVE TISSUE

V. I. Shishkin, G. V. Kudryavtseva, S. A. Makarov

Institute for Postgraduate Training of Physicians, Leningrad

Ratios of activities of oxidative and nonoxidative enzymes involved in the pentose phosphate pathway of carbohydrate metabolism were altered in blood plasma and cells of the patients with systemic impairments of connective tissue. In rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus the enzymatic activity was increased in blood plasma and cells, while the most distinct activation of the enzymes was found in granulocytes. In systemic sclerodermia total activity of the enzymes involved in metabolism of pentose phosphates in granulocytes exceeded 2.6-fold their values under conditions of normal state, whereas activities of the other enzymes studied remained near normal values. Calculation of ratios ( $\mu$  value) between activities of the pathway oxidative and nonoxidative enzymes showed that the  $\mu$  value was increased 2.7-fold in rheumatoid arthritis, while this value was decreased in lupus erythematosus and systemic sclerodermia 4.2- and 2-fold, respectively. The  $\mu$  values, calculated on the basis of estimation of total activity of dehydrogenases from pentose phosphate pathway and total pentose phosphate metabolizing activity, might serve as a convenient diagnostic criterion for estimation of the ratio between activities of oxidative and nonoxidative enzymes involved in pentose phosphate pathway in granulocytes used for differential diagnosis of systemic impairments of connective tissue (rheumatoid arthritis, lupus erythematosus and systemic sclerodermia).

С. Э. Акопов, Г. С. Мхитарян, Г. А. Никогосян,  
Э. С. Габриелян

## О МЕХАНИЗМАХ ИЗМЕНЕНИЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ К ПРОСТАЦИКЛИНУ У БОЛЬНЫХ ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Республиканский диагностический центр Минздрава Армянской ССР, Ереван

Развитие тромбоцитарных дисфункций является одним из важных элементов патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний, связанного с атеро- и тромбогенезом, реологическими расстройствами, изменениями сосудистого тонуса и т. д. [2]. В нормальных условиях дисфункции тромбоцитов препятствует ряд физиологических факторов, среди которых ведущее значение принадлежит простаглицлину ( $\text{PGI}_2$ ), синтезирующемуся в сосудистой стенке, легких, почках [5].  $\text{PGI}_2$  является мощным антиагрегантом, подавляет реакцию высвобождения тромбоцитов, вызывает разрушение уже образовавшихся агрегатов, а также дает сильный сосудорасширяющий эффект [6]. Однако при патологии, в частности при коронарных и церебральных дисциркуляциях, эффективность воздействия  $\text{PGI}_2$  на тромбоциты снижается. что рассматривается как одна из причин возникновения сосудистых катастроф [1, 10]. До сих пор причины изменения чувствительности тромбоцитов к воздействию  $\text{PGI}_2$  остаются неясными.

Целью настоящей работы явилось исследование роли изменений связывания  $\text{PGI}_2$  тромбоцитами в механизмах нарушений его влияния на их функциональное состояние у больных цереброваскулярными заболеваниями.

### Методика

Обследовано 25 больных с дисциркуляторной энцефалопатией на фоне церебрального атеросклероза и его сочетаний с артериальной гипертензией, а в качестве контроля — 25 здоровых лиц. Возраст обследованных колебался от 35 до 60 лет.

Агрегацию тромбоцитов под действием АДФ ( $10^{-5}\text{M}$ ) оценивали на агрегометре «Payton» (США). Антиагрегантный эффект  $\text{PGI}_2$  измеряли в процентах от исходной агрегации, используя  $\text{PGI}_2$  в концентрации 2,5 нг/мл, близкой к величине ЭД<sub>75</sub> для его

антиагрегантного эффекта на тромбоцитах здоровых лиц.

При исследовании связывания простаглицлинов (ПГ) на мембранах тромбоцитов использовали метод [9]. Поскольку, по данным разных авторов,  $\text{PGI}_2$  и  $\text{PGE}_1$  имеют на мембране тромбоцитов общий рецептор, состояние рецепторов для  $\text{PGI}_2$  исследовали по вытеснению им  $^{14}\text{C}$ - $\text{PGE}_1$ , предварительно связанного с тромбоцитами [9]. Связывание  $^{14}\text{C}$ - $\text{PGE}_1$  проводили при его добавлении в концентрации 72 нМ к суспензии тромбоцитов, содержащей  $(3-5) \cdot 10^5$  клеток в 1 мкл. Разделение суспензии для оценки количеств связанного и несвязанного лиганда осуществляли методом быстрой фильтрации. При исследовании вытеснения лиганда  $\text{PGI}_2$  последний добавляли в концентрациях  $10^{-9}$  —  $10^{-7}\text{M}$ . Анализ результатов проводили, используя величины специфического связывания, определяемые в присутствии 1000-кратного избытка немеченого лиганда. Специфическое связывание составляло 70—80% от общего связывания. Константу диссоциации ( $K_{\text{дис}}$ ) и число мест связывания ( $N$ ) рассчитывали с помощью графического метода [7].

Связывающую способность цАМФ-зависимых протеинкиназ тромбоцитов определяли методом ультрафильтрации на мембранных фильтрах «Миллипор» [3, 4]. Тромбоциты разрушали замораживанием — оттаиванием, затем гомогенизировали в буфере Михаэлиса с добавлением ЭГТА (1 мМ), после чего суспензию фильтровали и диализовали в течение 12 ч [3]. Концентрация белка в пробах составляла 1—1,5 мг/мл.  $^3\text{H}$ -цАМФ добавляли в пробу в концентрациях от  $10^{-9}$  до  $10^{-8}\text{M}$ .  $K_{\text{дис}}$  и число центров связывания цАМФ рассчитывали по графикам Лайнуивера — Берка.

Радиоактивность проб измеряли на сцинтилляционном счетчике «Mark-III», США.

Использованы  $^{14}\text{C}$ - $\text{PGE}_1\alpha$  и  $^3\text{H}$ -цАМФ («Amersham», Англия),  $\text{PGI}_2$  («Sigma», США),  $\text{PGE}_1$  и 6-кето- $\text{PGF}_1\alpha$  («Upjohn Co.», США), ЭГТА («Fluka», Швейцария), остальные реактивы — отечественного производства.

### Результаты и обсуждение

Анализ распределений антиагрегантной активности  $\text{PGI}_2$  у здоровых лиц и больных с дисциркуляторной энцефалопатией показал, что в обеих группах она варьирует в широких пределах, но в группе больных преобладают лица с низкой чувствительностью тромбоцитов к  $\text{PGI}_2$  (табл. 1). На основе полученных данных были выделены группы лиц с высокой и низкой



Таблица 1

Действие  $\text{PGI}_2$  в концентрации 2,5 нг/мл на агрегацию тромбоцитов у здоровых и больных дисциркуляторной энцефалопатией ( $n=25$ )

Группа обследованных	Антиагрегантный эффект $\text{PGI}_2$ , % от исходной величины агрегации			
	>90	90—50	50—20	<20
Больные дисциркуляторной энцефалопатией	1	3	9	12
Здоровые ( $n=25$ )	7	12	5	1

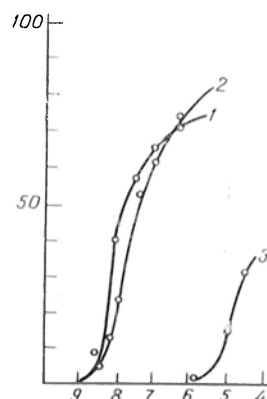
Примечание. Указано число лиц.

чувствительностью тромбоцитов к  $\text{PGI}_2$  и исследовано его связывание с кровяными пластинками этих больных (табл. 2).

Исследование вытеснения  $^{14}\text{C}$ -ПГЕ<sub>1</sub> из связи с рецепторами показало, что  $\text{PGI}_2$  и немеченый ПГЕ<sub>1</sub> подавляют его связывание практически одинаково (рис. 1). ЭД<sub>50</sub> для  $\text{PGI}_2$  оказалась даже несколько более низкой, чем для ПГЕ<sub>1</sub> ( $2,2 \cdot 10^{-8}$  и  $5,9 \cdot 10^{-8}$  М соответственно), что свидетельствует о большем средстве рецепторов к  $\text{PGI}_2$ . При этом стабильный, но неактивный метаболит  $\text{PGI}_2$  — 6-кето-ПГФ<sub>1 $\alpha$</sub>  — резко уступает им по способности подавлять связывание лиганда (см. рис. 1). Способность  $\text{PGI}_2$  вытеснять меченый ПГЕ<sub>1</sub> из его связи с рецепторами считается доказательством того, что антиагрегантный эффект этих агентов

Рис. 1. Влияние  $\text{PGI}_2$  (1), ПГЕ<sub>2</sub> (2) и 6-кето-ПГФ<sub>1</sub> (3) на связывание  $^{14}\text{C}$ -ПГЕ<sub>1</sub> с тромбоцитами человека.

Приведены средние результаты 5 опытов. По оси ординат — подавление связывания (% от исходной величины), по оси абсцисс — отрицательный логарифм концентрации.



реализуется через общие рецепторы [2, 9].

Оценка процессов связывания в координатах Скетчарда показала, что графики не линейны, а имеют отчетливый излом (рис. 2). Это свидетельствует о наличии двух типов центров связывания  $\text{PGI}_2$  с различным сродством к этому агенту. Представления о двух типах центров связывания для  $\text{PGI}_2$  и ПГЕ<sub>1</sub> (или двух состояниях одного рецептора) — высоко- и низкоаффинных — соответствуют данным литературы [8, 9]. Анализ состояния этих рецепторов у лиц с различной реактивностью тромбоцитов показал, что у больных с церебральными диссемиями с низкой чувствительностью тромбоцитов к  $\text{PGI}_2$  наблюдаются недостоверное увеличение  $K_{\text{дис}}$ , свидетельствующее о некотором понижении

Таблица 2

Параметры связывания  $\text{PGI}_2$  и цАМФ в тромбоцитах человека ( $M \pm m$ )

Группа обследованных	Антиагрегантный эффект $\text{PGI}_2$ (2,5 нг/мл), %	Связывание $\text{PGI}_2$ тромбоцитами		Связывание цАМФ протенипилазами	
		$K_{\text{дис}} \cdot 10^{-8}$ М	число рецепторов на 1 тромбоцит	$K_{\text{дис}} \cdot 10^{-8}$ М	число рецепторов, пмоль на 1 мг белка
Здоровые лица с высокой чувствительностью тромбоцитов к $\text{PGI}_2$ ( $n=12$ )	$88,0 \pm 3,9$	$32,7 \pm 2,5$	$701,6 \pm 18,1$	$0,435 \pm 0,02$	$0,57 \pm 0,04$
Больные дисциркуляторной энцефалопатией с низкой чувствительностью тромбоцитов к $\text{PGI}_2$ ( $n=17$ ):					
1-я подгруппа ( $n=11$ )	$10,8 \pm 3,5^{**}$	$41,8 \pm 3,0$	$272,7 \pm 28,5^{*}$	$0,450 \pm 0,01$	$0,43 \pm 0,04$
2-я подгруппа ( $n=6$ )	$16,8 \pm 6,3^{**}$	$35,7 \pm 3,2$	$677,5 \pm 10,5$	$0,410 \pm 0,02$	$0,26 \pm 0,01^{*}$

Примечание. Звездочками отмечены параметры, достоверно отличающиеся от контрольных: одна —  $p < 0,05$ , две —  $p < 0,01$ .

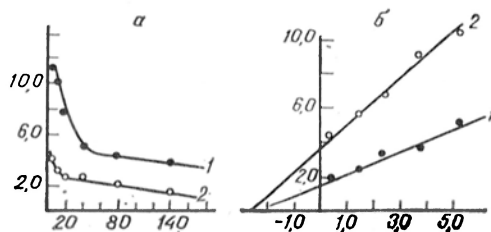


Рис. 2. Исследование связывания  $\text{PGI}_2$  и цАМФ в тромбоцитах у здорового человека с высокой чувствительностью тромбоцитов к  $\text{PGI}_2$  (1) и у больного дисциркуляторной энцефалопатией с низкой чувствительностью (2). а — исследование конкурентного подавления связывания  $^{125}\text{I}$ -ПГЕ<sub>1</sub> возрастающими концентрациями  $\text{PGI}_2$  ( $10^{-9}$  —  $10^{-7}$  М) в координатах Скотчарда. По оси ординат — отношение связанного и свободного лиганда ( $\cdot 10^3$ ); по оси абсцисс — концентрация связанного лиганда (в пмоль  $\cdot 10^3$ ); б — зависимость связывания  $^3\text{H}$ -цАМФ протеинкиназами от его концентрации в среде в двойных обратных координатах. По оси ординат — обратная величина количества связанного лиганда, по оси абсцисс — обратная величина концентрации лиганда.

средства к лиганду, и существенное снижение числа центров связывания, особенно высокоаффинных (см. табл. 2, рис. 2). При этом интересно отметить, что у одного обследуемого из группы здоровых, у которого антиагрегантный эффект  $\text{PGI}_2$  был низок, картина связывания  $\text{PGI}_2$  изменялась аналогичным образом ( $K_{\text{дис}} = 49,2 \times 10^{-9}$  М,  $N = 175$ ), а с другой стороны, у одного из обследованных больных, у которого эффект  $\text{PGI}_2$  был полностью сохранен, параметры связывания были близки к контрольным ( $K_{\text{дис}} = 36,9 \cdot 10^{-9}$  М,  $N = 680$ ).

Отчетливое понижение характеристик высокоаффинного связывания  $\text{PGI}_2$  наблюдалось только у 11 (1-я подгруппа) из 17 больных с пониженной чувствительностью тромбоцитов к  $\text{PGI}_2$ ; у остальных они были близки к контрольным цифрам (см. табл. 2). По-видимому, в этом случае снижение эффективности воздействия  $\text{PGI}_2$  связано с иными причинами.

С целью поиска других факторов, влияющих на тромбоцитарные эффекты  $\text{PGI}_2$ , было оценено состояние связывания цАМФ с тромбоцитарными протеинкиназами. Выбор этого направления исследований обусловлен тем, что в механизмах антиагрегантного действия  $\text{PGI}_2$  ведущее значение придается увеличению внутритромбоцитарной концентрации цАМФ [2, 5, 6, 9]. Реализация же эффектов последнего во многом определяется особенностями его взаимодействия с цАМФ-за-

висимыми протеинкиназами, которое часто нарушается при патологических состояниях [3, 4]. Как показало проведенное исследование, у лиц без нарушений связывания  $\text{PGI}_2$  (6 человек; 2-я подгруппа) наблюдается понижение числа центров связывания цАМФ при незначительных изменениях  $K_{\text{дис}}$  (см. табл. 2, рис. 2). Интересно отметить, что в 1-й подгруппе лиц с нарушениями связывания  $\text{PGI}_2$  параметры связывания цАМФ в основном соответствовали контрольным величинам. Лишь у 4 человек они были нарушены в той же степени, что и во 2-й подгруппе. Важно то обстоятельство, что у всех этих лиц степень подавления антиагрегантного эффекта  $\text{PGI}_2$  была максимальной.

Таким образом, проведенное исследование позволило впервые идентифицировать 2 типа изменений чувствительности тромбоцитов к ведущему физиологическому регулятору —  $\text{PGI}_2$ . При первом типе нарушена организация рецепторного аппарата  $\text{PGI}_2$  на мембранах кровяных пластинок, при втором — антиагрегантное воздействие цАМФ, что обусловлено изменениями связывания последнего с протеинкиназами. При этом у определенной категории лиц возможен сочетанный (смешанный) тип, включающий оба описанных выше и приводящий, по-видимому, к наиболее глубокому угнетению антиагрегантного воздействия  $\text{PGI}_2$ . Все это может сыграть важную роль в развитии внутрисосудистых дисфункций тромбоцитов. Механизмы этих дисфункций у различных больных могут быть неодинаковыми и соответственно неодинаковы должны быть и пути корректирующего воздействия.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Акопов С. Э., Габриелян Э. С., Тунян Ю. С. // Журн. невропатол. и психиатр. — 1985. — № 8. — С. 1146—1150.
2. Габриелян Э. С., Акопов С. Э. Клетки крови и кровообращение. — Ереван, 1985.
3. Горбачевская Л. В. // Вопр. мед. химии. — 1978. — № 3. — С. 432—426.
4. Хохлов А. П., Малаховский В. К., Ненашева Т. Н. // Лаб. дело. — 1985. — № 2. — С. 101—103.
5. Gryglewski R. J., Korbut R., Ocelkiewicz A. // Nature. — 1978. — Vol. 273. — P. 765—767.
6. Moncada S., Vane J. R. // Drugs. — 1981. — Vol. 21. — P. 430—437.
7. Rosenthal H. E. // Analyt. Biochem. — 1967. — Vol. 20. — P. 525—532.

8. Rücker W., Schrör K. // Biochem. Pharmacol. — 1983. — Vol. 32. — P. 2405—2410.
9. Schafer A. I., Cooper B., O'Hara D., Handin R. // J. biol. Chem. — 1979. — Vol. 234. — P. 2914—2917.
10. Sinzinger H., Scherthaner G., Kaliman J. // Prostaglandins. — 1981. — Vol. 22. — P. 773—781.

Поступила 17.11.87

# ALTERATIONS IN SENSITIVITY OF THROMBOCYTES TO THE ANTIAGGREGATION EFFECT OF PROSTACYCLINE IN PATIENTS WITH CEREBRAL DYSHEMIAS

S. E. Akopov, G. S. Mkhitarian, G. A. Nikogossyan, E. S. Gabrielyan

Diagnostic Centre, Ministry of Public Health of the Armenian SSR, Yerevan

Sensitivity of thrombocytes to the antiaggregation effect of prostacycline was decreased in patients with dyscirculatory encephalopathy, which occurred in response to, at least, two reasons: a decrease in content of highly affinity receptors of prostacycline on thrombocyte membranes and as a result of impairment in binding ability of the thrombocyte protein kinases. Combination of both these factors was also possible, which caused especially distinct impairments in the prostacycline control of the thrombocyte functions.

УДК 616.391:577.161.2]-008.64-07:[616.153.962.4:616.153.916

Л. И. Апуховская, Л. В. Антоненко, Ю. Д. Холодова, П. А. Возиян, Е. В. Солодова

## СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ И ЛИПИДСВЯЗЫВАЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ ФИБРИНОГЕНА И $\gamma$ -ГЛОБУЛИНОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ ПРИ ВИТАМИН-D-ДЕФИЦИТНОМ РАХИТЕ

Институт биохимии им. А. В. Палладина АН УССР, Киев

Известно, что заболевание рахитом сопровождается глубокими нарушениями биосинтеза липидов, что приводит к изменению их содержания в плазме крови и индивидуальных белках плазмы крови [5, 15, 16].

Особый интерес представляет изучение связи липидов со специфическими белками (фибриноген и  $\gamma$ -глобулины), содержание которых в плазме крови высоко и свойства которых могут изменяться вследствие обогащения их липидными компонентами [4, 18] при различных заболеваниях.

При экспериментальном атеросклерозе наиболее ранние изменения наблюдаются в фибриногене, где значительно увеличивается содержание липидных компонентов [4]. В атеросклеротических бляшках появляется патологический фибриноген с очень низкой степенью растворимости [18]. Можно предположить, что уменьшение растворимости фибриногена является следствием его обогащения гидрофобными соединениями.

При экспериментальном D-гиповитаминозе значительно увеличивается содержание липидов, связанных с иммуноглобулинами и фибриногеном [2]. Изменение содержания липидов, связанных со специфическими белками, дает основание предположить существенную роль липидов в тех процессах, которые осуществляются с помощью

этих белков. Связываясь с белками, липиды, отличающиеся многообразием структурных форм, могут по-разному влиять на их конформацию и биологические свойства [3]. В то же время липидсвязывающая способность белков во многом предопределяется их структурой.

В связи с указанным представилось важным исследовать у больных рахитом детей липидсвязывающую способность и структурные особенности фибриногена и  $\gamma$ -глобулинов плазмы крови, которые могут приводить к нарушениям их функциональной активности.

### Методика

Под наблюдением находилось 60 детей в возрасте от 4 до 12 мес. Из них 15 были здоровы и составляли контрольную группу, 45 имели рахит II степени тяжести в периоде разгара заболевания. Диагноз устанавливали на основании клинико-биохимического обследования [13]. У больных рахитом детей содержание кальция в сыворотке крови составляет  $1,8 \pm 1,1$  ммоль/л против  $2,60 \pm 0,05$  ммоль/л у здоровых, неорганического фосфора —  $1,10 \pm 0,05$  ммоль/л против  $1,8 \pm 0,1$  ммоль/л у здоровых детей. Активность щелочной фосфатазы увеличивается от  $208 \pm 16$  Е/л у здоровых детей до  $446 \pm 63$  Е/л у больных рахитом. Уровень активных метаболитов витамина D<sub>3</sub> у здоровых детей составляет  $47,4 \pm 2,4$  нг/мл для 25 (ОН)D<sub>3</sub>,  $6,1 \pm 1,6$  нг/мл для 24,25 (ОН)D<sub>3</sub> и  $69,7 \pm 4,6$  пг/мл для 1,25 (ОН)D<sub>3</sub>. При рахите II степени тяжести содержание исследуемых ме-

Содержание липидов (в мкмоль на 1 г белка), связанных с фибриногеном и  $\gamma$ -глобулинами у здоровых и больных рахитом детей ( $M \pm m$ )

Исследуемые липиды	Фибриноген		$\gamma$ -Глобулины	
	здоровые (n = 15)	больные рахитом (n = 45)	здоровые (n = 15)	больные рахитом (n = 45)
Холестерин	51,4 $\pm$ 5,5	99,7 $\pm$ 18,9*	23,1 $\pm$ 3,7	20,1 $\pm$ 3,7
Эфиры холестерина	97,5 $\pm$ 25,0	169,9 $\pm$ 21,0*	22,5 $\pm$ 2,7	31,2 $\pm$ 2,2*
Ланостерин	1,4 $\pm$ 0,7	1,3 $\pm$ 0,4	2,5 $\pm$ 0,4	2,1 $\pm$ 0,7
Сквален	1,6 $\pm$ 0,5	4,9 $\pm$ 0,9*	1,5 $\pm$ 0,1	5,7 $\pm$ 2,0*
ФХ	20,7 $\pm$ 2,0	7,9 $\pm$ 2,8*	5,2 $\pm$ 0,6	3,7 $\pm$ 1,3
СМ	18,0 $\pm$ 3,5	6,1 $\pm$ 1,7*	4,9 $\pm$ 1,0	4,5 $\pm$ 1,0
ЛФХ	7,8 $\pm$ 0,7	4,8 $\pm$ 1,1*	3,2 $\pm$ 0,7	2,8 $\pm$ 0,6
ЛФЭ	1,9 $\pm$ 0,1	2,5 $\pm$ 0,1*		
ФС	1,6 $\pm$ 0,5	—		

Примечание. ФХ — фосфатидилхолин; СМ — сфингомиелин; ЛФХ — лизофосфатидилхолин; ЛФЭ — лизофосфатидилэтанолламин; ФС — фосфатидилсерин. Здесь и в табл. 2: звездочка — различия достоверны.

табелитов снижается до 9,61 $\pm$ 0,90, 0,74 $\pm$  $\pm$ 0,04 нг/мл и 37,6 $\pm$ 1,3 пг/мл соответственно. Полученные результаты подтверждают наличие витамин D-дефицитного рахита II степени тяжести у обследуемой группы детей.

Белки плазмы крови выделяли с помощью полиэтилсгликоля (молекулярная масса 2000) [12]. Полученные белки растворяли в минимальном объеме физиологического раствора при подщелачивании. Содержание белка в пробе определяли с помощью метода Лоури и соавт. [17]. Липиды экстрагировали хлороформметанольным методом [14]. Количественный и качественный состав липидов определяли посредством метода тонкослойной хроматографии в сочетании с хроматоскопическими и калориметрическими измерениями [1, 19].

Для определения аминокислотного состава белки гидролизовали 6 н. раствором HCl при 105 °C в течение 24 ч. Содержание аминокислот исследовали на автоматическом аминокислотном анализаторе ААА-881 (ЧССР) и выражали в мкмоль%.

Исследование величин рК и количества доступных для связывания протонов ионогенных групп белка, дающих сведения о его структурных изменениях при данном заболевании, проводили методом потенциометрического титрования. Блок суспендировали в 0,12 М растворе KCl и титровали при 25 °C в атмосфере азота. Использовали схему с прямым отсчетом [9], где сигнал с ионометра подавался на записывающее устройство с усилителем EZ-2. Пределы титрования рН 8,0—2,7. Титрационные кривые рассчитывали с учетом данных титрования среды суспендирования и выражали как зависимость количества связывающего +Н от рН среды. Их анализировали в дифференциальной форме, предполагая независимость участков связывания [7, 8]. Все расчеты проведены на ЭВМ СОУ-1, программа записана на языке ФОРТРАН.

## Результаты и обсуждение

Исследование фосфолипидов, связанных с фибриногеном плазмы крови у практически здоровых детей, показало наличие в этом белке фосфати-

дилхолина, сфингомиелина, лизофосфатидилхолина, лизофосфатидилэтанолламина и фосфатидилсерина, в то время как  $\gamma$ -глобулины образуют комплексы только с тремя первыми из перечисленных фосфолипидов. Количество фосфолипидов в фибриногене значительно выше, чем в глобулинах. При этом на долю фосфатидилхолина и сфингомиелина приходится до 70 % от суммы определяемых фосфолипидов (табл. 1).

Исследуемые белки содержали также холестерин и его эфиры, ланостерин и предшественник биосинтеза холестерина — сквален. При этом фибриноген наиболее обогащен эфирами холестерина. Их уровень почти в 2 раза выше уровня свободного холестерина. Содержание холестерина и его эфиров в  $\gamma$ -глобулинах практически одинаково и значительно меньше такового в фибриногене. Соотношение холестерин/фосфолипиды для фибриногена и  $\gamma$ -глобулинов составляет соответственно 1,0 $\pm$ 0,1 и 1,7 $\pm$ 0,3.

Таким образом, у здоровых детей первого года жизни фибриноген значительно больше обогащен липидными компонентами, чем  $\gamma$ -глобулины.

Липиды циркулируют в крови в основном в комплексе с транспортными белками. Однако при нарушении биосинтеза холестерина и его избыточном поступлении в кровь при некоторых заболеваниях в транспорт включаются и специфические белки, что отражается на их стеринном составе. Оказалось, что у больных рахитом детей почти в 2 раза увеличивается

Таблица 2

Аминокислотный состав (в мкмоль%) фибриногена и  $\gamma$ -глобулинов у здоровых и больных рахитом детей

Аминокислота	Фибриноген		$\gamma$ -Глобулины	
	здоровые (n=15)	больные рахитом (n=45)	здоровые (n=15)	больные рахитом (n=45)
Лизин	7,80 $\pm$ 0,02	8,23 $\pm$ 0,29	8,31 $\pm$ 0,21	8,26 $\pm$ 0,16
Гистидин	2,12 $\pm$ 0,01	2,19 $\pm$ 0,09	2,34 $\pm$ 0,23	2,23 $\pm$ 0,13
Аргинин	3,86 $\pm$ 0,11	4,37 $\pm$ 0,15*	3,51 $\pm$ 0,03	3,79 $\pm$ 0,08
	13,78 $\pm$ 0,11	14,81 $\pm$ 0,46*	14,17 $\pm$ 0,26	14,50 $\pm$ 0,37
Аспарагиновая кислота	9,59 $\pm$ 0,21	10,72 $\pm$ 0,15*	8,86 $\pm$ 0,02	10,40 $\pm$ 0,26*
Глутаминовая кислота	11,29 $\pm$ 0,28	11,47 $\pm$ 0,21	10,32 $\pm$ 0,02	11,70 $\pm$ 0,30*
	20,88 $\pm$ 0,07	22,18 $\pm$ 0,30*	19,19 $\pm$ 0,37	22,13 $\pm$ 0,38*
Треонин	7,14 $\pm$ 0,04	6,81 $\pm$ 0,21	7,18 $\pm$ 0,10	6,68 $\pm$ 0,05
Серин	9,60 $\pm$ 0,06	9,07 $\pm$ 0,23	9,70 $\pm$ 0,18	8,78 $\pm$ 0,30*
Пролин	5,78 $\pm$ 0,18	6,13 $\pm$ 0,22	5,83 $\pm$ 0,51	6,56 $\pm$ 0,16
Глицин	7,31 $\pm$ 0,04	6,80 $\pm$ 0,35	6,40 $\pm$ 0,06	6,33 $\pm$ 0,27
Аланин	6,90 $\pm$ 0,19	6,79 $\pm$ 0,25	7,72 $\pm$ 0,15	7,68 $\pm$ 0,30
$\frac{1}{2}$ Цистин	1,85 $\pm$ 0,06	3,04 $\pm$ 0,14*	2,56 $\pm$ 0,01	1,64 $\pm$ 0,15*
	38,59 $\pm$ 0,57	38,70 $\pm$ 1,66	39,40 $\pm$ 0,08	37,67 $\pm$ 0,20*
Метионин	1,15 $\pm$ 0,10	1,26 $\pm$ 0,04	0,76 $\pm$ 0,05	0,56 $\pm$ 0,09
Валин	6,53 $\pm$ 0,06	5,93 $\pm$ 0,20	7,02 $\pm$ 0,06	7,18 $\pm$ 0,53
Изолейцин	2,52 $\pm$ 0,01	2,50 $\pm$ 0,16	2,07 $\pm$ 0,03	1,93 $\pm$ 0,11
Лейцин	8,75 $\pm$ 0,17	8,07 $\pm$ 0,14	9,30 $\pm$ 0,20	8,81 $\pm$ 0,14
Тирозин	3,94 $\pm$ 0,01	3,71 $\pm$ 0,08	3,92 $\pm$ 0,07	3,56 $\pm$ 0,10
Фенилаланин	3,91 $\pm$ 0,09	3,82 $\pm$ 0,07	4,12 $\pm$ 0,06	3,86 $\pm$ 0,07
	26,80 $\pm$ 0,21	25,10 $\pm$ 0,46*	27,19 $\pm$ 0,35	25,89 $\pm$ 0,55

уровень холестерина и его эфиров, связанных с фибриногеном, в то время как во фракции  $\gamma$ -глобулинов увеличивается содержание только этерифицированного холестерина. Общим для исследуемых белков плазмы крови больных рахитом детей является увеличение содержания в них эфиров холестерина, отражающее, вероятно, усиление процесса этерификации холесте-

рина в плазме крови и тканях при данном заболевании. Что касается фосфолипидов, то у детей, больных рахитом, общее содержание фосфолипидов в фибриногене уменьшается почти вдвое и практически остается без изменения в  $\gamma$ -глобулинах. Уменьшение общего содержания фосфолипидов в фибриногене происходит в основном за счет фосфатидилхолина и сфинго-

Таблица 3

Количество заряженных групп в фибриногене и  $\gamma$ -глобулинах у здоровых и больных рахитом детей по данным потенциометрического титрования ( $M \pm m$ )

Белок	Участок связывания	Здоровые		Больные рахитом	
		pK	емкость мг-экв на 1 г белка	pK	емкость мг-экв на 1 г белка
Фибриноген	I	2,87 $\pm$ 0,04	0,56 $\pm$ 0,06	2,95 $\pm$ 0,05	0,28 $\pm$ 0,12
	II	3,68 $\pm$ 0,07	0,77 $\pm$ 0,10	3,46 $\pm$ 0,10	0,50 $\pm$ 0,04
	III	4,84 $\pm$ 0,03	0,54 $\pm$ 0,02	4,78 $\pm$ 0,08	0,52 $\pm$ 0,02
			1,87 $\pm$ 0,18		1,30 $\pm$ 0,12
	IV	10,38 $\pm$ 0,07	0,60 $\pm$ 0,07	10,39 $\pm$ 0,08	0,24 $\pm$ 0,05
$\gamma$ -Глобулины	V	10,79 $\pm$ 0,03	0,21 $\pm$ 0,01	10,78 $\pm$ 0,04	0,07 $\pm$ 0,01
			0,81 $\pm$ 0,08		0,31 $\pm$ 0,06
	I	3,04 $\pm$ 0,05	0,51 $\pm$ 0,05	2,98 $\pm$ 0,03	0,58 $\pm$ 0,06
	II	3,51 $\pm$ 0,05	0,49 $\pm$ 0,04	3,48 $\pm$ 0,06	0,88 $\pm$ 0,07
	III	4,51 $\pm$ 0,06	0,66 $\pm$ 0,08	4,64 $\pm$ 0,01	0,35 $\pm$ 0,02
	IV		1,66 $\pm$ 0,17	5,76 $\pm$ 0,04	0,53 $\pm$ 0,04
			0,46 $\pm$ 0,03		2,34 $\pm$ 0,19
	V	10,39 $\pm$ 0,05	0,43 $\pm$ 0,03	10,33 $\pm$ 0,03	0,43 $\pm$ 0,02
	VI	10,85 $\pm$ 0,05	0,89 $\pm$ 0,06	10,78 $\pm$ 0,06	0,24 $\pm$ 0,03
					0,67 $\pm$ 0,05

миелина. Характерно также, что фосфатидилсерин у больных детей практически не определяется; отмечается некоторое увеличение содержания лизофосфатидилэтаноламина. Величина соотношения холестерина/фосфолипиды в условиях рахита в фибриногене увеличивается и составляет  $4,6 \pm 0,4$ , в то время как в  $\gamma$ -глобулинах практически не изменяется.

Обогащение при рахите специфических белков липидными компонентами может быть причиной нарушения их функциональной активности. Известно, что состав фосфолипидов, их ненасыщенность оказывают большое влияние на факторы свертывающей системы крови. Показано, что фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин обладают свойством стимулировать процесс свертывания крови. В то же время фосфатидилсерин, взаимодействуя с протромбином, тормозит тромбогенез и угнетает реакцию тромбин — фибриноген по типу сопряженного торможения.

Отсутствие корреляции между изменениями уровня свободного и этерифицированного холестерина, с одной стороны, и фосфолипидов — с другой, исключает предположение о связывании дополнительных количеств холестерина участками, содержащими фосфолипиды, и свидетельствует о прямом белок-липидном взаимодействии. Характер такого взаимодействия определяется типом белка [7]. Весьма вероятно, что связь может осуществляться по месту  $C=C \Rightarrow$  двойной связи в гистидине и триптофана или путем дополнительного образования водородных связей вследствие изменения структуры белка [11].

Исследование аминокислотного состава белков плазмы крови показало, что у детей при рахите в фибриногене достоверно увеличивается содержание аргинина, аспарагиновой кислоты и цистина. В то же время в  $\gamma$ -глобулинах увеличивается содержание кислых аминокислот и уменьшается количество серина, цистина (табл. 2).

Определение доступных для титрования ионогенных групп (табл. 3) в фибриногене свидетельствует о существенном уменьшении в условиях рахита количества кислотных групп, титруемых в интервале рН 8,0—2,5 от  $1,87 \pm 0,18$  в норме до  $1,3 \pm 0,12$  при рахите. Это происходит за счет отри-

цательно заряженных концевых и боковых карбоксильных групп с рК 2,9 и 3,7. При этом наблюдается достоверный сдвиг рК в последнем участке от 3,68 до 3,46, характеризующий структурные изменения в белке. Количество доступных для титрования в щелочной области ионогенных групп (рН 8,5—11,0) также достоверно уменьшается в условиях рахита за счет участков с рК 10,4 и 10,8, где титруются  $\epsilon$ -аминогруппы лизина и, возможно, ОН-группы тирозина. Их рК не изменялось.

Учитывая ранее отмеченное значительное увеличение содержания холестерина и его эфиров в фибриногене больных детей (на 124 мкмоль на 1 г белка), некомпенсированное уменьшение содержания фосфолипидов (на 28 мкмоль на 1 г белка), можно предположить, что липидное окружение экранирует как отрицательно, так и положительно заряженные группы фибриногена, делая их недоступными для взаимодействия с протонами. Аналогичный эффект холестерина отмечен ранее [10, 11]. При этом уменьшается доступность активных центров молекулы белка для ферментов, ионов кальция, липоидных компонентов и глобулинов, необходимых для его превращения в профибрин и дальнейшей полимеризации в фибрин при появлении в крови тромбина.

Очевидно, изменение структуры фибриногена должно значительно влиять на его функциональную активность. Кроме того, отмеченное изменение структуры белка может увеличивать вязкость крови, нарушая гемодинамические свойства. При повышении уровня липидов в тканях наблюдали понижение фибринолитической активности и сокращение времени свертывания крови [6]. Этот эффект во многом определяется жирнокислотным составом липидов.

Липидное окружение  $\gamma$ -глобулинов изменяется при рахите не так значительно, как в фибриногене (см. табл. 1). При этом наблюдаемое увеличение содержания кислых аминокислот (см. табл. 2) находит отражение в увеличении числа доступных для титрования ионогенных групп в области рН 8,0—2,5 (участок с рК 3,5 и появление дополнительного участка с рК 5,8). Некоторое же уменьшение числа доступных для титрования групп



в интервале рН 8,5—11,0 наблюдается за счет усиления их электростатического взаимодействия с дополнительными анионными участками и, следовательно, электростатической инактивации.

Таким образом, в исследованных белках плазмы крови при рахите поразному изменяются их липидсвязывающая способность, аминокислотный состав и число доступных для титрования ионогенных групп, т. е. электростатический баланс. В случае фибриногена структурные нарушения в большей степени обусловлены изменениями липидного окружения ионогенных групп белка.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ануховская Л. И., Ивашкевич С. П., Вендт В. П. // *Вопр. мед. химии*. — 1979. — № 5. — С. 548—554.
2. Ивашкевич С. П. // *Укр. биохим. журн.* — 1980. — Т. 52, № 1. — С. 97—102.
3. Кондратьева Л. Г., Трофимова С. И., Говсеева Н. П. // *Молекулярная биология*. — Киев, 1976. — Вып. 14. — С. 54—67.
4. Кондратьева Л. Г., Вендт В. П., Говсеева Н. Н., Соловцова К. М. // *Биохимия животных и человека*. — Киев, 1979. — Вып. 3. — С. 63.
5. Николенко И. А. // *Укр. биохим. журн.* — 1980. — Т. 52, № 4. — С. 511—518.
6. Романенко Е. Б., Алексенко А. В., Бурлакова Е. Б. // *Вопр. мед. химии*. — 1986. — № 3. — С. 122—126.
7. Селищева А. А., Образцов В. В., Козлов Ю. П. // *Науч. докл. высш. школы: Биол. науки*. — 1977. — № 6. — С. 7—23.
8. Холодова Ю. Д., Бондарь О. П. // *Докл. АН УССР, сер. Б*. — 1979. — № 1. — С. 63—68.
9. Холодова Ю. Д., Бондарь О. П. // *Цитология*. — 1980. — № 5. — С. 499—513.
10. Холодова Ю. Д., Ануховская Л. И., Бондарь О. П. и др. // *Укр. биохим. журн.* — 1980. — Т. 52, № 5. — С. 597—603.

11. Холодова Ю. Д. // Там же. — 1981. — Т. 53, № 5. — С. 114—130.
12. Шинкаренко А. А. Особенности взаимодействия полиэтиленгликоля с белками плазмы крови и возможности использования этого полимера для их фракционирования: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — Киев, 1972.
13. Ивашкевич С. П., Ануховская Л. И., Антипкин Ю. Г. и др. // *Рукопись деп. во ВНИИМИ МЗ СССР*. — М., 1986.
14. Dodge J. T., Mitchell C. F., Hanahan D. S. // *Arch. Biochem.* — 1963. — Vol. 100, N 1. — P. 119—123.
15. Hanna M., El-Sebaie B., Abdell Salan // *J. Egypt. pediat. Ass.* — 1973. — Vol. 21, N 4. — P. 69—73.
16. Kamel A. // *J. Egypt. med. Ass.* — 1975. — Vol. 58, N 3—4. — P. 189—195.
17. Lowry O. H., Rosebrough N. I., Farr A. L., Randall R. I. // *J. biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265—275.
18. Shainoff R. // *Atherosclerosis*. — 1972. — Vol. 16, N 1. — P. 287—296.
19. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. G., Vasendin J. M. // *J. Chromatogr.* — 1975. — Vol. 114, N 1. — P. 129—141.

Поступила 17.11.87

#### STRUCTURE PROPERTIES AND LIPID-BINDING ABILITY OF FIBRINOGEN AND $\gamma$ -GLOBULINS FROM BLOOD PLASMA IN VITAMIN D-DEPENDENT RICKETS

L. I. Apukhovskaya, L. V. Antonenko, Yu. D. Kholodova, P. A. Voznyan, E. V. Solodova

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Structure properties and lipid-binding ability of fibrinogen and  $\gamma$ -globulins were studied in blood plasma of children with rickets. Content of cholesterol and its esters, developing complexes with fibrinogen, was found to increase simultaneously with a decrease in the phospholipids, containing in the protein fraction, under conditions of the disease. Surface charge of the proteins studied, especially of fibrinogen, was altered, thus demonstrating the distinct impairments of their structure and functions. Lipid environment appears to be of importance in functional activity of these proteins.

УДК 616.127-005.8-092:612.017.1

Н. А. Добротина, Т. В. Копытова, М. А. Березина

#### НЕКОТОРЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИММУННОГО ГОМЕОСТАЗА ПРИ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА

Горьковский медицинский институт, Горьковский университет

Механизм аутоиммунных реакций при инфаркте миокарда (ИМ) и его осложнениях является одним из наименее изученных среди других патогенетических механизмов развития данного заболевания. Начиная с 1956 г. появляются сообщения о выявлении циркулирующих противокардиальных

антител при некрозе сердечной мышцы [18]. Эти данные получили подтверждение в экспериментальных и клинических наблюдениях [15, 20, 21]. Однако сведения о частоте выявления аутоиммунных изменений при ИМ, их динамике в зависимости от фаз развития и глубины поражения мышцы

сердца немногочисленны и противоречивы. Неясным остается вопрос о патофизиологическом (патогенетическом и адаптационном) значении циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) при сердечно-сосудистой патологии и о качественной характеристике и идентификации ЦИК.

Циркуляция в крови аутоантигенов, которые, возможно, представлены атерогенными липопротеинами [9], продуктами деструкции миокардиальных клеток [2, 23, 24], органоспецифическими антигенами [3, 25], начинается уже с первых часов развития заболевания. Они попадают в регионарные лимфатические узлы, где проявляются признаки повышенной биологической активности в связи с продукцией противосердечных антител [8, 11, 20]. Аптитела, являясь иммуноглобулинами, характеризуются идиотипической специфичностью и участвуют в иммунных и аутоиммунных реакциях [6, 8, 16, 17]. Иммунологические изменения при ИМ описаны достаточно полно, однако накопленные факты не дают четкого представления о роли обнаруживаемых в крови антител, специфически отвечающих на некроз сердечной мышцы. Показано [7, 13], что при ИМ имеют место напряженные гуморальные и клеточные аутоиммунные процессы, направленные против антигенов миокарда, конечным результатом которых является образование иммунных комплексов (ИК). Хотя циркуляция ИК в превышающих нормальное значение концентрациях не всегда приводит к образованию патогенных отложений в организме, все же установление факта наличия ЦИК в биологических жидкостях, определение их количества могут служить интегральными показателями участия ЦИК в развитии патологического процесса [4]. Изучение динамики изменения количества ЦИК в течение острого периода ИМ [1, 12, 14] пока не привело к окончательному выяснению их патогенетического значения при этом, хотя и получены доказательства повреждения эндотелия коронарных сосудов «малыми» ИК [10].

Таким образом, в исследованиях последних лет проявляется большая заинтересованность состоянием системы иммуноглобулины (ИГ) — ЦИК у больных ишемической болезнью сердца, особенно в связи с повышением

частоты появления атипичных форм течения ИМ, развития различных, в том числе и аутоиммунных его осложнений. Данная работа посвящена анализу взаимосвязи ИГ и ЦИК при двух формах течения ИМ.

## Методика

Обследовано 77 человек с ИМ в остром периоде, из них 47 мужчин в возрасте от 40 до 70 лет и 30 женщин в возрасте от 54 до 78 лет. Контрольную группу составили 23 здоровых донора. Инфаркт миокарда с обычным, не рецидивирующим течением и без осложнений отмечен у 57 пациентов, осложнение течения ИМ в виде эпистенокардического перикардита обнаружено у 20 больных.

ИГ в сыворотке крови определяли методом радиальной иммунодиффузии [22].

Содержание ЦИК выявлялось по методу [19] в модификации [5]. Метод основан на селективной преципитации комплексов антиген — антитело различными концентрациями полиэтиленгликоля (ПЭГ, мол. масса 60 000) с последующим фотометрическим измерением поглощения.

Данные были статистически обработаны методами вариационной статистики. Рассчитано 60 криволинейных корреляционных зависимостей ( $\eta$ ). Вычисляли два коэффициента:

$$\eta_{xy} = \frac{\sigma_{xm}}{\sigma_x}; \quad \eta_{yx} = \frac{\sigma_{ym}}{\sigma_y},$$

где  $\sigma_{xm}$  и  $\sigma_{ym}$  — средние квадратичные отклонения отдельных групповых средних  $x$  и  $y$ . Расчет криволинейных корреляций позволяет найти аргументно-функциональную зависимость между показателями и прояснить некоторые механизмы гомеостаза в норме и при патологии.

## Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены данные о содержании иммуноглобулинов и ЦИК в норме и при двух вариантах течения миокарда. Исследования проводили в остром периоде заболевания. Высокий уровень изучаемых показателей в обеих исследованных группах отмечали при поступлении больных в стационар. При этом значения показателей в 3-й группе, как правило, были выше, чем во 2-й. Динамическое изучение показало постепенное увеличение ИГА и ИГГ от острого периода к подострому и при выписке в группе больных с неосложненным течением ИМ, что находит подтверждение в литературе [6, 16]. В то же время у больных ИМ, осложнившимся перикардитом, имело место снижение уровня ИГГ и увеличение всех остальных показателей в остром периоде и сохранение высоких значений

Содержание иммуноглобулинов и циркулирующих иммунных комплексов в норме и при ИМ ( $M \pm m$ )

Группа	ЦИК, усл. ед.		ИГ, мг%		
	БИК	МИК	А	М	Г
1-я	75,0 $\pm$ 5,2	350,5 $\pm$ 50,3	310,2 $\pm$ 70,4	120,7 $\pm$ 70,0	1330,2 $\pm$ 265,0
2-я:					
поступление	109,4 $\pm$ 28,4	459,4 $\pm$ 116,5	502,7 $\pm$ 162,6	100,7 $\pm$ 37,2	1886,7 $\pm$ 484,6
$p$	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
острый период	105,6 $\pm$ 27,5	406,3 $\pm$ 106,9	463,8 $\pm$ 78,2	100,1 $\pm$ 42,8	1635,3 $\pm$ 492,3
$p$	>0,05	>0,05	>0,04	>0,05	>0,05
14-е сутки	119,5 $\pm$ 20,3	445,3 $\pm$ 82,9	491,7 $\pm$ 66,3	96,2 $\pm$ 41,9	2273,2 $\pm$ 496,4
$p$	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05
перед выпиской	88,0 $\pm$ 15,2	356,8 $\pm$ 70,0	621,2 $\pm$ 91,1	137,5 $\pm$ 34,2	2836,5 $\pm$ 530,8
$p$	>0,05	>0,05	<0,05	>0,05	<0,05
3-я:					
поступление	99,3 $\pm$ 26,4	574,2 $\pm$ 101,8	474,0 $\pm$ 72,3	82,0 $\pm$ 21,1	2681,0 $\pm$ 360,4
$p$	>0,05	<0,05	>0,05	>0,05	<0,05
острый период	119,3 $\pm$ 50,0	538,3 $\pm$ 177,8	582,7 $\pm$ 120,7	114,5 $\pm$ 43,0	761,3 $\pm$ 186,2
$p$	>0,05	<0,05	<0,05	>0,05	>0,05
14-е сутки	127,6 $\pm$ 29,4	520,2 $\pm$ 161,8	476,7 $\pm$ 76,2	85,8 $\pm$ 26,7	819,2 $\pm$ 184,5
$p$	<0,05	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05
перед выпиской	108,7 $\pm$ 30,2	424,9 $\pm$ 138,6	495,1 $\pm$ 104,3	105,2 $\pm$ 23,7	2181,2 $\pm$ 554,3
$p$	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05

Примечание. 1-я группа — здоровые доноры; 2-я — больные с неосложненным течением острого периода ИМ; 3-я — больные с эпистенокардическим перикардитом в остром периоде ИМ.

при выписке больных. Вероятно, это связано с иммунологической функцией защиты и удаления из организма большого количества продуктов тканевого распада и проявлениями ауто-сенсibilизации.

С целью выяснения некоторых механизмов иммунного гомеостаза нами были вычислены корреляционные отношения ( $\eta$ ) между исследованными показателями. Оказалось, что у практически здоровых людей наблюдается высокая взаимозависимость между ИГ и ЦИК. Эта корреляционная взаимозависимость приближалась к прямой, имея средние коэффициенты от 0,69 до 0,98. Достоверная степень тесноты связи между ИГ и обоими типами иммунных комплексов (от 0,33 до 0,70) была выявлена и в обеих исследованных группах больных. При этом особенности  $\eta$  при ИМ во 2-й группе выявляли разбалансированность иммунного гомеостаза. Коэффициенты взаимосвязи имели значения от 0,41 до 0,54 и, как правило, отражали среднюю степень тесноты связи. В 3-й группе больных установлены более тесные корреляции (от 0,51 до 0,71), особенно между «большими» иммунными комплексами (БИК) и ИГ (от 0,61 до 0,71). Последние чаще выступали в роли аргументного показателя.

Этот факт позволяет на качественно ином уровне трактовать особенности иммунного гомеостаза при различных вариантах течения ИМ.

Известно, что корреляционные отношения позволяют выяснить роль различных показателей в ходе развития заболевания и могут служить обоснованием терапии. В связи с этим мы провели анализ  $\eta$  между исследованными показателями при динамическом наблюдении за больными (табл. 2 и 3). Выявлено, что в динамике течения неосложненного ИМ резко возрастает корреляция между ИГ и «малыми» ИК (МИК) (от 0,33—0,40 до 0,78—0,81). У больных 3-й группы эта тенденция менее выражена, разбалансированность гомеостаза остается характерной в течение всего периода изучения. Корреляция между ИГ и БИК была в основном высокой, но значения ее колебались в обеих группах. При первоначальном доминантном влиянии БИК над ИГ в 3-й группе в дальнейшем роль ведущего аргументного признака берут на себя ИГ. Теоретическое значение смены аргументных признаков в период развития перикардита, возможно, связано с тем, что в это время идет быстрое образование ИК с ИГМ и ИГГ, причем преимущественно БИК, которые способны

Корреляционные взаимоотношения между иммунологическими показателями в динамике ИМ (2-я группа)

Период заболевания	Между БИК и ИГА		Ведущий признак	Между ИГГ и БИК		Ведущий признак	Между МИК и ИГА		Ведущий признак	Между МИК и ИГГ		Ведущий признак
	по ИГА	по БИК		по ИГГ	по БИК		по ИГА	по МИК		по ИГГ	по МИК	
Поступление	0,65	0,57	ИГА	0,43	0,34	ИГГ	0,40	0,54	МИК	0,33	0,43	МИК
Острый период	0,47	0,40		0,43	0,49		0,59	0,55		0,91	0,96	
Конец острого периода	0,65	0,56	ИГА	0,41	0,53	БИК	0,71	0,62	ИГА	0,43	0,55	МИК
14-е сутки	0,42	0,49		0,53	0,54		0,76	0,50		0,81	0,49	

Таблица 3

Корреляционные взаимоотношения между иммунологическими показателями в динамике ИМ, осложненного развитием перикардита (3-я группа)

Период заболевания	Между БИК и ИГА		Ведущий признак	Между БИК и ИГГ		Ведущий признак	Между МИК и ИГА		Ведущий признак	Между МИК и ИГГ		Ведущий признак
	по ИГА	по БИК		по ИГГ	по БИК		по ИГА	по МИК		по ИГГ	по МИК	
Поступление	0,86	0,69	ИГА	0,44	0,60	БИК	0,44	0,43		0,41	0,44	
Перед развитием перикардита	0,60	0,39	ИГА	0,84	0,41	ИГГ	0,36	0,68	МИК	0,71	0,50	ИГГ
Развитие перикардита	0,71	0,53	ИГА	0,66	0,82	БИК	0,53	0,55		0,71	0,75	
Нормализация после перикардита	0,61	0,78	БИК	0,64	0,82	БИК	0,66	0,83	МИК	0,63	0,60	
14-е сутки	0,71	0,59	ИГА	0,63	0,66		0,66	0,55	ИГА	0,87	0,68	ИГГ

соединяться с компонентами комплекса, подвергаться процессам лизиса и элиминации [25].

ИМ — это активный иммунный и аутоиммунный процесс. Очевидно, в нем можно выделить три периода, когда преобладают разные антигены и аутоантигены. Состояние, предшествующее ИМ, характеризуется преобладанием аутоантигенов различной природы, возможно, представляющих собой липопротеиновые комплексы. Вторая стадия — основная — связана непосредственно с некротическими процессами в миокарде. В это время имеют место различные варианты миоглобиновой реакции, антигенами выступают продукты распада миокардиальных клеток. Постнекротический период, охватывающий подострый период ИМ, представляет собой комплекс биохимических и иммунных реакций, связанных с репарационными процессами. На всех стадиях идет интенсивное комплексобразование антиген — антитело, изучение характери-

стик которого позволит выяснить возможные механизмы иммунного гомеостаза при данной патологии.

Таким образом, напряженное состояние иммунного гомеостаза у больных в остром периоде ИМ проявлялось в повышении содержания ИГА и ИГГ и «малых» ЦИК; развитие перикардита сопровождалось резким характерным снижением содержания ИГГ (провал), что может служить иммунным критерием прогнозирования болезней.

Расчет корреляционных отношений (криволинейных корреляций) между ИГ и ЦИК выявил высокую степень взаимосвязи этих показателей в норме (в среднем 0,70—0,85). В остром периоде ИМ наблюдалась разбалансированность иммунного гомеостаза, что проявлялось в значительном снижении коэффициента корреляции; в динамике болезни (1-е и 7—14-е сутки) установлено повышение корреляционной взаимозависимости.

При сопоставлении нормы — патологии, динамики болезни и, в особен-

ности, осложненного и неосложненного течения ИМ наблюдалось перераспределение аргументно-функциональных значений, что также свидетельствует о разбалансированности гомеостаза.

Таким образом, корреляционные отношения могут быть использованы для достоверной характеристики изменения гомеостаза при различном течении острого периода ИМ.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Барановский П. В. // Тер. арх. — 1983. — № 4. — С. 13—15.
2. Бережной П. М. // Цитотоксины в современной медицине. — Киев, 1967. — Т. 4. — С. 189—194.
3. Борисова А. М., Москвина С. Н. // Молекулярная биология и молекулярная генетика патологических состояний в эксперименте и клинике. — М., 1975. — С. 45—46.
4. Виноградова Т. В., Турпикто О. Ю., Нестерко В. Н. // Лаб. дело. — 1984. — № 12. — С. 734—736.
5. Гриневич Ю. А., Алферов А. Н. // Там же. — 1981. — № 8. — С. 493—495.
6. Ефремушкин Г. Г. // Кардиология. — 1980. — № 1. — С. 37—42.
7. Исаков И. И. // Аутоиммунные реакции и заболевания у человека. — Л., 1973. — С. 38—60.
8. Кацман Р. Ф., Эсенбаева Э. М. // Тер. арх. — 1978. — С. 111—115.
9. Климов А. Я., Денисенко А. Д. // Вопр. мед. химии. — 1978. — № 4. — С. 539—543.
10. Климов А. Н., Зубицкий Ю. Н. и др. // Биохимические основы патогенеза атеросклероза. — Л., 1980. — С. 46—70.
11. Кондрашова Н. И., Лычова Г. А. // Иммунология и аллергия. — Киев, 1978. — Вып. 12. — С. 92—95.
12. Корочкин И. И., Чукаева И. И. // Кардиология. — 1985. — № 2. — С. 58—60.
13. Осипов С. Г. и др. // Тер. арх. — 1981. — № 8. — С. 31—34.
14. Терлецкая Л. М. // Врач. дело. — 1984. — № 5. — С. 38—40.
15. Терехова-Уварова Н. А. // Кардиология. — 1967. — № 2. — С. 75—76.

16. Цыбулина Е. В., Крохинова Л. Н. // Там же. — 1980. — № 8. — С. 106—107.
17. Ebringer A., Pineus N. // Amer J. Med. — 1977. — Vol. 50. — P. 297—301.
18. Dressler W. // J. A. M. A. — 1956. — Vol. 160. — P. 1379—1383.
19. Haskova V., Kaslik J. // Cas. Lek. ces., 1977. — Vol. 116. — P. 436—437.
20. Haber E., Smith T. // Метаболизм миокарда. — 1977. — С. 284—309.
21. Kleinsorge H., Dornbusch S. // Int. Arch. Allergy. — 1960. — Vol. 16. — P. 200—205.
22. Manchini G. // Lancet. — 1965. — Vol. 2. — P. 475—478.
23. Powel N. // Circulation. — 1971. — Vol. 44. — P. 159—162.
24. Serafini U., Masalo C. // Congresso international de allergologia, 5th. — Madrid, 1964. — P. 524—539.
25. Stefan I., Flek I. // Cas. Lek. ces., 1976. — Vol. 115. — P. 1411—1417.

Поступила 08.05.88

#### ON SOME MECHANISMS OF IMMUNE HOMEOSTASIS IN MYOCARDIUM INFARCTION

N. A. Dobrolina, T. V. Kopytova, M. A. Berezhina

Medical School, State University, Gorki

Dynamic alterations and interrelationships of the patterns of humoral immunity (immunoglobulins and immune complexes) were studied in 77 patients with myocardium infarction and in 23 healthy donors. Stimulation of immunity homeostasis in the patients with acute form of myocardium infarction was manifested as an increase in content of immunoglobulins and immune complexes. Content of immunoglobulin G was distinctly decreased in epistemonocarditis. High rate of correlations was found between the patterns studied in healthy persons ( $r=0.7=0.85$ ). During the acute period of myocardium infarction disbalance of homeostasis was observed, which was expressed as a decrease in the correlation coefficient down to  $r=0.41=0.54$ . An increase in the interrelation and redistribution of the argument-functional parameters were detected in dynamics of the disease.

УДК 612.115.35.014.46:615.357.37

Ф. Б. Шапиро, А. М. Ульянов

#### ВЛИЯНИЕ ИНСУЛИНА НА НАЧАЛЬНЫЕ СТАДИИ КЛИРЕНСА ГЕПАРИНА

Лаборатория физиологии и биохимии свертывания крови биологического факультета Московского университета им. М. В. Ломоносова

Ранее было установлено, что при связывании всего имеющегося в циркулирующей крови реактивного гепарина протамина сульфатом не проявляется гипогликемическое действие инсулина (концентрация инсулина в

крови при этом не изменяется), а при концентрации гепарина в крови ниже физиологического уровня оно ослабевает [2, 3]. Эти факты дают основание предполагать, что гепарин необ-

**Удельная радиоактивность (в %) крови после введения  $^{35}\text{S}$ -гепарина**

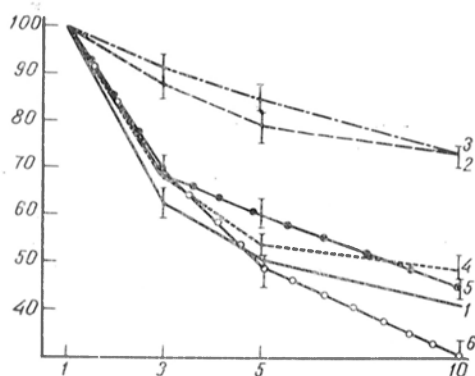
Условия опыта	Число животных	Время после введения меченого гепарина, мин			
		1	3	5	10
Геп., через 1 мин овальбумин	8	100	$61,5 \pm 2,0$	$48,1 \pm 1,8$	$39,2 \pm 2,2$
Геп., через 1 мин. физ. р-р	12	100	$62,4 \pm 4,8$	$51,5 \pm 4,5$	$41,6 \pm 4,9$
Геп., через 1 мин инсулин	12	100	$86,8 \pm 5,1$	$77,5 \pm 5,7$	$72,3 \pm 3,8$
Глюкоза, через 15 мин гепарин	8	100	$90,2 \pm 5,9$	$83,7 \pm 3,6$	$71,9 \pm 3,1$
ПС, через 1 мин геп., через 1 мин инс.	18	100	$66,8 \pm 4,9$	$53,4 \pm 5,1$	$48,2 \pm 3,7$
Физ. р-р, через 1 мин геп., через 1 мин инс.	18	100	$82,6 \pm 5,4$	$70,3 \pm 4,8$	$61,9 \pm 4,2$
Геп., через 1 мин ПС	16	100	$67,0 \pm 5,5$	$48,5 \pm 3,2$	$31,2 \pm 3,1$
Глюкоза + ПС, через 15 мин геп.	12	100	$67,8 \pm 4,1$	$59,4 \pm 2,5$	$44,8 \pm 2,9$

Примечание. геп. — меченый гепарин; физ. р-р — физиологический раствор; инс. — инсулин; ПС — протамина сульфат.

ходим для осуществления рецепции инсулина тканями-мишенями.

Естественно возникает вопрос, способны ли инсулин влиять на концентрацию гепарина в крови и тем самым как бы обеспечивать возможность реализации своего гипогликемического действия.

Поддержание определенного титра гепарина в крови, как и всякого другого вырабатываемого в организме биологически активного вещества, обусловлено в первую очередь регуляцией двух процессов — поступления его в кровотоки и интенсивности его метаболического клиренса. Изменения этих процессов могут сопутствовать друг другу, но могут быть и разобщены, влиять на них могут как одни и те же, так и разные факторы.



Влияние инсулина на интенсивность начальных этапов клиренса гепарина.

По оси абсцисс — время после введения  $^{35}\text{S}$ -гепарина (в мин); по оси ординат — удельная радиоактивность крови (в %). 1 — контроль: физиологический раствор или овальбумин; 2 — инсулин; 3 — глюкоза; 4 — протамин сульфат + инсулин; 5 — протамин сульфат + глюкоза; 6 — протамин сульфат.

В настоящей работе мы поставили перед собой задачу исследовать влияние инсулина на начальные стадии клиренса гепарина.

### Методика

Работа проведена на беспородных самцах крыс массой 180—200 г. Для определения интенсивности клиренса гепарина использовали  $^{35}\text{S}$ -гепарин («Amersham», Англия). Препарат  $^{35}\text{S}$ -гепарина (0,5 мкКи на 200 г массы, биологическая активность 1—2 МЕ) вводили животным в V. jugularis. Тем же путем вводили и другие использованные в работе препараты, а также брали пробы крови в течение 10 мин после введения меченого гепарина (антикоагулянт — цитрат натрия в соотношении 9:1). После этого животных забивали и брали у них пробы тканей. Перед определением удельной радиоактивности пробы тканей отмывали 0,85% раствором NaCl и гомогенизировали. Затем пробы тканей и крови обрабатывали по методу [4]. Удельную радиоактивность проб вычисляли по отношению к радиоактивности крови через 1 мин после введения  $^{35}\text{S}$ -гепарина, принятой за 100%.

В работе использовали инсулин для инъекций (СССР), протамин сульфат («Fluka», Швейцария), глюкозу для инъекций (СССР) и препарат овальбумин (СССР).

Инсулин вводили в дозе 0,5 ЕД на 200 г массы, протамин сульфат — 1 мг на 200 г массы, глюкозу — 0,5 мл 2% раствора на 200 г массы. Для контроля вместо испытуемых веществ животным вводили растворитель (физиологический раствор) и как специальный контроль к инсулину — раствор овальбумина. Объем вводимых веществ составлял 0,5 мл.

Инсулин и протамин сульфат вводили через 1 мин после  $^{35}\text{S}$ -гепарина, глюкозу — за 15 мин до введения  $^{35}\text{S}$ -гепарина.

Результаты обрабатывали статистически по методу Фишера — Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

Для решения поставленной задачи мы с помощью  $^{35}\text{S}$ -гепарина определя-



ли у крыс интенсивность клиренса гепарина и влияние на этот процесс экзогенного и эндогенного инсулина. Для этой цели мы вводили животным индикаторные дозы  $^{35}\text{S}$ -гепарина и определяли удельную радиоактивность крови на протяжении первых 10 мин после его введения.

Данные, представленные в таблице и на рисунке, показывают, что удельная радиоактивность крови после введения  $^{35}\text{S}$ -гепарина быстро снижается. Это снижение наиболее интенсивно и практически одинаково в группах контрольных животных, которым через 1 мин после меченого гепарина был введен овальбумин или физиологический раствор. Так, через 3, 5 и 10 мин после введения метки удельная радиоактивность крови у них снижалась в среднем соответственно на 38, 50 и 60 %. У животных же, которым через 1 мин после  $^{35}\text{S}$ -гепарина был введен инсулин в дозе 0,5 ЕД/200 г, снижение удельной радиоактивности крови было выражено в значительно меньшей степени и составляло 13, 22,5 и 28 % ( $p < 0,01$ — $0,001$ ). Таким образом мы видим, что под влиянием экзогенного инсулина вследствие снижения интенсивности клиренса гепарин в кровотоке задерживается.

Следует отметить, что через 10 мин после введения метки, у животных, которые получали инсулин, содержание  $^{35}\text{S}$ -гепарина в тканях, утилизирующих глюкозу, было выше, чем у контрольных. Так, в диафрагме и скелетной мышце оно превышало контрольный уровень в 2 раза и более ( $p < 0,001$ ), в печени — на 40 % ( $p < 0,05$ ), в сердечной мышце — на 25 % ( $p < 0,1$ ). В органе, не аккумулирующем глюкозу (мозг), оно было даже ниже, чем в контроле ( $p < 0,05$ ).

Сходное замедление удаления гепарина из кровотока имеет место и у животных, которым была внутривенно введена глюкоза (0,5 мл 2 % раствора) и тем самым был стимулирован выброс эндогенного инсулина. По нашим данным, через 20—30 мин после внутривенного введения такого количества глюкозы концентрация иммунореактивного инсулина в крови у крыс повышается примерно на 50 % [3]. В настоящем эксперименте мы вводили меченый гепарин через 15 мин после глюкозы. Определение показало, что снижение удельной радиоак-

тивности крови через 3, 5 и 10 мин после введения метки составляет в данном случае 9,8, 16,3 и 28,1 % и практически не отличается от снижения, наблюдавшегося у животных, получавших инсулин. Удельная радиоактивность органов, утилизирующих глюкозу, также превышает контрольный уровень; в сердечной мышце и печени — более чем в 2 раза ( $p < 0,001$ ), в диафрагме и скелетной мышце — на 60—70 % ( $p < 0,001$ ), в селезенке — на 34 % ( $p < 0,1$ ).

Если снижение интенсивности клиренса гепарина под влиянием инсулина связано с реализацией гипогликемического действия последнего, следует ожидать, что в тех условиях, когда это действие не проявляется, инсулин не будет способствовать задержке гепарина в кровотоке. Как уже было сказано выше, после введения протамина сульфата в дозе, связывающей весь имеющийся в циркулирующей крови гепарин, наступает временная резистентность организма к гипогликемическому действию как экзогенного, так и эндогенного инсулина [3].

Результаты специально проведенной серии экспериментов свидетельствуют, что у животных с вызванной протамином сульфатом резистентностью экзогенный инсулин не оказывает тормозящего действия на клиренс гепарина и интенсивность его остается такой же, как у контрольных животных, получавших вместо инсулина овальбумин или физиологический раствор. В контрольной группе, животным которой вместо протамин сульфата был введен физиологический раствор, инсулин, как и следовало ожидать, полностью проявил свое тормозящее действие на интенсивность клиренса гепарина. При введении одного протамин сульфата интенсивность клиренса гепарина в условиях нашего эксперимента в первые 5 мин от контрольной не отличалась; на 10-й минуте отмечено некоторое усиление интенсивности клиренса (возможно за счет образования комплекса гепарин — протамин сульфат).

На фоне протамин сульфата и эндогенный инсулин, выброс которого был стимулирован введением глюкозы, не оказывал тормозящего влияния на интенсивность клиренса гепарина.

Таким образом, есть все основания говорить о наличии закономерной свя-

зи между реализацией гипогликемического действия инсулина и задержкой гепарина в кровотоке. О механизме этой связи пока трудно сказать что-либо определенное, кроме того что она, очевидно, осуществляется на уровне рецепции гормона. В связи с этим интересно отметить, что и АКТГ, для реализации действия которого также необходимо наличие гепарина в кровотоке, оказывает на его клиренс тормозящее действие [1, 5].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Кудряшов Б. А., Шапиро Ф. Б., Ульянов А. М. // Физиол. журн. СССР. — 1982. — № 11. — С. 1531—1536.
2. Кудряшов Б. А., Ульянов А. М., Шапиро Ф. Б. и др. // Бюл. exper. биол. — 1984. — № 5. — С. 516—518.
3. Кудряшов Б. А., Шапиро Ф. Б., Ульянов

- А. М., Пытель Ю. А. // Пробл. эндокринолог. — 1984. — № 1. — С. 51—56.
4. Озрина Р. Д., Ульянов А. М., Сорвачев К. Ф. // Науч. докл. высш. школы: Биол. науки. — 1979. — № 4. — С. 100—103.
  5. Шапиро Ф. Б., Никитина М. М., Ульянов А. М., Кудряшов Б. А. // Пробл. эндокринолог. — 1986. — № 6. — С. 62—65.

Поступила 08.05.87

#### EFFECT OF INSULIN ON THE INITIAL STEPS OF HEPARIN CLEARANCE

F. B. Shapiro, A. M. Ul'yanov

Laboratory of Physiology and Biochemistry of Blood Coagulation, Biological Faculty, M. V. Lomonosov State University, Moscow

Use of  $^{35}\text{S}$ -heparin enabled to found that both exogenous and endogenous insulin decreased the intensity of initial steps of heparin metabolic clearance maintaining high content of heparin in blood. This effect of insulin was related to its hypoglycemic action.

УДК 617-001.17-07:616.15-073.537.9

В. Е. Рябинин, А. Г. Налимов, Р. И. Лифшиц

### ВЛИЯНИЕ ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЫ И СРЕДНЕМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПЕПТИДОВ НА ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ ПЛАЗМЫ КРОВИ

Кафедра биоорганической и биологической химии Челябинского медицинского института

Изменения биохимических и биофизических процессов при ожоговой болезни являются результатом развития неспецифического синдрома адаптации в начальный период заболевания и последующей дезинтеграции функций различных органов и систем в стадии токсемии [5]. Важным интегральным показателем взаимодействия регуляторных систем разного уровня является хемилюминесценция (ХЛ) крови, интенсивность которой характеризует свободнорадикальные процессы, уровень про- и антиоксидантов, реакцию симпатико- и гипоталамико-адреналовой систем [9]. В связи с этим исследование ХЛ крови у обожженных может не только представлять теоретический интерес, но и оказаться полезным в разработке новых информативных способов диагностики тяжести поражения и прогнозирования исхода заболевания [10].

#### Методика

Термический ожог III<sup>a</sup>—III<sup>b</sup> степени 15% поверхности тела наносили крысам-самцам ли-

нии Вистар под эфирным наркозом с помощью кварцево-галогеновой лампы.

Среднемолекулярные пептиды (СМП) плазмы крови получали от 30 обожженных (через 1 сут после травмы) и 30 здоровых животных путем последовательной ультрафильтрации на мембранных фильтрах УАМ-400, УАМ-150 и УАМ-50 («Владипор»). Сконцентрированный ультрафильтрат наносили на колонку с сепадексом G=15 (5,6×50 см). Элюцию проводили водой со скоростью 80—90 мл/ч с помощью насоса «Варио Перпекс», оптическую плотность элюата регистрировали на «Увикорде» (ЛКВ, Швеция) при длине волны 206 нм с помощью одноканального самописца.

Плазму крови от 34 больных с тяжелыми ожогами получали в период токсемии на фоне интенсивной терапии, включавшей гемосорбцию и УФ-облучение крови. Гемосорбцию осуществляли по общепринятой методике на сорбенте СКН-4М при перфузии двух объемов циркулирующей крови. Аутотрансфузию УФ-облученной крови у обожженных больных проводили также по общепринятому методу на аппарате «Изоolda» в объеме 2 мл на 1 кг массы тела. Кровь для анализа брали непосредственно перед операциями и после них.

Интенсивность ХЛ определяли с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика LS-1800 («Beckman», США) в режиме счета единичных фотонов при комнатной температуре. Интенсивность спонтанной ХЛ (СХЛ) 1 мл плазмы крови измеряли в условных едини-

цах по отношению к фону, после чего добавляли 0,2 мл 3%  $H_2O_2$  и автоматически с помощью печатающего устройства регистрировали в течение 5 мин кинетику ХЛ, затем добавляли 0,2 мл 10 мМ  $FeSO_4$  и повторяли цикл измерений. Для определения наиболее важных характеристик ХЛ рассчитывали следующие показатели: СХЛ, амплитуду вспышки при добавлении  $H_2O_2$  ( $AB_1$ ) и после добавления ионов железа ( $AB_2$ ) в относительных единицах, конечное значение интенсивности свечения через 5 мин ( $I_5$ ) и светосумму свечения (СС) за 5 мин по отношению к СХЛ, константу скорости изменения интенсивности свечения ( $K_3$ ) после добавления  $H_2O_2$  [9]. Кроме того, рассчитывали показатели «скорости гашения» ХЛ после добавления  $H_2O_2$  или ионов железа (V) как отношение  $AB/I_5$  и коэффициент ослабления интенсивности свечения (КО).

## Результаты и обсуждение

Термическая травма приводит к существенному изменению ХЛ плазмы экспериментальных животных (табл. 1 и 2). Так, через 2 ч после ожога наблюдается достоверное увеличение всех исследуемых параметров перекисной ХЛ по сравнению с нормой. Добавление железа вызывало лишь достоверное усиление  $I_5$  и соответствующее понижение КО, тогда как через 1 сут после травмы наряду с этими изменениями отмечалось уменьшение  $AB_2$  на 23 %, СС на 19 % и  $V_{Fe}$  на 46 %. Через 3 сут после ожоговой травмы происходило снижение большинства показателей ХЛ по сравнению с нормой при индукции как  $H_2O_2$ , так и  $Fe^{2+}$  при сохранении по-прежнему на высоком уровне СХЛ. На 6-е сутки заболевания не обнаружено достоверных изменений ХЛ крови экспериментальных животных, хотя отмечалась определенная тенденция к уменьшению большинства параметров.

Увеличение в начальный период ожоговой болезни СХЛ, а затем достижение ею исходного уровня может объясняться соответствующим усилением реакций свободнорадикального окисления липидов за счет самопроизвольно протекающих неферментативных реакций перекисного окисления липидов (ПОЛ) и последующим исчерпанием легкоокисляемых липидов вследствие их активного метаболизма. Это предположение подтверждается ранее проведенными экспериментами [8], в которых было показано, что аскорбатзависимое (неферментативное) ПОЛ снижается через 7 сут после ожоговой травмы.

Таблица 1

Влияние термической травмы и СМП на перекисную ХЛ крови

Условия эксперимента	СХЛ, усл. ед.	$AB_1$ , усл. ед.	$I_5$ , усл. ед.	V, имп/мин	КО, усл. ед.	$K_3$	СС, усл. ед.
Здоровые доноры	$0,76 \pm 0,06$	$37,4 \pm 0,97$	$6,3 \pm 0,3$	$80,8 \pm 4,895$	$5,9 \pm 0,1$	$0,48 \pm 0,017$	$17,1 \pm 0,6$
Больные с термической травмой	$1,0 \pm 0,047^*$	$26,9 \pm 3,1^*$	$5,1 \pm 0,5^*$	$82,394 \pm 17,820$	$5,3 \pm 0,4$	$0,77 \pm 0,047^*$	$11,8 \pm 1,4^*$
Здоровые животные	$0,92 \pm 0,017$	$108,0 \pm 22,0$	$15,7 \pm 2,2$	$199,526 \pm 51,926$	$7,2 \pm 1,1$	$0,5 \pm 0,05$	$51,0 \pm 8,4$
Животные с термической травмой:							
2 ч	$1,1 \pm 0,06^*$	$261,7 \pm 11,7^*$	$20,0 \pm 1,1$	$596,547 \pm 71,751^*$	$12,7 \pm 1,0^*$	$0,72 \pm 0,006^*$	$93,7 \pm 1,88^*$
24 ч	$1,1 \pm 0,012^*$	$138,0 \pm 14,3$	$25,0 \pm 4,5^*$	$296,592 \pm 3,663$	$5,9 \pm 1,1$	$0,45 \pm 0,06$	$74,3 \pm 8,2^*$
72 ч	$1,3 \pm 0,06^*$	$53,7 \pm 2,8^*$	$23,7 \pm 1,7^*$	$93,616 \pm 10,988^*$	$2,26 \pm 0,12^*$	$0,23 \pm 0,03^*$	$38,0 \pm 4,0$
144 ч	$0,93 \pm 0,02$	$72,5 \pm 7,3$	$13,6 \pm 2,6$	$115,303 \pm 11,607$	$5,8 \pm 0,7$	$0,47 \pm 0,046$	$34,5 \pm 5,6$
СМП из крови здоровых животных (25—50 мкг на 1 мл плазмы доноров)	$1,06 \pm 0,013^*$	$31,8 \pm 1,2^*$	$5,2 \pm 0,07^*$	$96,653 \pm 5,404^*$	$6,12 \pm 0,27$	$0,49 \pm 0,016$	$14,17 \pm 0,4^*$
СМП из крови обожженных животных (25—50 мкг на 1 мл плазмы крови)	$0,98 \pm 0,03^*$	$31,9 \pm 1,6^*$	$5,5 \pm 0,2^*$	$87,983 \pm 4,169$	$5,7 \pm 0,2$	$0,47 \pm 0,014$	$14,28 \pm 0,06^*$

Примечание: Здесь и в табл. 2 звездочка —  $p < 0,05$ .

Влияние термической травмы и СМП на  $\text{Fe}^{2+}$ -индуцируемую ХЛ крови

Условия эксперимента	$\text{AB}_2$ , усл. ед.	$\text{I}_b$ , усл. ед.	V, имп/мин	КО, усл. ед.	СС, усл. ед.
Здоровые доноры	$7,4 \pm 0,08$	$2,6 \pm 0,07$	$12\ 706 \pm 2\ 598$	$2,8 \pm 0,26$	$4,1 \pm 0,26$
Больные с термической травмой	$4,4 \pm 0,46^*$	$3,2 \pm 0,4$	$4\ 557 \pm 850^*$	$1,4 \pm 0,05^*$	$3,4 \pm 0,4$
Здоровые животные	$2,2 \pm 0,14$	$1,1 \pm 0,05$	$2\ 078 \pm 189$	$1,7 \pm 0,09$	$1,6 \pm 0,15$
Животные с термической травмой:					
2 ч	$2,2 \pm 0,1$	$1,23 \pm 0,03^*$	$2158,7 \pm 79,2$	$1,6 \pm 0,06$	$1,6 \pm 0,1$
24 ч	$1,7 \pm 0,1^*$	$1,23 \pm 0,02^*$	$1\ 106 \pm 169^*$	$1,4 \pm 0,05^*$	$1,3 \pm 0,03^*$
72 ч	$1,75 \pm 0,05^*$	$1,1 \pm 0,01$	$2\ 097 \pm 216,7$	$1,57 \pm 0,03$	$1,3 \pm 0,01^*$
144 ч	$2,0 \pm 0,13$	$1,18 \pm 0,06$	$1609,6 \pm 165,0$	$1,71 \pm 0,07$	$1,4 \pm 0,06$
СМП из крови здоровых животных (25—50 мкг на 1 мл плазмы доноров)	$10,47 \pm 1,3^*$	$3,1 \pm 0,17^*$	$26\ 679 \pm 4\ 356^*$	$3,35 \pm 0,2$	$5,15 \pm 0,45^*$
СМП из крови обожженных животных (25—50 мкг на 1 мл плазмы доноров)	$10,8 \pm 1,5^*$	$2,9 \pm 0,2$	$26\ 155 \pm 4\ 206^*$	$3,6 \pm 0,28^*$	$5,05 \pm 0,56$

Существенный вклад в изменение СХЛ может внести колебание уровня глюкокортикоидов, тироксина, катехоламинов и других биологически активных соединений [9]. Таким образом, обнаруженная нами динамика изменений интенсивности СХЛ, по-видимому, является результатом не только определенного соотношения уровня про- и антиоксидантов, но и сложного взаимодействия регуляторных механизмов, включающих в себя реакцию гипоталамо-гипофизарно-корковой системы на термический ожог.

Полезную информацию дают и другие показатели ХЛ. Так, усиление  $\text{AB}_1$  в начальный период ожогового шока, а затем ее снижение подтверждают мнение о том, что окисляемость липидов в течение ожоговой болезни может снижаться, а резистентность тканей и липидов к неферментативному ПОЛ — увеличиваться. Об этом же свидетельствует возрастание на 84 и 46 %  $\text{CC}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  соответственно через 1 и 3 сут после ожога, а затем снижение этого показателя. Такая же тенденция обнаружена при определении  $\text{V}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  и  $\text{K}_3$ .

Изменения ХЛ плазмы, вызванные добавлением  $\text{Fe}^{2+}$ , были наиболее значимыми на 1—3-и сутки после ожога. Это проявлялось уменьшением на 20—23 %  $\text{AB}_2$ , СС и соответствующим снижением КО. Как известно, величина  $\text{AB}_2$  пропорциональна количеству липоперекисей в плазме и поэтому может характеризовать интенсивность

ПОЛ [3]. Нам не удалось однозначно связать эти процессы, так как достоверное увеличение продуктов ПОЛ в крови было обнаружено лишь на 3—7-е сутки после ожога [8]. Клинические исследования Ю. Е. Бабской и соавт. [1] подтверждают отсутствие изменений интенсивности ПОЛ в крови в период шока и усиление ее у некоторых групп больных начиная с 3-го дня заболевания.

Анализ ХЛ плазмы обожженных больных показал значительное уменьшение АВ и СС при перекиспой и  $\text{Fe}^{2+}$ -индуцируемой ХЛ, что совпадает

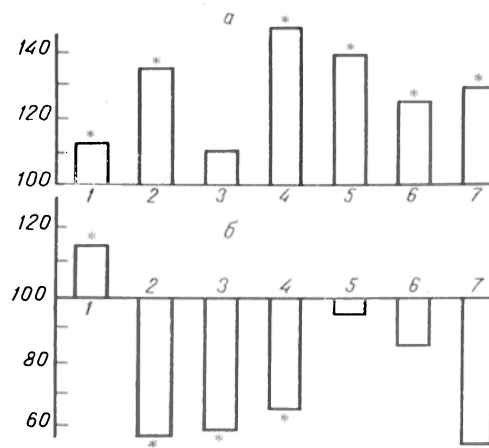


Рис. 1. Интенсивность перекисной ХЛ плазмы крови обожженных больных после УФ-облучения (а) и гемосорбции (б).

1—7 — соответственно СХЛ,  $\text{AB}_1$ ,  $\text{I}_b$ , V, КО,  $\text{K}_3$ , СС. Здесь и на рис. 2 результаты выражены в процентах от контроля; звездочка —  $p < 0,05$ .

с результатами, полученными в эксперименте на животных в период ожоговой токсемии. Аналогичные данные по  $\text{Fe}^{2+}$ -индуцируемой ХЛ были получены у обожженных больных Р. Р. Фархутдиновым и соавт. [10]. Эти изменения авторы связывают с увеличением уровня молекул средней массы, способных подавлять ПОЛ и ингибировать СС. Исследования, проведенные в нашей лаборатории А. К. Однопозовым [6], свидетельствуют о том, что в начальный период ожоговой болезни уровень СМП мало отличается от нормы и не коррелирует с тяжестью заболевания, тогда как в период токсемии действительно наблюдается существенное увеличение концентрации СМП в крови больных.

Лечение обожженных больных с помощью гемосорбции приводило к уменьшению уровня СМП сразу после операции, снижению перекисной ХЛ и незначительному изменению свечения после добавления  $\text{Fe}^{2+}$ , что свидетельствует о сложном и опосредованном воздействии гемокарбоперфузии на организм, включающем в себя не только элиминирование СМП, но и, например, регулирование уровня про- и антиоксидантов (рис. 1). О принципиальной возможности сорбции пероксидов на активированном угле СКН в процессе гемосорбции было сообщено в ранее проведенных исследованиях [7].

Аутоотрансфузия УФ-облученной крови у обожженных больных не изменяла существенно уровень СМП и  $\text{Fe}^{2+}$ -зависимой ХЛ, но заметно усиливала перекисную ХЛ (рис. 2). Эти данные

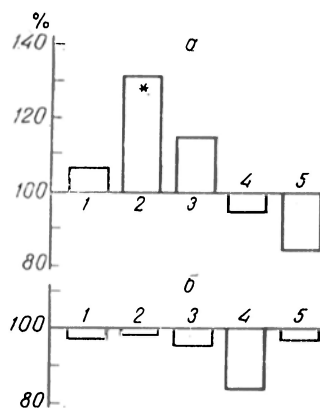


Рис. 2. Интенсивность  $\text{Fe}^{2+}$ -индуцируемой ХЛ плазмы крови обожженных больных после УФ-облучения (а) и гемосорбции (б).  
1 — 5 — соответственно  $\text{AB}_2$ ,  $\text{I}_5$ , КО, СС.

указывают на отсутствие прямой корреляции между уровнем СМП и интенсивностью ХЛ. Ослабление перекисной резистентности плазмы можно объяснить, в частности, тем, что сразу после одного сеанса УФ-облучения резко подавляется активность церулоплазмينا и супероксиддисмутазы [11], возникает интенсивная и длительная фото-ХЛ, уменьшающаяся в течение 15—20 мин [4]. Существуют противоречивые мнения о влиянии УФ-облучения на процесс ПОЛ. Если одни авторы считают, что УФ-облучение клеток, гомогенатов тканей усиливает ПОЛ, то данные других свидетельствуют об отсутствии изменений в содержании продуктов ПОЛ и интенсивности антиоксидантной системы даже после 3 сеансов УФ-облучения или обнаруживается антиоксидантное действие последнего на кровь [2]. Ясно, что интенсивность ХЛ нельзя объяснить только реакциями ПОЛ, не учитывая другие морфофункциональные и биохимические изменения. Как известно, лечебный эффект УФ-облучения связан с нормализацией реологических свойств крови, микроциркуляции, фагоцитирующей функции лейкоцитов и т. п.

Для выяснения роли СМП в регуляции интенсивности ХЛ было проведено выделение соответствующих фракций из крови обожженных и здоровых крыс. Как показали результаты, действие всех СМП оказалось однонаправленным, и поэтому данные обрабатывали отдельно только по суммарному эффекту фракций от обожженных и здоровых животных. Однако и здесь разницы не обнаружилось, так как СМП крови обожженных и здоровых животных в равной степени увеличивали СХЛ плазмы, уменьшали  $\text{AB}_1$ ,  $\text{I}_5$ , СС, усиливали  $\text{V}_{\text{H}_2\text{O}_2}$ ,  $\text{AB}_2$ ,  $\text{V}_{\text{Fe}}$ ,  $\text{I}_5$  и СС после добавления  $\text{Fe}^{2+}$ , т. е. в целом обнаружено угнетение перекисной и усиление  $\text{Fe}^{2+}$ -зависимой ХЛ.

С позиций полученных данных логично интерпретируется взаимосвязь между изменениями уровня СМП и интенсивности ХЛ в крови обожженных крыс. Так, уменьшение уровня СМП в крови крыс с термическим ожогом через 1 сут после травмы сопровождается значительным усилением перекисной и уменьшением  $\text{Fe}^{2+}$ -индуцируемой ХЛ в этот период.

Возрастание концентрации СМП в период токсемии (3—7-е сутки) может приводить к противоположным изменениям.

Таким образом, результаты исследований показали, что термическая травма приводит к изменению большинства показателей ХЛ плазмы крови. Это является отражением особенностей динамики биохимических процессов в организме обожженных и не только служит показателем уровня свободнорадикальных реакций и процессов ПОЛ, но и характеризует специфическую реакцию нейрогуморальной системы в ответ на термическое повреждение. Одним из факторов, способных оказывать влияние на интенсивность ХЛ, может быть изменение концентрации в крови СМП.

Лечение обожженных с помощью гемосорбции и УФ-облучения крови позитивно воздействует на ХЛ крови и может быть связано не только с изменением уровня СМП, про- и антиоксидантов, но и с системной реакцией организма на проводимое лечение.

Дальнейшие исследования в этой области позволят выбрать наиболее информативные параметры ХЛ, на основе которых могут быть созданы диагностические и прогностические способы определения тяжести ожоговой болезни и эффективности ее терапии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бабская Ю. Е., Лавров В. Л., Олюнина Н. А. // Хирургия. — 1985. — № 11. — С. 95—97.
2. Вихриев Б. С., Маркелов И. М., Матвеевко А. В. и др. // Механизмы влияния облученной ультрафиолетовыми лучами крови на организм человека и животных. — Л., 1986. — С. 39—50.

3. Владимиров Ю. А., Фархутдинов Р. Р., Молоденков М. Н. // Вопр. мед. химии. — 1976. — № 2. — С. 216—223.
4. Журавлев А. И., Журавлева А. И. Сверхслабое свечение сыворотки крови и его значение в комплексной диагностике. — М., 1975. — С. 93—97.
5. Кочетыгов Н. И. Ожоговая болезнь. — Л., 1973.
6. Однопозов А. К. Вопросы биохимической оценки течения ожоговой болезни и эффективности ее лечения: Дис. ... канд. мед. наук. — Челябинск, 1986.
7. Рябинин В. Е., Лазовская А. Я., Лифшиц Р. И. // Вопр. мед. химии. — 1985. — № 2. — С. 94—97.
8. Рябинин В. Е., Лифшиц Р. И. // Там же. — 1986. — № 3. — С. 115—118.
9. Хемиллюминесценция крови в экспериментальной и клинической онкологии / Серкиз Я. И., Чеботарев Е. Е., Барабой Б. А. и др. — Киев, 1984.
10. Фархутдинов Р. Р., Юханова А. Ш. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 4. — С. 38—40.
11. Шабуневич Л. В., Александрова Л. А., Перельгин В. Г. // Механизмы влияния ультрафиолетовыми лучами крови на организм человека и животных. — Л., 1986. — С. 50—56.

Поступила 15.05.87

#### EFFECT OF THERMIC TRAUMA AND MIDDLE MOLECULAR PEPTIDES ON BLOOD CHEMOLUMINESCENCE

V. E. Ryabinin, A. G. Nalimov, R. I. Lifshits

Medical School, Chelyabinsk

Thermic trauma altered the most of patterns of blood plasma chemoluminescence, which appear to occur as a result of specific shifts in metabolic dynamics in the patients with burns trauma. The patterns of blood chemoluminescence may reflect not only the rate of free radical reactions and lipid peroxidation but as well as the specific response of the neuro-humoral system to trauma. Alterations in content of middle molecular peptides in blood might be among factors responsible for the chemoluminescence intensity.

УДК 612.354.1:577.112.853].014.46:615.357.441

Е. Н. Панасюк, Н. И. Кузьмак

#### ВЛИЯНИЕ IN VIVO L-ТИРОКСИНА НА СОДЕРЖАНИЕ УГЛЕВОДСОДЕРЖАЩИХ КОМПОНЕНТОВ ГЛИКОПРОТЕИДОВ В СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЯХ ПЕЧЕНИ У КРЫС

Львовский медицинский институт

Углеводные компоненты гликопротеидов (УКГ) играют важную роль в регуляции функций клетки [2, 13]. Известно значение этих соединений в структурной организации и транспорте

различных веществ через биомембраны [3, 4, 13, 19], в функционировании ферментов и заряде мембран [1, 3, 4, 19, 26], в клеточном контакте и распознавании сигналов извне [1, 4, 16],



К ст. С. В. Лисиковского и соавт.

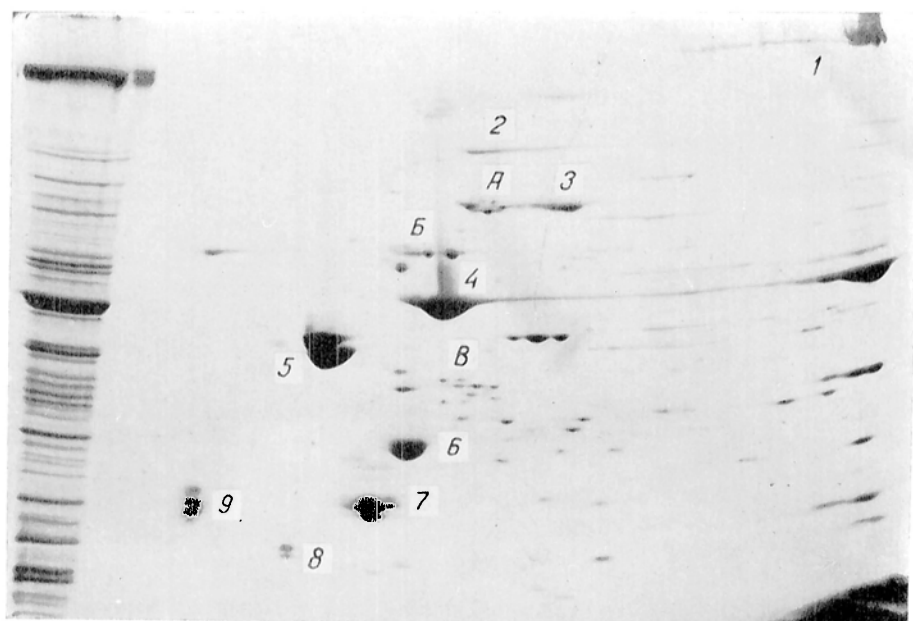


Рис. 5. Фракционирование белков четырехглавой мышцы бедра человека со сроком аутолиза менее 15 ч методом двухмерного электрофореза.

1 — тяжелая цепь миозина (200 кД); 2 —  $\alpha$ -актинин (100 кД); 3 — альбумин (68 кД); 4 — актин (42,6 кД), 5 — тропомиозин (36 кД); 6, 7, 8 — легкие цепи миозина соответственно ЛЦ 1 (21,5 кД), ЛЦ 2 (18 кД), ЛЦ 3 (15 кД); 9 — тропоин С (18 кД). А, В, В — см. объяснение в тексте.

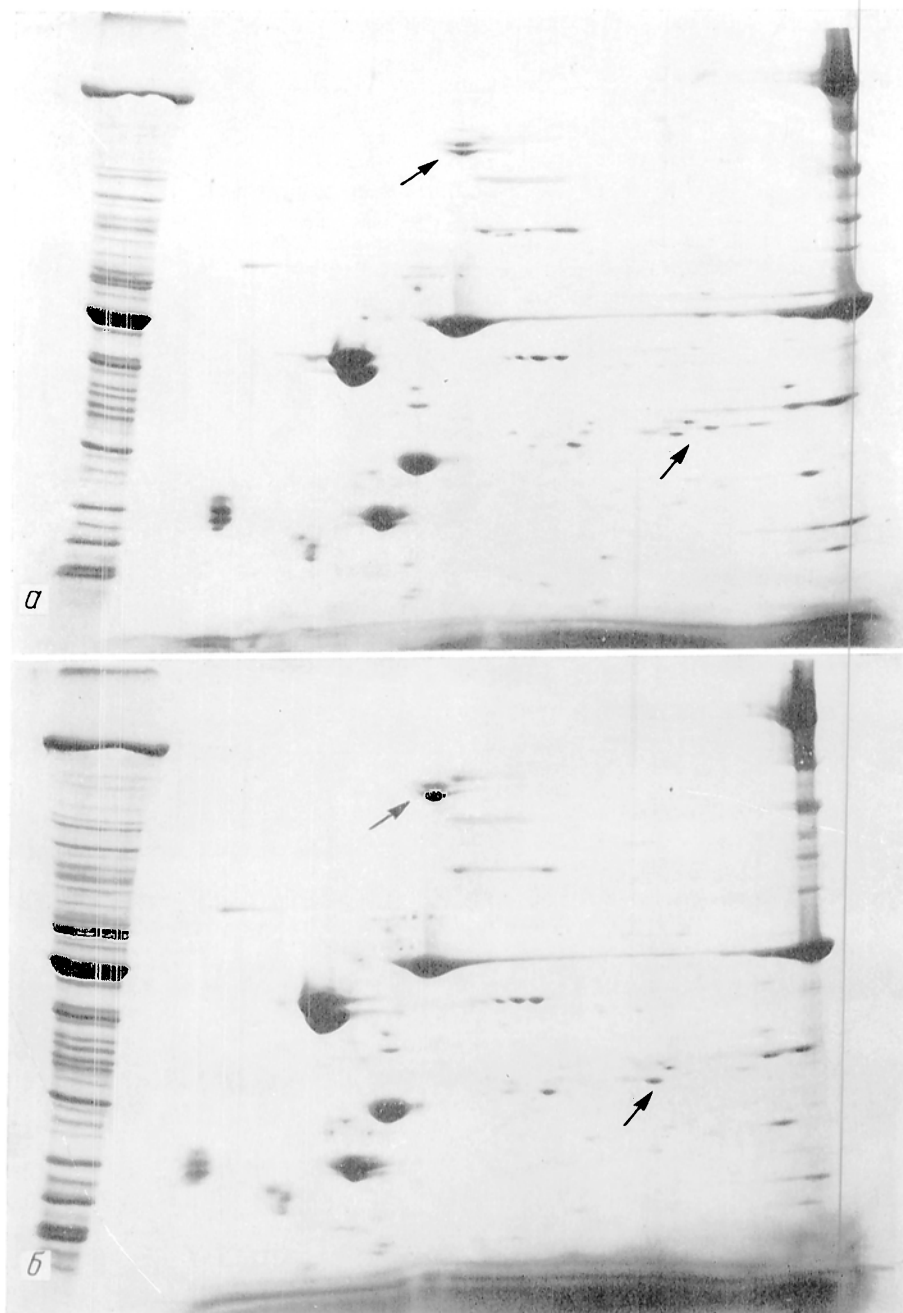


Рис. 6. Двухмерные электрофореграммы белков скелетной мышцы человека при различных сроках сохранения.  
а — аутолиз 6 сут; б — аутолиз 11 сут.

в регуляции клеточной адгезии и межклеточных взаимодействий [11, 13, 14].

В литературе мы не нашли данных о влиянии различных доз L-тироксина ( $T_4$ ) на содержание отдельных УКГ (сиаловых кислот, гексозаминов, гексоз, связанных с белками — ГСБ, L-фукозы) в субклеточных структурах печени крыс, что не позволяет характеризовать корреляции между их изменениями. Установление корреляционных связей может иметь определенное значение в выявлении взаимосвязей дозы вводимого тиреоидного гормона и содержания определенных УКГ в субклеточных структурах печени.

Цель настоящей работы — сравнительное изучение действия различных доз  $T_4$  на содержание сиаловых кислот, гексозаминов, ГСБ и L-фукозы в различных субклеточных структурах печени крыс.

### Методика

Опыты проводили на белых беспородных 10—12-месячных крысах-самцах массой 190—232 г. Все животные были разделены на 4 группы: 1-я — контрольная; животным 2, 3, 4-й групп ежедневно в течение 21 дня подкожно вводили соответственно малые дозы  $T_4$  (по 10 мкг на 100 г массы), средние дозы  $T_4$  (по 20 мкг на 100 г массы) и большие дозы  $T_4$  (по 40 мкг на 100 г массы). В каждой опытной группе, кроме 1-й, через 6, 12, 18, 24, 30, 36 и 42 дня под эфирным наркозом часть животных умерщвляли путем декапитации с немедленным отделением печени и взятием крови для анализов. Методика проведения эксперимента и подбор дозы гормона описаны ранее [7—9].

Для определения общего содержания свободных и связанных УКГ в субклеточных элементах ткань печени 10 крыс объединяли. Затем ткань разделяли поровну на две половины. Первую — для выделения митохондрий и микросом — перфузировали 0,5 М раствором NaCl при 2—4°C. 25% гомогенат готовили на 0,05 М растворе KCl, приготовленном на калий-фосфатном буфере, pH 7,4, вместо обычно применяемой сахарозы, так как последняя мешает определению сиаловых кислот. Ткани гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с тefлоновым пестиком в течение 3—5 мин. Ядра осаждали вместе с остатками тканей (630 г, 10 мин), осадок отбрасывали. Структурные элементы печени выделяли методом дифференциального центрифугирования в KCl-фосфатном буфере. Надосадочную жидкость центрифугировали (3000 г, 20 мин) и выделяли митохондрии, затем к ней добавляли  $CaCl_2$  до конечной концентрации 0,013 М и оставляли при 4°C на 30 мин, после чего снова центрифугировали (12000 г, 30 мин) для осаждения фракций микросом. Полученные фракции митохондрий и микросом промывали KCl-фосфатным буфером при соот-

ветствующих режимах центрифугирования (3000 и 12000 г) и разрушали путем повторного замораживания и оттаивания. Из разрушенных структурных элементов печени растворимые белки и УКГ экстрагировали физиологическим раствором в течение 2 ч при комнатной температуре, осадки отделяли центрифугированием (12000 г, 30 мин).

Во второй половине разделенной ткани печени методом [23], несколько видоизмененным, как описано в работе [11], выделяли плазматические, митохондриальные и микросомальные мембраны печени. Ткань перфузировали раствором 0,5 М NaCl, содержащим 0,5 мМ  $CaCl_2$  в соотношении 1:1 (pH 7,6 при температуре 4°C), затем измельчали в стеклянном гомогенизаторе с тefлоновым пестиком в течение 5—7 мин (до получения однородной гомогенной массы), после этого исследуемую ткань помещали в среду выделения (1 мМ  $NaHCO_3$  и 0,5 мМ  $CaCl_2$  при pH 7,5) в соотношении объема ткани и среды выделения (1:4). Затем опять проводили гомогенизацию в течение 1,5—2 мин. Гомогенат фильтровали через три слоя марли, разводили до объема 1,5 л средой выделения и центрифугировали при 1000 г в течение 15 мин. Эту операцию повторили 3 раза, причем каждый раз полученный осадок гомогенизировали (1,5—2 мин) и разводили в половине предыдущего объема среды выделения. После этого гомогенат наносили на градиент плотности сахарозы как описано в работе [5], и центрифугировали (центрифуга Beckman L5-55; 140000 г, 40 мин), что приводило к четкому расслоению раствора на три различные фракции: плазматические, митохондриальные и микросомальные мембраны. Затем последовательно каждую фракцию отдельно осторожно отбирали пипетом, суспензировали в 1 мМ растворе  $NaHCO_3$  (pH 7,6) и трижды отмывали от сахарозы KCl-фосфатным буфером с последующим центрифугированием при 140000 г в течение 40 мин. Полученные таким образом фракции мембран практически не были загрязнены митохондриями и микросомами, о чем свидетельствовали результаты исследований активности ферментов-маркеров.

Определение активности ферментов-маркеров во фракциях митохондрий и микросом ткани печени контрольных крыс проводили как описано в работе [2], а в плазматических, митохондриальных и других мембранах — как описано в работе [11]. По нашим данным, у intactных крыс активность во фракциях митохондрий и микросом (в процентах от общей активности в гомогенате) для цитохром-С-оксидазы соответственно равнялась 76,6 и 0,78%, для сукцинат-цитохром-С-редуктазы — 78,7 и 0,43%, для Г-6-Ф — 17,8 и 21,1% и для неспецифической эстеразы — 16,5 и 29,8%.

В плазматических мембранах печени у этих же крыс удельная активность 5'-нуклеотидазы, щелочной фосфатазы,  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФазы и Г-6-Ф соответственно равнялась 74,8, 7,5, 5,1 и 1,4 мкмоль на 1 мг белка за 1 ч. Выход этих ферментов во фракции плазматических мембран составил 29,8, 55,2, 27,4 и 28,3% от их суммарной активности в гомогенате. Соответствующие данные для митохондриальных мембран составили 0,9, 1,4, 1,2 и 1 мкмоль/(мг·ч), что соответствовало 2,9, 14, 0,3 и 1,7%, а для микросомальных мембран — 9,1, 2,2, 1,5, 2,8 мкмоль/(мг·ч), что соответствовало 4,7, 2,8, 1,6 и 39,4%.

Таким образом, выход и удельная активность ферментов-маркеров не были одинаковы во всех фракциях. В отдельных случаях отмечена относительно низкая активность ферментов (в процентах от общей активности) во фракциях микросом и особенно митохондрий. Это явление, вероятно, обусловлено главным образом неизбежностью частичной инактивации ферментов на промежуточных стадиях выделения, что согласуется с нашими результатами [9] и данными литературы [2, 11, 23].

Полученные фракции микросом, митохондрий, плазматических, микросомальных и митохондриальных мембран печени после дифференциального разрушения гликопротеидных молекул (для каждого из определяемых УКГ применяли различные условия деполимеризации) подвергали кислотному гидролизу [6, 15], определяли в них общее содержание белка [20], сиаловых кислот [22], гексозаминов [17], ГСБ [21] и L-фукозы [18].

В работе применяли L-тироксин («Reanal», ВНР). Для построения калибровочных графиков использовали высокоочищенные препараты N-ацетилнейраминной кислоты («Serva», ФРГ), кристаллического альбумина крови быка («Koch — Light», Англия), гексозаминов, ГСБ и L-фукозы («ВДН Lab. Chemicals», Англия). Остальные реактивы отечественного или венгерского («Reanal») производства.

Критериями, характеризующими степень гипертиреоза у крыс, служили данные о содержании в сыворотке крови связанного с белками йода (СБЙ) [12], а также изменении общей массы тела и относительной массы щитовидных желез. Учитывали характерные симптомы гипертиреоза (повышение подвижности и аппетита, резкое беспокойство, замет-

ное выпадение шерсти, экзофтальм и др.). Полученные результаты были обработаны общепринятыми методами вариационной статистики и считались достоверными при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

После введения различных доз  $T_4$  во всех 3 опытных группах отмечено достоверное снижение общей массы тела крыс — от 22,5 до 52,6 %. Наибольшее снижение общей массы наблюдалось у животных, получавших средние или большие дозы гормона — от 32,6 до 48,6 % по сравнению с нормой. Еще более значительное снижение выявлено при определении относительной массы щитовидной железы. Так, у крыс, получавших малые дозы  $T_4$ , относительная масса щитовидной железы снизилась на 28,6 %, средние — на 57,6 % и большие — на 71,6 % по сравнению с таковой в контрольной группе.

Наибольшие изменения наблюдали при определении уровня СБЙ в сыворотке крови. Так, у крыс, получавших малые дозы  $T_4$ , его содержание увеличилось на 56,7 %, средние и большие дозы — соответственно на 125,6 и 261,6 % по сравнению с нор-

Таблица 1

Содержание сиаловых кислот, гексозаминов, ГСБ и L-фукозы (в мкг на 1 мг белка) в субклеточных элементах печени у крыс через 24 дня после введения различных доз  $T_4$  ( $M \pm m$ ;  $n=6$ )

Доза $T_4$ , мкг на 100 г массы	УКГ	Митохондрии	Микросомы	Мембраны		
				плазматические	митохондриальные	микросомальные
Контроль	Сиаловые кислоты	14,5±0,45	14,1±0,52	125±2,3	85,3±1,6	76,4±1,3
	Гексозамины	58,0±1,0	52,3±1,2	228±2,9	184±2,5	104±1,2
	ГСБ	56,4±0,86	56,8±0,86	205±2,3	195±2,6	185±2,4
	L-фукоза	3,62±0,24	2,58±0,22	41,6±1,0	17,0±0,92	9,55±0,32
10 (малые)	Сиаловые кислоты	18,4±0,38	17,6±0,43	128±2,5*	86,3±1,8*	79,4±1,1*
	Гексозамины	68,4±0,42	63,6±1,4	240±3,2*	186±2,3*	107±1,6*
	ГСБ	63,5±0,72	51,2±1,7*	210±2,8*	198±2,9*	189±2,8*
	L-фукоза	4,65±0,14	4,12±0,15	40,2±1,3*	17,6±0,65*	9,85±0,42*
20 (средние)	Сиаловые кислоты	10,5±0,32	9,51±0,24	195±1,8	92,6±1,0	85,4±0,85
	Гексозамины	35,4±0,58	38,4±1,5	251±2,2	212±1,9	118±1,9
	ГСБ	32,4±0,65	42,6±1,2	245±3,1	223±2,3	237±2,3
	L-фукоза	3,0±0,18*	1,85±0,19	52,4±0,95	21,6±0,52	16,4±0,51
40 (большие)	Сиаловые кислоты	8,46±0,38	9,25±0,26	82,1±1,7	57,2±0,95	43,8±0,65
	Гексозамины	29,6±0,36	32,3±1,1	198±3,5	105±1,7	67,4±0,79
	ГСБ	24,3±0,40	30,5±0,78	144±1,7	110±1,8	108±2,2
	L-фукоза	2,52±0,17	1,25±0,15	20,8±0,78	9,8±0,46	5,16±0,40

Примечание. Звездочка — отсутствие статистически достоверных различий с контролем (100%) ( $p > 0,05$ ). Все другие величины достоверно отличаются от контроля.

мой (у контрольных крыс уровень СБИ в сыворотке крови равнялся  $2,85 \pm 0,04$  мкг%). После окончания введения тиреоидного гормона в течение 18—36 дней эти величины постепенно нормализовались.

Таким образом, у животных под влиянием введения  $T_4$  в течение 21 дня развивался гипертиреоз различной тяжести.

Из табл. 1 видно, что на 24-й день после начала введения различных доз  $T_4$  содержание отдельных УКГ в исследуемых субклеточных элементах печени было значительно изменено. Так, у крыс, получавших малые дозы  $T_4$ , отмечено достоверное повышение уровня УКГ в митохондриях и микросомах печени. В плазматических, митохондриальных и микросомальных мембранах печени данной опытной группы установлена лишь тенденция к их повышению ( $p > 0,05$ ). У животных, получавших средние дозы гормона, эти изменения не были одинаковыми. Так, в митохондриях и микросомах печени выявлено достоверное, довольно значительное снижение содержания УКГ, а во всех исследованных мембранах печени, наоборот, повышение. При введении же больших доз  $T_4$  животным отмечено значительное достоверное снижение содержания УКГ во всех субклеточных элементах печени. Самое большое снижение уровня сиаловых кислот, гексозаминов, ГСБ и L-фукозы установлено в митохондриях (на 41,7, 49, 57 и 30,3 % соответственно) и микросомах (на 34,4, 38,3, 44,1 и 59,6 % соответственно) печени. В плазматических, митохондриальных и микросомальных мембранах печени эти изменения были несколько менее выражены.

Уже на 6-й день после начала введения  $T_4$  в большинстве случаев установлено достоверное изменение содержания УКГ в субклеточных структурах печени. У крыс, получавших малые дозы гормона, с 6-го по 24-й день опыта в митохондриях и микросомах наблюдали достоверное повышение всех УКГ (в среднем от 11,2 до 39,4 %) при нормальном их уровне во всех исследованных препаратах мембран. У животных, получавших средние дозы  $T_4$ , в начальные сроки опыта (на 6—12-й день) отмечали заметное повышение содержания всех исследуемых УКГ в структурных элементах

печени, которое затем (на 18—30-й день опыта) сменялось их снижением в митохондриях и микросомах при довольно высоком их уровне во всех мембранах печени. При введении же животным больших доз  $T_4$  в начальные сроки эксперимента (на 6-й день после начала введения гормона) установлено существенное повышение уровня отдельных УКГ во всех мембранах, которое затем, начиная с 12-го дня опыта, постепенно сменялось их снижением во всех исследованных структурах печени. Нормализация уровня отдельных УКГ наиболее быстро (на 6—12-й день после окончания опыта) происходила у крыс, получавших малые дозы тироксина. При введении же средних и особенно больших доз этот процесс затягивался (до 16—24 дней и более). Быстрее происходила нормализация концентрации УКГ в митохондриях и микросомах, значительно медленнее — в препаратах биомембран печени. Самый длительный процесс нормализации уровня УКГ отмечался в плазматических мембранах.

При анализе коррелятивных связей у крыс, получавших малые дозы  $T_4$ , на всех этапах исследования была установлена положительная корреляция между изменениями УКГ в субклеточных элементах печени ( $r \geq +0,895 - +0,950$ ). В значительно меньшей мере данная закономерность выявлялась у крыс, которым вводили средние или большие дозы тиреоидного гормона. Во всех опытных группах, получавших различные дозы  $T_4$ , коэффициент корреляции между изменениями содержания УКГ в мембранах печени значительно выше, чем при сопоставлении таковых в митохондриях и микросомах по отношению к изменениям в плазматических мембранах. У крыс, получавших малые дозы  $T_4$ , начиная с 6-го дня опыта отмечали положительную корреляцию между изучаемыми изменениями уровня УКГ в печени, к 24-му дню опыта корреляция нарастала. У животных, получавших средние или большие дозы гормона, наблюдали наивысший коэффициент положительной корреляции при сравнении содержания отдельных УКГ в субклеточных элементах печени в начальные сроки исследований (на 6-й и значительно ниже на 12-й день от начала введения  $T_4$ ). К 24-му

Корреляция между изменениями содержания УКГ в субклеточных элементах печени крыс через 24 дня после введения  $T_4$  ( $n=6$ )

Субклеточные элементы	УКГ	Статистический показатель	УКГ					
			сиаловые кислоты		гексозамины		ГСБ	
			доза Т <sub>4</sub> , мкг на 100 г массы					
			10 (малые)	20 (средние)	10 (малые)	20 (средние)	10 (малые)	20 (средние)
Митохондрии	Л-фукоза	r	+0,898	+0,725*	+0,895	+0,750*	+0,897	+0,745*
		z	1,44	0,91	1,42	0,97	1,43	0,97
	ГСБ	r	+0,915	+0,685*	+0,945	+0,765*	—	—
		z	1,56	0,84	1,78	1,0	—	—
	Гексозами- ны	r	+0,943	+0,758*	—	—	—	—
		z	1,76	0,99	—	—	—	—
Микросомы	Л-фукоза	r	+0,900	+0,785*	+0,915	+0,725*	+0,895	+0,685*
		z	1,47	1,06	1,56	0,91	1,42	0,84
	ГСБ	r	+0,925	+0,725*	+0,950	+0,785*	—	—
		z	1,62	0,91	1,83	1,06	—	—
	Гексозами- ны	r	+0,910	+0,715*	—	—	—	—
		z	1,52	0,89	—	—	—	—
Мембраны: плазматиче- ские	Л-фукоза	r	+0,920	+0,900	+0,915	+0,735*	+0,935	+0,896
		z	1,59	1,47	1,56	0,94	1,69	1,42
	ГСБ	r	+0,938	+0,895	+0,982	+0,800*	—	—
		z	1,72	1,45	2,35	1,08	—	—
	Гексозами- ны	r	+0,985	+0,815*	—	—	—	—
		z	2,44	1,13	—	—	—	—
митохонд- риальные	Л-фукоза	r	+0,910	+0,685*	+0,916	+0,755*	+0,925	+0,810*
		z	1,52	0,84	1,56	0,98	1,63	1,10
	ГСБ	r	+0,948	+0,896	+0,965	+0,900	—	—
		z	1,81	1,42	2,02	1,47	—	—
	Гексозами- ны	r	+0,935	+0,840*	—	—	—	—
		z	1,70	1,22	—	—	—	—
микросомаль- ные	Л-фукоза	r	+0,895	+0,740*	+0,900	+0,835*	+0,918	+0,820*
		z	1,45	0,95	1,47	1,20	1,58	1,17
	ГСБ	r	+0,925	+0,901	+0,955	+0,860*	—	—
		z	1,63	1,47	1,89	1,29	—	—
	Гексозами- ны	r	+0,940	+0,835*	—	—	—	—
		z	1,74	1,20	—	—	—	—

Примечание. Здесь и в табл. 3:  $r$  — коэффициент корреляции,  $z$  — критерий Фишера, + — положительная корреляция. Звездочка — отсутствие статистически достоверных различий с контролем ( $p>0,05$ ). Все остальные величины достоверно отличаются от контроля.

дню опыта корреляция между исследуемыми изменениями уровня отдельных УКГ в сравниваемых субклеточных фракциях печени постепенно снижается (табл. 2).

С целью характеристики изменений содержания УКГ в митохондриях, микросомах и мембранах печени крысы проводили корреляционный анализ для каждого из УКГ в зависимости от дозы  $T_4$ . Полученные данные показывают, что корреляция наиболее отчетлива в изменениях уровня сиаловых кислот в мембранах и значительно менее выражена при сопоставлении этих нарушений в митохондриях и микросомах по сравнению с таковыми в мембранах. Величина коэффициен-

та корреляции между изменениями отдельных УКГ в исследуемых структурах ткани печени зависит от дозы, продолжительности введения тиреоидного гормона и сравниваемых субклеточных элементов печени. Так, самый высокий процент положительной корреляции отмечен для уровней УКГ в мембранах печени на 24-й день после начала опыта в группе крыс, получавших малые дозы  $T_4$ . У животных, которым вводили средние дозы  $T_4$ , величина коэффициента корреляции через 24 дня после начала опыта значительно ниже, чем в предыдущей группе, но еще в отдельных случаях достоверная. У крыс, которым вводили большие дозы  $T_4$ , отмечено значительное



Таблица 3

Корреляция между изменениями содержания сиаловых кислот в субклеточных элементах печени крыс через 24 дня после введения  $T_4$  ( $n=6$ )

Субклеточные структуры	Доза $T_4$ , мкг на 100 г массы	Статистический показатель	Микросомы	Митохондрии	Мембраны		
					плазматические	митохондриальные	микросомальные
Митохондрии	10 (малые)	$r$	+0,950	—	+0,828*	+0,815*	+0,800*
		$z$	1,88	—	1,18	1,13	1,10
	20 (средние)	$r$	+0,820*	—	+0,812*	+0,805*	+0,808*
		$z$	1,15	—	1,12	1,08	1,09
	40 (большие)	$r$	+0,650*	—	+0,715*	+0,718*	+0,800*
		$z$	0,77	—	0,89	0,90	1,10
Мембраны: плазматические	10 (малые)	$r$	+0,807*	+0,826*	—	+0,985	+0,975
		$z$	1,08	1,17	—	2,44	2,18
	20 (средние)	$r$	+0,750*	+0,855*	—	+0,925	+0,906
		$z$	0,97	1,27	—	1,63	1,50
	40 (большие)	$r$	+0,610*	+0,700*	—	+0,852*	+0,812*
		$z$	0,71	0,86	—	1,26	1,12
митохондриальные	10 (малые)	$r$	+0,886*	+0,868*	+0,990	—	+0,972
		$z$	1,42	1,31	2,64	—	2,13
	20 (средние)	$r$	+0,850*	+0,820*	+0,985	—	+0,965
		$z$	1,25	1,15	2,44	—	2,02
	40 (большие)	$r$	+0,645*	+0,508*	+0,685*	—	+0,650*
		$z$	0,76	0,56	0,84	—	0,77
микросомальные	10 (малые)	$r$	+0,856*	+0,835*	+0,978	+0,960	—
		$z$	1,27	1,20	2,25	1,95	—
	20 (средние)	$r$	+0,800*	+0,796	+0,910	+0,915	—
		$z$	1,10	1,08	1,53	1,56	—
	40 (большие)	$r$	+0,705*	+0,755*	+0,840*	+0,835*	—
		$z$	0,87	0,98	1,22	1,20	—

Примечание. Аналогичные результаты получены при исследовании корреляции в сравниваемых субклеточных структурах для уровня гексозаминов, ГСБ и L-фукозы.

снижение коэффициента корреляции между изменениями уровней УКГ в сравниваемых субклеточных элементах печени (табл. 3).

Таким образом, введение различных доз тиреоидного гормона животным влияло на содержание общих УКГ в субклеточных элементах печени. Малые дозы  $T_4$  приводили к достоверному повышению уровня УКГ в митохондриях и микросомах при незначительном их изменении в препаратах мембран. Введение же крысам средних доз  $T_4$  в начальные сроки опыта (на 6-й день после начала введения) вело к увеличению содержания УКГ во всех субклеточных элементах печени, которое затем, начиная с 12-го дня эксперимента, в митохондриях и микросомах сменялось снижением при высоком содержании их в мембранах. У крыс, получавших большие дозы, наоборот, отмечалось достоверное снижение содержания УКГ во всех исследуемых материалах независимо от сроков определений. Нормализация уровня отдельных УКГ в субклеточных

элементах печени происходит наиболее быстро (на 6—12-й день после окончания введения крысам гормона) у крыс, которым вводили малые дозы  $T_4$ , и наоборот, наиболее продолжительно (на 18-й и 24-й дни после окончания опытов) у животных, получавших большие дозы  $T_4$ . Отсутствие корреляции между показателями нормализации содержания отдельных УКГ в различных субклеточных элементах печени показывает, что эти процессы в различных субклеточных структурах печени происходят сугубо индивидуально и не взаимосвязанно.

Достоверное повышение содержания УКГ в митохондриях и микросомах печени у крыс, которым вводили малые дозы  $T_4$ , по-видимому, согласуется с представлениями о стимулирующем действии  $T_4$  на генетический аппарат клетки [23], вследствие чего стимулируется транскрипция с последующей активизацией ферментных систем, принимающих участие в биосинтезе УКГ, а также повышается уровень богатых энергией соединений [10] и

увеличивается интенсивность окислительно-восстановительных процессов [24, 25] в указанных субклеточных элементах печени.

Умеренное снижение уровня отдельных УКГ в митохондриях и микросомах печени у крыс, получавших средние дозы  $T_4$ , а также еще более значительное снижение этих показателей во всех структурных элементах печени у животных, которым вводили большие дозы  $T_4$ , зависят от многих причин. По-видимому, средние дозы  $T_4$  способствуют повышению процесса связывания УКГ с липидами и белками на поверхности мембран [26].

Самый высокий коэффициент положительной корреляции ( $r \geq$  от +0,895 до +0,985) отмечен между изменениями уровня отдельных УКГ в субклеточных элементах печени крыс, получавших в течение 21 дня малые дозы  $T_4$ . Введение крысам средних или больших доз  $T_4$  резко снижает корреляцию ( $r \geq$  от +0,895 до +0,685), а ее достоверность во всех случаях практически отсутствует ( $p > 0,05$ ). Вероятно, вводимый в организм тиреоидный гормон по-разному влияет на содержание УКГ в органеллах и мембранах клеток печени.

Можно предположить, что повышение уровня УКГ у крыс, получавших малые или средние дозы  $T_4$ , может играть роль своего рода буферной системы в связывании на поверхности плазматических мембран «излишнего» количества гормона, циркулирующего в русле крови. Этот процесс может продолжаться до тех пор, пока существенно не нарушается биосинтез в них УКГ, что ведет к относительному снижению уровня УКГ в плазматических и других мембранах при длительном введении средних и больших доз  $T_4$ . Снижение уровня УКГ в плазматических мембранах крыс, вероятно, играет определенную роль в защите органелл клетки от токсического воздействия  $T_4$ . Известно [16], что уменьшение содержания УКГ в биомембранах снижает эффект связывания и переноса гормона в клетке.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Азарашвили Т. С., Лукьяненко А. И., Евтодченко Ю. Б. // Биохимия. — 1978. — Т. 43, № 7. — С. 1139—1142.
2. Арчаков А. И., Панченко Л. Ф., Капитонов А. Б. и др. // Цитология. — 1971. —

- Т. 13, № 7. — С. 887—893.
3. Богач П. Г., Курский М. Д., Кучеренко Н. Е., Рыбальченко В. К. Структура и функции биологических мембран. — Киев, 1981. — С. 268—283.
4. Видершайн Г. Я. Биохимические основы гликозидозов. — М., 1980. — С. 95—218.
5. Воейков В. Л., Денисов В. М., Поздняков С. П. // Биоорг. химия. — 1976. — № 12. — С. 1672—1675.
6. Гликопротеины / Под ред. А. Готтшалка: Пер. с англ. — М., 1969. — Т. 1. — С. 195—210.
7. Кузьмак Н. И. // Физиол. журн. СССР. — 1973. — Т. 59, № 7. — С. 1114—1121.
8. Кузьмак Н. И. // Вопр. мед. химии. — 1977. — № 4. — С. 444—449.
9. Кузьмак Н. И. // Там же. — 1983. — № 2. — С. 93—101.
10. Панайотов Б. // Общ. сравнит. пат. — 1977. — № 4. — С. 98—103.
11. Поцелуева М. М., Евтодченко Ю. В., Лазарева А. В. // Цитология. — 1980. — Т. 22, № 1. — С. 52—55.
12. Степанов Г. С. // Лаб. дело. — 1965. — № 10. — С. 594—597.
13. Туманова С. Ю. // Биохимия. — 1978. — Т. 43, № 3. — С. 387—398.
14. Туракулов Я. Х. // Всесоюзный биохимический съезд, 3-й: Тезисы симпозиальных докладов. — Рига, 1974. — С. 96—97.
15. Цветкова И. В., Узбеков М. Г. // Биохимия. — 1967. — Т. 32, № 3. — С. 646—650.
16. Aschwell G. // The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans. — New York, 1980. — P. 289—318.
17. Boas N. P. // J. biol. Chem. — 1953. — Vol. 204. — P. 553—556.
18. Dische Z., Shettles H. // Ibid. — 1948. — Vol. 175. — P. 595—603.
19. Gharbi-Chihi J., Torresani J. // J. Endocr. Invest. — 1981. — Vol. 4, N 2. — P. 177—183.
20. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. S. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
21. Lustig B. A., Langer A. // Biochem. Z. — 1931. — Bd 242. — S. 320—337.
22. Miettinen T., Takki-Luukkainen J. // Acta chem. scand. — 1959. — Vol. 13. — P. 856—858.
23. Ray T. K. // Biochim. biophys. Acta. — 1970. — Vol. 196. — P. 1—9.
24. Tobin R. B., Berdanier C. D., Ecklund R. E. // J. environm. Path. Toxicol. — 1979. — Vol. 2, N 6. — P. 1223—1234.
25. Williams A. F. // Biochem. Soc. Trans. — 1978. — Vol. 6, N 3. — P. 490—495.
26. Yoshida K., Davis P. J. // Horm. Metab. Res. — 1981. — Vol. 13, N 7. — P. 394—395.

Поступила 26.08.87

#### IN VIVO EFFECT OF L-THYROXIN ON CONTENT OF SOME CARBOHYDRATES IN GLYCOPROTEINS OF RAT LIVER SUBCELLULAR FRACTIONS

Ye. N. Panasyuk, N. I. Kuz'mak

Medical School, Lvov

Effect of various doses of L-thyroxin on content of some carbohydrates (sialic acids, hexosamines, hexoses bound with proteins and

L-fucose) in glycoproteins was studied in rat liver subcellular fractions. Content of these carbohydrates was altered similarly in liver tissue, whereas various doses of the hormone caused different changes of the glycoprotein components in liver tissue subcellular fractions. Within 24 days after L-thyroxin administration small doses of the hormone led to elevation of these carbohydrates in mitochondria and microsomes, while their content was unaltered in

biomembranes, intermediate doses caused a decrease of the carbohydrates in mitochondria and microsomes and an increase in plasmatic mitochondrial and microsomal membranes, high doses of L-thyroxin caused a decrease of the carbohydrates in all the structures studied. Duration of normalization of the glycoprotein carbohydrate components in rat liver tissue depended on the L-thyroxin dose administered.

УДК 616.155.392-036.11-07:616.155.3-008.93:577.123.2

*Л. И. Филиновская, М. Н. Блинов, А. В. Того, Н. И. Клубовская,  
Е. В. Бурмистрова*

## О ДЕГРАДАЦИИ ПУРИНОВ В ЛЕЙКОЦИТАХ ПРИ ОСТРЫХ НЕЛИМФОБЛАСТНЫХ ЛЕЙКОЗАХ

Ленинградский НИИ гематологии и переливания крови

Представляется важной роль процессов метаболизма пуриновых нуклеотидов, ответственных за их деградацию и катализируемых ферментами аденозиндезаминазой (АДА), пури́н-нуклеозидфосфорилазой (ПНФ) и 5'-нуклеотидазой (5'-Н), в регуляции функциональной активности клеток различных типов. Процессы, осуществляемые этими ферментами, направлены на поддержание внутриклеточного баланса концентраций аденозина и дезоксиаденозина, являющихся модуляторами клеточных [12] и физиологических функций [9]. Ферменты АДА, ПНФ и 5'-Н являются маркерами дифференцировки лимфоидных клеток [8], и анализ их активности оказывает существенную помощь при диагностике вариантов острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) и определении клеточной принадлежности цитохимически недифференцируемых форм острого лейкоза (ОЛ) [5].

Ферменты АДА, ПНФ и 5'-Н, соотношение уровней их активности, однако, мало изучены как в нормальных, так и в лейкозно-трансформированных клетках миелоидной природы. В большинстве исследований [6, 11] представлены результаты изучения при острых лейкозах нелимфоидной природы (ОнеЛЛ) только активности АДА.

В последнее время появилось сообщение, в котором авторы на основании близкого сходства уровней активности АДА и 5'-Н в лейкозных клетках ставят под сомнение ценность этих двух ферментов как биохимических маркеров вариантов  $M_1-M_6$

ОнеЛЛ [14]. Между тем из-за нечеткости отличительных морфоцитохимических признаков лейкозных клеток [1] вариант ОнеЛЛ нередко трудно диагностировать и потому представляется актуальным поиск дополнительных критериев, в том числе и биохимических, способствующих решению этой задачи.

Мы изучили АДА, ПНФ и 5'-Н в лейкоцитах здоровых людей и больных ОнеЛЛ с целью определить, имеются ли специфические особенности в распределении величин их активностей в лейкозных клетках при различных вариантах этой формы ОЛ, позволяющие использовать ферменты деградации пуринов в качестве маркеров для дифференциальной диагностики также и при ОнеЛЛ.

### Методика

Работа проведена на лейкоцитах периферической крови 34 больных ОнеЛЛ и гранулоцитах 17 здоровых людей. Обследованные больные находились на стационарном лечении в гематологических клиниках нашего института. Среди больных было 14 детей в возрасте от 2 до 14 лет и 20 взрослых в возрасте от 19 до 77 лет.

По данным клинико-гематологического и морфоцитохимического исследований 17 больным поставлен диагноз острого миелобластного лейкоза (ОМБЛ), 6 — миеломонобластного острого лейкоза (ОМ — монЛ), 7 — острого монобластного лейкоза (ОМонЛ). Больных острым промиелоцитарным лейкозом (ОПЛ) было 2, острым эритромиелозом (ОЭМЛ) — также 2. У 32 больных к моменту проведения биохимического обследования констатирована 1 активная фаза заболевания, у 2 больных — 2-й или 3-й рецидив.

Пробы крови брали в период постановки диагноза и перед цитостатической терапией.

Активность ферментов деградации пуринов в гранулоцитах здоровых людей и лейкоцитах больных ОнеЛЛ

Виды клеток	Число обследо- ванных	Состав исследуемой клеточной фракции, %	Активность ферментов, ед.			Цитохимические показатели, %				
			АДА	ПНФ	АДА/ПНФ	миелоперок- сидаза	липиды	PAS-реакция	хлорацетат- эстераза	$\alpha$ -нафтил- ацетатэстера- за
Гранулоциты	17		$87 \pm 10$ (30—176)	$216 \pm 25$ (91—447)	$0,44 \pm 0,05$ (0,17—0,87)					
ОМБЛ:										
1-я группа ( $M_2$ )	11	Бл. 21—98, лф. 1,5—64	$878 \pm 73$ (584—1410)	$289 \pm 37$ (76—459)	$3,7 \pm 0,6$ (1,71—8,2)	62—92	26—100	36—68		
2-я группа ( $M_1$ )	3	Бл. 51—81, лф. 25—31	$287 \pm 48$ (222—377)	$186 \pm 24$ (144—224)	$1,5 \pm 0,2$ (1,17—1,81)	7—46	53—98	0,0—17		
3-я группа ( $M_1$ )	3	Бл. 41—89, лф. 8—25	$294 \pm 8$ (283—310)	$534 \pm 30$ (491—591)	$0,6 \pm 0,04$ (0,48—0,63)	1—7	2—21	0,0—6		
ОПЛ ( $M_3$ )	2	Бл. 82, лф. 16	2192	384	5,7	15	77	4	58	
		Бл. 90, лф. 9	197	211	0,93	84	100	0,0	51	
ОМмонЛ ( $M_4$ )	6	Бл. 24—96, лф. 2,5—27	$362 \pm 42$ (238—521)	$216 \pm 56$ (96—461)	$2,26 \pm 0,6$ (0,7—4,57)	4—93	13—98	6—56	14—61	28—75
ОМонЛ ( $M_{5a}$ )	3	Бл. 14—30, лф. 30—67	$274 \pm 52$ (179—355)	$220 \pm 48$ (143—307)	$1,33 \pm 0,4$ (0,85—2,02)	0,0	0,0—4	0,0—34	0,0	60—100
ОМонЛ ( $M_{5b}$ )	4	Бл. 86—96, лф. 3—14, мон. 59	$733 \pm 113$ (531—1013)	$275 \pm 90$ (81—446)	$3,82 \pm 1,2$ (1,38—6,58)	27—95	55—100	6—71	15—24	53—96
ОЭМЛ ( $M_6$ )	2	Бл. 1—63, лф. 0—55, рц. 98, нормобл. 4—24/100	$71 \pm 10$ (81—62)	$188 \pm 31$ (156—219)	0,5	19—66	Положи- тельные	Во всех эритроид- ных клет- ках	Положи- тельные	
Клетки К-562	3		$84 \pm 12$ (31—159)	$544 \pm 21$ (387—696)	$0,13 \pm 0,03$ (0,08—0,23)					

Примечание. 1 единица активности фермента соответствует 1 нмоль субстрата, превращенного  $10^6$  клеток за 1 ч. Бл. — бласты, лф. — лимфоциты, мон. — моноциты, рц. — ретикулоциты, нормобл. — нормобласты. В скобках — пределы колебаний.

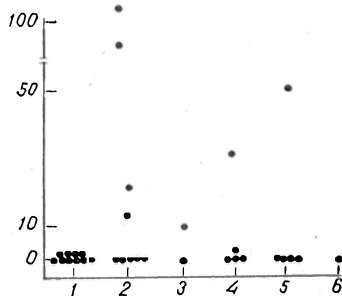


Рис. 1. Активность 5'-нуклеотидазы в нормальных и лейкозных миелоидных клетках. 1 — нормальные гранулоциты; 2 — ОМБЛ; 3 — ОПЛ; 4 — ОМБЛ; 5 — ОМБЛ; 6 — ОМБЛ. По оси ординат — дефосфорилирование АМФ (в ед.).

Гранулоциты из крови здоровых доноров получали после отстаивания ее с желатиноцитратным раствором [2]. Лейкоциты из периферической крови больных выделяли при центрифугировании на градиенте фиколл-верографин с плотностью 1,076 [7]. Получаемая фракция клеток, кроме бластов, могла содержать другие незрелые клеточные элементы, лимфоциты и моноциты.

Активность ферментов деградации пуринов определяли методами, описанными ранее [4]. Для статистической обработки экспериментальных данных применяли метод Стьюдента — Фишера.

## Результаты и обсуждение

Опыты, проведенные на гранулоцитах здоровых людей, показали (см. таблицу), что в норме в зрелых миелоидных клетках активность ферментов АДА и ПНФ значительно варьирует и средние показатели активности второго фермента ( $216 \pm 25$  ед.) в 2,5 раза выше, чем первого ( $87 \pm 10$  ед.). Это определяет величину отношения АДА/ПНФ (0,44), которая в гранулоцитах ниже, чем в лимфоцитах. Из рис. 1 видно, что на клеточной мембране гранулоцитов активность 5'-Н не определяется. Отсутствие на гранулоцитах энзиматической системы, способствующей проникновению во внутриклеточное пространство аденозина, возможно, является одним из механизмов резистентности зрелых миелоидных клеток к токсическому действию этого пуринового нуклеозида, от которого не защищены лимфоциты, несущие активную 5'-Н.

В результате исследования лейкозных клеток выяснилось, что больные ОМБЛ по уровню активности АДА, ПНФ и их соотношения в миелобластах могут быть разделены на 3 группы. У 11 из 17 обследованных с ОМБЛ

(1-я группа) в миелобластах определяется высокая активность АДА ( $873 \pm 73$  ед.), которая в несколько раз превышает активность ПНФ ( $289 \pm 37$  ед.). Поскольку соотношение активности АДА и ПНФ в миелобластах этих больных противоположно соотношению, установленному в гранулоцитах, величина АДА/ПНФ в них намного выше (3,7), чем в норме.

В миелобластах 3 больных 2-й группы активность АДА ( $287 \pm 48$  ед.) хотя и превышала таковую в зрелых гранулоцитах, но была существенно ниже, чем в 1-й группе. Активность же ПНФ у этих больных была близка к определяемой в гранулоцитах. Индекс АДА/ПНФ (1,5) занимал промежуточное положение между установленным в гранулоцитах доноров и бластах больных ОМБЛ 1-й группы.

У 3 последних из обследованных больных ОМБЛ миелобласты отличались тем (см. таблицу), что в них активность ПНФ ( $534 \pm 30$  ед.) была выше активности АДА ( $294 \pm 8$  ед.) и в 1,7—2,8 раза превышала активность ПНФ в бластах больных ОМБЛ, рассмотренных ранее ( $0,05 > p > 0,02$ ). Миелобласты данной группы больных характеризовались самой низкой по сравнению с установленной у других больных ОМБЛ величиной соотношения АДА/ПНФ (0,6).

Представленные результаты показывают, что бластные клетки больных ОМБЛ неоднородны по показателям активности ферментов деградации пуринов. В миелобластах  $2/3$  обследованных больных ОМБЛ отмечена такая же высокая активность АДА, как и в лимфоцитах при Т-клеточном ОЛЛ [5]. Однако характерным отличием миелобластов является то, что в них активность ПНФ всегда в несколько раз выше, а величина АДА/ПНФ (даже в 1-й группе) ниже, чем в Т-лимфоцитах.

Таким образом, миелобластный вариант ОД в картине распределения активностей маркерных энзимов в лейкозных клетках имеет типичные черты, надежно отличающие его от Т-лимфобластного.

Из таблицы видно, что высокая активность АДА типична для миелобластов больных ОМБЛ, лейкозные клетки которых имеют цитохимические признаки созревания. Это позволяет отнести их к ОнеЛЛ-М<sub>2</sub>. В то же вре-

мя у миелобластов больных ОМБЛ (2-я и 3-я группы), в которых активность АДА ниже, чем в 1-й группе, отмечаются цитохимические характеристики малодифференцированных клеток, характерных для ОнеЛЛ-М<sub>1</sub>.

Эти сопоставления позволяют высказать предположение, что дифференцировка миелобластов связана с изменением активности исследованных ферментов, прежде всего, с повышением активности АДА и соотношения АДА/ПНФ. Согласно полученным результатам, малодифференцированные бласты при ОнеЛЛ-М<sub>1</sub> представлены двумя типами клеток, различающимися по активности ПНФ и соотношению АДА/ПНФ.

Результаты исследования при ОПЛ (ОнеЛЛ-М<sub>3</sub> по ФАБ-классификации) показали (см. таблицу), что бласты 2 обследованных больных с этим вариантом ОЛ резко различаются по активности исследованных ферментов. У одного из них в бластах обнаружена очень высокая активность АДА (в 2,5 раза выше активности фермента у больных ОнеЛЛ-М<sub>2</sub>), а активность ПНФ и величина соотношения АДА/ПНФ были сравнимы с определяемыми в миелобластах у последних. В бластах другого больного ОПЛ активность АДА была в 10, а ПНФ — в 2 раза ниже, чем в бластах первого больного. Биохимически столь резко различающиеся бласты больных ОПЛ ни морфологически, ни по интенсивности цитохимических реакций (см. таблицу) существенно не отличались друг от друга. Исключение составляла миелопероксидаза, которая у больного с высокой активностью АДА в бластах выявлялась только в 15 % клеток, а у больного с пониженной активностью АДА — в 84 % клеток.

Биохимические исследования у 6 больных с диагнозом ОМмонЛ (ОнеЛЛ-М<sub>4</sub>) показали (см. таблицу), что в бластах этих больных активность АДА составляет в среднем  $362 \pm 42$  ед., что в 2,4 раза ниже активности фермента ( $p < 0,001$ ) у большинства больных ОМБЛ-М<sub>2</sub>, но несколько выше активности АДА в миелобластах больных с ОнеЛЛ-М<sub>1</sub> ( $0,1 < p < 0,2$ ). Что же касается ПНФ то ее активность ( $216 \pm 56$  ед.) в бластах при ОМмонЛ (см. таблицу) мало отличается от обнаруживаемой у большинства больных ОМБЛ.

Таким образом, распределение активностей АДА, ПНФ и их соотношения в бластах при ОМмонЛ существенно отличается от наблюдаемого в миелобластах большинства больных ОМБЛ. Появление в популяции лейкозных клеток при ОМмонЛ гистохимических признаков моноцитотидной дифференцировки (наличие в клетках  $\alpha$ -нафтилацетатэстеразы, частично ингибируемой фторидом натрия) связано с замедлением деградации пуриновых нуклеотидов в бластах вследствие снижения активности АДА.

Из результатов исследования у больных ОМонЛ (ОнеЛЛ-М<sub>5</sub>) видна (см. таблицу) четкая зависимость распределения активностей ферментов деградации пуринов от вызревания лейкозных моноцитотидных клеток, а также от уровня бластоэоза. У 3 из 7 обследованных больных ОМонЛ с невысокой бластемией (14—30 %) по морфоцитохимическим признакам лейкозных клеток диагностирован ОнеЛЛ-М<sub>5a</sub>. Энзиматический анализ их лейкоцитов показал, что по величине активности АДА ( $274 \pm 52$  ед.), ПНФ ( $220 \pm 48$  ед.) и соотношения АДА/ПНФ (1,33) они имеют близкое сходство с малодифференцированными миелобластами больных ОМБЛ с вариантом заболесвания М<sub>1</sub>, выделенными нами во 2-ю группу.

У 4 больных ОМонЛ с высоким содержанием монобластов (86—95 %) или моноцитов (59 %) были отчетливо выражены морфоцитохимические признаки вызревания моноцитотидных клеток, что послужило основой для диагностирования у них ОнеЛЛ-М<sub>5b</sub>. В лейкозных клетках этих больных ОМонЛ, как видно из таблицы, активность АДА в 2,6 раза выше активности фермента в бластах больных ОнеЛЛ-М<sub>5a</sub>, когда отсутствуют признаки вызревания лейкозного клон. По распределению величин активности АДА ( $733 \pm 113$  ед.), ПНФ ( $275 \pm 90$  ед.) и их соотношения (3,82) бластные клетки этой группы больных ОМонЛ сходны с миелобластами больных ОМБЛ (1-я группа), имеющими цитохимические признаки созревания (см. таблицу).

Рассмотренные данные показывают, что дифференцировка монобластов, как и миелобластов, сопровождается повышением активности АДА и пере-



распределением в соотношении уровней активности АДА и ПНФ.

При ОЭМЛ в бластных клетках (см. таблицу) определяется наименьшая (в 2,7—30 раз ниже, чем в лейкозных клетках при других вариантах ОнеЛЛ) активность АДА ( $71 \pm 10$  ед.). Активность ПНФ ( $188 \pm 31$  ед.) в бластах при ОЭМЛ оказалась сниженной в меньшей степени, чем в лейкоцитах других больных ОнеЛЛ. Лейкозный клон у одного из обследованных больных ОЭМЛ на 60 % был представлен миелобластами, из чего можно заключить, что последние, как и эритроидные клетки этих больных, имеют сниженную активность АДА и по своим биохимическим параметрам отличаются от миелобластов при ОМБЛ.

При исследовании клеток линии К-562, которые потенциально способны к дифференцировке и в эритроидном, и в миелоидном направлении, мы обнаружили, что активность АДА в них ( $84 \pm 12$  ед.) сравнима с определенной при ОЭМЛ, а высокая активность ПНФ ( $544 \pm 21$  ед.) сопоставима с установленной в миелобластах некоторых больных ОМБЛ. Сходство энзиматических параметров лейкозных клеток больных ОЭМЛ с определяемыми в клетках К-562 и малодифференцированных миелобластах при ОнеЛЛ-М<sub>1</sub> наводят на мысль о том, что при ОнеЛЛ-М<sub>6</sub> лейкозогенный фактор поражает эритроидные и миелоидные клетки ранних этапов дифференцировки.

При анализе результатов изучения активности поверхностно-клеточной 5'-Н выяснилось, что в отличие от зрелых гранулоцитов этот фермент обнаруживается на лейкозных клетках некоторых больных ОнеЛЛ (см. рис. 1). В ряде случаев ОМБЛ, ОМмонЛ, ОМонЛ активность 5'-Н не уступала (25, 46, 30 ед.) или даже превышала (78, 106 ед.) активность фермента, определяемую на лимфоидных клетках [4]. Показано, что при ОЛЛ более высокая активность 5'-Н обнаруживается на лимфобластах ранних этапов дифференцировки, еще не экспрессирующих клеточных детерминант и антигенов [10]. В связи с этим можно предположить, что когда на бластах выявляется активная 5'-Н, уровень их дифференцировки ниже, чем клеток без 5'-Н.

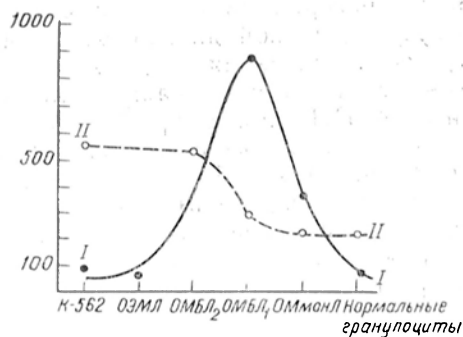


Рис. 2. Динамика активности АДА (I) и ПНФ (II) в ходе дифференцировки и созревания клеток миелоидного ряда.

Таким образом, этапы дифференцировки миелобластов сопровождаются «перекрестными» изменениями активности АДА и ПНФ, причем активность первого фермента возрастает, а второго снижается (рис. 2), что противоположно наблюдаемому при Т-лимфоидной дифференцировке [8]. Следовательно, миелобласты при ОнеЛЛ могут быть представлены клетками различных уровней дифференцировки, что подтверждается также результатами изучения их поверхностных рецепторов [3].

Повышение активности АДА в ходе дифференцировки является свойством клеток как миелоидного, так и моноцитарного ряда. Изменение в направлении дифференцировки (при ОМмонЛ) связано со сдвигами в картине ферментативных активностей в лейкозных клетках и происходит прежде всего за счет изменений в активности АДА. Дифференцировка и созревание клеток миелоидного ряда в наибольшей степени затрагивают уровни активности АДА.

Результаты работы, по нашему мнению, ставят под сомнение выводы некоторых исследователей, что изучение ферментов деградации пуринов не может оказать существенной помощи при дифференциальной диагностике ОнеЛЛ. Согласно полученным данным, лейкозные клетки при вариантах ОнеЛЛ М<sub>1</sub>, М<sub>2</sub>, М<sub>4</sub>, М<sub>6</sub> имеют характерные отличия в величинах активности АДА, ПНФ и их соотношении, что может служить основой для идентификации перечисленных вариантов ОЛ. Близкое сходство показателей активности в лейкоцитах ОнеЛЛ-М<sub>5</sub> с такими при вариантах М<sub>1</sub> и М<sub>2</sub> ограни-

чивает информативность анализа для дифференциальной диагностики таких случаев заболевания. Однако это не снижает значимости анализа активности АДА, ПНФ и 5'-Н при ОнеЛЛ, так как, помимо вклада в уточнение классификации этих заболеваний, он дает возможность определить уровень дифференцировки лейкозных клеток, от которой может зависеть успех в терапии [13].

- Arch. Geschwulstforsch. — 1983. — Bd. 53, № 1. — S. 53—59.
12. van Laarhoven J. P. R. M., De Bruyn C. H. M. M., Collet H., Delespesse G. // Immunomodulation, Frontiers and Advances. — New York, 1984. — P. 257—267.
  13. Mirro J., Zipt T. F., Pui Chung-Hon et al. // Blood. — 1985. — Vol. 66, № 5. — P. 1115—1123.
  14. Skoog L., Hägerström T., Reizenstein P., Öst A. // Scand. J. Haemat. — 1986. — Vol. 36, № 1. — P. 25—32.

Поступила 25.05.87

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Козинец Г. И., Дульцина С. М., Захарова А. В. и др. // Гематол. и трансфузиол. — 1986. — № 9. — С. 8—15.
2. Луганова И. С., Сейц И. Ф. // Лаб. дело. — 1967. — № 9. — С. 521—526.
3. Тищенко Л. М., Гусева С. А. // Экспер. онкол. — 1985. — № 2. — С. 51—54.
4. Филановская Л. И., Варганян Н. Л., Того А. В. и др. // Вопр. мед. химии. — 1985. — № 3. — С. 48—53.
5. Цвейбах А. С., Филановская Л. И., Того А. В. и др. // Гематол. и трансфузиол. — 1986. — № 9. — С. 3—7.
6. Bertazzoni U., Scovassi A. I., Torsello S. et al. // Biochemical and Biological Markers of Neoplastic Transformation. — New York, 1983. — P. 217—232.
7. Böyum A. // Scand. J. clin. Invest. — 1968. — Suppl. 97. — P. 77—89.
8. Demeocq F., Viillard J. L., Boumsell L. et al. // Leukemia Res. — 1982. — Vol. 6, № 2. — P. 211—220.
9. Fredholm B. B., Hedqwist P. // Biochem. Pharmacol. — 1980. — Vol. 29, № 12. — P. 1635—1643.
10. Gutenzon W., Thiel E., Emmerich B. // Klin. Wscr. — 1983. — Bd 64, № 1. — S. 57—62.
11. Krüger W., Müller G., Storch H. et al. //

#### 'DEGRADATION OF PURINES IN LEUKOCYTES UNDER CONDITIONS OF ACUTE NON-LYMPHOBLASTIC LEUKOSES

L. I. Filanovskaya, M. N. Blinov, A. V. Toga, N. I. Klubovskaya, E. V. Burmistrova

Institute of Hematology and Blood Transfusion, Leningrad

Activities of the enzymes, responsible for degradation of purine nucleotides in leukocytes, were distinctly dissimilar in  $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_4$  and  $M_6$  variants of acute non-lymphoblastic leukemia studied in 34 patients. Differentiation of leukemic cells was shown to be due to alterations in activity of adenosine deaminase and purine nucleoside phosphorylase, which were oppositely directed as compared with those observed in lymphoblasts under conditions of acute lymphoblast leukemia. Evaluation of activities of adenosine deaminase, purine nucleoside phosphorylase and 5'-nucleotidase is of importance for characteristics of individual variants of acute non-lymphoblastic leukemia and for elucidation of the state of leukemic clone differentiation, which may affect the efficiency of the therapeutic measures used.

УДК 616.74-008.939.62.4-091.818

З. К. Никитина, Л. Б. Ребров

#### СТРУКТУРНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МИОЗИНА СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ КРЫС В ПРОЦЕССЕ ПОСМЕРТНОГО АУТОЛИЗА

Научно-исследовательская лаборатория биологических структур Минздрава СССР, Москва

Исследование процессов, происходящих в мышечной ткани в посмертном периоде, особенно на его начальных этапах, представляет значительный интерес по ряду причин. Так, важной задачей является выявление наиболее ранних функциональных и структурных изменений после смерти в практике трансплантации органов и тканей и мышечно-пластических операций [11]. Кроме того, для исследования структуры мышечной ткани часто при-

меняется обработка препаратов миофибрилл, миозина, актина протеолитическими ферментами [14, 20, 24]. Сравнение характера протеолитической дегградации мышечных белков в посмертном периоде, сопровождающемся активацией гидролаз [6, 19], с процессами, происходящими *in vitro*, может дать представление об особенностях их структурированности в ткани. Следует также учитывать, что изменения, происходящие в мышцах пос-

ле смерти, во многом совпадают с процессами деградации белков при тех или иных патологических состояниях [5, 9].

Посмертные изменения мышечной ткани изучались довольно широко гистологическими и электронно-микроскопическими методами [1, 16-18]. В биохимических работах чаще всего исследовались изменения окислительно-восстановительного потенциала и кислотно-основных свойств ткани [11, 15], соотношение кислоторастворимых и кислотонерастворимых компонентов в мышце [13, 15, 22], гидролитической активности ферментов [6] и т. д. Однако изменения одного из основных белков миофибрилл миозина изучены сравнительно мало. Как известно, характерной особенностью миозина является его способность функционировать одновременно в качестве фермента и структурного белка. В связи с этим целью настоящей работы явилось сравнительное исследование структурной целостности и ферментативной активности миозина скелетных мышц крыс в процессе посмертного аутолиза.

### Методика

Использовали мышцы задних конечностей белых беспородных крыс. Животных декапитировали и тушки хранили при комнатной температуре в течение 0, 3, 12 и 24 ч.

Выделение миозина проводили по методу Perry [27] с последующей очисткой ионообменной хроматографией [28]. Для этого полученный препарат миозина диализовали в течение 3 ч против буфера, содержащего 0,04 М пирогенфосфат Na pH 7,5. Колонку (12×150 мм) заполняли гелем DEAE-Toyo-pearl 650 M под давлением около 1,5 атм. Скорость элюции составляла 120 мл/ч/см<sup>2</sup>. Раствор белка (не более 100 мг) наносили на колонку и промывали стартовым буфером до полного удаления несорбированного материала. Для создания линейного градиента KCl использовали по 20 мл стартового и финишного буфера следующего состава: 0,04 М пирогенфосфат Na (pH 7,5), 0,5 М KCl. Окончательную элюцию сорбированного примесного материала проводили 0,5 М NaOH. Непрерывную запись оптической плотности осуществляли на денситометре «Uvicord II.» Во фракциях объемом 2 мл определяли Ca<sup>2+</sup>-АТФазную активность. Материал, соответствующий миозину, собирали, анализировали с использованием дискового электрофореза в полиакриламидном геле ПААГ с додецилсульфатом натрия (ДСН) и гель-фильтрации на Toyo-pearl HW-65 в 8 М мочевины. Кроме того, исследовали кинетику гидролиза АТФ миозином, спектры поглощения белка в УФ-области на спектрофотометре «Unicam SP 800» и определяли содержание белка методом Лоури [23].

Экстракты мышечных белков получали, используя метод [26] с некоторыми модификациями. В состав «лизирующих» растворов входили мочевины (8 М), ДСН (0,2%), тритон X-100 (1%) и β-меркаптоэтанол (2%). Для получения экстрактов предварительно измельченные образцы мышечной ткани гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с притертым пестиком в «лизирующем» растворе в соотношении 1:10 (масса:объем). Полученные экстракты центрифугировали при 3000 об/мин 30 мин, фильтровали и фильтраты использовали для анализа дисковым электрофорезом в ПААГ с ДСН.

Дисковый электрофорез в ПААГ с ДСН препаратов миозина после ионообменной хроматографии и экстрактов мышечных белков проводили по методу, описанному Н. С. Шелудько [10] для разделения миофибриллярных белков. Гели окрашивали 0,125% раствором кумаси ярко-голубого R-250 в смеси метанол — вода — уксусная кислота (4,5:4,5:1) и сканировали на денситометре «Хромоскан 200». Подвижность белковых зон определяли в процентах, принимая подвижность бромфенолового синего за 100%. Для построения калибровочной кривой использовали наборы белков с диапазоном молекулярных масс от 2,5 до 280 кД («Fluka»).

Гель-фильтрацию миозина осуществляли на колонке 12×1000 мм, заполненной гелем Тоуо-pearl HW-65 под давлением около 2 атм. Скорость элюции составляла 100 мл/ч/см<sup>2</sup>, элюирующим раствором служил раствор 8 М мочевины. Внешний объем колонки был равен 36 мл, внутренний — 55 мл. Для построения калибровочной кривой использовали наборы маркерных белков с диапазоном молекулярных масс от 15 до 220 кД («Serva», Merck). Перед хроматографией калибровочные белки, а также препараты миозина выдерживали в растворе 8 М мочевины в течение ночи при 4°C.

Ca<sup>2+</sup>-АТФазную активность полученных препаратов миозина определяли по накоплению неорганического фосфора [2] после инкубации в среде, содержащей 1 мг белка в 0,01 М трис-HCl pH 6,5, 0,3 М KCl, 0,01 М CaCl<sub>2</sub> и 4 мМ АТФ, и выражали в микромолях фосфора на 1 мг белка в 1 мин.

Кинетику гидролиза АТФ миозином исследовали в среде, содержащей 0,002 М трис-малат (pH 7,6), 0,3 М KCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub> [7, 8].

Статистическую обработку результатов проводили, используя распределение Стьюдента для малых выборок [3]. Данные выражали в виде  $\bar{X} \pm \sigma$ .

### Результаты и обсуждение

Из полученных результатов следует, что хроматографические свойства, характер спектров поглощения в УФ-области, электрофертическая подвижность, величина Ca<sup>2+</sup>-АТФазной активности полученного белкового препарата соответствовали аналогичным параметрам, ранее описанным для миозина [4].

При ионообменной хроматографии белка, выделенного из мышечной тка-

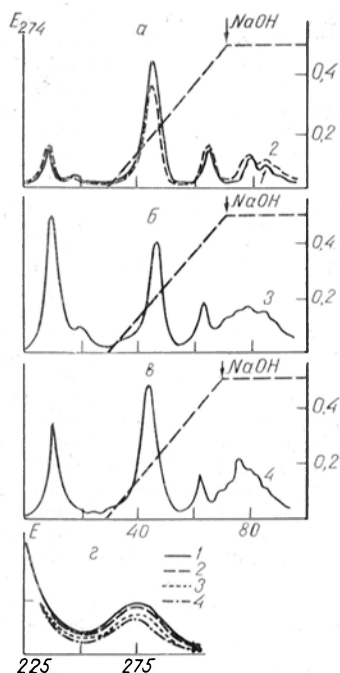


Рис. 1. Ионообменная хроматография (а—в) и спектры поглощения (г) препаратов миозина, полученных через разные сроки аутолиза. 1 — нормальная ткань; 2, 3 и 4 — соответственно 3, 12 и 24 ч аутолиза. По оси абсцисс: а—в — объем элюата (в мл); г — длина волны (в нм); по оси ординат слева — оптическая плотность, справа — молярность KCl (в М).

ни через разные сроки после смерти (рис. 1), наблюдалось распределение

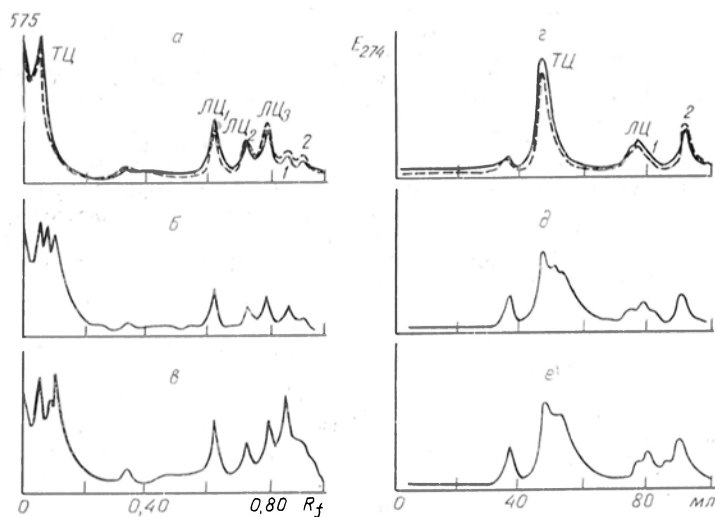


Рис. 2. Дисковый электрофорез в ПААГ с ДСН (а—в) и гелевая фильтрация в 8 М мочевице (г—е) препаратов миозина, полученных через разные сроки аутолиза.

а, г — нормальная ткань (1) и 3 ч аутолиза (2), б, д — 12 ч аутолиза, в, е — 24 ч аутолиза. ТЦ — тяжелые цепи миозина, ЛЦ — легкие цепи миозина. По оси абсцисс: а—в — относительное расстояние миграции; г—е — объем элюата (в мл); по оси ординат — оптическая плотность.

материала в целом, подобное распределению нативного миозина: несорбирующиеся на геле вещества; хорошо выраженный пик, соответствующий миозину, начинавший элюироваться с колонки при концентрации KCl 0,1—0,15 М; несколько примесных компонентов, в том числе фракция, содержащая нуклеиновые кислоты (по данным орциновой реакции и характеристикам спектров поглощения), элюирующаяся с колонки только при применении 0,5 М NaOH. В то же время соотношение различных компонентов в препарате миозина заметно менялось при увеличении времени аутолиза. Так, начиная с 12 ч после смерти в препаратах значительно увеличивалась доля несорбирующегося на колонке материала, который, по данным литературы [28], содержит, кроме примесных высокомолекулярных белков, некоторое количество агрегированного актомиозина и миозина. Можно предполагать, что увеличение доли таких агрегатов в течение первых суток после смерти связано с изменением способности миофибриллярных белков к ассоциации-диссоциации, которое наблюдается при развитии эффекта посмертного окоченения в мышеч-

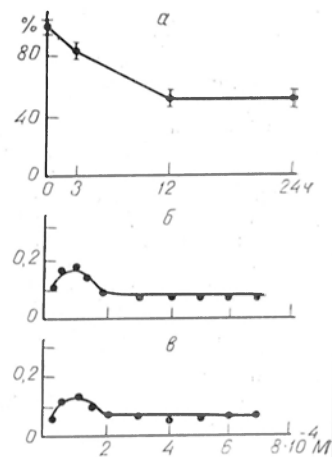


Рис. 3.  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазная активность миозина, полученного через разные сроки аутолиза.

а — активность миозина. По оси абсцисс: время аутолиза (в ч); по оси ординат —  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза (в %); б, в — кинетика гидролиза АТФ белком, полученным из нормальной ткани (б) и через 3 ч аутолиза (в). По оси абсцисс: концентрация АТФ (в М); по оси ординат: активность миозина (в мкмоль Р/мин на 1 мг белка).

ной ткани [30]. На всех сроках посмертного аутолиза материал, соответствующий миозину, элюировался при одних и тех же концентрациях KCl и имел сходные спектральные характеристики. При этом выход белка несколько снижался к 12 ч после смерти ( $3,15 \pm 0,40$  мг на 1 г ткани) по сравнению с нормальной тканью ( $4,35 \pm 0,35$ ), менялся в дальнейшем до 24 ч ( $3,48 \pm 0,21$  мг/г). Снижение выхода миозина через 3 ч аутолиза ( $3,89 \pm 0,34$  мг/г) не было статистически достоверным.

При дисковом электрофорезе препаратов миозина, полученных через разные сроки после гибели животных (рис. 2) не было обнаружено каких-либо изменений после 3 ч аутолиза. Применение в качестве денатурирующего агента мочевины с последующей гель-фильтрацией в 8 М мочеvine также не выявило существенных различий хроматографического поведения миозина из ткани через 3 ч после смерти животного по сравнению с нативным белком. В то же время при исследовании ферментных свойств миозина обнаружено незначительное, но статистически достоверное снижение  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазной активности белка на этом сроке аутолиза (рис. 3). По-видимому, изменение каталитических свойств миозина свидетельствует о начальных посмертных структурных нарушениях, причиной которых являются, возможно, химическая модификация некоторых активных групп, возникающая вследствие изменения кислотно-основных свойств, окислительно-восстановительного потенциала и т. д. на самых ранних этапах посмертного аутолиза мышечной ткани [11, 15, 22].

Как известно, при анализе кинетических свойств миозиновой АТФазы в ряде работ [7, 8] был обнаружен эффект «субстратного ингибирования», сохраняющийся при различных экспериментальных условиях, в том числе при модификации тиоловых групп фермента п-хлормеркурбензоатом. При более значительных структурных изменениях белка, заключающихся, например, в уменьшении степени спирализации, увеличении агрегации белка, отмеченный эффект не обнаруживался [8]. В связи с этим были изучены кинетические свойства  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы миозина из нативной и аутолизированной в течение 3 ч мышечной ткани. Пока-

зано, что наряду с уменьшением ферментной активности белка наблюдается сохранение эффекта «субстратного ингибирования» для миозина после 3 ч аутолиза. Таким образом, уменьшение  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазной активности без выраженной деградации белка является, по-видимому, наиболее ранним показателем аутолитических превращений миозина после смерти.

Дисковый электрофорез белка, полученного из мышечной ткани через 12 и 24 ч после смерти, выявил деградацию тяжелых цепей миозина, заключающуюся в появлении наряду с компонентом с мол. м.  $\sim 200\,000$  фрагментов с мол. м. 150 000 и 120 000 (см. рис. 2). При этом с увеличением времени аутолиза от 12 до 24 ч доля низкомолекулярных фрагментов возрастает. Положение и соотношение легких цепей миозина в тех же препаратах менялось незначительно.

Гель-фильтрация этих препаратов в 8 М мочеvine выявила в целом аналогичные изменения белка в процессе аутолиза. В связи с меньшей разрешающей способностью гель-фильтрации по сравнению с дисковым электрофорезом не удалось полностью разделить фрагменты тяжелых цепей миозина. Однако изменение при хроматографии формы пика, соответствующего тяжелым цепям, появление дополнительных фракций свидетельствовало о том, что и при использовании в качестве денатурирующего агента мочевины выявляется фрагментация белка, полученного из посмертно аутолизированной ткани.

Представленные результаты, свидетельствующие о фрагментации тяжелых цепей миозина в препаратах, полученных из аутолизированной ткани, не исключали возможность протеолиза белка в процессе его выделения из гомогената аутолизированной мышечной ткани, характеризующейся, как известно [6], повышенной активностью гидролитических ферментов. В связи с этим проводился контрольный дисковый электрофорез «лизатов» тех же образцов ткани, которые использовались для выделения миозина (рис. 4), выявивший аналогичный характер изменения белка в процессе посмертного аутолиза. Так, через 12 и 24 ч после смерти в «лизате», кроме компонентов, соответствующих тяжелым цепям миозина, также обнаруживались фракции

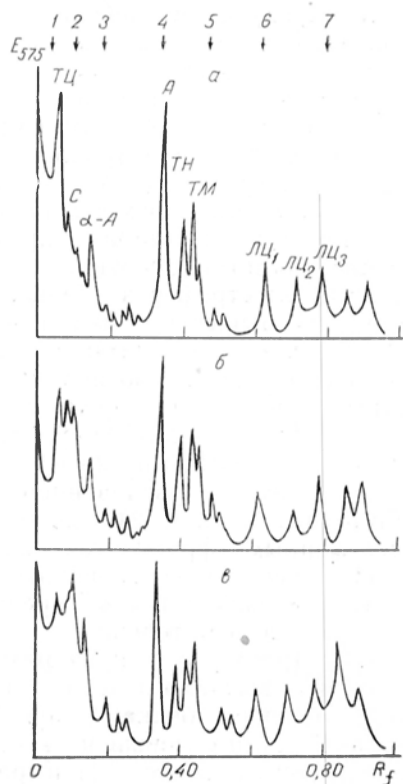


Рис. 4. Дисковый электрофорез в ПААГ с ДСН экстрактов мышечных белков, полученных через разные сроки аутолиза.

а — нормальная ткань, б — 12 ч аутолиза, в — 24 ч аутолиза, ТЦ — тяжелые и ЛЦ — легкие цепи миозина, С — С-белок, α-А — α-актинин, А — актин, ТН — тропонин, ТМ — тропомиозины. Стрелками указаны относительные расстояния миграции для калибровочных белков («Fluka»): 1 — мол. м. 224 000, 2 — мол. м. 112 000, 3 — мол. м. 71 500, 4 — мол. м. 42 900, 5 — мол. м. 28 600, 6 — 25 000, 7 — 17 000. По оси абсцисс — относительное расстояние миграции ( $R_f$ ); по оси ординат — оптическая плотность.

с мол. м.  $\sim 150\,000$  и  $120\,000$ . Следует подчеркнуть, что при этом не отмечалось каких-либо различий в электрофоретической подвижности фракций, соответствующих актину.

Таким образом, по-видимому, одним из самых существенных структурных изменений белков мышечной ткани в процессе посмертного аутолиза является деградация тяжелых цепей миозина. Следует отметить, что немногочисленные данные, имеющиеся по этому вопросу в литературе, довольно разноречивы. Так, если, по мнению ряда авторов [17, 29], посмертный аутолиз, деградация миофибрилл сопровождаются уменьшением содержания тяжелых цепей миозина, появлением фрагментов с мол. м.  $\sim 150\,000$  [29], то, по другим данным [30], из-

менения соотношения миозина и актина при хранении образцов мышечной ткани в азиде натрия при  $10^\circ\text{C}$  не обнаруживается до 10 сут после смерти [30]. Возможно, получение столь разных результатов связано с различиями в условиях хранения материала, в частности температурных, которые, как известно [25], существенно влияют на характер аутолитических процессов.

Многочисленные исследования действия протеолитических ферментов на миозин *in vitro* позволили установить наличие в белке участка, особенно чувствительного к протеолизу и расположенного в середине стержня миозиновой молекулы [14, 20, 21]. Гидролиз этого участка приводит к образованию тяжелого и легкого меромиозинов (ТММ и ЛММ соответственно), представляющих собой димеры с мол. м.  $340\,000$ — $360\,000$  и  $140\,000$ — $160\,000$  соответственно [4]. Сравнивая молекулярную массу фрагментов миозина, полученных из посмертно аутолизированной мышечной ткани, с молекулярной массой ТММ и ЛМ, можно предполагать, что и в этом случае протеолиз в первую очередь затрагивает тот же участок молекулы белка. В пользу этого предположения свидетельствуют также крайне незначительные изменения соотношения легких цепей миозина. Отсутствие в препаратах миозина, полученных из аутолизированной ткани, фрагментов, соответствующих по молекулярной массе ЛММ, может быть связано с дальнейшим протеолизом этого белка [12] и появлением более низкомолекулярных фрагментов, не выявляемых при анализе. Однако указанное предположение о соответствии ТММ фрагментам миозина с мол. м.  $150\,000$  и  $120\,000$ , образующимся в процессе посмертного аутолиза мышечной ткани, нуждается в дальнейшем более детальном изучении.

Исследование  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазной активности миозина, полученного из аутолизированной мышечной ткани, показало ее снижение к 12 ч после смерти (см. рис. 3). Как известно, протеолиз миозина и образование ТММ не приводят к уменьшению его АТФазной активности, рассчитанной на 1 мг белка [4]. В связи с этим снижение  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазной активности, обнаруженное в работе, свидетельствует, по-видимому,



о том, что, кроме фрагментации, белок претерпевает и существенные конформационные изменения или химические модификации, затрагивающие активные центры. Это предположение хорошо согласуется с результатами, указывающими на снижение ферментной активности миозина без выраженной его фрагментации через 3 ч посмертного аутолиза. Увеличение времени хранения тушек животных после гибели до 24 ч практически не вызвало дальнейшего изменения уровня ферментативной активности миозина и не влияло на его выход из тканей. Возможно, это связано с замедлением аутолитических процессов, наблюдаемых в мышцах в период трупного окоченения, наступающего в это время [5].

Таким образом, в процессе посмертного аутолиза происходят изменения как ферментативных, так и структурных свойств миозина, одного из основных белков мышечной ткани. При этом на самых ранних этапах обнаружено уменьшение  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазной активности белка, не сопровождающееся выраженным нарушением структуры биополимера. В дальнейшем, в течение первых суток после гибели животного, обнаруживается фрагментация миозина с одновременной утратой его ферментативных свойств.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Белоусов А. А. Ультраструктура поперечнополосатых мышц при аутолизе в условиях протеолиза: Дис. ... канд. мед. наук. — М., 1969.
2. Иванов И. И., Юрьев В. А. Биохимия и патобиохимия мышц. — Л., 1961.
3. Лакин Г. Ф. Биометрия. — М., 1980.
4. Левицкий Д. И. // Успехи биол. химии. — 1986. — Т. 27. — С. 74.
5. Павловский В. И., Симбирева Е. И. // Прикладная биохимия. — 1975. — Т. 11. — С. 414.
6. Петушкова Е. В., Власова Т. И. // Биохимия. — 1973. — Т. 38. — С. 1144.
7. Петушкова Е. В., Власова Т. И. // Там же. — 1976. — Т. 41. — С. 1968.
8. Хорошков Ю. А. // Арх. анат. — 1975. — № 7. — С. 67.
9. Шелудько Н. С. // Цитология. — 1975. — Т. 17. — С. 1148.
10. Шумаков В. И., Штенгольд Е. Ш., Онищенко Н. А. Консервация органов. — М., 1975.
11. Akutagawa T., Ooi T. // J. Biochem. (Tokyo). — 1982. — Vol. 92. — P. 999.
12. Ando S., Hanato M. // Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. — 1986. — Vol. 52. — P. 1237.
13. Assulin O., Borejdo J. // J. Muscle Res. — 1986. — Vol. 7. — P. 167.
14. Briskey E. J. // Advanc. Food Res. — 1964. — Vol. 13. — P. 89.
15. Casseus R. G., Briskey E. J., Hockstra W. J. // J. Food Sci. — 1963. — Vol. 28. — P. 680.
16. Chuaqui B., Carrido J. // Virchows Arch. — 1982. — Bd A297. — S. 149.
17. David H., David S. // Acta biol. med. germ. — 1965. — Bd 14. — S. 423.
18. Decker R. S., Pool A. R. // J. molec. cell. Cardiol. — 1979. — Vol. 11. — P. 189.
19. Frenette G., Dube J. Y., Tremblau R. R. // Int. J. Biochem. — 1986. — Vol. 18. — P. 697.
20. Ikebe M., Hartshorne D. J. // Biochemistry (Wash.). — 1986. — Vol. 25. — P. 6177.
21. Khan A. W., van den Berg L. // J. Food Sci. — 1964. — Vol. 29. — P. 597.
22. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265.
23. Mitchell E. J., Jakes R., Kendrick J. J. // Europ. J. Biochem. — 1986. — Vol. 161. — P. 25.
24. Newbold R. P. // The Physiology and Biochemistry of Muscle as a Food. — New York, 1966. — P. 213.
25. L. Farrell P. H. // J. biol. Chem. — 1975. — Vol. 250. — P. 4007.
26. Perry J. // Meth. Enzymol. — 1955. — Vol. 2. — P. 582.
27. Richardson E. G., Chung C-S., Menzel D. B., Olcott H. S. // Biochemistry (Wash.). — 1967. — Vol. 6. — P. 582.
28. Seki N., Watanabe T. // Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. — 1982. — Vol. 48. — P. 517.
29. Takahashi K., Nakomura F., Inoue A. // J. Biochem. (Tokyo). — 1981. — Vol. 89. — P. 321.

Поступила 26.05.87

#### STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ALTERATIONS IN RAT SKELETAL MUSCLE MYOSIN DURING POSTMORTAL AUTOLYSIS

Z. K. Nikitina, L. B. Rebrov

Research Laboratory of Biological Structures,  
Ministry of Public Health of the USSR,  
Moscow

Structure and enzymatic properties of myosin were studied in rat skeletal muscles during various periods of postmortal autolysis.  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity of the protein was decreased within 3 hrs after death. At the same time, the structure of myosin, as shown by gel filtration in 8 M urea and disc electrophoresis in SDS polyacrylamide gel, was maintained. The phenomenon of "substrate inhibition" exhibited both native myosin and the protein isolated from the autolyzed muscle tissue. Enzymatic activity of myosin was markedly decreased within 12 hrs and 24 hrs after death. Degradation of the protein heavy chains was also observed.

Д. А. Бабарыкин, Э. Х. Смитниекс, М. Ю. Валиниесе, В. К. Бауман

# 24,25-ДИГИДРОКСИВИТАМИН $D_3$ МОДУЛИРУЕТ ДЕЙСТВИЕ $1\alpha$ -ГИДРОКСИВИТАМИНА $D_3$ НА СОЗРЕВАНИЕ В-ЛИМФОЦИТОВ У ЦЫПЛЯТ

Рижский медицинский институт, Институт биологии АН Латвийской ССР, Саласпилс

Классические кальцитропные эффекты витамина D на уровне органов-мишеней (кишечника, костной ткани, почек) вызываются гормональной формой этого витамина — 1,25-дигидроксивитамином  $D_3$  [ $1,25(OH)_2D_3$ ]. Последний образуется из 25-гидроксивитамина  $D_3$  [ $25(OH)D_3$ ], синтезирующегося из холекальциферола в печени [8].

Кроме перечисленных, в крови выявляется целый спектр других метаболитов витамина D, из которых основным в количественном отношении является 24,25-дигидроксивитамин  $D_3$  [ $24,25(OH)_2D_3$ ]. Функции этого метаболита остаются неясными. Наличие рецепторов  $1,25(OH)_2D_3$  в органах, не связанных с минеральным обменом, навело на мысль, что функции гормональной формы холекальциферола в организме могут быть более широкими, чем предполагалось до недавнего времени. В частности, указанные рецепторы выявлены у моноцитов-макрофагов, активированных Т- и В-лимфоцитов [7]. Показана роль стероида в продукции «гормонов» иммунной системы, как интерлейкины и интерфероны [5]. В настоящее время  $1,25(OH)_2D_3$  относят к иммунорегулирующим гормонам [12].

$1,25(OH)_2D_3$  принадлежит важная роль в созревании Т-лимфоцитов, хотя механизм этого эффекта мало изучен [6]. В отношении В-лимфоцитов вопрос изучен в еще меньшей степени. Имеющиеся на этот счет немногочисленные данные свидетельствуют о важной роли витамина D в продукции лимфоцитов в сумке Фабрициуса у птиц [3]. Следует подчеркнуть, что большинство исследований иммунотропных эффектов метаболитов витамина D проводились на культурах клеток.

Внедрение в клиническую практику аналогов витамина D в качестве лекарственных средств для коррекции фосфорно-кальциевого обмена обусловило актуальность изучения действия

этих соединений на иммунную систему.

Цель настоящей работы заключалась в оценке влияния 24,25( $OH$ ) $_2D_3$  и синтетического аналога гормональной формы витамина  $D_3$  —  $1\alpha$ -гидроксивитамина  $D_3$  [ $1\alpha(OH)D_3$ ], превращающегося в печени в  $1,25(OH)_2D_3$ , на показатели обмена кальция и созревание В-лимфоцитов *in vivo* у цыплят.

## Методика

Эксперименты проводили на петухах породы хайсекс белый кросс, выращенных на рационе, дефицитном по витамину D, но содержащем все другие компоненты в пределах нормы. Этот рацион содержал 0,85% кальция и 0,64% фосфора (группа 1). С 10-дневного возраста методом аналогов птиц разделили на 13 групп по 15 голов в каждой. Цыплятам 2—13-й группы вводили витамин  $D_3$  или его аналоги, в отдельности или в сочетаниях, перорально, в дозах, указанных в табл. 1. В 4-недельном возрасте птиц взвешивали, декапитировали.

Показатели минерального обмена определяли у 7 птиц из группы. При этом в сыворотке крови определяли содержание кальция с помощью атомно-абсорбционной спектроскопии. В слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки определяли содержание специфического витамина D-зависимого кальцийсвязывающего белка (CaCB) методом радиальной иммунодиффузии [1]. Кроме того, определяли относительную массу паращитовидных желез, зольность высушенной и обезжиренной большеберцовой кости, массу сумки Фабрициуса.

Сумки Фабрициуса от 3 птиц каждой группы перерезали в поперечном направлении, готовили по 6 отпечатков таким образом, чтобы в препарат попали клетки всех слоев сумки. По 3 отпечатка фиксировали в смеси абсолютный этанол — этиловый эфир (1:1), проводили через растворы этанола (80—70—50%), дистиллированную воду, 1% раствор уксусной кислоты, дистиллированную воду. Флюорохромирование проводили в растворе акридинового оранжевого (1:10 000) на  $1/15$  М фосфатном буфере pH 6,0 в течение 3 мин с последующей промывкой в том же буфере. С помощью люминесцентной микроскопии дифференцировали 500 клеток препарата.

Три других отпечатка каждой сумки фиксировали метанолом, окрашивали азур-эозиновой смесью и также дифференцировали по 500 клеток. Итоговый результат подсчитывали как среднее количество клеток на 1000 кле-

Действие аналогов витамина D<sub>3</sub> на массу тела и биохимические показатели цыплят

№ группы животных	Доза, нмоль/сут	Живая масса, г	Кальций сыворотки крови, ммоль/л	Зольность большеберцовой кости, %	СаСБ слизистой кишечника, мкг на 1 г белка	Относительная масса парацитовидных желез, мг на 100 г массы тела
D-авитаминоз						
1	—	141,4±7,2	1,94±0,06	26,53±0,98	—	4,82
Введение 1α(OH)D <sub>3</sub>						
2	0,16	194,8±7,4	2,95±0,04	37,90±0,90	31,80±2,61	0,90
3	0,65	193,9±8,6	3,06±0,03	40,88±0,55	47,16±1,07	0,81
4	1,30	178,6±8,9	3,18±0,06	38,01±0,50	52,56±0,89	0,71
Введение 24,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>						
5	0,16	149,8±4,9	1,99±0,13	27,04±0,58	8,42±1,45	4,05
6	0,65	159,7±4,1	2,24±0,07	31,86±0,37	17,51±2,01	4,29
7	1,30	193,1±6,4	2,82±0,06	36,26±1,53	28,48±0,79	2,35
Введение 1α(OH)D <sub>3</sub> +24,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>						
8	0,16+0,16	201,5±7,5	2,89±0,10	41,63±0,88	45,45±0,67	0,85
9	0,65+0,16	198,1±9,6	3,08±0,06	40,45±0,13	46,55±1,70	0,90
10	0,65+0,65	201,3±6,7	2,84±0,07	40,52±0,47	46,03±2,88	0,87
11	0,65+1,30	200,7±7,7	2,78±0,09	40,56±0,57	46,42±2,60	0,96
12	1,30+1,30	180,5±7,9	2,76±0,06	37,97±0,35	50,13±1,01	0,88
Введение D <sub>3</sub>						
13	0,65	201,8±7,9	2,83±0,06	40,90±0,05	46,32±1,87	0,71

ток препарата каждой сумки и для группы в целом.

## Результаты и обсуждение

Полученные данные, обобщенные в табл. 1, свидетельствуют, что у птиц 1-й группы развился глубокий D-авитаминоз, проявившийся отставанием роста, гипокальциемией, сниженной минерализацией кости, отсутствием в слизистой кишечника СаСБ. Введение птицам витамина D<sub>3</sub> в дозе, обеспечивающей суточную потребность, резко изменило данные показатели (13-я группа, норма).

Под действием 0,16 нмоль 1α(OH)D<sub>3</sub> концентрация кальция в сыворотке крови достигла нормального уровня. Дальнейшее повышение дозы стероида привело к еще большему приближению всех показателей к уровню 13-й группы. Однако характерная для птиц 3-й группы гиперкальциемия свидетельствовала о первых признаках токсического действия 0,65 нмоль 1α(OH)D<sub>3</sub>. Последний в токсической дозе (1,30 нмоль) вызвал

гиперкальциемию, понижение зольности кости, подавление роста. Нарастание синтеза СаСБ, участвующего в транспорте кальция, происходило, несмотря на гиперкальциемию. Таким образом, при введении 1α(OH)D<sub>3</sub> в токсической дозе в качестве единственного источника витамина D организм животных лишался возможности регулировать всасывание кальция в кишечнике адекватно своим потребностям.

Антирахитическая активность 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> была существенно ниже, чем у прочих изученных соединений (примерно в 10 раз ниже, чем у 1α(OH)D<sub>3</sub>). Токсических эффектов в использованном диапазоне доз 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> не наблюдалось.

Представлялось логичным предположить, что совместное введение цыплятам 1α(OH)D<sub>3</sub> и 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> позволит в большей степени воспроизвести характер витамин D-зависимых процессов, происходящих в интактном организме, чем при использовании каждого из аналогов в отдельности. Полу-

Действие аналогов витамина D<sub>3</sub> на созревание лимфоцитов сумки Фабрициуса у цыплят

Группа животных	Доза, нмоль/сут	Лимфобла- сты, %	Пролимфо- циты, %	Зрелые лимфоциты (большие + средние), %	Малые лимфоциты, %	Относительная масса сумки Фабрициуса, г на 100 г массы тела
<b>D-авитаминоз</b>						
1	—	20	13	55	12	0,28±0,02
<b>Введение 1α(OH)D<sub>3</sub></b>						
2	0,16	10	24	48	18	0,34±0,09
3	0,65	13	16	61	10	0,42±0,02
4	1,30	13	18	57	12	0,45±0,04
<b>Введение 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub></b>						
5	0,16	13	19	52	16	0,33±0,03
6	0,65	12	16	54	18	0,31±0,03
7	1,30	8	18	53	21	0,37±0,03
<b>Введение 1α(OH)D<sub>3</sub>+24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub></b>						
8	0,16+0,16	2	6	55	37	0,37±0,05
9	0,65+0,16	13	18	46	23	0,36±0,03
10	0,65+0,65	8	13	45	34	0,38±0,03
11	0,65+1,30	4	7	47	42	0,35±0,03
12	1,30+1,30	2	4	44	50	0,38±0,04
<b>Введение D<sub>3</sub></b>						
13	0,65	3	2	40	55	0,37±0,01

ченные результаты подтвердили наши прежние данные [2] и данные других авторов [8] об эффективности совместного введения 1α25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> и 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Однако уровень изученных показателей определялся абсолютными величинами и соотношениями доз препаратов. 1α(OH)D<sub>3</sub> в сочетании с 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> в минимальных дозах (1 : 1) дали эффект практически такой же, как 0,65 нмоль витамина D<sub>3</sub>. Повышение дозы 1α(OH)D<sub>3</sub> при том же уровне 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (4 : 1, группа 9) вызвало гиперкальциемию, которая устранялась дальнейшим повышением дозы последнего. Иными словами, наблюдалось ослабление с помощью 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> токсического действия 1α(OH)D<sub>3</sub>.

Максимальная доза 1α(OH)D<sub>3</sub> в сочетании с таковой 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (12-я группа) оказала токсическое действие (снижение зольности кости, массы тела), однако в отличие от 4-й группы гиперкальциемия не развивалась.

D-витаминный статус оказал существенное влияние на относительную массу сумки Фабрициуса (табл. 2). Этот показатель для цыплят с рахитом составил 75 % от нормы. 1α(OH)D<sub>3</sub> в дозах 0,65 и 1,30 нмоль вызвал ложную гипертрофию сумки, 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> способствовал нормали-

зации массы сумки, а в сочетании с 1α(OH)D<sub>3</sub> ослаблял способность высоких доз последнего стимулировать гипертрофию органа.

В отличие от массы динамика цитологической картины сумки Фабрициуса была более сложной. Рахит характеризовался задержкой созревания лимфоцитов на стадии лимфобластов, количество которых почти в 7 раз превышало уровень у птиц, получавших витамин D<sub>3</sub>. Низкая доза 1α(OH)D<sub>3</sub> стимулировала повышение числа малых лимфоцитов, не достигшего, однако, уровня нормы (13-я группа). При этом число пролимфоцитов было максимальным по сравнению с другими группами. Повышение дозы 1α(OH)D<sub>3</sub> до субтоксической и токсической вызвало снижение числа малых лимфоцитов на фоне ложной гипертрофии сумки.

Действие 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> на созревание В-лимфоцитов также зависело от дозы, причем введение 1,3 нмоль 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> оказывало большее влияние, чем 1α(OH)D<sub>3</sub> в наиболее эффективной дозе — 0,16 нмоль. Можно также отметить, что использованные дозы 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> не вызывали токсического действия.

Наибольший интерес представляют данные о совместном введении анало-

гов витамина  $D_3$  на соотношения лимфоцитов, находящихся на различных стадиях созревания. В целом можно сказать, что характер влияния комбинаций стероидов на созревание лимфоцитов был аналогичным тому, что наблюдалось в отношении показателей минерального обмена. Так, выявлено потенцирование действия минимальных доз препаратов. Сравнение 8-й и 9-й групп свидетельствует, что субтоксическая доза  $1\alpha(OH)D_3$  ( $0,65$  нмоль) приводит к торможению созревания клеток на стадии лимфобластов и пролимфоцитов, а  $24,25(OH)_2D_3$  даже в малой дозе ослабляет этот эффект (группы 3-я и 9-я). Особенно наглядно эта способность  $24,25(OH)_2D_3$  проявилась при использовании препарата в максимальной дозе.

В доступной литературе мы не встретили данных о влиянии аналогов витамина D на созревание В-лимфоцитов. Имеющиеся немногочисленные сообщения в большей мере касаются вопросов влияния метаболитов холекальциферола на функции В-лимфоцитов человека *in vitro*. Показано, что  $1,25(OH)_2D_3$  угнетает вызванную митогеном лаконоса активацию В-клеток [11], подавляет в отличие от  $24,25(OH)_2D_3$  пролиферацию, предшествующую их превращению в клетки, секретирующие иммуноглобулины [4]. Однако остается неясным, как соотносятся рассматриваемые эффекты *in vitro* и *in vivo*. Исследования на крысах с различными моделями иммунопатий *in vivo* показали, что  $1,25(OH)_2D_3$  и  $1\alpha(OH)D_3$  восстанавливают способность лимфоцитов активироваться митогенами, стимулируют пролиферацию и дифференцировку В-лимфоцитов до достижения оптимального иммунного ответа.

Более детального изучения требует вопрос о том, какие факторы в наших экспериментах имели решающее значение в процессе созревания лимфоцитов. Определенное значение в этом могло принадлежать полипептидным кальцитропным гормонам — кальцитонину и паратгормону [10]. Паращитовидные железы играют ведущую роль в транзитном повышении кальциемии, которая является одним из звеньев цепи событий, связывающих действие антигена с пролиферацией клеток в лимфоидных тканях [9]. Как видно из табл. 1, относительная мас-

са паращитовидных желез существенно зависела от D-витаминного статуса организма цыплят. Однако непосредственному действию метаболитов витамина D на В-лимфоциты, видимо, принадлежит основная роль. Об этом свидетельствует экспрессия рецепторного белка к  $1,25(OH)_2D_3$  у В-лимфоцитов [7].

Важно подчеркнуть, что иммунотропной активностью обладает не только гормональная форма витамина  $D_3$ . Способность  $24,25(OH)_2D_3$  модулировать действие 1-ОН-derivата витамина D на иммунную систему показана нами впервые. Как отмечалось выше, для оптимальной регуляции минерального обмена в организме необходимо совместное действие по крайней мере двух основных дигидроксильированных метаболитов холекальциферола. Аналогичный вывод можно сделать в отношении действия последних и на иммунную систему. Эти факты свидетельствуют об универсальном характере подобных взаимоотношений  $1,25(OH)_2D_3$  и  $24,25(OH)_2D_3$  для различных систем организма. Материальным субстратом такого взаимодействия может быть конкуренция (взаимодействие) обоих метаболитов на уровне рецептора. Сообщается, что  $24,25(OH)_2D_3$  является аллостерическим эффектором связывания  $1,25(OH)_2D_3$  с рецептором в кишечном эпителии [13].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о важной роли двух основных метаболитов витамина D в созревании В-лимфоцитов, что является еще одним подтверждением тесной связи между функциями систем регуляции обмена кальция и иммунитета.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бабарыкин Д. А., Валинец М. Ю., Бауман В. К. // *Вопр. мед. химии*. — 1978. — № 6. — С. 847—850.
2. Бабарыкин Д. А., Бауман В. К., Валинец М. Ю., Розенталь Р. Л. // *Хим.-фарм. журн.* — 1982. — № 3. — С. 19—23.
3. Векслер Х. М., Ремез И. М., Стржежа И. К. и др. // *Научные основы витаминного питания сельскохозяйственных животных*. — Юрмала, 1987. — С. 61—63.
4. Iho S., Takahashi T., Kura F. et al. // *J. Immunol.* — 1986. — Vol. 136. — P. 4427—4431.
5. Manolagas S. C., Deftos L. J. // *Ann. intern. Med.* — 1984. — Vol. 100. — P. 144—147.

6. Manolagas S. C. // Vitamin D: Chemical, Biochemical and Clinical Update. — Berlin, 1985. — P. 199—208.
7. Merke J., Senst S., Ritz E. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1984. — Vol. 120. — P. 199—205.
8. Norman A. W., Henry H. L., Malluche H. H. // Life Sci. — 1980. — Vol. 27. — P. 229—237.
9. Perris A. D., Edwards D. J., Atkinson M. J. // J. Endocr. — 1984. — Vol. 102. — P. 257—263.
10. Perris H. M., Chappel J. C., Bellorin-Font E. et al. // J. biol. Chem. — 1984. — Vol. 259. — P. 5531—5535.
11. Shiozuwa K., Shiozuwa S., Shimizu S. et al. // Immunology. — 1985. — Vol. 56. — P. 161—167.
12. Tsoukas C. D., Provvedini D. M., Manolagas S. C. // Science. — 1984. — Vol. 224. — P. 1438—1440.
13. Wilhelm F., Ross F. P., Norman A. W. // Vitamin D: Chemical, Biochemical and Clinical Update. — Berlin, 1985. — P. 129—130.

Поступила 29.05.87

## 24,25-DIHYDROXY VITAMIN D<sub>3</sub> MODULATES THE EFFECT OF 1 $\alpha$ -HYDROXY VITAMIN D<sub>3</sub> ON MATURATION OF B LYMPHOCYTES IN CHICKEN

D. A. Babarykin, E. Kh. Smiltnieks, M. Yu. Valinietse, V. K. Bauman

Medical School, Riga

Patterns of calcium metabolism and maturation of lymphocytes in chicken Fabricius bursa were studied in presence of various doses of 1 $\alpha$ -hydroxy vitamin D<sub>3</sub> and 24,25-dihydroxy vitamin D<sub>3</sub> administered separately and at various combinations. 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> was distinctly less effective in the antirickets activity as compared with 1 $\alpha$ (OH)D<sub>3</sub>. A decrease in mass of Fabricius bursa and inhibition of lymphocytes maturation within early steps were observed in the birds with rickets. A toxic dose of 1 $\alpha$ (OH)D<sub>3</sub> caused pseudohypertrophy of Fabricius bursa. Small doses of these drugs administered simultaneously exhibited higher effect both on rickets and on stimulation of B lymphocytes maturation. 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> attenuated the negative effect of either subtoxic (0.65 nmol/day) or toxic (1.3 nmol/day) doses of 1 $\alpha$ (OH)D<sub>3</sub> on an increase in body mass, calcemia, ash content of bones, content of small lymphocytes in Fabricius bursa.

УДК 616.98:578].092.9-07:616.153.915-39]-02:[615.373:578.245+615.356:577.161.3

А. А. Ананенко, В. В. Малиновская, А. И. Клембовский,  
Л. Н. Политова, Н. Г. Перцева, В. И. Зверева, Н. А. Федюшкина

## ПРОЦЕССЫ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ И ВЛИЯНИЕ НА НИХ ИНТЕРФЕРОНОВ И $\alpha$ -ТОКОФЕРОЛА

НИИ педиатрии и детской хирургии Минздрава РСФСР, Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР, Москва

Ранее нами было установлено, что в патогенезе экспериментальной вирусной инфекции определенную роль играет интенсификация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и снижение антиоксидантной защиты (АОЗ) [4].

Задачей настоящего исследования явилась разработка вопросов АОЗ при экспериментальной вирусной инфекции. При этом были использованы два подхода — применение противовирусного препарата интерферона и антиоксиданта  $\alpha$ -токоферола. Мы полагаем, что применение интерферона приведет к ослаблению вирусной инфекции, а следовательно, к снижению интенсификации ПОЛ и повышению АОЗ, тем более что нами установлена взаимосвязь между процессами интерфероногенеза и ПОЛ [3]. В качестве препарата, оказывающего непо-

средственное антиоксидантное действие, мы использовали  $\alpha$ -токоферол.

### Методика

Модель вирусной инфекции воспроизводили на беспородных белых мышах массой 5—6 г. Инфицирование животных проводили высокопатогенным для мышей вирусом гриппа А (A/Aichi 168(H3N2)).

О состоянии системы ПОЛ — антиоксиданты судили по содержанию малонового диальдегида (МДА), который определяли в садке липопротеидов плазмы крови [10], в эритроцитах после инициации в них ПОЛ перекисью водорода [1], в гомогенатах тканей (легкие, печень, почки) после воздействия на них УФ-облучением. В гомогенатах тканей определяли также общие липиды [8] и содержание диеновых конъюгатов (ДК) [6]. Одновременно проводили оценку общей антиоксидантной активности (АОА) плазмы крови путем определения ее ингибирующего действия на свободнорадикальное окисление липидов мембран эритроцитов [5].



Исследования проводили на 3-и сутки — в период разгара вирусной инфекции, а также на 7-е сутки — в период репарации.

Титр вируса в легочной ткани инфицированных мышей оценивали по реакции агглютинации эритроцитов. Об эффективности применяемых препаратов судили на основании снижения летальности животных, динамики массы тела, легочно-соматического коэффициента, лейкоцитоза.

Влияние интерферона на процессы ПОЛ исследовали на двух группах мышей с вирусной инфекцией. Животным одной группы интерферон вводили интраназально в дозе 1600 ед., профилактически в течение 2 сут перед инфицированием. Животным другой группы после профилактического введения интерферона и последующего инфицирования вводили  $\alpha$ -токоферол из расчета 10 мг на 1 кг массы (внутримышечно) в течение 3 сут. В эксперименте использовали интерферон различного происхождения: синтезированный *in vivo* клетками крови половозрелых животных (индуктор — вирус болезни Ньюкасла) и синтезированный в культурах кожно-мышечных фибробластов половозрелых и новорожденных животных в присутствии сыворотки крови мышей соответствующего возраста.

Интерферон, синтезированный *in vivo*, использовали в работе в качестве нативного препарата. Интерфероны, продуцированные в системе клеток взрослых и новорожденных животных, затем очищали по белку в 100 раз с помощью высокопористого стекла (100—120 меш) [2].

## Результаты и обсуждение

При профилактическом введении интерферона мыши легче переносили

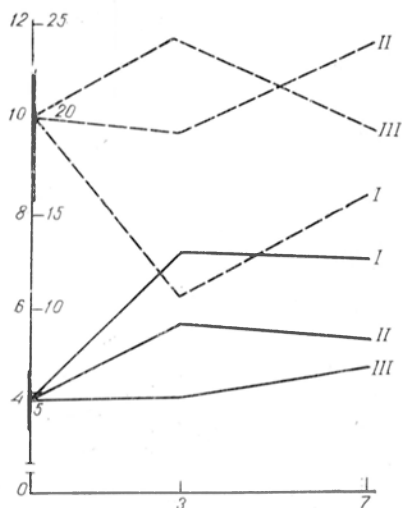


Рис. 1. Влияние нативного интерферона и  $\alpha$ -токоферола на уровень МДА (сплошные линии) и ЛОА (штриховые линии) плазмы крови мышей с вирусной инфекцией.

По оси абсцисс — срок болезни (в сут); по оси ординат: слева — уровень МДА (в нмоль/л); справа — ЛОА (в %). Здесь и на рис. 2 и 3: I — животные с вирусной инфекцией; II — животные с вирусной инфекцией, получавшие интерферон; III — животные с вирусной инфекцией, получавшие интерферон и  $\alpha$ -токоферол.

вирусную инфекцию. Введение нативного интерферона и интерферона новорожденных животных способствовало снижению титра вируса в 2,5 раза. При профилактическом введении мышам интерферона взрослых животных антивирусное действие усиливалось в 5 раз. При сочетанном применении интерферона и  $\alpha$ -токоферола титр вируса в легочной ткани еще более снижался независимо от вида ранее примененного интерферона. Летальность мышей при профилактическом введении интерферона различного возрастного происхождения составила от 20 до 30 %, причем наименьший процент летальности наблюдался при сочетании интерферона и  $\alpha$ -токоферола.

При морфологическом исследовании легочной ткани животных, которым вводили интерферон, выявлено сравнительно слабое развитие воспалительной реакции; еще более положительный эффект обнаружен при дополнительном введении мышам  $\alpha$ -токоферола.

Интерфероны оказывали также влияние на процессы ПОЛ и АОЗ. Наиболее существенные изменения установлены в плазме и гомогенате ткани печени. На рис. 1 представлены данные о влиянии нативного интерферона на показатели системы ПОЛ — АОЗ. При профилактическом его введении мышам с вирусной инфекцией на 3-и сутки отмечалось менее выраженное накопление МДА в плазме крови ( $5,95 \text{ мкМ/л}$  против  $7,5 \pm 0,2 \text{ мкМ/л}$  при вирусной инфекции без введения интерферона) и повышение общей АОА плазмы (соответственно  $20 \pm 0,5 \%$  против  $11,6 \pm 0,25 \%$ ). При этом одновременно повышалась устойчивость ткани печени к инициации ПОЛ: МДА снижался с  $132 \pm 3$  до  $116 \pm 2,4$  нмоль на 1 мг белка ткани. Однако содержание ДК при первоначальной (3-и сутки) положительной реакции ( $13,6 \pm 1,5$  против  $24,0 \pm 1,8$  нмоль на 1 мг липидов) к 7-м суткам вновь повышалось до  $17,2 \pm 1,9$  нмоль на 1 мг липидов.

Поскольку введение интерферона не вызывало нормализации показателей процессов ПОЛ, мы применили комбинацию нативного интерферона и  $\alpha$ -токоферола. Это способствовало нормализации уровня МДА плазмы

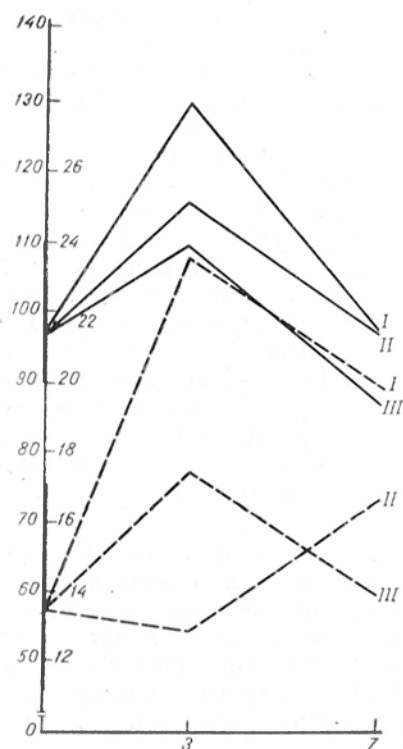


Рис. 2. Влияние нативного интерферона и  $\alpha$ -токоферола на содержание МДА (сплошные линии) и ДК (штриховые линии) в ткани печени мышей с вирусной инфекцией.

По оси абсцисс — срок болезни (в сут); по оси ординат — содержание МДА (слева) и ДК (справа) в наномолях на 1 мг липидов.

крови и стабилизации ее АОА, повышению устойчивости ткани печени к усилению ПОЛ при иницировании его УФ-облучением, снижению уровня ДК до нормы (рис. 2).

Таким образом, сочетанное применение интерферона и  $\alpha$ -токоферола можно считать оправданным, так как оно обеспечивало более благоприятное течение вирусной инфекции, снижение летальности животных и стабилизацию процессов ПОЛ и АОЗ.

Применение частично очищенных интерферонов (взрослых и новорожденных животных) оказывало аналогичное действие на содержание МДА в плазме и перекисный гемолиз эритроцитов, как и при введении нативного интерферона. Вместе с тем устойчивость легочной ткани к инициации ПОЛ под действием УФ-облучения была ниже, чем при введении нативного интерферона. Однако АОА при введении интерферона новорожденных оказалась значительно ниже

( $13 \pm 0,52\%$ ), чем при введении нативного интерферона и интерферона взрослых (соответственно 20 и 18% при норме 17,4%).

Кроме того, проокислительное действие интерферона новорожденных животных в отличие от влияния нативного интерферона и интерферона взрослых животных проявлялось снижением устойчивости ткани почек к УФ-облучению (уровень МДА  $82,5 \pm \pm 2,5$  нмоль на 1 мг белка против 62 и 66,4 нмоль на 1 мг белка) и повышением уровня ДК ( $25,8 \pm 0,5$  нмоль на 1 мг липидов против 17,2 и 17,3 нмоль на 1 мг липидов; рис. 3). Морфологически при этом в почечной ткани было обнаружено образование единичных кальцификатов.

Сочетанное введение интерферона новорожденных и  $\alpha$ -токоферола снимало побочные явления: снижало содержание ДК, повышало устойчивость ткани почек к инициации ПОЛ и АОА плазмы крови, предотвращало развитие морфологических изменений в почках.

Проведенные исследования показали, что интерферон оказывает профилактическое действие, препятствуя развитию вирусной инфекции, что подтверждается и морфологическими исследованиями. Одновременно наблюдаются менее выраженные сдвиги

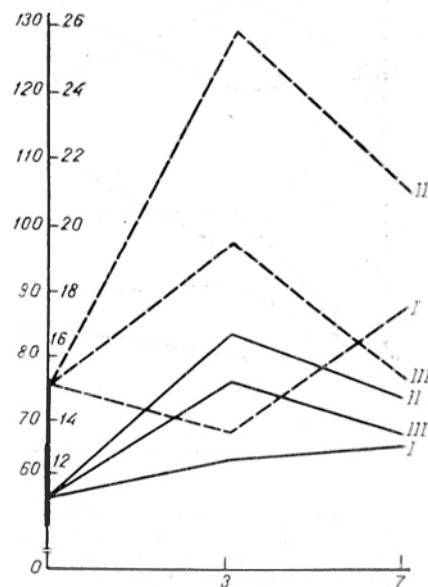


Рис. 3. Влияние интерферона новорожденных животных и  $\alpha$ -токоферола на содержание МДА и ДК в ткани почек мышей с вирусной инфекцией.

Обозначения те же, что на рис. 2.

в системе ПОЛ — АОЗ в крови и тканях инфицированных животных. Полученные результаты отражают особенности реакции организма мышей на действие интерферонов различного возрастного происхождения и степени очистки. При этом не всегда выявляется параллелизм антивирусного действия и изменения показателей ПОЛ — АОЗ.

В настоящее время имеются сведения и о неблагоприятном влиянии экзогенно введенного интерферона на почки и печень новорожденных [9]. Ряд авторов объясняют это проявлением цитотоксичности индуцированного эндогенно иммунного интерферона. Показано, что иммунный интерферон способен подавлять в печени метаболизм цитохрома Р-450, что приводит к некротическим изменениям в печени и гибели животных. Поражение почек объясняют избирательным катаболизмом экзогенного интерферона в почках [7]. В условиях эксперимента нами показано, что сочетание интерферона и  $\alpha$ -токоферола уменьшает и даже снимает побочные явления, вызванные применением только одного интерферона. Полученные результаты могут служить экспериментальным обоснованием для сочетанного использования интерферона и  $\alpha$ -токоферола при вирусной инфекции у детей.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бенисович В. И., Идельсон Л. И. // *Вопр. мед. химии.* — 1973. — № 6. — С. 596—599.
2. Малиновская В. В., Литовченко В. Г., Баландин И. Г. // *Бюл. exper. биол.* — 1981. — № 10. — С. 460—462.

3. Малиновская В. В., Ананенко А. А., Спектор Е. Б. и др. // *Вопр. вирусол.* — 1983. — № 6. — С. 681—684.
4. Спектор Е. Б., Политова Л. Н., Малиновская В. В. и др. // *Всесоюзное совещание «Биоантиоксидант»: Тезисы докладов.* — Черноголовка, 1983. — С. 112—113.
5. Спектор Е. Е., Ананенко А. А., Политова Л. Н. // *Лаб. дело.* — 1984. — № 1. — С. 26—28.
6. Шилина Н. К., Чернавина Г. В., Маслов А. А. // *Там же.* — 1978. — № 3. — С. 140—142.
7. Billau A. // *Arch. Virol.* — 1981. — Vol. 67, № 2. — P. 121—123.
8. Folch J., Lees S. // *J. biol. Chem.* — 1957. — Vol. 22. — P. 497—509.
9. Gresser J. // *Mechanisms of Lymphocyte Activation.* — Amsterdam, 1981. — P. 151—155.
10. Ishihara M. // *Clin. chim. Acta.* — 1978. — Vol. 84. — P. 1—9.

Поступила 29.05.87

#### EFFECT OF INTERFERONS AND $\alpha$ -TOCOPHEROL ON LIPID PEROXIDATION IN EXPERIMENTAL VIRAL INFECTION

A. A. Ananenko, V. V. Malinovskaya, A. I. Klembovsky, L. N. Politova, N. G. Pertseva, V. I. Zvereva, N. A. Fedushkina

Institute of Pediatrics and Child Surgery, Ministry of Public Health of the RSFSR, Institute of Epidemiology and Microbiology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Lipid peroxidation as well as effects of various interferons (native, from fibroblasts of new born and adult animals) on the peroxidation were studied in blood plasma, erythrocytes, liver and kidney tissues of mice with viral infection. These interferons, simultaneously with antiviral action, exhibited the positive effect on lipid peroxidation, while the interferon from fibroblasts of new borns produced the side reactions. Simultaneous use of the interferon and  $\alpha$ -tocopherol removed these side reactions.

УДК 616-056.43-07:[616.153.1:577.152.34+616.154:577.175.85]

В. Л. Доценко, Н. М. Ненашева, Е. А. Нешкова, Н. А. Морозова,  
Г. А. Яровая

#### МЕХАНИЗМ АКТИВИРОВАНИЯ КАЛЛИКРЕИН-КИНИНОВОЙ СИСТЕМЫ ПЛАЗМЫ КРОВИ У БОЛЬНЫХ АТОНИЧЕСКИМИ АЛЛЕРГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Центральный институт усовершенствования врачей, Москва

Изменение активности калликреин-кининовой системы (ККС) при аллергических заболеваниях может обострять течение болезни, резко ухудшая состояние больных. Это в значительной мере связано с увеличением концентрации в плазме крови вазоак-

тивных пептидов, освобождаемых из специфического субстрата — кининогена активированной кининогеназой плазмы крови — калликреином [3, 11]. Механизм такого активирования при атопических состояниях в условиях контактирования больного с ал-

лергеном до конца не изучен. Представление о ферментном активировании XII фактора свертывания крови (фактора Хагемана — ФХ), обусловленном специфической дегрануляцией базофильных полиморфноядерных лейкоцитов при контакте с аллергеном, экспериментально обоснованное в работах [9, 10], находится в противоречии с точкой зрения Nojima и соавт., рассматривающих активирование ФХ как следствие контактного взаимодействия с отрицательно заряженными молекулами гепарина [6].

Исходя из полученных ранее данных об активировании ККС при обострении поллиноза и крапивницы, а также в период специфического гипосенсибилизирующего лечения этих состояний [3], мы предприняли попытку изучить механизм такого активирования. Были поставлены следующие задачи. Во-первых, установить начальное звено активации ККС при контакте с аллергенами, используя при этом препараты частично очищенных компонентов системы: ФХ и прекалликреина. Во-вторых, нас интересовала роль гепарина в активировании ФХ как возможного инициатора кининогенеза при атопиях. Наконец, было предпринято активирование ККС сыворотки крови донора в модельной системе, включающей специфический аллерген, с последующей оценкой активности калликреина и содержания его предшественника.

### Методика

Образцы лейкоцитной массы, обогащенной базофилами, готовили из 25 мл крови, получаемой из локтевой вены больных поллинозом. Обследовано 18 больных: 10 из них страдали аллергией к пыльце злаковых трав, 8 — аллергией к пыльце деревьев. Все больные в период обследования находились в фазе ремиссии.

Лейкоциты получали путем центрифугирования в течение 90 мин смеси крови и 2,5 мл 0,1 М ЭДТА в 6,25 мл 6 % декстрана (полигликина) с 187,5 мг глюкозы [8]. В 6 экспериментах обогащенную базофилами взвесь мононуклеарных клеток получали центрифугированием периферической крови в градиенте плотности 1,080 г/см<sup>3</sup> фиколла — гипака [12].

Затем клетки дважды отмывали буферным раствором А (0,025 М трис-НСl рН 7,6, содержащий 0,120 М NaCl, 0,005 М KCl и 0,3 мг/мл сывороточного альбумина человека) и ресуспендировали в 2,5 мл буферного раствора Б (раствор А с добавлением 6·10<sup>-4</sup> М Ca<sup>2+</sup> и 10<sup>-3</sup> М Mg<sup>2+</sup>). Клеточный выход составлял

10<sup>7</sup> клеток в 1 мл (около 5 % базофильных лейкоцитов).

ФХ получали в виде предшественника в 4 хроматографические стадии из свежеполученной сыворотки крови на QAE-сефадексе и сефадексах G=200 или G=150 [1]. Активность оценивали по способности преарата ФХ после его обработки трипсином переводить прекалликреин в активный фермент. Для этого к 0,05—0,1 мл раствора ФХ (около 500 имоль·мин<sup>-2</sup>), помещенного в 3 пробирки, добавляли по 0,1 мл 0,5 М трис-НСl (рН 8,0) и 0,1 мл трипсина (33 мг/мл в 0,02 н. HCl). По истечении 15 мин инкубации при 37 °С в каждую пробирку вносили 0,1 мл раствора овомуконда (2 мг/мл) для подавления активности трипсина. Через 3—5 мин в пробирки вносили 0,1—0,2 мл прекалликреина и инкубировали при 37 °С в течение 1½, 7 или 20 мин, после чего объем пробы доводили до 2 мл 0,05 М трис-НСl (рН 8,0), добавляли 1 мл 1,5·10<sup>-3</sup> М БАЭЭ (этиловый эфир N-бензонил-L-аргинина) и измеряли БАЭЭ-эстеразную активность при 253 им. В работе использовали препараты ФХ с удельной активностью 1,5—1,8 мкмоль БАЭЭ·мг<sup>-1</sup>·мин<sup>-2</sup>, демонстрирующих при электрофорезе с додецилсульфатом натрия основную полосу с мол. массой 80 кД.

Прекалликреин выделяли на QAE- и КМ-сефадексе из свежеполученной сыворотки крови доноров, как описано ранее [7].

Высокомолекулярный кининоген (ВМК) выделяли из плазмы крови в две хроматографические стадии на ДЭАЭ- и КМ-сефадексе модифицированным методом [5]. Для этого 300 мл крови собирали в полиэтиленовый стакан, содержащий 50 мл консервирующего раствора следующего состава: 600 мг ЭДТА, 37,5 мг ингибитора трипсина из сои, 2,5 г глюкозы, 20 000 КЕ контрикала, 1 % раствор ε-аминокапроновой кислоты (рН 7,3). После центрифугирования без охлаждения плазму крови (180 мл) перемешивали со 100 мл ДЭАЭ-сефадекса А-50, уравновешенного с 0,02 М трис-НСl, содержащим 0,1 М NaCl (рН 7,5), и инкубировали 2 ч при комнатной температуре. Затем сефадекс отфильтровывали, промывали 400 мл исходного буфера и переносили в колонку. Кининоген элюировали 0,2 М Na-ацетатным буфером (рН 6,2) с 0,6 М NaCl. Фракции, содержащие кининоген, сливали и диализовали первый раз против 0,05 М Na-ацетатного буфера (рН 6,2) с 0,15 М NaCl, 0,04 % полибрена и 0,003 М ЭДТА при 4 °С, второй раз — против того же буфера, но содержащего 0,25 М NaCl. Диализат при рН 6,5 инкубировали 2 ч со 130 мл КМ-сефадекса, уравновешенного 0,05 М Na-ацетатным буфером (рН 6,5) с 0,25 М NaCl. Затем сефадекс промывали в воронке стартовым буфером, вносили в колонку и элюировали кининоген линейным градиентом NaCl до 0,8 М. Фракции, содержащие кининоген, сливали и лиофильно высушивали. Полученный препарат высокомолекулярного кининогена обладал активностью 2 мг-экв брадикинина на 1 мг белка.

Об активности кининогена во фракциях судили по количеству брадикинина, освобождающегося при обработке фракций трипсином. Тестирование брадикинина проводили на роге матки крысы в период эструса.

Воздействие «либерата» мононуклеарных клеток, обогащенных базофилами, на препа-

раты ФХ и прекалликреина изучали в двух модификациях. В одном случае 15—30 мкл специфического аллергена приводили в контакт с 0,4—0,6 мл лейкоцитной массы, находящейся в буфере Б, содержащем ионы  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ , в другом взвесь клеток (0,4—0,6 мл) смешивали с таким же объемом ФХ, добавляли 15 мкл водно-солевого раствора аллергена и инкубировали в течение определенного времени. В первом случае по окончании инкубации с аллергеном (40—60 мин) лейкоциты отделяли центрифугированием при 2000 об/мин, а надосадочную жидкость («либерат») исследовали на ее способность активировать ФХ и прекалликреин. Для этого к 0,4 мл «либерата» добавляли 0,2 мл раствора ФХ или 0,4 мл раствора прекалликреина, смесь забуферивали 0,05 мл 0,5 М трис-НСl (рН 8,0) и инкубировали при 37 °С, отбирая аликвоты по 0,1—0,2 мл и исследуя активность их.

Во второй модификации по истечении времени инкубации взвеси лейкоцитов с ФХ клетки удаляли центрифугированием, а в надосадочной фракции исследовали прекалликреинактивирующую способность ФХ. Для этого через определенный промежуток времени отбирали аликвоты по 0,2 мл, добавляли 0,1 мл 0,5 М трис-НСl (рН 8,0), 0,1 мл прекалликреина и инкубировали 10—20 мин при 37 °С. Затем объем пробы доводили до 2 мл 0,05 М трис-НСl, добавляли 1 мл БАЭЭ (раствор  $1,5 \cdot 10^{-3}$  М) и измеряли эстеразную активность калликреина.

Контролями во всех модификациях служили инкубационные смеси, не содержащие аллергена. Препарат ФХ перед инкубированием с лейкоцитарной массой или с «либератом» в определенных экспериментах диализовали против 0,05 М трис-НСl (рН 8,0) или против буфера Б для удаления содержащегося в нем полибрана (0,001 % раствор гексацимедринбромид). В двух случаях в инкубат, кроме ФХ, вносили 0,1 мл (168 мкг препарата) высокомолекулярного кининогена.

Показатели ККС сыворотки крови здорового донора после ее инкубации с лейкоцитарной массой больного поллинозом и соответствующим аллергеном оценивали двумя методами: хроматографическим на ДЭАЭ-сефадексе А-50 [4] и по скорости расщепления хромогенного субстрата до и после активирования контактной фазы [2]. Инкубацию сыворотки крови здорового донора и «либерата» проводили следующим образом: к 1 мл сыворотки крови здорового донора добавляли 1 мл «либерата», полученного в результате инкубации специфического аллергена с пре-

паратом лейкоцитов, обогащенных базофилами, из крови больного поллинозом. Контрольная проба не содержала аллергена. По истечении 20—30 мин инкубационную смесь наносили на колонку с ДЭАЭ-сефадексом А-50 или оценивали уровень активности ККС по скорости расщепления хромогенного субстрата.

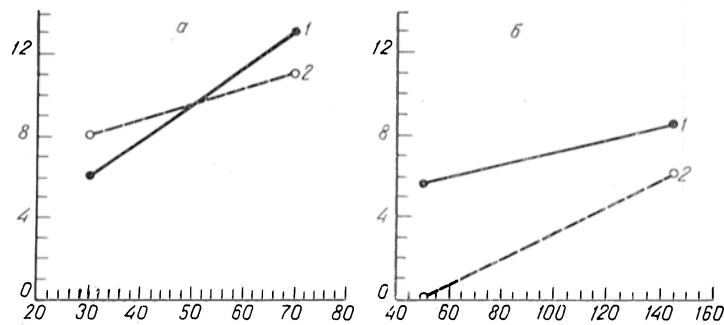
Используемые реактивы: препарат гексацимедринбромид (полибрана) фирмы «Aldrich» (США); QAE-сефадекс, КМ-сефадекс и сефадексы (G-150 и G-200), фикоилл, набор белков для определения молекулярной массы фирмы «Pharmacia Fine Chem.» (Швеция); БАЭЭ фирмы «Reanal» (ВНР); овомукоид завода химреактивов г. Олайна (СССР); трипсин фирмы «Srofa» (ЧССР); азид натрия, сульфат декстрана и N-Pro-Phe-Arg-pNa фирмы «Serva» (ФРГ); гипак фирмы SRL (Англия). Аллергены — водно-солевые экстракты пыльцы злаков и деревьев — получены в НИИ вакцины и сывороток (Ставрополь).

## Результаты и обсуждение

Совместное инкубирование препарата ФХ с надосадочной жидкостью лейкоцитной массы, обогащенной базофилами, выделенной из крови 9 больных поллинозом, приводило к прогрессивному активированию ФХ в течение 1—2 ч инкубации. При этом эффект активирования «либератом», полученным после добавления специфического аллергена, был более выраженным, чем в контрольной пробе без добавления аллергена. На рис. 1 приведены кривые активирования ФХ «либератами» лейкоцитных масс, полученных из крови 2 больных поллинозом. Как показывают представленные данные, активирование фактора происходит и в контрольных инкубационных смесях, что может быть связано с нарушением целостности некоторых клеток в процессе их выделения. Если считать активность ФХ после его активирования трипсином максимальной и принять ее за 100 %, то «либерат» из опытной пробы активирует фактор лишь на 3—5 %.

Рис. 1. Активирование ФХ «либератом» лейкоцитной массы, обогащенной базофилами от двух больных поллинозом (соответственно а, б).

Здесь и на рис. 2—4: 1 — преинкубирование со специфическим аллергеном; 2 — без аллергена. По осям абсцисс (здесь и на рис. 2—4) — время инкубирования (в мин), по осям ординат — активность ФХ (в нмоль БАЭЭ · мин<sup>-1</sup> · мл<sup>-1</sup>).



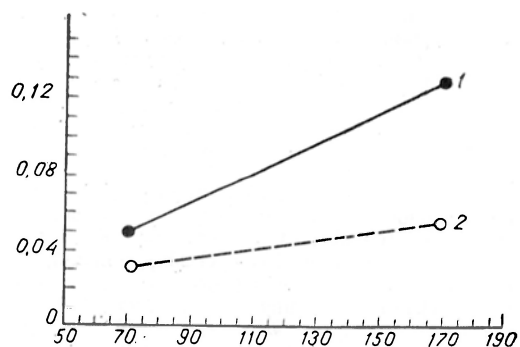


Рис. 2. Активирование прекалликреина «либератом» лейкоцитной массы, обогащенной базофилами, полученной от больного поллинозом. По оси ординат — активность калликреина (в мкмоль/мин в 1 мл).

Активирование прекалликреина «либератом» (рис. 2) в опытных инкубациях происходит в большей степени, чем в контрольных, что может свидетельствовать об освобождении из базофильных гранулоцитов при контакте со специфическим аллергеном активности, оказывающей действие непосредственно на предшественник калликреина, минуя ФХ.

Степень активирования ФХ в той модификации эксперимента, где инкубация лейкоцитарной массы после добавления аллергена проходила непосредственно в присутствии ФХ, в 3 опытах не отличалась от степени активирования собственно «либератом». На рис. 3 представлена кривая активирования фактора в результате инкубирования лейкоцитной массы в течение 1 ч с ФХ и специфическим аллергеном. Активирование фактора в течение почти 4 ч инкубирования со-

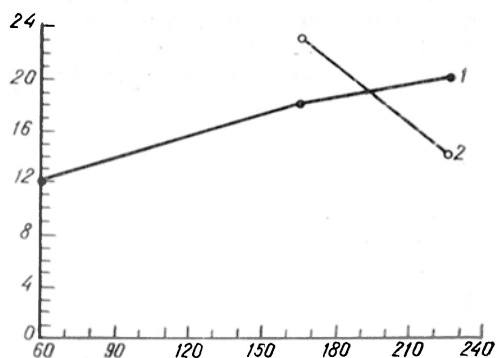


Рис. 3. Активирование ФХ в присутствии лейкоцитной массы, обогащенной сенсibilизированными базофилами. Здесь и на рис. 4 по оси ординат — активность ФХ (в нмоль · мин⁻¹ · мл⁻¹).

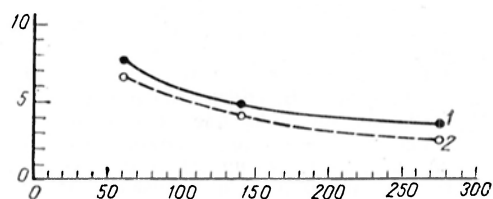


Рис. 4. Активирование ФХ после тщательного удаления полибрена в присутствии лейкоцитной массы, обогащенной сенсibilизированными базофилами.

ставило лишь 4 % от максимально возможного (495 мЕ/мин).

Препарат ФХ, используемый в качестве субстрата для «либерата» лейкоцитной массы при ее контакте со специфическим аллергеном, содержал 0,001 % гексадимедринбромида (полибрена) — ингибитора контактного активирования фактора. Поскольку одним из возможных путей активирования ФХ и ККС при обострении болезни могло оказаться контактное активирование на освобождающемся из тучных клеток и базофилов гепарине — молекуле с ярко выраженным отрицательным зарядом, было принято активирование ФХ после тщательного удаления полибрена. Последний удаляли 3-кратным диализом против 0,05 М трис-НСl (рН 8,0) или буфера Б. В инкубационную смесь, содержащую 1 часть лейкоцитной массы и 1 часть диализованного ФХ, добавляли 0,1 мл раствора высокомолекулярного кининогена (80—160 мкг препарата в 1 мл инкубационной смеси) как необходимый кофактор контактного активирования. Смесь инкубировали в присутствии аллергена в течение 1 ч, после чего оценивали активность фактора в аликвотах по скорости активирования прекалликреина. На рис. 4 представлены результаты такого активирования, свидетельствующие от отсутствия дополнительной активности фактора по сравнению с описанной выше.

Отсутствие прогрессивного активирования ФХ при длительных сроках инкубации с «либератом» и даже постепенное уменьшение активности фактора, происходящее иногда в промежутке между 2-м и 4-м часом (см. рис. 3 и 4), обусловило необходимость проверки нативности ФХ при длительных сроках инкубации с «либератом». Для этого аликвоту, отбираемую из инку-



бационной смеси, подвергали действию трипсина для полного активирования ФХ с последующей проверкой его активности по скорости превращения прекалликреина в калликреин. Выборочная проверка активности ФХ показала, что он сохраняет полную потенциальную активность лишь в течение 30 мин инкубации с «либератом». Затем его способность к активации начинает падать: до 80—90 % в течение 1-го часа с последующим уменьшением до 20 % к 4-му часу инкубации.

Суммируя описанные выше результаты воздействия «либерата» из обогащенной базофилами лейкоцитной массы, освобождающегося при контакте со специфическим аллергеном, можно утверждать: в «либерате» присутствует активатор по отношению не только к ФХ, но и к прекалликреину, что при определенных условиях *in vivo* может способствовать особенно быстрому и глубокому активированию ККС.

В том, что касается активирования ФХ, эти данные соответствуют результатам работ [9, 10], в которых впервые была исследована взаимосвязь ККС с клеточными факторами у больных atopическими заболеваниями. Активирование прекалликреина в этих условиях показано нами впервые.

Нам не удалось подтвердить данные [6] о возможном активировании ФХ на гепарине при дегрануляции базофильных гранулоцитов в присутствии специфического аллергена. Ферментативный путь активации ФХ косвенно подтверждает и установленный нами факт его инактивации при длительном инкубировании с «либератом» (в течение 2—4 ч).

Для изучения воздействия «либерата» лейкоцитной массы при контакте с аллергеном на компоненты ККС не-

посредственно в сыворотке крови лейкоцитную массу, полученную из крови больного аллергией, смешивали с сывороткой крови здорового донора (в соотношении по объему 1:1) и инкубировали после добавления аллергена в течение 30 мин. Затем лейкоциты отделяли центрифугированием, а в надосадочной фракции оценивали уровень активности ККС. В таблице приведены средние данные 4 опытов по активированию ККС «либератом» непосредственно в сыворотке крови, свидетельствующие о гораздо более глубоком активировании системы, чем при контакте с препаратами очищенных проферментов. При этом активность калликреина возрастала в 2 раза при таком же падении уровня прекалликреина.

Предварительный анализ активности калликреина, содержания прекалликреина и уровня антикалликреинового потенциала сыворотки донора после контакта с «либератом» проведенный с использованием хромогенного субстрата S-2302 [2], подтвердил результаты, полученные хроматографическим методом.

Более яркая картина активирования прекалликреин-калликреиновой системы на фоне вероятного истощения или инактивации ингибиторов по сравнению с активированием очищенных ферментных препаратов, которая наблюдалась при совместном инкубировании сыворотки крови здорового донора с лейкоцитной массой, обогащенной сенсibilизированными базофилами, обусловлена, по-видимому, присутствием в инкубационной смеси одновременно двух субстратов (ФХ и прекалликреина) для освобождающихся из базофилов протениаз и возможного взаимного активирования этих ферментов в плазме крови.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Доценко В. Б., Серова Н. Б., Логунов А. И. и др. // *Вопр. мед. химии.* — 1987. — № 4. — С. 104—109.
2. Доценко В. Л., Яровая Г. А., Нешкова Е. А. // *Там же.* — 1989.
3. Ненашева Н. М., Доценко В. Л., Горячкина Л. А., Яровая Г. А. // *Там же.* — 1986. — № 5. — С. 106—111.
4. Пасхина Т. С., Доценко В. Л., Блиникова Е. И. // *Биохимия.* — 1973. — Т. 38. — С. 420—423.
5. Dittmann B., Stager A., Winneer R., Fritz H. // *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* — 1981. — Bd 362. — S. 919—927.

Активирование калликреина сыворотки крови донора при инкубации с «либератом» лейкоцитной массы

Сыворотка крови	Калликреин	Прекалликреин
	нмоль/БАЭЭ/мл	
Здоровых доноров	33,16±19,87	211,79±50,20
Здоровых доноров, инкубированная с «либератом»	69,31±27,20	106,56±28,17

6. *Hojima Y., Cochrane C. G., Wiggins R. C.* et al. // *Blood.* — 1984. — Vol. 63. — P. 1453—1459.
7. *Kawiak Y., Kowalec M., Dolsenko V. L., Yarovaya G. A.* // *Clin. chim. Acta.* — 1984. — Vol. 141. — P. 287—292.
8. *Lichenstein L. M., Osler A.* // *J. exp. Med.* — 1964. — Vol. 12. — P. 507—524.
9. *Newball H. H., Talamo R. C., Lichenstein L. M.* // *J. clin. Invest.* — 1979. — Vol. 64. — P. 66—75.
10. *Newball H. H., Meier H. L., Lichtenstein L. M.* // *J. invest. Derm.* — 1980. — Vol. 74. — P. 344—348.
11. *Norman P., Naclerio R., Creticos P.* et al. // *Int. Arch. Allergy.* — 1985. — Vol. 77. — P. 57—63.
12. *Stahl Skov P., Nory S., Week B.* // *Clin. exp. Immunol.* — 1977. — Vol. 27. — P. 423—439.

Поступила 26.08.87

## ON THE MECHANISM OF ACTIVATION OF KALLIKREIN-KININE SYSTEM IN BLOOD PLASMA OF PATIENTS WITH ATOPIC FORMS OF ALLERGIC DISEASES

*V. L. Dolsenko, N. M. Nenasheva, E. A. Neshkova, N. A. Morozova, G. A. Yarovaya*

Central Institute for Postgraduate Training of Physicians, Moscow

Data early obtained on activation of the kallikrein-kinine system in acute forms of pollinosis and urticaria were corroborated *in vitro*. These experiments exhibited enzymatic activation of Hageman factor and prekallikrein using "liberator", obtained after incubation of the leukocyte fraction enriched with basophiles and specific allergen. 1 ml of the "liberator" containing  $10^7$  cells activated Hageman factor up to 12-20 mU per min (evaluated by BAEE-esterase activity of the kallikrein developed) as well as kallikrein activity was increased up to 80-130 mU within 1.5-2 hrs of incubation. The Hageman factor was distinctly inactivated after long-term incubation with the "liberator".

УДК 616.5-008.921.8-07:616-008.93:547.915.5'458]-074

*Е. М. Баскаева, Э. В. Дятловицкая, Г. Я. Видершайн*

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПРОДУКТОВ НАКОПЛЕНИЯ ПРИ БОЛЕЗНИ ФАБРИ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Институт биоорганической химии АН СССР, Москва

Ранее нами были описаны случаи болезни Андерсона — Фабри у двух родных братьев 49 и 47 лет (Г. В. и Г. И.) и проведена биохимическая диагностика этих заболеваний [3, 6]. В плазме и лейкоцитах крови больных была выявлена значительная недостаточность  $\alpha$ -D-галактозидазы, которая, как известно, наблюдается при болезни Фабри [2, 7] и приводит к накоплению в организме больных тригексозилцерамида (ТГЦ), дигексозилцерамида (ДГЦ) и в меньшей степени других гликолипидов с концевым остатком галактозы. ТГЦ и ДГЦ накапливаются главным образом в почках больных [2, 7]. Кроме того, ТГЦ накапливается в печени, легких, фибробластах, поджелудочной железе, плазме и других тканях. ДГЦ накапливается в поджелудочной железе. Повышенное содержание обоих гликолипидов обнаруживается также в осадках мочи больных [16]. Идентификация продуктов накопления в сочетании с выявлением ферментативного дефекта позволяет достаточно надежно диагностировать болезнь Фаб-

ри. В последние годы для анализа накапливаемых продуктов в плазме крови с целью диагностики лизосомных болезней накопления используется метод высокоэффективной жидкостной хроматографии [18]. Этот метод, в частности, был применен и для анализа нейтральных гликолипидов при диагностике болезни Фабри. При этом в качестве стандарта использовался ТГЦ, выделенный из мочи пациентов, страдающих болезнью Фабри. В нашей стране биохимическая диагностика этого заболевания на основе идентификации продуктов накопления не проводилась.

Целью настоящей работы было выделение основных продуктов накопления из почек умершего пациента с болезнью Фабри (Г. В.), подтверждение последней после идентификации полученных соединений, а также сравнение количества ДГЦ и ТГЦ в осадке мочи обследованных больных и здоровых лиц. Выделенные нейтральные гликолипиды могут быть использованы в дальнейшем в качестве стандартов

ранней диагностики болезни Фабри по продуктам накопления в моче.

## Методика

Нейтральные гликолипиды выделяли из почек больного по методике выделения глико-сфинголипидов из тимуса телят [4].

**Экстракция липидов из почек.** Почки измельчали пропуская через мясорубку. 180 г измельченной ткани гомогенизировали в 300 мл ацетона в течение 15 мин. Гомогенат фильтровали на стеклянном фильтре, полученный остаток гомогенизировали в течение 30 мин в 240 мл смеси хлороформ — метанол (2:1), фильтровали и вновь гомогенизировали в этой же смеси. Затем остаток гомогенизировали в течение 30 мин в 240 мл смеси хлороформ — метанол (1:1), фильтровали, а полученный остаток подвергали 3-кратной экстракции смесью хлороформ — метанол (1:2). Все хлороформно-метанольные экстракты объединяли и упаривали.

**Удаление глицеридов из смеси липидов.** Полученный остаток растворяли в 100 мл хлороформа, к раствору добавляли 160 мл 0,21 н. NaOH в метаноле и после тщательного перемешивания смесь инкубировали в течение 1,5 ч при 40°C с периодическим перемешиванием. По окончании реакции смесь нейтрализовали добавлением 0,35 н. уксусной кислоты в метаноле до pH около 6,0, концентрировали в роторном испарителе, добавляли ~1/3 часть дистиллированной воды и диализовали против воды при 4°C в течение 2 сут, меняя воду через каждые 12 ч. Затем содержимое диализного мешка упаривали и образовавшиеся в процессе щелочного метанолиза метиловые эфиры жирных кислот удаляли из смеси обработкой гексаном. Для этого к полученному остатку приливали 100 мл гексана, тщательно перемешивали и полученную суспензию центрифугировали на центрифуге ЦУМ-1 при 7000 об/мин в течение 10 мин. Экстракцию гексаном проводили трижды. Полученный осадок, представляющий собой смесь глико-сфинголипидов, сфингомиелина и холестерина, растворяли в смеси хлороформ — метанол (1:1), фильтровали, фильтрат упаривали и подвергали дальнейшей хроматографии.

## Результаты фракционирования

Элемент	Соотношение	Выделенная фракция
Хлороформ	—	Холестерин
Хлороформ — метанол	98:2	То же
	95:5	Моногексозилцерамиды
	90:10	Моно- и дигексозилцерамиды
	87:13	Дигексозилцерамиды
	85:15	Тригексозилцерамиды
	80:20	То же (следы)
	75:25	Полигексозилцерамиды

**Выделение нейтральных гликолипидов.** На колонку (3×50 см) с ДЭАЭ-сфадексом А-25 («Pharmacia», Швеция) в ацетатной форме в смеси хлороформ — метанол — вода (30:60:8) наносили 15 мл раствора полученного остатка в смеси хлороформ — метанол (1:1) и элюировали 1,7 л смеси хлороформ — метанол — вода (30:60:8) для отделения суммы нейтральных глико-сфинголипидов, сфингомиелина и холестерина.

Ход элюции контролировали микротонкослойной хроматографией [1]. Полученный элюат упаривали досуха и ацетилювали. Для этого остаток растворяли в 50 мл перегнанного пиридина, добавляли 50 мл уксусного ангидрида, перемешивали и оставляли на 48 ч при комнатной температуре. Затем реакционную смесь упаривали на роторном испарителе для удаления пиридина и уксусного ангидрида и растворяли в смеси дихлорэтан — гексан (4:1). 16 мл полученного раствора наносили на колонку (3×35 см) с флоризилом («Merck», ФРГ), уравновешенную смесью дихлорэтан — гексан, для отделения гликолипидов от фосфолипидов и холестерина. Колонку промывали 400 мл указанной смеси (I), 400 мл дихлорэтана (II) и 700 мл смеси дихлорэтан — ацетон (1:1) (III). Объединенные элюаты I и II и отдельно элюат III упаривали. Остатки по отдельности растворяли в 50 мл смеси хлороформ — метанол (1:1), добавляли 20 мл 0,5 % раствора метилата натрия в метаноле, перемешивали и оставляли на 1,5 ч при комнатной температуре для деацетилирования. По окончании реакции смесь нейтрализовали добавлением 0,35 н. уксусной кислоты в метаноле до pH 6,0—6,5 и диализовали против воды при 4°C в течение 2 сут.

**Разделение нейтральных глико-сфинголипидов на фракции.** Содержимое каждого диализного мешка упаривали, растворяли в хлороформе и наносили на колонки размерами 3×50 и 2,5×30 см с силикагелем L 40/100 («Chemapol», ЧССР), уравновешенные хлороформом. Фракции липидов и гликолипидов элюировали хлороформом и смесями хлороформ — метанол с постепенным увеличением содержания последнего. О ходе элюции судили по данным микротонкослойной хроматографии на силикагеле КСК в системе хлороформ — метанол — вода (60:35:8) с использованием фосфориомолибденовой кислоты [5] для идентификации липидов и антронового реагента [20] для идентификации гликолипидов. Результаты фракционирования приведены в таблице.

Полученные фракции гликолипидов с двух колонок, содержащие соответственно ДГЦ и ТГЦ, объединяли, упаривали и доводили до постоянной массы. Было получено 275 мг ДГЦ и 957 мг ТГЦ.

Углеводный состав гликолипидов анализировали с помощью газожидкостной хроматографии (ГЖХ) [17] в хроматографе «Хром-5» (ЧССР) на колонке (2500×3 мм) с 3 % OV-1 на хромосорбе W-HP (100—120 меш) при программировании температуры от 170 до 315°C со скоростью 6°C мин и скоростью газаносителя (гелия) 30 мл/мин.

Фракцию гликолипидов из осадков мочи получали экстракцией смесью хлороформ — метанол (2:1) по известной методике [14].

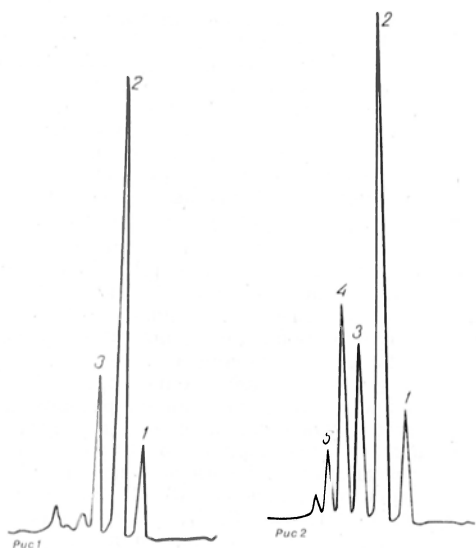


Рис. 1. Элюционный профиль триметилсилиловых эфиров метилгликозидов, полученных после кислотного гидролиза ДГЦ при ГЖХ [17]. 1, 2, 3 — пики, соответствующие галактозе.

Рис. 2. Элюционный профиль триметилсилиловых эфиров метилгликозидов, полученных после кислотного гидролиза ТГЦ при ГЖХ [17]. 1, 2, 3 — пики, соответствующие галактозе; 4, 5 — пики, соответствующие глюкозе.

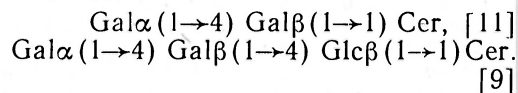
## Результаты и обсуждение

Из почек больного Г. В. были выделены 3 фракции гликолипидов — 9,7 мг моногексозилцерамидов (МГЦ), 275 мг ДГЦ и 957 мг ТГЦ. Количество выделенных МГЦ, ДГЦ и ТГЦ в пересчете на 1 г свежей ткани составляло соответственно 0,05, 1,5 и 5,55 мг/г. При этом содержание МГЦ практически не отличалось от нормы [15], а содержание ДГЦ и ТГЦ превышало норму [15, 16] соответственно в 9—19 и 15—26 раз, что свидетельствует о значительном накоплении ДГЦ и ТГЦ в почках больного.

Методом ГЖХ было показано, что фракция МГЦ представлена смесью глюкозил- и галактозилцерамидов в соотношении 2:1. Как известно [12, 15], такая смесь МГЦ характерна и для нормальных почек, содержащих также небольшое количество ДГЦ — лактозилцерамида и дигалактозилцерамида [13]. Как видно на рис. 1, фракция ДГЦ, выделенная из почек больного, была представлена только дигалактозилцерамидом, что соответствует данным литературы [19]. Анализ состава фракции ТГЦ (рис. 2) на

основании величины соотношения галактозных и глюкозных остатков (3:1) позволил предположить, что ТГЦ на 90 % состоят из дигалактозил-глюкозилцерамида и на 10 % — из тригалактозилцерамида. Данные о существовании тригалактозилцерамида в организме человека как в норме, так и при болезни Фабри в литературе отсутствуют [8]. Имеются сведения о существовании в слизистой оболочке тонкой кишки крыс полигалактозилцерамидов с галактозными остатками, связанными  $\alpha(1\rightarrow3)$ -связью [8], что не исключает возможности существования тригалактозилцерамида у человека и его накопления при болезни Фабри.

Мы не проводили анализа конфигурации аномерных связей между углеводными остатками в ДГЦ и ТГЦ, так как в литературе имеются данные о типе связи остатков моносахаров в накапливаемых гликолипидах при болезни Фабри [10]. Так, с помощью методов масс-спектрометрии, ПМР-спектрометрии и ферментативного анализа с использованием очищенных препаратов  $\alpha$ - и  $\beta$ -галактозидазы установлено, что ДГЦ и ТГЦ имеют следующие структуры:



Что касается тригалактозилцерамида, то его обнаружение при болезни Фабри, характеризующейся недостаточностью  $\alpha$ -галактозидазы, а также описанные структуры полигалактозилцерамида у млекопитающих [8], позволяют полагать наличие в его составе конечного галактозного остатка с  $\alpha$ -аномерной связью.

Продукты накопления при болезни Фабри исследовали не только в почках, но и в моче больного Г. В., его брата Г. И. и дочери Г. И. (Г. О.). Как видно на рис. 3, в моче обоих братьев обнаруживались значительные количества ДТЦ и ТГЦ, которые практически не выявлялись в контрольной моче и в моче Г. О. В образце осадка мочи Г. О. содержалось большое количество негликозилированных липидов, которые практически полностью отсутствовали у других лиц. Происхождение этих соединений пока не выяснено. Активность  $\alpha$ -D-галактозидазы в лейкоцитах Г. О. для

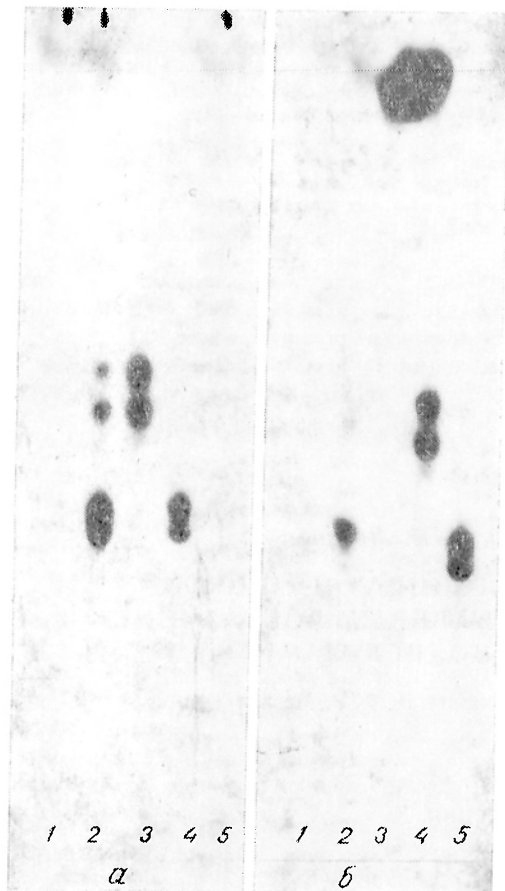


Рис. 3. Тонкослойная хроматография фракций ДГЦ и ТГЦ, выделенных из осадков мочи. а: 1, 5 — норма; 2 — больной Г. В.; 3 — стандарт ДГЦ; 4 — стандарт ТГЦ; б: 1 — норма; 2 — больной Г. И.; 3 — больной Г. О.; 4 — стандарт ДГЦ; 5 — стандарт ТГЦ.

(52 нмоль/ч на 1 мг белка) не отличалась от нормы [3] и соответствовала активности этого фермента у ее матери Г. К. (53,6 нмоль/ч на 1 мг белка). Полученные результаты о практическом отсутствии накопления ДГЦ и ТГЦ в моче и снижения активности  $\alpha$ -D-галактозидазы в лейкоцитах Г. О. согласуются с данными литературы, свидетельствующими о значительных трудностях идентификации гетерозиготных носителей болезни Фабри на основании выявления их энзиматического статуса и продуктов накопления, обусловленных особенностями, в частности неполной пенетрантностью гена болезни Фабри [17].

Таким образом, представленные данные о накоплении ДГЦ и ТГЦ в осадках мочи Г. В. и Г. И., а также в почках больного Г. В. подтверждают наличие болезни Фабри, диагностиро-

ванной ранее на основании результатов клинических и биохимических исследований.

Авторы выражают признательность врачам М. М. Мендельсону, Э. И. Брук (Клиническая больница им. С. П. Боткина) и О. В. Зайратьянц (кафедра патологической анатомии I ММИ им. И. М. Сеченова) за предоставленный материал биопсии, а также образцы крови и мочи больных.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бергельсон Л. Д., Дятловицкая Э. В., Молотковский Ю. Г. и др. // Препаративная биохимия липидов. — М., 1981. — С. 21—23.
2. Видершайн Г. Я. Биохимические основы гликозидозов. — М., 1980.
3. Видершайн Г. Я., Бейер Е. М., Мендельсон М. М., Ливановский Ю. А. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 5. — С. 120—123.
4. Дятловицкая Э. В., Ахмед-Заде А. // Прикладная биохим. — 1983. — № 3. — С. 399—402.
5. Кейтс М. Техника липидологии: Пер. с англ. — М., 1975. — С. 138—140.
6. Мендельсон М. М., Ливановский Ю. А., Видершайн Г. Я. и др. // Тер. арх. — 1987. — № 8. — С. 137—141.
7. Desnik R. J., Sweeley C. C. // The Metabolic Basis of Inherited Diseases / Ed. B. Stanbury et al. — New York, 1983. — P. 906—944.
8. Hakomori S. // Handbook of Lipid Research / Ed. D. I. Hanahan. — New York, 1983. — Vol. 3. — P. 1—150.
9. Hakomori S. et al. // J. biol. Chem. — 1971. — Vol. 246. — P. 2271.
10. Handa S., Ariga T., Miyatake T. et al. // J. Biochem. (Tokyo). — 1971. — Vol. 69. — P. 625—627.
11. Li Y.-T., Li S.-C., Dawson G. // Biochim. biophys. Acta. — 1972. — Vol. 260. — P. 88—92.
12. Makita A. // J. Biochem. (Tokyo). — 1964. — Vol. 55. — P. 269—279.
13. Makita A., Yamakawa T. // Ibid. — P. 365.
14. Malmqvist E., Ivemark B. I., Lindsten J. et al. // Lab. Invest. — 1971. — Vol. 25. — P. 1—14.
15. Martensson E. // Biochim. biophys. Acta. — 1966. — Vol. 116. — P. 296.
16. Pabico R. C., Atanacio B. C., McKenna B. A. et al. // Amer. J. Med. — 1973. — Vol. 55. — P. 415—426.
17. Pritchard D. G., Todd C. W. // J. Chromatogr. — 1977. — Vol. 133. — P. 133—135.
18. Strasberg P. M., Warren I., Skomorowski M. A. et al. // Clin. chim. Acta. — 1983. — Vol. 132. — P. 29—41.
19. Sweeley C. C., Klionsky B. // J. biol. Chem. — 1963. — Vol. 238. — P. PC-3148.
20. Van Jent C. M., Rosenleu O. J., Van der Bigl P. // J. Chromatogr. — 1973. — Vol. 85. — P. 174—176.

Поступила 17.07.87

## ISOLATION AND IDENTIFICATION OF THE ACCUMULATED PRODUCTS IN FABRY DISEASE

*E. M. Baskaeva, E. V. Dyatlovitskaya, G. Ya. Wiedershain*

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

Three fractions of glycolipids — monohexosylceramide, dihexosylceramide (DHC) and trihexosylceramide (THC) were isolated from kidney of the patient with Fabry disease. As compared with normal state amount of DHC and THC was increased in the patient kidney 9-19-fold and 15-26-fold, respectively. Gas liquid

chromatography showed that the DHC fraction consisted in digalactosylceramide, while the THC fraction — a mixture of digalactosylglucosylceramide (90 %) and trigalactosylceramide (10 %). Presence of the latter glycolipid was not early found in human body both in normal state and in Fabry disease. Accumulation of DHC and THC was also detected in urine precipitates of the patients using thin-layer chromatography, whereas these substances were not found in urine of one of the patients daughter, who was heterozygote gene carrier of Fabry disease. The data obtained corroborate the Fabry disease presence, which have been predetermined by means of clinical diagnosis as well as basing on deficiency of  $\alpha$ -D-galactosidase in blood plasma and leukocytes.

УДК 616-002-092.9-085.31:547.466]-07:[616.154:577.175.823

*Л. Г. Цырульникова, А. И. Логунов*

## ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ СЕРТОНИНА И ПИРИДОКСАЛЯ В КРОВИ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ВОСПАЛЕНИЕМ ПРИ НАГРУЗКЕ АМИНОКИСЛОТАМИ

НИИ уха, горла и носа Минздрава РСФСР, Москва

Сведения о роли серотонина (5-окситриптамина) в процессах воспаления и заживления ран неоднозначны. Принято считать, что серотонин оказывает стимулирующее влияние на регенерацию тканей и развитие соединительнотканых структур, повышая активность фибробластов на уровне биосинтеза коллагена [2, 4, 5, 6, 9]. В то же время скорость биосинтеза серотонина находится в прямой зависимости от витамина В<sub>6</sub> (пиридоксаль-фосфата). Витамин В<sub>6</sub> является кофактором 5-окситриптофандекарбоксилазы, которая катализирует превращение 5-окситриптофана в 5-окситриптамин [14]. Как известно, пиридоксаль-фосфат выполняет ключевые функции в реакциях  $\beta$ -замещения, переаминирования, декарбоксилирования и расщепления боковой цепи аминокислот [16]. Наряду с этим имеются данные о том, что незаменимые аминокислоты и аминокислоты с разветвленной боковой цепью обладают сравнительно высокой противовоспалительной активностью [13].

Цель настоящей работы — изучить динамику содержания серотонина и пиридоксалия в крови крыс с экспериментальным воспалением кожи и подкожных тканей и влияние нагрузки незаменимыми аминокислотами и аминокислотами с разветвленной боковой

цепью на концентрации серотонина и пиридоксалия в различные сроки воспаления.

### Методика

Экспериментальное воспаление кожи и подкожных тканей вызывали у крыс-самок линии Вистар массой 180—220 г. С этой целью под нембуталовым наркозом (30 мкг на 1 г массы тела внутривенно) крысам подкожно имплантировали марлевые салфетки. Животных забивали декапитацией на 7, 14, 21 и 28-й день после операции. В эксперименте использованы 4 группы животных: 2 опытные и 2 контрольные. Операцию производили в 2 опытных и 1 контрольной группах, в каждой было по 20 животных. Вторую контрольную группу составили 10 intactных крыс.

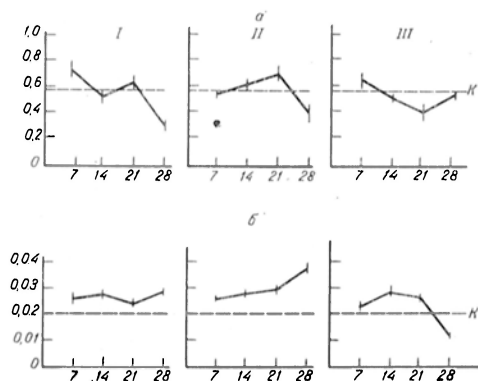
Каждому животному опытных групп в течение первых 5 дней после операции инъецировали смеси аминокислот из расчета по 5 мг аминокислоты на крысу. Для первой опытной группы использована смесь Вал, Лей, Илей, Цитр, Опро, Гли, растворенная на физиологическом растворе. Во второй опытной группе аминокислотная смесь включала Три, Арг, Лиз, Тре, Сер, Цис.

Содержание серотонина в крови крыс определяли флуориметрическим методом [10, 17], модифицированным нами [8]. Концентрация пиридоксалия в крови также определена флуориметрическим методом [11]. Полученные результаты обобщали использованием критерия Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

Динамика содержания серотонина и пиридоксалия в крови оперированных животных первой контрольной группы





Динамика содержания серотонина (а) и пиридоксала (б) в крови крыс при воспалении, индуцированном подкожной имплантацией инородного материала.

По осям абсцисс — срок после операции (в днях), по осям ординат — содержание серотонина и пиридоксала (в мкг/мл). I — оперированные животные, которым вводили Вал, Лей, Илей, Цитр, Опро, Гли; II — оперированные животные, которым вводили Три, Арг, Лиз, Тре, Сер, Цис; III — контрольные оперированные животные; К — интактные животные.

несколько отличается от таковой в опытных группах (см. рисунок). У животных первой контрольной группы, начиная с 7-го дня после операции и до конца обследования, содержание серотонина в крови имеет тенденцию к снижению, не достигающему, однако, статистически достоверных значений. В первой опытной группе отмечено значительное увеличение содержания серотонина на 7-й день, находящееся на грани достоверности. На 14—21-й день оно снижается до нормы и статистически достоверно падает на 28-й день по сравнению с аналогичным показателем в обеих контрольных группах. Во второй опытной группе не отмечено резких перепадов уровня серотонина в первые 3 нед после операции и только на 28-й день он статистически достоверно падает, как и в первой опытной группе.

Полученные результаты отличаются от имеющихся в литературе сведений. Так, показано, что нагрузка животных большими дозами аминокислот вызывает повышение уровня серотонина в крови [13]. Расхождение в результатах могут вызывать разные факторы: дозировка и набор аминокислот, специфика оперативного вмешательства и гнойного воспаления и др. Вместе с тем известно, что гнойное воспаление приводит к понижению уровня серотонина в крови больных [7]. Нанесение кожной раны крысам

статистически достоверно снижает количество амина в коже на 5-й день после операции с последующим его возрастанием через 2 нед [4].

Что касается динамики содержания пиридоксала в крови, то к 7-му дню после операции данный показатель несколько увеличивается у оперированных животных всех 3 групп по сравнению с таковым у интактных крыс. Затем это увеличение становится статистически достоверным в опытных группах, тогда как в контрольной группе наблюдается статистически достоверное снижение его уровня на 28-й день после операции.

Повышение уровня пиридоксала у оперированных крыс всех трех групп, по-видимому, связано с самой операцией, так как имеются сведения о значительном увеличении содержания пиридоксальфосфата в плазме крови ложнооперированных крыс по сравнению с таковым у интактных животных [12]. Вместе с тем показано [1, 2], что количество пиридоксала в крови снижается при использовании экзогенных аминокислот. Это происходит вследствие его участия в процессе их метаболизма. Возможно, наложение обоих факторов и определяет характер динамики содержания пиридоксала в крови экспериментальных животных.

Таким образом, экзогенные аминокислоты оказывают некоторое влияние на динамику содержания в крови серотонина и пиридоксала независимо от состава используемых смесей. Кроме того, показано, что содержание в крови названных веществ во все сроки наблюдения находится в обратной зависимости, т. е. возрастание уровня пиридоксала сопровождается снижением концентрации серотонина. Этот вывод согласуется с имеющимися в литературе сведениями. Так, доказана тесная взаимосвязь и взаимозависимость серотонина и пиридоксала через пиридоксалькиназу. Этот фермент фосфорилирует пиридоксаль в пиридоксальфосфат, участвующий в биосинтезе серотонина [14]. При высокой концентрации серотонина тормозится активность пиридоксалькиназы, вследствие чего накапливается пиридоксаль и понижается концентрация его фосфорилированного производного. В этих условиях снижается биосинтез серотонина. Серотонин считается одним из

факторов метаболического контроля биосинтеза пиридоксала. Возможно, что повышение уровня пиридоксала в крови оперированных животных объясняется не только и не столько влиянием операции, сколько имеющейся зависимостью от серотонина.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Браунштейн А. Е. // Успехи совр. биол. — 1953. — Т. 35, № 1. — С. 27—56.
2. Горяченкова Е. В. // Витамины. — М., 1974. — С. 236—263.
3. Ибрагимов И. И. // Сообщ. АН Груз. ССР. — 1972. — Т. 68, № 3. — С. 721—726.
4. Липищ Р. У., Звягинцева Т. В. // Общая и неотложная хирургия. — Киев, 1979. — Вып. 9. — С. 66—69.
5. Пидевич И. Н. Фармакология серотонинореактивных структур. — М., 1977. — С. 186—189.
6. Пухальская Е. И. Серотонин и клеточная пролиферация в норме и патологии: Дис... д-ра мед. наук. — М., 1965.
7. Тарлов Е. Л. и др. // Тер. арх. — 1978. — № 5. — С. 98—101.
8. Цырульникова Л. Г., Косякова Э. И., Беляев В. Г. // Вестн. оторинолар. — 1971. — № 5. — С. 100—103.
9. Чернух А. М. Воспаление. — М., 1979. — С. 154—159.
10. Ashcroft G. W., Crawford T. B. // Clin. chim. Acta. — 1964. — Vol. 9. — P. 364—369.
11. Maeda M., Ikeda M., Tsuji A. // Chem. pharm. Bull. — 1976. — Vol. 24. — P. 1094.
12. Meisler N. T., Thanassi J. W. // J. Nutr. — 1982. — Vol. 112. — P. 314—323.
13. Meyers B. E., Moonka D. K., Davis R. H. // Inflammation. — 1979. — Vol. 3. — P. 223.
14. Neary J. F., Meneely R. R., Grever M. R., Diven W. F. // Arch. Biochem. — 1972. — Vol. 151. — P. 42—47.
15. Singh S. // Calif. Tissue int. — 1980. — Vol. 41, Suppl. — P. 125.
16. Snell E. E., Haskell B. E. // Compr. Biochem. — 1970. — Vol. 21. — P. 47—71.
17. Weissbach H. // Meth. med. Res. — 1961. — Vol. 5. — P. 178—182.

Поступила 13.07.87

#### DYNAMICS OF SEROTONIN AND PYRIDOXAL CONTENT IN BLOOD OF RATS WITH EXPERIMENTAL INFLAMMATION AFTER LOADING WITH AMINO ACIDS

L. G. Tsyru'nikova, A. I. Logunov  
Institute of Ear, Throat and Nose, Ministry of Public Health of the RSFSR, Moscow

Dynamics in content of serotonin and pyridoxal in blood as well as effect of loading with essential and branch-chained amino acids on these substances were studied in rats with experimental inflammation of skin and hypodermic tissues within various periods of the disease. The exogenous amino acids administered were found to affect particularly the dynamics of serotonin and pyridoxal content in the rat blood independently on their mixtures used. Concentration of serotonin in blood correlated inversely with pyridoxal content within the all periods of the experiment.

УДК 616.24-002.582-07:616.233-008.931:577.152.344.042.2

Г. О. Каминская, И. Э. Степанян, Н. Л. Жукова

#### СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ ПРОТЕИНАЗЫ — ИНГИБИТОРЫ В БРОНХОАЛЬВЕОЛЯРНОМ СОДЕРЖИМОМ У БОЛЬНЫХ С ДИФФУЗНЫМИ ПОРАЖЕНИЯМИ ЛЕГКИХ

Центральный НИИ туберкулеза Минздрава СССР, Москва

Актуальность изучения диффузных поражений легких вызвана как постоянным увеличением их удельного веса среди всех легочных заболеваний, так и множеством нерешенных вопросов с ними связанных [1, 10]. Важнейшими и наиболее распространенными заболеваниями этой группы являются саркоидоз и альвеолиты различного генеза. В последние годы в изучении многих из диффузных поражений легких отмечен значительный прогресс. Вместе с тем сохраняется необходимость дальнейшего совершенствования существующих и поиска новых информативных тестов, позволяющих точно оценить активность, прогноз при диф-

фузных поражениях легких, а также выработать показания к лечению.

Широкие возможности открыло внедрение в практику диагностического бронхоальвеолярного лаважа. Анализ состава бронхоальвеолярных смывов (БАС) подтверждает наличие патологических процессов, протекающих в периферических отделах респираторной системы. В частности, появилась возможность изучить состояние системы протеолитических ферментов и их ингибиторов в дистальных отделах легких.

Дисбаланс между протеиназами и ингибиторами с появлением свободной протеолитической активности в респи-

раторных путях считается в настоящее время важным фактором поддержания хронического воспаления, развития эмфиземы легких и пневмосклероза у больных с хроническими неспецифическими заболеваниями легких [5, 8, 12, 13]. При диффузных поражениях легких значение дисбаланса протеиназы — ингибиторы в БАС остается недостаточно изученным.

Целью настоящего исследования явился анализ данных биохимического исследования БАС у больных диффузными поражениями легких для установления диагностической ценности используемых методов и изучения возможных механизмов, лежащих в основе развития этих заболеваний.

### Методика

Обследовано 102 больных: 53 женщины и 49 мужчин в возрасте от 20 до 59 лет. У 70 из них был диагностирован саркоидоз органов дыхания (у 12 внутригрудных лимфоузлов, у 58 внутригрудных лимфоузлов с одновременным поражением легочной ткани), у 19 — экзогенный аллергический альвеолит (болезнь птицеводов) и у 13 — идиопатический фиброзирующий альвеолит. Диагноз был установлен на основании результатов комплексного обследования и верифицирован у больных саркоидозом и идиопатическим фиброзирующим альвеолитом на основании данных гистологического исследования биоптатов легких, а у больных экзогенным аллергическим альвеолитом — в результате обнаружения специфических антител в крови. У всех больных методами клинико-лабораторного обследования была установлена разной степени выраженность патологического процесса.

Комплексное бронхологическое исследование, проведенное всем больным, включало диагностический субсегментарный бронхоальвеолярный лаваж по методу [9]. В растворимой фракции БАС, получаемой после центрифугирования при 5000 оборотов в 1 мин в течение 20 мин, определяли содержание белка микробиуретовым методом, протеолитическую и ингибиторную активности. Для стандартизации все показатели рассчитывали на 1 мг белка в пробе БАС.

Протеолитический потенциал БАС оценивали по трем показателям: активности трипсиноподобных протеиназ (ТПП), эластазоподобной и фибринолитической активности (соответственно ЭА и ФА). Трипсиноподобную активность определяли по величине эстеразной активности БАС по отношению к синтетическому субстрату — N,  $\alpha$ -бензоил-L-аргинин-этиловому эфиру (BAEE) спектрофотометрическим методом [7]. ЭА исследовали спектрофотометрическим методом [4, 14] с применением в качестве субстрата N-терт-бутилокси-карбонил-L-аланин-паранитрофенилового эфира (BANPE). Показатели ТПП и ЭА выражали в миллиединицах (мЕ); 1 мЕ равнялась 1 нмоль субстрата, гидролизованного в стандартных условиях за 1 мин. Определение ФА в БАС проводили модифицированным нами

методом, основанным на регистрации разницы между стандартным количеством фибриногена, вводимым в пробу, и содержанием его через 24 ч инкубации с пробой БАС [3].

Ингибиторный потенциал БАС оценивали по величине свободной антитриптической активности (АТА). АТА, формируемую на альвеолярной поверхности преимущественно за счет поступающего из кровяного русла  $\alpha_1$ -протеиназного ингибитора ( $\alpha_1$ -ПИ) [5, 12, 13], определяли по степени торможения трипсинового гидролиза синтетического субстрата BAEE под действием свободных ингибиторов протеолиза, содержащихся в БАС [7]. Результаты выражали в миллиингибиторных единицах (мИЕ). За 1 мИЕ принимали активность ингибитора, тормозящую гидролиз 1 нмоль BAEE трипсином за 1 мин при 25 °C в стандартных условиях.

В качестве ориентировочных условно-нормальных величин для ТПП, ЭА и АТА мы использовали данные О. Г. Оглобиной и соавт. [7], применявших аналогичные методы для анализа бронхиальных смывов, которые составили: для ТПП  $1,58 \pm 1,15$  мЕ/мг, для ЭА  $2,22 \pm 1,63$  мЕ/мг, для АТА  $100,0 \pm 16,0$  мИЕ/мг. Для установления взаимосвязи локальных ферментативных сдвигов с общим антипротеолитическим потенциалом организма у всех больных в сыворотке крови определяли активность  $\alpha_1$ -ПИ методом [6], нормальные величины которой, по нашим данным [2], составляют 1,00—1,67 мг/мл.

Достоверность различий между исследованными величинами оценивали с помощью критерия *t* Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

У подавляющего большинства обследованных больных было отмечено снижение уровня антитриптической активности в БАС, полное ее отсутствие у 40 % больных саркоидозом, у 31,6 % больных экзогенным аллергическим альвеолитом и у 23,1 % больных идиопатическим фиброзирующим альвеолитом. Дефициту ингибиторов сопутствовало повышение всех видов исследованной протеолитической активности.

Вариабельность рассмотренных показателей была значительной: АТА колебалась от нормального уровня до нулевых значений, повышение протеолитической активности достигало 7-кратного уровня по отношению к условной норме.

Анализ средних показателей протеолитической активности (табл. 1) не позволил выявить существенного повышения активности ТПП на альвеолярной поверхности при всех изученных заболеваниях. В то же время средний уровень ЭА оказался заметно повышенным у больных саркоидозом и экзогенным аллергическим альвеоли-

Т а б л и ц а 1

Средние показатели содержания белка, протеолитической и антипротеолитической активности в БАС у обследованных больных

Диагноз	Белок, мг/мл	ТПП	ЭА	ФА	АТА
Саркоидоз (70)	$0,70 \pm 0,07$	$3,34 \pm 0,42$	$6,78 \pm 0,63$	$0,41 \pm 0,06$	$60,3 \pm 7,9$
Экзогенный аллергический альвеолит (19)	$0,47 \pm 0,04$	$2,63 \pm 0,7$	$5,92 \pm 1,69$	$0,73 \pm 0,16$	$87,5 \pm 21,9$
Идиопатический фиброзирующий альвеолит (13)	$0,51 \pm 0,06$	$3,02 \pm 0,76$	$3,58 \pm 1,71$	$0,25 \pm 0,07$	$89,7 \pm 20,5$

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2 и 3 в скобках — число больных.

том. У больных с идиопатическим фиброзирующим альвеолитом отмечали низкий уровень ЭА. Отсутствие этого вида протеолитической активности в БАС наблюдали при идиопатическом фиброзирующем альвеолите в 69,2 % случаев, в то время как при саркоидозе и экзогенном аллергическом альвеолите — значительно реже (в 10 и 26,3 % случаев соответственно). Средний показатель ФА при идиопатическом фиброзирующем альвеолите был также заметно ниже, чем при двух других заболеваниях. Такие на первый взгляд парадоксальные данные, как минимальное повышение уровня протеолитической активности в респираторной системе при наиболее неблагоприятно протекающем дистрофическом процессе в легочной ткани, соответствуют современным представлениям о том, что развитие избыточного пневмофиброза при идиопатическом фиброзирующем альвеолите является следствием недостаточной резорбции фибрина [11]. Снижение средних показателей АТА в БАС было выражено несколько больше при саркоидозе.

Для выявления возможных механизмов развития дисбаланса между про-

теиназами и их ингибиторами в БАС мы провели ряд клинико-лабораторных сопоставлений. Оказалось, что при наличии воспалительных изменений бронхиальной слизистой различного характера, присутствии патогенной микрофлоры в мокроте, повышенном содержании нейтрофильных лейкоцитов в БАС отмечалось достоверно более значительное повышение протеолитической активности, чем при отсутствии указанных изменений. Вместе с тем при саркоидозе органов дыхания было установлено, что в случаях изолированного поражения внутригрудных лимфоузлов уровень ЭА в БАС был достоверно ниже, чем при наличии легочной диссеминации ( $2,9 \pm 0,75$  и  $7,58 \pm 0,7$  мЕ/мг;  $p < 0,01$ ). Это, на наш взгляд, может свидетельствовать об участии высокого уровня свободной эластолитической активности в формировании распространенного легочного поражения при саркоидозе.

Нами найдена отчетливая зависимость уровня антипротеолитической и, соответственно, протеолитической активности в БАС от состояния ингибиторной системы крови. Известно, что

Т а б л и ц а 2

Влияние состояния ингибиторной системы крови на протеолитическую и антипротеолитическую активность БАС

Состояние ингибиторной системы крови ( $\alpha_1$ -ПИ)	Белок, мг/мл	ТПП	ЭА	ФА	АТА
1. Нормальное (23)	$0,64 \pm 0,09$	$2,01 \pm 0,76$	$4,03 \pm 1,02$	$0,38 \pm 0,12$	$78,5 \pm 23,7$
2. Активация (33)	$0,73 \pm 0,12$	$1,89 \pm 0,71$	$4,18 \pm 1,31$	$0,31 \pm 0,08$	$101,9 \pm 22,2$
3. Функциональный дефицит (46)	$0,56 \pm 0,08$	$4,71 \pm 0,62$	$8,76 \pm 1,48$	$0,56 \pm 0,14$	$42,1 \pm 16,4$
$p_{1-3}$	$>0,05$	$<0,01$	$<0,01$	$>0,05$	$>0,05$
$p_{2-3}$	$>0,05$	$<0,01$	$<0,02$	$>0,05$	$<0,05$

Исходный уровень протеолитической и антипротеолитической активности в БАС у больных с различной динамикой саркоидоза органов дыхания

Динамика	Белок, мг/мл	ТПП	ЭА	ФА	АТА
1. Спонтанная регрессия (24)	$0,94 \pm 0,16$	$2,20 \pm 0,57$	$4,38 \pm 0,87$	$0,52 \pm 0,12$	$73,7 \pm 12,0$
2. Выраженная положительная (20)	$0,57 \pm 0,06$	$3,22 \pm 0,82$	$5,28 \pm 0,82$	$0,34 \pm 0,08$	$83,6 \pm 15,9$
3. Замедленная (26)	$0,59 \pm 0,08$	$4,30 \pm 0,77$	$10,15 \pm 1,11$	$0,34 \pm 0,11$	$33,7 \pm 11,1$
$p_{1-3}$	$<0,05$	$<0,05$	$<0,01$	$>0,05$	$<0,02$
$p_{2-3}$	$>0,05$	$>0,05$	$<0,01$	$>0,05$	$<0,05$

$\alpha_1$ -ПИ является острофазным воспалительным белком и повышение его в крови является свидетельством воспалительной реакции [2]. У обследованных больных повышение  $\alpha_1$ -ПИ при первом определении было выявлено в 31 (30,4 %) случае, у 3 больных уровень сывороточного  $\alpha_1$ -ПИ был умеренно снижен, а у большинства (66,7 %) больных оказался нормальным. С учетом клинко-рентгенологических и лабораторных признаков активности заболеваний и показателей  $\alpha_1$ -ПИ мы разделили больных на 3 группы: 1-я — 23 больных с отсутствием выраженных клинко-лабораторных признаков активности воспалительной реакции и нормальном уровне  $\alpha_1$ -ПИ в крови (нормальное состояние ингибиторной системы); 2-я — 33 больных с повышением уровня  $\alpha_1$ -ПИ при активном воспалении (активация) и 3-я — 46 больных с отсутствием адекватного повышения  $\alpha_1$ -ПИ, несмотря на активность процесса, что мы рассценивали как «функциональный дефицит»  $\alpha_1$ -ПИ. В случаях отсутствия адекватного повышения  $\alpha_1$ -ПИ при всех заболеваниях были отмечены достоверно более значительное снижение АТА и повышение ТПП и ЭА в БАС (табл. 2).

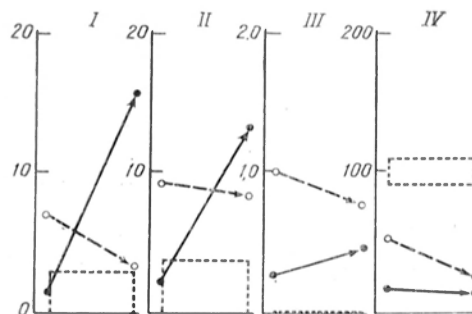
Таким образом, оказалось, что скрытая неполноценность общей ингибиторной системы организма является важным фактором развития дисбаланса между протеиназами и ингибиторами в респираторной системе у больных с диффузными поражениями легких.

Анализируя взаимосвязь состояния системы протеиназы — ингибиторы в БАС с динамикой течения заболевания, мы сравнивали исходный уровень протео- и антипротеолитической актив-

ности в БАС в наиболее показательной группе больных с саркоидозом органов дыхания. Оказалось, что у 24 больных с тенденцией к спонтанной регрессии заболевания и у 20 больных с наличием выраженной положительной динамики после первых 1,5—2 мес лечения кортикостероидами дефицит АТА и повышение ТПП и ЭА в БАС были достоверно менее выражены, чем у 26 больных с замедленной динамикой процесса (табл. 3).

Мы провели повторное биохимическое исследование БАС у 7 больных саркоидозом органов дыхания. Из них в 3 случаях отмечено прогрессирование заболевания у больных, не получавших лечения, в 4 показанием для повторной бронхоскопии с бронхоальвеолярным лаважем явилось отсутствие эффекта от лечения кортикостероидами в течение 2 мес.

Данные двукратного биохимического исследования БАС позволили установить, что у больных с отсутствием



Динамика средних показателей протеолитической и антипротеолитической активности при различном течении саркоидоза органов дыхания.

I — ТПП (в мг/мг); II — ЭА (в мг/мг); III — ФА (в мгФ/мг); IV — АТА (в МИЕ/мг). Сплошные линии — прогрессирующее течение; прерывистые — отсутствие эффекта от лечения; пунктир — границы условных норм.

эффекта после 2-месячного курса кортикостероидной терапии сохранялись исходно повышенный уровень всех видов протеолитической активности и дефицит АТА. При прогрессировании саркоидоза удерживалось исходное снижение АТА, но при этом отмечалось значительное нарастание показателей протеолитической активности (см. рисунок).

Таким образом, у больных саркоидозом органов дыхания, экзогенным аллергическим и идиопатическим фиброзирующим альвеолитами в активной фазе в бронхоальвеолярных смывах наблюдаются дефицит антипротеолитической и повышение протеолитической (трипсино- и эластазоподобной и фибринолитической) активности. Эти изменения — проявление как локального, так и общего патологического процесса. Результаты исследования протео- и антипротеолитической активности в бронхоальвеолярных смывах могут быть использованы в качестве дополнительного критерия при оценке активности, прогноза и динамики указанных заболеваний.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Илькович М. М. // Диссеминированные процессы в легких. — Л., 1984. — С. 4—9.
2. Каминская Г. О., Жукова Н. Л., Серебряная Б. А. и др. // Пробл. туб. — 1980. — № 8. — С. 55—60.
3. Каминская Г. О., Жукова Н. Л., Степанян И. Э., Ловачева О. В. // Лаб. дело. — 1983. — № 6. — С. 20—22.
4. Каминская Г. О., Жукова Н. Л., Степанян И. Э. // Там же. — 1984. — № 2. — С. 110—113.
5. Каминская Г. О. // Пробл. туб. — 1985. — № 5. — С. 63—71.
6. Нартикова В. Ф., Пасхина Т. С. // Современные методы в биохимии. — М., 1977. — С. 188—191.

7. Оглоблина О. Г., Платонова Л. В., Мясникова Л. В. и др. // Вопр. мед. химии. — 1980. — № 3. — С. 387—392.
8. Путов Н. В., Походзей Н. В., Колодкина Л. А. // Тер. арх. — 1985. — № 3. — С. 144—148.
9. Филиппов В. П., Залеская Ю. М., Тарковская Н. Э. // Пробл. туб. — 1981. — № 4. — С. 54—57.
10. Хоменко А. Г., Озерова Л. В. // Там же. — 1985. — № 1. — С. 25—29.
11. Chapman H. A., Allen Ch. R., Stone A. L. // Amer. Rev. resp. Dis. — 1986. — Vol. 133. — P. 437—443.
12. Janoff A. // Ibid. — 1982. — Vol. 126. — P. 1070—1073.
13. Stockley R. A. // Clin. Sci. — 1983. — Vol. 64. — P. 119—126.
14. Visser L., Blout E. R. // Biochim. biophys. Acta. — 1972. — Vol. 268. — P. 257—260.

Поступила 10.09.87

#### THE STATE OF PROTEINASE-INHIBITOR SYSTEM IN BRONCHOALVEOLAR LAVAGE OF PATIENTS WITH DIFFUSE IMPAIRMENTS OF LUNGS

G. O. Kaminskaya, I. E. Stepanyan, N. L. Zhukova

Central Institute of Tuberculosis, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

Proteolytic and antiproteolytic activities were studied in bronchoalveolar lavages of 102 patients with sarcoidosis of respiratory tissues, exogenous allergic and idiopathic fibrotic alveolitis. Deficiency of the antiproteolytic activity was observed in all the impairments studied, whereas elastase-like and fibrinolytic activities were distinctly increased in sarcoidosis and exogenous allergic alveolitis. Impairments of bronchial mucose, pathogenic microflora, increase in content of neutrophils in respiratory tract as well as potential deficiency of the body inhibitory system were responsible for disturbance in the system proteinases-inhibitors of bronchoalveolar lavage. Biochemical examination of bronchoalveolar lavages enabled to find that clinico-roentgenological dynamics of these diseases correlated with the level of proteolytic activity.

УДК 616.13-004.6-092:[616.36-008.93:577.112.856]-02:613.863

Ф. З. Меерсон, В. П. Твердохлиб, А. А. Никоноров

#### ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ АТЕРОГЕННЫХ ДИСЛИПОПРОТЕИДЕМИЙ И КОМПЛЕКСА МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ В ПЕЧЕНИ ПРИ ЭМОЦИОНАЛЬНО-БОЛЕВОМ СТРЕССЕ

НИИ общей патологии и патологической физиологии АМН СССР, Москва, Оренбургский медицинский институт

Экспериментальные и клинические наблюдения показали, что печень играет важную роль в атерогенезе [1, 2, 6, 13, 21]. Однако вопрос о том, какие конкретно нарушения метаболизма

в этом центральном органе липидного обмена возникают под влиянием тяжелого стрессорного воздействия, в частности при развитии атерогенных стрессорных дислипидотендезий, во многом



остается открытым [7, 11, 12, 25]. Неизвестно также, каким образом реализуются на уровне печени эффекты защитных факторов, с помощью которых удалось предотвратить или существенно ограничить атерогенные изменения в липопротеидном спектре крови, в частности антиоксидантов, адаптации к умеренной гипоксии или кратковременным стрессорным воздействиям [11, 12].

Цель настоящей работы — попытка изучить отдельные биохимические механизмы повреждения печени, лежащие в основе атерогенных стрессорных дислипидотропических, и оценить защитный гепатотропный эффект факторов, предупреждающих эти дислипидотропические.

### Методика

Опыты проводили на крысах-самцах Вистар массой 180—220 г. Эмоционально-болевого стресс (ЭБС) в виде невроза тревоги вызывали по методу [18]. Стрессорное воздействие продолжалось 6 ч. Адаптацию к повторным стрессорным воздействиям воспроизводили, вызывая у животных кратковременный ЭБС: в 1-й день в течение 15 мин, во 2-й день — 30 мин, в 3-й день — 45 мин, в последующие 11 дней — по 60 мин ежедневно. Адаптацию животных к гипоксии проводили в барокамере, начиная с «высоты» 1000 м, постепенно увеличивая ее до 5000 м, по 6 ч в день в течение 45 дней. Через сутки после завершения последнего сеанса адаптации к коротким стрессам и гипоксии животных подвергали длительному (в течение 6 ч) ЭБС. Антиоксидант ионол вводили в течение 3 дней перед стрессом ежедневно перорально в дозе 20 мг на 1 кг массы тела в 0,5 мл подсолнечного масла.

Животные были разделены на 8 групп: 1-ю группу составили интактные животные (контроль), 2-ю — животные, перенесшие ЭБС и взятые в опыт через сутки после завершения стрессорного воздействия, 3-ю — крысы, адаптированные к кратковременным стрессорным воздействиям, 4-ю — животные, подвергавшиеся стрессу на фоне адаптации к кратковременным стрессорным воздействиям, 5-ю — крысы, адаптированные к гипоксии, 6-ю — особи, перенесшие ЭБС на фоне завершённой адаптации к гипоксии, 7-ю — животные, получавшие ионол, и, наконец, 8-ю — крысы, перенесшие ЭБС после предварительного введения ионола. Во всех случаях животных брали в опыт через сутки после окончания стрессорного воздействия. Сыворотку крови и ткань печени для биохимических исследований получали и обрабатывали, как описано ранее [11]. Для оценки липидного обмена в сыворотке крови определяли содержание общего холестерина ( $ХС_{общ}$ ), уровень триглицеридов (ТГ), содержание холестерина в липопротеидах высокой плотности (ЛПВП) после осаждения апо-В-содержащих липопротеидов  $MnCl_2$  и гепарином [10]. При этом

исходили из известного положения о том, что между уровнем  $ХС_{ЛПВП}$  и атеросклеротическим поражением сосудов существует отрицательная корреляция, а между уровнями липопротеидов низкой и очень низкой плотности, напротив, положительная [1, 13, 19, 20, 22]. По полученным данным рассчитывали интегральный показатель — индекс атерогенности (ИА), равный отношению

$$\frac{ХС_{общ} - ХС_{ЛПВП}}{ХС_{ЛПВП}} \quad [1].$$

Для оценки состояния процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в печени определяли содержание одного из продуктов ПОЛ — малонового диальдегида (МДА) по методу [24] и активность супероксиддисмутазы (СОД) по методу [17]. В качестве критерия повреждения печени оценивали активность органоспецифического цитоплазматического фермента — фруктозо-1-фосфаталядозы (Ф-1-ФА) в сыворотке крови [3].

Дополнительно оценивали влияние стресса на процесс окисления  $ХС$  в желчные кислоты. Для этого животным внутривенно вводили альбумин-стабилизированную эмульсию 7 (п)- $\alpha$ - $[^3H]$ -Cholesterol фирмы «Amersham» в дозе 0,4 мл эмульсии с общей радиоактивностью  $13 \cdot 10^6$  имп/мин. При этом исходили из разработанных ранее методов, основанных на том, что в реакции 7- $\alpha$ -гидроксилирования  $ХС$  1 атом трития переходит в состав воды и что количество образующейся  $^3H_2O$ , отражает скорость реакции окисления  $ХС$  в микросомальной системе печени [4,9].

Через 2, 4 ч, а затем через каждые сутки собирали выделенную животными мочу, свободную от примесей, обрабатывали ее 20 % раствором ТХУ и перегоняли в микродистилляторе. Для подсчета радиоактивности  $^3H_2O$  мочи использовали сцинтилляционный счетчик LS-100 Beckman. При оценке скорости окисления  $ХС$  в разных сериях эксперимента количество  $^3H_2O$  в моче животных 1-й группы принимали за 100 %.

Полученные данные обрабатывали статистически с использованием  $t$ -критерия Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

Данные табл. 1 свидетельствуют о том, что под влиянием длительного ЭБС развивается дислипидотропическая с характерными диспропорциями в распределении  $ХС$  между липопротеидами различной плотности. Эти изменения достигают максимума через сутки после окончания стресса, при этом содержание  $ХС$  во фракции ЛПВП оказывается уменьшенным более чем в 2 раза, а индекс атерогенности увеличен в 4 раза по сравнению с контролем. Существенно, что постепенная адаптация животных к действию умеренной дозированной гипоксии значительно увеличивает долю  $ХС$ , сосредоточенного в ЛПВП — основной «анти-атерогенной» фракции сыворотки кро-

## Предупреждение стрессорной дислиппротеидемии с помощью адаптации и антиоксиданта ионола

Группа животных	ХС <sub>общ</sub> , мг/дл	ХС <sub>ЛПВП</sub> , мг/дл	ТГ, мг/дл	Индекс атерогенности
1-я (9)	70,8±3,5	52,6±2,8	52,84±4,2	0,35
2-я (9)	58,6±4,5	22,7±1,7	40,8±3,2	1,6
$p_{1-2,3}$		<0,001		
3-я (9)	65,4±6,8	48,4±3,2	20,2±3,4	0,35
$p_{3-1,2,4}$		<0,001	<0,001	
4-я (8)	55,4±5,6	32,7±4,1	8,8±1	0,7
$p_{3-4}$		<0,001	<0,001	
5-я (10)	73,6±3	63,6±3	31,2±3,6	0,15
$p_{1,2,3,4-5}$		<0,01	<0,001	
6-я (10)	63,8±2	45,9±3	22,9±3	0,35
$p_{5-6}$		<0,001	<0,05	
7-я (10)	68,2±6	50,2±4	50,8±7	0,36
8-я (10)	65,8±1,3	34,7±3,1	34±5,6	0,8
$p_{7-8}$		<0,001		

Примечание. Здесь и в табл. 2 приведены данные, полученные через 24 ч после завершения ЭБС, в скобках — число животных в группе.

ви и приводит к отчетливому снижению уровня ТГ сыворотки крови по сравнению с контролем. При этом ИА у животных, адаптированных к гипоксии, был в 2 раза ниже, чем в группе интактных крыс. ЭБС, воспроизведенный на фоне завершённой адаптации к гипоксии, не вызывал у животных значительных изменений в распределении ХС между липопротеидами различной плотности, приводил к еще большему снижению уровня ТГ в сыво-

ротке крови; ИА в этой группе не отличался от контроля.

Полученные результаты свидетельствуют как о снижении атерогенных свойств сыворотки крови животных, адаптированных к периодической гипоксии, так и об их большей устойчивости к развитию стрессорной дислиппротеидемии. Сходный, но менее выраженный антиатерогенный эффект выявлен и при адаптации животных к кратковременным стрессорным воздействиям. Таким образом, обе использованные формы адаптации предупреждали развитие стрессорной атерогенной дислиппротеидемии.

При введении ионола уровень ХС<sub>лпвп</sub> был более высоким, а ИА — более низким, чем в группе незащищенных животных. По-видимому, ионол не предупреждает, но заметно ограничивает развитие атерогенной стрессорной дислиппротеидемии.

Учитывая защитный эффект ионола и установленный ранее факт снижения активности лецитин:холестерин-ацил-трансферазы в печени при стрессорном воздействии, мы предположили, что при тяжелом стрессе в печени, так же как и в других органах [5, 6, 8] происходит активация ПОЛ, приводящая к повреждению клеток. Данные, представленные в табл. 2, согласуются с указанным предположением и свидетельствуют о том, что под влиянием ЭБС в печени увеличивается в 2 раза содержание МДА и снижается активность СОД — основного антиоксидант-

Таблица 2

Содержание малонового диальдегида, активность супероксиддисмугазы в гомогенатах печени и активность фруктозо-1-фосфатальдозазы в сыворотке крови при стрессе

Группа животных	Содержание МДА, нмоль на 1 мг белка	Активность СОД, усл. ед.	Активность Ф-1-ФА, усл. ед.
1-я	2,8±0,1 (10)	64,6±7,3 (6)	2,7±0,1 (10)
2-я	5,6±0,3* (10)	50,33±4* (6)	10,2±0,3* (10)
3-я	3,0±0,15 (10)	107±4,8* (13)	2,2±0,2 (10)
4-я	3,6±0,4 (9)	75±8,5* (6)	5,2±0,5* (9)
5-я	3,5±0,2 (9)	93,8±4* (10)	3,2±0,2 (9)
6-я	3,8±0,4 (10)	80,6±5,6 (10)	5±0,3* (10)
7-я	2,1±0,2 (10)	78,4±4 (6)	1,7±0,2 (10)
8-я	2,3±0,3 (9)	68±2,6 (6)	3,6±0,2* (9)

\*  $p < 0,01$ .

ного фермента. Существенно, что активность СОД наиболее резко угнеталась уже через 2 ч после окончания 6-часового стресса — до  $30,8 \pm 2$  против  $64,6 \pm 7$  ед. активности на 1 мг белка в контроле.

Адаптация к гипоксии и кратковременным стрессорным воздействиям приводила к достоверному повышению активности СОД в печени на 66 и 44 %, не влияя существенно на содержание в ней МДА. ЭБС, воспроизведенный на фоне такого рода адаптаций, лишь незначительно активизирует ПОЛ, вызывая повышение содержания МДА на 17 и 25 % соответственно ( $p > 0,05$ ). Ионол, подобно адаптации, предупреждает активацию ПОЛ и накопление МДА в печени после ЭБС, но при этом достоверно не влияет на активность СОД.

Адаптационное повышение активности антиоксидантных ферментов и ограничение за счет этого механизма стрессорной активации ПОЛ выявлено ранее в сердце [5], мозге [8] и, по-видимому, является важным звеном функционирования защитных антиоксидантных систем организма. При этом если адаптационная защита печени от стресса реализуется прежде всего на уровне ферментных антиоксидантных систем организма, то эффект экзогенных антиоксидантов, по-видимому, связан с их действием на уровне системы ПОЛ.

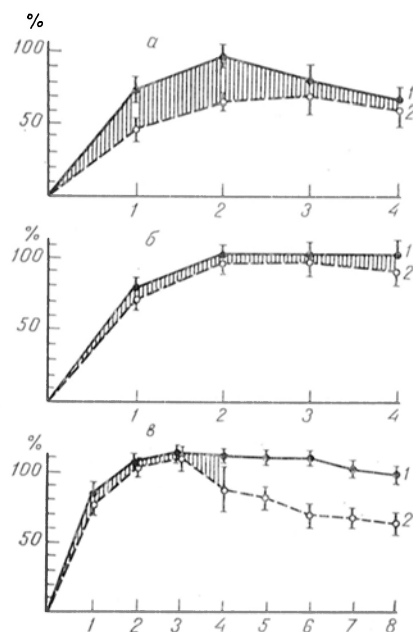
Весьма важным представляется тот факт, что у незащищенных животных ЭБС вызывает увеличение в 4 раза активности Ф-1-ФА в сыворотке крови. Эта органоспецифичная гиперферментемия, отражающая повреждение клеток печени, полностью предупреждается адаптацией к гипоксии или введением ионола и достоверно (в 2 раза) ограничивается адаптацией к повторным кратковременным стрессорным воздействиям.

В целом, выраженная активация ПОЛ и ингибирование антиоксидантной защиты, гиперферментемия Ф-1-ФА свидетельствуют о высокой чувствительности печени к стрессу. Адаптационная или химическая защита этого органа предупреждает стрессорную атерогенную дислиппротеидемию, в которой повреждение печени играет решающую роль.

Полученные результаты послужили предпосылкой для использования

адаптации животных к гипоксии и ионола для защиты механизма окисления ХС в желчные кислоты, который оказывается нарушенным при стрессе и может играть важную роль в развитии стрессорных атерогенных дислиппротеидемий.

Кривые на рисунке отражают результаты измерения скорости окисления 7 (п) —  $\alpha$ [ $^3\text{H}$ ]-ХС по количеству образующейся в этой реакции  $^3\text{H}_2\text{O}$ , выделяемой животными с мочой. Как видно, у контрольных животных наибольшее количество  $^3\text{H}_2\text{O}$  в моче, а значит и максимальная скорость окисления ХС в желчные кислоты, отмечается ко 2-м суткам после введения меченого  $^3\text{H}$ -ХС в организм. ЭБС, перенесенный животными непосредственно перед введением меченого субстрата, уменьшает на  $1/3$  скорость гидроксилирования ХС в течение первых 1—2 сут. Показано, что применение перед стрессом адаптации к гипоксии или введение антиоксиданта ионола предупреждает стрессорную депрессию окисления ХС в печени. Заштрихованная зона количественно характеризует величину



Влияние антиоксиданта ионола и адаптации к гипоксии на скорость окисления ХС в печени крыс при стрессе (в % от соответствующего контроля).

По оси абсцисс — длительность наблюдений после завершения стрессорного воздействия (в сут), по оси ординат — специфическая активность  $^3\text{H}_2\text{O}$  в моче животных а: 1 — intactные животные, 2 — стресс; б: 1 — ионол, 2 — ионол + стресс; в: 1 — адаптация; 2 — адаптация + стресс.

стрессорного снижения скорости окисления ХС в печени, ясно выраженную у незащищенных животных. Видно также, что эта депрессия становится несущественной в результате антиоксидантной или химической защиты.

Таким образом, выявленное стрессорное повреждение печени сопровождается нарушением активности системы цитохрома Р-450 и его важной функциональной изоформы — 7- $\alpha$ -ХС-гидроксилазы, лимитирующая трансформацию ХС в желчные кислоты и элиминацию его из организма. Предупреждение этого нарушения предотвращает и развитие стрессорной атерогенной дислиппротеидемии. Следовательно, имеются реальные основания для того, чтобы считать стрессорные повреждения печени и возникающее при этом угнетение активности 7- $\alpha$ -ХС-гидроксилазы одним из важных механизмов атерогенной дислиппротеидемии, а следовательно и атеросклероза. Этот факт хорошо согласуется с тем, что предварительная индукция 7- $\alpha$ -ХС-гидроксилазы фенобарбиталом уменьшает гиперхолестеринемию, вызванную экзогенным ХС [4, 9, 23]. Аналогичным образом, прирост цитохрома Р-450 и активация 7- $\alpha$ -ХС-гидроксилазы, индуцированные полихлорированными дифенолами в сочетании с клофибратом, влекут за собой увеличение скорости метаболизма ХС в печени и снижение содержания ХС в крови [23].

Можно полагать, что адаптационная, или антиоксидантная защита печени при стрессе, а также направленная индукция биосинтеза 7- $\alpha$ -ХС-гидроксилазы могут явиться одним из перспективных путей предупреждения атерогенных дислиппротеидемий различного происхождения и играть существенную роль в развитии новых методов профилактики атеросклероза.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Климов А. Н. // Превентивная кардиология. — М., 1977. — С. 260—321.
2. Климов А. Н., Герасимова Е. Н., Шестов Д. Б. и др. // Кардиология. — 1979. — № 4. — С. 61—67.
3. Колб В. Г., Камышников В. С. Клиническая биохимия. — Минск, 1976. — С. 74—77.
4. Лопухин Ю. М., Арчаков А. И., Владимиров Ю. А., Коган Э. М. Холестериноз. — М., 1983.
5. Меерсон Ф. З. Адаптация, стресс и профилактика. — М., 1981.

6. Никитин Ю. П., Курилович С. А., Давидик Г. С. Печень и липидный обмен. — Новосибирск, 1985.
7. Положенцев С. Д., Руднев В. И. // Физиология человека. — 1986. — Т. 12, № 6. — С. 956—960.
8. Прилипко Л. Л., Каган В. Е., Меерсон Ф. З. // Бюл. exper. биол. — 1983. — № 11. — С. 6—8.
9. Салганик Р. И., Мананкова Н. М., Семенова Л. А. // Вopr. мед. химии. — 1977. — № 4. — С. 468—473.
10. Современные методы исследования липопротеидов высокой плотности: Метод. рекомендации. — М., 1983.
11. Твердохлиб В. П., Лобанова Г. Т., Меерсон Ф. З. // Бюл. exper. биол. — 1986. — № 12. — С. 681—683.
12. Твердохлиб В. П., Меерсон Ф. З. // Физиология и патофизиология сердца и коронарного кровообращения. — Киев, 1987. — С. 160.
13. Титов В. Н., Руднев В. И., Творогова М. Г. // Кардиология. — 1981. — № 1. — С. 103—109.
14. Хомуло П. С. // Там же. — 1974. — № 5. — С. 140—147.
15. Хомуло П. С. Эмоциональное напряжение и атеросклероз. — Л., 1982.
16. Физиология адаптационных процессов / Меерсон Ф. З., Пшенникова М. Г., Барбараш Н. А. и др. — М., 1986.
17. Beauchamp C., Fridovich J. // Analyt. Biochem. — 1971. — Vol. 44, N 1. — P. 276—287.
18. Desiderato O., MacKinnon J. R., Hisson H. J. // J. comp. Physiol. Psychol. — 1974. — Vol. 87, N 2. — P. 208—214.
19. Gordon T., Castelli W. P., Hjortland M. C. et al. // Amer. J. Med. — 1977. — Vol. 62. — P. 707—714.
20. Heis G., Johnson N. J., Reiland S. et al. // Circulation. — 1980. — Vol. 62, Suppl. IV. — P. 116—136.
21. Levy R., Fridrickson D., Shulman R. et al. // Ann. intern. Med. — 1972. — Vol. 77. — P. 267—294.
22. Miller G. J., Miller N. E. // Lancet. — 1975. — Vol. 1. — P. 16—19.
23. Nakagawa M., Shimokawa T., Noguchi A. et al. // Lipids. — 1986. — Vol. 21, N 2. — P. 159—163.
24. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. // Analyt. Biochem. — 1979. — Vol. 95. — P. 351—358.
25. Wolf S. G. // Stress and Heart Disease / Ed. R. E. Beamish et al. — Boston, 1985. — P. 3—16.

Поступила 29.03.87

#### PREVENTION OF STRESS-DEPENDENT IMPAIRMENTS OF LIVER TISSUE AND OF ATHEROGENOUS DISLIPOPROTEINEMIAS BY PREADAPTATION TO HYPOXIA, SHORT-TERM STRESSORY EFFECTS AND ANTIOXIDANTS

F. Z. Meerson, V. P. Tverdokhlib, A. A. Nikonov

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

Atherogenous dislipoproteinemia, involving a decrease in HDL cholesterol and 3-4-fold in-

crease in the atherogeneity index was found to develop in rats after emotional-pain-dependent stress. Lipid peroxidation was activated in liver tissue of the animals, which was expressed as an increase in the MDA content, a decrease in SOD activity and as marked activation of fructose 1-phosphate aldolase, an enzyme specific for liver tissue, in blood serum. The impairment of liver tissue caused an inhibition of  $7\alpha$ -cholesterol hydroxylase — key enzyme of cholesterol hydroxylation into bile acids; the phenomenon may be of importance in develop-

ment of dislipoproteinemias. Preadaptation of the animals to moderate hypoxia as well as administration of an antioxidant ionol prevented the activation of lipid peroxidation in liver tissue, liberation of fructose 1-phosphate aldolase into blood, depression of  $7\alpha$ -cholesterol hydroxylase and protected against the stress-dependent atherogenous dislipoproteinemia. Possible chemical and adaptational protection of liver, which is a very stress-sensitive tissue, is discussed.

УДК 616.831-005.4-085.217.24]-036.8-07:616.831-008.921.8-074

*С. Ст. Лиходий, С. С. Лиходий, Л. А. Сибельдина, Н. А. Семенова*

## **ВЛИЯНИЕ ВЕРАПАМИЛА НА ДИНАМИКУ СНИЖЕНИЯ УРОВНЕЙ МАКРОЭРГИЧЕСКИХ ФОСФАТОВ МОЗГА ПРИ ИШЕМИИ ПО ДАННЫМ $^{31}\text{P}$ -ЯМР СПЕКТРОСКОПИИ IN VIVO**

Институт химической физики АН СССР, Москва, Целиноградский медицинский институт

Известно важное значение ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в регуляции внутриклеточного метаболизма и функциональной активности ЦНС [2]. Рядом исследований была предпринята попытка использовать Са-антагонисты (верапамил, нифедипин, галлопамил и др.) для предупреждения Са-зависимых клеточных повреждений мозга при ишемии [11]. Установлено, что под влиянием Са-блокаторов происходит стимуляция мозгового кровотока [11], в нейронах ингибируется захват внеклеточного Са [7], повышается уровень  $\text{NAD}^+$  [9], снижается число инфарктных зон мозга при локальной ишемии. Вместе с тем некоторые авторы [6] не обнаружили положительного эффекта от применения Са-блокаторов, есть также сообщения [8] об их отрицательном влиянии на ионный гомеостаз и энергетический статус клеток.

В настоящей работе методом  $^{31}\text{P}$ -ЯМР in vivo изучено влияние верапамила на динамику снижения уровней фосфорсодержащих метаболитов в мозге крысы в период 30-минутной ишемии.

### **Методика**

Исследования проведены на 36 белых беспородных крысах-самцах массой 150–200 г, разделенных на 3 группы. Животным 1-й группы (контроль) препарат не вводили, крысам 2-й группы за 30–40 мин до моделирования ишемии внутрибрюшинно вводили верапамил в дозе 5 мг/кг, животным 3-й группы верапамил (0,5 мг/кг, объем 0,05 мл) вводили в желудочки мозга. Полную ишемию у крыс

моделировали остановкой дыхания и кровообращения двумя способами (две модели ишемии). При первом из них остановку дыхания и кровообращения вызывали путем электрофибрилляции сердечной мышцы переменным электрическим током напряжением 27 В (ток подавали на пару игольчатых электродов, закрепляемых под кожей грудной клетки в области сердца); при втором — введением раствора ацетилхолина (100 мг/кг) в бедренную вену по методике, описанной ранее [4]. Остановку дыхания и сердечной деятельности контролировали по исчезновению электрической активности сердца и дыхательных движений, регистрируемых с помощью электрокардиографа. Все манипуляции проводили на животных, находившихся под тиопенталовым наркозом (80–90 мг/кг внутривенно).

Спектры  $^{31}\text{P}$ -ЯМР мозга крыс регистрировали на спектрометре ЯМР Фурье ЛМ-400 фирмы «Bruker» (резонансная частота для ядер фосфора 162 МГц,  $B_0 = 9,4$  Т) с использованием датчика ЯМР с поверхностной катушкой специальной конфигурации [5].

Перед фиксацией крысы в датчике ЯМР у наркотизированного животного скальпировали участок головы (1×2 см). Тесный контакт этого участка с поверхностной катушкой датчика осуществляли с помощью стереотаксического устройства. Улучшения однородности магнитного поля  $B_0$  добивались оптимизацией токов шиммовых катушек при наблюдении сигнала протонов тканевой воды.

Спектр  $^{31}\text{P}$ -ЯМР получали после Фурье-преобразования усредненных за 1,5–2 мин сигналов спада свободной индукции. Условия регистрации спектров описаны ранее.

Эксперимент включал следующие этапы: после снятия первых 3–4 контрольных спектров на электроды, закрепленные на грудной клетке крысы, подавали ток (или в бедренную вену вводили раствор ацетилхолина), после остановки дыхания и сердечной деятельности регистрировали серии спектров  $^{31}\text{P}$ -ЯМР.

Полученные спектры обрабатывали математически на ЭВМ с тем, чтобы устранить широкий сигнал от фосфолипидов мозга (ме-

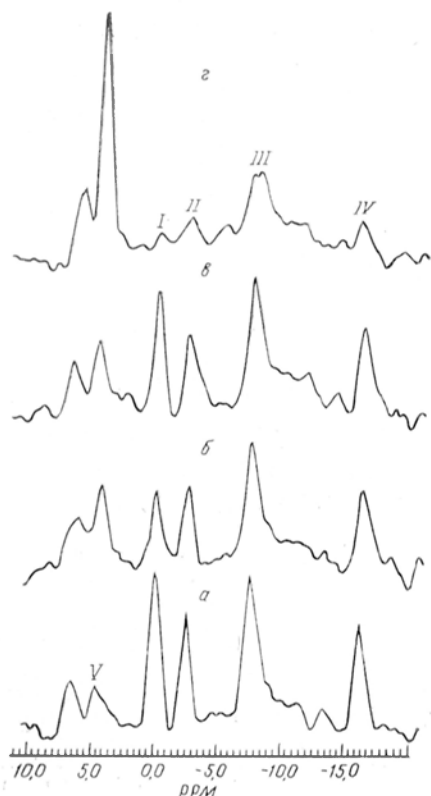


Рис. 1. Спектры  $^{31}\text{P}$ -ЯМР мозга леченных верапамилом и контрольных крыс.

*а* — контроль (до ишемии); через 6 мин ишемии; *б* — внутрибрюшинное введение верапамила, *в* — введение верапамила в желудочки мозга, *г* — без введения препарата. *I* — РСг; *II*, *III*, *IV* — АТФ (соответственно  $\gamma$ - $\alpha$ - и  $\beta$ -остатки); *V* —  $\text{P}_i$ .

год convolution difference [5]), затем определяли интегральные интенсивности линий в спектрах  $^{31}\text{P}$ -ЯМР. Данные обрабатывали статистически с помощью критерия Стьюдента. Всего обработано более 900 спектров.

Значение внутриклеточного  $\text{pH}_i$  вычисляли по формуле [12]:

$$\text{pH}_i = 6,77 + \lg \frac{\delta P_i - 3,29}{5,68 - \delta P_i},$$

где  $\delta P_i$  — химический сдвиг сигнала неорганического фосфата относительно сигнала креатинфосфата (PCr).

## Результаты и обсуждение

### Анализ спектров $^{31}\text{P}$ -ЯМР мозга

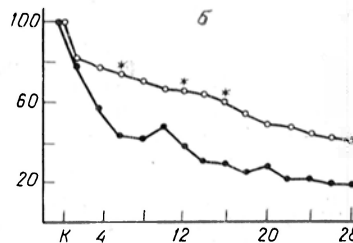
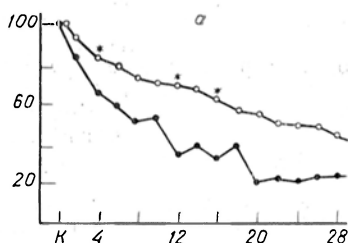


Рис. 2. Влияние предварительного лечения верапамилом (белые кружки) на динамику уровней АТФ (*а*) и РСг (*б*) в тканях мозга крыс при ишемии, вызванной электрофибрилляцией мышцы сердца.

По осям абсцисс — длительность ишемии (в мин); по осям ординат — уровни РСг и АТФ (в %). Звездочка —  $p < 0,05$  по сравнению с контролем (К, черные кружки).

крыс показал, что верапамил, введенный до моделирования ишемии, не оказывал существенного влияния на значения внутриклеточного  $\text{pH}_i$  и уровень фосфорсодержащих метаболитов (за исключением креатинфосфата).

Повышалось отношение РСг/АТФ ( $1,42 \pm 0,08$  при внутрибрюшинном введении верапамила и  $1,47 \pm 0,08$  при введении в желудочки мозга против  $1,31 \pm 0,02$  — в контрольной группе) за счет статистически достоверного роста уровня РСг (в среднем на  $13 \pm 5\%$ ) у леченных животных при неизменном уровне АТФ.

Аналогичное повышение уровня РСг было зарегистрировано методом ЯМР в перфузированном сердце при введении верапамила в среду перфузии.

Выявленное изменение стационарного уровня РСг в контроле у леченных верапамилом животных происходит, по-видимому, из-за смещения равновесия креатинкиназной реакции  $\text{PCr} + \text{ADP} \rightleftharpoons \text{Cr} + \text{ATP}$  в сторону образования РСг и АДФ. Это смещение могло быть вызвано падением пула АДФ вследствие того, что при блокированных каналах на поддержание трансмембранного градиента  $\text{Ca}^{2+}$  (СаАТФаза) расходуется меньшее количество АТФ. Стабильность же уровня АТФ в интактной клетке хорошо регулируется, в частности, путем изменения скорости дыхания митохондрий (акцепторный контроль дыхания) [3].

Во время ишемии обнаружено выраженное влияние верапамила на скорость снижения уровней макроэргических фосфатов мозга (рис. 1). Отмечены различия в темпах расходования макроэргических фосфатов и нарастания уровня неорганического фосфата во время ишемии у леченных верапамилом и контрольных животных (рис. 2 и 3).

Полученные результаты выявили как общие, так и некоторые особые черты влияния верапамила в зависи-



Т а б л и ц а 1

Влияние верапамила (5 мг/кг внутривенно) на показатели биоэнергетики и внутриклеточный ацидоз мозга крыс по данным  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектроскопии *in vivo* в динамике ишемии, вызванной электрофибрилляцией мышцы сердца

Условия опыта	$\text{PCr}/\text{P}_i$	$\beta\text{ATP}/\text{P}_i$	$\text{pH}_i$
Контроль:			
интактные крысы (и)	$2,27 \pm 0,03$	$1,68 \pm 0,06$	$7,12 \pm 0,02$
крысы, получавшие верапамил (в)	$2,31 \pm 0,08$	$1,68 \pm 0,16$	$7,19 \pm 0,03$
Ишемия:			
2 мин			
и	$1,25 \pm 0,12$	$1,03 \pm 0,10$	$6,94 \pm 0,50$
в	$1,27 \pm 0,13$	$1,26 \pm 0,15$	$6,79 \pm 0,11$
4 мин			
и	$0,41 \pm 0,05$	$0,30 \pm 0,04$	$6,77 \pm 0,05$
в	$0,70 \pm 0,09^*$	$0,84 \pm 0,15^*$	$6,74 \pm 0,06$
6 мин			
и	$0,33 \pm 0,03$	$0,25 \pm 0,03$	$6,72 \pm 0,04$
в	$0,73 \pm 0,10^*$	$0,76 \pm 0,13^*$	$6,67 \pm 0,04$
10 мин			
и	$0,27 \pm 0,01$	$0,22 \pm 0,02$	$6,59 \pm 0,03$
в	$0,50 \pm 0,08^*$	$0,54 \pm 0,14^*$	$6,61 \pm 0,05$
20 мин			
и	$0,23 \pm 0,02$	$1,21 \pm 0,03$	$6,60 \pm 0,04$
в	$0,34 \pm 0,04^*$	$0,33 \pm 0,04^*$	$6,53 \pm 0,02$
30 мин			
и	$0,20 \pm 0,03$	$0,23 \pm 0,02$	$6,56 \pm 0,06$
в	$0,28 \pm 0,03$	$0,29 \pm 0,03$	$6,51 \pm 0,02$

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2 звездочка —  $p < 0,05$  по сравнению с интактными крысами.

Т а б л и ц а 2

Влияние верапамила (5 мг/кг внутривенно; 0,5 мг/кг в желудочки мозга) на показатели биоэнергетики и внутриклеточный ацидоз мозга крыс по данным  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектроскопии *in vivo* в динамике ишемии после остановки сердца ацетилхолином

Условия опыта	$\text{PCr}/\text{P}_i$	$\beta\text{ATP}/\text{P}_i$	$\text{pH}_i$
Контроль:			
интактные крысы (и)	$2,27 \pm 0,03$	$1,68 \pm 0,06$	$7,12 \pm 0,02$
крысы, получавшие верапамил внутривенно (в <sub>1</sub> )	$2,31 \pm 0,08$	$1,68 \pm 0,16$	$7,19 \pm 0,03$
крысы, получавшие верапамил в желудочки мозга (в <sub>2</sub> )	$2,32 \pm 0,06$	$1,64 \pm 0,06$	$7,16 \pm 0,01$
Ишемия:			
2 мин			
и	$0,88 \pm 0,08$	$0,77 \pm 0,09$	$6,72 \pm 0,05$
в <sub>1</sub>	$1,56 \pm 0,11^*$	$1,39 \pm 0,12^*$	$7,11 \pm 0,07^*$
в <sub>2</sub>	$1,64 \pm 0,02^*$	$1,37 \pm 0,13^*$	$6,88 \pm 0,20$
4 мин			
и	$0,56 \pm 0,03$	$0,39 \pm 0,03$	$6,56 \pm 0,02$
в <sub>1</sub>	$1,23 \pm 0,14^*$	$1,06 \pm 0,03^*$	$6,87 \pm 0,14^*$
в <sub>2</sub>	$1,65 \pm 0,21^*$	$1,30 \pm 0,26^*$	$6,82 \pm 0,02^*$
6 мин			
и	$0,50 \pm 0,03$	$0,32 \pm 0,02$	$6,55 \pm 0,02$
в <sub>1</sub>	$0,86 \pm 0,13^*$	$0,92 \pm 0,25^*$	$6,74 \pm 0,14$
в <sub>2</sub>	$0,51 \pm 0,06$	$0,37 \pm 0,07$	$6,64 \pm 0,04$
10 мин			
и	$0,44 \pm 0,07$	$0,34 \pm 0,10$	$6,49 \pm 0,01$
в <sub>1</sub>	$0,49 \pm 0,03$	$0,40 \pm 0,05$	$6,46 \pm 0,02$
в <sub>2</sub>	$0,29 \pm 0,05$	$0,23 \pm 0,06$	$6,54 \pm 0,06$

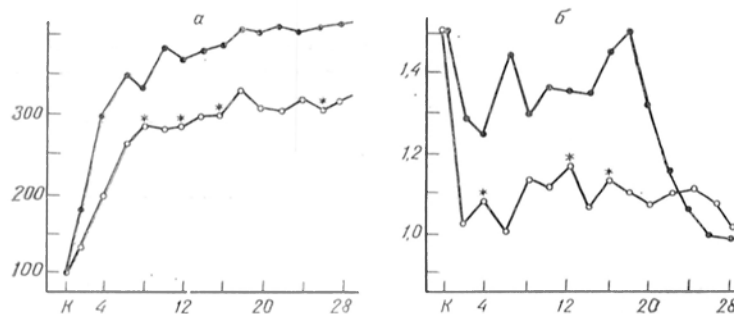


Рис. 3. Влияние предварительного лечения верапамилом на динамику уровня  $P_i$  (а) и соотношения  $PCr/\beta ATP$  (б) в тканях мозга крыс при ишемии, вызванной электрофибрилляцией мышцы сердца. Обозначения те же, что на рис. 2.

мости от примененных моделей ишемии и путей введения препарата в организм.

Так, если в группе крыс с ишемией после остановки сердечной деятельности электрическим током положительный эффект верапамила был заметным и достоверным лишь через 4—6 мин (табл. 1), то в группе с ацетилхолиновой моделью он был очевиден с первых же минут ишемии (табл. 2). В последней группе верапамил снижал и степень внутриклеточного ацидоза в мозге. Здесь его эффект (ацетилхолиновая модель) становился малозаметным к 10-й минуте, в то время как в группе с электрофибрилляцией положительный эффект препарата на макроэргические фосфаты мозга сохранился вплоть до 20-й минуты ишемии, не оказывая, однако, влияния на динамику показателей  $pH_i$  (см. табл. 2). Эти различия связаны с неодинаковой в двух моделях глубины и скоростью развития ишемических явлений, определяемых прежде всего величинами остаточного кровотока, длительностью агонального периода, специфическим воздействием в первом случае электрического тока, во втором — ацетилхолина на метаболизм органов и тканей.

Наряду со специфическими особенностями выявляются и общие закономерности эффектов верапамила. Как в одной, так и в другой группе подопытных животных верапамил достоверно, особенно в первые 4—6 мин ишемии, сдерживал нарастание уровня неорганического фосфата в мозге (см. рис. 3). Медленней в обеих группах по сравнению с контролем падала в спектрах ЯМР интенсивность сигналов  $\beta ATP$  и  $PCr$  (см. рис. 2). Интенсивность сигнала  $\beta ATP$  с начала и до 15—20-й минуты ишемии в 2—3 раза выше у крыс, предварительно леченных верапамилом. Аналогичным, хотя

и несколько менее выраженным (в 1,5—2 раза), было снижение скорости падения при ишемии и уровня  $PCr$ . Поскольку распад  $PCr$  и  $ATP$  сдерживался в неодинаковой степени ( $ATP$  сохраняется лучше), существенно изменилась динамика соотношения  $PCr$  и  $ATP$  у леченых животных (см. рис. 3). Резкое снижение этого показателя ко 2-й минуте ишемии может быть вызвано быстрым расходом  $PCr$  в креатинкиназной реакции в результате смещения ее равновесия в сторону образования  $ATP$ . На этом этапе ишемии благодаря защите клеток от поступления  $Ca^{2+}$ , снижения активности  $ATP$ -азных реакций компенсаторные метаболические процессы (креатин- и аденилаткиназная реакция, гликолиз) способны удовлетворительно поддерживать уровень  $ATP$ . В связи с этим на 2-й минуте ишемии мы наблюдали небольшой по сравнению с контролем дефицит  $ATP$ , содержание которого снижалось всего на  $5,0 \pm 2,0\%$  против  $17,0 \pm 5,0\%$  у нелеченных животных (см. рис. 2). В дальнейшем показатель  $PCr/\beta ATP$  претерпевает колебания в узких пределах, что отражает незначительные изменения соотношения скоростей распада  $PCr$  и  $ATP$ .

Эффективность действия препарата зависела также от способа его введения подопытным животным. При сохранении общих закономерностей влияние верапамила, введенного в желудочки мозга, было более кратковременным. Согласно данным табл. 2, положительный эффект верапамила наблюдался лишь в первые 4—6 мин ишемии. Эту особенность можно объяснить преимущественным влиянием препарата на нервную ткань, в то время как при внутрибрюшинном введении препарат оказывал воздействие и на сердечно-сосудистую систему; известно, что  $Ca$ -блокаторы являются

мощными вазодилататорами, а также улучшают энергетический метаболизм миокарда при ишемии [1]. Зарегистрированное различие эффектов при двух способах введения могло быть связано также с разными по эффективности дозами препарата, непосредственно воздействующими на ткань головного мозга. Тот факт, что независимо от способов введения препарата (связанных и не связанных с преодолением гематоэнцефалического барьера) в эксперименте наблюдается общая тенденция к сохранению уровней макроэргов, свидетельствует о способности верапамила проникать в ткань мозга через гематоэнцефалический барьер.

Таким образом, применение блокатора ионов  $\text{Ca}^{2+}$  верапамила замедляет темпы снижения содержания макроэргических фосфатов в ишемической ткани мозга. В зависимости от путей введения в организм и моделей ишемии интенсивность и продолжительность положительного действия препарата на биоэнергетику ЦНС неодинаковы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Боголюбов В. М., Лыскова М. Е. // Кардиология. — 1972. — № 8. — С. 124—126.
2. Костюк П. Г. // Успехи физиол. наук. — 1984. — Т. 15. — С. 7—22.
3. Ленинджер А. Митохондрия: Пер. с англ. — М., 1966.
4. Лиходий Ст. С., Лебедев А. С., Утешева О. М., Корпачев В. Г. // Клиника, патогенез и лечение неотложных состояний. — Новосибирск, 1982. — С. 6—7.
5. Cambell J. D., Dobson C. M., Williams

- R. J. P., Xavier A. V. // J. Magn. Reson. — 1973. — Vol. 54. — P. 172.
6. Goton O., Mohamed A. A., McCulloch J. et al. // J. Cerebr. Blood Flow Metab. — 1986. — Vol. 6, N 3. — P. 321—331.
7. Hagberg H., Lehman A., Hamberg A. // Ibid. — 1984. — Vol. 4, N 1. — P. 297—300.
8. Harris R. J., Branston N. M., Symon L. et al. // Stroke. — 1982. — Vol. 13, N 6. — P. 759—766.
9. Hefflez D. S., Passonean J. V. // J. Cerebr. Blood Flow Metab. — 1985. — Vol. 5, N 4. — P. 523—528.
10. Kovach A. G. B., Dora E. // Oxygen Transport to Tissue. 5: — New York. — 1984. — P. 315—325.
11. Mild L. N., Mild J. H., Michenferder J. // J. Cerebr. Blood Flow Metab. — 1984. — Vol. 4, N 1. — P. 297—300.
12. Petroff O. A. C., Prichard S. W., Behar R. L. et al. // Neurology (Minneapolis). — 1985. — Vol. 35. — P. 781—788.

Поступила 29.09.87

#### EFFECTS OF VERAPAMIL ON DYNAMICS OF PHOSPHORUS-CONTAINING METABOLITES STUDIED IN ISCHEMIA BY MEANS OF $^{31}\text{P}$ -NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE

S. St. Likhody, S. S. Likhody, L. A. Sibeldina, N. A. Semyonova

Institute of Chemical Physics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow, Medical School, Tselinograd

Protective effects of verapamil on dynamics of phosphorus-containing metabolites were studied during 30 min complete ischemia by means of  $^{31}\text{P}$  NMR. Verapamil appears to decrease the ATP and creatine phosphate pools consumption in ischemic brain tissue. The efficiency of the drug depended on the administration procedure and was not similar in two different models of ischemia. Possible mechanisms of the verapamil effect on bioenergetics of nervous tissue are discussed.

УДК 616.36-006-008.939.6-02:[615.357.441:577.175.444

А. Т. Адылова, Б. А. Атаханова

#### СТИМУЛЯЦИЯ ТРИЙОДИТИРОНИНОМ СИНТЕЗА ДНК, ТОТАЛЬНЫХ БЕЛКОВ, БЕЛКОВ ЯДРА И ЯДЕРНОГО МАТРИКСА В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТКАХ ГЕПАТОМЫ МОРРИСА 7777

Лаборатория молекулярной биологии Института биохимии АН Узбекской ССР, Ташкент

В литературе приводятся многочисленные доказательства участия тиреоидных гормонов в росте, развитии и метаболизме клеток [11, 13, 19]. Показано [15], что рост трансплантированной гепатомы Морриса 7777 также зависит от тиреоидного статуса организма. Однако в условиях *in vivo*, в кото-

рых были проведены эти исследования, не исключается вклад других гуморальных факторов, в связи с чем нам представлялось необходимым проведение подобных исследований *in vitro*.

Нами было исследовано действие физиологических концентраций трийодтиронина ( $\text{T}_3$ ) на синтез ДНК тоталь-

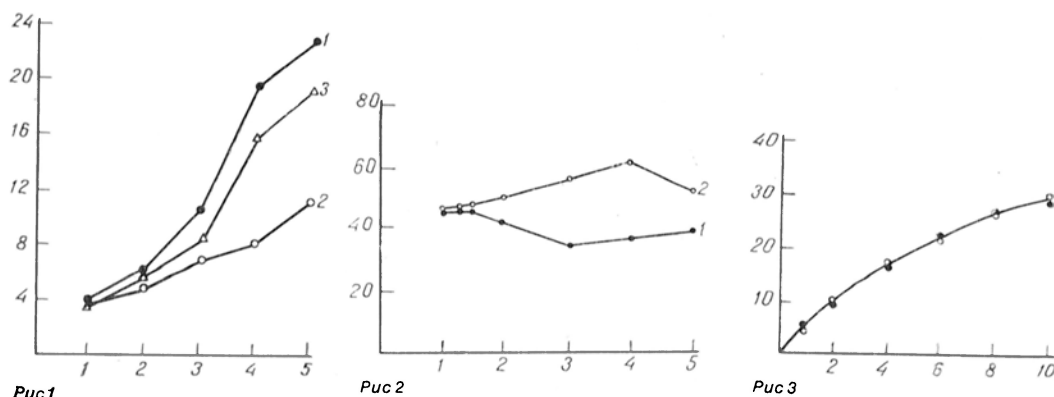


Рис. 1. Влияние  $T_3$  на рост клеток гепатомы Морриса 7777.

Клетки в количестве  $(50-70) \cdot 10^3$  были внесены во флаконы диаметром 60 мм с 8 мл минимальной среды Игла + 10% сыворотки теленка. Через 24 ч культивирования материал был разделен на 3 части. В одной из них культуральную среду заменяли на свежую с нормальной сывороткой (1 — норма), в другой — на гипотиреоидную среду (2 — контроль), в третьей — на гипотиреоидную среду +  $T_3$  (3 — опыт). По оси ординат — содержание ДНК (в мкг на флакон); по оси абсцисс — время культивирования (в днях).

Рис. 2. Влияние  $T_3$  на включение  $^{14}C$ -аминокислот в тотальные белки клеток гепатомы Морриса 7777.

1 — клетки культивированы в гипотиреоидной среде (контроль); 2 — в гипотиреоидной среде +  $T_3$  (опыт). Время инкубации с  $^{14}C$ -аминокислотами 2 ч. Условия культивирования те же, что указаны в подписи к рис. 1. По оси ординат — включение  $^{14}C$ -аминокислот (в имп/мин/100 мкг белка  $\cdot 10^{-3}$ ); по оси абсцисс — время культивирования (в днях).

Рис. 3. Гидролиз ДНК в ядрах клеток гепатомы Морриса 7777, обработанных ДНКазой I.

Светлые квадратики — ядра выделены из клеток, культивированных в течение 3 дней в гипотиреоидной среде (контроль); темные квадратики — ядра выделены из клеток, культивированных в течение 3 дней в гипотиреоидной среде +  $T_3$  (опыт). По оси ординат — кислоторастворимая ДНК (в %); по оси абсцисс — время гидролиза (в мин).

ных белков, белков ядра и ядерного матрикса клеток гепатомы Морриса 7777 и изучена чувствительность к ДНКазе I хроматина ядер этих клеток.

### Методика

Клетки гепатомы Морриса 7777 культивировали на среде Игла, содержащей 10 % телячьей эмбриональной сыворотки (НИИЭМ им. Н. Ф. Гамален, Москва) с добавлением глутамина и антибиотика гентамицина (40 мг на 0,5 л среды). Через 24 ч после пассирования культуральную среду во флаконах заменяли на свежую, а в экспериментальных группах клеток — на среду, содержащую 10 % телячьей сыворотки, истощенной тиреоидными гормонами (гипотиреоидная среда). Истощение эмбриональной сыворотки тироксином ( $T_4$ ) и  $T_3$  проводили путем обработки сыворотки анионообменником Дауэкс 1×8 (200—400 меш) [10]. Экспериментальные клетки были разделены на 2 группы, одну из которых культивировали в гипотиреоидной среде (контроль), другую — в той же среде с добавлением экзогенного  $T_3$  в конечной концентрации  $5 \cdot 10^{-9}$  моль на 1 мл среды (опыт). Инкубацию клеток со смесью  $^{14}C$ -аминокислот (удельная активность 1,295 МБк/мг-атом С, Прага) проводили в течение 2 ч (конечная концентрация  $^{14}C$ -аминокислот 0,07 МБк на 1 мл среды). Клетки снимали с культуральных флаконов трипсином или механически, промывали дважды охлажденным раствором

Хенкса, суспендировали в минимальном объеме этого раствора, отбирали аликвоты для определения ДНК, белка и для подсчета ТХУ-нерастворимой радиоактивности.  $^{14}C$ -радиоактивность измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике (Rackbeta, LKB).

В экспериментах по выделению ядер и анализу включения аминокислот в белки ядра и ядерного матрикса клетки гепатомы инкубировали на холоду с гипотоническим буфером, содержащим 0,01 M NaCl, 0,0015 M  $MgCl_2$ , 0,1 M трис-HCl, pH 7,4 с последующей гомогенизацией и выделением ядер. Все этапы выделения и очистки ядер и ядерного матрикса проводили по методу [4]. Обработку ядер ДНКазой I («Serva»,  $2 \cdot 10^3$  ед. активности на 1 мг) проводили в течение 10 мин при 30 °C при концентрации фермента 5 мкг на 100 мкг ядерной ДНК в среде, содержащей 0,25 M сахарозы, 3 mM  $MgCl_2$ , 0,5 mM  $CaCl_2$ , 30 mM NaCl, 0,4 mM ФМСФ, 10 mM трис-HCl, pH 8,3. Реакцию останавливали добавлением 10 mM ЭДТА, после чего пробы переносили в ледяную баню и добавляли 0,8 н.  $HClO_4$ . Для определения активности эндогенных нуклеаз ядра инкубировали при тех же условиях, но без добавления ДНКазы I. Концентрацию ДНК в пробах определяли по методу [3], белка — по методу [12].

### Результаты и обсуждение

В наших экспериментах телячья эмбриональная сыворотка была обед-

нена йодтиронидами с помощью обработки анионообменником, что позволяет уменьшить содержание тиреоидных гормонов в сыворотке в 60—70 раз [10]. В условиях культивирования клеток в коммерческой среде без предварительного обеднения сыворотки тиреоидными гормонами действие последних на клетку не выявлено [14] или наблюдается только при высоких (на 2—3 порядка превышающих физиологические) их концентрациях [5].

На рис. 1 представлен рост клеток гепатомы Морриса 7777, культивируемых в среде с нормальной коммерческой сывороткой (кривая 1). Добавление к таким клеткам физиологических концентраций  $T_3$  не давало эффекта (на рисунке не показано). Перенос клеток в гипотиреоидную среду (контроль) приводит к задержке роста, выявляющейся через 2 сут (рис. 1, кривая 2). При добавлении к контрольной группе клеток физиологических концентраций  $T_3$  (опыт) в течение первых 48 ч существенных различий в скорости роста клеток по сравнению с контролем не отмечено (рис. 1, кривая 3), однако затем идет быстрый экспоненциальный рост, темп которого приближается к темпу роста, характерному для клеток, культивируемых в нормальной среде. Эти данные свидетельствуют о том, что в отсутствие гормонов щитовидной железы увеличивается время генерации клеток, а  $T_3$  ускоряет рост клеток до исходного уровня.

В литературе описано аналогичное действие тиреоидных гормонов при введении их в среду культивирования других опухолевых клеток. Показано [8], что при введении  $T_3$  в среду культивирования время дупликации клеток уменьшалось почти в 3,5 раза. Сокращение времени дупликации клеток гормонов происходит либо за счет уменьшения длительности стадии  $G_1$  [8], либо всех стадий клеточного цикла [9].

Анализ действия тиреоидных гормонов на белковый синтез в клетках гепатомы Морриса 7777 показывает, что через 24 ч после замены нормальной среды на гипотиреоидную интенсивность синтеза тотальных белков начинает уменьшаться и остается низкой во все последующие сроки культивирования клеток (рис. 2, кривая 1). При

Включение  $^{14}C$ -аминокислот (в имп/мин/100 мкг) в белки культивируемых клеток гепатомы Морриса 7777

Объект исследования	Контроль	Введение $T_3$
Клетки	44 121 $\pm$ 5 013	44 857 $\pm$ 4 577
Ядра	48 571 $\pm$ 4 801	52 438 $\pm$ 4 641
Ядерный матрикс	61 686 $\pm$ 5 318	78 434 $\pm$ 6 849

Примечания. Условия культивирования см. в подписи к рис. 1. Включение  $^{14}C$ -аминокислот определяли после 2-часовой экспозиции клеток с гормоном. Приведены средние данные 6—8 определений.

введении  $T_3$  (рис. 2, кривая 2) существенных различий в скорости биосинтеза белков в контрольном и опытном вариантах вплоть до 12 ч нет, однако к 48 и 72 ч включение  $^{14}C$ -аминокислот в опытной группе клеток становится выше контрольного уровня (соответственно на 61 и 70 %).

Для биологического эффекта тиреоидных гормонов характерно наличие латентного периода [17]. В наших исследованиях по действию  $T_3$  на пролиферацию и биосинтез тотальных белков также выявлено существование определенной лаг-фазы (от 12 до 48 ч) как при замене нормальной среды на гипотиреоидную, так и при введении  $T_3$  в клетки, культивируемые в гипотиреоидной среде. В то же время уже через 2 ч после экспозиции клеток с гормоном удельная радиоактивность белков ядра и ядерного матрикса возросла по сравнению с контролем соответственно на 8 и 21 % (см. таблицу). В исследованиях последних лет показано, что ядерный матрикс является метаболически активной структурой, находящейся под влиянием регуляторных систем организма, в том числе гормонов [7]. Более того, данные литературы [18], а также результаты наших исследований [1, 2] свидетельствуют о том, что в ядерном матриксе имеются участки с большим сродством к  $T_3$ . Поэтому не исключено, что стимуляция биосинтеза белков ядерного матрикса  $T_3$  вслед за связыванием гормона с акцепторными сайтами в нем является одним из наиболее ранних эффектов, предшествующих действию тиреоидных гормонов на пролиферацию и клеточный метаболизм.

В условиях повышенного белкового синтеза при действии гормонов можно

было ожидать и определенных сдвигов в структуре хроматина, тем более что меченый  $T_3$  обнаруживается в менее компактизованных и более чувствительных к эндонуклеазному расщеплению участках хроматина. В то же время повышенная чувствительность к эндонуклеазам является одним из критериев наибольшей активности данного участка хроматина [16]. Таким образом, различная доступность транскрибируемых последовательностей ДНК в хроматине к действию ДНКазы I или микрококковой нуклеазы при различном гормональном статусе может свидетельствовать о различной степени компактизации хроматина или об изменениях структуры нуклеосом при введении гормона. Однако, как показывают наши данные (рис. 3), заметных различий в чувствительности к ДНКазе I хроматина из контрольных и опытных клеток мы не обнаружили, хотя сравнение проводили при том временном интервале (3-и сутки экспозиции клеток с гормоном), при котором отмечалось максимальное действие гормона как на тотальный белковый синтез в клетках, так и на их деление.

Возможно несколько интерпретаций этих результатов: 1) тиреоидные гормоны вызывают ограниченные модификации в структуре генома, не выявляемые данным методом; 2) тиреоидные гормоны влияют не на биосинтез, а на скорость созревания РНК, включая их сплайсинг и транспорт из ядра в цитоплазму; 3) можно предположить, что по аналогии со стероидами [6] активизируемые тиреоидными гормонами участки хроматина обладают исходной, чувствительной к ДНКазе I, потенциально активной конформацией независимо от того, функционирует ли данный ген или нет.

Итак, мы установили, что в клетках гепатомы Морриса 7777 в отсутствие тиреоидных гормонов интенсивность синтеза ДНК и биосинтеза белков уменьшается. При действии физиологических концентраций  $T_3$  после лаг-фазы (12—48 ч) синтез ДНК и тотальных белков усиливается, а синтез белков ядра и ядерного матрикса возрастает уже после 2-часовой экспозиции клеток с гормоном. Эти данные свидетельствуют о том, что стимуляция биосинтеза белков ядра и ядерного матрикса опережает действие гормона

на пролиферацию и клеточный метаболизм. Изменений в чувствительности хроматина к ДНКазе I нами не было выявлено. Чувствительность культивируемых клеток гепатомы Морриса 7777 к тиреоидным гормонам служит основанием для дальнейшего использования таких клеток в качестве модели при исследовании молекулярных механизмов действия тиреоидных гормонов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Адылова А. Т., Атаханова Б. А., Туракулов Я. Х. // Докл. АН СССР. — 1985. — Т. 284, № 3. — С. 752—754.
2. Адылова А. Т., Атаханова Б. А. // Биохимия. — 1986. — Т. 51, № 1. — С. 112—117.
3. Бартон К. // Методы исследования нуклеиновых кислот: Пер. с англ. — М., 1970. — С. 7—9.
4. Бульдеева Т. В., Кузьмина С. Н., Збарский И. Б. // Докл. АН СССР. — 1978. — Т. 241, № 6. — С. 1461—1464.
5. Романов Ю. А., Ивченко Т. Н., Панченко Л. Ф. // Пробл. эндокринологии. — 1974. — № 5. — С. 90—94.
6. Романов Г. А., Жаворонкова Е. Н., Савельев С. В., Ванюшин Б. Ф. // Там же. — 1984. — № 6. — С. 38—42.
7. Barrack E. R., Coffey D. S. // J. biol. Chem. — 1980. — Vol. 225, N 15. — P. 7265—7275.
8. DeFesi C. R., Surks M. I. // Endocrinology. — 1981. — Vol. 108, N 1. — P. 259—267.
9. DeFesi C. R., Fels E. C., Surks M. I. // Ibid. — 1985. — Vol. 116, N 5. — P. 2062—2069.
10. Gingrich S. A., Smith P. J., Shapiro L. E., Surks M. I. // Endocrinology. — 1985. — Vol. 116, N 6. — P. 2306—2313.
11. Leffert H. L., Alexander M. // Ibid. — 1976. — Vol. 98. — P. 1241—1247.
12. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265—275.
13. Oppenheimer J. H. // Science. — 1979. — Vol. 203. — P. 971—979.
14. Richman R. A., Claus T. H., Pilakis S. J., Friedman D. L. // Proc. nat. Acad. Sci. US. — 1976. — Vol. 73, N 10. — P. 3589—3593.
15. Short J., Klein K., Kibert L., Ove P. // Cancer Res. — 1980. — Vol. 40, N 7. — P. 2417—2422.
16. Simpson R. T. // Gene Amplification and Analysis. — New York, 1981. — Vol. 2. — P. 347—368.
17. Tata J. R., Widnell C. C. // Biochem. J. — 1966. — Vol. 98, N 2. — P. 604—620.
18. Wilson J. W., Leduc E. H. // Anat. Res. — 1948. — Vol. 100. — P. 724—729.
19. Wilson B. D., Albrecht C. F., Wium C. A. // S. Afr. med. J. — 1982. — Vol. 62, N 2. — P. 44—49.

Поступила 08.10.87



STIMULATING EFFECT OF TRIIODOTHYRONINE ON SYNTHESIS OF DNA, TOTAL PROTEINS, NUCLEAR AND NUCLEAR MATRIX PROTEINS IN CULTIVATED CELLS OF MORRIS HEPATOMA 7777

A. T. Adylova, B. A. Atakhanova

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Uzbek SSR, Tashkent

Intensity of DNA and protein biosynthesis was decreased in Morris hepatoma 7777 cultivated

cells in absence of thyroid hormones. Physiological concentrations of triiodothyronine increased synthesis of DNA and total proteins after lag phase within 12-48 hrs, while synthesis of nuclear and nuclear matrix proteins was stimulated already within 2 hrs. This suggests that stimulation of nuclear proteins biosynthesis occurred prior to the hormone effect on proliferation and cell metabolism. Alterations in sensitivity of chromatin to DNAase I were not observed. Response of the Morris hepatoma cells to thyroid hormones may be used in studies of molecular mechanisms of thyroid hormones action.

УДК 616.74-008.939.6-091.818-074

С. В. Лисаковский, Т. В. Володина, В. Л. Козельцев

ИЗУЧЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ БЕЛКОВ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ ЧЕЛОВЕКА В ПРОЦЕССЕ АУТОЛИЗА МЕТОДОМ ДВУХМЕРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Научно-исследовательская лаборатория биологических структур Минздрава СССР, Москва

Изучению процессов, происходящих в мышечной ткани после наступления смерти организма, посвящены многочисленные работы, опубликованные на протяжении ряда лет. На микроскопическом уровне описаны следующие изменения в сократительном аппарате мышечной ткани в посмертном периоде: укорочение миофибрилл, приводящее к трупному окоченению [5, 15, 27], фрагментация миофибрилл на участки по 1—4 саркомера при его разрешении [6, 11, 20], деградация Z-линии [6, 7, 13, 27] и наступающая после нее деградация M-линии саркомера [13].

Проведенные к настоящему времени биохимические исследования по выявлению изменений индивидуальных мышечных белков выполнены в основном на мышечной ткани различных животных, а полученные отдельными авторами результаты весьма противоречивы [12, 21—23, 25, 29, 30]. Так, в работе [21] указывается, что посмертные изменения приводят к специфической и лимитированной деградации миофибрилярных белков, которая сопровождается исчезновением тропоина Т и появлением группы полипептидов с мол. массой около 30 кД без заметной деградации актина и миозина. В то же время имеются сведения о разрушении тяжелых цепей миозина уже в 1-е сутки посмертного периода [2].

Следует также отметить, что подавляющее большинство выполненных работ проведено с использованием мето-

да одномерного электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия (ДДСН), разрешающая способность которого значительно ниже двухмерного электрофореза по методу О'Фаррелла.

Задачей настоящего исследования явилось изучение изменения белков мышечной ткани методом двухмерного электрофореза в различные сроки посмертного периода.

Методика

Объектом исследования служила четырехглавая мышца бедра мужчины 4-й возрастной группы со сроком посмертного периода не более 15 ч. Образцы ткани для предотвращения процессов гниения заворачивали в фильтровальную бумагу, смоченную 0,02 % раствором азиды натрия, и хранили при комнатной температуре (22 °C) во влажной атмосфере. Через соответствующие сроки хранения (1, 4, 6 и 11 сут) мышцу помещали в боксы и замораживали при -20 °C до проведения электрофоретического анализа белков. В отдельных экспериментах использовали биопсийный материал прямой мышцы живота человека.

В работе применяли амфолины pH 5,0—7,0 и 3,5—10,0 (LKB, Швеция), DDCH, тритон X-100, 2-меркаптоэтанол, агарозу («Serva», ФРГ), акриламид, метиленбисакриламид, персульфат аммония, ТЕМЕД («Reanal», ВНР), мочевины марки ос. ч. (отечественного производства).

В качестве белков-маркеров для определения молекулярной массы использовали миозин (тяжелая цепь) кролика, β-галактозидазу, фосфоорилазу В, бычий сывороточный альбумин, яичный альбумин, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу, карбоангидразу, трипсиноген, ингибитор трипсина, β-лактоглобулин,

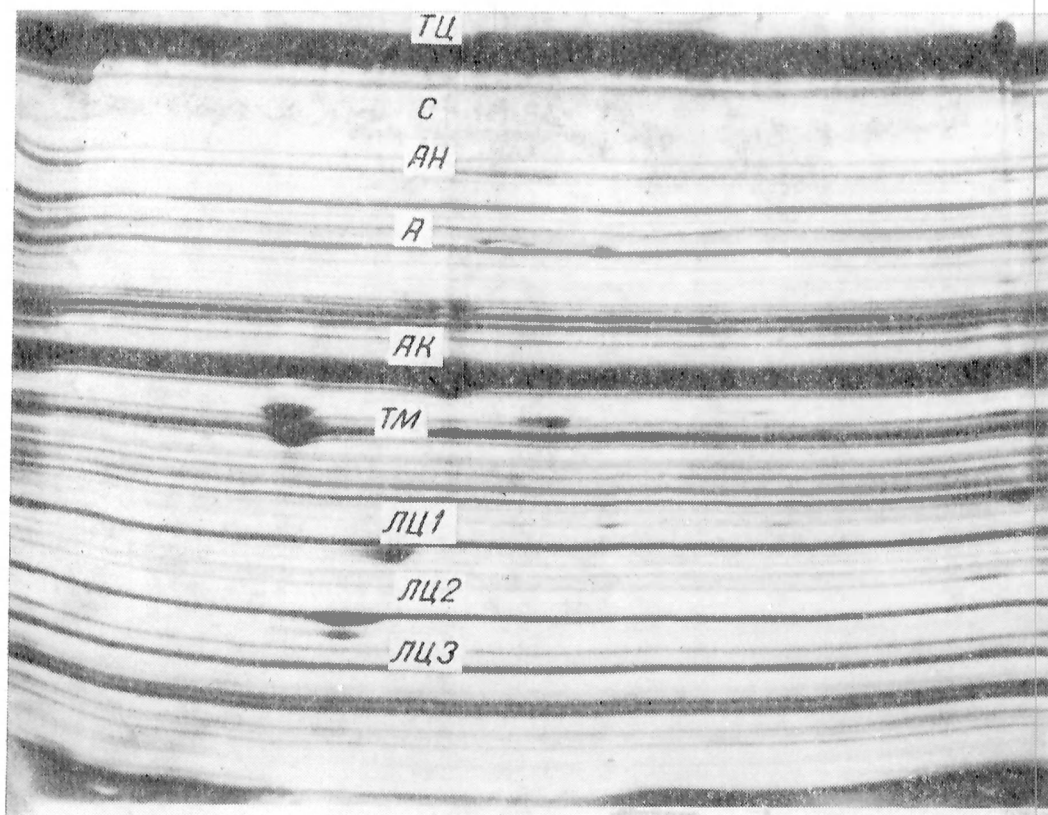


Рис. 1. Фракционирование белков мышечной ткани методами одно- и двухмерного электрофореза в полиакриламидном геле с линейным градиентом концентрации (9—25 %).

ТЦ — тяжелая цепь миозина (200 кД); С — С-белок (150 кД); АН — актинин (100 кД); А — альбумин (68 кД); АК — актин (42,6 кД); ТМ — тропомиозин (36 кД); ЛЦ1, ЛЦ2, ЛЦ3 — легкие цепи миозина (соответственно 25, 20 и 15,8 кД).

$\alpha$ -лактальбумин («Sigma», США), цитохром с («Serva»).

Образцы скелетной мышцы для фракционирования с помощью одномерного электрофореза измельчали ножницами и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с притертым пестиком в 50 объемах лизис-буфера 2 следующего состава: 0,125 М трис-HCl (pH 6,8), 2 % DDCN, 5 % 2-меркаптоэтанол, 10 % глицерин. Полученный лизат фильтровали через 2 слоя марли и на каждую дорожку гелевой пластины наносили 20 мкл раствора.

Одномерный электрофорез проводили по методу Лэммли [14] в пластинах геля (160×160×1 мм), приготовленных с линейным градиентом концентрации акриламида 9—25 %. После окончания электрофореза гели окрашивали 0,1 % кумасси R-250 в смеси 10 % уксусной кислоты и 20 % этанола.

Для идентификации получаемых фракций и оценки их молекулярных масс в качестве маркерных белков использовали суммарный лизат мышцы сердца крысы по методу [3]. Для приготовления лизата животное забивали декапитацией, быстро извлекали сердце, промокали кровь, взвешивали, измельчали ножницами и суспендировали в релаксирующих буферах 1 и 2 по методу [31]. Обработанную ткань тщательно гомогенизировали в лизис-

буфере 2 на механическом гомогенизаторе до конечной концентрации гомогената 2 %, исходя из первоначальной массы сердца. Полученный раствор белка прогревали 5 мин при 100 °C и хранили в замороженном состоянии.

Двухмерный электрофорез проводили по методу О'Фаррела [18].

Гомогенизацию образцов мышечной ткани для изоэлектрического фокусирования проводили в 10 объемах лизис-буфера 1 следующего состава: 2 % тритон X-100, 9,5 М мочевины, 2 % амфолины (смесь pH 5,0—7,0 и 3,5—10,0 в соотношении 4:1), 5 % 2-меркаптоэтанол. Для разделения белков в первом направлении (изоэлектрофокусирование) применяли 4 % акриламидный гель, содержащий 2 % амфолинов (смесь амфолинов pH 5,0—7,0 и 3,5—10,5 в соотношении 4:1), 2 % тритон X-100, 9 М мочевины. Образцы наносили с катодного конца геля. Электрический режим фракционирования: презэлектрофорез 1 ч при 200 В, далее — 17 ч при 500 В.

Для оценки получаемого при изоэлектрофокусировании градиента pH были использованы коммерческие белки-маркеры с известными изоэлектрическими точками («Sigma»). После окончания изоэлектрофокусирования гели окрашивали по методу [24], сканировали на спектрофотометре («Chromoscan», Англия) и определяли профиль градиента pH.

После окончания фракционирования гели первого направления выдерживали в лизис-буфере 2 в течение 20 мин при комнатной температуре и использовали для фракционирования белков во втором направлении, которое проводили по методу Лэммли. На расстоянии 1 см от края пластины в качестве маркеров по молекулярной массе наносили лизат сердца крысы.

## Результаты и обсуждение

Правильность оценки молекулярной массы ( $M_r$ ) является одним из необходимых условий исследования изменения белков мышечной ткани при аутолизе. В этой связи надежность полученных данных во многом зависит от качества линейного градиента концентрации акриламидного геля, создаваемого по всей площади пластины.

На рис. 1 представлена гелевая пластина с результатом фракционирования белков лизата сердца крысы методом одномерного электрофореза. Такой препарат дает стандартный набор белковых полос с мол. массами от 220 до 15 кД, а также позволяет оценить качество приготовленной пластины. Основные белковые фракции лизата сердца идентифицированы, в литературе приводятся сведения об их молекулярных массах [3].

На этой же гелевой пластине выполнено фракционирование во втором направлении биопсийного образца прямой мышцы живота человека. Окрашенные белковые пятна соответствуют основным миофибриллярным белкам и хорошо совпадают по значениям  $M_r$  с соответствующими белками лизата сердечной мышцы. Таким образом, фракционирование во втором направлении различных белковых препаратов после изоэлектрофокусирования совместно с препаратом лизата сердца крысы позволяет достаточно точно определить величину  $M_r$  получаемых белковых пятен.

В наших экспериментах определение  $M_r$  основных белковых фракций лизата сердца крысы было проведено также с использованием индивидуальных белков-маркеров с известной величиной  $M_r$  (рис. 2). Значения  $M_r$  основных мышечных белков, полученные в экспериментах, совпадают с аналогичными данными других авторов [3, 8]. На основании полученных результатов были определены следующие величины  $M_r$  для основных белков мышцы человека: тяжелая цепь миозина — 200 кД, С-бе-

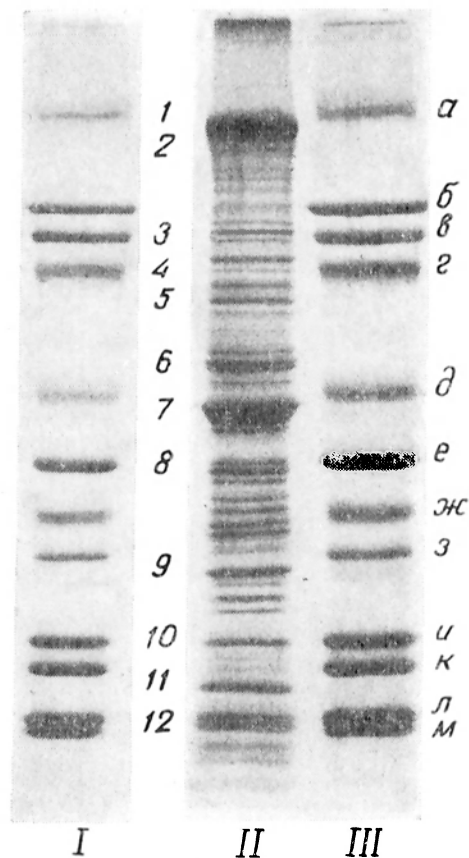


Рис. 2. Фракционирование белков сердечной мышцы крысы методом одномерного электрофореза.

I, III — белки-маркеры: а — тяжелая цепь миозина (205 кД), б —  $\beta$ -галактозидаза (116 кД), в — фосфоорилаза В (97,4 кД), г — бычий сывороточный альбумин (66 кД), д — яичный альбумин (45 кД), е — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (36 кД), ж — карбоангидраза (29 кД), з — трипсиноген (24 кД), и — соевый ингибитор трипсина (20,1 кД), к —  $\beta$ -лактоглобулин (18,4 кД), л —  $\alpha$ -лактальбумин (14,2 кД), м — цитохром с (12,3 кД); II — препарат лизата сердечной мышцы крысы (арабскими цифрами обозначены номера фракций).

лок — 150 кД,  $\alpha$ -актинин — 100 кД, альбумин — 68 кД, актин — 42,6 кД, тропомиозин — 36 кД, легкие цепи миозина 1—24,5 кД, 2—18 кД, 3—15 кД, тропонин С — 18 кД, что соответствует данным литературы [4, 10].

В следующей серии экспериментов изучали изменение белков скелетной мышцы человека при аутолизе методом одномерного электрофореза в полиакриламидном геле. Результаты этих исследований представлены на рис. 3. Как видно из приведенных данных, основные белковые фракции скелетной мышцы человека обладают высокой устойчивостью при хранении изолированных образцов даже в течение 11 сут. Однако, начиная с 6-х суток хранения, отмечается появление дополнительной

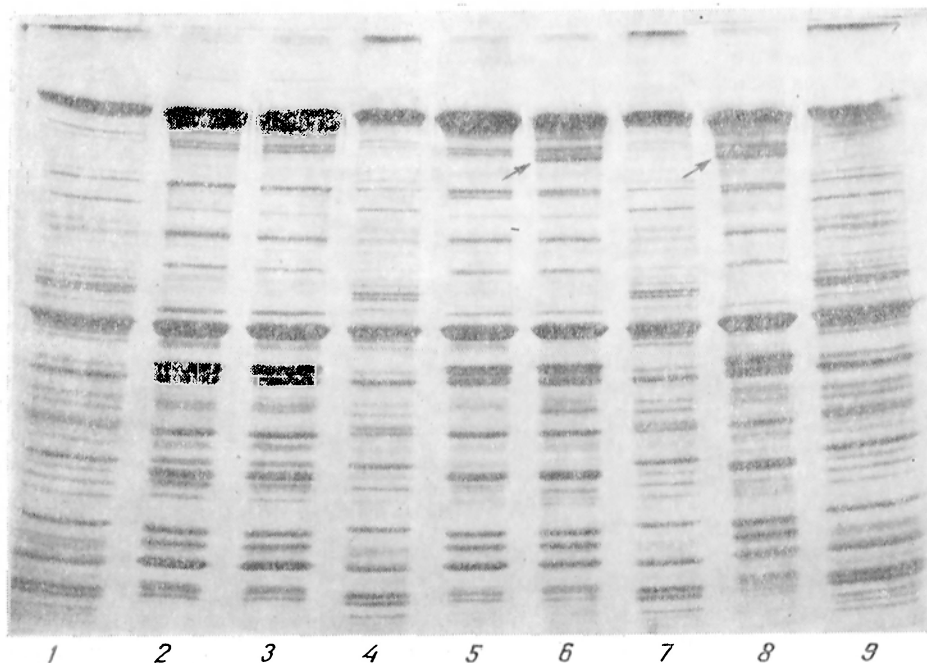


Рис. 3. Одномерный электрофорез белков скелетной мышцы человека в полиакриламидном геле с градиентом концентрации (9—25 %).

1, 4, 7, 9 — белки лизата сердечной мышцы крысы (маркеры). Препараты белков скелетной мышцы человека со следующими сроками аутолиза: 2 — менее 15 ч; 3 — 1 сут; 5 — 4 сут; 6 — 6 сут; 8 — 11 сут.

белковой фракции с мол. массой около 140 кД (на рис. 3 указано стрелками). В эти же сроки исчезают две белковые фракции с мол. массами около 500 и 1000 кД, располагающиеся на геле выше тяжелой цепи миозина. Можно предположить, что данные высокомолекулярные белки относятся к так называемым промежуточным структурным миофиламентам, обнаруженным недавно в скелетной мышце. Возможно, что эти белки — титин (1000 кД) и небулин (500 кД) объединяют саркомеры мышечной ткани в одно целое, являясь своеобразным цитоскелетом [28].

О влиянии процесса аутолиза на белки скелетной мышцы человека мы судили также по результатам двухмерного электрофореза. В этой серии экспериментов предварительно проводили оценку параметров градиента pH, создаваемого в геле первого направления при изоэлектрическом фокусировании.

На рис. 4 видно, что белки-маркеры распределяются по всей длине геля первого направления, причем характер их распределения соответствует калибровочной кривой, предоставляемой фирмой-изготовителем. В диапазоне pH 5,0—8,0 градиент несколько растянут за счет добавления к амфолинам

широкого диапазона амфолинов pH 5,0—7,0, что способствует лучшему фракционированию белков в данной области. На щелочном конце геля происходит менее четкое деление белков-маркеров. По-видимому, в щелочной области наблюдается разрушение градиента pH, характерное для метода О'Фаррелла [19], что приводит к концентрации белков с изоэлектрическими точками более 8,5 у щелочного конца геля.

Таким образом, двухмерный электрофорез по методу О'Фаррелла позволяет фракционировать изучаемые белковые смеси по двум параметрам — относительной изоэлектрической подвижности в первом направлении и величине  $M_r$  во втором.

При фракционировании лизата скелетной мышцы человека на пластине удается идентифицировать более 100 окрашенных кумасси R-250 белковых пятен (рис. 5, см. вклейку). Сбоку на пластине в качестве маркеров по  $M_r$  нанесен лизат сердца крысы, приготовленный для одномерного электрофореза. Следует отметить, что нам не удалось обнаружить отличий в белковом составе при электрофорезе между биопсийным материалом и тканью от

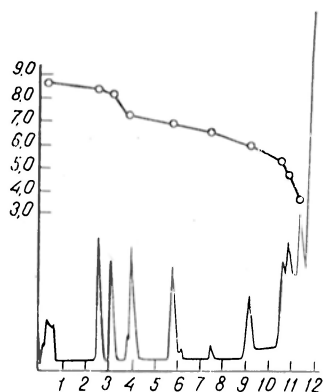


Рис. 4. Изоэлектрофокусирование в полиакриламидном геле белков-маркеров с известными изоэлектрическими точками (денситограмма геля первого направления при 570 нм и калибровочный график).

По оси абсцисс — расстояние от катода (в см), по оси ординат — рН.

тел с посмертным периодом менее 15 ч. В дальнейшем такой материал условно принимали за норму и сроки экспериментального аутолиза отсчитывали от времени его получения.

Сравнение полученных электрофореграмм с электрофореграммами скелетных мышц, приведенными в опубликованных ранее работах [9, 10, 17], позволяет определить положение некоторых мышечных белков: актина, тропомиозина, легких цепей миозина 1, 2, 3, тропонина С и др. Тяжелая цепь миозина определяется только в верхнем правом углу гелевой пластины на стартовой зоне геля первого направления, что, по-видимому, связано с трудностями изоэлектрофокусирования высокомолекулярных белков [10]. При идентификации следует принимать во внимание не только положение белковых пятен при изоэлектрофокусировании и их  $M_r$ , но и взаиморасположение белков и форму самих пятен [1, 17].

Все указанные фракции сохранялись на электрофореграммах мышечной ткани со сроками аутолиза 1 и 4 сут, при этом не изменялись также форма и взаимное расположение пятен. Однако к 4-м суткам становится заметным, а к 6-м суткам отчетливо видимым (рис. 6, а, см. вклейку) тройное пятно с мол. массой 140—150 кД, расположенное над актиновой фракцией. К 11-м суткам хранения образцов размеры пятен и интенсивность их окраски увеличиваются, а высокое значение  $M_r$  образующихся полипептидных це-

пей позволяет считать их продуктами деградации тяжелых цепей миозина.

Противоречивость полученных разными авторами данных о деградации тяжелой цепи миозина в процессе аутолиза в значительной степени можно объяснить различными условиями сохранения биоматериала. Так, при хранении мышечной ткани при 2—10 °С тяжелая цепь миозина оставалась сохраненной по крайней мере в течение 7 сут [12, 21, 22]. Инкубация в течение 3 сут при 25 °С также не приводила к деградации тяжелой цепи миозина [21]. Однако при 37 °С деградацию миозина наблюдали уже через 11 ч инкубации [30]. Кислые значения рН и повышение температуры до 37 °С были оптимальными условиями для деградации миозина при инкубации гомогенатов мышечной ткани [29, 30]. Такие условия являются оптимальными и для действия некоторых эндогенных протеиназ. Так, катепсины D и В из мышцы крысы активно расщепляли миозин скелетной мышцы кролика с образованием фрагмента с мол. массой 150 кД [26].

При анализе электрофореграмм образцов ткани после 6 и 11 сут хранения выявляется гетерогенность пятна, соответствующего легкой цепи миозина 3. Исчезают также белковые пятна в зонах А (68 кД), Б (54 кД) и В (36—25 кД; см. рис. 5). После 6 сут хранения в щелочной области на пластине выявляются 3 пятна с мол. массой около 27 кД, два из которых исчезают к 11-м суткам хранения (на рис. 6 указаны стрелками). Появление компонентов с мол. массой 27—30 кД многие авторы объясняют деградацией тропонина Т [16, 21].

Таким образом, применение метода двухмерного электрофореза по О'Фарреллу позволяет более детально выявить изменения мышечных белков в процессе аутолиза по сравнению с методом одномерного электрофореза.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ковалев Л. И., Шишкин С. С., Нволгина Г. Л. и др. // Биохимия. — 1986. — Т. 51, № 6. — С. 896—908.
2. Никитина З. К., Могильский В. Н., Ребров Л. Б. // Всесоюзный симпозиум по медицинской энзимологии: Тезисы докладов. — М. 1986. — С. 73.
3. Anderson N. G., Anderson N. L. // Behring. Inst. Mitt. — 1979. — Bd 63. — S. 169—210.

4. *Bailin G.* // Biochem. biophys. Acta. — 1976. — Vol. 449. — P. 310—326.
5. *Bendall J. R.* // J. Physiol. (Lond.). — 1951. — Vol. 114. — P. 71—88.
6. *Davey C. L., Gilbert K. V.* // J. Food Sci.— 1969. — Vol. 34. — P. 69—74.
7. *Fukazawa T., Yasui T.* // Biochim. biophys. Acta. — 1967. — Vol. 140. — P. 534—537.
8. *Giometti C. S., Anderson N. G., Tollasken S. L. et al.* // Analyt. Biochem. — 1980. — Vol. 102. — P. 47—58.
9. *Giometti C. S., Barany M., Dannon M. J., Anderson N. G.* // Clin. Chem. — 1980. — Vol. 26. — P. 1152—1156.
10. *Giometti C. S., Dannon M. J., Anderson N. G.* // Neurology (Minneapolis), 1983. — Vol. 33. — P. 1152—1156.
11. *Hay J. D., Currie R. W., Wolfe F. H., Sanders E. J.* // J. Food Sci.— 1973. — Vol. 38. — P. 981—986.
12. *Hay J. D., Currie R. W., Wolfe F. H.* // Ibid. — P. 987—990.
13. *Henderson D. W., Goll D. E., Stromer M. H.* // Amer. J. Anat. — 1970. — Vol. 128. — P. 117—136.
14. *Laemmli U. K.* // Nature. — 1970. — Vol. 227. — P. 680—685.
15. *Locker R. H.* // J. biophys. biochem. Cytol.— 1959. — Vol. 6. — P. 419—423.
16. *Macbride M., Parrish F. C.* // J. Food Sci.— 1977. — Vol. 42. — P. 1627—1629.
17. *Mikawa T., Takeda S., Shimizu T., Kitaura T.* // J. biochem. (Tokyo). — 1981. — Vol. 89. — P. 1951—1962.
18. *O'Farrell P. H.* // J. biol. Chem. — 1975. — Vol. 250. — P. 4007—4021.
19. *O'Farrell P. Z., Goodman H. M., O'Farrell P. H.* // Cell. — 1977. — Vol. 12. — P. 1133—1142.
20. *Olson D. G., Parrish F. C., Stromer M. H.* // J. Food Sci.— 1976. — Vol. 41. — P. 1036—1041.
21. *Olson D. G., Parrish F. C., Dayton W. R., Goll D. E.* // Ibid. — 1977. — Vol. 42. — P. 117—124.
22. *Penny I. F.* // J. Sci. Food Agricult. — 1976. — Vol. 27. — P. 1147—1155.
23. *Penny I. F., Ferguson-Pryce R.* // Meat Sci. — 1979. — Vol. 3. — P. 121—134.
24. *Righetti P. G., Drysdale J. W.* // J. Chromatogr. — 1974. — Vol. 98. — P. 271—321.
25. *Samejima K., Wolfe F. H.* // J. Food Sci.— 1976. — Vol. 41. — P. 250—254.
26. *Schwartz W., Bird J.* // Biochemistry. J.— 1977. — Vol. 167. — P. 811—820.
27. *Stromer M. H., Goll D. E.* // J. Food Sci.— 1967. — Vol. 32. — P. 329—331.
28. *Wang K.* // Muscle Development, Molecular and Cellular Control. — Cold Spring Harbor, N. Y., 1982. — P. 439—457.
29. *Yamamoto K., Samejima K., Yasui T.* // J. Food Sci.— 1979. — Vol. 44. — P. 51—55.
30. *Yates L. D., Dutson T. R., Caldwell J., Carpenter Z. L.* // Meat Sci. — 1983. — Vol. 9. — P. 157—179.
31. *Zak R., Etlinger J., Fishman D. A.* // Excerpta med. int. Congr. Ser. N 240. — 1972. — P. 163—175.

Поступила 07.12.87

# ESTIMATION OF HUMAN SKELETAL MUSCLE PROTEINS ALTERED DURING AUTOLYSIS BY MEANS OF TWO-DIMENSIONAL ELECTROPHORESIS

S. V. Lisakovsky, T. V. Volodina, V. L. Kozel'tsev

Laboratory of Biological Structures, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

More than 100 various fractions were detected in human skeletal muscle proteins analyzed by O'Farrell two-dimensional electrophoresis. Main proteins were maintained well in individual preparations of muscle tissue after their storage within 4 days at 20°. The protein fractions with molecular mass of 140-150 kD as well as alteration of other muscle proteins were found on electrophoregrams within 6 days of storage.

УДК 612.351.11+612.33.015.1]:577.152.3]:088.1

Л. В. Кравченко, Е. Э. Кузьмина, В. С. Соболев

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОСОМАЛЬНОЙ ЭПОКСИДГИДРОЛАЗЫ ПЕЧЕНИ И СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ТОНКОЙ КИШКИ КРЫС

Институт питания АМН СССР, Москва

Эпоксидгидролаза (КФ 3.3.2.3), локализованная преимущественно в мембранах эндоплазматического ретикула наряду с цитозольной глутатион-трансферазой играет определяющую роль в биотрансформации и детоксикации эпоксидов [4, 14]. Последние образуются в результате окисления в системе микросомальных монооксигеназ различных ксенобиотиков, содержащих ароматические, моно- или полиеновые

структуры (полициклические ароматические углеводороды, стирол, винилхлорид, афлатоксины), а также в процессе биосинтеза некоторых эндогенных субстратов (стероиды) [7, 10, 22, 23]. Эпоксиды могут поступать в организм и извне как компоненты пищи, пищевые добавки или загрязнители пищевых продуктов.

Эпоксидгидролаза может превращать высокореактивные эпоксиды в ме-



нее опасные дигидродиолы и тем самым защищать клетку от их токсического действия. Однако в некоторых случаях, например в процессе биотрансформации полициклических ароматических углеводородов, эпоксидгидролаза превращает монофункциональные эпокси-ды в более реактивные дигидродиол-эпокси-ды, являющиеся инициаторами канцерогенеза [1, 20].

С помощью разработанных в последние годы высокочувствительных методов определения активности эпоксидгидролазы установлено ее наличие не только в печени, но и в ряде других органов и тканей различных видов животных [4, 13, 16]. В то же время свойства и функциональное значение эпоксидгидролазы, локализованной в печени, остаются мало изученными.

Целью настоящей работы явилось сравнительное изучение некоторых свойств микросомальной эпоксидгидролазы печени и слизистой оболочки тонкой кишки, которая является основными «воротами» поступления в организм различных чужеродных соединений.

## Методика

Исследования проводили на половозрелых крысах-самцах линии Вистар. Микросомы выделяли из печени по методу [11], используя в качестве среды выделения 0,154 М КСl, содержащий 50 мМ трис-НСl рН 7,4, из слизистой тонкой кишки по методу [21] в 0,154 М КСl, содержащем 50 мМ трис-НСl, 20 % (об/об) глицерина, ингибитор трипсина из сои (5 мг на 1 г ткани) и гепарин (4 ЕД/мл).

В опытах *in vivo* изучали действие на активность эпоксидгидролазы бензила, транс-эпокси-стильбена, 2-ацетамидофлуорена и бутилокситолуола. Бензил вводили в течение 5 дней внутрибрюшинно в кукурузном масле в дозе 210 мг/кг; транс-эпокси-стильбен — в течение 3 дней внутрибрюшинно в кукурузном масле в дозе 400 мг/кг; 2-ацетамидофлуорен — однократно внутрибрюшинно в диметилсульфоксиде (ДМСО, 3,5 мл/кг) в дозе 35 мг/кг; бутилокситолуол — в течение 4 дней в дозе 1 г/кг в кукурузном масле внутрь. Животные контрольных групп получали эквивалентные количества растворителя. Число животных в каждой группе было не менее 10. Крыс, получавших бензил и бутилокситолуол, забивали через 24 ч после последнего введения, остальных — через 48 ч.

В опытах *in vitro* бензил, транс-эпокси-стильбен и бутилокситолуол добавляли в инкубационную среду в конечной концентрации 1,6 мМ (в 4 мкл ДМСО) за 5 мин до внесения субстрата (2 мМ). При изучении влияния ингибиторов на активность фермента эпоксициклопексен в конечной концентрации 1,6 мМ (в ДМСО) и 1,2-эпокси-3,3,3-трихлорпропан в конечной концентрации 0,4 мМ

(в ацетонитриле) добавляли в объеме 4 мкл одновременно с субстратом; в случае 2-бром-4-нитроацетофенона (0,3 мМ в ацетонитриле) проводили предварительную инкубацию (до внесения субстрата) в течение 10 мин при комнатной температуре.

В работе использованы химические реактивы фирм «Sigma» (США) и «Koch-Light» (Англия).

Активность эпоксидгидролазы определяли разработанным нами методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, используя в качестве субстрата стиреноксид («Fluka», Швейцария). Инкубационная среда (общий объем 400 мкл) содержала 0,15 М трис-НСl рН 8,7, 0,1—0,4 мг микросомального белка и 1 мМ стиреноксида. После инкубации при 37 °С в течение 15—30 мин продукт гидролиза стиреноксида — фенилэтиленгликоль — экстрагировали 1 мл *n*-бутилового спирта с добавлением насыщенного раствора сульфата аммония и аликвоту бутанольного экстракта (5 мкл) подвергали анализу на жидкостном хроматографе («Altex», США). УФ-детектирование фенилэтиленгликоля осуществляли при длине волны 210 нм, количественное определение его проводили с помощью интегратора с использованием внешнего стандарта (фенилэтиленгликоль, «Aldrich», США).

## Результаты и обсуждение

В разных сериях экспериментов активность эпоксидгидролазы в микросомах печени варьировала от 6,25 до 9,67 нмоль/мин на 1 мг белка, в слизистой оболочке тонкой кишки — от 0,38 до 0,81 нмоль/мин на 1 мг белка. Уровень удельной активности эпоксидгидролазы в микросомах слизистой тонкой кишки составлял 4,8—10 % от уровня активности в микросомах печени, что совпадает с данными для крыс [7], но намного ниже, чем активность эпоксидгидролазы в слизистой тонкой кишки кролика (50 % от активности в печени) и морской свинки (42 %).

Кинетические константы действия эпоксидгидролазы определяли в координатах Лайнуивера — Бэрка и Эди — Хофсти в пределах изменения концентрации субстрата от 0,03 до 0,6 мМ (рис. 1, табл. 1). Величины кажущихся  $K_m$  и  $V_{max}$ , установленные для эпоксидгидролазы микросом печени, совпадают с результатами других авторов, использовавших стиреноксид в качестве субстрата [17]. Для эпоксидгидролазы микросом слизистой оболочки тонкой кишки значение кажущейся  $K_m$  было довольно близко к  $K_m$  фермента микросом печени, а величина  $V_{max}$  — значительно ниже. Ферментная реакция носила линейный характер в течение 30 мин инкубации при использовании как микросом печени, так и микро-

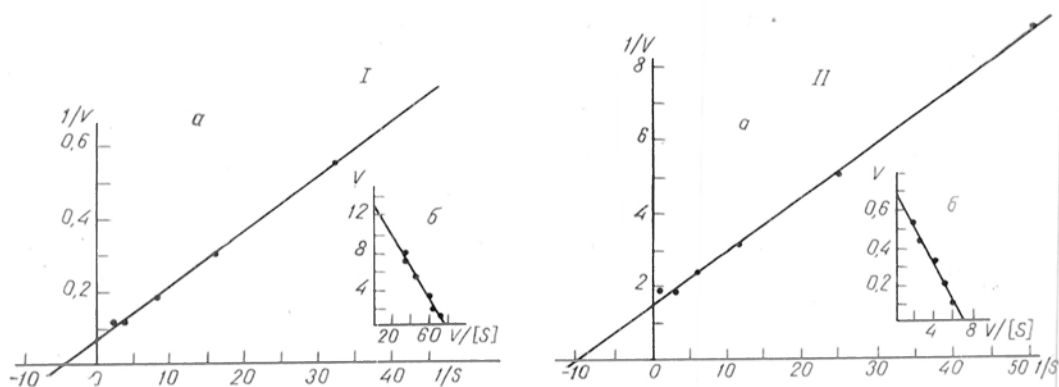


Рис. 1. Зависимость скорости реакции, катализируемой эпоксидгидролазой микросом печени (I) и слизистой тонкой кишки (II) от концентрации субстрата. а — в координатах Лайнуивера — Бэрка; б — в координатах Эди—Хофсти, V — нмоль/мин на 1 мг белка, V/S — в нмоль/мин/мг/мМ.

сом слизистой тонкой кишки. Линейность ее сохранялась при увеличении содержания белка в пробе от 0,025 до 0,4 мг в случае микросом печени и от 0,05 до 0,8 мг в случае микросом слизистой кишки.

Как видно на рис. 2, оптимум pH для микросомальной эпоксидгидролазы слизистой тонкой кишки составляет 8,7, что соответствует оптимуму pH, установленному для эпоксидгидролазы пе-

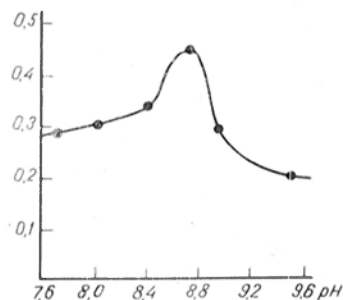


Рис. 2. Влияние pH на активность эпоксидгидролазы микросом слизистой тонкой кишки (в нмоль/мин на 1 мг белка).

чени крыс и других видов животных [7, 12].

Известно, что активность микросомальной эпоксидгидролазы печени по сравнению с активностью других, близких по локализации и функциональному предназначению ферментов, например UDP-глюкуронозилтрансферазы, изменяется незначительно при воздействии неионных детергентов [2]. Представленные в табл. 2 данные в целом подтверждают это. В отличие от авторов работы [15] мы не выявили какого-либо активирующего влияния твина-80 на активность эпоксидгидролазы в микросомах печени, а в микросомах слизистой оболочки кишки высокие концентрации твина-80 в незначительной степени подавляли активность фермента. Луброл в концентрациях 0,1 и 0,5 % вызывал умеренное дозозависимое возрастание активности эпоксидгидролазы в микросомах слизистой кишечника и практически не влиял на активность фермента в микросомах печени. Лишь при высокой концентрации луброла (1 %) активность в микросомах слизи-

Таблица 1

Кинетические характеристики эпоксидгидролазы микросом печени и слизистой оболочки тонкой кишки крыс (субстрат — стиреноксид)

Источник фермента	В координатах Лайнуивера — Бэрка		В координатах Эди — Хофсти	
	$K_M$ , мМ	$V_{max}$ , нмоль/мин на 1 мг белка	$K_M$ , мМ	$V_{max}$ , нмоль/мин на 1 мг белка
Микросомы печени	$0,22 \pm 0,05$	$14,2 \pm 3,0$	$0,18 \pm 0,007$	$13,2 \pm 0,02$
Микросомы слизистой тонкой кишки	$0,10 \pm 0,01$	$0,71 \pm 0,04$	$0,10 \pm 0,01$	$0,71 \pm 0,05$

Примечание. Представлены средние данные ( $M \pm m$ ) 3 определений.

Изменения активности эпексидгидролазы (в % от контроля) в микросомах печени и слизистой оболочки тонкой кишки крыс при воздействии неионных детергентов

Источник фермента	Детергент и конечная концентрация (%)								
	твин-80			луброл			BRJ-35		
	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0
Микросомы печени	—3	—3	—11	0	—12	+32	—10	+7	—9
Микросомы слизистой тонкой кишки	+9	+25	—28	+13	—44	—80	+50	+48	+43

Примечание. Представлены средние данные 3 определений.

стой оболочки кишки возрастала на 80 %, в микросомах печени — на 32 %. BRJ-35 также вызывал умеренное возрастание активности эпексидгидролазы в микросомах слизистой тонкой кишки независимо от использованной концентрации, но не влиял на активность фермента в микросомах печени. Необходимо отметить, что в присутствии детергентов снижался уровень неферментного гидролиза субстрата, что затрудняет оценку полученных результатов. Хотя представленные в табл. 2 данные свидетельствуют о более выраженном влиянии неионных детергентов на активность эпексидгидролазы слизистой тонкой кишки, они не позволяют предположить наличие существенных различий в структурированности фермента в мембранах эндоплазматического ретикулаума клеток печени и слизистой оболочки тонкой кишки крыс.

Специфические индукторы или ингибиторы ферментов широко применяются в исследованиях по выяснению роли отдельных ферментов в биотрансформации ксенобиотиков, а также при изучении механизмов их регуляции. В настоящее время установлено, что ряд соединений обладает способностью селективно или с большим преимуществом индуцировать эпексидгидролазу печени. К ним относятся бензил — сильный индуктор и активатор эпексидгидролазы [17, 18], транс-эпоксистильтбен — индуктор микросомальной системы ферментов метаболизма ксенобиотиков, отличающийся от таких «классических» индукторов, как фенобарбитал и 3-метилхолантрен [10], 2-ацетамидофлуорен, вызывающий быстрое и избирательное усиление синтеза эпексидгидролазы [6], и антиоксиданты, в том числе бутилокситолуол [9]. Бутилокситолуол, по нашим данным, скорее всего усиливает синтез фермен-

та в печени, не изменяя его свойств (кажущаяся  $K_m$  для стирепоксида не изменялась существенно, в то время как  $V_{max}$  возрастала до 94 нмоль/мин на 1 мг белка).

Результаты изучения влияния некоторых индукторов на активность эпексидгидролазы микросом печени и слизистой оболочки тонкой кишки крыс представлены на рис. 3. В опытах *in vivo* бензил вызывал значительное возрастание активности микросомальной эпексидгидролазы как в печени (до 670 %), так и в слизистой кишки (до 220 %). При введении транс-эпоксистильтбена и бутилокситолуола активность эпексидгидролазы возрастала в печени в 5 раз, в слизистой тонкой ки-

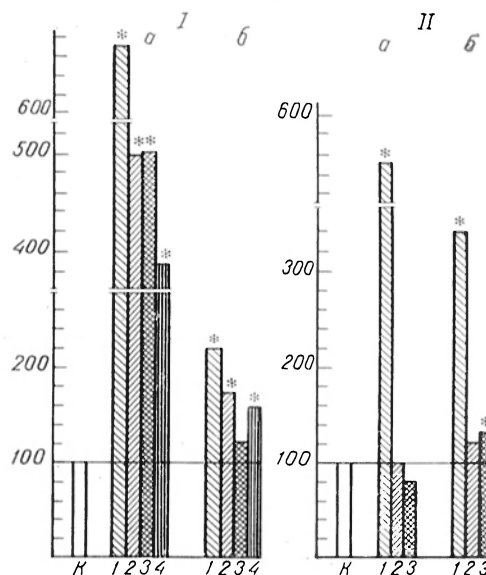


Рис. 3. Влияние модуляторов на активность эпексидгидролазы микросом печени (а) и слизистой тонкой кишки (б) *in vivo* (I) и *in vitro* (II).

По осям ординат — активность фермента (в % от контроля). К — контроль, 1 — бензил, 2 — транс-эпоксистильтбен, 3 — бутилокситолуол, 4 — 2-ацетамидофлуорен. Звездочка —  $p < 0,05$ .

## Влияние ингибиторов на активность эпоксидгидролазы микросом печени и слизистой оболочки тонкой кишки крыс

Ингибитор	Микросомы печени		Микросомы слизистой тонкой кишки	
	нмоль/мин на 1 мг белка	% изменения	нмоль/мин на 1 мг белка	% изменения
Контроль (ДМСО)	6,25±0,09		0,38±0,02	
Эпоксидциклогексен (1,6 мМ)	1,90±0,07	—70	0,20±0,02	—47,4
Контроль (ацетонитрил)	8,00±0,66		0,81±0,04	
1,2-эпокси-3,3,3-трихлорпропан (0,4 мМ)	0,30±0,08	—96,3	0,12±0,03	—85,2
Контроль (ацетонитрил)	6,75±0,23		0,50±0,02	
2-бром-4-нитроацетофенон (0,3 мМ)	3,49±0,16	—48,3	0,25±0,01	—50

Примечание. Представлены средние данные ( $M \pm m$ ) 6 определений. Во всех случаях  $p < 0,001$ .

шки — соответственно на 70 и 20 %. У крыс, получавших однократно 2-ацетаминофлуорен, активность фермента возрастала в печени и слизистой тонкой кишки соответственно в 3,8 и 1,6 раза.

В опытах *in vitro* бензил также вызывал значительную активацию эпоксидгидролазы как в микросомах печени (в 5,5 раза), так и в микросомах слизистой оболочки кишки (в 3,4 раза), в то время как транс-эпоксистильбен и бутилокситолуол вызывали незначительное возрастание активности фермента (соответственно на 20 и 30 %) только в микросомах слизистой кишки.

Для изучения влияния ингибиторов на активность эпоксидгидролазы были использованы эпоксидциклогексен, неконкурентный ингибитор, и 1,2-эпокси-3,3,3-трихлорпропан, бесконкурентный ингибитор эпоксидгидролазы, выделенной из печени различных видов животных [3, 15]. Кроме того, был использован 2-бром-4-нитроацетофенон, который, по данным литературы [5], быстро и необратимо связывается с гистидином, входящим в активный центр эпоксидгидролазы печени крыс. Как видно из табл. 3, 1,2-эпокси-3,3,3-трихлорпропан и 2-бром-4-нитроацетофенон в выбранных концентрациях подавляли в равной степени активность эпок-

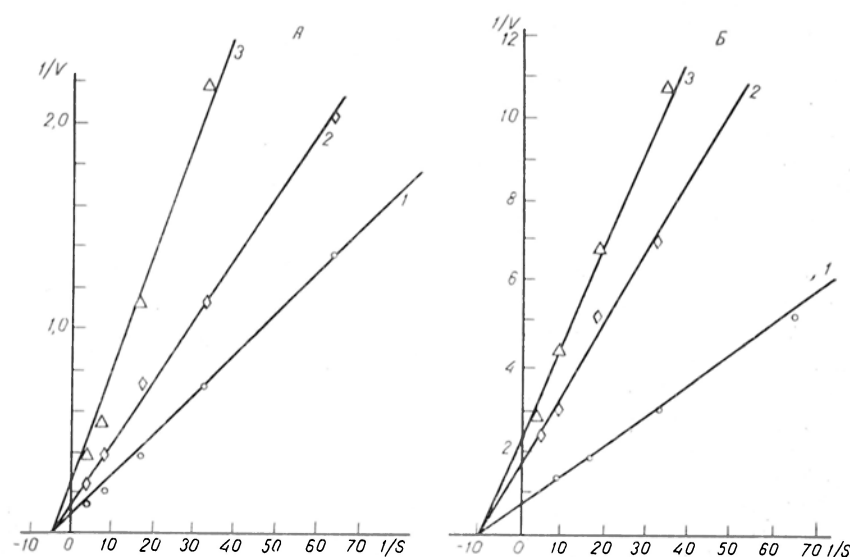


Рис. 4. Влияние эпоксидциклогексена на активность эпоксидгидролазы микросом печени (А) и слизистой тонкой кишки (Б).

Результаты представлены в координатах Лайнунгера—Бэрка. 1 — без добавления циклогексена; 2, 3 — концентрация циклогексена соответственно 0,15 и 0,25 мМ.

сидгидролазы в микросомах печени и слизистой оболочки тонкой кишки. Эпоксидциклогексен оказывал более сильное ингибирующее действие на активность фермента в микросомах печени. При этом установлено, что эпоксидциклогексен ингибирует активность эпоксидгидролазы слизистой тонкой кишки, так же как и активность фермента печени по неконкурентному типу (рис. 4). Константы ингибирования ( $K_i$ ) эпоксидгидролазы микросом печени и микросом слизистой тонкой кишки были близки и составляли соответственно 0,10 и 0,14 мМ.

Тип ингибирования и величины  $K_i$  эпоксидгидролазы эпоксидциклогексеном определяли в двойных обратных координатах при концентрациях субстрата 0,02—0,25 мМ и концентрациях ингибитора 0,15 и 0,25 мМ.

Представленные данные позволяют считать, что эпоксидциклогексен обладает большим сродством к эпоксидгидролазе печени, чем к эпоксидгидролазе слизистой тонкой кишки.

Таким образом, результаты, полученные при сравнительном изучении некоторых свойств эпоксидгидролазы в микросомах печени и слизистой оболочки тонкой кишки крыс Вистар позволяют сделать вывод о том, что оба фермента являются схожими по кинетическим характеристикам, имеют одинаковый оптимум рН 8,7 и, по-видимому, не различаются по структурированности в мембранах эндоплазматического ретикула. Отмечается положительная корреляция между изменениями активности эпоксидгидролазы в микросомах печени и слизистой тонкой кишки при воздействии различных модуляторов как *in vivo*, так и *in vitro*, что позволяет предположить существование общих механизмов регуляции активности обоих ферментов.

Хотя удельная активность эпоксидгидролазы в слизистой оболочке тонкой кишки не превышает 5—10 % от активности, определяемой в печени, ее значение для биотрансформации эпоксидсодержащих соединений, попадающих в организм алиментарным путем, может быть существенным. Это определяется тем, что с пищей постоянно поступают значительные количества консервантов, антиоксидантов, остатков пестицидов и других чужеродных веществ, которые могут поддерживать индуцированное состояние эпоксидгид-

ролазы. При этом следует иметь в виду и быстрое обновление клеток слизистой кишечника и связанную с этим быструю реакцию ферментов метаболизма ксенобиотиков на чужеродные вещества [24]. Есть все основания полагать, что в определенных ситуациях значительная часть эпоксидов подвергается гидролизу при прохождении через желудочно-кишечный тракт, что может приводить к изменению их фармакокинетики и конечных эффектов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Bentley P., Oesch F., Glatt H. R. // Arch. Toxicol. — 1977. — Vol. 39. — P. 65—75.
2. Burchell B., Bentley P., Oesch F. // Biochim. biophys. Acta. — 1976. — Vol. 444. — P. 531—538.
3. Dent J., Schnell S. R. // Biochem. Pharmacol. — 1981. — Vol. 30. — P. 1712—1714.
4. DePierre J. W., Mejer J., Birberg W. et al. // Extrahepatic Drug Metabolism and Chemical Carcinogenesis / Ed. J. Rydström et al. — Amsterdam, 1983. — P. 95—103.
5. Du Bois G. C., Appella E., Levin W. et al. // J. biol. Chem. — 1978. — Vol. 253. — P. 2932—2939.
6. Graichen M. E., Dent J. G. // Carcinogenesis. — 1984. — Vol. 5. — P. 23—28.
7. James M. O., Fouts J. R., Bend J. R. // Biochem. Pharmacol. — 1976. — Vol. 25. — P. 187—193.
8. Jerina D. M., Daly J. W. // Science. — 1974. — Vol. 185. — P. 573—582.
9. Kahl R. // Cancer Lett. — 1980. — Vol. 8. — P. 323—328.
10. Kuo C.-H., Hook J. B., Bernstein J. // Toxicology. — 1981. — Vol. 22. — P. 149—160.
11. Lake B. G. // Biochemical Toxicology: A Practical Approach. — Oxford, 1987. — P. 183—215.
12. Lu A. Y. H., Jerine D. M., Levin W. // J. biol. Chem. — 1977. — Vol. 252. — P. 3715—3723.
13. Moody D. E., Loury D. N., Hammock B. D. // Biochem. Pharmacol. — 1987. — Vol. 36. — P. 570—572.
14. Oesch F. // Enzymatic Basis of Detoxication. — New York, 1980. — Vol. 2. — P. 277—290.
15. Oesch F., Kaubisch N., Jerina D. M., Daly J. W. // Biochemistry (Wash.). — 1971. — Vol. 10. — P. 4858—4866.
16. Papadopoulos D., Seidegård J., Georgellis A., Rydström J. // Chem.-Biol. Interact. — 1985. — Vol. 55. — P. 249—260.
17. Seidegård J., DePierre J. W. // Europ. J. Biochem. — 1980. — Vol. 112. — P. 643—648.
18. Seidegård J., DePierre J. W., Guentlher T. M., Oesch F. // Ibid. — 1986. — Vol. 159. — P. 415—423.
19. Siekmann L., Thull P., Breuer H. // Acta endocr. (Kbh.). — 1980. — Vol. 95. — P. 49—57.
20. Sims P., Grover P. L., Swaisland A. et al. // Nature. — 1974. — Vol. 252. — P. 326—327.
21. Stohs S. J., Grafström R. C., Burke M. D. et al. // Arch. Biochem. — 1976. — Vol. 177. — P. 105—116.

22. Swenson D. H., Lin J. K., Miller E. C., Miller J. A. // Cancer Res. — 1977. — Vol. 37. — P. 172—181.
23. Vainio H. // Chem.-Biol. Interact. — 1978. — Vol. 22. — P. 117—124.
24. Wollenberg P., Ulrich V. // Extrahepatic Metabolism of Drugs and Other Foreign Compounds / Ed. T. Gram. — Lancaster, 1980. — P. 267—276.

Поступила 15.03.88

#### A COMPARATIVE STUDY OF MICROSOMAL EPOXIDE HYDROLASE OF RAT LIVER AND SMALL INTESTINE

L. V. Kravchenko, E. E. Kuz'mina, V. S. Sobolev  
Institute of Nutrition, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Activity of epoxide hydrolase was studied in microsomes of rat liver and small intestinal

mucosa with styrene oxide as substrate using high performance liquid chromatography. Specific activity of epoxide hydrolase in microsomes from small intestine constituted 5-10 % of the activity in liver microsomes. Both these enzymes had similar kinetic parameters, the same pH optimum around pH 8.7; their activity was altered only slightly in presence of anionic detergents. The enzyme activity was increased in liver and small intestine after administration of benzil, trans-stilbene oxide, 2-acetamidofluorene and butylated hydroxytoluene. 1,2-epoxy-3,3,3-trichloropropane and 2-brom-4-nitroacetophenon inhibited similarly epoxide hydrolase in hepatic and intestinal microsomes. Cyclohexene oxide inhibited both these enzymes by the non-competitive type, exhibiting the higher affinity to liver epoxide hydrolase.

УДК 617.721.6-002-092.9-092:616.155.3.085

Г. И. Клебанов, И. В. Бабенкова, Ю. О. Теселкин, О. С. Комаров,  
Ю. А. Владимиров

#### РОЛЬ АКТИВАЦИИ ПОЛИМОРФНО-ЯДЕРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ В РАЗВИТИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО УВЕИТА

Кафедры биофизики и глазных болезней И ММИ им. Н. И. Пирогова

В возникновении и развитии многих заболеваний человека и животных важная роль принадлежит активации процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) клеточных мембран и липопротеидов крови [6]. Это в полной мере относится к ряду заболеваний органа зрения [2, 4, 12], в том числе к увеитам [5, 8].

В развитии локальных и генерализованных воспалительных реакций принимают участие полиморфно-ядерные лейкоциты (ПМЛ) крови и другие фагоциты [22], функциональная активность которых при этом увеличивается. Активация фагоцитов сопряжена с так называемым «респираторным взрывом», который сопровождается генерацией активных форм кислорода (АФК): супероксидного анион-радикала, перекиси водорода, гидроксильного радикала, синглетного кислорода [20] и других прооксидантов, что лежит в основе бактерицидного [23] и цитотоксического эффекта [22] активированных фагоцитов. В процессе развития локального воспаления происходят хемотаксис ПМЛ в зону воспаления, их инфильтрация через стенку сосудов в ткань и лавинообразное выделение клетками цитотоксических продуктов — инициаторов ПОЛ [17],

что создает локальный перевес над их ингибиторами.

Таким образом, чрезмерное увеличение функциональной активности ПМЛ, приводящее к накоплению продуктов их активации и сопровождающееся повышением уровня ПОЛ, может повлечь за собой повреждение нормальных тканей и расширение зоны воспаления [22].

Целью настоящей работы явилось исследование изменения функциональной активности ПМЛ крови в ходе развития и течения экспериментального токсико-аллергического увеита кроликов.

#### Методика

Исследования проведены на кроликах породы шиншилла массой 2,5—3,5 кг. Для получения модели токсико-аллергического увеита животные были 4-кратно подкожно иммунизированы нормальной лошадиной сывороткой из расчета 1 мл на 1 кг массы еженедельно. На 10-е сутки после последней иммунизации в переднюю камеру глаза вводили разрешающую дозу антигена — 0,1 мл сыворотки. Пик воспаления в виде переднего увеита наблюдали на 3-и сутки после введения антигена. Оценку степени тяжести симптомов проводили по 4-балльной системе [10]. При этом учитывали воспалительные изменения конъюнктивы (инъекция), роговицы (инфильтрация, «запотелость» эндотелия, врастание сосудов в



роговицу), радужки (отек, гиперемия, депигментация, задние синехии), экссудат в передней камере глаза, помутнение хрусталика, внутриглазное давление, определяемое пальпаторно. Исчезновение офтальмологических показателей воспаления происходило через 23—25 сут. Животные были разделены на 4 группы. У кроликов 1-й группы ( $n=5$ ), которая служила контролем, был вызван увеит по описанной выше схеме. Животные 2-й группы ( $n=4$ ) за 3 сут до введения антигена в переднюю камеру глаза получали антиоксидант дибунол рег оз ежедневно однократно в дозе 60 мг/кг [13]. Животным 3-й группы ( $n=4$ ) внутримышечно вводили пипольфен (0,15 мл 2,5 % раствора) в качестве препарата с сильными антиокислительными свойствами [9]. После введения антигена кролики 2-й и 3-й групп продолжали получать дибунол и пипольфен в течение 7 сут. Животным 4-й группы ( $n=2$ ) в течение первых 3 сут после введения антигена в переднюю камеру глаза инъецировали внутримышечно пирогенал [7] в количестве 20 МПД (минимальная пирогенная доза). Однократное введение 20 МПД интактным кроликам вызывало повышение функциональной активности ПМЛ крови в 2—2,5 раза. Один кролик на протяжении всего эксперимента получал внутримышечно инъекции циклофосфана (10 мг/кг 1 раз в 4 сут). ПМЛ крови выделяли по методу [15]. Функциональную активность ПМЛ измеряли методом люминолазависимой хемилюминесценции (ЛХЛ) [14]. В измерительную кювету хемилюминометра вводили  $5 \cdot 10^5$  клеток и 0,1 мл  $5,6 \cdot 10^{-4}$  М раствора люминола, объем суспензии доводили до 5 мл раствором Хенкса (рН 7,45). Для стимуляции клеток в пробу добавляли 0,4 мл суспензии сульфата бария (20 мг/мл). Измерения проводили при 37 °С.

Уровень ПОЛ в гомогенатах тканей глаза определяли по накоплению ТБК-активных продуктов [3]. Антиокислительную активность плазмы крови измеряли методом хемилюминесценции [11]. Содержание общих липидов в гомогенатах тканей определяли с помощью набора «Био-Ла-Тест» (ЧССР).

## Результаты и обсуждение

После введения антигена в переднюю камеру глаза кролика развивается иммунное воспаление в виде переднего увеита с вовлечением в процесс роговицы и передних слоев хрусталика. В табл. 1 приведены суммы баллов (для двух глаз), которые отражают степень выраженности воспалительных изменений в ходе течения увеита. В контрольной группе животных увеит достигал наибольшей тяжести по всем симптомам к 3-м суткам после введения антигена. В это время наблюдали резко выраженную смешанную инъекцию глазного яблока, слезотечение, диффузную инфильтрацию роговицы и ее отек, выпот в переднюю камеру желтовато-белого цвета, отложение экссудата на передней кап-

Таблица 1  
Степень выраженности воспалительных изменений (в баллах) в ходе течения экспериментального увеита у кроликов ( $M \pm m$ )

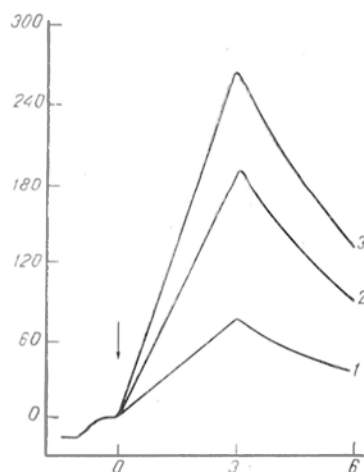
Условия опыта	Число животных	Срок определения показателя, сутки			
		3-и	7-е	12-е	30-е
Увеит (контроль)	5	42±4	37±4	28±3	23±2,5
Дибунол	4	21±3	12±3	4±2,5	3±2
Пипольфен	4	28±3	18±2,5	11±2	6±1
Пирогенал	2	58±2	61±2,5	—	—

Примечание. Во всех случаях  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

суле хрусталика. Радужка была резко изменена, отечна, гиперемирована, ржавого цвета. Зрачок был неправильной формы из-за грубых задних синехий, реакция зрачка на свет отсутствовала. Внутриглазное давление было повышено. На 7-е сутки клинические проявления увеита были почти такими же, как и на 3-и сутки. С 12-х суток наблюдали признаки затухания воспалительного процесса. К 30-м суткам офтальмологические показатели воспаления у кроликов исчезли. Однако остались осложнения: депигментация радужки, грубые задние синехии, помутнение хрусталика, изменение внутриглазного давления, выраженное вращение сосудов в роговицу, что нашло отражение в сумме баллов.

Предварительное введение животным антиоксидантов дибунола и пипольфена обусловило более легкое течение увеита. Так, на 3-и сутки наблюдали менее выраженный отек роговицы, небольшое количество экссудата в передней камере, не было изменений со стороны хрусталика, повышение внутриглазного давления было кратковременным. Последующее лечение способствовало быстрому затуханию воспалительного процесса и привело к меньшему числу осложнений. К 12-м суткам воспалительные изменения радужки и роговицы почти исчезли. Осталась лишь конъюнктивальная и перикорнеальная инъекция. К 30-м суткам отмечали незначительное вращение сосудов в роговицу и задние синехии, рисунки радужки был несколько сглажен.

Инъекции пирогенала, наоборот, привели к развитию тяжелой формы



Типичная кинетика развития хемилюминесценции ПМЛ крови при стимуляции сульфатом бария.

По оси абсцисс — время (в мин); по оси ординат — интенсивность хемилюминесценции клеток (в отн. ед.), которую определяли как разность между максимальным уровнем активированной и спонтанной ЛХЛ. 1 — ПМЛ интактных кроликов; 2 — ПМЛ кроликов на 6-м часу после внутримышечного введения 20 МПД пирогенала; 3 — ПМЛ кроликов с увеитом. Стрелка — момент введения активатора

увеита с резко выраженным геморрагическим компонентом. Наблюдалась сильная гефема и понижение внутриглазного давления, а также признаки атрофии глаза. Отмечалось резкое ухудшение общего состояния животных. Животные погибли на 8-е сутки увеита, по-видимому, из-за множественных кровоизлияний и в другие органы.

На рисунке показана кинетика развития хемилюминесценции ПМЛ крови интактных кроликов, кроликов с увеитом, а также на 6-й час после введения пирогенала.

В табл. 2 представлены результаты измерения интенсивности ЛХЛ ПМЛ в течение эксперимента. До иммуниза-

ции интенсивность ЛХЛ составляла  $72 \pm 21$  усл. ед. В ходе иммунизации функциональная активность ПМЛ увеличивалась примерно в 2 раза, что, по-видимому, было следствием образования при повторной иммунизации иммунных комплексов (ИК), которые активируют систему комплемента. Активация системы комплемента вызывает генерацию медиаторов воспаления, оказывающих стимулирующее воздействие на фагоциты [22]. Кроме того, ИК сами способны активировать ПМЛ [18]. Так, при введении антигена в переднюю камеру глаза иммунизированного кролика происходит образование и отложение в стенках сосудов глаза большого количества ИК [26]. Хемотаксис ПМЛ в зону с большим градиентом хемоаттрактанта (ИК), их активация, сопровождающаяся значительным увеличением продукции различных прооксидантов, приводят к развитию воспаления сосудистой оболочки глаза [16, 24].

При подавлении иммунного ответа на введение лошадиной сыворотки циклофосфаном развития увеита не происходило. Циклофосфан не изменяет функциональную активность фагоцитов [25], но препятствует образованию ИК за счет торможения пролиферации В-лимфоцитов. У кролика, получавшего инъекции циклофосфана, активность клеток оставалась почти одинаковой на протяжении всего эксперимента и составляла  $90 \pm 10$  усл. ед. При развитии увеита (к 7-м суткам) уровень функциональной активности ПМЛ был приблизительно в 3,5 раза выше нормы и оставался довольно высоким, несмотря на затухание воспалительного процесса к 20-м суткам заболевания. Введение дибунола

Таблица 2

Интенсивность хемилюминесценции ПМО крови (в отн. ед.) в ходе развития экспериментального увеита у кроликов\* ( $M \pm m$ )

Условия опыта	Число животных	Перед иммунизацией	Период иммунизации	Введение антигена	3-и сутки увеита	7-е сутки увеита	20-е сутки увеита
		срок от начала эксперимента, сут					
		0	28	31	34	38	51
Увеит (контроль)	5	$72 \pm 21$	$142 \pm 25$	$148 \pm 24$	$231 \pm 28$	$247 \pm 20$	$193 \pm 21$
Дибунол	4	$68 \pm 18$	$127 \pm 20$	$75 \pm 14^*$	$58 \pm 12^*$	$51 \pm 13^*$	$98 \pm 11^*$
Пипольфен	4	$75 \pm 20$	$146 \pm 25$	$106 \pm 21$	$105 \pm 23^*$	$124 \pm 19^*$	$133 \pm 21$

Примечание. Звездочка —  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

и пипольфена достоверно снижало по сравнению с контролем интенсивность ЛХЛ ПМЛ крови.

Таким образом, между изменением функциональной активности ПМЛ крови и клиническими проявлениями увеита существует тесная корреляция. Введение антиоксидантов снижает функциональную активность ПМЛ, с одной стороны, и улучшает течение и исход заболевания — с другой. И, наоборот, дополнительная стимуляция ПМЛ пирогеналом приводит к резкому ухудшению клинического течения увеита и состояния всего организма.

При развитии локального воспаления происходят увеличение активности фагоцитов, их хемотаксис в зону воспаления, инфильтрация через стенку капилляров в ткань и локальная секреция прооксидантов в очаг воспаления [22]. Выделенные клетками АФК и другие прооксиданты инициируют ПОЛ и вызывают повреждение клеточных мембран. Следовательно, уменьшение активности фагоцитов или элиминация их цитотоксических продуктов должны оказать положительное влияние на характер течения заболевания. Аккумуляция фагоцитов в стекловидном теле, вызванная локальной инъекцией гемоглобина или системы ксантин — ксантиноксидаза — плазма крови, сопровождалась развитием увеита [16, 24], а введение антилейкоцитарного глобулина или препарата, вызывающего лейкопению, предотвращало развитие стромальных поражений в васкуляризации роговицы при герпетическом кератите [21].

В нашей работе для лечения увеита были использованы дибунол и пипольфен. Защитное действие этих

антиоксидантов, по-видимому, обуславливается двумя причинами: во-первых, увеличением содержания антиоксидантов в тканях глаза (что относится скорее к липофильному антиоксиданту дибунолу) и защитой липидов тканей от ПОЛ; во-вторых, перехватом АФК, продуцируемых ПМЛ (что в большей степени относится, по-видимому, к водорастворимому пипольфену). Действительно, количество ТБК-активных продуктов в тканях сосудистой оболочки глаза у кроликов с увеитом, леченных дибунолом, оказалось достоверно ниже такового у интактных животных (табл. 3). Введение антиоксидантов сопровождалось не только ингибированием ПОЛ тканей организма, но и увеличением суммарной антиокислительной активности плазмы крови. Так, при введении дибунола и пипольфена на 7-е сутки увеита антиокислительная активность плазмы крови была выше на 12,5 % по сравнению с соответствующими показателями для животных, не получавших антиоксидантов.

Защищая липидную фазу мембран клеток и липопротеидов от ПОЛ и элиминации АФК, продуцируемых активированными ПМЛ, антиоксиданты, кроме того, могут, по-видимому, оказывать влияние на количество циркулирующих в русле крови ПМЛ [1]. Так, было обнаружено (табл. 4), что в процессе развития токсико-аллергического увеита количество лейкоцитов в крови кролика увеличивается вплоть до 7-х суток развития заболевания. Аналогично через 6 ч после введения пирогенала параллельно увеличению удельной активности ПМЛ происходило увеличение и количества клеток в русле крови (примерно в 2 раза). Введение антиоксидантов дибунола и пипольфена, наоборот, вызывало уменьшение не только активности, но и количества циркулирующих ПМЛ.

Таким образом, при экспериментальном токсико-аллергическом увеите выявлены активация ПМЛ крови и повышение уровня ПОЛ в тканях глаза и связь этих процессов с клиническими проявлениями заболевания. Применение антиоксидантов улучшает клиническую картину заболевания и одновременно подавляет функциональную активность ПМЛ крови.

Т а б л и ц а 3

Накопление ТБК-активных продуктов (в нмоль на 1 мг липидов) в сосудистой оболочке глаза при экспериментальном увеите и при его лечении дибунолом ( $M \pm m$ )

Условия опыта	Ткань	
	радужка (n = 6)	сосудистая оболочка (n = 6)
Увеит	1,75 ± 0,37*	3,67 ± 0,40*
Дибунол	0,97 ± 0,13	2,43 ± 0,18
Интактные животные	0,71 ± 0,11	2,06 ± 0,15

П р и м е ч а н и е. Звездочка —  $p < 0,05$  по сравнению с интактными животными.

Изменение общего числа лейкоцитов и числа ПМЛ в периферической крови (в тыс/мм<sup>3</sup>) в ходе развития экспериментального увеита ( $M \pm m$ )

Исследуемый показатель	Условия опыта	Число животных	Перед иммунизацией	Период иммунизации	Введение антигена	3-и сутки увеита	7-е сутки увеита	12-е сутки увеита
			срок от начала эксперимента, сут					
			0	28	31	34	38	43
Число ПМЛ	Увеит (контроль)	5	3,0±0,1	4,5±0,2	4,0±0,2	5,8±0,3	6,5±0,3	5,3±0,2
	Дибунол	4	3,2±0,1	4,5±0,2	2,8±0,1*	4,0±0,2*	4,3±0,3*	3,4±0,2*
Общее число лейкоцитов	Пипольфен	4	3,1±0,1	4,2±0,2	3,2±0,2	5,1±0,3	5,3±0,3*	4,8±0,2
	Увеит (контроль)	5	6,6±0,2	8,0±0,3	7,9±0,3	9,0±0,4	10,7±0,7	8,1±0,5
	Дибунол	4	6,8±0,2	8,1±0,3	6,0±0,4*	7,7±0,4	7,0±0,3*	6,9±0,3
	Пипольфен	4	6,6±0,2	8,0±0,4	6,8±0,4	7,5±0,5*	8,5±0,5*	7,8±0,4

Примечание. Звездочка —  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

## ЛИТЕРАТУРА

- Агафонова Н. А., Лунина Н. В. // Физиол. журн. — 1987. — Т. 33, № 1. — С. 57—63.
- Бабижаев М. А., Деев А. И. // Вопр. мед. химии. — 1987. — № 2. — С. 125—132.
- Гаврилов В. Б., Гаврилова А. Р., Ма-жуль Л. М. // Там же. — № 1. — С. 118—122.
- Гундорова Р. А., Далгат Л. Д., Ромащенко А. Д., Майчук Ю. Ф. // Офтальмол. журн. — 1981. — № 3. — С. 175—176.
- Гусева М. Р., Комаров О. С., Котяшева Г. И. и др. // Возрастные особенности органа зрения в норме и при патологии у детей. — М., 1984. — С. 66—72.
- Дубур Г. Я., Велена А. Х. // Биомембраны: Структура, функции, медицинские аспекты. — Рига, 1981. — С. 257—277.
- Климов В. В., Кошовкина Т. В. // Лаб. дело. — 1982. — № 10. — С. 48—49.
- Ковалевский Е. И., Котяшева Г. И., Комаров О. С. и др. // Актуальные вопросы патологии сетчатой и сосудистой оболочек глаза. — Кишинев, 1985. — С. 100—101.
- Ковалевский Е. И., Клебанов Г. И., Теселкин Ю. О. и др. // Вестн. офтальмол. — 1987. — № 4. — С. 48—51.
- Котяшева Г. И. // Возрастные особенности органа зрения в норме и при патологии у детей. — М., 1975. — С. 168—172.
- Лопухин Ю. М., Владимиров Ю. А., Молоденков М. Н. и др. // Бюл. exper. биол. — 1983. — № 2. — С. 61—63.
- Нестеров А. П., Краснов С. К., Кашинцева Л. Т. // Всесоюзный съезд офтальмологов, 6-й: Тезисы докладов. — М., 1985. — Т. 2. — С. 3—10.
- Якубенко Е. Д., Мареева Т. Е., Мананков А. К. // Укр. биохим. журн. — 1985. — Т. 57, № 1. — С. 79—82.
- Allen R. C., Rune L. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1972. — Vol. 47, N 6. — P. 679—684.
- Boyum A. // Scand. J. clin. Lab. Invest. — 1968. — Suppl. 97. — P. 77—85.
- Burke J. M. // Invest. Ophthalm. — 1981. — Vol. 20, N 4. — P. 435—441.
- Engler R., Dahlgren M., Peterson M. et al. // Amer. J. Physiol. — 1986. — Vol. 251, N 1. — P. H93—H100.
- Gale R., Bertouch J. V., Gordon T. P. et al. // Ann. rheum. Dis. — 1984. — Vol. 43, N 1. — P. 34—39.
- Knight J. A., Anderson S., Rawle J. M. // Clin. Chem. — 1972. — Vol. 18, N 2. — P. 199—204.
- McPhail L. C., Snyderman R. // Regulation of Leukocyte Function. — New York, 1984. — P. 247—279.
- Meyers-Elliott R. H., Chitjian P. A. // Invest. Ophthalm. — 1981. — Vol. 20, N 6. — P. 784—798.
- Palmblad J. // Scand. J. Rheum. — 1984. — Vol. 13, N 2. — P. 163—172.
- Segal A. W. // Med. Biol. — 1984. — Vol. 62, N 2. — P. 81—84.
- Sery T. W., Petrillo R. // Curr. Eye Res. — 1984. — Vol. 3, N 1. — P. 243—252.
- Tam P. E., Hinsdill R. D. // Toxicol. appl. Pharmacol. — 1984. — Vol. 76, N 1. — P. 183—194.
- Vergani S., Di Mauro E., Davies E. T. et al. // Brit. J. Ophthalm. — 1986. — Vol. 70, N 1. — P. 60—63.

Поступила 22.01.88

# ROLE OF POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES ACTIVATION IN DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL UVEITIS

G. I. Klebanov, I. V. Babenkova, Yu. O. Teselkin, O. S. Komarov, Yu. A. Vladimirov

II Medical School, Moscow

Increase in functional activity of blood polymorphonuclear leukocytes and in the rate of lipid peroxidation in eye tissues was found in rabbits with experimental uveitis. Preadministration of antioxidants pipolphen and ionol led to considerable improvement of the uveitis clinics, to inhibition of lipid peroxidation in eye tissues and to decrease of the leukocytes in circulation.

# МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 616.154.94:615.355:577.152.344]-074

В. А. Исаченков, О. П. Вакулина, В. А. Томилин

## ИММУНОСОРБЦИОННЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОКИНАЗЫ

Институт биомедицинской технологии Минздрава СССР, Москва

Энзимотерапия тромбозов основывается на использовании экзогенных протеаз — активаторов пламиногена, специфически катализирующих превращение пламиногена в плазмин, который в свою очередь лизирует фибриновый тромб. Наиболее широкое применение среди активаторов пламиногена нашла урокиназа (КФ 3.4.21.31) — сериновая протеаза, выделяемая из мочи человека или получаемая клонированием гена почки человека [10, 13]. При лечебном использовании урокиназы требуется тщательный контроль за ее активностью в крови и других биологических жидкостях. Классический метод определения активности по Аструпу и его модификации [2, 4], основанные на лизисе фибринового геля в присутствии пламиногена, непригодны для этих целей. В сыворотке крови содержатся белки ( $\alpha_2$ -макроглобулин,  $\alpha_1$ -антитрипсин,  $\alpha_2$ -антиплазмин и др.), ингибирующие проявляемый урокиназой опосредованный фибринолиз [16]. Обнаружение урокиназы в сыворотке крови также затруднено по причине связывания этим ферментом белков-ингибиторов с константой, совпадающей с таковой у антител [9]. Секреция урокиназы сопровождается одновременным высвобождением из клеток ее ингибиторов [14]. Поэтому многие закономерности образования и секреции урокиназы тканями человека и животных остаются неизученными ввиду отсутствия методов ее определения на фоне ингибиторов.

Целью настоящего исследования явилась разработка метода, позволяющего осуществлять количественное определение урокиназы в сыворотке крови человека в присутствии высоко- и низкомолекулярных ингибиторов фермента различной химической природы. В основу метода положена сорбция комплексов урокиназа — ингиби-

тор из анализируемых проб иммуносорбентом на основе антител к урокиназе.

### Методика

Антитела к урокиназе человека получали иммунизацией кроликов препаратом фирмы "Green Cross" (Япония), который дополнительно очищали от белковых примесей на колонке с моноклональными антителами к урокиназе (любезно предоставлена С. П. Домогатским, ВКНЦ). 20 000 МЕ фермента в полном адьюванте Фрейнда вводили внутриочно в 30 различных точек тела, на 54-й день реиммунизировали внутримышечным введением такой же дозы урокиназы; спустя 9—14 дней получали антисыворотки и проверяли их титры. Титр антисыворотки выражали показателем ее разведения, обеспечивающего 50 % ингибирование 50 МЕ урокиназы. К 100 мкл антисыворотки в соответствующем разведении добавляли 10 мкл урокиназы, после инкубации в течение 1 ч при 37 °С определяли фибринолитическую активность (ФА) фермента методом, описанным ниже. В качестве контроля использовали преиммунную сыворотку крови кроликов. Антисыворотки, обладающие титром не ниже 1:2000, инактивировали в течение 30 мин при 56 °С и лиофильно высушивали. Иммуносорбент готовили сополимеризацией белков антисыворотки изобутиловым эфиром хлороугольной кислоты ("Merck", ФРГ) в 0,2 М ацетатном буфере (рН 5,4) при 20 % концентрации белка [1]. Готовый иммуносорбент хранили при 4 °С в 0,05 М трис-HCl-буфере (рН 7,6) с 0,14 М NaCl (рабочий буфер) и 0,02 % азидом натрия.

Активность урокиназы определяли в полистиреновых пробирках (12×75 мм) в 3 этапа. На 1-м этапе к 5—10 мкл сорбента (связывает 50 % индикаторной дозы урокиназы — ИДУ), суспендированного в 300 мкл рабочего буфера с 0,1 % бычьим сывороточным альбумином, вносили 10—100 мкл анализируемых образцов сыворотки или стандарта (0,5—50 МЕ на пробу). После инкубации в течение 6 ч (время, минимально достаточное для достижения равновесного состояния) при 20 °С и постоянном встряхивании добавляли 4 мл рабочего буфера и центрифугировали при 2000 g в течение 10 мин при 4 °С. При больших объемах образцов сыворотки или высоких концентрациях ингибиторов урокиназы процедуру отмывки сорбента повторяли. На 2-м этапе к осадкам добавляли 250 мкл ИДУ (1—5 МЕ на пробу) и инкубировали в течение ночи при тех же условиях. Чувствительность определения зависит от количества сорбента и ИДУ (рис. 1), поэтому количества этих ингре-

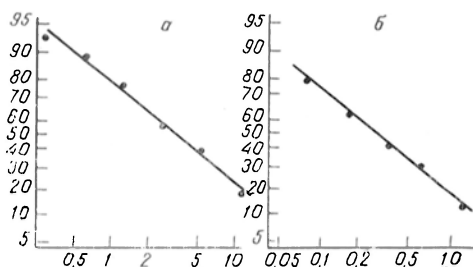


Рис. 1. Калибровочные графики определения урокиназы.

По оси абсцисс — содержание урокиназы (в МЕ на пробу); по оси ординат — связывание (в %). А — 10 мкл иммуносорбента, ИДУ — 2,5 МЕ на пробу; Б — 5 мкл иммуносорбента, ИДУ — 1,0 МЕ на пробу.

дентов и объем вносимого образца в опытах варьировали. На 3-м этапе после центрифугирования в надосадочной жидкости определяли остаточную ФА ИДУ. Анализ ФА основан на превращении ферментом плазминогена в плазмин с последующим гидролизом фибрина, равномерно распределенного в агаровом геле. Все реактивы готовили на рабочем буфере. 10 мл расплавленного 3,3 % агара ("Difco", США) смешивали при 45 °С с 15 мл 0,9 % фибриногена и 0,5 мл тромбина (0,3 ЕД/мл, Каунас). Фибрин-агаровый гель формировали на пластиковой чашке Петри (диаметр 9 см), предварительно покрытой высушенной пленкой агара. В чашку вставляли матрицу с 19 отверстиями и пробивали лунки (диаметр пробойника 4 мм; рис. 2). Образцы вносили в объеме 20 мкл. По истечении с начала эли-модифузии при 37 °С достаточного количества времени (5—18 ч) измеряли площадь зон

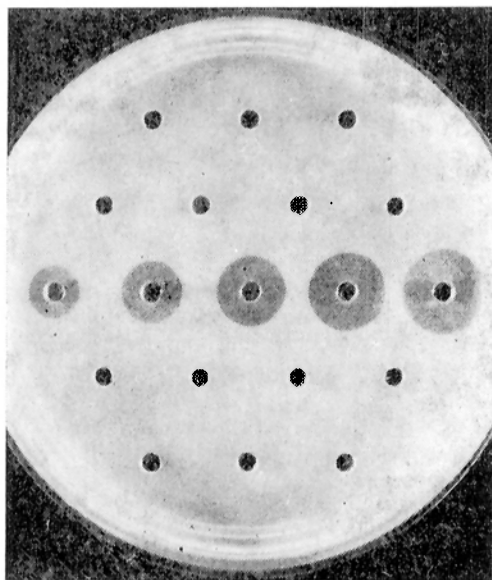


Рис. 2. Зависимость площади лизиса фибрина в агаровом геле от содержания урокиназы (фото).

лизиса фибрина. Активность урокиназы выражали в международных единицах (МЕ), используя для построения калибровочных кривых урокиназу фирмы "Green Cross". Для построения графиков использовали преобразование log-logit. Для повышения чувствительности иммуносорбционного метода в ряде опытов к фибриногену добавляли плазминоген (12,5—200 мкг/мл), выделенный из сыворотки крови человека с помощью лизин-сефарозы ("Sigma", США) по методу [7].

При изучении возможности определения урокиназы иммуносорбционным методом в присутствии ее высоко- и низкомолекулярных ингибиторов стандартные количества урокиназы инкубировали в течение 1 ч при 37 °С с цельной сывороткой крупного рогатого скота, 0,05 мМ ингибитором трипсина из соевых бобов, 0,5 М бензамидином, 0,5 М аргинином, 0,05 М  $\epsilon$ -аминокапроновой кислотой.

Исследовали содержание иммунореактивной урокиназы в сыворотке крови человека. Кровь получали от 20 здоровых доноров-мужчин (21—48 лет) на станции переливания крови клинической больницы № 6 Минздрава СССР (Москва), сыворотку хранили при —40 °С до использования. В качестве контроля была взята смесь индивидуальных сывороток, выдержанная в течение 6 ч при 20 °С при избытке иммуносорбента. Данные обрабатывали статистически с применением  $t$ -критерия Стьюдента.

## Результаты и их обсуждение

Урокиназа, подобно другим высокомолекулярным антигенам, в комплексе с ингибиторами сохраняет сродство к поликлональным антителам иммуносорбента. На 1-м этапе анализа антиген как в свободном виде, так и в комплексе с ингибиторами присоединяется к сорбенту; свободные ингибиторы удаляются при отмывке сорбента. На 2-м этапе остаточная емкость сорбента насыщается ИДУ. На 3-м этапе по фибринолитическому тесту определяется доля несвязавшейся ИДУ, которая отражает количество урокиназы, присутствующей в образце или стандарте на 1-м этапе.

В соответствии с принципом метода были получены калибровочные графики (см. рис. 1). Ингибирование связывания ИДУ в зависимости от количества урокиназы описывается линиями с крутым наклоном, причем с уменьшением ИДУ и мест связывания чувствительность определения значительно возрастает. Зная удельную активность высокомолекулярной формы урокиназы (200 000 МЕ/мг) [15], можно рассчитать, что предел чувствительности иммуносорбционного метода сопоставим с таковым радиоиммунологических методов определения высоко-



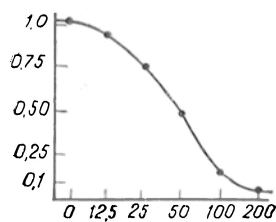


Рис. 3. Влияние плазминогена на пределы чувствительности определения ФА ИДУ. По оси абсцисс — содержание плазминогена (в мкг/мл); по оси ординат — активность урокиназы (в МЕ/мл).

молекулярных антигенов и составляет 0,25 нг на пробу. Зона лизиса в фибрин-агаровом геле зависит в конечном счете от количества плазмينا, образуемого урокиназой из его зимогена. Такое ферментативное сопряжение позволяет значительно повысить чувствительность обнаружения урокиназы по фибринолизу путем внесения дополнительных количеств плазминогена (рис. 3). При том количестве плазминогена, который присутствует в коммерческом препарате фибриногена из-за их взаимного сродства [12], чувствительность определения ФА составляет приблизительно 0,02 МЕ на пробу (1 МЕ/мл); при внесении насыщающих количеств плазминогена этот показатель снижается на порядок. Следует отметить также преимущества количественной визуализации ФА на фибрин-агаровом геле. Строго радиальная диффузия фермента объективизирует процесс измерения образующегося прозрачного кольца на матовом фоне (см. рис. 2). Плотность фибрин-агарового геля позволяет осуществлять любые манипуляции по перемещению чашек. При нанесении на чашку вместе с пробами внутренних стандартов температура и продолжительность инкубации не лимитированы;

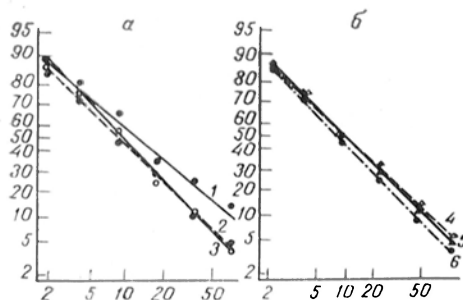


Рис. 4. Влияние высокомолекулярных (а) и низкомолекулярных (б) ингибиторов на калибровочные графики определения урокиназы.

По оси абсцисс — содержание урокиназы (в МЕ/мл); по оси ординат — связывание (в %). 1 — сыворотка крови крупного рогатого скота; 2 — 0,05 мМ ингибитор трипсина из соевых бобов; 3 — рабочий буфер; 4 — 0,5 М бензамидин; 5 — 0,5 М аргинин; 6 — 0,05 М  $\epsilon$ -аминокапроновая кислота.

при этом с удлинением инкубации чувствительность анализа ФА ИДУ возрастает.

Результаты иммуносорбционного определения урокиназы в присутствии ее ингибиторов различной природы иллюстрирует рис. 4. Сыворотка крови крупного рогатого скота была взята как источник высокомолекулярных ингибиторов урокиназы [11], основным из которых является  $\alpha_2$ -макроглобулин, образующий с ферментом ковалентную тиоэфирную связь [9]. Ингибитор трипсина из соевых бобов представляет собой другой высокомолекулярный (мол. масса 21 000) ингибитор, взаимодействующий с урокиназой нековалентно [8]. В качестве представителей низкомолекулярных ингибиторов, действующих по типу конкурентного ингибирования, были исследованы бензамидин, аргинин,  $\epsilon$ -аминокапроновая кислота [6]. Калибровочные графики в присутствии всех перечисленных соединений и сыворотки крови оказались близки или идентичны.

Возможность анализа урокиназы иммуносорбционным методом в присутствии ингибиторов позволила определить содержание фермента в сыворотке крови здоровых людей. Уровень иммунореактивной урокиназы составил  $166 \pm 8,9$  МЕ/мл (индивидуальные вариации от 107 до 260 МЕ/мл). После предварительной иммуносорбции сыворотка крови утрачивала иммуноконкурентность в условиях определения активности урокиназы.

Клиническое значение определения активности урокиназы в крови и других биологических жидкостях до сих пор не оценено. Измерение этого показателя может оказаться диагностически и прогностически важным не только при тромбозах или иных нарушениях свертывающей системы крови. Биосинтез и секреция урокиназы осуществляются ограниченным числом нормальных тканей, главным образом почками [3]. Урокиназа может быть тканеспецифическим белком почки, а его уровень в крови или моче — биохимическим тестом на функциональное состояние почек. Неопластическая трансформация клеток различного тканевого происхождения сопровождается значительным увеличением содержания и секреции активаторов плазминогена, что служит биохимическим

маркером неопластического состояния клеток как *in vivo*, так и *in vitro* [5]. Следовательно, определение активности урокиназы может иметь важное значение у онкологических больных. Необходимо подчеркнуть, что положенный в основу метода иммуносорбционный принцип позволяет измерять в крови уровень не только урокиназы, но и других протеаз, ингибируемых сывороточными белками.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Никифорова Г. П., Антонов А. С., Кривошеев О. Г., Исаченков В. А. // Пробл. эндокринол. — 1977. — № 1. — С. 74—79.
2. Angles-Cano E., Julten Y. // Immunol. Meth. — 1984. — Vol. 69. — P. 115—127.
3. Aasted B., Wallen P., Aasted B. // Thrombos. Res. — 1979. — Vol. 16. — P. 463.
4. Astrup T., Mullertz S. // Arch. Biochem. — 1952. — Vol. 40. — P. 346—350.
5. Danø K., Andreassen P. A., Grondahl-Hansen J. // Advanc. Cancer Res. — 1985. — Vol. 44. — P. 139—266.
6. Danø K., Reich E. // Biochim. biophys. Acta. — 1979. — Vol. 566. — P. 138—151.
7. Deutsch D. G., Meritz E. T. // Science. — 1970. — Vol. 170. — P. 1095—1096.
8. Golder J. P., Stephens P. W. // Europ. J. Biochem. — 1983. — Vol. 136. — P. 517—522.
9. Harpel P. C., Brower M. S. // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 1983. — Vol. 421. — P. 1—9.
10. Holmes W. E., Pennica D. et al. // Biotechnology. — 1985. — Vol. 3. — P. 923—929.
11. Levin E. G., Loskutoff D. G. // Cell. — 1980. — Vol. 22. — P. 701—707.
12. Lucas M. A., Fretto A. J., Mc Kee P. A. // J. biol. Chem. — 1983. — Vol. 258. — P. 4249—4256.
13. Schneider P. L., Bachman F., Sauser D. // Urokinase: Basic and Clinical Aspects. — London, 1982. — P. 1—12.

14. Scott R. W., Eaton D. L., Durant W., Baker J. B. // J. biol. Chem. — 1983. — Vol. 258. — P. 4397—4403.
15. Soberano M. E., Ong E. B., Johnson A. L. et al. // Biochim. biophys. Acta. — 1976. — Vol. 445. — P. 763—767.
16. Walker J. E., Ogston D. // Thrombos. Haemost. — 1982. — Vol. 47. — P. 265—268.

Поступила 11.08.87

#### IMMUNOSORPTION PROCEDURE FOR ESTIMATION OF UROKINASE

V. A. Isachenkov, O. P. Vakulina, V. A. Tomilin

Institute of Biomedical Technology, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

An immunosorption procedure is developed for quantitative estimation of plasminogen activator of the urokinase type in human blood serum. The procedure involved sorption of urokinase from blood serum using polyclonal antibodies to the enzyme as a sorbent at the first step of the assay. Concentration of the immunoreactive urokinase in a preparation correlated with the absorbed fraction of standard urokinase added into the sample at the second step after washing of the sorbent. The residual fibrinolytic activity of the standard dose was detected in fibrin-agar gel. Results of the assay were not altered in presence of high molecular (bovine blood serum, soy bean inhibitor of trypsin) and low molecular inhibitors of urokinase (benzamidine, arginine,  $\epsilon$ -aminocaproic acid). Sensitivity of the assay constituted 0.05 IU/sample (2.5 IU/ml, 0.25 ng/sample) and might be increased by a decimal order after addition of plasminogen into fibrin-agar gel. Content of urokinase in blood serum of healthy men (21-48 years old) was equal to  $166 \pm 8.9$  IU/ml with individual variations from 107 to 260 IU/ml.

#### УКАЗАТЕЛЬ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ В ЖУРНАЛЕ ЗА 1988 ГОД

- Александровский Я. А. Роль ингибиторов активации системы комплемента в патогенезе и терапии инсулинзависимого сахарного диабета (Обзор). 3, 7—15.
- Аникеева С. П. Органоспецифические черты метаболизма кетоновых тел в тканях (Обзор). 6, 11—16.
- Бугланов А. А. Метаболизм железа и металлопротенды (Обзор). 3, 2—7.
- Бурчинский С. Г., Кузнецова С. М. Моноаминоксидаза мозга и ее ингибиторы в геронтологии (Обзор). 4, 2—9.
- Гомазков О. А. Роль ферментных систем в регуляции «триггерной» функции физиологически активных пептидов (Обзор). 1, 12—19.
- Овчинникова Л. Н. Природные модуляторы функций аминоксидаз (Обзор). 6, 16—23.
- Оглоблина О. Г. Биохимические механизмы участия нейтрофилов в реакциях острого воспаления (Обзор). 5, 2—9.

- Плещитый К. Д. Активные метаболиты витамина D как регуляторы процессов клеточной пролиферации и дифференцировки. Сообщение 1. Лимфоциты. 5, 9—14.
- Соколовский В. В. Тиоловые антиоксиданты в молекулярных механизмах неспецифической реакции организма на экстремальное воздействие (Обзор). 6, 2—11.
- Соркина Д. А. Структурные аспекты транспортной функции сывороточного альбумина (Обзор). 2, 8—16.
- Струмило С. А. Регуляция активности оксиглутаратдегидрогеназного комплекса животного происхождения (Обзор). 2, 2—7.
- Сьякте Н. И., Сьякте Т. Г. Роль разрывов ДНК в патологических процессах (Обзор). 4, 9—17.
- Торховская Т. И., Халилов Э. М. Липидпереносящие белки плазмы крови (Обзор). 1, 2—12.
- Абакумов Г. З., Бушма М. И., Лукиенко П. И., Легонькова Л. Ф., Шуринов А. С. Влияние никотинамида на процессы пере-

- кисного окисления липидов. 1, 39—41.
- Абакумов Г. З., Новицкий Г. К., Легонькова Л. Ф. К вопросу о роли перекисного окисления липидов в патогенезе вирусного гепатита. 6, 30—32.
- Аввакумов Г. В., Матвеевцева И. В., Вашкевич И. И., Врубель С. В. Исследование связанной с беременностью разновидности транскортина человека. 2, 49—53.
- Агаев Т. М., Курбанова Г. А. Влияние ранней зрительной депривации на синтез глутаминовой и аспарагиновой кислот в митохондриях центральных структур зрительного анализатора мозга собак. 3, 59—61.
- Адылова А. Т., Атаханова Б. А. Стимуляция триодотиронипом синтеза ДНК, тотальных белков, белков ядра и ядерного матрикса в культивируемых клетках гепатомы Морриса 7777. 6, 113—117.
- Акопов С. Э., Мхитарян Г. С., Никогосян Г. А., Габриелян Э. С. О механизмах изменений чувствительности тромбоцитов к простациклину у больных цереброваскулярными заболеваниями. 6.
- Ананенко А. А., Малиновская В. В., Клембовский А. И., Политова Л. Н., Перцева Н. Г., Зверева В. И., Федюшкина Н. А. Процессы перекисного окисления липидов при экспериментальной вирусной инфекции и влияние на них интерферонов и  $\alpha$ -токоферола. 6, 86—89.
- Андреев Г. В., Подорольская Л. В., Федоров А. М. О значении фибринолитической системы при пневмониях, осложненных экссудативными плевритами у детей. 2, 110—113.
- Ануховская Л. И., Антоненко Л. В., Холодова Ю. Д., Возиян П. А., Солодова Е. В. Структурные особенности и липидсвязывающая способность фибриногена и  $\gamma$ -глобулинов плазмы крови при витамин-Д-дефицитном рахите. 6, 49—52.
- Архипова Л. В., Куликов А. В., Озолин О. Н. РНК-синтезирующая способность хроматина мозговой ткани крыс с экспериментальным аллоксановым диабетом. 5, 76—79.
- Бабарыкин Д. А., Васина С. Б., Гинтере Г. Б., Бигестан В. Я. Иммунокорригирующие свойства и влияние на фосфорно-кальциевый обмен оксидевита ( $1\alpha$ -гидроксивитамина  $D_3$ ). 4, 104—109.
- Бабарыкин Д. А., Смитниекс Э. Х., Валинище М. Ю., Бауман В. К. 24, 25-Дигидроксивитамина  $D_3$  модулирует действие  $1\alpha$ -гидроксивитамина  $D_3$  на созревание В-лимфоцитов у цыплят. 6, 82—86.
- Банкова В. В., Никанорова Т. М., Поляков С. Д., Тагиева Т. А. Деградация малонового диальдегида в эритроцитах и ее возрастание, сезонные и суточные изменения. 6.
- Баскаева Е. М., Дятловицкая Э. В., Видершайн Г. Я. Выделение и идентификация продуктов накопления при болезни Фабри. 6, 94—98.
- Бахова Л. К., Фадеева Т. К. Активность микросомального окисления и биохимические особенности симпатико-адреналовых влияний при ишемии миокарда у крыс. 1, 22—25.
- Бауман В. К., Валинище М. Ю., Бабарыкин Д. А. Действие стронция на антирахитическую активность витамина  $D_3$  и его гидроксильированных аналогов. 4, 26—32.
- Бездетная Л. Н., Нагиев А. И., Потапенко А. Я. Влияние фотоокисленного псоралена на проницаемость мембран эритроцитов и липосом. 2, 56—59.
- Безрукавникова Л. М., Архипова О. Г., Нейфах Е. А., Бурлакова Е. Б. Нарушение контроля липоперекисного окисления у больных пылевыми заболеваниями легких. 3, 18—21.
- Белкин В. М., Дольникова А. Э., Володарская С. М., Мазуров В. И. Использование иммобилизованных антител к фибронектину для выделения макромолекулярных комплексов фибронектина с другими секретируемыми белками фибробластов человека. 4, 101—104.
- Беляев Н. А., Генгин М. Т., Година С. В., Калихевич В. Н., Панченко Л. Ф. Активность энкефалинконвертазы в отделах мозга крыс при алкогольной интоксикации. 4, 118—122.
- Берштейн Л. М., Ковалева И. Г., Правосудов И. В. Усиление гетероответа аденилатциклазы в опухолях толстой кишки: связь с липидным составом ткани. 3, 71—74.
- Бехтерева Э. П. Влияние препарата негормональной природы — бисанионного соединения ароматического ряда — ИЭМ 967 — на гипофизарно-овариальную систему крыс. 4, 78—81.
- Божко Г. Х., Хоменко Е. И. Сравнение взаимодействия этанола и ацетальдегида с компонентами хроматина ядер клеток печени крыс. 2, 19—23.
- Божко Г. Х., Волошин П. В., Чурсина В. С. Изменение содержания и связывания холестерина в тканях морских свинок при этаноловой интоксикации и холестеринемии. 5, 39—43.
- 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. 5, 87—91.
- Бондаренко Т. И., Кондрашова И. Н. Влияние антенатальной гипоксии на содержание гомокарнозина в мозге и крови крыс разного возраста. 4, 24—26.
- Вавилова Т. П., Ларионова Н. И., Петрович Ю. А. Ингибиторы трипсиноподобных протеиназ смешанной слюны человека. 3, 74—78.
- Вакулина О. П., Попкова Е. В., Исаченков В. А. Взаимодействие активатора плазминогена урокиназного типа с сывороткой крови человека. 4, 32—36.
- Васильев А. В., Коновалова Л. С., Плещитый К. Д., Пономарева Л. Г., Тутельян В. А. Активность лизосомальных гидролаз в печени, селезенке и тимусе крыс при антигенной стимуляции и дефиците витамина  $B_6$ . 2, 97—99.
- Васильева А. В., Коновалова Л. С., Плещитый К. Д., Пономарева Л. Г., Тутельян В. А. Активность лизосомальных гидролаз и обновление белка в печени, селезенке и тимусе крыс при антигенной стимуляции и дефиците белка. 6.
- Васильев В. Н., Чугунов В. С., Дербенцева Л. М., Еремеев М. С. Проба с L-ДОФА у больных при неврозе навязчивых страхов. 1, 115—120.
- Видершайн Г. Я., Цише М., Зайдлиц Г. Идентификация болезни Краббе у двух

- братьев из ГДР с помощью нового флуорогенного субстрата для галактоцереброзидазы. 1, 87—89.
- Возиян П. А., Холодова Ю. Д., Смирнова И. П., Чоботко Г. М. Поверхностные свойства и размеры липопротеинов очень низкой и низкой плотности плазмы крови человека в норме и при гиперхолестеринемии. 1, 101—105.
- Волкова З. И., Астахова Т. А., Трофимова Т. М., Мульдидров П. Я. Гликозаминогликаны и  $\beta$ -глюкуронидаза клеток периферической крови и биологических жидкостей при ревматоидном артрите. 3, 53—59.
- 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. 5, 91—93.
- Гашимова А. Д., Соколов А. И., Никольская Г. В., Гаппаров М. М. Изменение липидного обмена и обновления сигналов кислот в составе гликопротеинов жировой ткани при углеводной нагрузке. 6.
- Герасимов А. М., Захаров А. С. Свободно-радикальный механизм окисления гомогенизированной кислоты при алкантонурин. 1, 112—115.
- Герасимов А. М., Захаров А. С. Восстановление нитросинего тетразолия тиолами в присутствии витамина К. 2, 102—105.
- Герасимов А. А., Баканов М. И., Балаболкин И. И., Бершова Т. В. Корреляционные взаимоотношения лизосомных ферментов и циклических нуклеотидов при аллергических заболеваниях у детей. 5, 104—107.
- Голиков П. П., Николаева Н. Ю., Спиридонов И. В., Скляревский В. В. Глюкокортикоидные рецепторы печени и лимфоцитов крови при остром холецистите. 6, 36—39.
- Голубев М. А., Никулин И. Р., Стволинская Н. С. Влияние экзогенного рибозо-5-фосфата на уровень АТФ в культуре кардиомиоцитов в условиях «метаболической ишемии» и аноксии. 4, 94—97.
- Гончаренко М. С., Кондакова А. К., Бродская О. М. Состояние кальциевого гомеостаза крови у больных псориазом в период усиленного эпидермопоза. 3, 42—45.
- Горшкова И. Н., Ноева Е. А., Полесский В. А., Перова Н. В., Рууге Э. К. Исследование термoinдуцированных изменений в липопротеидах высокой плотности человека при гипоальфа-липопротеинемии и ишемической болезни сердца методом спинных зондов. 3, 85—90.
- Грек О. Р., Шарпов В. И., Зыков А. А. Изменения липидного компонента микросомальных мембран печени в постишемическом периоде при введении  $\alpha$ -токоферола и лидокаина. 4, 57—63.
- Губский Ю. И., Задорина О. В., Парамонова Г. И., Сударикова Л. Г., Прадий Т. П. Оксигеназные реакции в микросомах печени крыс в условиях антиоксидантной недостаточности. 4, 81—85.
- Гудкин Л. Р., Кузнецова Н. П., Самсонов Г. В., Мишаева Р. Н., Страгович Л. М., Иванов К. П., Чуйкин А. Е., Селиванов Е. А., Быстрова И. М., Гербут К. А., Молоковская И. Е. Влияние химической модификации гемоглобина на его биологическую активность. 4, 90—93.
- Гуринович И. Ф., Грубина Л. А., Некрашевич С. Ф., Ремизова Р. М., Шишпоренок С. И. Количественный и качественный состав порфиринов в эритроцитах онкологических больных. 5, 34—37.
- Гусина Н. Б., Цукерман Г. Л. Активности лизосомных гидролаз плазмы и лейкоцитов у гомо- и гетерозигот с различными вариантами I-клеточной болезни. 3, 21—25.
- Давлетов Э. Г., Карелин А. А., Камиллов Ф. Х. Изменения в системе циклических нуклеотидов при экспериментальной ожоговой болезни у неполовозрелых крыс. 3, 120—124.
- Дагис А. И., Толейкис А. И., Прашкявичюс А. К. Изучение целостности мембранных структур клеток сердца при ишемии. 5, 80—83.
- Дворянинович Л. И. Влияние острого дефицита витамина В<sub>1</sub>, вызванного окситиаминном, на биосинтез белка в селезенке крыс при иммуногенезе. 4, 71—74.
- Дзоогуашвили В. У. Влияние контрикала на активность лизосомальных протеиназ в слизистой оболочке желудка крыс при экспериментальной язве. 2, 46—49.
- Добротина Н. А., Копытова Т. В., Березина М. А. Некоторые механизмы иммунного гомеостаза при инфаркте миокарда. 6, 52—57.
- Долгих В. Т. Предупреждение постреанимационных нарушений энергетического обмена миокарда  $\gamma$ -оксипутиратом натрия, ионолом и гутиминном. 1, 33—38.
- Дорошкевич И. А., Мандрик К. А., Виноградов В. В. Пальмитонил-КоА-дегидрогеназа надпочечников, печени и сердца кролика. 3, 39—42.
- Доценко В. Л., Ненашева Н. М., Нешкова Е. А., Морозова Н. А., Яровая Г. А. Механизм активирования калликреин-кининовой системы плазмы крови у больных атопическими аллергическими заболеваниями. 6, 89—94.
- Елизарова Г. П., Кеда Ю. М., Киселева А. Г., Осипова Т. А., Булатов А. А., Панков Ю. А. Сравнительное исследование физико-химических и биологических свойств соматотропина человека, полученного генно-инженерным методом и выделенного из гипофизов. 2, 90—96.
- Жизневская Н. Г., Макаренко В. С. Обмен белков в почках при острой почечной недостаточности. 5, 37—39.
- Зайденберг М. А., Андреев В. И. Различия между коллагенами интерстициальных типов в их влиянии на биосинтез ДНК, РНК и активность некоторых ферментов в биоптатах тканей ран крыс. 3, 97—100.
- Зорин Н. А. Парадоксальные реакции сульфатированных гликозаминогликанов с белками сыворотки крови человека. 3, 78—81.
- Зорин Н. А. Комплексный анализ углеводных компонентов ассоциированного с беременностью  $\alpha_2$ -гликопротеина. 5, 53—55.
- Исаев М. Н., Рабинович П. Д. Выделение различных гликозаминогликанов у больных хронической дуоденальной язвой. 1, 62—65.
- Каленикова Е. И., Дмитриева О. Ф., Коробов Н. В., Жуковский С. В., Тищенко В. А., Виноградов В. А. Фармакокинетику далагина. 1, 75—83.
- Каминская Г. О., Степанян И. Э., Жукова Н. Л. Состояние системы протеиназы — ингибиторы в бронхоальвеолярном содер-

- жимом у больных с диффузными поражениями легких. 6, 100—104.
- Карасева Т. Л., Чапенко Ж. Н., Головенко Н. Я., Тимофеева С. Э., Лукьяненко Н. Г. Обмен гамма-аминомасляной кислоты в головном мозге крыс в условиях введения им ноотропных средств. 3, 81—84.
- Каратабанова Н. А., Арханчев Ю. П., Сергеев И. Н., Линберг Л. Ф., Спиричев В. Г. Обмен витамина D при экзогенном гиперкортицизме у крыс. 1, 83—86.
- Карелин А. А., Алексеев А. А., Глоба А. Г., Демидова В. С., Цветков В. О. Энзиматическая продукция супероксида полиморфно-ядерными лейкоцитами человека при ожоговой болезни. 5, 107—109.
- Каримова М. Х., Алеуов Ш. А. Изменения содержания серотонина в крови при паркинсонизме. 1, 45—47.
- Карсакевич А. С., Кинстлер О. Б., Дауварте А. Ж., Вина И. А. Высокомолекулярные производные L-аспарагиназы на основе водорастворимой карбоксиметилцеллюлозы: биологические свойства. 3, 107—110.
- Кашаускас А. П., Тамулявичюс А. А., Я., Лукошявичюс Л. Ю., Иванов Л. Л., Прашкявичюс А. К. Биологическая активность тРНК и аминоксил-тРНК-синтетаз миокарда свиньи при аноксии и последующей реоксигенации. 2, 84—86.
- Кашуба В. А., Трусова Н. Ф., Лаврова Э. Н. Состояние энергетического обмена в структурах зрительного анализатора и нейронах симпатического ганглия после облучения глаза низкоинтенсивным инфракрасным лазерным излучением ближней области спектра. 2, 29—34.
- Кендыш И. Н., Братцев В. А., Гольяпин Ю. В., Климова Т. В., Смирнова Т. Н. <sup>125</sup>I-п-йодфениламины как прототип средства исследования митохондриального окисления. 5, 66—72.
- Ким Н. П., Овчинников И. В., Гулямов Д. С., Андрус Ю. П. Особенности окисления глюкозы и лактата в миокарде при разных стадиях митрального стеноза. 2, 99—102.
- Кирилличева Г. Б., Синилова Н. Г., Туманян М. А. Изучение влияния иммуностимуляторов различной природы на активность 5-нуклеотидазы макрофагов перитонеального экссудата мышей. 1, 56—59.
- Клебанов Г. И., Бабенкова И. В., Теселкин Ю. О., Комаров О. С., Владимиров Ю. А. Роль активации полиморфно-ядерных лейкоцитов крови в развитии экспериментального увеита. 6, 128—132.
- Ковалева Г. Г., Карманский И. М. Получение и некоторые свойства иммобилизованной холестеролэстеразы. 2, 78—81.
- Колесова Г. М., Сокольников А. А., Коденцова В. М., Климова О. А., Сергеев И. Н., Спиричев В. Б. Влияние недостаточности витамина К у крыс на некоторые ферментные системы, участвующие в энергообеспечении. 4, 46—51.
- Ковалишин Я. Ф., Николаев В. Г., Баран Е. Я., Дударь И. А., Юшко Л. А. Исследование среднемолекулярной фракции плазмы крови больных с уремией с помощью жидкостной хроматографии высокого давления и тонкослойной хроматографии. 6.
- Комов В. П., Спасенкова О. М., Стрелкова М. А. Изучение протеиназ в бронхолегочном аппарате крыс с бронхиальной анафилаксией. 5, 72—76.
- Конвай В. Д., Лукошкин А. В., Поспелов В. С. Нарушение обмена глутатиона в печени реанимированных крыс и его коррекция. 1, 65—68.
- Котловский Ю. В., Гришанова А. Ю., Мишин В. М., Бачминова Г. И. Роль микросом печени крыс в метаболизме метилметакрилата до формальдегида. 5, 14—17.
- Кравченко Л. В., Кузьмина Е. Э., Соболев В. С. Сравнительная характеристика микросомальной эпоксидгидролазы печени и слизистой оболочки тонкой кишки крыс. 6.
- Краковский М. Э., Аширметов А. Х., Комарин А. С., Файнгольд Д. Я. Состояние микросомальной окислительной системы печени крыс при острой кишечной непроходимости. 3, 117—120.
- Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А., Шишкин М. А., Азиева Л. Д. Характеристика белкового фактора селезенки, ингибирующего гепарин. 3, 90—93.
- Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А., Пасторова В. Е. Значение комплекса антитромбин-III-гепарин-тромбин в защитной реакции противосвертывающей системы. 2, 38—42.
- Кузнецов В. А., Мордвинцев П. И., Данк Е. Х., Юркин В. А., Ванин А. Ф. Низкомолекулярные и белковые динитрозильные комплексы негемового железа как ингибиторы агрегации тромбоцитов. 5, 43—46.
- Курский М. Д., Шинлова О. П., Фомин В. П., Костерин С. А. Влияние стимуляторов сокращения матки на активный и пассивный транспорт Ca<sup>2+</sup> во фракции сарколеммы миоциты. 2, 113—117.
- Кухта В. К., Морозкина Т. С., Лисицына Л. П., Захаренко И. В., Мальковец И. Г., Карпова И. Н. Ферментативная система инициации и защиты от перекисного окисления липидов в печени и крови крыс при гипокинезии. 1, 19—22.
- Кушнер В. П. Аминокислотная специфичность собственной фосфопротеинкиназной активности некоторых фракций негистоновых белков хроматина почек, гепатомы и печени крыс при однократном действии диэтилнитрозамина. 3, 25—27.
- Лидер В. А. Влияние витамина К на активность ферментов гликолиза и пентозофосфатного цикла. 3, 64—67.
- Линберг Л. Ф., Миримский А. С., Попов С. А., Милова О. Г., Каюденко Л. Г., Венгеров Ю. Я. Применение газохроматографического профиля липидов сыворотки крови для компьютерной диагностики. 4, 86—90.
- Лисняк И. А. Выделение и характеристика ингибитора неоваскуляризации из стекловидного тела. 2, 16—18.
- Литвинов Н. И., Астахова Л. Ф., Мухамбетова Л. Х. Влияние различных концентраций нитрозодиметиламина на функциональное состояние ферментных систем митохондрий печени крыс в зависимости от длительности воздействия. 2, 105—109.
- Лиходий С. Ст., Лиходий С. С., Сибельдина Л. А., Семенова Н. А. Влияние верапамила на динамику снижения уровней макроэргических фосфатов мозга при ишемии по данным <sup>31</sup>P-ЯМР спектроскопии in vivo. 6.
- Логинов А. С., Высоцкая Р. А. Инкреторная функция поджелудочной железы при алкогольных поражениях печени. 1, 105—109.
- Лычко А. П., Пентюк А. А., Луцюк Н. Б. Метаболизм и токсичность некоторых ксе-



- нобиотиков при недостаточности витамина B<sub>1</sub> и введении тиамин и тиаминдифосфата. 3, 45—48.
- Магеровский Ю. В., Монастырский В. А., Гайда А. В., Бирка И. И., Вороняк М. И. Частичная очистка с тканевого тромбопластина методом гель-проникающей хроматографии и воспроизведение с его помощью синдрома генерализованного декомпенсированного тромбоцитопения. 3, 34—39.
- Мажуль Л. М., Якубовский С. М., Самбурский С. С., Егудкин Г. Г., Гацко Г. Г. Возрастные особенности регуляции инсулином физико-химических свойств мембран печени. 2, 23—26.
- Мансурова И. Д., Султанова У. К. Газохроматографическое определение высших жирных кислот в ткани печени крыс при хронической алкогольной интоксикации. 1, 42—45.
- Марков Х. М., Кучеренко А. Г. Влияние диет с различным содержанием линолевой кислоты на простагландиную систему почек крыс. 2, 87—90.
- Марков Х. М., Атрохов В. В., Задкова Г. Ф., Пинелис В. Г., Полещук В. С. Влияние пищевой линолевой кислоты на агрегацию тромбоцитов, жирнокислотный состав их фосфолипидов и синтез тромбоцитарных простагландинов у крыс. 4, 37—41.
- Меерсон Ф. З., Явич М. П., Рожницкая И. И. Влияние эмоционально-болевого стресса на скорость синтеза ДНК в клетках сердца и печени. 5, 59—62.
- Меерсон Ф. З., Твердохлеб В. П., Никоноров А. А. Предупреждение атерогенных дислипидопротеидов и комплекса метаболических нарушений в печени при эмоционально-болевого стрессе. 6, 104—108.
- Микаелян Э. М., Карагезян К. Г., Овакимян С. С. Динамика количественных изменений суммарных и индивидуальных фосфолипидов мембран эритроцитов белых крыс в различные стадии стрессорной реакции организма. 2, 64—68.
- Микаелян Н. П., Ильина З. И. Оценка функционального состояния печени по ферментному спектру крови после гемосорбции в связи с ожоговой интоксикацией. 2, 75—78.
- Микаелян Н. П. Изучение взаимодействия инсулина с его рецепторами в плазматических мембранах лимфоцитов при ожоговой травме у крыс. 5, 96—98.
- Минченко А. Г. Особенности действия гидрокортизона на биосинтез митохондриальных белков в печени тиреоидэктомизированных крыс. 5, 17—22.
- Миренбург Т. В., Аронович Е. Л., Лебедева Т. В., Ахунов В. С., Краснополяская К. Д., Барцева О. Б., Смирнова О. А., Бахарев В. А., Фукс М. А. Пренатальная диагностика наследственных лизосомных болезней. 4, 41—46.
- Мирошниченко В. П., Ряпосова И. К., Чарачьян И. А., Крюкова Г. В., Северина И. С. Сопоставление активности гуанилатциклазы сердца и тромбоцитов в норме и при экспериментальном аллергическом миокардите. 2, 34—38.
- Мисионский Э. Ю., Вартапетян М. А., Турова Н. Ф. К аминоксидазной активности сыворотки крови у детей с интеллектуальной недостаточностью. 2, 61—64.
- Моренкова С. А., Табуцадзе Т. У., Федорова Л. М. Влияние различных вариантов ваготомии на синтез простагландинов (E, F<sub>2α</sub>), тромбоксана и простациклина в слизистой оболочке гастродуоденальной зоны при экспериментальных язвах у крыс. 1, 109—112.
- 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. 5, 25—30.
- Немцова Е. Р., Уткин М. М., Якубовская Р. И. Иммунохимическое сравнение лактоферрина женского молока и лактоферрина нейтрофилов. 3, 127—131.
- Никитина З. К., Ребров Л. Б. Структурные и функциональные изменения миозина скелетных мышц крыс в процессе посмертного аутолиза. 6, 76—81.
- Никифорова Т. Н., Апуховская Л. И., Ивашевич С. П. Изучение белков мембран эритроцитов при экспериментальном D-гиповитаминозе. 3, 30—34.
- Однопозов А. К., Лифшиц Р. И., Горкин В. З. Активность сывороточных аминоксидаз и γ-глутамилтрансептидазы при ожоговой болезни. 2, 68—72.
- Олефиренко Г. А., Петрунин Д. Д., Татаринов Ю. С., Щербакова Л. А., Мурашов В. А. Пренаративное выделение α<sub>2</sub>-микроглобулина на фертильности человека методом ионообменной хроматографии. 3, 124—126.
- Осипович В. К., Тушикова З. А., Матвеевко А. В., Крайник И. В. Синдром липидной гиперпероксидации у обожженных и его коррекция методом АУФОК. 5, 62—66.
- Пак Д. Ф., Маслова Г. Б., Куликов А. В., Боримотов В. В. Модифицированный метод определения серотониновых рецепторов первого и второго типов в мозге. 4, 17—21.
- Панасюк Е. Н., Кузьмак Н. И. Влияние in vivo L-тироксина на содержание углеводсодержащих компонентов гликопротеидов в субклеточных фракциях печени у крыс. 6, 64—71.
- Панин Л. Е., Поляков Л. М., Розуменко А. А., Биушкина Н. Г. Транспорт стероидных гормонов липопротеидами сыворотки крови. 5, 56—58.
- Парфенова Н. С., Петрова-Маслакова Л. Г., Кузнецов А. С., Иоффе Д. В., Алкснис Е. Г., Носкин В. А., Иванова М. А., Криворученко И. В. Нарушение холестерин-акцепторной функции липопротеидов высокой плотности у пациентов с ишемической болезнью сердца. 2, 42—46.
- Пасхина Т. С., Платонова Л. В., Полянцева Л. Р. Ингибитор трипсина мочи у больных гломерулонефритом. 1, 89—94.
- Петушкова Н. А. К вопросу о формах нейраминидазы хориона человека. 4, 67—71.
- Пряткин С. А., Назаров И. Б., Морозов В. И., Рогозкин В. А. Радиодиагностика человеческого лимфоцита человека и влияние физической нагрузки на его содержание в крови. 4, 74—78.
- Прозоровская Н. Н., Сучкова Т. Н., Сучков С. В., Дельвиг А. А. О возможном участии механизмов естественной цитотоксичности в нарушениях катаболизма коллагена при очаговой склеродермии. 1, 95—100.
- Прозоровская Н. Н., Геращенко Л. П., Глинская С. В., Дельвиг А. А., Рудаков С. С., Солониченко В. Г. Исследование связи между инфекциями в период беременности и уровнем экскреции оксипролина у детей



- с врсжденными деформациями грудной клетки. 4, 63—67.
- Прозоровская Н. Н., Глиняная С. В., Герасценко Л. П., Рудаков С. С., Соловиченко В. Г., Дельвиг А. А. Влияние терапии  $\beta$ -адреноблокатором и комплексом витаминов на показатели экскреции оксипролина при некоторых наследственных болезнях соединительной ткани. 5, 99—104.
- Рабинович П. Д., Кашкина Е. И. Фукоза и другие нейтральные гексозы в кале у больных неспецифическим язвенным колитом. 2, 81—84.
- Рахимов М. М., Алматов К. Т., Мурталипов Д. Т., Касимова Г. М., Ходжаева Н. И., Абдушукуров А. А., Горбатая О. Н. Образование фосфатидилэтанола при алкогольной интоксикации. 3, 101—107.
- Резник Л. В., Мязина Е. М., Наточкин Ю. В. Содержание белка и активность Na, K-АТФазы в ткани почки крыс при действии цис-платины. 2, 26—29.
- Ржанинова А. А., Требухина Е. Л., Прозоровский В. Н. Получение и характеристика высокоочищенной креатинфосфокиназы из мозга свиньи. 5, 84—87.
- Розанов В. А., Карпович Г. А., Сергеева О. Н., Конелевич В. М., Гунар В. И. Влияние многократных инъекций ГАМК на ГАМК-шунт и некоторые связанные с ним реакции в головном мозге крыс. 1, 29—33.
- Рыженков В. Е., Огурцов Р. П., Трубачева В. В., Попов В. Г., Пузырева В. П., Ремезова О. В., Хавинсон В. Х., Морозов В. Г. Влияние тималина на развитие экспериментальной гиперлипидемии и атеросклероза. 1, 51—56.
- Рыженков В. Е., Чистякова А. М., Войциски Е., Самоховец Л., Дадей Р., Яворска М., Гавронска-Шкляж Б., Ковнацка А. Гиполипидемическое действие нового производного дипрофилина — [2-гидрокси-3-(теофиллин-7-ил)] пропфлового эфира 4-бензилоксибензойной кислоты. 4, 109—112.
- Рябинин В. Е., Лифшиц Р. И., Казарян Г. Х. Интенсивность образования белков, нуклеиновых кислот и пептидов при экспериментальной ожоговой токсемии. 3, 131—135.
- Рябинин В. Е., Налимов А. Г., Лифшиц Р. И. Влияние термической травмы и среднемолекулярных пептидов на хемилюминесценцию плазмы крови. 6, 60—64.
- Селевич М. И. Метаболические эффекты этанола и обмен липидов в печени крыс. 5, 49—52.
- Селиванов Е. А., Вязьменская М. М., Быстрова И. М. О составе и некоторых свойствах препарата ацетилхолинэстеразы эритроцитов человека. 5, 46—49.
- Сергеев И. Н., Арханчев Ю. П., Кравченко Л. В., Коденцова В. М., Пиля Н. М., Тутельян В. А., Спиричев В. Б. Влияние микстоксинов — афлатоксина  $B_1$  и T-2-токсина — на обмен витамина  $D_3$  и рецепцию его гормональной формы — 1,25-дихидроксивитамина  $D_3$  — у крыс. 4, 51—57.
- Симхович Б. З., Мейрена Д. В., Шутенко Ж. В., Хаги Х. Б., Бриде Я. Л., Калвинский И. Я., Лукевиц Э. Я. Влияние DL-карнитина и ингибитора  $\gamma$ -бутиробетаин гидроксилазы 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионата (ТГП) на вызываемые изопро-  
теренолом изменения в метаболизме миокарда крыс. 5, 30—34.
- Сокольников А. А., Коденцова В. М., Гулидова Г. П., Миронова Г. Д. Активность Na, K-АТФазы в телях эритроцитов млекопитающих в присутствии аламетидина и п-нитрофенилфосфата. 2, 53—56.
- Сторожук П. Г., Скляр В. А., Быков И. М. Изменение активности глицеральдегидфосфатдегидрогеназы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, супероксиддисмутазы и каталазы в эритроцитах в зависимости от скорости утилизации глюкозы. 5, 93—96.
- Сушкова В. В., Касьянова Н. Н., Васильева С. М., Гулый М. В. О влиянии этанола на начальный этап биосинтеза белка в печени крыс. 4, 21—24.
- Табазари С. И., Шубигидзе Т. М., Абдушелишвили Г. В. Влияние силмарина на активность лизосомальных протеиназ печени и почек при введении тетраметилтиурамдисульфида. 5, 110—113.
- Творогова М. Г., Озерова И. Н., Нечаев А. С., Жолус Н. Н., Перова Н. В. Активность основных ферментативных реакций обмена липопротеидов в плазме крови у больных ишемической болезнью сердца. 3, 51—53.
- Телушкин П. К., Филиппов С. П. Активность ферментов и содержание субстратов цикла Кребса в ткани головного мозга крыс при инсулиновой гипогликемии и в восстановительном периоде. 3, 94—96.
- Тихонова Н. Е., Кучук Э. М. Влияние условий высокогорья на связывание инсулина эритроцитами при экспериментальном аллоксановом диабете. 3, 67—71.
- Турова Н. Ф., Мисионжик Э. Ю., Ермолина Л. А., Азявчик А. В., Красов В. А. Экскреция моноаминов, их предшественников и метаболитов при гиперактивном синдроме у детей с интеллектуальной недостаточностью. 1, 47—50.
- Утеулин К. Р., Джаkelова Ш. А., Иващенко А. Т., Кусаинова Н. И. Гидрофобные свойства некоторых фосфогидролаз. 3, 110—113.
- Ушакова Н. А., Лавренова Т. П., Казлас Е. В., Томилиная Н. А., Зубкин М. Л., Федорова Н. Д., Лукомская И. С. Растворимая и мембранно-связанная формы нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы мочи человека в норме и при заболеваниях почек. 1, 120—125.
- Ушакова Н. А., Казлас Е. В., Бельный Д. М., Лукомская И. С. Использование антител для дифференциального определения нейтральной и кислой  $\alpha$ -глюкозидаз мочи человека в норме и при патологии. 1, 68—71.
- Фараджев А. Н. Влияние голодания на активность ГАМК-трансаминазы и глутаматдекарбоксилазы в митохондриях структур лимбической системы мозга собак в постнатальном онтогенезе. 6, 32—36.
- Филановская Л. И., Блинов М. Н., Того А. В., Клубовская Н. И., Бурмистрова Е. В. О деградации пуринов в лейкоцитах при острых нелимфобластных лейкозах. 6.
- Фрейдин М. И., Соловьева Н. В., Кухаренко В. И., Дельвиг А. А. Секреция  $^{14}C$ -проколлагена эмбриональными фибробластами человека с диплоидным и трисомным набором хромосом. 2, 72—75.
- Фролькис В. В., Кульчицкий О. К., Ясечко А. В. Концентрация циклических нуклеоти-

- дов, активность аденилатциклазы и мембранный потенциал волокон икроножной мышцы взрослых и старых крыс при депривации. 3, 48—51.
- Хадуев С. Х., Лукашева Е. В., Смирнова И. П., Янкевич Н. Б., Лаугалене Н. Ф., Пуоджюте С. П., Веса В. С., Березов Т. Т.** Некоторые физико-химические свойства L-лизин- $\alpha$ -оксидазы из *Trichoderma* Sp. 4, 97—100.
- Цветкова Т. А., Козлов Е. А., Рудаков С. С., Дельвиг А. А.** Экстрагируемость коллагена реберного хряща и кожи при воронкообразной деформации грудной клетки у детей. 1, 71—74.
- Цыбышева А. К., Бурков И. В., Блажевич Н. В., Переверзева О. Г., Спиричев В. Б.** Обеспеченность витамином D детей в терминальной стадии хронической почечной недостаточности и ее коррекция. 4, 112—117.
- Цырульников Л. Г., Логунов А. И.** Динамика содержания серотонина и пиридоксала в крови крыс с экспериментальным воспалением при нагрузке аминокислотами. 6.
- Честков В. В., Лаптев А. В., Щепкина Ю. В.** Иммунохимическое выявление фенилаланингидроксилазы в экстрактах некоторых органов человека. 3, 113—116.
- Чешиев А. Б.** Гипоинсулинемия и биоэнергетические процессы в коре больших полушарий мозга крыс. 3, 16—18.
- Шапиро Ф. Б., Ульянов А. М.** Влияние инсулина на начальные стадии клиренса гепарина. 6, 57—60.
- Шарапов В. И., Грек О. Р., Зыков А. А.** Структурные перестройки липидного компонента мембран эндоплазматического ретикулаума в ранние и отдаленные периоды после ишемии печени. 1, 25—29.
- Шатилина Л. В., Баллюзек М. Ф., Гуревич В. С.** Некоторые показатели перекисного окисления липидов тромбоцитов у больных ишемической болезнью сердца. 2, 59—61.
- Шатров Г. П., Гмошинский И. В., Зайцев А. Н.** Всасывание меченого  $^{14}\text{C}$  красителя «активный красный 5CX», иммобилизованного на полисахаридах, в желудочно-кишечном тракте крыс. 6.
- Шимонова Е. Е., Андреев Г. В.** Тромболитические свойства комплекса гепарин—тканевый активатор плазминогена и его влияние на фибринолитическую и свертывающую системы крови животных. 1, 59—62.
- Шимонова Е. Е., Андреев Г. В.** Определение содержания плазминогена в плазме крови крыс. 3, 28—29.
- Шишкин В. И., Кудрявцева Г. В., Макаров С. А.** Пентозофосфатный путь обмена углеводов при некоторых системных заболеваниях соединительной ткани. 6, 40—45.
- Шугалей В. С., Ананян А. А., Козьмин В. В.** Система микросомального окисления печени при гипоксии и гипероксии. 3, 62—64.
- Щербакова Л. А., Татаринцев Ю. С., Калашиников В. В., Мурашов В. А., Олефиренко Г. А., Петрунин Д. Д.** Сравнительный иммуноферментный анализ  $\alpha_2$ -микроглобулина фертильности у здоровых доноров и при онкогинекологических заболеваниях. 5, 23—25.
- Янсон Т. М., Бауман В. Р., Гром Н. П., Кленкас И. А., Калвинш И. Я.** Изучение кардиопротекторного действия карнитина и его синтетического аналога 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионата при экспериментальном инфаркте миокарда у крыс. 4, 122—125.

#### Методы биохимических исследований

- Вагенкнехт К., Барлебен Х., Хайне Х.** Значение изоферментов для диагностики инфаркта миокарда и способы их исследования. 5, 133—137.
- Гамзатова П. А., Коршунова Т. Ю., Клемашов Г. П., Овчарук И. Н., Федоров Н. А.** Иммуноферментное, турбидиметрическое и аффинно-хроматографическое изменение концентрации фибропектина в плазме крови человека (сопоставимость результатов и влияние условий и времени хранения крови). 2, 123—125.
- Гончаров Н. П., Кацяя Г. В., Бутнев В. Ю., Воронцов В. И., Хагундокова Л. Б., Веземан Р.** Применение радиосиммунного метода определения 11-дезоксикортизола для оценки функции системы гипофиз-кора надпочечников в условиях метопиропового теста. 1, 130—133.
- Гусина Н. Б., Цукерман Г. Л.** Сравнение спектрофотометрического и флуориметрического методов определения активности галактоцереброзид- $\beta$ -D-галактозидазы в лейкоцитах. 4, 129—131.
- Давлетов Э. Г., Курочкин И. Н., Зайцев С. В.** Радиорецепторный метод определения опиоидных пептидов в головном мозге крыс. 4, 132—138.
- Захаров С. Ф., Громов П. С., Шишкин С. С.** Двумерный электрофорез эритроцитарных мембран белков человека в присутствии тритона X-305. 3, 139—142.
- Игнатенко Л. Л., Матарадзе Г. Д., Бунятян А. Ф.** Определение свободных и связанных форм рецепторов эстрогенов в цитозоле печени крыс методом лигандного обмена при низкой температуре. 2, 125—128.
- Исаченков В. А., Вакулина О. П., Томилин В. А.** Иммуносорбционный метод определения урокиназы. 6, 133—136.
- Кендыш И. Н., Братцев В. А., Климова Т. В., Климова А. И.** Радиондикаторный метод определения активности панкреатической липазы в организме. 6.
- Крылова С. М., Сахарова 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 европиевой метки и полимерного комплексона. 5, 116—121.
- Куликов А. В., Воронова И. П., Жанаева Е. Ю.** Чувствительный флуориметрический метод определения активности триптофангидроксилазы в структурах мозга. 2, 120—123.
- Лебедева Т. В., Одиноква О. Н., Краспольская К. Д., Фрейдин М. И.** Использование флуориметрического титрования в методе метаболической кооперации для дифференциации мукополисахаридозов. 2, 117—119.
- Лисаковский С. В., Володина Т. В., Козельцев В. Л.** Изучение изменения белков скелетной мышцы человека в процессе аутолиза методом двухмерного электрофореза. 6, 117—122.
- Ляпов Б. Г., Воинов Д. И.** Определение мо-

- лекулярных типов триацилглицеринов в липопротеидах плазмы крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием ЭВМ. 6.
- Меняцкая Т. А., Ратнер Г. М., Лимарева Т. Д., Масенко В. П. Применение иммуноферментного анализа для контроля специфической активности антител к вазопрессину. 5, 114—116.
- Морозов В. И., Прияткин С. А., Исакова Т. И., Луцицкая И. М., Rogozkin В. А. Метод радиоиммунного анализа эстрадиола-17 $\beta$  и влияние физической нагрузки на его содержание в крови людей. 3, 136—139.
- Ростовцев А. П., Григорьянц О. О., Гомазков О. А. Субстраты для исследования энкефалинообразующей карбоксицепптидазы в моче и надпочечниках крысы. 1, 126—129.
- Ротт Г. М., Лапшина Г. М., Рожинская И. В., Летова О. А., Блинова Т. В., Поверенный А. М. Разработки и сопоставление информации значимости методов определения миоглобина: твердофазный иммуноферментный анализ и гемагглютинационный тест. 5, 124—129.
- Смирнова И. П., Березов Т. Т. Ортсиданидинный микрометод определения активности L-фенилаланин- $\alpha$ -оксидазы. 2, 129—131.
- Стукалов Ю. В., Орлов Е. Н. Определение ретинола,  $\alpha$ -токоферола,  $\beta$ -каротина и суммы каротиноидов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. 5, 121—124.
- Хрипач Л. В., Мищенко Б. П. Флуориметрическое определение активности УДФ-глюкурозилтрансферазы и сульфотрансферазы в клетках крови человека. 4, 126—129.
- Шер Б. М., Соколов Б. П. Бромциановое пептидное картирование коллагеновых полипептидов после разделения электрофорезом в полиакриламидном геле и детекции окрашиванием или радиоавтографией. 1, 133—138.
- Шишкин С. С., Ильянский Р. В., Ковалев Л. И., Борисенко В. И., Громов П. С., Чесалин Л. С. Анализ результатов двумерного электрофоретического фракционирования белков на комплексе цифровой обработки видеoinформации (СВИТ). 2, 131—135.
- Шишкин С. Н., Островский Ю. М., Пронько П. С. Оптимизация техники определения уровня эндогенного этанола в крови и тканях человека и экспериментальных животных. 5, 129—133.
- Юрonen Э. И., Вийкмаа М. Г., Микельсаар А.-В. Н. Использование моноклональных антител для количественного определения миоглобина с помощью твердофазного иммуноферментного анализа типа сэндвич. 4, 132—136.

#### Рецензии

- Алимова Е. К. Рецензия на книгу В. Н. Гурина «Обмен липидов при гипотермии, гипертермии и лихорадке». — Минск; Беларусь, 1986. 2, 138—139.
- Видершайн Г. Я., Герасимов А. М. «Отражение проблем медицинской химии в выпусках журнала «Вопросы медицинской химии» в 1987 г.». 5, 137—140.
- Касавина Б. С. Рецензия на книгу А. М. Герасимова, Л. Н. Фурцевой «Биохимическая диагностика в травматологии и ортопедии». — М., Медицина, 1986. — 234 с. 2, 135—137.
- Минченко А. Г. Рецензия на книгу Н. П. Мертвцова «Гормональная регуляция экспрессии генов». — М., Наука, 1986. — 208 с. 2, 137—138.
- Федоров Н. А. Рецензия на книгу В. К. Кухта, Э. И. Олецкого, А. Н. Стожарова «Белки плазмы крови». 1, 138—139.

#### История медицины

- Юлия Марковна Гефтер (К 100-летию со дня рождения). 5, 140—142.

#### Хроника

- Сабитов Ф. М. Из плана выпуска издательства «Медицина» на 1989 г. 4, 139—141.

### СОДЕРЖАНИЕ

- Соколовский В. В. Тиоловые антиоксиданты в молекулярных механизмах неспецифической реакции организма на экстремальное воздействие (Обзор) 2
- Аникиеева С. П. Органоспецифические черты метаболизма кетонных тел в тканях (Обзор) 11
- Овчинникова Л. И. Природные модуляторы функций аминоксидаз (Обзор) 16
- Ковалишин Я. Ф., Николаев В. Г., Баран Е. Я., Дударь И. А., Юшко Л. А. Исследование среднемoleкулярной фракции плазмы крови больных с уремией с помощью жидкостной хроматографии высокого давления и тонкослойной хроматографии 23
- Банкова В. В., Никанорова Т. М., Поляков С. Д., Тагиева Т. А. Деградация малонового диальдегида в эритроцитах и ее возрастные, сезонные и суточные изменения 27
- Абакумов Г. З., Новицкий Г. К., Легонькова Л. Ф. К вопросу о роли перекисного окисления липидов в патогенезе вирусного гепатита 30
- Фараджев А. Н. Влияние голодания на

### CONTENTS

- Sokolovsky, V. V. Thiolic antioxidants in molecular mechanisms of non-specific response of the body on extreme effect 2
- Anikeeva, S. P. Organospecific features of ketonic bodies metabolism in tissues 11
- Ovchinnikova, L. N. Natural modulators of aminooxidase functions 16
- Kovalyshin, J. F., Nikolaev, V. G., Baran, E. J., Dudar, I. A., Jushko, L. A. Analysis of middle molecular fraction in blood plasma of patients with uremia by means of high performance liquid chromatography and thin layer chromatography 23
- Bankova, V. V., Nikanorova, T. M., Polyakov, S. D., Tagieva, T. A. Degradation of malonic dialdehyde in erythrocytes and its age-, season- and circadian-dependent alterations 27
- Abakumov, G. Z., Novitsky, G. K., Legon'kova, L. F. Role of lipid peroxidation in pathogenesis of virus hepatitis 30
- Faradjev, A. N. Effect of starvation on

- активность ГАМК-трансаминазы и глутаматдекарбоксилазы в митохондриях структур лимбической системы мозга собак в постнатальном онтогенезе
- 32 Голиков П. П., Николаева Н. Ю., Спиридонов И. В., Скляревский В. В. Глюкокортикоидные рецепторы печени и лимфоцитов крови при остром холецистите
- 36 Шишкин В. И., Кудрявцева Г. В., Макаров С. А. Пентозофосфатный путь обмена углеводов при некоторых системных заболеваниях соединительной ткани
- 40 Акопов С. Э., Мхитарян Г. С., Никогосян Г. А., Габриелян Э. С. О механизмах изменений чувствительности тромбоцитов к простаглицлину у больных цереброваскулярными заболеваниями
- 46 Апуховская Л. И., Антоненко Л. В., Холодова Ю. Д., Возиян П. А., Солодова Е. В. Структурные особенности и липидсвязывающая способность фибриногена и  $\gamma$ -глобулинов плазмы крови при витамин-D-дефицитном рахите
- 49 Добротина Н. А., Копытова Т. В., Березина М. А. Некоторые механизмы иммунного гомеостаза при инфаркте миокарда
- 53 Шапиро Ф. Б., Ульянов А. М. Влияние инсулина на начальные стадии клиренса гепарина
- 57 Рябинин В. Е., Налимов А. Г., Лифшиц Р. И. Влияние термической травмы и среднемолекулярных пептидов на хемилюминесценцию плазмы крови
- 60 Панасюк Е. Н., Кузьмак Н. И. Влияние in vivo L-тироксина на содержание углеводсодержащих компонентов гликопротеидов в субклеточных фракциях печени у крыс
- 64 Филановская Л. И., Блинов М. Н., Того А. В., Клубовская Н. И., Бурмистрова Е. В. О деградации пуринов в лейкоцитах при острых нелимфобластных лейкозах
- 71 Никитина З. К., Ребров Л. Б. Структурные и функциональные изменения миозина скелетных мышц крыс в процессе смертного аутолиза
- 76 Бабарыкин Д. А., Смиттниекс Э. Х., Валинище М. Ю., Бауман В. К. 24, 25-Дигидроксивитамин D<sub>3</sub> модулирует действие 1  $\alpha$ -гидроксивитамина D<sub>3</sub> на созревание В-лимфоцитов у цыплят
- 82 Ананенко А. А., Малиновская В. В., Клембовский А. И., Политова Л. Н., Перцева Н. Г., Зверева В. И., Федюшкина Н. А. Процессы перекисного окисления липидов при экспериментальной вирусной инфекции и влияние на них интерферонов и  $\alpha$ -токоферола
- 86 Доценко В. Л., Ненасьева Н. М., Нешкова Е. А., Морозова Н. А., Яровая Г. А. Механизм активирования калликреин-кининовой системы плазмы крови у больных atopическими аллергическими заболеваниями
- 89 GABA-transaminase and glutamate decarboxylase activities in mitochondria of dog brain limbic structures during postnatal ontogenesis
- Golikov, P. P., Nikolaeva, N. Yu., Spiridonov, I. V., Sklyarevsky, V. V. Liver tissue glucocorticoid receptors in pathogenesis of acute cholecystitis
- Shishkin, V. I., Kudryavtseva, G. V., Makarov, S. A. Pentose phosphate pathway of carbohydrate metabolism in some systemic impairments of connective tissue
- Akopov, S. E., Mkhitarjan, G. S., Nikogosyan, G. A., Gabrielyan, E. S. Alterations in sensitivity of thrombocytes to the antiaggregation effect of prostacycline in patients with cerebral dyshemias
- Apukhovskaya, L. I., Antonenko, L. V., Kholodova, Yu. D., Voziyan, P. A., Solodova, E. V. Structure properties and lipid-binding ability of fibrinogen and  $\gamma$ -globulins from blood plasma in vitamin D-dependent rickets
- Dobrotina, N. A., Kopytova, T. V., Berezhina, M. A. On some mechanisms of immune homeostasis in myocardium infarction
- Shapiro, F. B., Ul'yanov, A. M. Effect of insulin on the initial steps of heparin clearance
- Ryabinin, V. E., Nalimov, A. G., Lifshits, R. I. Effect of thermic trauma and middle molecular peptides on blood chemoluminescence
- 60 Panasyuk, Ye. N., Kuz'mak, N. I. In vivo effect of L-thyroxine on content of some carbohydrates in glycoproteins of rat liver subcellular fractions
- 64 Filanovskaya, L. I., Blinov, M. N., Toga, A. V., Klubovskaya, N. I., Burmistrova, E. V. Degradation of purines in leukocytes under conditions of acute non-lymphoblastic leukoses
- 71 Nikitina, Z. K., Rebrov, L. B. Structural and functional alterations in rat skeletal muscle myosin during postmortal autolysis
- 76 Babarykin, D. A., Smiltnieks, E. Kh., Valinietse, M. Yu., Bauman, V. K. 24,25-dihydroxy vitamin D<sub>3</sub> modulates the effect of 1 $\alpha$ -hydroxy vitamin D<sub>3</sub> on maturation of B lymphocytes in chicken
- 82 Ananenko, A. A., Malinovskaya, V. V., Klembovsky, A. I., Politova, L. N., Pertseva, N. G., Zvereva, V. I., Fedyushkina, N. A. Effect of interferons and  $\alpha$ -tocopherol on lipid peroxidation in experimental viral infection
- 86 Dolsenko, V. L., Nenasheva, N. M., Neshkova, E. A., Morozova, N. A., Yarovaya, G. A. On the mechanism of activation of kallikrein-kinine system in blood plasma of patients with atopie forms of allergic diseases

Техн. редактор Н. К. Евстигнеева

Корректор А. Д. Абрамова

Сдано в набор 26.09.88. Подписано в печать 28.10.88. Формат 70×108<sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Бумага тип. № 1. Гарнитура литературная. Печать высокая. Печ. л. 9,00 + печ. л. вкл. 0,13. Усл. печ. л. 12,78. Усл. кр.-отт. 13,30. Уч.-изд. л. 16,65. Тираж 1558 экз. Цена 1 р. 30 коп. Заказ 2489

Ордена Трудового Красного Знамени  
Издательство «Медицина», Москва 101000, Петроверигский пер., 6/8.  
Ордена Трудового Красного Знамени  
Чеховский полиграфический комбинат  
ВО «Союзполиграфпром» Государственного комитета СССР  
по делам издательств, полиграфии и книжной торговли  
142300, г. Чехов Московской области