

ТОМ XXXV

ВЫПУСК 2

МАРТ — АПРЕЛЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

ВОПРОСЫ
МЕДИЦИНСКОЙ
ХИМИИ



МОСКВА · МЕДИЦИНА · 1989



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

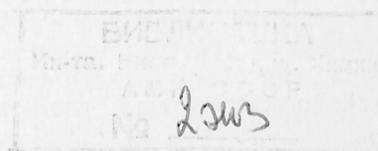
Главный редактор С. С. ДЕБОВ

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

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

ТРОИЦКИЙ Г. В. (Симферополь)
ТУРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)
ТЯХЕПЫЛД Л. Я. (Тарту)
ШАПОТ В. С. (Москва)
ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)
ЯСАИТИС А. А. (Вильнюс)



И. А. Горошинская

РОЛЬ ИЗМЕНЕНИЯ КАТАЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МОНОАМИНОКСИДАЗЫ МОЗГА В ОТВЕТНОЙ РЕАКЦИИ ОРГАНИЗМА НА ЭКСТРЕМАЛЬНЫЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ (ОБЗОР)

НИИ биологии Ростовского-на-Дону университета

Вопрос о реакции организма на разнообразные воздействия в настоящее время представляется очень важным в связи с изменением экологических условий, в которых вынуждено находиться большое количество людей. Прежде всего это разные уровни состава газовой среды, температуры, влажности, давления и т. д. Развиваются представления об общности механизмов ответной реакции организма и уровне ее перехода в патологические состояния в условиях экстремальных воздействий. Большое внимание уделяется свободнорадикальным процессам, ведущим к образованию липидных перекисей и нарушению мембранных структур.

Определенный вклад в решение данной проблемы может внести, по нашему мнению, анализ материалов по изучению активности, субстратной специфичности и физико-химических свойств фермента митохондриальных мембран моноаминоксидазы [амин:кислород — оксидоредуктаза (дезаминирующая) (содержащая флаavin), КФ 1.4.3.4; MAO]. Данный фермент, открытый еще в 1928 г., находится в центре ослабевающего внимания исследователей, главным образом благодаря его важному значению в функции ЦНС. К настоящему времени достаточно хорошо изучена роль MAO в регулировании внутринейронального уровня моноаминных медиаторов [6, 8, 41, 44, 68], показано изменение активности и каталитических свойств этого фермента при различных патологических состояниях ЦНС [9]. Обратимые качественные изменения каталитических свойств MAO, выражающиеся в снижении активности фермента в пробах с собственными субстратами и возникновении способности катализировать дезаминирование ряда азотсодержа-

щих веществ, в порме не являющихся субстратами MAO, обнаружены при многих патологических состояниях, сопровождающихся активацией перекисного окисления липидов (ПОЛ) [5—10]. Такие изменения свойств фермента показаны при облучении, злокачественном росте, гипервитаминозе D₂ [5], в грануляционно-фиброзной ткани кожных ран [61], при гипероксии [12], туберкулезе [10], холодом стрессе [16], гипоксии [14], экспериментальной гиперхолестеринемии [27], черепно-мозговой травме [1]. Высказываются предположения о возможном патогенетическом значении качественной модификации активности MAO при заболеваниях [8], в частности при атеросклерозе [37]. Однако вопрос о месте моноаминоксидазной реакции в механизме метаболических изменений, наблюдаемых под влиянием изменения внутренней и внешней среды организма, и значении фермента в развитии патологических состояний остается невыясненным. Более глубокий анализ функциональной роли MAO возможен при системном изучении ее свойств в процессе экстремальных воздействий разной этиологии. В данном обзоре предпринята попытка выявить общее в изменении свойств фермента под влиянием различных факторов окружающей среды, в частности повышенного и пониженного давления кислорода, ишемии головного мозга, при холодом воздействии и адаптации к холоду.

Интерес к исследованию MAO определяется ее важной ролью в процессах медиации нервных импульсов, четкой локализацией в мембранных структурах и способностью к изменению субстратной специфичности в условиях, способствующих накоплению липидных перекисей. Продукты реакции,

катализируемой МАО, включаются в метаболизм широкого круга биологически активных соединений. Это делает возможным установление непосредственной связи между функциональной активностью нервной системы и изменением свойств МАО.

МАО — единственный фермент медиаторного обмена, субстратами которого в норме являются не один, а целая группа нейромедиаторов. МАО является основным ферментом обмена катехоламинов и серотонина, она также катализирует дезаминирование гистамина после его метилирования [52, 64]. Изменение субстратной специфичности при патологических состояниях в еще большей мере расширяет круг веществ, испытывающих влияние МАО. Поскольку нарушение мембранных структур является одной из первичных ответных реакций на экстремальные воздействия, мембранная локализация МАО определяет особую чувствительность этого фермента к различным патогенным факторам. Таким образом, МАО не только важнейший и уникальный по широте своего воздействия медиаторный фермент, но и особо чувствительный к любому изменению внешней и внутренней сред организма. Это обуславливает важное значение изменения свойств МАО в механизмах ответной реакции организма на экстремальные воздействия.

Различают МАО типа А, субстратами которой являются серотонин и норадреналин, а ингибитором — хлоргидин, и МАО типа В (субстраты β -фенилэтиламин и метилгистамин, ингибитор — депренил). Дофамин, тирамин и триптамин могут дезаминироваться при участии обоих типов МАО [57]. Основной функцией МАО типа А в нервной системе считают участие фермента в процессах передачи первого импульса путем поддержания физиологического уровня медиаторов в пре-синаптическом окончании нервного волокна [41, 43] МАО типа В, помимо участия в обмене β -фенилэтиламина (которому приписывают в основном нейромодуляторные функции) и метилгистамина, играет важную роль в регуляции действия симпатомиметических аминов и осуществлении детоксикационной функции печени и желудочно-кишечного тракта [23, 56].

В условиях гипероксии, гипоксии и холодового стресса наблюдается сни-

жение активности МАО типа А в мозге. Степень ингибирования этой формы фермента коррелирует с состоянием животных. Наиболее выраженные изменения активности МАО типа А отмечены в судорожной стадии гипероксии. При гипоксической гипоксии и холодовом стрессе активность фермента снижается в меньшей степени [48]. При гипероксии прослеживается четкая зависимость между фазой гипероксического воздействия (компенсаторная, предсудорожная и судорожная фазы) и степенью ингибирования МАО типа А. При кратковременном действии умеренно высокого давления кислорода (0,2 МПа, 30 мин) активность фермента, напротив, повышается: незначительно с серотонином в качестве субстрата и существенно по отношению к норадреналину [3].

Изучение влияния гипероксии на активность двух форм фермента в разных тканях показало, что наиболее выраженные изменения активности МАО типа А наблюдаются в мозге при незначительном ингибировании МАО типа В. Это, по-видимому, связано с тем, что при острой форме кислородной интоксикации наиболее поражаемым органом является ЦНС. В отличие от мозга в печени, легких и сердце активность МАО типа В снижается в большей степени, чем активность МАО типа А [20]. Тканевые различия в активности двух форм МАО подчеркивают разную функциональную роль фермента в отдельных тканях.

В условиях гипоксической гипоксии и холодового стресса также наблюдается ингибирование МАО типа А мозга при сохранении активности МАО типа В. Преимущественное изменение в мозге активности МАО типа А свидетельствует об изменении функциональной активности норадренергической и серотонинергической медиаторных систем, которое, по-видимому, можно рассматривать как универсальную ответную реакцию организма.

Не менее важным, чем ингибирование специфической моноаминоксидазной активности, представляется изменение субстратной специфичности фермента, поскольку оно вызывает нарушение функционирования большого числа клеточных компонентов [5, 8]. Снижение активности МАО типа А с естественными субстратами сопровождается при гипероксии, гипоксии и хо-

лодовом стрессе появлением способности дезаминировать глюкозамин, путресцин, полиамины, ГАМК, гомокарнозин и гистамин. Использование преинкубации с избирательно действующими ингибиторами MAO: ингибитором MAO типа А хлоргилином и ингибитором MAO типа Б депренилом — позволило установить, что, во-первых, действительно имеет место изменение субстратной специфичности MAO, а не активирование других ферментов, которые могут содержаться в препарате митохондрий, и, что, во-вторых, при исследованных экстремальных воздействиях изменяется субстратная специфичность именно MAO типа А [12, 14, 16, 21]. Снижение моноаминоксидазной активности и изменение субстратной специфичности обнаружены и при ишемии головного мозга [49].

Изменение активности и субстратной специфичности MAO ведет к дискоординации работы многих медиаторных систем. Ингибирование MAO типа А, способствуя повышению уровня моноаминов и препятствуя нормальной терминеции их медиаторного действия, ведет к возрастанию функциональной активности симпатoadреналовой системы. Поскольку норадренергическая система оказывает тормозящее действие на ГАМКергическую систему мозга [29], являющуюся основной тормозной системой ЦНС, повышение активности норадренергической системы ведет к растормаживанию и усилению процессов возбуждения в ЦНС. Помимо опосредованного норадренергической системой тормозного действия на ГАМКергическую систему, MAO оказывает и прямое влияние на уровень тормозных медиаторов ГАМК и гомокарнозина, осуществляя в условиях патологических состояний их окислительное дезаминирование. Доказательством роли MAO в снижении содержания ГАМК в мозге при гипероксии служат опыты с ингибиторами. Предварительное введение животным избирательно действующего ингибитора MAO типа А хлоргилина препятствует снижению уровня ГАМК при гипероксии, не влияя при этом на ингибирование фермента синтеза ГАМК — глутаматдекарбоксилазы [17]. Приобретая способность дезаминировать ди- и полиамины [8], MAO становится также одним из факторов, обуславливаю-

щих снижение уровня этих соединений при гипероксии [50].

Снижению содержания полиаминов, ГАМК, гомокарнозина в условиях гипероксического воздействия придают важную роль в механизме развития кислородной интоксикации. С уменьшением уровня полиаминов связывают торможение процессов биосинтеза белка, нарушение структуры клеточных мембран и регуляции многих процессов в клетке [42]. Снижение уровня ГАМК и гомокарнозина, выполняющих функции тормозных медиаторов [32, 55], рассматривают в качестве одной из причин развития кислородных судорог [67].

Изменение субстратной специфичности MAO является также, по-видимому, одной из причин снижения уровня полиаминов, ГАМК и гомокарнозина при холододовом воздействии. В условиях холододового стресса в мозге обнаружено значительное снижение содержания спермидина и спермина [39], ГАМК [22, 40] и гомокарнозина [2].

Особый интерес представляет вопрос о механизме изменения свойств MAO. Снижение моноаминоксидазной активности и изменение субстратной специфичности фермента могут быть обусловлены, во-первых, изменением молекулярных свойств самого фермента и, во-вторых, изменением структуры и проницаемости митохондриальных мембран, на которых локализована MAO [5, 8].

При гипероксии, гипоксической гипоксии, ишемии и холододовом стрессе наблюдается резкое (2—3-кратное) увеличение K_m , свидетельствующее о снижении сродства фермента к субстрату [11, 49]. Увеличение K_m и изменение субстратной специфичности MAO типа А при всех перечисленных состояниях указывает на изменение молекулярных свойств фермента.

Как известно, MAO является флавопротеидом, содержащим свободные сульфгидрильные группы, существенные для ее активности [8]. Частичное обратимое окисление сульфгидрильных групп MAO до стабильных остатков цистеинсульфеновой кислоты ведет к изменению субстратной специфичности MAO [5]. В условиях целого организма частичное окисление сульфгидрильных групп MAO, вызывающее трансформацию каталитических свойств фермента, происходит под действием

липидных перекисей, накапливающихся в тканях при многих патологических состояниях [7]. Усиление ПОЛ имеет место при гипероксии [4, 54, 58], гипоксической гипоксии [38], ишемии головного мозга [30, 65], холодовом стрессе [26, 35], т. е. при всех состояниях, при которых обнаружено характерное изменение субстратной специфичности МАО. О том, что трансформация МАО происходит в результате обратимого окисления сульфгидрильных групп фермента липидными перекисями [8], свидетельствуют также восстановление исходных свойств МАО при обработке митохондрий, полученных от гипероксических животных, аскорбиновой кислотой [12] и предотвращение трансформации фермента мочевиной, препятствующей усилению процессов ПОЛ [13].

Изменение каталитических свойств МАО при экстремальных воздействиях может обуславливаться влиянием продуктов ПОЛ не только непосредственно на сам фермент, но и на митохондриальные мембраны [8, 9]. МАО весьма чувствительна к нативности мембран. Обработка последних детергентами, фосфорилазой ведет к частичной инактивации фермента и изменению его свойств [46, 53]. Нарушение субстратной специфичности МАО, проявляющееся в значительном возрастании скорости дезаминирования норадrenalина по сравнению с таковой серотонина, наблюдали уже при выделении МАО из митохондриальных мембран [34].

Как показали наши исследования, параллельно снижению активности МАО типа А в митохондриальной фракции в условиях гипероксии, гипоксии и холодового стресса наблюдается появление серотонин- и глюкозаминдезаминазной активности в цитозоле. Преинкубация с хлоргелином препятствует повышению интенсивности дезаминирования серотонина и глюкозамина, что свидетельствует о моноаминоксидантном происхождении индуцируемой в цитозоле активности [11]. Одновременное появление в цитозоле хлоргелинчувствительных серотонин- и глюкозаминдезаминазных активностей указывает на выход из митохондрий трансформированной МАО типа А. Не исключено, что наряду с окислением сульфгидрильных групп определенную роль в механизме транс-

сформации МАО играет и состояние митохондриальных мембран. Показано, что при трансформации происходит уменьшение вязкости гидрофобной части мембран митохондрий, о чем свидетельствует более быстрое вращение встроеного в мембрану липидного аминоксильного радикала [33]. МАО типа Б, меньше зависящая от липидного микроокружения и целостности митохондриальных мембран [47, 66], не изменяется или изменяется в значительно меньшей степени, чем МАО типа А, как в митохондриальной фракции, так и в цитозоле. Выход маркерного фермента митохондрий в цитозоль свидетельствует о нарушении структуры и проницаемости митохондриальных мембран при гипероксии, гипоксии и холодовом стрессе. На это же указывают и результаты электронно-микроскопического исследования [19, 25]. Таким образом, снижение активности МАО при этих состояниях может быть обусловлено как выходом фермента в цитозоль в результате нарушения мембранных структур, так и изменением молекулярных свойств фермента, о чем свидетельствуют увеличение K_m и изменение субстратной специфичности.

Ингибирование МАО типа А при сохранении активности МАО типа Б может также быть связано с гибелью нейронов, поскольку МАО типа А имеет преимущественно нейрональную локализацию, в то время как МАО типа Б располагается в значительной степени в клетках глии. В процессе развития ряда патологических состояний, так же как и при старении организма, соотношение между нейрональными и глиальными клетками нередко изменяется в пользу последних. Гибель нейронов отмечена, в частности, у животных, подвергшихся церебральной ишемии [59].

При всех изученных воздействиях лучшим «новоприобретенным» субстратом трансформированной МАО типа А становится глюкозамин. Дезаминирование при участии МАО, по-видимому, служит одной из причин снижения уровня глюкозамина в тканях мозга при гипероксии и нарушения структуры и проницаемости мембран, в состав которых входят амниосахара. Следовательно, с одной стороны, повреждение мембран может являться одним из факторов изменения мембраносвязан-

ных ферментов, в том числе МАО, с другой — изменение каталитических свойств МАО может в свою очередь способствовать дальнейшему нарушению мембранных структур.

Важную роль играет МАО в функционировании гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), регулируя его проницаемость для аминов и ряда других соединений [45]. При патологических состояниях нарушение работы ГЭБ может происходить как в результате ингибирования МАО, так и в результате обусловленной МАО активации ПОЛ, поскольку ведущая роль в деятельности ГЭБ принадлежит мембранным структурам. Это, возможно, служит одной из причин увеличения проницаемости ГЭБ, наблюдаемого при гипероксии [31].

Как окисление сульфгидрильных групп МАО, так и в значительной степени нарушение мембранных структур обусловлено липидными перекисями. Одним из факторов, способствующих усилению ПОЛ, является перекись водорода, представляющая собой конечный продукт деятельности МАО [8, 24]. Катализируемая МАО реакция считается основным путем образования H_2O_2 в мозге [62, 63]. Несмотря на снижение активности МАО типа А при острой гипероксии, гипоксических состояниях и холодовом стрессе, резкое увеличение суммарного объема реакций, катализируемых ферментом в результате приобретения им способности дезаминировать большое число азотсодержащих компонентов клетки, может способствовать избыточной продукции H_2O_2 при патологических состояниях. При гипероксии увеличение образования H_2O_2 происходит, возможно, и за счет активирования фермента на начальных этапах кислородного воздействия.

Важную роль в инициации и усилении процессов ПОЛ играют не только H_2O_2 , но и другие продукты моноаминоксидазной реакции. Наиболее активная стимуляция ПОЛ имеет место в системе с субстратами МАО типа Б и с субстратами трансформированной МАО типа А. Серотонин, напротив, дает антиоксидантный эффект [24]. Поскольку при гипероксии, гипоксии и холодовом стрессе интенсивность дезаминирования серотонина снижается при практически неизменной активности МАО типа Б в моз-

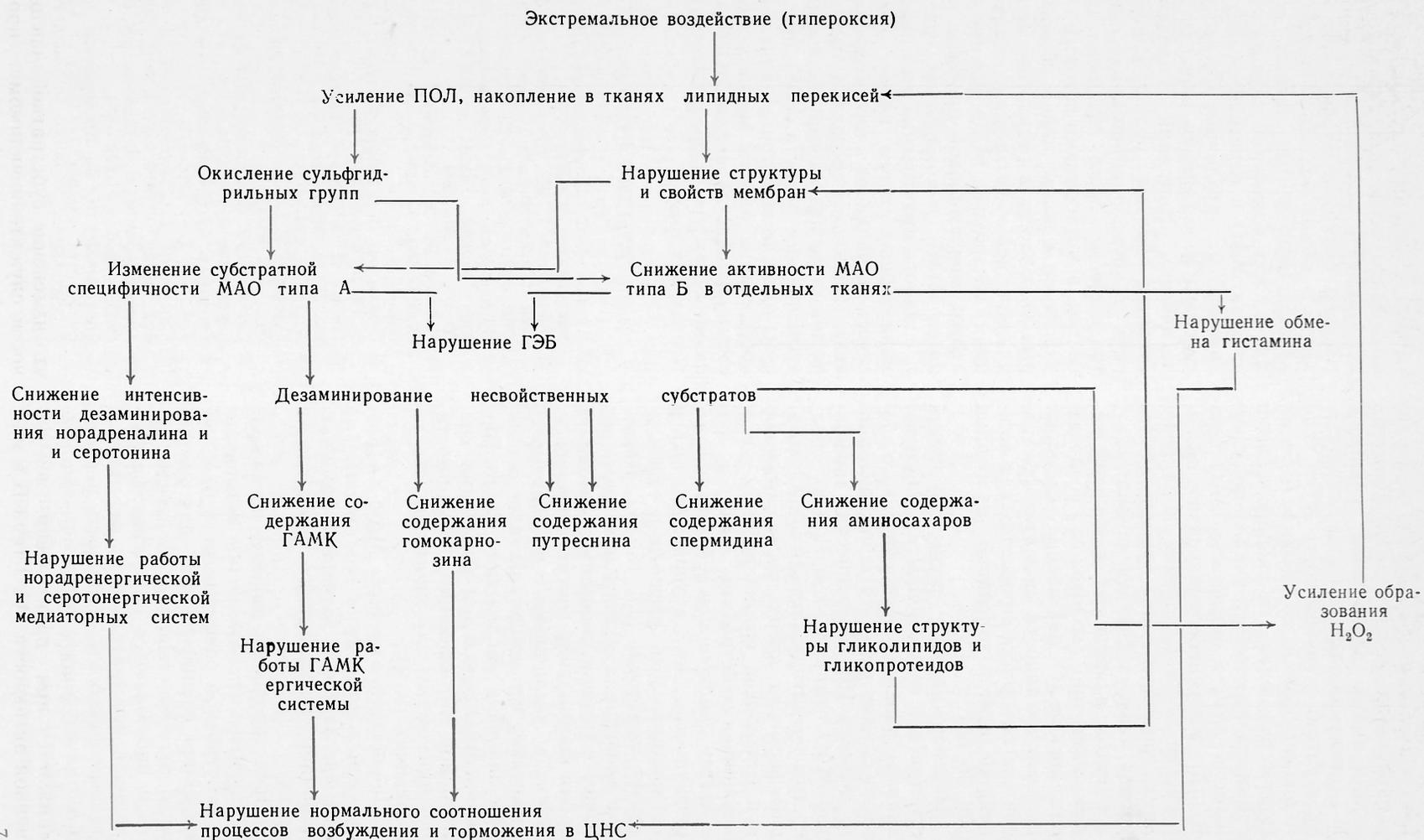
ге и многократном увеличении интенсивности дезаминирования необычных субстратов, создаются условия для усиления ПОЛ: системы, оказывающие стимулирующее действие на ПОЛ, активно функционируют, а дезаминирование серотонина, в процессе которого образуются продукты, обладающие антиоксидантным свойством, ингибируется. Таким образом, при исследованных экстремальных воздействиях возникает «порочный цикл», играющий, возможно, важную патогенетическую роль в условиях недостаточности каталазы [24]. Инициация ПОЛ под действием активных форм кислорода вызывает трансформацию МАО, в результате чего усиливается ПОЛ, которое в свою очередь приводит к дополнительной трансформации МАО и, следовательно, лавинообразному накоплению продуктов ПОЛ в биомембранах [24].

Системой, противодействующей МАО-зависимому усилению ПОЛ, служит пентозофосфатный шунт. Полагают, что в мозге защита мембранных липидов от перекисного окисления, связанного с появлением продуктов деградации моноаминов и H_2O_2 , является одной из важнейших функций НАДФ·Н, образующегося по пентозофосфатному пути. При этом показано, что уровень ПОЛ в отдельных участках мозга изменяется в соответствии с уровнем МАО в этих участках. В наибольшей степени от пентозофосфатдетоксикационной системы зависят симпатические катехоламинергические ядра. В условиях патологии, когда НАДФ·Н и необходимый для работы системы восстановленный глутатион находятся в дефиците, продукты реакций, катализируемых МАО, становятся факторами, вызывающими повреждение мозга [51].

Важно отметить, что изменения МАО не первичны, а являются результатом происходящих при экстремальных воздействиях нарушений. Но затем изменение свойств МАО становится причиной последующих нарушений не только медиаторного обмена, но и структурных компонентов клетки [9].

Сопоставление изменения субстратной специфичности МАО типа А и ингибирования ее специфической активности позволяет прийти к заключению, что изменение субстратной специфичности служит, по-видимому, проявле-

Место MAO в развитии патологического процесса



нием патологии, в то время как умеренное снижение активности фермента может иметь адаптивный характер. У адаптированных к холоду животных субстратная специфичность МАО типа А нормализуется, но активность этой формы фермента со специфическими субстратами остается сниженной. Снижается также и активность МАО типа Б [15]. Умеренное уменьшение интенсивности дезаминирования норадреналина, способствующее повышению его уровня, следует считать, по-видимому, элементом адаптивных изменений метаболизма при холодом воздействии, поскольку повышение функциональной активности симпатoadренальной системы рассматривается как важнейший фактор холодовой адаптации [28, 36, 60].

Подтверждением роли изменения субстратной специфичности МАО в механизме развития патологического процесса служат результаты ингибиторного анализа [8]. Классический ингибитор МАО типа А хлоргилин, полностью предотвращающий трансформацию фермента, препятствует снижению при гипероксии уровня веществ, становящихся субстратами МАО в результате изменения ее субстратной специфичности, дает антиоксидантный и антирадикальный эффекты и стабилизирует мембраны [17, 18, 21]. Введение хлоргилина значительно улучшает общее состояние животных, отодвигает время наступления гипероксических судорог и увеличивает выживаемость животных, что свидетельствует о важном значении последствий трансформации МАО типа А для механизма кислородной интоксикации, в частности, по-видимому, и для многих других заболеваний [8, 9].

Предполагаемая роль МАО в развитии патологических состояний на примере наиболее изученной нами кислородной интоксикации показана на схеме.

Представленные данные позволяют заключить, что изменения активности и субстратной специфичности МАО не являются специфическими для какого-либо экстремального воздействия, хотя и наблюдаются определенные различия в чувствительности фермента к разным факторам. Общность реакции МАО на изученные экстремальные воздействия и ее физиологические последствия определяются, во-

первых, общими пусковыми механизмами и, во-вторых, структурой, локализацией и ролью МАО, обеспечивающей возможность включения фермента в обмен большого числа важнейших компонентов живых систем. Значимость изменений каталитических свойств МАО в ответной реакции организма на различные стрессорные факторы и механизме развития патологических состояний определяется главным образом ролью специфических и «повонобренных» субстратов и прежде всего тех медиаторных систем, в метаболизме которых МАО участвует в норме или в обмен которых включается в результате происходящей с ней качественной модификации. Субстратами МАО, помимо медиаторов моноаминовой природы, становятся ГАМК, гомокарбозин, гистамин, т. е. работа практически всех основных медиаторных систем, кроме холинергической, начинает в значительной степени зависеть от состояния МАО. Важнейшими последствиями изменения каталитических свойств МАО при экстремальных воздействиях являются дискоординация работы медиаторных систем, усиление процессов ПОЛ и нарушение структуры и проницаемости клеточных мембран.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аюлян А. С., Прохоров М. Ш. // *Вопр. мед. химии.* — 1984. — № 1. — С. 75—77.
2. Бондаренко Т. И., Кричевская А. А., Кошций Г. Н. // *Физиол. журн. СССР.* — 1985. — Т. 71, № 3. — С. 333—336.
3. Броновицкая З. Г., Горошинская И. А. // *Укр. биохим. журн.* — 1976. — Т. 48, № 3. — С. 295—299.
4. Габитов М. М., Карагезян К. Г. // *Бюл. экспер. биол.* — 1981. — № 6. — С. 682—684.
5. Горкин В. З. // *Молекул. биол.* — 1976. — Т. 10, № 4. — С. 717—736.
6. Горкин В. З. // *Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева.* — 1976. — Т. 22, № 2. — С. 181—186.
7. Горкин В. З. // *Хим.-фарм. журн.* — 1977. — № 1. — С. 6—13.
8. Горкин В. З. *Аминоксидазы и их значение в медицине.* — М., 1981.
9. Горкин В. З. // *Нейрохимия.* — 1985. — Т. 4. — № 1. — С. 68—79.
10. Горкин В. З., Елистратова И. А. // *Вопр. мед. химии.* — 1979. — № 6. — С. 743—748.
11. Горошинская И. А. // *Бюл. экспер. биол.* — 1985. — № 6. — С. 672—674.
12. Горошинская И. А., Броновицкая З. Г. // *Вопр. мед. химии.* — 1976. — № 3. — С. 558—562.
13. Горошинская И. А., Броновицкая З. Г. // *Изв. Сев.-Кавказ. науч. центра высш. шко-*

- лы: Естеств. науки. — 1976. — № 3. — С. 89—90.
14. *Горошинская И. А., Броницкая З. Г., Кричевская А. А., Кабарухина Е. Г.* // Нейрохимия. — 1982. — Т. 1, № 3. — С. 282—286.
 15. *Горошинская И. А., Грабовскова Л. Л., Броницкая З. Г., Кричевская А. А.* // Физиол. журн. СССР. — 1981. — Т. 67, № 11. — С. 1611—1616.
 16. *Горошинская И. А., Кричевская А. А., Броницкая З. Г.* // Бюл. exper. биол. — 1981. — № 4. — С. 431—433.
 17. *Горошинская И. А., Кричевская А. А., Шугалей В. С.* и др. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 2. — С. 76—79.
 18. *Горошинская И. А., Милютин Н. П., Бежанова В. А.* // Всесоюзная конф. «Биоантиоксидант», 2-я: Тезисы. — Черноголовка, 1986. — Т. 1. — С. 112.
 19. *Горошинская И. А., Федоренко Г. М., Ходакова А. А.* // Нейрохимия. — 1985. — Т. 4, № 2. — С. 134—140.
 20. *Горошинская И. А., Ходакова А. А., Коробова Л. И.* и др. // Науч. докл. высш. школы: Биол. науки. — 1984. — № 11. — С. 20—24.
 21. *Горошинская И. А., Цветненко Е. З., Ходакова А. А.* и др. // Укр. биохим. журн. — 1986. — Т. 58, № 3. — С. 74—77.
 22. *Готлобер И. В., Кричевская А. А., Гершеневич З. С.* // Эволюционная нейрофизиология и нейрохимия. — Л., 1967. — С. 170—175.
 23. *Жарикова А. Д.* // Катехоламинергические нейроны / Под ред. Т. М. Турпаева, А. Ю. Буданцева. — М., 1979. — С. 184—201.
 24. *Каган В. Е., Смирнов А. В., Савов В. М., Горкин В. З.* // Вопр. мед. химии. — 1984. — № 1. — С. 112—118.
 25. *Кричевская А. А., Горошинская И. А., Федоренко Г. М., Ходакова А. А.* // Нейрохимия. — 1986. — Т. 5, № 1. — С. 37—44.
 26. *Ломакина Л. В.* // Укр. биохим. журн. — 1980. — Т. 52, № 3. — С. 305—308.
 27. *Мамадиев М., Хужамбердиев М., Горкин В. З.* // Вопр. мед. химии. — 1983. — № 1. — С. 83—89.
 28. *Пастухов Ю. Ф.* // Нейроэндокринные корреляции. — Владивосток, 1978. — С. 85—106.
 29. *Робертс Ю.* // Журн. эволюц. биохимии. — 1973. — № 5. — С. 445—463.
 30. *Селиченко В. В., Полуэктов Л. В., Конвай В. Д.* // Бюл. exper. биол. — 1983. — № 7. — С. 12—14.
 31. *Синичкин А. А.* // Нейрохимия. — 1983. — Т. 2, № 2. — С. 221—231.
 32. *Сытинский И. А.* Гамма-аминомасляная кислота — медиатор торможения. — Л., 1977.
 33. *Татьяненко Л. В., Соколова Н. В., Машковский Ю. Ш.* // Вопр. мед. химии. — 1982. — № 6. — С. 126—131.
 34. *Третьяков А. В., Мухленов А. Г., Гуркало В. К.* // Докл. АН СССР. — 1976. — Т. 228, № 2. — С. 494—497.
 35. *Турчинский В. И.* // Вестн. АМН СССР. — 1979. — № 6. — С. 23—32.
 36. *Хаскин В. В.* // Теоретические и практические проблемы терморегуляции. — Ашхабад, 1982. — С. 44—53.
 37. *Хужамбердиев М. М., Сайдуллаев Т., Мамадиев М., Горкин В. З.* // Нейрохимия. — 1986. — Т. 5, № 3. — С. 277—285.
 38. *Шафран Л. М., Гулевич Е. К., Левицкий Л. П.* // Укр. биохим. журн. — 1979. — Т. 51, № 2. — С. 107—110.
 39. *Шугалей В. С., Цветненко Е. З.* // Изв. Сев.-Кавказ. науч. центра высш. школы: Естеств. науки. — 1979. — № 1. — С. 86—88.
 40. *Эмирбеков Э. Э., Абдуллаев Р. А., Исмаилов И. А.* // Биохимия животных и человека. — Киев, 1980. — Вып. 4. — С. 84—90.
 41. *Achee H. M., Gabay S., Tipton K. F.* // Progr. Neurobiol. — 1977. — Vol. 8, № 4. — P. 325—347.
 42. *Bachrach U.* Function of Naturally Occurring Poliamines. — New York, 1973.
 43. *Benedetti M. S., Boucher T., Fowler C. J.* // Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. — 1983. — Bd 323, № 4. — S. 315—320.
 44. *Blaschko H. J.* // J. psychiat. Res. — 1974. — Vol. 11. — P. 325—327.
 45. *Colzias G., Tang L. C., Ginas J. Z.* // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1974. — Vol. 71. — P. 2715—2719.
 46. *Ekstedt B., Oreland L.* // Biochem. Pharmacol. — 1976. — Vol. 25, № 2. — P. 119—124.
 47. *Fowler C. J., Oreland L.* // J. Pharm. Pharmacol. — 1980. — Vol. 32, № 10. — P. 681—688.
 48. *Goroshinskaya I. A., Hodakova A. A., Tsvetnenko E. Z., Rakic L. L.* // IRCS med. Sci.: Biochemistry. — 1985. — Vol. 13, № 10. — P. 999—1000.
 49. *Goroshinskaya I. A., Stojanovic T., Micić D. V., Mrsulja B. B.* // Union of Yugoslav Physiological Societies Congress, 13th: Abstracts. — Skopje, 1985. — P. 31.
 50. *Goroshinskaya I. A., Tsvetnenko E. Z., Krichevskaya A. A., Rakic L.* // IRCS med. Sci.: Biochemistry. — 1985. — Vol. 13, № 7. — P. 673—674.
 51. *Hothersall J. S., Greenbaum A. L., McLean P.* // J. Neurochem. — 1982. — Vol. 39, № 5. — P. 1325—1332.
 52. *Hough L. B., Domino E. F.* // J. Pharmacol. exp. Ther. — 1978. — Vol. 208, № 3. — P. 422—428.
 53. *Houslay M. D., Tipton K. F.* // Biochem. J. — 1975. — Vol. 145. — P. 311—321.
 54. *Jerrett S. A., Jefferson D., Mengel C. E.* // Aerospace Med. — 1973. — Vol. 44, № 1. — P. 40—44.
 55. *Meldrum B.* // Clin. Neuropharmacol. — 1982. — Vol. 5, № 3. — P. 293—316.
 56. *Murphy D. L.* // Biochem. Pharmacol. — 1978. — Vol. 27, № 15. — P. 1889—1893.
 57. *Neff N. H., Yang H.-Y. T.* // Life Sci. — 1974. — Vol. 14, № 11. — P. 2061—2078.
 58. *Nohl H., Hegner D., Summer K.-H.* // Biochem. Pharmacol. — 1981. — Vol. 30, № 13. — P. 1753—1757.
 59. *Petito C. K., Pulsinelli W. A.* // J. Neuro-path. exp. Neurol. — 1984. — Vol. 43, № 2. — P. 141—153.
 60. *Preston E., Schönbaum E.* // Brain Dysfunction in Infantile Febrile Convulsions. — New York, 1976. — P. 75—87.
 61. *Romanova L. A., Stalnaya I. D., Gorokin V. Z.* // Med. Biol. — 1975. — Vol. 53. — P. 205—209.
 62. *Seregi A., Serfözö P., Mergl Z., Schaefer A.* // J. Neurochem. — 1982. — Vol. 38, № 1. — P. 20—27.
 63. *Sinet P. M., Heikkilä R. E., Cohen G.* // Ibid. — 1980. — Vol. 34, N 6. — P. 1421—1428.

64. Waldmeier P. C., Feldtrauer J.-J., Maitre L. // Ibid. — 1977. — Vol. 29, № 5. — P. 785—790.
65. Watson B. D., Busto R., Goldberg W. J. et al. // J. Cerebr. Blood Flow Metab. — 1983. — Vol. 13, № 1. — P. 325—326.
66. White H. L., Stine D. K. // J. Neurochem. — 1982. — Vol. 38, № 5. — P. 1429—1436.
67. Wood J. D., Watson W. J., Murray G. W. // Ibid. — 1969. — Vol. 16, № 3. — P. 281—287.
68. Youdim M. B. H. // Mod. Probl. Pharmacopsychiat. — 1975. — Vol. 10. — P. 65—88.

Поступила 20.10.87

ROLE OF ALTERATIONS IN CATALYTIC PROPERTIES OF BRAIN MONOAMINE

OXIDASE IN RESPONSE TO EXTREMAL CONDITIONS

I. A. Goroshinskaya

Institute of Biology, State University, Rostov-on-Don

Alterations of brain monoamine oxidase (MAO) properties related to various functional states of a body are discussed. Similar reactions of the enzyme to extremal effects of different etiology were shown as well as role of alterations in metabolic response to impairment of environment and internal medium was demonstrated. Possible mechanisms responsible for specific properties of MAO under pathological conditions are discussed.

УДК 612.111.7.063 (048.8)

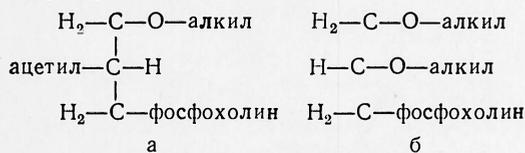
Е. И. Дайхин, Н. А. Федюшкина, А. Т. Гусейнов

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАКТОРА АКТИВАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ (ОБЗОР)

НИИ педиатрии и детской хирургии Минздрава РСФСР, Москва

Последние 15 лет характеризуются значительными достижениями в исследовании липидных медиаторов аллергии и воспаления. В 1972 г. обнаружен новый биологически активный агент фосфолипидной природы. Оказалось, что при анафилаксии сенсibilизированные иммуноглобулином класса Е базофилы высвобождают вещество, способное агрегировать (активировать) тромбоциты [7]. Это соединение названо «фактором агрегации или активации тромбоцитов» (ФАТ). Как впоследствии выяснилось, ФАТ обладает гораздо большим спектром действия, однако название, данное первоначально, сохранилось и его употребляют до настоящего времени. Позднее, когда была определена структурная характеристика ФАТ [35, 78], выяснилось, что тромбоцитагрегирующий фактор положил начало изучению нового класса фосфолипидных медиаторов.

Структурно ФАТ (а) представляет собой вещество, близкое к фосфатидилхолину (лецитину; б). Полное его название 1-алкил-2-ацетил-sn-глицеро-3-фосфохолин:



ФАТ представляет собой группу алкилацетилглицерофосфохолинов, содержащих связанные эфирными связя-

ми ацетат и жирные кислоты, поэтому они называются ФАТ-ацетоэфирами [1, 78, 82]. Биологическую активность ФАТ обуславливает наличие алкильной цепи, связанной эфирной связью с первым углеродным атомом глицеринового скелета (в основном длина цепи составляет 14, 16 или 18 углеродных атомов), наличие ацетогруппы в положении 2 и полярной группы фосфохолина в положении 3 [1, 35, 78]. C₁₆ алкильная группа в позиции 1 обеспечивает максимум активности, которая снижается в 10 раз при замене на C₁₈ или C₁₄ [85].

Метаболизм ФАТ достаточно сложен, и в этот процесс вовлечено более 10 ферментов. Наибольшей активностью обладают ацетилтрансфераза и холинфосфотрансфераза в легких, селезенке, почках [85]. Систематизированное представление об обмене ФАТ дано в работе Snyder и соавт. [79] (рис. 1). Авторы считают, что имеется «челночная» система химических превращений, в результате действия которой осуществляется взаимосвязь ФАТ и арахидонатов (рис. 2).

ФАТ обладает широким спектром действия. Под действием ФАТ в организме могут наблюдаться анафилактический шок, гипотония, выход жидкости за пределы сосудов, инфильтрация тканей, сгущение крови, снижение сердечного выброса, спазм бронхов, задержка в легких тромбоцитов и нейтрофилов с развитием тромбоцито-

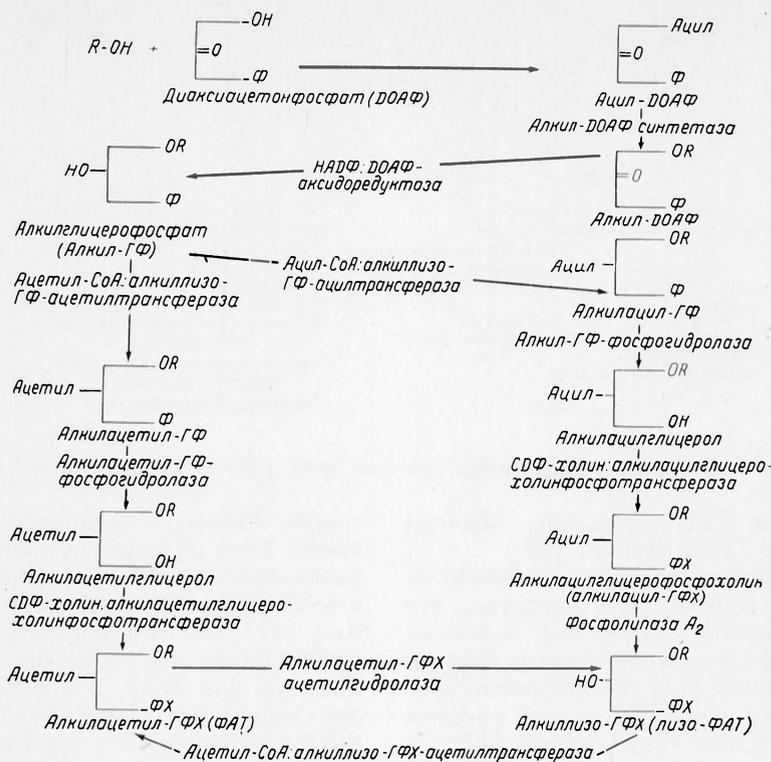


Рис. 1. Схема обмена ФАТ [79].

нейтропении, отек легких, спазм или расширение сосудов [2, 12, 76, 80].

Следует отметить, что ФАТ относится к аутокоидам, т. е. эндогенно образующимся при патологической стимуляции соединениям, обладающим биологической активностью, в частности относительно клеток, их синтезирующих [30].

В условиях *in vitro* действие ФАТ сводится к агрегации тромбоцитов и нейтрофилов, дегрануляции последних, повышению хемотаксической активности, генерации свободных радикалов, высвобождению арахидиновой кислоты и ее метаболитов, сокращению гладкой мускулатуры, повышению сосудистой проницаемости [12, 15, 42, 86].

Как отмечают Schlondorff и соавт. [76], существует общепринятое мнение, что покоящиеся клетки не продуцируют ФАТ. Для того чтобы установить, какие клеточные элементы способны к его синтезу, прибегают к активации клеток. Известно довольно много активаторов, но чаще всего пользуются кальциевым ионофором А 23187. Под действием последнего на нейтрофилы высвобождается преимуще-

ственно ФАТ с C₁₆ алкильной группировкой [37].

Синтез ФАТ могут осуществлять следующие виды клеток: тромбоциты [14, 19, 23, 65], нейтрофилы [22, 53, 60], базофилы [34, 61], эозинофилы [48, 84], моноциты [71], макрофаги [41, 73], эндотелиальные клетки [26, 88], эритроциты [77]. Известны ткани, которые продуцируют ФАТ: легкие [38], сердце [50], почки [16, 78], печень [13, 66], кожа [55, 78], селезенка

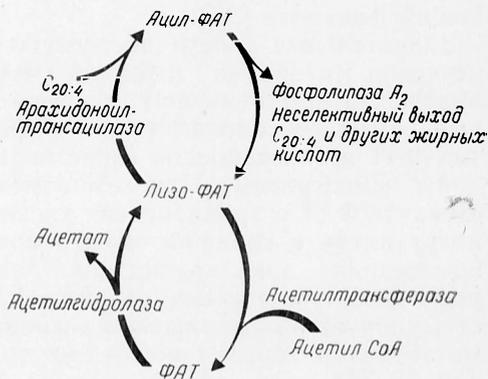


Рис. 2. «Челночная» система активации ФАТ [79].

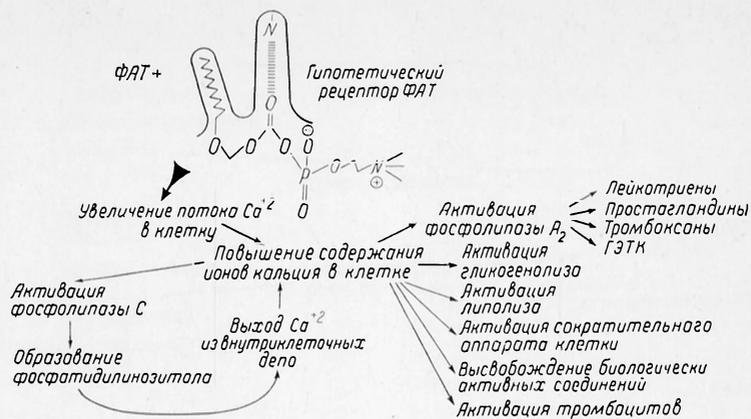


Рис. 3. Механизмы действия ФАТ [12, 39, 44, 76].

[49], retina [12], гладкие мышцы [63], матка [87], амнион [10].

ФАТ обнаруживается и в биологических жидкостях. Так, известно, что в норме с мочой у взрослого человека экскретируется в течение суток $53,11 \pm \pm 21,25$ нг ФАТ [74]. В сыворотке крови здоровых взрослых людей уровень ФАТ составляет $0,225$ нг/мл [17], у детей — $0,24 \pm 0,07$ нг/мл [3]. ФАТ найден в смешанной слюне [24, 84], асцитической и амниотической жидкостях [18, 38, 64].

В работе Hoffma и соавг. [38] показана возможная роль ФАТ в реакциях, приводящих к изменению формирования системы сурфактанта. Так, 3—4-кратное увеличение содержания в амниотической жидкости ФАТ на поздних сроках беременности, видимо, выполняет триггерную функцию и запускает процессы гликогенолиза в легочной ткани плода. Образующиеся при этом ряд соединений (глицерол, ацетил-СоА) и энергия утилизируются в процессе биосинтеза фосфолипидов сурфактанта [38].

Значительные успехи достигнуты в изучении механизма действия ФАТ. Многие авторы отмечают определенный синергизм биологических эффектов ФАТ и эйкозаноидов (простагландины, лейкотриены). При этом отмечается, что ФАТ и арахидоновая кислота могут иметь в качестве общего предшественника алкиларахидоноилглицерофосфохолин, а также то, что ФАТ стимулирует высвобождение активных метаболитов арахидоновой кислоты [42, 73, 86].

Биологическое действие ФАТ реализуется после его связывания с рецеп-

тором. Имеются данные о существовании двух функционально различных рецепторов с неодинаковым сродством к ФАТ [62]. Исследования Hwang San Bao [41] свидетельствуют о наличии межвидовых различий в строении рецептора для ФАТ и его ближайшего окружения на мембране. Связывание ФАТ с рецептором в тромбоцитах приводит к быстрому (в течение нескольких секунд) поступлению ионов кальция внутрь клетки. При этом ионы кальция активируют фосфолипазу С, катализирующую расщепление фосфатидилинозитола. инозитолтрифосфат резко увеличивает содержание кальция в клетке, мобилизуя его из внутриклеточных запасов [44]. Ионы кальция запускают также целую серию реакций — активируют фосфолипазу А₂ с образованием метаболитов арахидоновой кислоты [21, 47, 62], стимулируют липолиз и гликогенолиз, способствуют высвобождению различных биологически активных соединений из клетки [12, 76]. Следует отметить, что под влиянием ФАТ механизм активации различных клеток примерно одинаков, но ответная реакция на воздействие неоднозначна. Основной реакцией тромбоцитов на действие ФАТ является агрегация, нейтрофилов — агрегация, дегрануляция, хемотаксис, респираторный взрыв; реакцией эндотелиальных и гладкомышечных клеток служит сокращение [23, 26, 53, 60, 63, 65]. Схематично механизм действия ФАТ отражен на рис. 3.

Заслуживает особого внимания то, что продуцируемый полиморфно-ядерными лейкоцитами ФАТ в большинстве своем не секретируется, а метабо-

лизируется самой клеткой [54]. Об этом свидетельствует тот факт, что вне зависимости от вызывающего активацию нейтрофилов сигнала (ионофор А 23187, зимозан, хемотаксический пептид), способа выделения (фиколл, перколл) или видовой принадлежности (человек, кролик) в надосадочной жидкости активированных полиморфно-ядерных лейкоцитов выделялось значительно меньшее количество ФАТ, чем в лизатах клеток. Это соотношение не нарушалось с начала и до окончания продукции ФАТ. В нестимулированных клетках ФАТ не определяется.

ФАТ находится в различном взаимоотношении с другими биологически активными агентами. Так, он инициирует образование простагландинов [26, 86], лейкотриенов [6], инозитолфосфатов [56], активатора плазминогена [27], интерлейкина [12], маломолекулы диальдегида [67]. Метаболиты арахидоновой кислоты и С-реактивный белок в свою очередь способствуют высвобождению ФАТ [26, 45]. Некоторые агонисты высвобождают ФАТ, другие (тромбин, гистамин, брадикинин) лишь увеличивают синтез ФАТ, причем он остается связанным с мембраной [12]. ФАТ ингибирует действие ренина [70], аденилатциклазы [5], эстерификацию холестерина [8], может быть блокатором β -адренорецепторов [28]. Существуют и ингибиторы ФАТ, по некоторым данным [11], их число достигает 50. В настоящее время уже синтезированы или выделены несколько подобных соединений: СУ-3988 [81], ВN-52021 [36, 46]. Из лекарственных веществ ингибирующим свойством обладают стероидные гормоны [20, 59], теофиллин, кетотифен [59], блокаторы кальциевых каналов (дитиазем, галлопанил, верапамил) [31, 46] и кальмодулин [9].

Значительное число экспериментальных данных свидетельствует об участии ФАТ в патогенезе ряда заболеваний. Клинических же наблюдений очень мало, они разрозненны и противоречивы. Практически нет сведений о значении ФАТ у детей: в доступной литературе встретились только две работы [3, 57].

Больше всего фактов получено при изучении аллергических заболеваний. Так, Morley [59], основываясь на выраженном бронхоконстрикторном дей-

ствии ФАТ, выдвинул гипотезу о том, что ФАТ играет центральную роль в возникновении и обострении бронхиальной астмы. ФАТ обладает значительным противовоспалительным потенциалом и, возможно, способствует повышенной секреции слизи, что ведет к бронхиальной обструкции. Имеются данные о том, что именно ФАТ в большей мере, чем лейкотриены, ответствен за развитие бронхиальной астмы [69]. Эти же авторы сопоставили эффект целого ряда медиаторов аллергии (гистамин, ацетилхолин, брадикинин, простагландин $F_{2\alpha}$, тромбоксан A_2 , лейкотриены С, D, E, F, В) и ФАТ. Оказалось, что ФАТ оказывает наиболее широкое воздействие на органы-мишени (гладкие мышцы дыхательных путей, эндотелий сосудов, нейтрофилы, тромбоциты, эозинофилы) и секрецию слизи.

О причастности ФАТ к другим заболеваниям легких свидетельствует его обнаружение в мокроте больных бронхитом и эмфиземой [33].

Содержание ФАТ в крови исследовали при приобретенной первичной холодовой крапивнице [32]. Холодовая нагрузка заключалась в погружении в холодную воду на 3 мин с последующим взятием крови. У больных с тяжелыми проявлениями аллергии методом измерения агрегации тромбоцитов установлено значительное повышение уровня ФАТ в крови. Считают, что индукция холодовой аллергии связана с выходом ФАТ в кровяное русло.

Участие ФАТ в патогенезе почечных заболеваний подтверждают данные о том, что его содержание в моче больных волчаночным нефритом увеличено в 5 раз [74]. Отсутствие ФАТ в крови взрослых больных с хронической почечной недостаточностью (ХПН) показывает, что это соединение продуцируется и почечной тканью [17]. Аналогичные данные обнаружены у детей с ХПН: не было выявлено даже следовых количеств ФАТ в плазме крови [3]. Вместе с тем у детей с нефротическим синдромом уровень ФАТ в плазме крови достоверно превышал норму ($0,57 \pm 0,16$ нг/мл по сравнению с $0,24 \pm 0,07$ нг/мл).

Некоторыми исследователями [43, 51] установлено увеличение концентрации ФАТ в плазме крови больных с тромбоцитопенической пурпурой. Отмечено, что повышение содержания

ФАТ в плазме крови сопровождается ухудшением клинической картины заболевания. При улучшении состояния больных содержание ФАТ снижалось [40].

Моппенс и соавт. [57] исследовали роль ФАТ у детей с гемолитико-уремическим синдромом. Оказалось, что плазма 6 из 11 больных детей вызывает агрегацию гомологичных тромбоцитов. Авторы считают, что отсутствие эффекта у 5 детей обусловлено несовершенством методики.

Несколько работ посвящено значению ФАТ при лейкозах. Так, в плазме крови 2 из 40 больных острыми и хроническими лимфоидными и миелоидными лейкозами был обнаружен ФАТ. У этих больных диагностирован синдром внутрисосудистого диссеминированного свертывания. Высказывается мнение, что способность к синтезу ФАТ у больных лейкозами находится в обратно пропорциональной зависимости от зрелости клеток [29].

Существуют сведения о содержании ФАТ в крови больных циррозом печени. Так, у всех больных независимо от этиологии заболевания уровень ФАТ в крови достоверно превышал таковой в норме. Максимальная величина ФАТ обнаружена у больных декомпенсированным циррозом ($1,78 \pm 0,62$ нг/мл); в 2 раза меньший уровень ($0,79 \pm 0,21$ нг/мл) выявлен при компенсированном циррозе. Однако и эта величина достоверно выше нормы ($0,2 \pm 0,04$ нг/мл) [18].

Единичные работы посвящены исследованию ФАТ при таких заболеваниях, как псориаз [5], диабетическая ретинопатия [12], болезнь о. Танжер [72].

Определение ФАТ в тканях и биологических жидкостях сопряжено с большими трудностями вследствие ничтожно малого его содержания и довольно быстрого разрушения. В настоящее время применяются методы ТСХ, ВЭЖХ, газовой хроматографии — масс-спектрометрии, агрегации тромбоцитов [25, 37, 39, 44, 57, 64, 82, 83, 87]. Наиболее оптимальным для определения ФАТ (в пределах 20—50 нг) в биологическом материале является исследование с использованием ВЭЖХ в линейном градиенте водного ацетонитрила, содержащего 1 ммоль метансульфоново́й кислоты, с предварительной очисткой на амберли-

те ХАД-2, где выход различных молекулярных типов (C_{14} , C_{16} , C_{18}) ФАТ соответствует более чем 95 % [75]. Возможность получения дополнительной информации о ФАТ, особенно в биологических жидкостях, связывают с таким методом, как спектроскопия отрицательных ионов [76].

Таким образом, данные литературы свидетельствуют о том, что ФАТ — мощный липидный медиатор, обладающий широким спектром действия. Это определяет его участие в патогенезе многих аллергических и воспалительных заболеваний. Данный факт и сведения, накопленные о ФАТ в клинике, побуждают к интенсивному и целенаправленному его изучению.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гордеев К. Ю., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П. // Биоорг. химия. — 1984. — Т. 10, № 12. — С. 1589—1605.
2. Куликов В. И., Муза Г. И., Бергelson Л. Д. // Биохимия. — 1984. — Т. 49, № 9. — С. 1449—1455.
3. Светлов С. И., Серебряный В. Л. // Актуальные проблемы гомеостаза в клинической практике. — М., 1987. — С. 98—98.
4. Albert A., Snyder F. // Biochim. biophys. Acta. — 1984. — Vol. 796, N 1. — P. 92—101.
5. Avdonin P., Svitina-Ulitina J., Kulikov V. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1985. — Vol. 131, N 1. — P. 307—313.
6. Beabien B., Tippius J., Morris H. // Ibid. — 1984. — Vol. 125, N 1. — P. 105—108.
7. Benveniste J., Henson P., Cochrane C. // J. exp. Med. — 1972. — Vol. 136. — P. 1356—1377.
8. Bergelson L., Kulikov V., Musiy G. // FEBS Lett. — 1985. — Vol. 190, N 2. — P. 305—306.
9. Billah M., Siegel M. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1984. — Vol. 118. — P. 629—635.
10. Billah M., DiRehro C., Bab C. et al. // Prostaglandins. — 1985. — Vol. 30, N 5. — P. 841—851.
11. Braque J. // Haemostasis. — 1986. — Vol. 5, Suppl. — P. 16—18.
12. Bussolino F., Biffignandi P., Arese P. // Acta haemat. — 1986. — Vol. 75. — P. 129—140.
13. Buxton D., Hanahan D., Olson M. // J. biol. Chem. — 1984. — Vol. 259. — P. 13758—13761.
14. Caffaneo M., Canciani M., Manucci P. // Thrombos. Haemostas. — 1985. — Vol. 53, N 2. — P. 221—224.
15. Camussi G., Brentjeus J. // Clin. Immunol. Immunopath. — 1985. — Vol. 34, N 3. — P. 333—344.
16. Camussi G. // Kidney int. — 1986. — Vol. 29, N 2. — P. 469—477.
17. Caramelo C., Fernandes-Gallardo S., Marincao D. et al. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1984. — Vol. 120. — P. 789—796.

18. *Caramelo C., Fernandes-Gallardo S., Santos J. et al.* // *Europ. J. clin. Invest.* — 1987. — Vol. 17, N 1. — P. 7—11.
19. *Chignard M., Le Couedic B., Vergaflig B., Benveniste J.* // *Brit. J. Haemat.* — 1980. — Vol. 46. — P. 455—464.
20. *Chignard M., Le Couedic B., Andersson P., Brange C.* // *Int. Arch. Allergy.* — 1986. — Vol. 81, N 2. — P. 184—185.
21. *Chilton F., O'Flaherty J., Walsh C. et al.* // *J. biol. Chem.* — 1982. — Vol. 257. — P. 5402—5407.
22. *Clay K., Murphy R., Andres J. et al.* // *Biochem. biophys. Res. Commun.* — 1984. — Vol. 121, N 3. — P. 815—825.
23. *Coeffier E., Niniy E., Le Couedic B., Chignard M.* // *J. Haemat.* — 1986. — Vol. 62; N 4. — P. 641—651.
24. *Cox C., Wardlow M., Jorgensen R., Farr R.* // *J. Immunol.* — 1981. — Vol. 127. — P. 46—51.
25. *Croff K., Sturm M., Coddle J. et al.* // *Life Sci.* — 1986. — Vol. 38. — P. 1875—1882.
26. *Dillumieres S., Russo-Marie F., Vargaftig B.* // *Europ. J. Pharmacol.* — 1986. — Vol. 131, N 1. — P. 13—19.
27. *Emeis J., Klufft C.* // *Blood.* — 1985. — Vol. 66, N 1. — P. 86—91.
28. *Feuerstein G., Boyd L., Ezra D., Golgstein R.* // *Amer. J. Physiol.* — 1984. — Vol. 246. — P. 466—471.
29. *Foa R., Bussolino F., Ferrando M. et al.* // *Cancer Res.* — 1985. — Vol. 45. — P. 4483—4485.
30. *Ghezzi E.* // *Boll. Ist. sieroter. Milan.* — 1986. — Vol. 65, N 3. — P. 169—192.
31. *Goldenberg M., Meurer R.* // *Prostaglandins.* — 1984. — Vol. 28. — P. 271—278.
32. *Grandel K., Farr R., Wanderer A.* // *New Engl. J. Med.* — 1985. — Vol. 313, N 7. — P. 405—409.
33. *Grandel K., Wardlow W., Farr R.* // *Fed. Proc.* — 1985. — Vol. 44. — P. 184—187.
34. *Hanahan D., Demopoulos C., Liehr J., Pinkard R.* // *J. biol. Chem.* — 1980. — Vol. 255. — P. 5514—5516.
35. *Hanahan D.* // *Ann. Rev. Biochem.* — 1986. — Vol. 55. — P. 483—509.
36. *Harczy T., Maclot T., Prodelles P. et al.* // *Pharmacol. Res. Commun.* — 1986. — Vol. 18, Suppl. — P. 111—117.
37. *Haroldson P., Clay K., Murphy R.* // *J. Lipid Res.* — 1987. — Vol. 28, N 1. — P. 42—50.
38. *Hoffman D., Truong C., Johnson J.* // *Biochim. biophys. Acta.* — 1986. — Vol. 879. — P. 88—96.
39. *Houltham W., Saunders R.* // *Triangle.* — 1986. — Vol. 25. — P. 97—103.
40. *Hussey C., Hause C., Gottschall J., Anderson T.* // *Thrombos. Res.* — 1986. — Vol. 44, N 3. — P. 355—364.
41. *Hwang S. B., Lam M.-H.* // *Biochem. Pharmacol.* — 1986. — Vol. 35, N 24. — P. 4511—4518.
42. *Kawaqueshi K., Yasuda H.* // *Biochim. biophys. Acta.* — 1986. — Vol. 875, N 3. — P. 525—534.
43. *Kelton J., Moore J., Santoz A., Sheridan D.* // *Ann. inter. Med.* — 1980. — Vol. 101. — P. 589—593.
44. *Kloprogge E., Hasselaar P., Gorter G., Ackerman J.-W.* // *Biochim. biophys. Acta.* — 1986. — Vol. 883. — P. 127—137.
45. *Kohayakawa M., Inone K.* // *Thrombos. Res.* — 1986. — Vol. 41, N 5. — P. 649—657.
46. *Küster L.* // *Ibid.* — Vol. 43, N 4. — P. 425—433.
47. *Lapetina E.* // *J. biol. Chem.* — 1982. — Vol. 257. — P. 7314—7317.
48. *Lee T., Lenihan D., Maione B. et al.* // *Ibid.* — 1984. — Vol. 259. — P. 5526—5530.
49. *Lee T., Malone B., Snyder F.* // *Ibid.* — 1986. — Vol. 261, N 12. — P. 5373—5377.
50. *Levi R., Burkner J., Guo Z.-G. et al.* // *Circulat. Res.* — 1984. — Vol. 54. — P. 117—124.
51. *Lian E., Harkness D., Burnes J. et al.* // *Blood.* — 1979. — Vol. 53. — P. 333—338.
52. *Lin A., Norton D., German R.* // *J. clin. Invest.* — 1982. — Vol. 70. — P. 1058—1065.
53. *Ludwig J., Hoppens C., McManus L. M. et al.* // *Arch. Biochem.* — 1985. — Vol. 241, N 2. — P. 337—347.
54. *Lynch J., Henson P.* // *J. Immunol.* — 1986. — Vol. 137, N 8. — P. 2653—2661.
55. *Mallet A., Cunningham F., Daniel R.* // *J. Chromatogr.* — 1984. — Vol. 309. — P. 160—164.
56. *McIntyre D., Pollock W.* // *Biochem. J.* — 1983. — Vol. 212, N 2. — P. 433—437.
57. *Monnens L., Van De Meer W., Landenhuyzen C. et al.* // *Clin. Nephrol.* — 1985. — Vol. 24, N 3. — P. 135—137.
58. *Morley J., Page C.* // *Int. Arch. Allergy.* — 1985. — Vol. 77, N 1—2. — P. 73—78.
59. *Morley J.* // *Agents a. Actions.* — 1986. — Vol. 19, N 1—2. — P. 100—108.
60. *Mueller H., O'Flaherty J., Wykle R.* // *J. biol. Chem.* — 1984. — Vol. 259, N 23. — P. 14 554—14 559.
61. *Muromatsu T., Totani N., Mangold H.* // *Chem. Phys. Lipids.* — 1981. — Vol. 29, N 2. — P. 121—127.
62. *Naccache P., Molski M., Volpi M. et al.* // *J. Leucocyt. Biol.* — 1986. — Vol. 40, N 5. — P. 533—548.
63. *Nakayama R., Oda M., Satouchi K., Saito K.* // *Biochem. biophys. Res. Commun.* — 1985. — Vol. 127. — P. 629—634.
64. *Nishimura J., Ishibushi T., Imai Y. et al.* // *Lipids.* — 1984. — Vol. 19, N 12. — P. 907—910.
65. *Oda M., Satouchi K., Saito K., Yasuda K.* // *Lipid Res.* — 1985. — Vol. 26, N 11. — P. 1294—1299.
66. *Okaysu T., Hoshii T., Slyama K. et al.* // *Biochim. biophys. Acta.* — 1986. — Vol. 876, N 1. — P. 58—64.
67. *Osterman G., Block H.-H., Till U.* // *Ibid.* — 1984. — Vol. 43, N 8—9. — P. 323—326.
68. *Page C., Paul W., Archer C., McDonald D.* // *PAF and Structurally Related Lipids.* — Amsterdam, 1983. — P. 357—366.
69. *Page C., Morley J.* // *Pharmacol. Res. Commun.* — 1986. — Vol. 18, Suppl. — P. 217—237.
70. *Pfeilschifter J., Kurtz A., Bauer C.* // *Biochem. biophys. Res. Commun.* — 1985. — Vol. 127, N 3. — P. 903—910.
71. *Pinckard R., McManus L., Hanahan D.* // *Advanc. Inflamm. Res.* — 1982. — Vol. 4. — P. 147—180.
72. *Pritchard P., Chonn A., Yeung C.* // *Blood.* — 1985. — Vol. 66, N 6. — P. 1476—1478.

73. Saito K., Hirai A., Tamura Y., Yoshida S. // Prostagl. Leucotr. Med. — 1985. — Vol. 181, N 3. — P. 271—286.
74. Sanchez-Crespo M., Inarrea P., Alvarez V. et al. // Amer. J. Physiol. — 1983. — Vol. 244, N 6. — P. 706—711.
75. Salari H. // J. Chromatogr. — 1986. — Vol. 382. — P. 89—98.
76. Schlondorf D., Neuwirth R. // Amer. J. Physiol. — 1986. — Vol. 251. — P. 1—11.
77. Schneider E., Haest C., Deutlike B. // FEBS Lett. — 1986. — Vol. 198, N 2. — P. 311—314.
78. Snyder F. // Med. Res. Rev. — 1985. — Vol. 5. — P. 104—140.
79. Snyder F., Blank M., Johnson D. et al. // Pharmacol. Res. Commun. — 1986. — Vol. 18, Suppl. — P. 33—41.
80. Stewart A., Piper P. // Ibid. — P. 163—172.
81. Terashita Z., Imura Y., Nishikawa K. // Biochem. Pharmacol. — 1985. — Vol. 34, N 9. — P. 1491—1495.
82. Vargaftig B., Benveniste J. // Trends Pharm. Sci. — 1983. — Vol. 4, N 8. — P. 341—343.
83. Wardlow W. // J. Chromatogr. — 1985. — Vol. 342, N 2. — P. 380—384.
84. Wardlow W., Mogbel A., Cronwell O., Kay A. // J. clin. Invest. — 1986. — Vol. 78, N 6. — P. 1701—1706.
85. Wasserman S. // J. Allergy. — 1983. — Vol. 72, N 2. — P. 101—115.
86. Weisman S., Felsen D., Vaughan E. // J. Pharmacol. exp. Ther. — 1985. — Vol. 235, N 1. — P. 10—15.
87. Yasuda K., Satouchi K., Saito K. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1986. — Vol. 138, N 3. — P. 1231—1236.
88. Zimmerman G., McIntyre T., Prescott S. // Circulation. — 1985. — Vol. 72, N 4. — P. 718—728.

Поступила 01.12.87

УДК 616.1-055.5/7-092:612.6.052:575.113

А. П. Сургучев

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ЧЕЛОВЕКА, МЕТОДЫ ЕГО ВЫЯВЛЕНИЯ И СВЯЗЬ С СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ (ОБЗОР)

Институт экспериментальной кардиологии ВКНЦ АМН СССР, Москва

С конца 70-х годов XX века наблюдается неуклонный рост исследований, направленных на выяснение структурных особенностей и деталей функционирования генома человека [1, 2]. Одной из причин этого является совершенствование методов работы с генетическим материалом — ДНК, благодаря чему стал возможен переход от детального анализа генов вирусов и бактерий к характеристике человеческого генома. Современные методы молекулярной биологии, молекулярной генетики и генной инженерии позволяют клонировать индивидуальные гены человека, определять нуклеотидную последовательность их структурных и регуляторных участков, выявлять нуклеотидные замены в мутантных генах и т. п.

Развитие методологии работы с клонированными генами позволило достичь значительного прогресса в изучении наследственных болезней человека. В частности, появилась возможность перейти от систематического анализа структуры генов, ответственных за развитие моногенных заболеваний (гемоглобинопатии, мышечная дистрофия Дюшенна и др.), к анализу с этих же позиций полигенных наслед-

ственных заболеваний, в возникновении и течении которых важную роль играет комбинация из нескольких, не всегда идентифицированных генов. Кроме того, разработан простой метод анализа полиморфизма индивидуальных генов человека (метод RFLP — restriction fragments length polymorphism) с использованием молекулярных зондов (чаще всего фрагментов этих генов), который может применяться для скрининга населения с целью выявления полиморфных форм гена.

В настоящем обзоре рассматриваются подходы к выявлению полиморфизма генов человека, а также возможности использования полученных при этом результатов для анализа некоторых сердечно-сосудистых заболеваний.

Полиморфизм ДНК человека. Характерной чертой генома человека является его полиморфизм. По расчетам некоторых специалистов [50], частота структурных вариаций в двух родительских последовательностях ДНК составляет около 1:200 нуклеотидов. Многие из таких вариаций обусловлены заменами одиночных оснований, небольшими делециями или вставка-

ми, различием в количестве копий tandemно повторяющихся последовательностей. В результате таких изменений в первичной структуре ДНК часто нарушается участок распознавания рестрикционными эндонуклеазами или, наоборот, возникает новый участок распознавания. В таком случае возникает изменение длины рестрикционных фрагментов ДНК, которое выявляется при электрофорезе ферментативного гидролизата суммарной ДНК с последующим переносом фрагментов на нитроцеллюлозную бумагу (или иной матрикс) и гибридизацией с меченым зондом (метод RFLP). Выявление полиморфизма генов человека получило широкое распространение в недавнее время благодаря тому, что за последние годы число клонированных генов человека значительно увеличилось (в настоящий момент оно превышает 1000) и продолжает стремительно расти. Это означает, что для более чем 1000 генов существуют молекулярные пробы, специфичные, как правило, к разным участкам генов. Другой особенностью, облегчающей использование метода RFLP, является то, что для его проведения достаточно ДНК, выделенной из 10 мл крови, а значит, не существует принципиальных сложностей в получении материала для выделения и анализа ДНК.

Каким же образом можно исследовать роль генетического фактора в развитии полигенных заболеваний, для которых установлено существование документированной наследственной предрасположенности, например ишемической болезни сердца (ИБС) или атеросклероза? Совершенно очевидно, что бессистемный поиск требует слишком много времени и усилий, если учесть размеры человеческого генома (согласно современным представлениям, количество генов человека достигает 100 000—200 000, а общее количество пар нуклеотидов в геноме составляет $3 \cdot 10^9$). Поэтому следует идти более рациональным путем: на начальном этапе выбрать ограниченное количество генов, которые, по существующим представлениям, могут играть первостепенную роль в развитии данной болезни, и провести их анализ [24]. Для сердечно-сосудистых заболеваний можно выделить несколько групп таких генов:

1) к числу генов, определяющих специфику липидного метаболизма в организме человека, относятся гены, кодирующие образование апобелков, входящих в состав липопротеидов, рецепторов липопротеидных частиц, а также ферментов биосинтеза холестерина и триглицеридов [7, 55]. Мутационные изменения в них могут, в частности, привести к нарушению нормального метаболизма липидов, отложению последних в сосудистой стенке и развитию атеросклероза; 2) предрасположенность к тромбозам может быть связана с мутациями в генах, кодирующих белковые факторы свертываемости крови; 3) гены, контролирующие ферменты биосинтеза простагландинов, выполняют важную роль в процессе агрегации тромбоцитов; 4) группа генов, кодирующих структурные и сократительные белки, например актина и коллагены, определяет специфику морфологии сердца и сосудов.

В последние годы возрастает число сообщений о полиморфизме генов апобелков, входящих в состав липопротеидных частиц, появляются работы о полиморфизме генов рецепторов липопротеидов, фибриногена и т. д. Ниже приводится краткий обзор этих данных, в котором отмечены в основном те случаи полиморфизма, для которых установлена корреляция с развитием какого-либо патологического состояния.

Апобелки, входящие в состав липопротеидов ApoB. Для гена apoB, имеющего огромную длину (размер кДНК около 18 000 пар нуклеотидов) и состоящего из 29 экзонов [7, 9, 55], описано большое количество полиморфных форм, причем некоторые из них коррелируют с частотой возникновения того или иного заболевания. Полиморфные формы apoB представляют особый интерес в связи с тем, что этот белок выполняет центральную роль в метаболизме и транспорте триглицеридов и холестерина и является важнейшим структурным элементом хиломикронов, липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП) и липопротеидов низкой плотности (ЛПНП). Примерно 75 % холестерина плазмы переносится при участии этого белка, который, кроме того, является лигандом для рецепторов ЛПНП. ApoB — один из наиболее крупных белков человека, ко-

торый содержит большое количество функциональных доменов. Очевидно, что мутации в кодирующей части гена apoB могут влиять на взаимодействие ЛПНП с рецепторами, макрофагами, эндотелиальными клетками, факторами свертываемости крови, компонентами иммунной системы, вызывая атерогенные изменения.

При использовании рестриктазы XbaI обнаружен полиморфный участок в кодирующей части гена apoB [32]. В ДНК гомозиготных (генотип X1X1) и гетерозиготных (генотип X1X2) больных может присутствовать участок распознавания этой рестриктазой. У таких пациентов наблюдается повышенный (в среднем на 36 %) уровень триглицеридов в крови по сравнению с таковым у гомозиготных (генотип X2X2) больных, в гене apoB которых такой участок распознавания отсутствует. Установлено, что соотношение аллелей X1 и X2 равно 0,52 : 0,48, а соотношение различных генотипов у больных (при обследовании 83 мужчин среднего возраста) составило 27 X1X1 : 33 X1X2 : 23 X2X2. У обследованных с генотипами X1X1 и X1X2 содержание белка apoB оказалось на 10 % выше, чем у лиц с генотипом X2X2. Проведенный анализ показывает, что наследование полиморфного участка носит доминантный характер, а присутствие названного участка распознавания рестриктазой XbaI является фактором риска развития атеросклероза. По-видимому, эффект полиморфизма проявляется на уровне метаболизма богатых триглицеридами ЛПОНП, а не на уровне ЛПНП, богатых эфирами холестерина.

В другой работе, посвященной выявлению полиморфизма гена apoB, сделана попытка найти корреляцию между полиморфными формами этого гена и заболеванием инфарктом миокарда [22]. При использовании рестриктаз XbaI, MspI, EcoRI были выявлены следующие аллели: соответственно X1, X2 и X3; R1 и R2; ID1, ID2 и т. д. Систематический анализ присутствия этих аллелей у 84 больных, перенесших инфаркт миокарда, и у такого же количества лиц контрольной группы свидетельствует о том, что у больных аллели X1, R1 и ID1 встречаются значительно чаще, чем в контрольной группе, для которой наиболее обычными являются аллели X2,

R2 и ID2. Однако корреляции между частотой встречаемости определенных аллелей и содержанием в крови холестерина, входящего в состав ЛПНП, или apoB, не выявлено. Функциональная роль обнаруженных аллелей остается не вполне ясной, тем не менее из этих результатов очевидно, что описанные генетические вариации в локусе apoB могут быть использованы для выявления нового фактора риска развития инфаркта миокарда.

В работе [49] проведено изучение полиморфизма гена apoB, выявляемого с помощью тех же рестриктаз (XbaI, EcoRI и MspI) у пациентов с повышенным содержанием липидов в крови (гиперлипидемия). Частота встречаемости у больных аллелей, выявляемых с помощью рестриктазы XbaI, существенно отличалась от таковой в контрольной группе. Так, например, у индивидуумов, гомозиготных по аллели X2, уровень холестерина в сыворотке оказался выше (5,71 ммоль/л), чем у лиц, гомозиготных по аллели X1 (4,81 ммоль/л). В то же время индивидуумы с генотипом X1X2 обладали промежуточным уровнем холестерина в сыворотке (5,30 ммоль/л). Кроме того, у индивидуумов с разными XbaI генотипами наблюдались разные концентрации триглицеридов в сыворотке. Выявленные в результате такого анализа структурные вариации гена apoB коррелируют с концентрациями холестерина и триглицеридов в сыворотке не только у больных с третьим типом гиперлипидемии, но и у лиц контрольной группы.

В то же время различий в частоте встречаемости аллелей, выявляемых с помощью рестриктаз MspI и EcoRI, между больными с гиперлипидемией и лицами контрольной группы не обнаружено. Анализ нуклеотидной последовательности полиморфного участка, распознаваемого рестриктазой XbaI, показал, что мутационное изменение локализовано в кодирующей части гена — экзоне, однако оно не вызывает аминокислотных замен в белковом продукте гена [8]. Вполне возможно, что XbaI полиморфизм ассоциируется с изменениями в других участках ДНК вблизи от гена apoB, затрагивая, в частности, промоторную область гена, что сопровождается изменениями в эффективности экспрессии гена. В настоящее время описано еще более

десятка различных полиморфных сайтов в гене апоВ или прилегающих участках [6, 11, 20, 21, 30, 33, 41—45], однако функциональная значимость большинства из них остается пока неизвестной.

Существуют гипотетические объяснения механизма проявления некоторых полиморфных форм гена апоВ. Так, некоторые аллели этого гена [34] содержат минисателлитные фрагменты большей длины, присутствие которых коррелирует с частотой инфаркта миокарда. Такой минисателлитный фрагмент располагается в непосредственной близости (72 пары нуклеотидов) от второго участка полиаденилирования, и изменение этого участка может оказывать влияние на полиаденилирование мРНК, а через это воздействовать на стабильность мРНК гена апоВ. Минисателлиты, дающие начало полиморфизму гена апоВ, состоят из tandemных повторов двух структурно сходных последовательностей нуклеотидов с высоким содержанием А и Т: х (АТААТТАААТАТТТТ) и у (АТААТТААААТАТТТТ). Обычно эти последовательности повторяются в порядке х — у. Вариации в этом участке гена могут быть связаны либо с вариабельным числом повторов х — у, в результате чего длина гена изменяется (в пределах от нескольких единиц до 300 нуклеотидов), либо с появлением в их составе нуклеотидных замен (С или G вместо А) [34].

Результаты, полученные при характеристике гипервариабельного участка на 3' гена апоВ [30], несколько отличаются от результатов лаборатории Бреслова [34]. По данным Нотта, такой участок общей длиной около 550 пар нуклеотидов располагается на расстоянии 181 пары нуклеотидов от участка присоединения поли-А и представлен богатыми АТ tandemными повторами длиной 11—16 пар нуклеотидов. Вариабельность по этому участку выявляется при обработке ДНК рестриктазами MspI, BamHI и EcoRI [30].

Недавно разработанная технология получения моноклональных антител позволяет использовать их для выявления индивидуальных вариаций молекулы апоВ, обусловленных различиями в аминокислотной последовательности в некоторых участках белковой молекулы, что служит дополнительной

информацией по отношению к той, которая может быть получена при анализе генетических вариаций с помощью метода RFLP. Представляется весьма перспективным сопоставление данных, полученных при анализе гена апоВ, и результатов характеристики его белкового продукта с помощью моноклональных антител.

Следует отметить, что существует ряд нарушений метаболизма липопротеидов (например, абетаалипопротеинемия или гомозиготная гипобетаалипопротеинемия), в основе которых, видимо, лежат некоторые генетические дефекты в гене апоВ. Однако механизм таких изменений остается неизвестным [7]. Описаны заболевания, для которых характерны нормальная абсорбция жиров и способность продуцировать хиломикроны, однако холестерин в составе ЛПНП у таких пациентов практически отсутствует. Можно полагать, что у этих больных происходит нормальное образование одной из форм апоВ (В-48), но нарушен синтез другой его формы (В-100). Исходя из изложенного, можно сделать вывод, что синтез В-48 и В-100 находится под независимым генетическим контролем [7].

АпоА-1. Ген АпоА-1 содержит 3 интрона и кодирует белок с молекулярной массой около 28 000, являющийся основным компонентом липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) [7, 55]. Существует мнение, что ЛПВП, содержащие апоВ, участвуют в отложении холестерина в стенке артерий, в то время как ЛПВП, основным структурным компонентом которых является апоА-1, выполняют противоположную функцию, а именно — осуществляют отток холестерина от мест его отложения в сосудистой стенке.

Популяционные исследования апоА-1 позволили установить, что в I случае из 200—500 обнаруживается гетерозиготный индивидуум, имеющий нормальную структурную аллель апоА-1, в то время как вторая аллель контролирует белковый продукт с избыточным кислым или основным зарядом [7].

При анализе белка апоА-1 методом изоэлектрической фокусировки выявлено по крайней мере 11 изоформ, для многих из которых установлены аминокислотные замены. Установлено, какие генетические формы этого бел-

ка коррелируют с пониженным уровнем ЛПВП, а какие теряют способность активировать лецитинхолестеринацилтрансферазу [7].

Данные о полиморфизме гена апоА-I также довольно многочисленны [7, 27, 55], однако лишь для небольшого числа полиморфных форм этого гена приводятся сведения об их связи с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Так, например, в работе [40] при использовании рестриктазы PstI обнаружен полиморфный участок, расположенный по направлению к 3'-концу от структурной части гена, в области между генами апоА-I и апоС-III. В присутствии такого участка, по данным Саузерн-блотинга, при электрофорезе обнаруживается зона размером 2,2 тыс. пар нуклеотидов (т. п. н.), а в случае его отсутствия — размером 3,3 т. п. н. Частота встречаемости зоны размером 3,3 т. п. н. оказалась существенно выше в группе больных семейной гипоальфалиппротеинемией (8 случаев из 12), а также ишемической болезнью сердца (28 случаев из 88) по сравнению с таковой в контрольной группе (5 случаев из 123). Эти и некоторые другие данные позволили сделать вывод о том, что PstI-полиморфизм в прилегающих к гену апоА-I участке является фактором риска развития семейной гипоальфалиппротеинемии и коронарной болезни в раннем возрасте.

Другой случай полиморфизма гена апоА-I выявлен при использовании рестриктазы SstI [46]. Обработка этой нуклеазой ДНК индивидуумов контрольной группы вызывает образование фрагментов размерами 5,7 и 4,2 т. п. н. В то же время у больных с гипертриглицеридемией четвертого или пятого типа с высокой частотой выявляется дополнительная зона размером 3,2 т. п. н. Вариабельность участка распознавания рестриктазой SstI может быть связана с точечной мутацией либо с делецией или со вставкой фрагмента ДНК, в результате чего создается новый сайт распознавания. Многократное увеличение частоты встречаемости мутантной аллели у больных с гипертриглицеридемией указывает на то, что полиморфный фрагмент гена может быть либо этиологическим фактором, либо маркером заболевания.

В работе [29] сообщается о полиморфизме гена апоА-1, возникшем в результате вставки размером 6,5 т. п. н. в кодирующую область гена. Такого рода полиморфная форма встречается с высокой частотой у больных атеросклерозом, развивающимся в раннем возрасте.

Полиморфизм гена апоА-1, обусловленный делецией размером около 300 нуклеотидов, выявляется при использовании рестриктазы AраI и некоторых других. Делетируемый фрагмент располагается по направлению к 5'-концу гена [17].

В некоторых работах сообщается о полиморфизме не для индивидуального гена, а для кластера сцепленных генов. Так, с помощью рестриктаз ТаqI и AваI выявлен полиморфизм для генов апоА-1-СIII-AIV, которые локализованы на длинном плече хромосомы [11, 10]. Полиморфизм в этом кластере обнаружен и при использовании рестриктазы DraI [15].

ApoA-IV. Белок апоА-IV входит в состав ЛПВП и богатых триглицеридами липопротеидных частиц. Он выполняет роль активатора лецитинхолестеринацилтрансферазы [55]. Возможно, что этот белок участвует в обратном транспорте холестерина. Для апоА-IV известно несколько генетических вариантов [28, 38]: наряду с преобладающей формой с изоэлектрической точкой 5,5 имеются еще две редкие формы с более основными свойствами. Частота встречаемости аллели, контролирующей образование обычной формы, составляет 92,5%. В гене апоА-IV присутствует также полиморфный участок распознавания рестриктазой BglII [38]. В результате при обработке этим ферментом образуются фрагменты ДНК длиной 5,8 или 6,4 т. п. н. Связь между встречаемостью этих аллелей и предрасположенностью к каким-либо сердечно-сосудистым заболеваниям пока не описана [38].

ApoC-II. АпоС-II входит в состав ЛПВП и ЛПОНП, являясь, кроме того, кофактором липопротеинлипазы [7]. Полиморфные формы этого гена обнаруживаются при обработке рестриктазой AваII. Сегрегация этого маркера происходит в соответствии с кодоминантным механизмом [31].

Ген апоС-III. При обработке ДНК рестриктазой SstI было установлено

существование двух аллелей для гена апоС-III, различающихся по участку, который локализуется в 3'-некодирующей части гена. Одна из аллелей (S2) с высокой частотой встречается у больных ИБС. Обнаружена корреляция между одной из полиморфных аллелей гена апоС-III и частотой встречаемости гипертриглицеридемии [47]. Имеются и другие сообщения о полиморфизме гена апоС-III, которые выявляются, например, при использовании рестриктазы PvuII. Полиморфный участок располагается по направлению к 5'-концу от кодирующей части гена [37].

Другие гены

Фибриноген. Три полиморфные формы описаны для гена фибриногена. Так, при использовании рестриктазы BclI выявлены две аллели, обозначенные В1 и В2. Индивидуумы с генотипом В1В2 имели более низкую концентрацию фибриногена — 2,74 г/л, а с генотипом В2В2 — 3,69 г/л. Столь высокая концентрация фибриногена является фактором риска развития ИБС. Лица, гетерозиготные по этим двум аллелям (генотип В1В2), обладали промежуточным уровнем фибриногена (2,98 г/л) [25]. Анализ полиморфизма гена фибриногена может представлять особый интерес в связи с имеющимися сообщениями о том, что корреляция между содержанием в крови фибриногена и развитием ИБС оказывается более значительной, чем при использовании данных о концентрации холестерина в крови [25, 26].

Полиморфные формы гена обнаруживаются и при использовании других рестриктаз TaqI и AvaII [25, 26]. Во всех случаях полиморфизм обусловлен нуклеотидными заменами, расположенными вне кодирующей части гена. При использовании рестриктазы TaqI выявляется полиморфизм в участке гена, расположенном на расстоянии около 1000 пар нуклеотидов по направлению к 3'-концу от структурной части гена [26]. Вполне вероятно, что обнаруженный с помощью всех 3 рестриктаз полиморфизм, не изменяя структурной части гена фибриногена, влияет на концентрацию фибриногена в крови опосредованно, например, изменяя нуклеотидные последовательности, контролирующие транскрипцию

гена или сплайсинг и процессинг первичного транскрипта. Возможно, что изменения в прилегающих к гену фибриногена участках принципиально сходны с описанными для гена бета-глобина мутациями, нарушающими промоторный участок гена или участки, по которым происходит сплайсинг РНК, в результате таких изменений нуклеотидной последовательности регуляторных участков развивается талассемия. Можно полагать, что изучение генов фибриногена, а также генов, контролирующих процесс фибринолиза и тромбообразования, может прояснить вопросы этиологии тромбоза и ИБС, а также послужить основой для разработки диагностических тестов.

Рецептор ЛПНП

Несмотря на большое количество работ по изучению структуры и особенностей регуляции генов рецепторов ЛПНП, в литературе имеется ограниченное количество сообщений об обнаружении полиморфных форм этого гена. Так, недавно при использовании рестриктазы Bst EI обнаружены две полиморфные аллели рецептора ЛПНП. В результате обработки рестриктазой образуется либо фрагмент ДНК размером 33 т. п. н. (75%), либо два фрагмента размером соответственно 11 и 23 т. п. н. (25%) [48].

В другой публикации по полиморфизму гена рецептора ЛПНП использовали рестриктазу TaqI. С ее помощью удалось выявить также две полиморфные аллели, которые дают начало фрагменту размером 1,7 т. п. н. (69%) или 0,6 т. п. н. (31%) [53].

Белок — переносчик эфиров холестерина

Для этого белка обнаружены две полиморфные формы (А и В), выявляемые с помощью одной рестриктазы — TaqI. Обе формы наследуются по менделевскому типу в соответствии с кодоминантным расщеплением, однако связи с фенотипическими проявлениями пока не установлено [12].

Липопротеинлипаза

Полиморфные формы гена, кодирующего липопротеинлипазу, обнаружены при использовании двух рестрик-

таз: *Vam*HI и *Pvu*II [13]. Имеются предварительные данные о том, что полиморфизм выявляется и при использовании рестриктазы *Hind*III. Сегрегация полиморфной формы происходит в соответствии с кодоминантным механизмом [23].

Фактор VIII

Этот ген кодирует белковый кофактор, выполняющий важную роль в процессе свертывания крови. При обработке ДНК рестриктазой *Xba*I выявляется полиморфный участок, расположенный в интроне 22. Частота встречаемости двух аллелей составляет 59:41. Выявление такого рода полиморфизма служит важным диагностическим признаком, который может быть использован, в частности, для пренатального выявления гемофилии и других нарушений в системе свертываемости крови [54]. Полиморфизм этого гена обнаруживается и при использовании рестриктазы *Msp*I [51].

Супероксиддисмутаза

Полиморфизм гена супероксиддисмутазы проявляется при использовании рестриктазы *Taq*I. Описанные две формы полиморфизма (*Taq*IA и *Taq*IB) с разной частотой обнаруживаются в популяциях европейцев и китайцев [52].

Натрийуретический фактор

Натрийуретический фактор — пептидный гормон, продуцируемый клетками предсердия и контролирующей важнейшие параметры функционирования сердечно-сосудистой системы [3—5]. Этот гормон, в частности, оказывает гипотензивное действие, поэтому высказывались предположения о том, что дефекты в его гене могут вызывать некоторые формы гипертонии. В настоящее время описано несколько полиморфных форм этого гена, выявляемых при обработке рестриктазы *Xho*I, *Taq*I, *Bgl*II и *Bsm*I [35, 36], однако корреляции с развитием каких-либо нарушений в функционировании сердечно-сосудистой системы пока не обнаружено.

Ренин

Для гена ренина, который также участвует в контроле за поддержани-

ем уровня артериального давления, обнаружено несколько полиморфных форм, выявляемых при обработке рестриктазами *Bgl*II, *Bgl*III, *Rsa*I, *Taq*I и *Hind*III [18, 19]. В настоящее время выявляется корреляция между наличием полиморфных форм этого гена и их фенотипическими проявлениями.

Коллаген

Полиморфизм для коллагенового гена выявлен при использовании рестриктазы *Rsa*I, обработка которой приводит к образованию фрагмента ДНК длиной 3,0 т. п. н., а также одного из двух варибельных фрагментов длиной 2,4 или 2,1 т. п. н. [39].

Подводя итог, следует подчеркнуть, что выявление полиморфных форм генов человека, попытки определить их функциональную значимость и связь с развитием тех или иных патологических состояний — новое направление биомедицинских исследований, которое привлекает все большее внимание ученых и врачей-клиницистов, поскольку оно может быть использовано как диагностический признак, позволяющий с высокой долей надежности идентифицировать новый фактор риска, а также выявить и объяснить молекулярный механизм развития заболевания. Очевидно, что по мере накопления новых клонированных генов и появления новых молекулярных проб количество информации о полиморфных формах генов будет неуклонно расти. В результате такого подхода возможен широкий анализ генетических особенностей определенного индивидуума, что позволит с помощью компьютерной обработки полученных результатов быстро оценить факторы риска и установить диагноз заболевания или выработать рекомендации по особенностям образа жизни и лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бочков Н. П. Генетика человека: наследственность и патология. — М., 1978.
2. Бочков Н. П., Захаров А. Ф., Иванов В. И. Медицинская генетика. — М., 1984.
3. Сургучев А. П. // Успехи совр. биол. — 1986. — Т. 102, вып. 2 (5). — С. 238—245.
4. Сургучев А. П., Григорьянц Р. А., Ураков В. Н. // Тер. арх. — 1987. — № 5. — С. 142—144.
5. Сургучев А. П., Фоминых Е. С., Ураков В. Н., Смирнов В. Н. // Докл. АН СССР. — 1986. — Т. 290, № 4. — С. 490—492.

6. Barni N., Talmud P. J., Carlsson P. et al. // Hum. Genet. — 1986. — Vol. 73. — P. 313—319.
7. Breslow J. L. // Amer. Heart J. — 1987. — Vol. 113. — P. 422—427.
8. Carlsson P., Darnfors C., Olofsson S. O. et al. // Gene. — 1986. — Vol. 49. — P. 29—34.
9. Carlsson P., Olofsson S. O., Bonjers G. et al. // Nucl. Acids Res. — 1985. — Vol. 13. — P. 8813—8819.
10. Cohen T., Karathanasis S. K., Kazazian H. H. et al. // Ibid. — 1986. — Vol. 14. — P. 1924.
11. Darnfors C. et al. // Ibid. — P. 7135.
12. Drayna D., Lawn R. // Ibid. — 1987. — Vol. 15. — P. 4698.
13. Fisher K. L., FitzGerald G. A., Lawn R. M. // Ibid. — P. 7657.
14. Frossard P. M., Coleman R. T. // Ibid. — 1986. — Vol. 14. — P. 9223.
15. Frossard P. M., Coleman R. T., Dillan N. A. et al. // Ibid. — P. 8699.
16. Frossard P. M., Coleman R. T., Morrison N. A. // Ibid. — 1987. — Vol. 15. — P. 7656.
17. Frossard P. M., Coleman R. T., Protter A. A. et al. // Ibid. — 1986. — Vol. 14. — P. 8694.
18. Frossard P. M., Gonzalez P. A., Dillan N. A. et al. // Ibid. — P. 6778.
19. Frossard P. M., Gonzalez P. A., Fritz L. C. et al. // Ibid. — P. 4380.
20. Frossard P. M., Gonzalez P. A., Protter A. A. et al. // Ibid. — P. 4372.
21. Frossard P. M., Gonzalez P. A., Protter A. A. et al. // Ibid. — P. 4373.
22. Hegele R. A., Li-Shin Huang, Herbert P. N. et al. // New Engl. J. Med. — 1986. — Vol. 315. — P. 1509—1515.
23. Heinzmann C., Ladias J., Antonakis S. et al. // Nucl. Acids Res. — 1987. — Vol. 15. — P. 6763.
24. Humphries S., Barni N. // Bioassays. — 1985. — Vol. 3. — P. 104—107.
25. Humphries S. E., Cook M., Dubowitz M. et al. // Lancet. — 1987. — Vol. 2. — P. 1452—1454.
26. Humphries S. E., Imam A. M. A., Robbins T. P. et al. // Hum. Genet. — 1986. — Vol. 68. — P. 148—153.
27. Karathanasis S. K., Norum R. A., Zannis V. I., Breslow J. L. // Nature. — 1983. — Vol. 301. — P. 718—720.
28. Karathanasis S. K., Oeltgen P., Haddad I. A., Antonarakis S. E. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1986. — Vol. 83. — P. 8457—8461.
29. Karathanasis S. K., Zannis V. I., Breslow J. L. // Nature. — 1983. — Vol. 305. — P. 823—825.
30. Knott T. J., Wallis S. C., Pease R. J. et al. // Nucl. Acids Res. — 1986. — Vol. 14. — P. 9215—9216.
31. Korneluk R. G., MacLeod H. L., Leblond S. C. et al. // Ibid. — 1987. — Vol. 15. — P. 6769.
32. Law A., Wallis S. C., Powell L. M. et al. // Lancet. — 1986. — Vol. 1. — P. 1301—1302.
33. Li-Shin Huang, Miller D. A., Bruns G. A. P. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1986. — Vol. 83. — P. 644—648.
34. Li-Shin Huang, Breslow J. L. // J. biol. Chem. — 1987. — Vol. 262. — P. 8952—8955.
35. Nemer M., Sirois D., Drouin J. // Nucl. Acids Res. — 1986. — Vol. 14. — P. 8696.
36. Nemer M., Sirois D., Drouin J. // Ibid. — P. 8697.
37. Oeltgen P., Antonarakis S. E., Karathanasis S. K. // Ibid. — P. 5571.
38. Oeltgen P., Antonarakis S. E., Karathanasis S. K. // Ibid. — P. 7138.
39. Ogilvie D. J., Aitchison K., Sykes B. C. // Ibid. — 1987. — Vol. 15. — P. 4699.
40. Ordovas J. M., Schaefer E. J., Salem D. et al. // New Engl. J. Med. — 1986. — Vol. 314. — P. 671—677.
41. Priestly L., Knott T., Wallis S. et al. // Nucl. Acids Res. — 1985. — Vol. 13. — P. 6789.
42. Priestly L., Knott T., Wallis S. et al. // Ibid. — P. 6790.
43. Priestly L., Knott T., Wallis S. et al. // Ibid. — P. 6791.
44. Priestly L., Knott T., Wallis S. et al. // Ibid. — P. 6793.
45. Priestly L., Knott T., Wallis S. et al. // Ibid. — P. 6792.
46. Rees A., Shoulders C. C., Stocks J., Galton D. J. // Lancet. — 1983. — Vol. 1. — P. 444—445.
47. Rees A., Stocks J., Williams L. G. et al. // Atherosclerosis. — 1985. — Vol. 58. — P. 269—275.
48. Sleyn L. T., Pretorius A., Brink P. A., Bester A. J. // Nucl. Acids. — Res. — 1987. — Vol. 15. — P. 4702.
49. Talmud P. J., Barni N., Kessler A. M. et al. // Atherosclerosis. — 1987. — Vol. 67. — P. 81—89.
50. Wainscoat J. S., Thein S. L. // TIBS. — 1985. — Vol. 10. — P. 474—476.
51. Wion K. L., Tuddenham E. G. D., Lawn R. M. // Nucl. Acids Res. — 1986. — Vol. 14. — P. 4535.
52. Xiang K., Cox N. J., Hallewell R. A., Bell G. I. // Ibid. — 1987. — Vol. 15. — P. 7654.
53. Yamakawa K., Okafuji T., Iwamura Y. et al. // Ibid. — P. 7659.
54. Youssoufian H., Phillips D. G., Kazazian H. H. et al. // Ibid. — P. 6312.
55. Zannis V. I., Breslow J. L. // Advanc. hum. Genet. — 1985. — Vol. 14. — P. 125—215.

Получена 07.12.87

HUMAN GENE POLYMORPHISM. THE METHODS OF ITS ANALYSIS AND CORRELATION WITH CARDIOVASCULAR DISEASES

A. P. Surguchov

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

The data on human gene polymorphism in connection to cardiovascular diseases are reviewed. Special attention is paid to the genes encoding apolipoproteins, the components of lipoprotein particles that play an important role in lipid transport and metabolism. Besides, the data on polymorphic forms of genes, encoding LDL-receptor, enzymes, participating in lipid metabolism and other genes relevant to the development of certain pathologies of cardiovascular system are presented. Possibilities of use of the information on the gene polymorphism for diagnostic purposes and for understanding the molecular mechanisms of the disease are discussed.

С. П. Феценко, К. Д. Краснопольская, И. А. Ребрин, С. С. Рудаков

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ КОМПОНЕНТОВ ПРОТЕОГЛИКАНОВЫХ АГРЕГАТОВ ГИАЛИНОВОГО ХРЯЩА ЧЕЛОВЕКА В НОРМЕ И ПРИ СИСТЕМНЫХ КОСТНЫХ ДИСПЛАЗИЯХ

Филиал Института медицинской генетики АМН СССР, Минск

Протеогликаны (ПГ) являются одним из компонентов экстраклеточного матрикса и клеточных мембран и играют важную роль в их структурной организации, в процессах клеточной дифференцировки, регуляции клеточного деления, морфогенезе [4, 12, 16, 27]. Понимание функциональной важности протеогликановых агрегатов (ПГА) в формировании скелета [13] способствует расширению исследований их структуры и метаболизма при системной костной патологии как наследственного, так и приобретенного характера. Данные исследования позволяют полнее представить роль определенных модификаций ПГА в формировании скелета, понять механизмы генетического контроля метаболизма ПГА. Целью настоящей работы явился комплексный структурный анализ компонентов ПГА гиалинового хряща человека в норме и при некоторых формах системных костных дисплазий.

Методика

В работе использовали хондроитиназу АВС, хондроитинсульфат А и С, гиалуроновую кислоту («Seikagaku Kogyo Co.», Япония), ЭДТА, акриламид, бисакриламид, додецилсульфат натрия, кумасси голубой R-250 и G-250, йодацетамид, ϵ -аминокапроновую кислоту, хондроитинсульфат (ХС) («Serva», ФРГ), ТЕМЭД, персульфат аммония («Reanal», ВНР), солянокислый гуанидин, фтористый фенолметилсульфонил («Sigma», США), агарозу («Bio-Rad», США), растворы амфилип («ЛКВ», Швеция), глицин («Nerck», ФРГ), карбазол, γ -глобулолактон, боргидрид натрия, полный адьювант Фрейнда, цетилпиридинимхлорид («Koch Licht», Великобритания), папаин («Fluka», Швейцария). Остальные реактивы отечественного производства квалификации х. ч. и ос. ч.

Методы выделения и очистки компонентов ПГА и коллагеновых белков описаны ранее [7, 10, 11]. Гликозаминогликаны (ГАГ) из раствора протеогликановых (ПГм) и экстрактов мономеров хряща осаждали 1% раствором цетилпиридинимхлорида либо трехкратным объемом этилового спирта после ферментативного гидролиза белка папаином либо β -элиминации цепей ГАГ щелочью [15]. ГАГ из мочи выделяли по методу Ли и соавт. [19].

ИК-спектры ПГм и ГАГ получали с сухих препаратов, смешанных с КВг в соотношении 1:200. Запись спектров поглощения вели на спектрофотометре Hitachi 260-50 (Япония) в области длин волн 1600—600 см^{-1} [2, 3]. Степень сульфатирования ПГм и свободных цепей ГАГ определяли по соотношению пиков абсорбции карбоксигруппы ($A_{1410} \text{ см}^{-1}$) и сульфогруппы ($A_{1210} \text{ см}^{-1}$) [9]. Процентное соотношение хондроитин-4-сульфат (Х4С) / хондроитин-6-сульфат (Х6С) определяли по соотношению пиков абсорбции $A_{850} \text{ см}^{-1} / A_{820} \text{ см}^{-1}$. Ферментативный гидролиз ХС хондроитиназой АВС проводили по методу Саито и соавт. [24] с последующим разделением дисахаридов с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинах целлюлозы F₂₅₄ («Merck», ФРГ) [29]. Хроматограммы окрашивали нитратом серебра [28] либо фотографировали при УФ-освещении. Для определения молекулярной массы ХС использовали электрофорез в 7,5% ПААГ [17]. Электрофоретическое разделение белков проводили по методу Лэммли [18], ПГ — по методу Мак-Дэвита и Муир [20] в модификации Станеску и соавт. [25], ГАГ — по методам Весслера в 0,1 М ацетате бария [30] либо 0,1 н. HCl [31]. Изоэлектрическое фокусирование связывающих белков (СБ) проводили, как описано у Рафли и соавт. [23]. Электрофореграммы белков окрашивали кумасси R-250 [14] или нитратом серебра [32] и сканировали на денситометрической приставке спектрофотометра Gilford-250 (Франция).

Для иммунизации кроликов стержневым белком (СтБ) и СБ использовали общепринятые схемы, иммунохимический анализ проводили по методу [5].

С помощью описанных выше методов исследовали образцы хряща коленного сустава, ребер и крыла подвздошной кости, полученные при выполнении хирургических операций или при аутопсии.

Авторы благодарят сотрудников лечебных учреждений Москвы А. А. Раззокова, А. Ф. Сорокина, И. Н. Волощук, Л. Н. Каск, В. Г. Солониченко, а также сотрудников Минского филиала Института медицинской генетики АМН СССР И. В. Лурье, И. А. Кириллову и А. И. Герасимовича за предоставление материала для исследований и ценные замечания при обсуждении работы.

Контрольный материал был представлен образцами хряща коленного сустава 5 новорожденных (38—40 нед пренатального развития), погибших от родовой травмы или гипоксии, образцами хряща коленного сустава, ребер и крыла подвздошной кости 25-недельного плода (прерывание беременности по медицинским показаниям) и образцами хряща ребер и крыла подвздошной кости детей 3 и 12 лет, погибших от травм. Патологический

Структурный анализ ПГм гиалинового хряща коленного сустава (К), ребер (Р) и крыла подвздошной кости (П) в норме и при системных костных дисплазиях

Группа обследованных	Экстрагируемость						Характеристика тяжелой формы ПГм															
	I. Уроновые кислоты			II. Белок			III. Электрофоретическая подвижность			IV. Содержание белка			V. Содержание КС, %			VI. Содержание Х4С, %			VII. Степень сульфатирования			
	К	Р	П	К	Р	П	К	Р	П	К	Р	П	К	Р	П	К	Р	П	К	Р	П	
Контрольная																						
Плод Новорожденные	4,77 ± 0,52	4,53 4,65	3,73 3,26	3,19 ± 0,14	3,02 3,77	2,84 2,17	0,54 ± 0,01	0,56 0,55	0,64 0,62	11— 14,5			5,9— 7,7			85	50 39	67 66	0,48 ± 0,03	0,30 0,38	0,52	
Дети 3 года		2,77	2,00		3,67	4,05		0,65	0,65		15	18		16,7	11,1		50	48		0,39	0,33	
12 лет		3,12	2,15		3,84	4,66		0,66	0,65		15			16,7			50			0,38		
1-я (детальные остеохондродисплазии)																						
Кампомелический синдром К1	5,11			8,08			0,54			14			6,7			61			0,40			
Кампомелический синдром К2	3,66			4,10			0,51			15			7,1			83			0,41			
Несовершенный остеогенез, тип II	4,74			5,44			0,49			14			5,3			81			0,55			
Танатофорная дисплазия:																						
ТД1	3,57			3,49			0,43			17			6,3			71			0,49			
ТД2	2,90			4,87			0,49			17			6,7			82			0,58			
ТД3	3,68	4,02	4,37	3,07	3,64	3,26	0,55	0,60	0,57							69	68	65	0,46	0,48	0,52	
Ахондрогенез, тип II	1,39	0,42		3,25			0,78	0,78		16	18		8,3	9,1		17			0,77			
Диастрофическая дисплазия	4,88			3,63			0,54												1,05			
2-я (множественная экзостозная хондродисплазия)																						
Э1	1,58		2,30	3,83		4,17	0,57			25		20	16,7		11,1							
Э2	1,83		2,20	3,20		3,85	0,55			35		30	14,3		16,7							
Э3	4,99		2,47	4,95		4,64	0,61			16			10,0			85			0,34			
Э4	4,72		1,69	2,01		4,43	0,60			14			10,0			81			0,36			
3-я (воронкообразные деформации грудной клетки)																						
Изолированная форма:																						
ИВ1		2,28			3,87			0,62			15			25			40			0,31		
ИВ2		2,04			3,92						16			20			43			0,26		
Синдром Марфана		2,33			3,85			0,68			14						40			0,31		
Синдром Элерса—Данло:																						
ЭД1		2,50			3,68			0,78									35			0,31		
ЭД2		2,83			4,48			0,69									37			0,26		
Синдром Видемана—Беквита		3,41			4,60			0,60			16			16,7			65			0,39		

25
Примечание. I и II—экстрагируемость выражена в мг на 1 г сырой массы ткани; III—за единицу принимали подвижность свободных цепей ХС, IV—в % от общей массы ПГм; V—за 100% принято общее содержание гексозаминов; VI—за 100% принято суммарное содержание Х4С и Х6С; VII—в усл. ед.

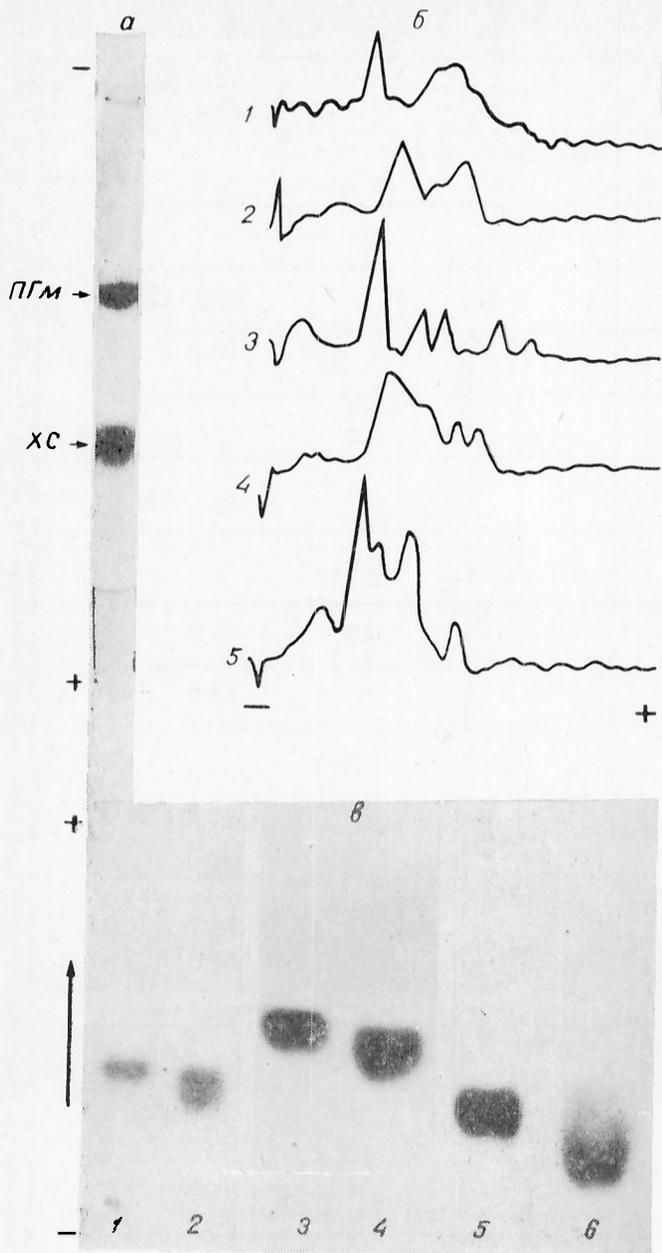


Рис. 1. Электрофоретический анализ ПГМ и ГАГ гиалинового хряща.

a — электрофореграмма ПГМ из фракции Д1 нормального хряща поворожденного; *b* — денситограммы электрофореграмм ПГМ хряща коленного сустава из фракции Д4: 1 — новорожденный, 2 — кампомеллический синдром (КП), 3 — летальный несовершенный остеогенез, 4 и 5 — танатофорная дисплазия (ТД2 и ТД1 соответственно); *в* — электрофореграммы в 0,1 и ИС1 ХС из тяжелой формы ПГМ; 1, 3 — новорожденный, 2 и 4 — ахондрогенез, 5 — 25-недельный плод, *г* — диастрофическая дисплазия (пробы 1—3, 5, 6 — хрящ коленного сустава, 4 — хрящ ребер).

материал при летальных формах остеохондродисплазий (1-я группа) был представлен полученными при аутопсии 3 образцами хряща новорожденных с танатофорной дисплазией, кампомеллической дисплазией (2 образца), летальной формой несовершенного остеогенеза, ахондрогенезом типа II, синдромом коротких ребер — полидактилии (все — 36—39 нед, пренатального развития) и плода с диастрофической дисплазией (25 нед пренатального развития, индуцированное прерывание беременности на основании пренатального диагноза). При множественной экзостозной хондродисплазии (2-я группа) исследовали хрящевые покрытия удаленных во время операций

экзостозов и биоптаты хряща подвздошной кости 4 больных. При воронкообразных деформациях грудной клетки (3-я группа) исследовали реберный хрящ, резецированный при коррекции деформаций грудной клетки у детей с синдромом Элерса — Данло (ЭД1 — тип 1, возраст 7 лет; ЭД2 — тип синдрома не установлен, возраст 4,5 года), синдром Марфана (возраст 13 лет), синдром Видемана — Беквита (возраст 5 лет), изолированной воронкообразной деформацией грудной клетки (ИБ1 — 11 лет, ИБ2 — 10 лет). До момента экстракции компонентов ПГМ хрящ хранили при -20°C . Аутопсийный материал получали не позднее 24 ч после смерти.

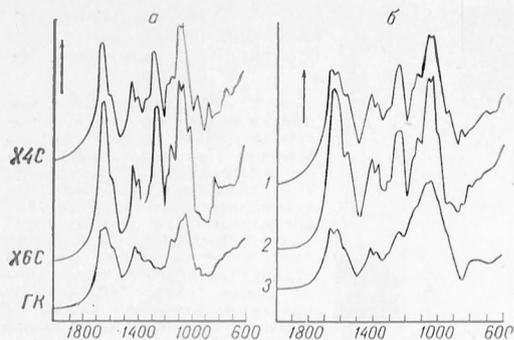


Рис. 2. ИК-спектры препаратов ГАГ и ПГМ. а — стандартные препараты ГАГ, б — ПГМ хряща коленного сустава новорожденного ребенка в норме (1), при ахондрогенезе (2) и дистрофической дисплазии (3). По оси абсцисс — волновые числа, см⁻¹; стрелка указывает повышение абсорбции.

Результаты и обсуждение

Для выделения и очистки компонентов ПГА использовали экстракцию компонентов ПГА из ткани 4М солянокислым гуанидином с последующей реакрацией ПГА, их очисткой и фракционированием с помощью градиентного ультрацентрифугирования в градиенте плотности CsCl [10]. В экстракте гиалинового хряща коленного сустава новорожденных выявлены 2 формы ПГМ: тяжелая — с относительной электрофоретической подвижностью $0,54 \pm 0,01$ (фракция Д1) и легкая — с относительной электрофоретической подвижностью $0,64 \pm 0,02$ (фракции Д3 — Д5) (см таблицу, рис. 1). По полной программе исследовали только преобладающую в хряще коленного сустава новорожденных тяжелую форму ПГМ.

При наличии 0,5—1 мг сухого препарата ПГМ для определения степени и типа сульфатирования ХС использовали ИК-спектроскопию. На рис. 2, а приведены ИК-спектры стандартных препаратов Х4С, Х6С и гиалуроновой кислоты (ГК). Областью «отпечатков пальцев» для указанных выше типов ГАГ следует считать область 700—950 см⁻¹. Для Х4С характерно наличие полос поглощения 925, 850 и 725 см⁻¹, для Х6С — 945 и 820 см⁻¹, для ГК — 895 см⁻¹. Результаты ИК-спектроскопии ПГМ новорожденного свидетельствуют о преобладании в данном препарате Х4С (табл., рис. 2, б).

При анализе препаратов ПГМ, полученных в малом количестве, уровень сульфатирования и соотношение Х4С/

/Х6С могут быть оценены также с помощью ТСХ после ферментативного гидролиза ПГМ хондроитиназой АВС или АС. На рис. 3 представлены хроматограммы стандартных препаратов дисахаридов ХС и продуктов ферментативного гидролиза ПГМ новорожденного. Результаты анализа хроматограмм подтвердили достоверность полученных с помощью ИК-спектроскопии соотношений Х4С/Х6С.

Ферментативный гидролизат ПГМ использован также для выявления иммунореактивного СтБ, представленного в изученном препарате только одной иммунореактивной формой. Нативные молекулы ПГМ при использованных стандартных условиях электрофореза не преципитировались, что может быть обусловлено их высоким зарядом и маскировкой антигенных детерминант цепями ГАГ.

В системе СБ гиалинового хряща коленного сустава новорожденных показано наличие трех СБ с молекулярной массой 48, 44 и 41,5 кДа, среди которых преобладает белок с молекулярной массой 48 кДа [11, 21, 33]. Выявленная гетерогенность СБ выявлена при изоэлектрическом фокусировании СБ в 5% ПААГ, содержащем 6 М мочевины (рис. 4, б). При изоэлектрическом фокусировании очищенного препарата СБ выявлен кластер белков, состоящий не менее чем из 7 изоформ с рI 6,0—7,0. При отсутствии мочевины СБ преципитировали в месте нанесения. При перекрестном иммуноэлектрофорезе СБ с использованием антисыворотки, полученной против очищенной гель-фильтрацией через Сефакрил S-200 фракции СБ [10], показано наличие не менее 2 перекрестно-реагирующих форм белка.

Для выявления топографических особенностей структуры ПГА и адекватного контроля для исследования патологического материала исследовали также хрящ ребер и крыла подвздошной кости. При этом выявлена наиболее низкая экстрагируемость уоновых кислот из хряща крыла подвздошной кости (см. таблицу), что может быть связано с возрастными и топографическими особенностями строения различных отделов скелета. Однако для доказательства данного предположения необходимо исследование большего числа образцов.

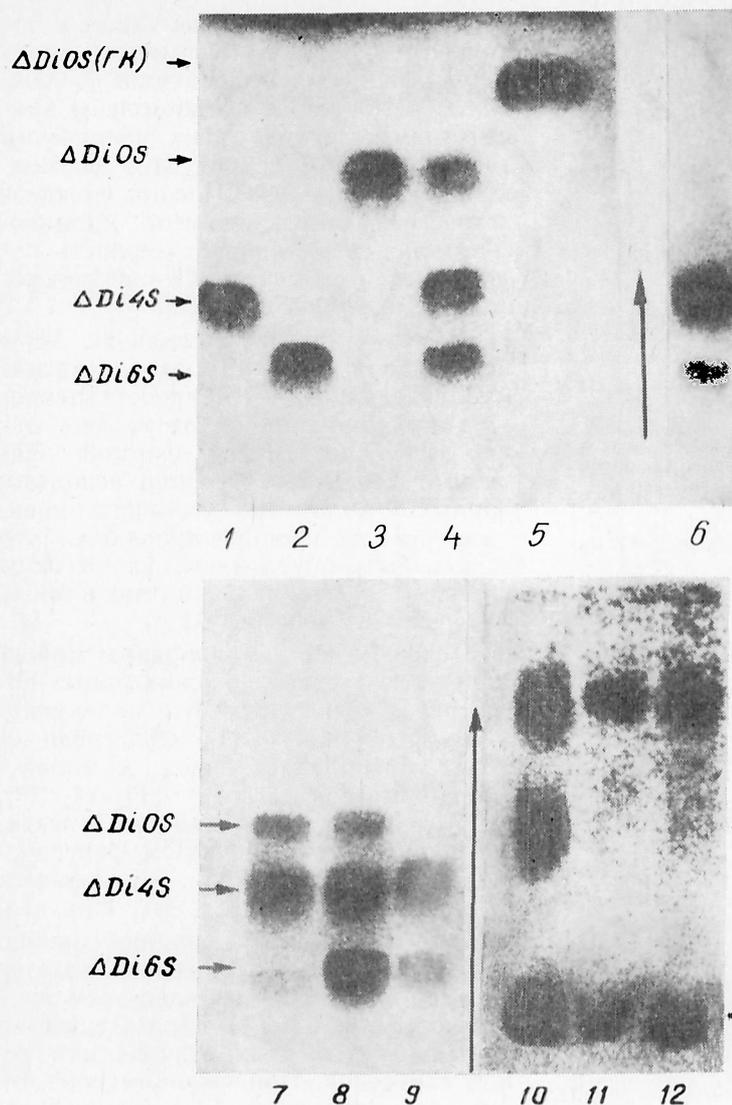


Рис. 3. Хроматограммы на пластинах целлюлозы препаратов дисахаридов из ПГМ.

1—5, 8, 12 — стандартные препараты дисахаридов; 6 — дисахариды ПГМ новорожденного ребенка, 7 — дисахариды ПГМ при диастрофической дисплазии, 9 — дисахариды ПГМ при тапаторфной дисплазии, 10, 11 — дисахариды ПГМ при ахондрогенезе. Препараты дисахаридов 6, 7, 9, 11 получены из ПГМ хряща коленного сустава, 10 — из хряща ребер. $\Delta DiOS$ — 2-ацетиамидо-2-деокси-3-0-(β -D-глюко-4-энопиранозилуруоновая кислота) D-галактоза, $\Delta Di4S$ — 2-ацетиамидо-2-деокси-3-0-(β -D-глюко-4-энопиранозилуруоновая кислота) 4-0-сульфо-D-галактоза, $\Delta Di6S$ — 2-ацетиамидо-2-деокси-3-0-(β -D-глюко-4-энопиранозилуруоновая кислота) — 6-0-сульфо-D-галактоза.

В хряще крыла подвздошной кости обнаружена только одна форма ПГМ, в хряще ребер наряду с тяжелой присутствовала и легкая форма ПГМ (фракция Д3) с большей электрофоретической подвижностью. Процентное содержание белка было наиболее высоким в хряще крыла подвздошной кости — 18%, а содержание КС в данном материале было в 1,5 раза ниже, чем в ПГМ реберного хряща. Электрофоретический анализ ХС в 7,5% полиакриламидном геле не позволил выявить различий в молекулярной массе данного ГАГ, которая составила в среднем 20 ± 2 кДа для всех исследованных образцов нормального хряща.

При ИК-спектроскопии ПГМ из нормального хряща различной локализа-

ции показана значительная вариабельность степени сульфатирования и соотношения Х4С/Х6С. Отмечено, что высокое относительное содержание Х6С сочетается с повышением степени сульфатирования ХС, а высокое относительное содержание Х4С — со снижением данного показателя. Поскольку Х4С необходим для нормального костеобразования, изменение в соотношении Х4С/Х6С может отражать различия в интенсивности данного процесса на разных этапах онтогенеза и в различных частях скелета.

Анализ СБ в данной серии образцов подтвердил предположение, что для разных отделов скелета и различных онтогенетических периодов характерно определенное соотношение СБ [11].

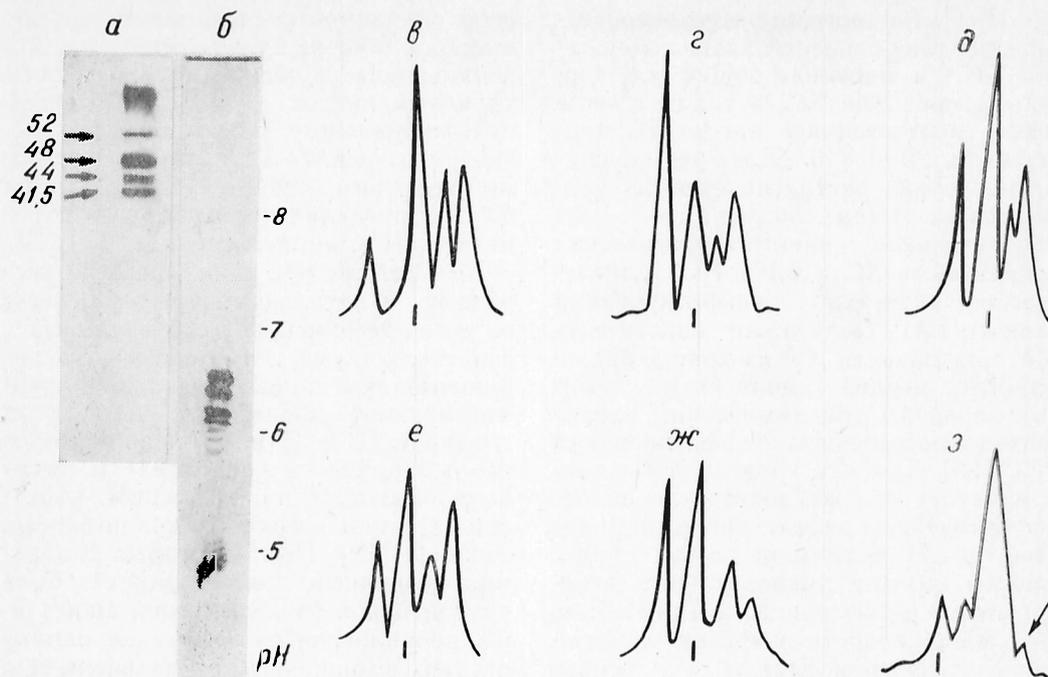


Рис. 4. Гетерогенность СБ гиалинового хряща по молекулярной массе и изоэлектрической точке.

а — электрофореграмма СБ нормального хряща новорожденного в 15 % полиакриламидном геле в присутствии DS-Na (справа указана молекулярная масса СБ в кДа), *б* — изоэлектрофореграмма очищенного препарата СБ нормального хряща новорожденного, *в-д* — денситограммы электрофореграмм СБ: *в* — новорожденный, *г, д* — 25-недельный плод, *е* — тапатофорная дисплазия (ТДЗ), *ж* — диастрофическая дисплазия, *з* — изолированная форма воронкообразной деформации грудной клетки (стрелкой указана низкомолекулярная форма СБ, чертой отмечен СБ 48 кДа), *а-а, е, ж* — хрящ коленного сустава, *г* — хрящ крыла подвздошной кости, *д, з* — хрящ ребер.

Содержание белка 52 кДа, видимо, также обладающего способностью взаимодействовать с ПГА, оказалось наиболее высоким в хряще ребер и крыла подвздошной кости 25 нед. плода — 21 и 40 % соответственно от всех белков данной фракции (см. рис. 3). Содержание белка 52 кДа в хряще новорожденных составило примерно 8—10 %, а в хряще детей 3 и 12 лет — лишь 1—3 % от всех белков данной фракции.

В целом исследование нормального материала позволило выявить различия ряда структурных параметров в зависимости от возраста доноров и источника получения материала; некоторые из них описаны ранее [12, 13, 21, 23]. Показано изменение таких характеристик, как экстрагируемость уроновых кислот из ткани, степень и тип сульфатирования ХС, относительное содержание ХС, КС и белка в ПГм, соотношение СБ, относительное содержание белка 52 кДа, электрофоретическая подвижность и число фракций ПГм. Вариабельность данных пара-

метров учитывали при анализе гиалинового хряща детей с различными формами остеохондродисплазий.

При исследовании хряща плода и детей 1-й группы не обнаружено дефектов матричного синтеза СтБ и СБ — эти компоненты ПГА сохраняли свои функции, а также взаимодействовали со специфическими антителами. Наиболее выраженные изменения при летальных формах остеохондродисплазий выявлены в структуре цепей ГАГ и в соотношении СБ. Так как контрольный материал соответствовал по онтогенетической стадии и топографии аутопсийным образцам хряща, полученным при остеохондродисплазиях, а выделение ПГА проводили при высоких концентрациях ингибиторов протеиназ широкой специфичности, нет оснований полагать, что изменения структуры компонентов ПГА могли произойти после смерти или в процессе выделения ПГА.

При ахондрогенезе и диастрофической дисплазии обнаружены изменения степени и типа сульфатирования

ХС. При ахондрогенезе выявлено резкое снижение относительного содержания Х4С и снижение общей степени сульфатирования ХС, а также уменьшение молекулярной массы ХС примерно на 20 % (16 кДа), резкое снижение уровня экстрагируемости уоновых кислот (см. таблицу, рис. 1—3). Относительная электрофоретическая подвижность ХС в 0,1 и НС1, определяемая степенью сульфатирования данного ГАГ, была ниже относительной подвижности ХС из хряща брахиоморфных мышц (линия Ыт), у которых первичный биохимический дефект связан с нарушением сульфатирования ГАГ [26]. Так как уровень Х6С в данном случае все же достаточно высок, биохимический дефект при ахондрогенезе типа II, видимо, не связан с нарушением синтеза универсальных переносчиков сульфогруппы, а может быть обусловлен недостаточностью хондроитин-4-сульфотрансферазы. В основе формирования фенотипических признаков данной дисплазии может лежать дефект сульфатирования Х4С.

Аномальный ИК-спектр ПГм при диастрофической дисплазии (см. рис. 2, б), снижение общей степени сульфатирования ПГм (см. таблицу) и электрофоретической подвижности цепей ХС (см. рис. 1, в), а также резкое уменьшение содержания дисахарида, сульфатированного по 6-му положению, в сочетании с повышенным содержанием несульфатированного дисахарида (см. рис. 3) позволяет считать, что данная дисплазия может быть связана с недостаточностью хондроитин-6-сульфотрансферазы. Для подтверждения данных предположений необходимы проведение энзимологических исследований и обследование облигатных гетерозиготных носителей (данная дисплазия наследуется аутосомно-рецессивно).

При танатофорной дисплазии (см. таблицу) отмечено уменьшение размеров СтБ, снижение экстрагируемости уоновых кислот из хряща коленного сустава, небольшое уменьшение степени сульфатирования ХС, появление малых форм ПГм (см. рис. 1, б). При летальном несовершенном остеогенезе наряду с присутствием малых форм ПГм обнаружено снижение относительного содержания в них КС, а также небольшое усиление степени сульфатирования ПГм. При кампомеличе-

ском синдроме отмечено некоторое повышение степени сульфатирования ХС и изменение уровня экстрагируемости уоновых кислот и белка. Степень сульфатирования ХС по данным электрофоретического анализа при синдроме коротких ребер — полидактилии была в пределах нормы, другие параметры ПГм не исследовали.

Выявленные при танатофорной дисплазии и летальном несовершенном остеогенезе изменения структуры ПГм свидетельствуют о существенном нарушении при данных дисплазиях ферментативного процессинга и (или) деградации ПГм. Эти изменения скорее всего вторичного характера и могут быть связаны с плейотропным эффектом мутации одного из коллагеновых генов [7, 22]. При некоторых синдромах первичный дефект может быть траизиторной биохимической аномалией, проявляющейся только на ранних стадиях эмбрионального развития, как это показано ранее для некоторых экспериментальных животных [6].

Результаты исследования системы СБ при изученных формах дисплазий частично описаны ранее [11]. Анализ гетерогенности СБ хряща ребер, крыла подвздошной кости и коленного сустава еще одного поворожденного с танатофорной дисплазией подтверждает отсутствие при данном синдроме феномена эмбриональной задержки — ни в одном из 5 исследованных образцов хряща 3 детей с танатофорной дисплазией не выявлено выраженного сдвига соотношения СБ в сторону высокомолекулярной формы 48 кДа, отмеченного нами при ряде других изученных форм летальных остеохондродисплазий [11], а также при диастрофической дисплазии (см. рис. 3). Персистирование эмбрионального соотношения СБ может являться отражением генетически детерминированного нарушения дифференцировки хондроцитов. Отсутствие данного феномена при танатофорной дисплазии указывает на разнообразие патогенетических изменений, лежащих в основе формирования летальных форм остеохондродисплазии.

Ни у одного из обследованных 2-й группы не обнаружено выраженной гиперэкскреции ГАГ с мочой, изменения их спектра (на электрофореграммах выявлен только ХС) и степени сульфатирования. Фракционирование

компонентов ПГА из хряща экзостозов свидетельствует о снижении относительного содержания тяжелой формы ПГм — плавучая плотность ПГм составила в среднем $1,53 \text{ г/см}^3$ (норма $\geq 1,57 \text{ г/см}^3$). В образцах Э1 и Э2 (см. таблицу) обнаружено также повышенное относительного содержания ГК примерно в 5—10 раз (соотношение ХС/ГК определяли после сканирования электрофорезграмм ГАГ экстрактов хряща). Содержание ГК в экзостозах со сбалансированным ростом (интенсивность роста экзостозов оценивали по уровню включения $^{90\text{m}}\text{Tc}$ -дифосфаната и рентгенологическим критериям) [1] было близким к нормальному (образцы Э3 и Э4). Исследование ПГм экзостозов большеберцовой кости показало, что они по ряду структурных параметров отличаются от ПГм хряща крыла подвздошной кости тех же больных. Пониженный уровень экстрагируемости уроновых кислот в случае Э1 и Э2, уменьшение размеров ПГм (снижение плавучей плотности, повышение относительного содержания белка), высокое относительное содержание Х4С — параметры, характерные для ПГм при интенсивном костеобразовании [13]. Повышенное относительное содержание ГК в пробах Э2 и Э1 свидетельствует о важной роли данного ГАГ в процессах клеточной пролиферации. О высокой пролиферативной активности хондроцитов косвенно свидетельствует и эмбриональный характер соотношения СБ [10]. Генетический дефект при данном заболевании, видимо, связан с нарушением контроля пролиферации хондроцитов.

Результаты исследования структуры ПГА при синдромальных и изолированных формах воронкообразных деформаций грудной клетки показали наличие выраженной биохимической гетерогенности этой группы дисплазий. Экстрагируемость уроновых кислот в данной серии образцов была самой низкой при изолированных формах, практически нормальной при синдроме Элерса — Данло и наиболее высокой у ребенка с воронкообразной деформацией грудной клетки при синдроме Видемана — Беквита (см. таблицу). Фракционирование компонентов ПГА позволило выявить у этого ребенка наиболее выраженное повышение относительного содержания легких форм

ПГм и ГК. Содержание КС и Х6С при большинстве изученных дисплазий повышено, но в ПГм ребенка с синдромом Видемана — Беквита уровень КС соответствовал нормальному, а соотношение Х4С/Х6С было сдвинуто в сторону первого ГАГ. В данном случае отмечены также наиболее низкая электрофоретическая подвижность ПГм и нормальная степень сульфатирования ХС. Все выявленные при синдроме Видемана — Беквита структурные параметры ПГА свидетельствуют об интенсивной пролиферации хондроцитов реберного хряща.

Анализ СБ позволил обнаружить при данной группе дисплазий сдвиг их соотношения в сторону белка 41,5 кДа, а также появление в ряде образцов низкомолекулярных СБ [11]. На рис. 3 приведена характерная для данной патологии денситограмма СБ.

В целом проведенное исследование показало наряду с гистологическими признаками диспластических и деструктивных изменений гиалинового хряща при воронкообразных деформациях грудной клетки [8] биохимические маркеры преждевременного старения ткани. У ребенка с синдромом Элерса — Данло типа I отмечена также повышенная экскреция с мочой ГК. В норме подобные структурные изменения ПГА и экскреция с мочой ГК обнаружены только у пожилых.

Результаты исследования коллагеновых белков при данных формах дисплазий, опубликованные ранее [7], подтвердили предположение об участии в патогенезе остеохондродисплазий наряду с ПГА коллагеновых белков.

Проведенное исследование позволило выявить определенные корреляции между клиническими, гистологическими и биохимическими нарушениями при большинстве исследованных заболеваний с системным поражением соединительной ткани. Установлены биохимические маркеры различных морфофункциональных изменений гиалинового хряща — гиперпролиферативных процессов, преждевременного старения ткани, персистенция эмбрионального типа метаболизма. Молекулярная гетерогенность ПГА при наследственных формах остеохондродисплазий связана с изменениями степени и типа сульфатирования ХС, количества цепей ХС и КС, длины СтБ, соот-

пошения СБ различной молекулярной массы. В основном модификация данных параметров происходит, видимо, на уровне процессинга гетеросахаридных и белковых компонентов ПГа.

Остается нерешенным вопрос о генетической связи тяжелой и легкой форм ПГм. Возможно, выявленная при летальных остеохондродисплазиях и воронкообразных деформациях грудной клетки выраженная электрофоретическая гетерогенность ПГм (присутствие дополнительных фракций) является следствием повышенной деградации тяжелой формы ПГм. В ряде случаев изменение электрофоретической подвижности ПГм не было связано со снижением степени сульфатирования и (или) молекулярной массы ХС, что косвенно подтверждает участие протеаз в модификации ПГм.

Результаты исследования позволяют также предположить зависимость интенсивности деградации компонентов ПГа от степени дифференцировки хондроцитов. Изменение соотношения СБ и гетерогенность ПГм могут являться следствием суммарного анализа ростовой пластинки, содержащей хондроциты, находящиеся на различных этапах дифференцировки. Нарушение дифференцировки хондроцитов на определенном уровне ростовой пластинки и приводит в итоге к изменению соотношения различных форм ПГм и СБ в анализируемом суммарном экстракте хряща. Так, отсутствие малого СБ или снижение его относительного содержания коррелирует с морфологическими изменениями в зоне гипертрофированных и дегенерирующих хондроцитов. Это дает основание полагать, что в норме синтез данной формы (либо повышенный процессинг высокомолекулярной формы) является отличительной чертой указанных выше зон хондроцитов. Высокомолекулярная форма СБ, напротив, синтезируется, видимо, недифференцированными клетками верхних слоев ростовой пластинки, а интенсивность протеолитической и углеводной деградации СБ в данных клетках низка. Для подтверждения этой гипотезы необходимо исследование структуры ПГа микрослоев хряща либо иммунофлюоресцентный анализ зоны роста с моноклональными антителами на различные формы СБ.

В заключение следует отметить, что выявление молекулярных дефектов

структуры ПГа является лишь первым шагом на пути выяснения первичных биохимических дефектов при системных костных дисплазиях. Установление определенного молекулярного дефекта ПГа дает возможность более четко определить пути дальнейшего исследования (ферментативный, молекулярно-генетический и другие методы анализа). Обнаруженные нарушения подтверждают информативность использованных методических приемов и указывают на целесообразность дальнейших исследований в данном направлении. Изучение молекулярных механизмов патогенеза остеохондродисплазий позволит уточнить их классификацию, усовершенствовать методы диагностики и прогнозирования. Знание молекулярных механизмов данных заболеваний является также необходимым условием для разработки новых методов их лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берглезов М. А., Раззоков А. А., Яновская Э. М., Феценко С. П. // Мед. реф. журн. IV. — 1985. — № 9. — Публ. 2949.
2. Бычков С. М., Богатов В. Н., Кузьмина С. А. // Бюл. экпер. биол. — 1981. — № 9. — С. 302—305.
3. Бычков С. М., Богатов В. Н., Харламова В. П. // Там же. — 1980. — № 6. — С. 680—682.
4. Бычков С. М., Кузьмина С. А. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 1. — С. 19—32.
5. Вееке Б. // Руководство по количественному иммуноэлектрофорезу: Пер. с англ. — М., 1977. — С. 41—73.
6. Колюхов Б. В. Генетика развития позвоночных. — М., 1980.
7. Лайбигер И.-Б., Феценко С. П., Козлов Е. А. и др. // Биохимия. — 1986. — Т. 51, № 3. — С. 505—515.
8. Урмонас В. К., Кондрашин Н. И. Воронкообразная грудная клетка. — Вильнюс, 1983.
9. Феценко С. П., Горняк Л., Краснополянская К. Д., Шишкин С. С. // Рукопись деп. в ВИНТИ № 7128—84 деп.
10. Феценко С. П., Краснополянская К. Д., Шишкин С. С. // Биохимия. — 1984. — Т. 49, № 10. — С. 1679—1685.
11. Феценко С. П., Краснополянская К. Д., Шишкин С. С., Эрбер И. Р. // Там же. — 1985. — Т. 50, № 4. — С. 693—699.
12. Arlin J. D., Hughes R. S. // Biochim. biophys. Acta. — 1982. — Vol. 694, N 4. — P. 375—418.
13. Buckwaller J. A. // Clin. Orthop. — 1983. — Vol. 172. — P. 207—232.
14. The Cell Biology of Extracellular Matrix / Ed. E. D. Hay. — New York, 1981.
15. Fairbanks F., Steck T. L., Wallach D. F. H. // Biochemistry (Wash.). — 1971. — Vol. 1. — P. 2606—2617.
16. Hascall V. C., Kimura J. H. // Meth. Enzymol. — 1982. — Vol. 82. — P. 769—800.

17. Hsu D., Hoffman P., Mashburn T. A. Jr. // Biochim. biophys. Acta. — 1974. — Vol. 338. — P. 254—264.
18. Laemmli U. K. // Nature. — 1970. — Vol. 227. — P. 680—685.
19. Lee G.-J., Evans I. E., Tieckelmann H. et al. // Clin. chim. Acta. — 1980. — Vol. 104. — P. 65—75.
20. McDevitt C. A., Muir H. // Analyt. Biochem. — 1971. — Vol. 44, N 2. — P. 612—622.
21. Mort J. S., Poole A. R., Roghley P. J. // Biochem. J. — 1983. — Vol. 214, N 1. — P. 249—272.
22. Prockop D. J. // Amer. J. hum. Genet. — 1984. — Vol. 36. — P. 499—505.
23. The Role of Extracellular Matrix in Development / Ed R. L. Trelstad. — New York, 1984.
24. Roughley P. J., Poole A. R., Mort J. S. // J. biol. Chem. — 1982. — Vol. 257. — P. 11 908—11 914.
25. Saito H., Yamagata T., Suzuki S. // Ibid. — 1968. — Vol. 243. — P. 1536—1539.
26. Stanescu V., Maroteaux P., Sobszak E. // Biomedicine. — 1973. — Vol. 19. — P. 460—463.
27. Suguhara K., Schwartz N. B. // Arch. Biochem. — 1982. — Vol. 214. — N 2. — P. 589—601.
28. Trevelyan W. E., Procter D., Harrison L. S. // Nature. — 1950. — Vol. 166. — P. 444—445.
29. Wasserman L., Ber A., Allalouf D. // J. Chromatogr. — 1977. — Vol. 136. — P. 342—347.
30. Wessler E. // Analyt. Biochem. — 1968. — Vol. 26, N 3. — P. 439—444.
31. Wessler E. // Ibid. — 1971. — Vol. 41, N 1. — P. 67—70.
32. Wray W., Boulikas T., Wray V. P., Hancock R. // Ibid. — 1981. — Vol. 119. — P. 197—203.

Поступила 18.12.87

MOLECULAR HETEROGENEITY OF PROTHEOGLYCAN AGGREGATES OF HUMAN HYALIN CARTILAGE IN NORMAL STATE AND IN SYSTEMIC BONE DYSPLASIA

S. P. Feschenko, K. D. Krasnopol'skaya, I. A. Rebrin, S. S. Rudakov

Branch of the Institute of Medical Genetics, Minsk, Institute of Medical Genetics, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Components of proteoglycan aggregates of human hyalin cartilage were studied under conditions of normal state and in some forms of osteochondrodysplasia. Extraction of uronic acids and protein from the tissue, amount of fractions and electrophoretic mobility of proteoglycan monomers, ratios protein/glycosaminoglycans, keratan sulfate/chondroitin sulfate, a level and type of sulfatation as well as molecular mass of chondroitin sulfate, amino acid composition of rod protein, heterogeneity of binding proteins (concerning their isoelectric points and molecular masses) and immunoreactivity of protein moiety in proteoglycan aggregates were studied in rib cartilage, knee joint and *ala ossis ilii*. Structural parameters of proteoglycan aggregates proved to be dissimilar and depended on cartilage localization and age of the donors. Impairments in the rate of chondroitin sulfate sulfatation were detected in achondrogenesis of the II type and in diastrophic dysplasia; an extraction ability and amount of proteoglycan fractions, relative content of glycosaminoglycans and binding proteins were altered in some other forms of osteochondrodysplasias. Numerous biochemical markers of extracellular matrix deterioration were detected, which are typical for various morphofunctional alterations in hyalin cartilage — hyperproliferative reactions, tissue pre-maturation, persistence of the embryonal type of metabolism.

УДК 612.018.06:612.438].08

С. Г. Калашников, Б. И. Кузник

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ТИМУСА В РЕГУЛЯЦИИ СИНТЕЗА ЦИТОМЕДИНОВ

Читинский медицинский институт

Имеется большое количество фактов, позволяющих говорить о существовании в многоклеточных организмах особой пептидергической системы регуляции межклеточных взаимоотношений [2, 3, 7]. Представителями этого класса молекул являются цитомедины — комплекс полипептидов основной природы, ответственных за межклеточный перенос информации в популяции специализированных клеток [3]. Вместе с тем установлено, что в составе цитомединов имеются соединения, способные оказывать влияние

на дифференцировку иммунокомпетентных клеток, в то время как аналогичные факторы из органов тимэктомированных животных таким эффектом не обладали [2]. Однако механизм развития этого явления до сих пор остается неясным. Выяснению данного вопроса мы посвятили свою работу.

Методика

Изучались цитомедины из печени, мышцы и селезенки 20 тимэктомированных крыс, выделенные по методике [4] через 3 мес после операции. Контролем служили полипептидные

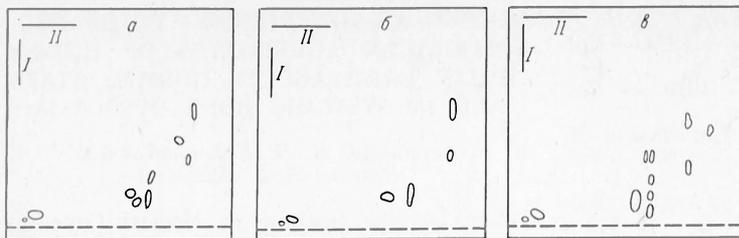


Рис. 1. ТСХ полипептидов из печени крыс.

Здесь и на рис. 2—6: а — ложнооперированные крысы; б — тимэктомированные; в — тимэктомированные, получавшие тималин.

факторы из органов 20 ложнооперированных животных. Для оценки специфичности взаимоотношений между тимусом и цитомединами периферических органов в сравнительный анализ были включены образцы из органов 20 кастрированных в те же сроки крыс, а также 20 тимэктомированных животных, получавших в течение 7 дней до эксперимента внутримышечно полипептиды из тимуса — тималин из расчета 1 мг/кг. Все манипуляции, связанные с оперативным вмешательством и взятием названных органов, осуществлялись под эфирным наркозом.

Сравнительное изучение указанных соединений проводили методом двухмерной тонкослойной хроматографии (ТСХ) и гель-фильтрации. ТСХ проводили на стандартных силикагелевых пластинках Silufol. Для нанесения на пластины использовали раствор анализируемых соединений в концентрации 1 мг/мл. Элюцию в первом направлении проводили системой бутанол — уксусная кислота — вода (4:1:5), во втором направлении использовали систему 3% изопропанол — аммиак (1:1) [6]. Пластины проявляли 1% нингидрином. Гель-фильтрацию осуществляли на стандартной колонке аминокислотного анализатора KLA-5, «Hitachi» (0,9×55 см), заполненной TOYOPEARL HW-50, на которую наносили 0,5 мл исследуемого препарата. Элюцию проводили забуференным фосфатом физиологическим раствором (рН 7,4) при скорости подачи элюента 7,5 мл/ч. Пептиды детектировали по стандартной реакции с нингидрином в проточном реакторе анализатора [7].

Результаты и обсуждение

Использование двухмерной ТСХ (45 анализов) позволило обнаружить стойкое отсутствие отдельных пептидных фракций в образцах из органов тимэктомированных крыс, что выражалось в уменьшении числа хроматографических пятен (рис. 1, б, 2, б, 3, б) по сравнению с результатами анализа аналогичных препаратов из органов ложнооперированных и получавших тималин животных (рис. 1, а, в; 2, а, в; 3, а, в). Идентичные изменения состава полипептидных факторов, возникающие на фоне тимэктомии, были прослежены при проведении гель-фильтрации (60 анализов). Так, установлено, что, несмотря на разницу в выходе вещества (см. таблицу), хроматографическая картина разделения полипептидных комплексов из печени, мышцы и селезенки ложнооперированных и кастрированных животных была идентичной (рис. 4, а, г; 5, а, г; 6, а, г). В то же время на дифференциальной кривой, отражающей характер фракционирования полипептидов, выделенных из тканей тимэктомированных крыс, наблюдались следующие изменения. Во-пер-

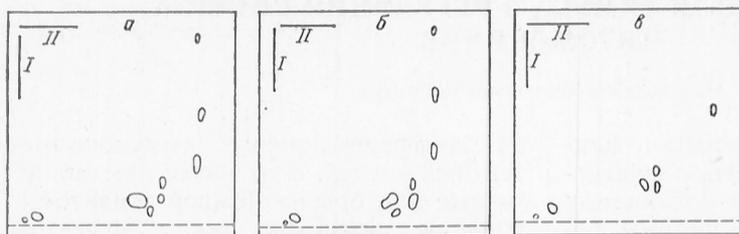


Рис. 2. ТСХ полипептидов из селезенки крыс.

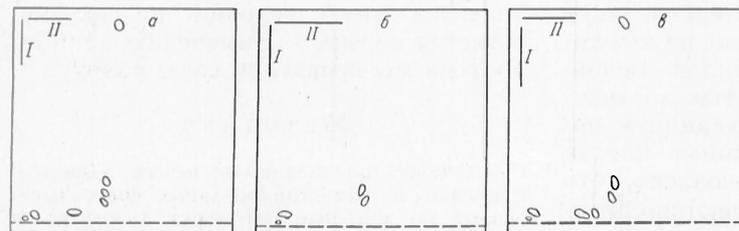


Рис. 3. ТСХ полипептидов из мышцы крыс.

Площадь (см²) хроматографических пиков по результатам гель-фильтрации на TOYOPEARL HW-50

Группа животных	Орган, из которого выделены пептиды		
	печень	селезенка	мышца
1. Ложнооперированные <i>p</i> ₁₋₃	63,23±0,002 <0,001	22,09±0,001 <0,001	7,65±0,003 <0,001
2. Кастрированные <i>p</i> ₂₋₃	41,04±0,001 <0,001	20,36±0,001 <0,001	6,07±0,005 <0,001
3. Тимэктомированные	31,05±0,005	17,78±0,002	3,161±0,008
4. Тимэктомированные, получавшие тималин	74,36±0,02	28,94±0,005	10,41±0,004

Примечание. Представлены средние ($M \pm m$) данные, полученные на 15 животных в каждой группе.

вых, резко уменьшалась площадь хроматографических пиков (см. таблицу), что свидетельствует о значительном снижении концентрации анализируемых соединений в препаратах этой группы. Во-вторых, на хроматограммах указанных образцов выпадал целый ряд фракций, дефицит которых в препаратах из печени достигал 3, из селезенки — 1, из мышцы — 1 (рис. 4, б; 5, б; 6, б), что позволяет думать об отсутствии отдельных факторов в составе анализируемых пептидных комплексов. В то же время при изучении состава полипептидов, выделенных из органов тимэктомированных животных, получавших тималин, оказалось, что последний способен не только восстанавливать исходный хроматографический профиль, аналогичный образцам из тканей ложнооперированных и кастрированных крыс, но и повышать содержание отдельных пептидных компонентов в анализируемых соединениях (рис. 4, в; 5, в; 6, в).

Исходя из полученных данных, мы считаем, что вилочковая железа по-

средством синтезируемых ею пептидов контролирует ферментные системы, ответственные за продукцию пептидных медиаторов межклеточного взаимодействия — цитомединов. В литературе есть данные о способности гормонов тимуса влиять на активность внутриклеточных протеаз лимфоцитов [1]. Не исключено, что и в данном случае тималин дает подобный эффект, однако нельзя отрицать и возможную роль его как фактора-индуктора, репрессирующего работу генов, ответственных за синтез этих медиаторов.

Полученные результаты позволяют заключить, что, во-первых, хроматографическая картина разделения полипептидов, выделенных из органов ложнооперированных и кастрированных животных, идентична, тогда как на хроматограммах образцов, полученных из тех же органов тимэктомированных животных, отсутствуют отдельные полипептидные фракции, во-вторых, что введение тимэктомированным животным тималина восстанавливает в образцах этой группы хроматографиче-

Рис. 4. Гель-фильтрация полипептидов из селезенки крыс. Здесь и на рис. 5 и 6: *г* — кастрированные крысы.

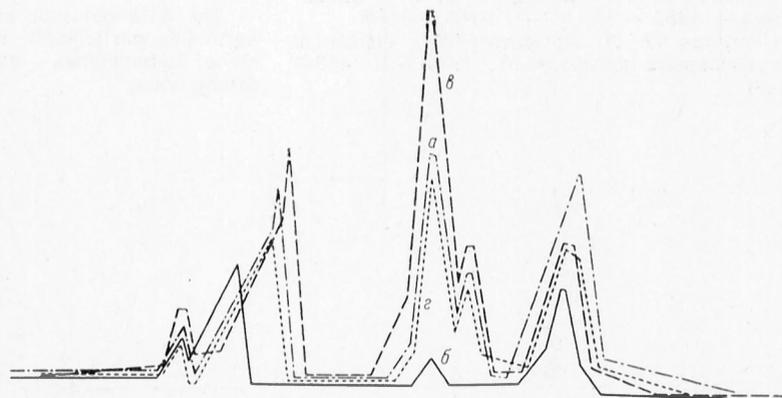


Рис. 5. Гель-фильтрация полипептидов из печени крыс.

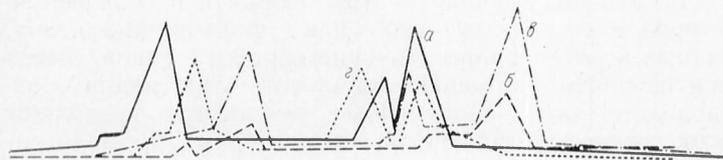
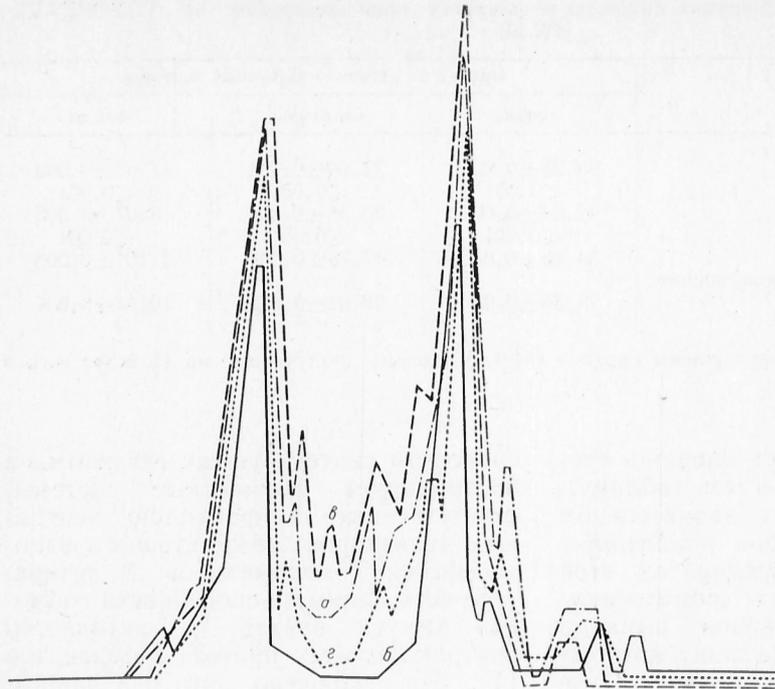


Рис. 6. Гель-фильтрация полипептидов из мышцы крыс.

скую картину и содержание полипептидов, характерные для ложноперирированных крыс.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ванюрихина Л. Т., Орлова А. В. // Врач. дело. — 1984. — № 11. — С. 71—73.
2. Кузник Б. И. // Цитомедины. — Томск, 1985. — С. 17—21.
3. Морозов В. Г., Хавинсон В. Х. // Успехи совр. биол. — 1983. — Т. 96, № 6. — С. 339—352.
4. Морозов В. Г., Хавинсон В. Х. // Биохимия. — 1981. — № 9. — С. 1652—1659.
5. Остерман Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. — М., 1985. — С. 466—491.

6. Остерман Л. А. // Там же. — С. 109—162.
7. Смагин В. Г., Виноградов В. А., Булгаков С. А. Лиганды опиатных рецепторов: Гастроэнтерологические аспекты. — М., 1983. — С. 7—12.

Поступила 09.09.87

ROLE OF THYMUS IN REGULATION OF CYTOMEDINES SYNTHESIS

S. G. Kalashnikov, B. I. Kuznik

Medical School, Chita

The data obtained suggest that thymotropic hormones participated in regulation of synthesis of cytomedines — mediators of intercellular interactions.

Н. Ю. Коневалова, И. А. Чиркина, А. А. Чиркин

ДЕЙСТВИЕ ФАКТОРОВ, СТИМУЛИРУЮЩИХ ПРОЛИФЕРАЦИЮ ГЕПАТОЦИТОВ, НА ПРОЦЕСС ЭСТЕРИФИКАЦИИ ХОЛЕСТЕРИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ

Кафедра биохимии Витебского медицинского института

Ферментный синтез эфиров холестерина в сыворотке крови зависит от состояния гепатоцитов, поскольку основные компоненты системы эстерификации холестерина — фермент лецитин-холестеринацилтрансфераза (ЛХАТ, КФ 2.3.1.43), апопротеины липопротеидов высокой плотности (ЛПВП), насцентные ЛПВП — синтезируются преимущественно в печени [12]. При различных типах повреждения печени процесс эстерификации холестерина в кровеносном русле страдает [9].

В условиях острой интоксикации тетрахлорметаном у крыс было продемонстрировано положительное действие факторов, стимулирующих пролиферацию гепатоцитов (препарат ФСП), на интенсивность образования эфиров холестерина в плазме крови. Механизм такого действия препарата ФСП связан, вероятно, с сохранением или стимуляцией биосинтеза ЛХАТ и ее молекулярных форм в печени, а также с выбросом в кровь насцентных ЛПВП из регенерирующей печени [10].

Целью настоящей работы было исследование влияния препарата ФСП на течение репаративной регенерации печени и систему эстерификации холестерина в кровеносном русле. Изучение системы эстерификации холестерина в процессе репаративной регенерации печени важно потому, что для построения мембран интенсивно делящихся клеток требуется неэстерифицированный холестерин [4].

Методика

Опыты поставлены на 314 беспородных крысах средней массой 150 г. В работе использована стандартная операция частичной гепатэктомии по Хиггинсу и Андерсену.

Препарат ФСП получали из цитозоля клеток печени крыс через 48 ч после частичной гепатэктомии [1]. Для этого ткань регенерирующей печени выдерживали сутки при -10°C , затем гомогенизировали с дистиллированной водой в соотношении 1 : 3 в измельчителе РТ-1 при 8000 об/мин в течение 60 с.

Полученный гомогенат центрифугировали 20 мин при 3000 об/мин при 4°C . Супернатант прогревали 15 мин при 100°C . Денатурированные макромолекулы удаляли фильтрованием через 6 слоев марли, а фильтрат центрифугировали при 40 000 об/мин 60 мин в ультрацентрифуге L2-65B фирмы «Спинко-Бекман». Полученный препарат (сумма относительно низкомолекулярных и термостабильных веществ) хранили при -20°C . Перед употреблением препарат ФСП размораживали и прогревали до 37°C .

Все оперированные животные были разделены на контрольную и опытную группы. Подопытным животным сразу после частичной гепатэктомии вводили внутривенно 5 мл препарата ФСП. Контрольным крысам в это же время вводили 5 мл физиологического раствора.

Контрольных и подопытных крыс декапитировали через 1, 2, 4, 6, 10 и 30 сут после операции. Оценивали митотическую активность гепатоцитов, количество двуядерных клеток, относительную массу органа и морфологическую картину ткани.

В сыворотке крови и ЛПВП определяли содержание общего, неэстерифицированного и эфирно-связанного холестерина [6, 7]. Скорость эндогенной эстерификации холестерина определяли радионуклидным методом Stokke, Norum [14]. Активность ЛХАТ исследовали с помощью искусственного субстрата протеолипосом [3, 11]. Производили исследования кинетических свойств ЛХАТ-реакции путем измерения зависимости скорости реакции от концентрации субстрата [10].

Результаты и обсуждение

Восстановление массы печени после операции частичной гепатэктомии происходит в два этапа [2, 8]. Наиболее быстрое нарастание массы органа наблюдается в первые 3 сут (1-й этап), затем с 3-х по 6-е сутки имеет место статистически достоверное замедление роста, вслед за которым с 7-х суток вновь отмечается увеличение массы органа (2-й этап). Аналогичные результаты были получены нами (рис. 1). Введение препарата ФСП обеспечило больший прирост массы печени на 6-е сутки опыта, причем достигнуто практически полное совпадение с исходными значениями массы органа. Этот эффект определяется более высоким уровнем митотической активности ге-

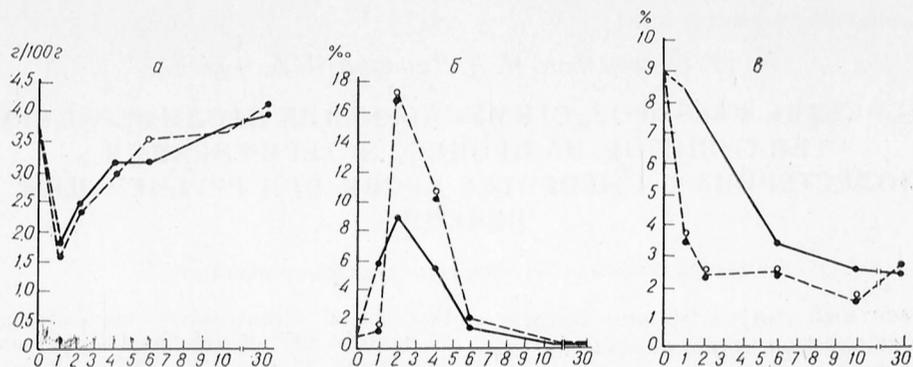


Рис. 1. Действие факторов, стимулирующих пролиферацию гепатоцитов, на течение регенераторной гипертрофии печени.

Сплошная линия — контроль; пунктирная — опыт; темные кружки — достоверные различия по сравнению с исходными данными; светлые — по сравнению с контролем. а — относительная масса печени (в г на 100 г массы тела); б — митозы (в %); в — двуядерные клетки (в %). Здесь и на рис. 2: по оси абсцисс — время после гепатэктомии (сутки).

патоцитов спустя 48 ч после операции и с ранним (на 1—2-е сутки опыта) делением двуядерных клеток. На протяжении 2-го этапа регенераторного процесса наблюдалась гипертрофия клеток печени. У подопытных животных этот эффект был более выражен по сравнению с контрольными крысами. Кроме того, в интервале 6—10 сут наблюдения у подопытных крыс было достоверно меньше двуядерных клеток в печени. К 30-м суткам постепенно появились морфологические признаки «созревания» ткани печени, более выраженные у подопытных крыс.

Анализ результатов морфологических исследований показал, что для течения восстановительных процессов в печени важны минимум два процесса — вступление гепатоцитов в митоз и деление двуядерных клеток. Оба этих процесса сопряжены с обменом холестерина. Известно, что синтезу ДНК в S-фазе митотического цикла предшествует увеличение скорости биосинтеза холестерина, происходящего в G₁-фазе. Это приводит к увеличению содержания холестерина в плазматической мембране гепатоцитов и увеличению ее вязкости. Выдвинута гипотеза, что накопление холестерина в плазматической мембране клеток в конце G₁-фазы является сигналом к началу синтеза ДНК, а увеличение вязкости мембраны в конце G₂-фазы может быть сигналом к началу деления. Обратный процесс — переход клеток из состояния размножения в состояние покоя — сопровождается снижением биосинтеза и содержа-

ния в них холестерина [4]. Другой путь увеличения числа гепатоцитов посредством деления двуядерных клеток также требует образования дополнительных участков бислоя плазмолеммы, а следовательно, и дополнительных количеств неэстерифицированного холестерина. Отсюда следует, что прирост массы печени за несколько суток примерно на 2 г в пересчете на 100 г массы тела должен сопровождаться ощутимыми сдвигами содержания холестерина и в сыворотке крови. Такое предположение базируется на том, что у крыс 82 % холестерина образуется в печени, и печень является одновременно основным органом выведения холестерина из кровотока [13].

Результаты исследований содержания холестерина в сыворотке крови представлены на рис. 2. У контрольных животных содержание общего холестерина резко снижено спустя сутки после частичной гепатэктомии. Механизм этого эффекта связан с тем, что в организме крысы осталось всего около 30 % клеток печени. Затем количество общего холестерина повысилось до исходных значений в интервале 2—4 сут, а содержание неэстерифицированного холестерина достоверно превысило исходный уровень через 48 ч после операции. Поскольку динамика изменений содержания неэстерифицированного холестерина совпадает по срокам с волной митозов, причиной роста количества холестерина можно считать усиление его биосинтеза в митотически делящихся гепатоцитах [4]. В интервале 6—10 сут гепатоциты перехо-

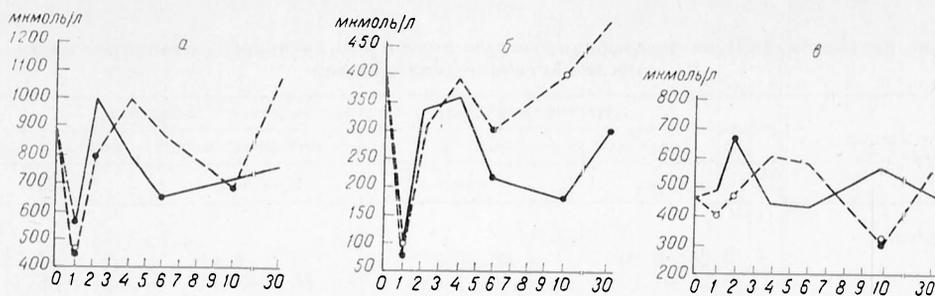


Рис. 2. Действие препарата ФСП на содержание холестерина и его фракций в сыворотке крови крыс после частичной гепатэктомии.
 а — общий холестерин; б — эфиры холестерина; в — неэстерифицированный холестерин.

дят из состояния интенсивного деления в состояние покоя, характеризующееся нормализацией биосинтеза холестерина. Но в это время начинают усиленно делиться двуядерные клетки, в результате чего, вероятно, и зарегистрировано повторное снижение содержания общего холестерина (6-е сутки). При этом содержание неэстерифицированного холестерина, необходимого для построения плазматических мембран гепатоцитов, поддерживается относительно постоянным за счет параллельного уменьшения количества эфиров холестерина. Тенденция к нормализации уровня холестерина и его фракций проявляется к 30-м суткам наблюдения.

Введение препарата ФСП изменило динамику холестеринемии. Через сутки после частичной гепатэктомии содержание общего и неэстерифицированного холестерина снизилось в большей степени, чем в контроле, а спустя 48 ч повышение уровня общего и неэстерифицированного холестерина было меньшим по сравнению с контрольными крысами. По всей видимости, эти изменения можно трактовать как результат отвлечения части неэстерифицированного холестерина на деление двуядерных клеток, содержание которых через 48 ч уменьшилось в 4 раза. Второе ощутимое снижение содержания общего и неэстерифицированного холестерина было зарегистрировано спустя 10 сут после частичной гепатэктомии, и оно совпадает по времени с дальнейшим уменьшением числа двуядерных клеток. Таким образом, используя гипотезу Ю. М. Лопухина и соавт. (1983 г.), можно искать логические связи между характером холесте-

ринемии и течением восстановительных процессов в печени.

Сопоставление морфологических признаков регенерирующей печени и показателей холестеринемического гомеостаза позволило сделать заключение о стимулирующем влиянии препарата ФСП на процесс восстановления массы органа. Однако при этом возникает вопрос о функциональной полноценности регенерации печени, ускоренной введением препарата ФСП. Для его решения была проанализирована холестеринэстерифицирующая активность сыворотки крови, так как основные компоненты системы эстерификации холестерина в кровеносном русле полностью или преимущественно синтезируются в печени [12].

Исследования показали, что динамика изменений фракционной и молярной скоростей эстерификации холестерина в сыворотке крови контрольных крыс хорошо совпадала с динамикой изменений содержания общего холестерина: гипохолестеринемическим фазам обоих этапов восстановления печени соответствовало снижение холестеринэстерифицирующей активности сыворотки крови (табл. 1). Введение препарата ФСП обеспечило превышение исходного и контрольного уровней фракционной скорости эстерификации спустя 6 сут после операции и молярной скорости в интервале 4—6 сут наблюдения. Кроме того, молярная скорость эстерификации холестерина полностью нормализовалась у подопытных животных уже на 10-е сутки опыта.

Рассматривая причины таких изменений в скорости эстерификации холестерина в кровеносном русле, следует оценить свойства субстратных ЛПВП

Действие препарата ФСП на эстерифицирующую холестерин активность сыворотки крови крыс после частичной гепатэктомии

Срок наблюдения, сут	Эстерифицирующая холестерин активность сыворотки			
	фракционная скорость, %		молярная скорость, мкмоль/л в 1 ч	
	контроль	опыт	контроль	опыт
До опыта	7,50±0,44		51,7±5,15	
1-е	2,96±0,49*	4,66±0,97*	21,8±4,41*	25,0±4,73*
2-е	6,27±1,19	5,66±1,08	35,5±3,44*	34,7±6,14*
4-е	7,48±0,50	8,52±1,27	47,5±6,01	105,7±9,76*,**
6-е	4,59±0,66*	10,94±1,25*,**	32,8±8,23	97,8±19,41*,**
10-е	3,90±0,81*	6,12±1,19	30,9±0,20*	51,3±3,44*,**
30-е	6,85±1,10	9,27±0,57*	39,8±3,41	75,2±15,1**

Примечание. Здесь и в табл. 2: одна звездочка — достоверность различий по сравнению с исходными данными; две — по сравнению с контролем.

и активность ЛХАТ. Оказалось, что содержание общего и эстерифицированного холестерина в ЛПВП уменьшилось в 8 раз у контрольных и подопытных крыс через 24 ч после операции, затем повысилось к 4-м суткам до 50 % исходных значений и сохранялось на этом уровне у контрольных крыс до конца наблюдения, а у подопытных к 30-м суткам нормализовалось. Следовательно, частичная гепатэктомия привела к уменьшению количества ЛПВП, являющихся основным субстратом ЛХАТ-реакции. В результате через 24 ч после операции резко снижена скорость эстерификации холестерина в кровеносном русле. Если учитывать дефицит субстрата, то сниженную скорость эстерификации холестерина следовало ожидать во все сроки наблюдения. Однако динамика изменений фракционной и молярной скоростей эстерификации холестерина не подтвердила это предположение. Поэтому причину изменений эстерифицирующей холестерин активности сыворотки крови необходимо искать в свойствах фермента.

Для подтверждения этого предположения была исследована зависимость скорости ЛХАТ-реакции от концентрации протеолипосом на 4, 6 и 10-е сутки после частичной гепатэктомии. При этом концентрация неэстерифицированного холестерина в протеолипосомах проб возрастала от 2,5 до 49,7 нмоль, что соответствовало диапазону концентраций холестерина в сыворотке крови от 125 до 2485 мкмоль/л [10]. Полученные кинетические кривые представлены на рис. 3. В трактовке сложного характера кинетиче-

ской кривой была использована рабочая гипотеза о наличии в сыворотке крови смеси молекулярных форм ЛХАТ [5, 10].

При формальном анализе кинетических кривых установлено, что у контрольных крыс спустя 4 сут после операции зависимость скорости ЛХАТ-реакции от концентрации субстрата представлена куполообразной формой с максимумом при 24,9 нмоль/проба, или 1245 мкмоль/л. На 6-е сутки наблюдения в кинетической кривой появляются 2 пика, причем пик в правой части кривой зарегистрирован при меньшей концентрации субстрата (31,1 нмоль/проба, или 1555 мкмоль/л), чем у интактных крыс. Обращает на себя внимание, что практически все исследованные точки на кинетических кривых на 4-е и 6-е сутки наблюдения достоверно превышали исходные значения. Спустя 10 сут после операции форма кинетической кривой напоминала кривую у интактных крыс, но отсутствовало плато, а пик в правой части кривой находился в области меньших концентраций неэстерифицированного холестерина протеолипосом. После введения препарата ФСП изменения в кинетических кривых были менее выраженными. По всей видимости, во все сроки наблюдения в сыворотке крови присутствовали обе молекулярные формы ЛХАТ. Нормализация зависимости скорости ЛХАТ-реакции от концентрации субстрата наступала у подопытных крыс раньше, поскольку форма кинетической кривой у них на 6-е сутки наблюдения была такой же, как у контрольных крыс на 10-е сутки.

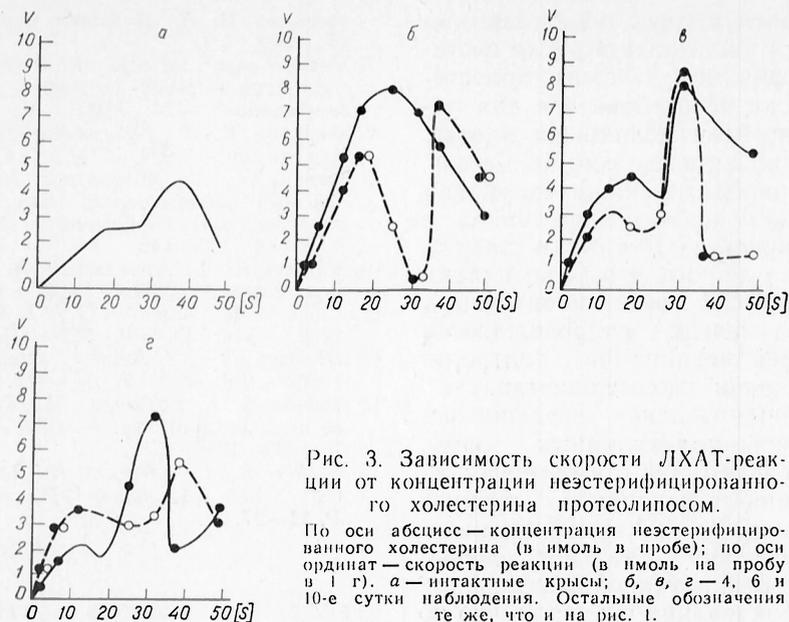


Рис. 3. Зависимость скорости ЛХАТ-реакции от концентрации незэтерифицированного холестерина протеолипосом.

По оси абсцисс — концентрация незэтерифицированного холестерина (в ммоль в пробе); по оси ординат — скорость реакции (в ммоль на пробу в 1 г). а — интактные крысы; б, в, г — 4, 6 и 10-е сутки наблюдения. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

Активность ЛХАТ, рассчитанная по линейному участку кривых, и величины K_M и V_{max} для ферментативного препарата сыворотки крови, найденные в координатах S/V от S в диапазоне концентраций субстрата от 2,5 до 18,6 ммоль/проба, приведены в табл. 2. Как видно, у контрольных крыс активность ЛХАТ повышена в интервале 4—6 сут наблюдения, что может быть связано с необходимостью сохранения нормальной молярной скорости эстерификации холестерина в этом периоде в условиях дефицита субстратных ЛПВП. Однако свойства фермента на 4-е и 6-е сутки не одинаковы. По кинетическим кривым и величинам K_M и V_{max} можно сделать предварительное заключение, что на 4-е сутки восстановительного процесса в сыворотке крови присутствует большее количество фермента с несколько менее выраженным сродством к субстрату, чем у интактных крыс. На 6-е сутки наблюдения в сыворотке крови обнаруживает-

ся более активный фермент с высоким сродством к субстрату. После введения препарата ФСП описанные изменения сохранялись, но были выражены в меньшей степени.

Особое внимание следует обратить на механизм более ранней нормализации уровня эфиров холестерина в сыворотке крови подопытных крыс к 10-м суткам наблюдения (см. рис. 2). Это результат действия более активного фермента при более высокой величине V_{max} ЛХАТ-реакции и практически нормальном сродстве субстрата к ферменту. Если учесть, что форма кинетической кривой была близка таковой у интактных крыс, можно считать ферментное обеспечение процесса эстерификации холестерина в сыворотке крови близким к нормализации. Но на 10-е сутки после операции у подопытных крыс зарегистрировано более интенсивное, чем в контроле, деление ядерных клеток. Следовательно, незэтерифицированный холестерин мог

Таблица 2

Характеристика ЛХАТ-реакции в сыворотке крови крыс после частичной гепатэктомии

Срок наблюдения, сут	Активность ЛХАТ, ммоль/л в 1 ч		K_M , ммоль/л		V_{max} , ммоль/л в 1 ч	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
До опыта	46,7±9,3		0,6		0,158	
4-е	124,7±4,5*	55,7±4,4**	0,82	0,75	0,631	0,203
6-е	157,7±22,7*	88,5±6,1*,**	0,20	0,34	0,250	0,148
10-е	80,8±15,1	114,1±5,5*	0,50	0,55	0,217	0,323

использоваться в двух процессах: переводиться в кровеносном русле системой эстерификации в эфиры холестерина, а также использоваться для построения мембран делящихся клеток. Несбалансированность этих процессов, вероятно, приводит к снижению уровня неэстерифицированного холестерина в сыворотке крови на 10-е сутки наблюдения. А это значит, что стимуляция препаратом ФСП восстановительных процессов в печени сопровождается мобилизацией механизмов, контролирующих уровень холестерина в крови.

Итак, дополнительное введение эндогенных низкомолекулярных термостабильных факторов, стимулирующих пролиферацию гепатоцитов, требует большего расхода неэстерифицированного холестерина для обеспечения ускоренной репаративной регенерации печени. Исследования показали, что по динамике холестеринемии и холестеринэстерифицирующей активности сыворотки крови можно судить о состоянии восстановительных процессов в поврежденной печени.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абакумова О. Ю., Котаев А. Ю., Карагулян С. Р. и др. // *Вопр. мед. химии.* — 1985. — № 5. — С. 95—97.
2. Биохимические методы исследования в клинике / Под ред. А. А. Покровского. — М., 1969. — С. 292—294.
3. Иванова Е. М., Никифорова А. А., Алкнис Е. Г. // *Вопр. мед. химии.* — 1985. — № 6. — С. 123—127.
4. Лопухин Ю. М., Арчаков А. И., Владимиров Ю. А., Коган Э. М. *Холестериноз.* — М., 1983.
5. Никифорова А. А., Иванова Е. М., Алкнис Е. Г. // *Бюл. exper. биол.* — 1985. — № 2. — С. 158—161.
6. Нормальная и патологическая цитология паренхимы печени / Бреслер В. М., Черно-

градская Н. А., Пильщик Е. М. и др. — Л., 1969.

7. Современные методы исследования липопротеидов высокой плотности: (Метод. рекомендации). — М., 1983. — С. 3—7.
8. Федуров В. В., Кузьменко И. В. // *Вопр. мед. химии.* — 1974. — № 2. — С. 172—177.
9. Чиркин А. А., Коневалова Н. Ю. // *Всесоюзный биохимический съезд, 5-й: Тезисы стендовых сообщений.* — М., 1986. — Т. 3. — С. 145—146.
10. Чиркин А. А., Коневалова Н. Ю. // *Вопр. мед. химии.* — 1987. — № 6. — С. 124—128.
11. Chen C. H., Albers J. J. // *J. Lipid Res.* — 1982. — Vol. 23. — P. 680—691.
12. Glomset J. A. // *Advanc. intern. Med.* — 1980. — Vol. 25. — P. 91—116.
13. Robins S. J., Fasulo J. M., Collins M. A. et al. // *J. Lipid Res.* — 1985. — Vol. 26. — P. 1230—1240.
14. Stokke K. J., Norum K. R. // *Scand. J. clin. Lab. Invest.* — 1971. — Vol. 27. — P. 21—27.

Поступила 15.03.88

EFFECT OF FACTORS, STIMULATING HEPATOCYTE PROLIFERATION, ON ESTERIFICATION OF CHOLESTEROL IN BLOOD SERUM DURING LIVER TISSUE REGENERATION

N. Yu. Konevalova, I. A. Chirkina, A. A. Chirkin

Chair of Biochemistry, Medical School, Vitebsk

Two-step regeneration of rat liver tissue was observed after partial hepatectomy. The first step involved mitosis of hepatocytes and the second step—division of the cells containing two nuclei and hypertrophy of hepatocytes. Both these steps of liver tissue regeneration were accompanied by hypercholesterolemia and a decrease in the cholesterol esterification activity in blood serum. The factors, stimulating hepatocyte proliferation, accelerated the reparative liver tissue regeneration due to activation of mitosis and the early division of the cells containing two nuclei. At the same time, the highest regeneration of the cholesterol esterification system was detected in circulation.

УДК 612.822.1.015.3:547.466.3].08

В. А. Розанов, В. М. Копелевич, И. В. Савицкий

ИЗМЕНЕНИЯ В СИСТЕМЕ ГАМК ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ МНОГОКРАТНОМ ИНЪЕЦИРОВАНИИ ПИРИДОКСАЛЬ-5'-ФОСФАТА И ЕГО ШИФФОВА ОСНОВАНИЯ С ГАМК

Одесский медицинский институт им. Н. И. Пирогова

В последнее время пиридоксаль-5-фосфат (ПАЛФ) как коферментный препарат широко применяется при лечении различных поражений централь-

ной нервной системы (ЦНС). Обоснованность его применения в психоневрологии базируется на представлениях о его направленном активирующем вли-

Изменения активности ферментов обмена ГАМК (в мкмоль·мин⁻¹·г⁻¹ ткани) и содержания ГАМК и ГЛ (в мкмоль·г⁻¹ ткани) в различных отделах головного мозга крыс после введения ПАЛФ и его шиффова основания с ГАМК

Показатель	Отдел мозга	Контроль	Введение ПАЛФ	Введение ПАЛФ-ГАМК
Активность ГДК	М	0,158 (0,097÷0,273)	0,117* (0,084÷0,171)	0,131 (0,075÷0,180)
	К	0,132 (0,098÷0,196)	0,103 (0,046÷0,136)	0,135 (0,083÷0,169)
	С	0,189 (0,133÷0,238)	0,129* (0,072÷0,161)	0,154* (0,120÷0,198)
«Эндогенная» активность ГДК	М	0,024 (0,002÷0,049)	0,025 (0,004÷0,048)	0,043* (0,013÷0,060)
	К	0,040 (0,019÷0,079)	0,038 (0,020÷0,042)	0,043 (0,022÷0,081)
	С	0,020 (0,08÷0,027)	0,037* (0,015÷0,062)	0,042* (0,019÷0,078)
Активность ГАМК-трансаминазная	М	0,327 (0,266÷0,419)	0,248* (0,174÷0,318)	0,300 (0,227÷0,347)
	К	0,214 (0,178÷0,241)	0,223 (0,136÷0,302)	0,202 (0,168÷0,226)
	С	0,234 (0,187÷0,274)	0,241 (0,191÷0,295)	0,171* (0,120÷0,213)
Содержание ГЛ ткани	М	7,96 (5,91÷10,68)	7,80 (6,32÷10,23)	6,24* (3,96÷8,35)
	К	8,72 (6,32÷10,34)	9,07 (6,16÷13,58)	8,77 (6,29÷14,00)
	С	6,97 (5,35÷11,16)	7,08 (4,30÷8,65)	7,75 (4,00÷13,14)
Содержание ГАМК	М	2,26 (1,24÷3,04)	1,81* (1,08÷2,27)	2,16 (1,15÷2,97)
	К	2,26 (1,32÷3,85)	2,20 (1,31÷3,15)	2,33 (1,27÷3,70)
	С	2,55 (1,59÷4,16)	2,57 (1,54÷3,77)	2,15 (1,51÷5,31)

Примечание. Здесь и в табл. 2: М — мозжечок, К — кора, С — стволовая часть. Представлены средние данные из 8—12 опытов. В скобках — предел колебаний. Звездочка — $p < 0,05$.

янии на обмен аминокислот, в том числе медиаторных. В то же время известно, что ПАЛФ является активным альдегидом, который, взаимодействуя с аминокислотами белков (в том числе ферментов), модифицирует их, приводя к появлению неожиданных метаболических эффектов [9, 10, 14]. В связи с этим представляет интерес возможность использования шиффова основания ПАЛФ с ГАМК как потенциального средства коррекции метаболизма мозга. Его метаболические эффекты могут быть отличными от ПАЛФ вследствие включения таких факторов, как кинетика гидролиза альдиминной связи и возможного сопутствующего влияния ГАМК. В доклинических испытаниях нового соединения в НПО «Витамины» была выявлена его нейротропная активность с двухфазным компонентом: депримирующим и легким тонизирующим действием [3]. С учетом того что в широком плане ГАМК-производные рассматривают как потенциальные ноотропы [5], нами проведено сравнительное изучение влияния ПАЛФ и ПАЛФ-ГАМК на систему ГАМК-шунта и некоторые связанные с ним реакции в ЦНС животных. При этом мы руководствовались представлениями о ГАМК-шунте как компенсаторном пути обмена, обеспечивающем приспособление ЦНС к гипоксии [16].

Методика

Опыты поставлены на 60 белых линийных крысах-самцах Вистар массой 180—220 г, содержавшихся на стандартном рационе вивария. Животным внутрибрюшинно вводили ПАЛФ и ПАЛФ-ГАМК (препарат синтезирован в лаборатории гетероциклических соединений НИО «Витамины») в виде водных растворов и курсами (5 инъекций в течение 2 сут). Дозы ПАЛФ и ПАЛФ-ГАМК были эквивалентны и составляли 10 и 15 мг/кг (одномоментно) или 50 и 75 мг/кг (суммарно). Контрольным животным вводили физиологический раствор по той же схеме. Ранее мы установили [6], что после серии инъекций ПАЛФ изменения в системе ГАМК приобретают фазный характер, причем наиболее выраженные сдвиги наблюдаются через 1 ч после последней инъекции препарата, поэтому этот срок был выбран для проведения настоящего исследования. Животных декапитировали через 1 ч после последней инъекции препаратов, головной мозг извлекали, на холоду разделяли на мозжечок, кору и оставшуюся часть мозга, которую условно обозначали как стволовую часть. В гомогенатах отделов мозга определяли активность ферментов обмена ГАМК — глутаматдекарбоксилазы (ГДК) и ГАМК- α -кетоглутаратаминотрансферазы (ГАМК-Т) методами И. А. Сытинского и М. Ш. Промыслова в нашей модификации [6]. В случае ГДК определяли максимальную и «исходную» ГДК-активность, проявляющуюся в гомогенатах ткани мозга без насыщения субстратом и кофактором. Одновременно методом хроматографии на бумаге определяли содержание ГАМК и глутамата (ГЛ). Кроме того, исследовали активность аспартат- и аланинаминотрансферазы (АСТ и АЛТ) [4] и интенсивность окисления α -кетоглутарата феррицианидным методом [11]. В отдельной серии экспериментов оценивали влияние ПАЛФ (50 мкМ) *in vitro*

Изменения активности аминотрансферазы и α -КГД (в мкмоль·мин⁻¹·г⁻¹ ткани) в различных отделах головного мозга крыс после введения ПАЛФ и ПАЛФ-ГАМК

Показатель	Отдел мозга	Контроль	Введение ПАЛФ	Введение ПАЛФ-ГАМК
Активность АСТ	М	9,66 (7,98÷11,0)	8,06* (7,00÷9,49)	7,71* (6,08÷10,23)
	К	6,31 (5,12÷7,33)	5,59 (4,17÷7,61)	4,59 (3,70÷5,83)
	С	6,41 (4,75÷8,83)	5,52* (4,45÷6,77)	4,52 (3,58÷5,50)
Активность АЛТ	М	1,35 (0,88÷1,88)	2,04* (1,10÷3,28)	1,51* (0,82÷2,06)
	К	1,01 (0,45÷1,78)	0,95 (0,40÷1,70)	0,70* (0,28÷1,17)
	С	0,84 (0,57÷1,45)	0,97 (0,55÷1,38)	0,82 (0,22÷1,42)
α -КГД	М	0,728 (0,537÷0,841)	0,757 (0,519÷0,967)	0,871* (0,716÷1,181)
	К	0,690 (0,555÷0,877)	0,905* (0,573÷1,110)	0,903* (0,734÷1,092)
	С	0,611 (0,448÷0,895)	0,933* (0,716÷1,128)	0,870* (0,734÷1,199)

на активность α -кетоглутаратдегидрогеназы (α -КГД) и аминотрансферазы. В этом случае опыты ставили в двух вариантах: измерение активности α -КГД, АСТ и АЛТ в присутствии 50 мкМ ПАЛФ без преинкубации и после 10-минутной преинкубации с ПАЛФ при 37 °С.

Результаты обработаны статистически с применением критерия Вилкоксона — Манна — Уитни.

Результаты и обсуждение

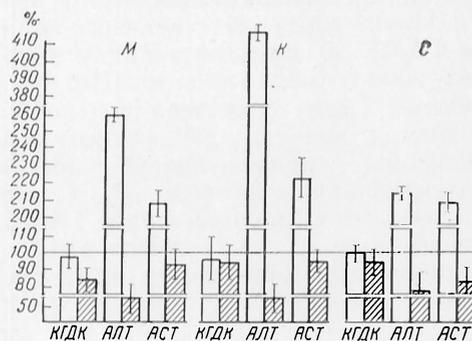
Как видно из табл. 1, введение ПАЛФ вызывает ряд закономерных изменений в системе ГАМК, отличающихся своеобразием в различных отделах мозга. Основной тенденцией изменений максимальной активности ферментов обмена ГАМК (несмотря на то что оба они пиридоксальзависимы) было снижение. Так, максимальная активность ГДК снижалась во всех исследованных отделах мозга на 22—32 % (в мозжечке и стволовой части достоверно). Активность ГАМК-Т в коре и стволовой части мозга практически не изменялось, а в мозжечке, где отмечался более высокий ее исходный уровень, достоверно снижалась. В то же время измерение исходной активности ГДК после введения ПАЛФ показало, что если в мозжечке и коре она не изменялась, то в стволовой части мозга наблюдался достоверный и значительный прирост ПАЛФ-независимой активности ГДК.

Таким образом, снижение максимальной активности ферментов обмена ГАМК сочеталось с активацией исходной активности ГДК. Характерно, что изменения активности других ПАЛФ-зависимых ферментов также были неоднородными (табл. 2). Так, активность АСТ заметно снижалась во всех исследованных отделах мозга (в моз-

жечке и стволе мозга достоверно), а активность АЛТ проявляла тенденцию к повышению, особенно в мозжечке. В то же время отмечалась активация не зависящей от ПАЛФ как кофактора активности α -КГД (на 30—50 % в коре и стволовой части мозга).

Эти результаты целесообразно сопоставить с данными, полученными при определении активности α -КГД и добавлении ПАЛФ *in vitro*. Как видно на рисунке, при добавлении 50 мкМ ПАЛФ в среду наблюдается снижение α -КГД-активности на 3—5 %, преинкубация с ПАЛФ усиливала этот эффект до 10—15 %. В то же время активность АСТ и АЛТ возрастала в 2—3 раза, однако преинкубация с ПАЛФ устраняла эффект активации аминотрансфераз (возможные причины этого обсуждаются в нашей предыдущей публикации [7]).

Таким образом, метаболические эффекты ПАЛФ *in vitro* и *in vivo* были



Изменения активности α -КГД, АСТ и АЛТ в присутствии 50 мкМ ПАЛФ (в % от контроля).

М — мозжечок, К — кора, С — стволовая часть мозга. Светлые столбики — активность ферментов в присутствии 50 мкМ ПАЛФ без преинкубации, заштрихованные — то же после преинкубации в присутствии ПАЛФ.

прямо противоположными. Эти результаты находят подтверждение в литературе. Так, *in vitro* ПАЛФ (0,05—10 мМ) инактивирует очищенные препараты лактатдегидрогеназы [10], пируватдегидрогеназы из мозга крысы [14] и сукцинат-убихинон-редуктазного комплекса дыхательной цепи митохондрий [9]. В то же время подкожное введение мышам ПАЛФ (2—4 мкмоль·кг⁻¹) вызывает отчетливое повышение активности ГДГ в течение 4 сут после инъекции [17].

Результаты, полученные *in vitro*, объясняются прямым влиянием ПАЛФ как активного альдегида на свободные аминокислоты белков-ферментов, в том числе принадлежащие активным центрам [9, 10, 14].

Разнообразие и неоднородность эффектов ПАЛФ *in vivo* обусловлены рядом причин. Прежде всего следует учитывать, что проницаемость гематоэнцефалического барьера к ПАЛФ ограничена [1]. Уровень ПАЛФ в отделах мозга, как полагают, жестко предопределен неоднородностью в распределении пиридоксалькиназой активности [2] и остается сравнительно неизменным как при развитии В₆-авитаминоза [15], так и при введении избыточных количеств витамина В₆. Необходимо учитывать возможность дефосфорилирования ПАЛФ с образованием витаминов В₆ [12], которые лучше транспортируются через гистогематические барьеры с последующим вторичным превращением в ПАЛФ (уже в других дозах и соответственно с другими эффектами). На метаболические эффекты многократно вводимого ПАЛФ большое влияние оказывают фармакодинамика препарата, быстрота его выведения из организма, возможность депонирования в печени и подверженности гепатодуоденальной рециркуляции.

Поэтому представляет интерес сравнение эффектов ПАЛФ и его шиффо-ва основания с ГАМК. Как видно из табл. 1 и 2, эффекты ПАЛФ-ГАМК на максимальную активность ферментов обмена ГАМК были принципиально такими же, как и эффекты ПАЛФ, но в ряде случаев менее выраженными. Так, степень угнетения максимальной активности ГДК во всех отделах мозга и активности ГАМК-Т в мозжечке, а также активности АЛТ после введения ПАЛФ-ГАМК была меньше, чем после

введения ПАЛФ. Однако увеличение исходной активности ГДК, активности α -КГД в мозжечке и торможение активности АСТ во всех отделах мозга и активности АЛТ в коре и стволовой части мозга было более выраженным. Таким образом, введение в состав молекулы ПАЛФ остатка ГАМК, связанного нестойкой альдиминной связью, обуславливает некоторые количественные модификации эффекта ПАЛФ, не меняя направленности и характера изменений в ЦНС. Это свидетельствует о том, что основу изменений формирует ПАЛФ, а также о быстрой биотрансформации ПАЛФ-ГАМК в организме с освобождением ПАЛФ. Эффекты самой ГАМК, отмеченные ранее в серии контрольных экспериментов [8], особенно активация ГАМК-Т и АСТ, при этом не наблюдаются.

Следует подчеркнуть, что содержание ГАМК и ГЛ после серии инъекций ПАЛФ и ПАЛФ-ГАМК изменялось незначительно, однако обращает на себя внимание неоднородность эффектов исследуемых соединений по этим показателям: уровень ГЛ достоверно снижался в мозжечке под влиянием ПАЛФ-ГАМК, но не изменялся после введения ПАЛФ, уровень ГАМК в том же отделе мозга снижался под влиянием ПАЛФ, не изменяясь после введения ПАЛФ-ГАМК.

Следует отметить, что наиболее выраженные и достоверные изменения в системе ГАМК и связанные с ней аминокислотные реакции возникали в мозжечке и стволовой части мозга, в которых исходная активность этих ферментов была более высокой. Можно предположить, что это связано с особенностями регуляции ферментов ГАМК-шунта, основным фактором которой является уровень ПАЛФ и его производных ПАЛФ-ГАМК и ПАЛФ-ГЛ [16].

Оценивая соотношение между ГАМК-шунтом и α -КГД-реакцией (при максимальном уровне активности), мы приходим к заключению, что многократное введение ПАЛФ и ПАЛФ-ГАМК ограничивает возможности потока через ГАМК-шунт, одновременно повышая пропускную способность основного пути обмена — α -КГД. Таким образом, *in vivo* у интактных животных эффекты ПАЛФ и его производных далеко не всегда однозначно следует расценивать как стимуляцию аминокис-

лотного обмена. Эти эффекты слагаются из коферментного и некоферментного действия ПАЛФ, опосредуются через регуляторные системы организма, ограничиваются проницаемостью гистогематических барьеров. С учетом ряда специфических черт влияния ПАЛФ-ГАМК (сравнительно менее выраженное уменьшение максимальной активности ГДК и ГАМК и более выраженное увеличение исходной активности ГДК) применение ПАЛФ-ГАМК следует признать более целесообразным с точки зрения направленного воздействия на интенсивность ГАМК-шунта в ЦНС.

Нам представляется, что сочетание ПАЛФ с ГАМК и другими субстратами ГАМК-шунта (в виде как шиффо-ва основания, так и смеси веществ) может быть перспективным в плане разработки подходов к направленной регуляции обмена ГАМК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Букин Ю. В. // Экспериментальная витаминология. — Минск, 1979. — С. 385—410.
2. Букин Ю. В., Иванова А. Л. // Биохимия. — 1976. — Т. 41, № 2. — С. 237—246.
3. Ковлер М. А., Караев А. Л., Копелевич В. М. и др. // Хим. фарм. журн. — 1987. — № 9. — С. 1051—1054.
4. Осадчая Л. М. // Методы биохимических исследований. — Л., 1982. — С. 246—250.
5. Раевский К. С., Георгиев В. П. Медиаторные аминокислоты. — М., 1986.
6. Розанов В. А. // Вопр. мед. химии. — 1980. — № 1. — С. 42—46.
7. Розанов В. А., Карпович Г. А., Мулюкина И. И. // Там же. — 1987. — № 3. — С. 129—132.
8. Розанов В. А., Карпович Г. А., Сергеева О. Н., Копелевич В. М. // Там же. — 1988. — № 1. — С. 29—33.
9. Чоудри Э. М., Котляр А. В., Виноградов А. Д. // Биохимия. — 1986. — Т. 51, № 9. — С. 1411—1419.
10. Chen Soo-Se, Engel P. C. // Biochem. J. — 1975. — Vol. 151, N 2. — P. 447—449.

11. Gubler C. J. // J. biol. Chem. — 1961. — Vol. 236, N 12. — P. 3112—3129.
12. Kyaw A. // Biochem. Med. — 1980. — Vol. 24, N 1. — P. 27—32.
13. Meisler N. T., Thanassi I. W. // J. Nutr. — 1980. — Vol. 110, N 10. — P. 1965—1975.
14. Ngo T. T., Berbeau A. // Int. J. Biochem. — 1979. — Vol. 10, N 11. — P. 937—941.
15. Spector R. // J. Neurochem. — 1978. — Vol. 30, N 4. — P. 881—887.
16. Tapia R. // Handbook of Neurochemistry / Ed. A. Lajtha. — New York, 1983. — Vol. 3. — P. 423—466.
17. Villela G. G., Calcagnotto A. M. // J. Nutr. Sci. Vitaminol. — 1977. — Vol. 23, N 1. — P. 19—22.

Поступила 15.03.88

ALTERATIONS IN GABA-SYSTEM OF BRAIN AFTER MULTIPLE ADMINISTRATION OF PYRIDOXAL-5'-PHOSPHATE AND ITS SHIFF BASE WITH GABA

V. A. Rozanov, V. M. Kopelevich, I. V. Savitsky

Medical School, Odessa

A state of the γ -aminobutyric acid (GABA) system (glutamate, glutamate decarboxylase, GABA, GABA- α -ketoglutarate aminotransferase) and the coupled reactions (α -ketoglutarate dehydrogenase complex, aspartate- and alanine aminotransferases) was studied in three brain structures (cerebellum, brain cortex and *truncus cerebri*) after multiple administration of pyridoxal-5'-phosphate (PALP) and its Shiff base with GABA (5 injections at doses 10.0 and 15.0 mg/kg of body mass, respectively). Non-coenzymatic effects of PALP were found to prevail within 1 hr after its last administration: inhibition of PALP-dependent aminotransferases and activation of the α -ketoglutarate oxidative decarboxylation were observed. The opposite effects were detected after addition of PALP to brain homogenates *in vitro*. Administration of the PALP-GABA complex exhibited qualitatively similar to those of PALP effects on the reactions studied in brain. The data obtained suggest that parenteral administration of the coenzyme preparation caused a number of metabolic effects, which are sometimes far from unambiguously predicted theoretical considerations. The similarity of PALP and PALP-GABA effects appears to demonstrate ready biotransformation of the Shiff base with liberation of PALP and GABA.

УДК 616.153.922-02:616.39]-092.9-07:616-008.939.15

А. Б. Косухин, Л. А. Махонина, Э. А. Ким, Р. Т. Сыздыкова

МЕХАНИЗМ ФОРМИРОВАНИЯ СПЕКТРА НЕЭСТЕРИФИЦИРОВАННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ У КРОЛИКОВ С АЛИМЕНТАРНОЙ ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИЕЙ

Институт физиологии АН Казахской ССР, Научно-исследовательский кожно-венерологический институт Минздрава Казахской ССР, Алма-Ата

Циркулирующие неэстерифицированные жирные кислоты (НЭЖК) служат пластическим и энергетическим материалом для различных органов и тка-

ней. Мобилизация НЭЖК в плазму крови происходит в результате гидролиза триацилглицеридов (ТГ) в клетках жировой ткани, катализируемого

специфическими липазами [4, 13]. Другой важный источник НЭЖК — циркулирующие липопротеиды (ЛП), богатые ТГ, — хиломикроны (ХМ) и ЛП очень низкой плотности (ЛПОНП). Гидролиз ТГ ХМ и ЛПОНП катализируется в основном липопротеидлипазой (ЛПЛ, КФ 3.1.1.34), локализованной на гликокаликсе эндотелиальных клеток капилляров, главным образом жировой ткани, миокарда, а также скелетной мускулатуры, легких и некоторых других тканей, в паренхиматозных клетках которых вырабатывается фермент. Гидролиз частично делипидированных ХМ и ЛПОНП (ремнантов) протекает в основном при участии печеночной эндотелиальной липазы (ПЭЛ, КФ 3.1.1.3), синтезирующейся гепатоцитами и локализованной на эндотелии печеночных синусоидов. Часть НЭЖК, образующихся в результате делипидирования ЛП, диффундирует в ткани; другая часть, связываясь с альбумином, остается в кровотоке [17].

Селективное поглощение из плазмы крови качественно разнородных НЭЖК является одним из факторов гомеостаза сердечной мышцы [2, 27]. Изменяющийся в условиях алиментарной гиперхолестеринемии состав НЭЖК [1], следовательно, должен оказывать влияние на состояние миокарда. В то же время механизм формирования пула НЭЖК в условиях гиперхолестеринемии нельзя считать установленным.

В связи с изложенным мы поставили задачу охарактеризовать в условиях алиментарной экспериментальной гиперхолестеринемии активность внутриклеточного липолиза ТГ жировой ткани, активности ЛПЛ жировой ткани и миокарда, а также активности постгепариновых липолитических ферментов — ЛПЛ и ПЭЛ — плазмы крови, сопоставив эти данные со спектром НЭЖК, ТГ ЛП, делипидируемых в плазме крови и ТГ жировой ткани.

Методика

Опыты поставлены на 14 кроликах-самцах породы шиншилла массой тела 2,5—3 кг. Экспериментальную гиперхолестеринемию вызывали у 7 животных путем скармливания 50 % взвеси холестерина (ХС) в подсолнечном масле из расчета 0,2 г на 1 кг массы тела ежедневно в течение 5 нед. Взятие крови и лимфы из кишечного ствола осуществляли у кроликов, лишенных пищи в течение 20 ч, но получавших воду *ad libitum*, под гексенало-

вым наркозом. Постгепариновую кровь брали через 10 мин после внутривенного введения гепарина в дозе 50 ЕД на 1 кг массы тела [9]. Затем производили торакотомию, вырезали сердце, которое промывали холодным (4°C) физиологическим раствором, и тщательно освобождали мышечную оболочку от других тканей. Жировую ткань получали из позадибрюшинной клетчатки [26]. Предшествующее введение гепарина не оказывает влияния на активность ЛПЛ в паренхиматозных клетках [15].

Определение липолитической активности производили тотчас по получении тканей, из которых готовились водные гомогенаты. 1 г сердечной мышцы или жировой ткани гомогенизировали в 3 мл 0,154 М раствора КСl при 4°C. Активность ЛПЛ определялась по методу [16] с некоторыми модификациями. Субстратная смесь состояла из 0,7 мл 10 % раствора альбумина в 0,2 М трис-НСl буфере рН 8,5; 0,1 мл ТГ-субстрата, который готовился *ex tempore* путем инкубации 20 % жировой эмульсии, липофундина С («Leifas», Финляндия) с сывороткой крови собаки в соотношении 1:1 в течение 30 мин при 37°C и содержала 2,4 ЕД/мл гепарина, 2,4 мг/мл глюкозы, 0,012 ЕД/мл инсулина. Гетеросыворотка служила в качестве облигатного кофактора ЛПЛ — апопротеина С-II; гепарин — субстрата связывания ЛПЛ; инсулин и глюкоза — ингибиторов внутриклеточных липаз. В субстратную смесь вносили 0,2 мл тканевого гомогената, после чего полученную систему инкубировали в условиях постоянного помешивания при 37°C в течение 1 ч. О липолитической активности судили по скорости прироста НЭЖК в реакционной смеси.

Для определения постгепариновой липолитической активности 0,2 мл цитратной плазмы крови вносили в субстратную смесь аналогичного состава, но не содержащую гетеросыворотки, так как имеющийся в последней активатор ЛПЛ — апопротеин С-II, а также ряд других веществ являются ингибиторами ПЭЛ [19]. В указанную субстратную смесь также не вносили гепарин, глюкозу и инсулин. С целью определения индивидуальной активности ПЭЛ в реакционную смесь дополнительно вводили NaCl в концентрации 1 М [9, 10]. Условия инкубации реакционных смесей были такие же, как и при определении активности тканевых ЛПЛ. Активность ЛПЛ в постгепариновой плазме крови подсчитывали по разнице между общей постгепариновой липолитической активностью и остаточной активностью плазмы крови после торможения ЛПЛ-реакции 1 М NaCl [9, 10].

Об активности внутриклеточного липолиза ТГ жировой ткани судили по степени прироста НЭЖК в среде инкубации, состоявшей из 12 % альбумина в 0,2 М трис-НСl буфере рН 7,6 и гомогената в соотношении 1:1 [26]. Инкубацию реакционной смеси также производили при 37°C в течение 1 ч.

Сарколемму миокарда выделяли методом [3]. Полученные препараты содержали белок, фосфолипиды (ФЛ) и ХС в среднем в соотношениях (по массе) 5,1:2,3:1,0, что соответствует данным литературы о химическом составе плазматической мембраны [4, 7].

Концентрацию ХС в биосубстратах определяли по методу [12]; ТГ — с помощью стандартных наборов производства «Lachema», ЧССР; НЭЖК — по методу [22]; ФЛ — по

Концентрация ХС, ТГ, НЭЖК в плазме крови и мезентериальной лимфе кроликов при гиперхолестеринемии

Показатель	Норма			Гиперхолестеринемия		
	ХС	ТГ	НЭЖК	ХС	ТГ	НЭЖК
Плазма крови	1,51±0,16	0,26±0,06	0,43±0,08	9,63±3,48	1,00±0,29	0,68±0,16
Лимфа	0,81±0,08	1,13±0,19	0,48±0,12	4,03±0,60	1,53±0,52	0,59±0,12

методу [23]; общего белка — биуретовым методом; альбумина — по методу [8].

Выделение из физиологических жидкостей суммарной фракции частиц, делинидируемых в плазме крови (т. е. ХМ, ЛПОНП и их ремнантов), осуществляли после предварительного осаждения ЛП низкой плотности гепарин-цитратной смесью [18], методом гепарин-марганцевой преципитации [14], который обеспечивает седиментацию апопротеин В, Е-содержащих частиц [20]. Липиды из суммарной фракции ХМ, ЛПОНП и их ремнантов экстрагировали хлороформ-метаноловой смесью (2:1 по объему); нейтральные липиды, а также ФЛ сарколеммы миокарда разделяли в тонком слое силикагеля пластин «Silufol UV-254» (ЧССР), как описано ранее [6]. С пластин соскабливали зоны силикагеля, соответствующие НЭЖК, ТГ, ФЛ, а также лизофосфолипидам (ЛФЛ), и проводили реакцию метилирования [24]. Метилловые эфиры высших жирных кислот анализировали на газовом хроматографе «Сhrom-5» (ЧССР) с пламенно-ионизационным детектором. Колонки из нержавеющей стали длиной 2,5 м, диаметром 3 мм заполняли хроматоном N/AW-HMDS («Chemapol, ЧССР) с нанесенным на него полиэтиленгликольсукцинатом в соотношении 10:1. Размер зерна твердого носителя 0,12—0,16 мм. Режим изотермический. Температура термостата 180 °С, испарителя и детекторов 210 °С. Газ-носитель — аргон. Пики на хроматограммах идентифицировали по удерживаемым объемам метилловых эфиров стандартных жирных кислот.

Результаты исследований обрабатывали статистически с использованием критерия *t* Стьюдента. Данные в работе представлены в виде средних арифметических и средних ошибок их репрезентативности.

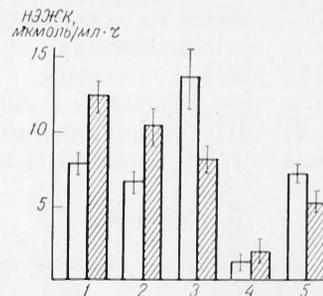
Результаты и обсуждение

Данные о содержании ХС и ТГ в плазме крови и мезентериальной лимфе у кроликов интактной и гиперхолестеринемической групп свидетельствуют, что у животных опытной группы развилась умеренная гиперхолестеринемия (табл. 1).

Как видно из рисунка, у кроликов с гиперхолестеринемией существенно снижалась внутриклеточная липолитическая активность жировой ткани; активность ЛПЛ жировой ткани достоверно возрастала, а активность ЛПЛ

миокарда, напротив, понижалась ($p < 0,05$). Активность постгепариновой ЛПЛ плазмы крови у кроликов с гиперхолестеринемией несколько увеличивалась, в то время как значимых различий в уровне активности ПЭЛ у животных исследованных групп не выявлено.

Хотя активация постгепариновой ЛПЛ в плазме крови кроликов с гиперхолестеринемией и является известным фактом [9], наши данные дополняют эти сведения тем, что позволяют связывать повышение липолитической активности плазмы крови у кроликов с гиперхолестеринемией с активацией ЛПЛ жировой ткани, но не миокарда. Считается, что пониженная активность ЛПЛ в паренхиме сердечной мышцы может быть обусловлена только уменьшением образования самого фермента [15]. Повышение активности ЛПЛ жировой ткани при понижении в ней активности внутриклеточного липолиза согласуется с тем, что ЛПЛ и фермент, лимитирующий скорость внутриклеточного гидролиза ТГ в адипоцитах — гормончувствительная липаза, находятся в реципрокных отношениях друг с другом [13, 17].



Активность постгепариновой ЛПЛ плазмы крови (1), ЛПЛ жировой ткани (2), ЛПЛ миокарда (3), ПЭЛ (4), внутриклеточного липолиза ТГ жировой ткани (5) кроликов при гиперхолестеринемии.

Светлые столбчки — норма, заштрихованные — гиперхолестеринемия.

Состав НЭЖК и жирно-кислотных остатков ТГ суммарной фракции ХМ, ЛПОНП и их ремнантов мезентериальной лимфы и плазмы крови, а также ТГ жировой ткани кроликов при гиперхолестеринемии (в %)

Форма ацила	ТГ			НЭЖК	
	лимфа	плазма крови	жировая ткань	лимфа	плазма крови
C _{14:0}	4,7±0,3	7,8±1,3	6,6±0,8	10,3±2,7	7,8±1,0
	6,8±1,3	5,3±1,1	5,0±0,9	4,8±0,9	5,0±1,6
C _{14:1}	6,0±3,8	5,8±1,6	2,4±0,8	3,3±1,1	6,0±1,1
	5,8±1,3	2,6±1,3	2,0±0,4	5,3±1,1	4,5±1,3
C _{16:0}	26,0±0,6	31,8±3,8	34,4±2,0	25,0±5,8	28,2±3,0
	32,3±7,7	34,0±5,8	39,3±2,7	35,3±6,7	31,0±1,1
C _{16:1}	2,7±1,5	3,6±1,3	2,4±0,8	2,8±1,0	2,5±1,0
	3,0±2,2	2,3±1,0	3,5±0,7	8,3±2,9	4,0±1,3
C _{18:0}	9,3±0,3	8,5±0,7	6,6±1,0	11,8±1,3	12,5±2,1
	14,6±3,3	16,5±3,1*	9,0±1,1***	11,7±2,3*	21,0±3,3*
C _{18:1}	35,3±2,6	29,5±3,6	38,0±2,1	28,3±2,4	25,2±1,4
	24,3±7,1	26,0±4,0	33,5±2,5	19,3±5,5	21,5±2,3
C _{18:2}	16,0±0,6**	12,0±1,1	9,6±0,8	18,5±1,5	17,8±2,5
	13,4±3,6	15,0±4,3	8,0±1,1	9,3±3,8*	13,0±0,7
C _{20:4}	Следы	0,8±0,3	Следы	Следы	Следы
		0,3±0,1			

Примечание. Одна звездочка — $p < 0,05$ по сравнению с нормой; две — $p < 0,05$ между лимфой и плазмой крови; три — $p < 0,05$ между ТГ жировой ткани и ТГ суммарной фракции ХМ, ЛПОНП и их ремнантов плазмы крови. Числитель — норма, знаменатель — гиперхолестеринемия.

Показано [25], что катаболизм ЛПОНП в перфузируемом сердце крысы сопровождается задержкой тканями ХС и апопротеина В. Высвобождение ЛПЛ из капилляров миокарда гепарином приводило к резкому снижению накопления ХС и апопротеина В в сердце. Возможно, что понижение активности ЛПЛ в сердечной мышце является защитной реакцией, направленной против перегрузки кардиомиоцитов ХС.

В табл. 2 представлен спектр НЭЖК плазмы крови, в котором в условиях гиперхолестеринемии существенно возросла доля стеариновой кислоты. Такие же изменения наблюдались и в ТГ суммарной фракции ХМ, ЛПОНП и их ремнантов. В то же время состав жирно-кислотных радикалов ТГ жировой ткани у кроликов с гиперхолестеринемией оставался неизменным.

Известно, что в плазме крови кроликов с алиментарной гиперхолестеринемией аккумулируются ремнанты ХМ и ЛПОНП [21, 28]. При этом скорость гидролиза эфиров ненасыщенных жирных кислот в плазме крови превышает скорость гидролиза эфиров насыщенных ацилов [11], с чем, вероятно, и связана аккумуляция насыщенных

жирно-кислотных остатков и, в частности, стеарата в ТГ ремнантов ХМ и ЛПОНП. Накопление указанных ЛП в известной мере может быть обусловлено низкой активностью ПЭЛ по сравнению с ЛПЛ в плазме крови у кроликов с гиперхолестеринемией [9], что и выявлено в наших исследованиях (см. рисунок). После захвата ремнантов ХМ и ЛПОНП клетками печеночной паренхимы ТГ гидролизуются, а освобождающиеся жирные кислоты могут быть использованы в реакции внутриклеточного ацилирования ХС [4], которая служит главным источником ХС у кроликов с гиперхолестеринемией [5]. Стеарат — наилучший субстрат для указанной реакции [7], и поэтому в большей степени, чем другие ацилы, должен ресекретироваться ЛП-продуцирующими клетками в физиологические жидкости в составе ТГ. Указанным, по-видимому, объясняется существенное увеличение доли стеарата в ТГ у кроликов с гиперхолестеринемией в наших опытах.

Поскольку перенос ТГ-богатых ЛП кишечного генеза в кровотоки осуществляется исключительно при помощи лимфатической системы [4, 17], в условиях алиментарной гиперхолестери-

Состав НЭЖК и жирно-кислотных остатков ФЛ и ЛФГ сарколеммы миокарда кроликов при гиперхолестеринемии (в %)

Форма ацила	НЭЖК		ФЛ		ЛФГ	
	норма	гиперхолестеринемия	норма	гиперхолестеринемия	норма	гиперхолестеринемия
C _{14:0}	13,1±2,4	9,8±2,4	6,9±2,4	5,6±2,1	10,8±2,7	7,8±2,6
C _{14:1}	8,0±1,4	6,6±1,5	1,1±0,3	2,2±1,0	2,5±1,1	0,8±0,2
C _{16:0}	23,2±1,8	27,8±2,8	28,5±2,1	29,5±2,0	24,0±2,3	25,2±2,4
C _{16:1}	3,2±1,4	7,8±2,3	2,1±0,3	5,0±1,6	5,3±2,9	2,4±0,9
C _{18:0}	14,7±1,8	19,2±1,3*	20,3±2,3	18,0±2,0	14,8±4,5	21,8±4,1
C _{18:1}	21,8±1,3	17,4±1,3*	20,0±1,2	22,5±0,9	23,8±1,8	22,6±2,3
C _{18:2}	16,0±2,7	11,4±1,5	13,5±2,1	11,1±0,9	14,0±1,8	15,8±1,9
C _{20:4}	Следы	Следы	7,6±1,4	6,1±1,2	4,8±2,2	3,6±1,1

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

немии особый интерес представляют данные о составе фракции ЛП, ответственной за транспорт этого класса липидов в брыжеечной лимфе. У интактных животных имеется существенная разница в составе ТГ двух физиологических жидкостей. В частности, ТГ из лимфы кишечного ствола содержат большую долю линолеата. У кроликов с гиперхолестеринемией указанные различия нивелируются. Последнее, очевидно, связано, с одной стороны, с персистированием в плазме крови ремнантов ТГ-богатых ЛП кишечного генеза, с другой — с увеличением неспецифического эндоцитоза ЛП плазмы крови энтероцитами [7], что должно сказываться на составе секретируемых ими ТГ.

Уменьшение доли неэстерифицированной линолевой кислоты у кроликов с гиперхолестеринемией в мезентериальной лимфе (см. табл. 2) также, очевидно, связано с возрастанием роли эндоцитоза ЛП из плазмы крови энтероцитами в формировании НЭЖК кишечной лимфы. Как известно, часть жирных кислот попадает из эпителиоцитов тонкой кишки в интерстиций, а оттуда — в лимфу в свободном виде [1]. В составе основных носителей жирных кислот в условиях гиперхолестеринемии у кроликов — эфиров ХС и ФЛ — процентное содержание линолеата закономерно уменьшается [5]. Естественно, что после внутриклеточного гидролиза таких липидов доля образующейся свободной линолевой кислоты должна понижаться по сравнению с нормой.

В то же время существенные различия спектра НЭЖК мезентериальной

лимфы и плазмы крови в каждой из групп кроликов не выявлены. По-видимому, это отчасти обусловлено тем, что значительная часть НЭЖК брыжеечной лимфы происходит из плазмы крови, фильтруясь в ассоциации с альбумином через гематолимфатический барьер. Действительно, содержание альбумина в лимфе кишечного ствола составляло в норме $68 \pm 4\%$, при гиперхолестеринемии — $71 \pm 6\%$ от его содержания в плазме крови.

Отсутствие значимых изменений в составе ТГ жировой ткани у кроликов с умеренной гиперхолестеринемией в условиях наших опытов, очевидно, объясняется функционированием механизмов, обеспечивающих стабильный уровень депонирования ТГ в самих адипоцитах [1].

Таким образом, несмотря на снижение активности ЛПЛ миокарда, в условиях гиперхолестеринемии роль ацилов кишечного, в том числе и эндогенного происхождения, в обеспечении сердечной мышцы НЭЖК возрастает. Примечательно, что при умеренной гиперхолестеринемии содержание НЭЖК в плазме крови и лимфе существенно не изменялось (см. табл. 1), что согласуется с результатами работы [9]. Отсюда можно заключить, что в данных условиях механизмы поддержания постоянства концентрации НЭЖК в плазме крови в известной мере сохраняются, хотя соотношение между активностью различных ферментных систем, ответственных за продукцию циркулирующих НЭЖК, изменяется.

Известно, что миокард избирательно поглощает качественно разнородные НЭЖК из омывающей его жидко-

сти [2, 27]. Однако, как следует из наших данных (табл. 3), состав НЭЖК сарколеммы миокарда у кроликов с гиперхолестеринемией модифицировался. В спектре НЭЖК плазматической мембраны миокарда увеличилась доля стеарата, при этом доля олеината — кислоты, которую сердечная мышца поглощает из плазмы крови наиболее интенсивно [27], понижалась. Направленность преобразования состава НЭЖК сарколеммы миокарда у кроликов с гиперхолестеринемией та же, что и в плазме крови, причем между индексами свободный стеарат/сумма остальных кислот плазмы крови и сарколеммы у кроликов с гиперхолестеринемией выявлена прямая коррелятивная связь ($r=0,65$). В то же время состав жирных кислот ФЛ, в том числе и ЛФГ сарколеммы миокарда при гиперхолестеринемии, не отличался от такового у интактных животных. Следовательно, преобразования состава НЭЖК плазматической мембраны сердечной мышцы нельзя связать с изменениями в соотношении активности различных тканевых фосфолипаз.

Таким образом, у кроликов с алиментарной гиперхолестеринемией роль ТГ плазмы крови, а следовательно, и ТГ кишечного генеза, в формировании пула НЭЖК плазмы крови возрастает, что отражается на специфике состава циркулирующих свободных ацилов и их поглощения миокардом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алимova Е. К., Аствацатурьян А. Т., Жаров Л. В. Липиды и жирные кислоты в норме и при ряде патологических состояний. — М., 1975.
2. Бояринов Г. А., Богдарин Ю. А. // Кардиология. — 1983. — № 12. — С. 78—80.
3. Даниленко М. П., Ким Э. А., Есырев О. В., Омарова Р. Д. // Вопр. мед. химии. — 1983. — № 1. — С. 29—33.
4. Климов А. П., Никульчева Н. Г. Липопротеиды, дислипидопротеидемии и атеросклероз. — Л., 1984.
5. Косухин А. Б. // Вопр. мед. химии. — 1984. — № 4. — С. 36—39.
6. Косухин А. Б., Ахметова Б. С. // Там же. — 1986. — № 1. — С. 67—71.
7. Лопухин Ю. М., Арчаков А. И., Владимиров Ю. А., Коган Э. М. Холестериноз. — М., 1983.
8. Лукичева Г. И., Сентебова Н. А. // Лаб. дело. — 1978. — № 4. — С. 227—233.
9. Солитернова И. Б., Никульчева Н. Г. // Кардиология. — 1980. — № 8. — С. 34—38.
10. Солитернова И. Б., Никульчева Н. Г. // Вопр. мед. химии. — 1982. — № 1. — С. 89—92.

11. Титов В. Н., Чернядьева И. Ф., Громадова М. М. // Лаб. дело. — 1986. — № 2. — С. 707—715.
12. Abell L. L., Levy B. B., Brodie B. B., Kendall F. E. // J. biol. Chem. — 1952. — Vol. 195. — P. 357—366.
13. Belfrage P., Fredrikson G., Stolfors P., Tornquist H. // Lipases / Eds B. Böttgerström, H. L. Brockman. — Amsterdam, 1984. — P. 365—416.
14. Burstein M., Scholnick H. R. // Advanc. Lipid Res. — 1973. — Vol. 11. — P. 68—108.
15. Cryer A. // Int. J. Biochem. — 1981. — Vol. 13. — P. 525—541.
16. Cryer A., Jones H. H. // Ibid. — P. 109—111.
17. Hamosh M., Hamosh P. // Molec. Aspects Med. — 1983. — Vol. 6. — P. 199—289.
18. Henrich W., Seidel D. // J. Lipid Res. — 1983. — Vol. 24. — P. 904—909.
19. Jahn C. E., Osborne J. C., Shaefer E. J., Bruwer H. B. // Europ. J. Biochem. — 1983. — Vol. 131. — P. 25—29.
20. Mahley R. W., Innerarity T. L. // J. biol. Chem. — 1977. — Vol. 252. — P. 3980—3986.
21. Mahley R. W., Innerarity T. L., Rall S. C. et al. // J. Lipid Res. — 1984. — Vol. 25. — P. 1277—1294.
22. Mikac-Devic D., Stancovic H., Bascovic K. // Clin. chim. Acta. — 1973. — Vol. 45. — P. 55—59.
23. Svanborg A., Svennerholm L. // Acta med. scand. — 1962. — Vol. 169. — P. 43—49.
24. Stoffel W., Chu F., Ahrens E. H. // Analyt. Chem. — 1959. — Vol. 31. — P. 307—308.
25. Tam S. P., Breckenridge W. C. // Biochim. biophys. Acta. — 1984. — Vol. 793. — P. 61—71.
26. Vaughan M., Berger J. E., Steinberg D. // J. biol. Chem. — 1964. — Vol. 239. — P. 401—409.
27. Vusse G. M., Roeman T. H. M., Flaming W., Reneman R. S. // Biochim. biophys. Acta. — 1983. — Vol. 752. — P. 361—370.
28. Zilvermit D. B. // Atherosclerosis / Ed. A. M. Gotto et al. — New York, 1980. — P. 600—603.

Поступила 15.03.88

DEVELOPMENT OF UNESTERIFIED FATTY ACIDS SPECTRUM IN BIOLOGICAL FLUIDS OF RABBITS WITH ALIMENTARY HYPERCHOLESTEROLEMIA

A. B. Kosukhin, L. A. Makhonina, E. A. Kim, R. T. Syzdykova

Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Kazakh SSR, Dermatovenerological Institute, Ministry of Public Health of the Kazakh SSR, Alma-Ata

Increase in activity of fatty tissue lipoprotein lipase and blood plasma post-heparin lipoprotein lipase, decrease in activity of myocardial lipoprotein lipase as well as in the rate of intracellular lipolysis of triacylglycerols in fatty tissue, unaltered activity of liver tissue endothelial lipase were observed in rabbits with moderate alimentary hypercholesterolemia (9.63 ± 3.48 μ mole of cholesterol per ml of blood plasma as compared with 1.51 ± 0.16 μ mole/ml

under conditions of normal state). The ratio of stearate was increased in composition of unesterified fatty acids from blood plasma, mesenteric lymph and myocardial sarcolemma as well as in triacylglycerols of chylomicrons total fraction, in very low density lipoproteins and their remnants. Ratios free stearate/total content of other acids correlated in blood plasma and myocardial sarcolemma ($r=0.65$).

Any shifts in the spectra of fatty acid residues of phospholipids were not found in myocardial membranes. In rabbits with alimentary hypercholesterolemia importance of intestine-derived triacylglycerols for production of circulating unesterified fatty acids was increased, as a result of which the ratio of various acyls, metabolized in myocardium, was altered.

УДК 615.356:577.164.13].034.074

Е. Ю. Глинка, А. А. Сокольников, В. М. Коденцова

ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПАЛФ-ЭФФЕКТА КАК ПОКАЗАТЕЛЯ ОБЕСПЕЧЕННОСТИ ВИТАМИНОМ В₆

Институт питания АМН СССР, Москва

Оценке обеспеченности организма человека витамином В₆ посвящены многочисленные исследования [9, 32, 35]. Разнообразные метаболических процессов, в которых принимает участие этот витамин, дает возможность использовать для оценки обеспеченности организма витамином В₆ различные тесты. Определяют экскрецию с мочой витамин В₆ [9, 27] или метаболитов, накапливающихся при снижении активности превращающих их пиридоксальзависимых ферментов [9], активность самих пиридоксальзависимых ферментов и их активацию *in vitro* экзогенным пиридоксальфосфатом (ПАЛФ) [9, 16, 18, 19], концентрацию витамин В₆ в тканях [12]. При этом, естественно, возникает вопрос о совпадении результатов оценки обеспеченности, полученных разными способами. Поскольку нам недоступны независимые критерии адекватных методов оценки дефицита витамина В₆ [31], разумным выходом является обнаружение корреляций между данными, полученными разными методами. На основании исследований корреляций между данными тестов отдают предпочтение определению активности аминотрансфераз перед коэффициентом их активации экзогенным ПАЛФ *in vitro* [31], активности аминотрансфераз перед экскрецией с мочой ксантуреновой кислоты или оксалата [19]. Эти корреляции могут нарушаться при различных воздействиях на организм. Так, продукты метаболизма триптофана кинуренин и ксантуреновая кислота накапливаются не только при дефиците В₆, но и при повышении уровня эстрогенов в организме [14]. Стрес-

сорная индукция триптофанпирролазы усиливает синтез кинуренина, что может имитировать дефицит витамина В₆ [17]. Активность аспартатамиотрансферазы (АсАТ) изменяется при интоксикации [13] и даже при облучении животных светом в видимой области [7]. Коэффициент активации аминотрансфераз *in vitro* экзогенным ПАЛФ зависит от функционального состояния печени и почек [22]. Не обнаружена корреляция между содержанием ПАЛФ и величиной ПАЛФ-эффекта в отношении апо-АсАТ и апоаланинаминотрансферазы в сыворотке. Такие эндогенные вещества, как креатинин, мочевины, и другие неидентифицированные факторы более сильно влияют на стимуляцию аминотрансфераз экзогенным ПАЛФ *in vitro*, чем концентрация эндогенного ПАЛФ и, следовательно, обеспеченность витамином В₆.

Сложностью учета всех этих факторов и сложностью ПАЛФ-зависимых метаболических путей объясняется, по видимому, значительное варьирование параметров, соответствующих нормальной обеспеченности организма витамином В₆. Так, коэффициент активации АсАТ экзогенным ПАЛФ *in vitro* изменяется от 1,3 [19] до 2 [9], величины нормальной экскреции 4-пиридоксильной кислоты (4-ПК) с мочой варьируют от 0,52 [11] до 3—4 мг/сут [3]. Такой разброс значений создает значительные трудности в использовании этих тестов в практических целях. В настоящей работе мы попытались выявить причины разброса, модифицировать указанные методы оценки обеспеченности витамином В₆ с учетом по-

лученных результатов и установить соотношение между ними. С этой целью были использованы экспериментальные животные (одного пола, возраста, массы), содержащиеся в строго одинаковых условиях (рацион, сезон), что дает определенные преимущества. Кроме того, в работе были сопоставлены методические варианты тестов, предлагаемые разными авторами.

Методика

В опытах использовали самцов-отъемышей крыс породы Вистар с исходной массой 45—50 г. Алиментарный дефицит витамина В₆ вызывали содержанием животных на рационе, лишенном пиридоксина и включающем 19 % казеина, очищенного от витаминов, 42,7 % крахмала, 21 % сахарозы, 3 % целлюлозы, 4 % солевой смеси, 0,2 % холинхлорида.

Витаминная смесь (0,1 % рациона) имела следующий состав (в %): тиамин, рибофлавин по 0,5, фолиевая кислота 0,1, цианкобаламин 0,002, никотиновая кислота 2,0, пантотенат кальция 2,0, биотин 0,01, глюкоза до 100. С подсолнечным маслом (10 % рациона) внесли ретинолпальмитат в количестве 15 000 МЕ на 1 кг рациона и витамин D₃ — 2000 МЕ/кг. В рацион контрольных животных добавляли пиридоксин в количестве 0,001 %. Продолжительность опыта 4 нед.

Эритроциты из крови крыс, собранной после декапитации животного, или венозной крови здоровых людей выдслили по общепринятой методике (в качестве антикоагулянта использовали 3,8 % раствор цитрата натрия 1:9), промывали физиологическим раствором, гемолизировали в 19 объемах деионизованной воды и оставляли на 1 ч на холоду.

Активность АсАТ в системе, сопряженной с малатдегидрогеназой (МДГ), определяли по уменьшению оптической плотности при 340 нм [15] в среде следующего состава: 100 мМ трис-НСl рН 7,4, 0,18 мМ NADH. Количество МДГ подбирали экспериментально с таким расчетом, чтобы ее активность не лимитировала измерения активности АсАТ. Концентрации субстратов указаны в подписях к рисункам. Для сравнения активность АсАТ измеряли колориметрическим методом по величине поглощения 2,4-динитрофенилгидразона пирувата, образующегося при декарбосилировании оксалоацетата — продукта реакции, катализируемой АсАТ [1]. Удельную активность АсАТ выражали в микромолях в 1 мин на 1 мг гемоглобина.

Концентрацию гемоглобина измеряли гемиглобинцианидным методом с использованием набора реактивов отечественного производства по прилагаемой к набору методике.

Для определения активности фосфорилазы использовали фракцию, полученную после центрифугирования (12 000 g, 10 мин) 20 % гомогената почек в среде следующего состава: 5 мМ MgCl₂, 10 мМ β-меркаптоэтанол, 50 мМ KF, 150 мМ трис-НСl рН 7,4. Активность фосфорилазы А и Б определяли по нарастанию уровня неорганического фосфата по методу [33] в среде следующего состава: 0,4 % гликогена, 16 мМ глюкозо-1-фосфата,

1,5 мМ АМФ, 40 мМ КОН-малеатного буфера рН 6,8 при 37 °С.

Определение концентрации белка осуществляли биуретовым методом.

За 1—3 дня до окончания опыта крыс помещали в метаболические клетки для сбора мочи, лишая пищи и предоставляя воду без ограничения. Объем мочи доводили дистиллированной водой до 25 мл, замораживали и хранили при —20 °С.

4-ПК в моче определяли по методу Хаффа и Перлцвейга [1], N-метилникотинамид — по методу Хаффа, Перлцвейга и Тилдена [1], однако в соответствии с оригинальной методикой использовали внутренний стандарт для каждого образца мочи, т. е. флюоресценцию стандартного раствора измеряли непосредственно в моче.

Результаты и их обсуждение

Стандартизация метода измерения активности АсАТ и определение степени ее активации экзогенным ПАЛФ (ПАЛФ-эффект) посвящено много публикаций [9, 15]. Наибольшее распространение получили метод определения активности АсАТ в системе, сопряженной с МДГ [26], в которой превращение продукта аминотрансферазной реакции оксалоацетата сопровождается эквимольным окислением NADH, и метод колориметрического определения накопленного оксалоацетата после остановки реакции [30]. До последнего времени публикуются уточненные и исправленные методические рекомендации для определения активности АсАТ первым из этих методов. Авторы варьируют температуру инкубации [25], концентрацию и состав буфера, его рН, концентрацию NADH. Указывают, что фосфат при температуре выше 30 °С снижает сродство АсАТ к ПАЛФ [25], что точному определению могут мешать высокие концентрации алапина и NH_4^+ в сыворотке крови некоторых больных, а также прием ими лекарственных препаратов [29].

Несмотря на такую детальную разработку методов, по вопросу о том, какие величины удельной активности АсАТ и ПАЛФ-эффекта соответствуют нормальной обеспеченности, существуют разногласия. Так, одни авторы [9, 36] считают, что ПАЛФ-эффект больше 2 указывает на недостаток витамина В₆, а ниже 2 — на нормальную обеспеченность. Другие авторы полагают, что нормальной обеспеченности соответствует величина ПАЛФ-эффекта 1,4—1,8 [2] или менее 1,7 [23].

Сопоставление методов измерения активности АсАТ эритроцитов человека

№ образца	Базальная активность, мкмоль/мин на 1 мл гемо- лизата · 10 ⁻³		A _I /A _{II}	ПАЛФ-эффект	
	метод I (A _I)	метод II (A _{II})		метод I	метод II
1	18,0±0,9	6,7±0,2	2,7	1,7	1,6
2	32,9±0,2	8,4±1,0	3,9	1,4	1,4
3	20,6±0,1	7,1±0,6	2,9	1,3	1,8
4	30,8±0,1	6,1±0,6	4,9	1,7	1,6
5	22,6±0,2	7,8±1,0	2,9	1,8	1,8
6	27,7±0,2	6,1±0,5	3,7	1,3	1,6
Среднее . . .			3,5±0,66		

Примечание. Концентрация L-аспартата 2,0 мМ, α-кетоглутарата 10 мМ, экзогенного ПАЛФ 3,74 мкМ. Метод I—сопряженный с МДГ, метод II—колориметрический.

Мы предположили, что если противоречивость данных указанных авторов не обусловлена различиями в обследованных контингентах, то они могут быть связаны с использованием разных методов определения активности АсАТ, различиями в конечном разведении гемолизата, влиянием времени преинкубации или изменением ее условий.

В табл. 1 сопоставлены удельные активности и величины ПАЛФ-эффектов 6 препаратов гемолизатов эритроцитов людей, измеренные в системе, сопряженной с МДГ, и колориметрическим методом [1]. Величины активности усреднены для каждого образца по 4—5 измерениям. Разведение гемолизата в пробах и концентрации всех реактивов были одинаковыми. Из данных табл. 1 следует, что ПАЛФ-эффект не зависит от метода определения активности, а величины активности, измеренные в сопряженной системе, в среднем в 3 раза превышают значения активности, определенные по методу [1]. Поскольку время измерения активности в первом случае составляет 6—10 мин, а во втором — 60 мин, вероятной причиной занижения активности может быть отсутствие линейности накопления продукта реакции во времени в течение 60 мин. По крайней мере, по нашим данным, при измерении активности в сопряженной системе снижение скорости реакции, не обусловленное расходом NADH и других субстратов и снижением активности МДГ, наблюдалось уже через 15—20 мин после ее начала.

Удельная активность и ПАЛФ-эффект (табл. 2) не зависят от времени преинкубации с ПАЛФ и субстратом в пределах от 3 до 25 мин. Однако, если начинать реакцию добавлением фермента к инкубационной смеси (время преинкубации равно нулю), то базальная активность сохраняется на прежнем уровне, а активность в присутствии экзогенного ПАЛФ оказывается несколько сниженной. Очевидно, для связывания ПАЛФ с апо-АсАТ в этих условиях требуется не более 3 мин. Длительная преинкубация — в течение 1—2 ч, которую рекомендуют некоторые авторы [21], по-видимому, влияет не на связывание ПАЛФ с апоферментом, а на какие-то другие процессы, в том числе ферментативные, которые могут происходить в гемолизате в этих условиях (например, превращения ка-

Таблица 2

Влияние времени преинкубации на удельную активность АсАТ и ПАЛФ-эффект

Показатель	Время преинкубации, мин			
	0	3	13	25
Базальная удельная активность, мкмоль/мин, на 1 мг гемоглобина	0,0014	0,0014	0,0014	0,0014
Удельная активность в присутствии ПАЛФ	0,00165	0,0018	0,0018	0,00185
ПАЛФ-эффект	1,1	1,3	1,3	1,32

Примечание. Концентрация L-аспартата 100 мМ, α-кетоглутарата 10 мМ, ПАЛФ 7,4 мкМ. Разведение гемолизата в 560 раз.

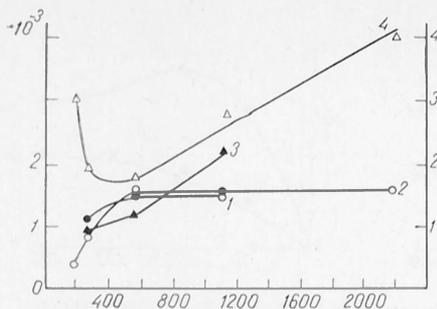


Рис. 1. Влияние разведения гемолизата в пробе (в пересчете на эритроциты) на величину ПАЛФ-эффекта (кривые 1 и 4) и базальную удельную активность АсАТ эритроцитов человека (кривые 2 и 3).

Концентрация L-аспартата 100 мМ (кривые 2 и 4) и 200 мМ (кривые 1 и 3); концентрация α -кетоглутарата 10 мМ, экзогенного ПАЛФ 3,74 мМ. По оси абсцисс — разведение эритроцитов; по осям ординат: слева (здесь и рис. 2) — удельная активность (в мкмоль/мин на 1 мг гемоглобина), справа — ПАЛФ-эффект.

ких-либо низкомолекулярных соединений, способных повлиять на активность АсАТ).

Поскольку АсАТ имеет четвертичную структуру [8] и склонна к диссоциации на субъединицы, характеризующиеся изменением кинетических свойств [6], то количество гемолизата в пробе может влиять на удельную активность и ПАЛФ-эффект. На рис. 1 представлены зависимости удельной активности АсАТ от разведения эритроцитов (кривые 2 и 3). Повышение удельной активности с увеличением степени разведения свидетельствует о том, что при диссоциации димера образуется более активный мономер [5]. Аналогичное влияние на активность АсАТ печени и сыворотки крови млекопитающих при разведении было показано в работе [6]. В присутствии 100 мМ L-аспартата разведение гемолизата в 560 раз и более не влияет на удельную активность (см. рис. 1, кривая 2) и, следовательно, равновесие в системе мономер \rightleftharpoons димер сильно сдвинуто в сторону образования мономера. Повышение концентрации L-аспартата препятствует диссоциации димера (см. рис. 1, кривая 2), и при разведении в 1100 раз кривая еще не выходит на плато.

Величина ПАЛФ-эффекта зависит также от разведения гемолизата. Это может быть связано как с диссоциацией комплексов апофермент — кофермент, так и с изменением кинетических свойств при диссоциации димера до

мономера. Если удельная активность при разведении более чем в 560 раз не зависит от разведения, то можно предполагать, что увеличение ПАЛФ-эффекта с увеличением разведения обусловлено, вероятно, диссоциацией кофермента.

При высоких концентрациях субстрата (200 мМ, см. рис. 1, кривая 1) ПАЛФ-эффект слабее зависит от разведения. Можно предполагать, что диссоциация кофермента от димерной формы апофермента происходит в меньшей степени, т. е. сродство к ПАЛФ выше, а повышение концентрации аспартата способствует подавлению диссоциации молекулы фермента на мономеры. Аналогичное действие оказывает и кофермент [4].

Смещение равновесия диссоциации фермента при повышении концентрации аспартата может вызывать изменения формы кинетической зависимости удельной активности от концентрации субстрата. На рис. 2, А и Б представлены такие зависимости от концентрации аспартата и α -кетоглутарата. Форма этих кривых объяснима, если предположить, что недиссоциированная форма обладает более низкой удельной активностью и субстраты смещают равновесие диссоциации-ассоциации в сторону образования высокомолекулярной формы. Снижение величины ПАЛФ-эффекта с ростом концентрации аспартата может объясняться повышением сродства к ПАЛФ у высокомолекулярной формы.

Поскольку при развитии дефицита витамина В₆ возможно снижение концентрации АсАТ в тканях [28], то кинетическое поведение АсАТ в этих условиях может оказаться аналогичным его поведению при более высоком разведении гемолизата. На рис. 2, В и Г представлены зависимости активности АсАТ эритроцитов крысы при нормальной их обеспеченности витамином В₆ и экспериментальном алиментарном дефиците этого витамина. Отметим, что при концентрациях субстратов, используемых в большинстве работ (200 мМ аспартат в пересчете на L-аспартат и 10 мМ α -кетоглутарат) [31], активность фермента при дефиците снижается приблизительно в 3 раза (см. рис. 2, В и Г), что хорошо согласуется с данными [28, 31] и свидетельствует о развитии дефицита витамина В₆ у крыс в нашем эксперименте.



Рис. 2. Зависимости удельной активности АсАТ эритроцитов человека (А и Б) и крысы (В и Г) от концентрации субстратов. А — зависимости базальной удельной активности АсАТ (кривые 1 и 3) и удельной активности АсАТ в присутствии 7,14 мМ экзогенного ПАЛФ (кривые 2 и 4). 1 и 2 — конечное разведение гемолизата (в пересчете на эритроциты) в 560 раз; 3 и 4 — конечное разведение гемолизата (в пересчете на эритроциты) в 1120 раз. Концентрация α -кетоглутарата 10 мМ; Б — зависимости базальной удельной активности (кривая 1) и удельной активности в присутствии 7,14 мМ экзогенного ПАЛФ (кривая 2) от концентрации α -кетоглутарата; разведение гемолизата (в пересчете на эритроциты) в 560 раз. Концентрация L-аспартата 200 мМ; В и Г — зависимости удельной активности АсАТ от концентрации L-аспартата в присутствии 10 мМ α -кетоглутарата (В) и α -кетоглутарата в присутствии 200 мМ L-аспартата (Г). 1 — при алиментарной недостаточности витамина В₆.

В пользу такого заключения свидетельствует также факт снижения активности другого ПАЛФ-зависимого фермента — фосфоорилазы почек — на 30 % по сравнению с контролем ($25,7 \pm 2,3$ и $36,0 \pm 4,5$ мкмоль/мин на 1 мг белка соответственно). Аналогичное снижение активности фермента из скелетных мышц вследствие развития гиповитаминоза В₆ было обнаружено другими авторами [16].

Из сопоставления кривой 3 (см. рис. 2, А) и кривой 1 (см. рис. 2, В) следует, что увеличение разведения гемолизата и снижение обеспеченности витамином В₆ приводят к аналогичным изменениям кинетического поведения фермента (исчезновение субстратного ингибирования, увеличение $S_{0,5}$).

Изменение формы кинетической кривой в условиях дефицита В₆ может быть также следствием изменения содержания в гемолизате высоко- или низкомолекулярных компонентов, влияющих на активность АсАТ.

Обычно для оценки обеспеченности витамином В₆ активность АсАТ измеряют при одних и тех же концентрациях субстратов: 200 мМ L-аспартата и 10 мМ α -кетоглутарата [15]. Однако следует отметить, что оценка степени обеспеченности витамином В₆ с использованием одной пары концентраций субстратов, по-видимому, не вполне корректна в случае кривых с субстратным ингибированием и зависимости кинетических параметров от разведения фермента, поскольку олиго-

мерное состояние фермента и, следовательно, его удельная активность и активация ПАЛФ зависят от концентрации субстратов. Количество фермента обусловлено степенью обеспеченности организма витамином В₆; следовательно, концентрация АсАТ в пробе при определении ее активности также зависит от степени обеспеченности. Поскольку удельная активность АсАТ возрастает по мере разведения, то повышение активности за счет разведения маскирует ее снижение за счет дефицита. Таким образом, использование этого теста в том варианте, как это принято [9, 15], т. е. с использованием одного разведения и одной пары концентраций субстратов, не во всех случаях дает истинную информацию об обеспеченности витамином В₆. Более корректным было бы измерение активности АсАТ в каждом образце при последовательном разведении до достижения постоянной величины удельной активности при данной концентрации субстратов. Такой линейный участок можно наблюдать на кривой 2 (см. рис. 1) в интервале разведений от 560 до 1100.

Поскольку величина ПАЛФ-эффекта зависит от разведения даже при постоянной базальной удельной активности (см. рис. 1, кривая 4), то для того чтобы показания теста были объективными, следует выбрать какую-либо реперную точку. Такой точкой может служить начало горизонтального плато на кривой 2 (см. рис. 1). Этой точ-

Суточная экскреция с мочой креатинина, 4-ПК и N-метилникотинамида у контрольных и лишенных витамина В₆ животных

Подопытные животные	Креатинин, мг	4-ПК, мкг	4-ПК (в мкг) креатинин (в мг)	N-метилнико- тинамид, мг	N-метилникотинамид (в мг) креатинин (в мг)
Контрольные (нормальное содержание витамина В ₆):					
1	1,30	—	—	1,114	0,86
2	2,00	4,52	2,24	0,933	0,46
3	3,00	6,97	2,32	0,319	0,11
4	0,70	1,59	2,15	0,274	0,37
Среднее . . .		4,36±3,88	2,27±0,07	0,66±0,67	0,45±0,16
Лишенные витамина, В ₆ :					
5	1,50	0,86	0,59	0,391	0,27
6	3,25	2,69	0,83	0,634	0,20
7	1,75	—	—	0,418	0,24
8	0,94	1,10	1,17	0,216	0,28
Среднее . . .		1,55±0,29	0,86±0,11	0,409±0,067	0,23±0,002

ке соответствует минимальное значение ПАЛФ-эффекта. Таким образом, в зависимости от условий определения ПАЛФ-эффекта (разведение гемолизата, концентрации субстратов) для одного и того же объекта можно получить разные величины ПАЛФ-эффекта, поэтому требуются дополнительные исследования, для того чтобы определить величину коэффициента активации, соответствующую нормальной обеспеченности витамином В₆. Следовательно, это обстоятельство в настоящее время делает, на наш взгляд, недостаточно надежным использование ПАЛФ-эффекта в качестве критерия обеспеченности витамином В₆ и указывает на целесообразность использования, помимо ПАЛФ-эффекта, также базальной активности.

Отметим, что в эксперименте на крысах определить величину ПАЛФ-эффекта, соответствующую маргинальному уровню обеспеченности, нам не удалось, поскольку, по-видимому, средство АсАТ крысы к коферменту выше, чем АсАТ человека, о чем свидетельствуют низкие значения ПАЛФ-эффекта при дефиците витамина В₆ у крысы (см. рис. 2, В, Г). Тем не менее развитие дефицита витамина В₆ у этих экспериментальных животных подтверждается достоверным снижением

экскреции 4-ПК и N-метилникотинамида, образующегося при метаболизме триптофана, в котором участвуют пиридоксальзависимые ферменты.

В табл. 3 представлены величины экскреции 4-ПК при нормальном содержании и при отсутствии витамина В₆ в рационе животных. Большой разброс индивидуальных величин суточной экскреции 4-ПК с мочой не позволяет надежно различать эти две группы животных. Однако пересчет этих значений на миллиграммы экскретируемого креатинина (см. табл. 3) выявляет различия между группами животных: при дефиците витамина В₆ экскреция 4-ПК снижается в 2,7 раза. Полученные нами величины экскреции 4-ПК совпадают с полученными в работах [10, 24]. Метод расчета экскреции метаболитов в пересчете на экскрецию креатинина применяется, например, при оценке обеспеченности витамином В₂ [20], однако в большинстве работ, в которых определяли 4-ПК, приведены только данные о ее выделении в миллиграммах в сутки [9, 10, 19, 27]. Возможно, именно этим и объясняются расхождения в данных разных авторов. Однако и метод расчета по креатинину имеет определенные ограничения, так как экскреция креатини-

на может зависеть от функционального состояния почек и печени.

В тех же образцах мочи было определено содержание N-метилникотинамида. Как следует из табл. 3, при дефиците витамина В₆ экскреция N-метилникотинамида существенно снижается. Величина суточной экскреции N-метилникотинамида используется в качестве показателя обеспеченности организма витамином РР [1, 10]. Очевидно (см. табл. 3), результаты этого теста зависят от уровня обеспеченности организма витамином В₆.

Таким образом, в нашем эксперименте выявлено хорошее соответствие между такими показателями обеспеченности витамином В₆, как удельная активность ПАЛФ-зависимых ферментов, экскреция 4-ПК — конечного продукта метаболизма витамина В₆, N-метилникотинамида — продукта метаболизма триптофана по пиридоксальзависимому «кинуриениновому» пути. Расчет величин суточной экскреции указанных метаболитов на миллиграммы экскретируемого креатинина позволяет более надежно выявить различие между группами животных в зависимости от уровня их обеспеченности витамином В₆.

В условиях нашего эксперимента на животных активность эритроцитарной АсАТ была более чувствительным параметром для выявления умеренного дефицита витамина В₆, чем величина ПАЛФ-эффекта. Использование ПАЛФ-эффекта для оценки обеспеченности человека витамином В₆ осложняется рядом факторов. Более корректно в качестве теста обеспеченности определять величину базальной удельной активности эритроцитарной АсАТ при использовании разведения гемолизата, которое не влияет на уровень этой активности.

С учетом указанных ограничений эти три типа тестов дали в наших экспериментах сходные результаты, что может служить подтверждением их адекватности и надежности.

Авторы выражают глубокую благодарность проф. В. Б. Спиричеву за плодотворное научное обсуждение статьи, а также О. А. Климовой за содержание лабораторных животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Биохимические методы исследования в клинике / Под ред. Покровского. — М., 1969.

2. Бондарев Г. И., Мартинчик А. Н., Хотимченко С. А. и др. // Вопр. питания. — 1986. — № 2. — С. 34—37.
3. Ефремов В. В. // Там же. — 1961. — № 3. — С. 82—88.
4. Ковлер М. А., Павленко А. А., Курганов Б. И., Аввакумов В. М. // Хим.-фарм журн. — 1986. — № 5. — С. 522—524.
5. Курганов Б. И. Аллостерические ферменты. — М., 1978. — С. 117—154.
6. Никифоров В. Н., Павленко А. А., Курганов Б. И., Гусниев А. М. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 6. — С. 60—62.
7. Поляновский О. А. // Успехи биол. химии. — 1977. — Т. 18. — С. 92—121.
8. Никулев А. Т. // Радиобиология. — 1986. — Т. 26, № 5. — С. 712—714.
9. Пятницкая И. Н., Богданов Н. Г., Санрунова М. М. // Вопр. питания. — 1982. — № 3. — С. 34—36.
10. Словохотнова И. И. // Стоматология. — 1977. — № 3. — С. 13—16.
11. Токовой В. А. // Клин. мед. — 1962. — № 11. — С. 118—121.
12. Barnard H. C., Vermaak W. J. H., Potgieter G. M. // Int. J. Vitam. Nutr. Res. — 1986. — Vol. 56, N 4. — P. 351—354.
13. Begum S. J., Reddy M. M., Swami K. S. // Environ. Ecol. — 1986. — Vol. 4, N 2. — P. 205—206.
14. Bender D. A. // Brit. J. Nutr. — 1983. — Vol. 50. — P. 33—42.
15. Bergmeyer H. H., Slorder M., Moss D. W. // Clin. Chem. — 1978. — Vol. 24. — P. 720—721.
16. Black A. L., Guirard B. M., Snell E. E. // J. Nutr. — 1978. — Vol. 108. — P. 670—677.
17. Brown R. R. // J. Agricult. Food Chem. — 1972. — Vol. 20, N 3. — P. 498—505.
18. Chrisley B. M., Driskell J. A. // Nutr. Rep. int. — 1979. — Vol. 19, N 4. — P. 553—560.
19. Cinnamon A. D., Beaton J. R. // Amer. J. clin. Nutr. — 1970. — Vol. 23, N 6. — P. 696—702.
20. Cooperman S. M., Lopez R. // Handbook of Vitamins / Ed. L. J. Machlin. — New York, 1984. — P. 325—343.
21. Fisher I., Walter H. // Biochim. biophys. Acta. — 1966. — Vol. 184. — P. 660—663.
22. Gressner A. M., Sittel D. // Fresenius Z. analyt. Chem. — 1984. — Bd 317, N 6. — S. 755—756.
23. Heller S., Salkeld R. M., Korner W. F. // Amer. J. clin. Nutr. — 1973. — Vol. 26. — P. 1339—1348.
24. Itoh R., Okada M. // J. Nutr. Sci. Vitaminol. — 1973. — Vol. 19. — P. 523—528.
25. Jung K., Grützmann K. D. // Clin. chim. Acta. — 1977. — Vol. 81. — P. 299—304.
26. Karmen A., Wroblewski F., LaDue J. S. // J. clin. Invest. — 1955. — Vol. 34. — P. 126—131.
27. Lewis J. S., Nunn K. P. // Amer. J. clin. Nutr. — 1977. — Vol. 30. — P. 2023—2027.
28. Lumeng L., Ryan M. P., Li T.-K. // J. Nutr. — 1978. — Vol. 108. — P. 545—553.
29. Provisional recommendations on IFCC methods for measurement of serum aspartate aminotransferase activity // Clin. chim. Acta. — 1976. — Vol. 70, N 2. — P. F19—F42.
30. Reilman S., Frankel S. // Amer. J. clin. Path. — 1957. — Vol. 28. — P. 56—63.

31. Rose C. S. // Amer. J. clin. Nutr. — 1976. — Vol. 29. — P. 847—853.
32. Sauberlich E. H. // Methods in Vitamin B-6 Nutrition: Analysis and Status Assessment / Eds J. E. Leklem, R. D. Reynolds. — New York, 1980. — P. 203—239.
33. Sumner J. B. // Science. — 1944. — Vol. 100. — P. 413—415.
34. Varley H. Practical Clinical Biochemistry. — London, 1954.
35. Vir S. C., Love A. H. G. // Int. J. Vitam. Nutr. Res. — 1977. — Vol. 47. — P. 363—372.
36. Vuilleumier J. P., Keller H. E., Rettenmaier R., Hunziker F. // Ibid. — 1983. — Vol. 53. — P. 359—370.

Поступила 11.08.87

USE OF THE PALP-EFFECT AS AN INDEX OF SUPPLYING WITH VITAMIN B₆

E. Yu. Glinka, A. A. Sokol'nikov, V. M. Kudentsova

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

Various methods used for estimation of a body supplying with vitamin B₆ as well as correspondence between the data obtained by means of these methods were studied. The factors affecting the values of conventional patterns of the vitamin requirements were also studied: PALP-effect and content of 4-pyridoxic acid in urine. A necessity was shown in standardization of the methods for estimation of a body supplying with vitamin B₆ with regard to these factors.

УДК 616.127-008.932.95-074-092.9

Ж. В. Шутенко, Б. З. Симхович, Д. В. Мейрена, И. Я. Калвиньш, Э. Я. Лукевиц

РЕГУЛЯЦИЯ КАРНИТИНЗАВИСИМОГО МЕТАБОЛИЗМА ЖИРНЫХ КИСЛОТ В МИОКАРДЕ КРЫС ПРИ ПОМОЩИ 3-(2,2,2-ТРИМЕТИЛГИДРАЗИН) ПРОПИОНАТА

Институт органического синтеза АН Латвийской ССР, Рига

Увеличение метаболической доступности жирных кислот (ЖК) играет значительную роль в возникновении патогенетической цепи нарушений биохимических процессов в миокарде при ишемии [4, 21]. Накапливающиеся в условиях снижения парциального давления кислорода недоокисленные интермедиаты β-окисления (β-гидроксиацил-КоА, β-кетоацил-КоА) и продукты метаболической активации ЖК (ацил-КоА, ацилкарнитин) оказывают повреждающее действие на структурно-функциональную целостность плазматических мембран, мембран митохондрий и служат аритмогенными факторами [18, 19, 30].

Одним из возможных подходов к устранению токсического влияния метаболитов ЖК в условиях ишемии является угнетение их окисления на стадии активации — образования ацилкарнитина, что возможно путем применения ингибиторов карнитинацилтрансферазы и карнитинацилкарнитинтрансферазы [13, 16, 27, 28]. Другой способ торможения β-окисления ЖК — снижение внутриклеточной концентрации свободного карнитина. Такого рода активность была обнаружена у аналога γ-бутиробетанина — 3-(2,2,2-триметилгидразин) пропионата

(ТГП), синтезированного в Институте органического синтеза и обладающего кардиопротекторной активностью [1, 2, 5, 6].

В настоящей работе было проведено изучение биохимического механизма влияния ТГП на метаболизм ЖК в миокарде крыс. Исследовали действие ТГП на активность γ-бутиробетанингидроксилазы, карнитинацетилтрансферазы, карнитинпальмитоилтрансферазы I и окисление 1-¹⁴C-олеата, U-¹⁴C-пальмитата, 1-¹⁴C-пальмитоил-L-карнитина до ¹⁴CO₂.

Методика

Животные. Опыты проводили на белых крысах-самцах, полученных из питомника Института органического синтеза АН Латвийской ССР.

Реактивы. Ацетил-КоА, L-карнитин, DL-карнитин, альбумин (V фракция), пальмитиновая кислота, олеиновая кислота, пальмитоил-L-карнитин, карнитинацетилтрансфераза, пальмитоил-КоА, ЭГТА («Sigma», США), γ-бутиробетанин («Serva», ФРГ), дитиобиснитробензойная кислота («G. Lawson», Великобритания), трис («Reanal», Венгрия), дитиотреitol, дауэкс 2×8, 200—400 меш («Serva», ФРГ), окисленный глутатион («Reanal», Венгрия), каталаза («Реахим», СССР), кислоты и соли (ч. д. а).

Изотопы. U-¹⁴C-пальмитиновая кислота «New England Nuclear», США; уд. акт. 800 мКи/ммоль, 1-¹⁴C-пальмитоил-L-карнитин

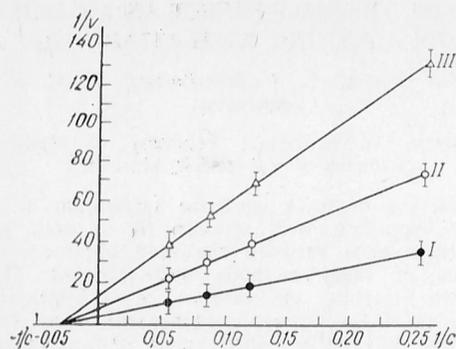


Рис. 1. График двойных обратных величин зависимости скорости γ -бутиробетанингидроксилазной реакции от концентрации субстрата. v — ммоль карнитина в 1 мин на 1 мг белка; c — концентрация γ -бутиробетанина (в мкМ). I — контроль; II — 16 мкМ ТГП; III — 40 мкМ ТГП. Каждая проба содержит 1,54 мЕД γ -бутиробетанингидроксилазы.

(уд. акт. 55 мКи/ммоль), I - ^{14}C -ацетил-КоА (уд. акт. 55,6 мКи/ммоль), I - ^{14}C -олеиновая кислота (в/о «Изотоп», СССР; уд. акт. 45 мКи/ммоль), DL-(метил- ^{14}C)карнитин («Amersham», Великобритания; уд. акт. 51 мКи/ммоль).

Изучение влияния ТГП на активность γ -бутиробетанингидроксилазы. Выделение фермента из печени крыс проводили путем дифференциального осаждения сульфатом аммония по ранее описанной методике [8]. Активность выделенной фракции составляла 1,54 мЕД на 1 мг белка. Определение активности γ -бутиробетанингидроксилазы осуществляли 2-этапным методом [20]. На I этапе происходит гидроксигидроксилирование γ -бутиробетанина под влиянием выделенного фермента до карнитина, на II — после проведения карнитинацетилтрансферазой реакции с I - ^{14}C -ацетил-КоА путем ионообменной хроматографии на смоле дауэкс 2×8 , 200-400 меш выделяется I - ^{14}C -ацетилкарнитин. Концентрации γ -бутиробетанина составляли 4, 8, 12 и 16 мкМ, концентрации ТГП — 16 и 40 мкМ. Расчет кинетических констант и выяснение характера ингибирования активности γ -бутиробетанингидроксилазы проводили непараметрическим методом [7].

Изучение влияния ТГП на активность карнитинацетилтрансферазы. Активность карнитинацетилтрансферазы (КАТФ) изучали *in vitro* по количеству высвободившегося КоА после инкубации с КАТФ (5 мкг, 0,5 ед.), с ацетил-КоА и L-карнитином [12]. В случае фиксированной концентрации L-карнитина (0,083 мМ) концентрации ацетил-КоА изменяли в диапазоне 0,01—0,5 мМ. При фиксированной концентрации ацетил-КоА (0,083 мМ) в аналогичном диапазоне изменяли концентрации L-карнитина. Концентрация ТГП в обоих случаях составляла 0,33 мМ. Графически при помощи непараметрического метода [7] рассчитывали предельные значения K_m для ацетил-КоА и L-карнитина.

Изучение влияния ТГП на окисление ЖК. Гомогенат сердец крыс готовили после курсового введения ТГП (100, 200 мг/кг *per os* в течение 10 дней) и DL-карнитина (300 мг/кг *per os* в течение 10 дней) или из сердец интактных животных. Использовали 20 % гомо-

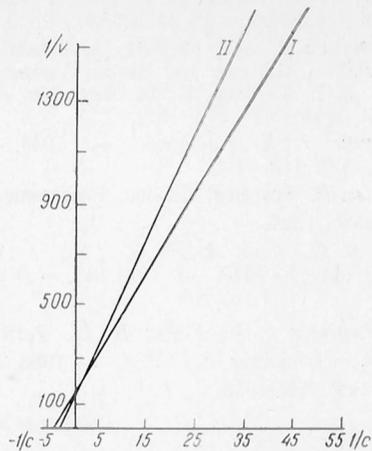


Рис. 2. Конкурентное по отношению к карнитину ингибирование КАТФ под влиянием ТГП.

v — скорость реакции (в мкмоль/КоА/мин); c — концентрация L-карнитина (в мМ). I — контроль; II — 0,33 мМ ТГП. Концентрация ацетил-КоА 0,083 мМ; концентрация карнитина 0,01—0,5 мМ.

генат, приготовленный на 0,25 М сахарозе. В качестве радиоактивных субстратов были взяты I - ^{14}C -олеат, U - ^{14}C -пальмитат и I - ^{14}C -пальмитоил-L-карнитин. Состав инкубационной среды, концентрации кофакторов и субстратов описаны ранее [9, 11]. О скорости метаболизма радиоактивных продуктов судили по образованию $^{14}\text{CO}_2$ и ^{14}C -растворимых продуктов (содержащих в основном кетоновые тела) [10, 17, 23].

Изучение влияния ТГП на активность карнитинпальмитоилтрансферазы. Активность карнитинпальмитоилтрансферазы I изучали по количеству образующегося радиоактивного пальмитоилкарнитина после инкубации митохондрий сердца крысы с пальмитоил-КоА и DL-(метил- ^{14}C)карнитином. Выделение митохондрий, инкубацию и подсчет радиоактивности проводили по ранее описанным методам [25, 26]. Концентрация пальмитоил-КоА составляла 0,04 мМ. Реакцию начинали добавлением 20 мкл 0,4 мМ L-карнитина и 1 мКи DL-(метил- ^{14}C)карнитина и проводили в течение 4 мин. Реакцию останавливали 0,6 М ТХУ. Образующиеся осадки собирали на фильтре «Миллипор», 0,4 мк».

Статистическая обработка результатов. Для статистической обработки результатов использовали непараметрический критерий U Вилкоксона — Манна — Уитни [3].

Результаты и их обсуждение

При изучении влияния ТГП на активность γ -бутиробетанингидроксилазы установлен неконкурентный характер ингибирования активности фермента под влиянием препарата (рис. 1). В отношении карнитинацетилтрансферазы ТГП явился конкурентным ингибитором. Соотношение предельных значений K_m для карнитина (при фиксиро-

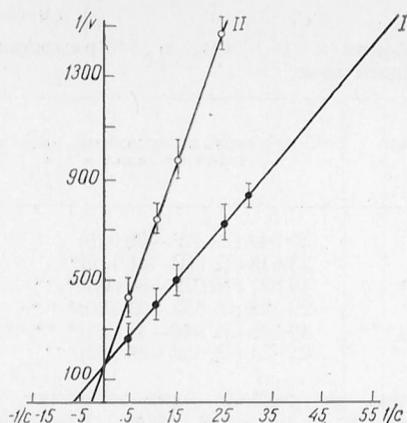


Рис. 3. Конкурентное по отношению к ацетил-КоА ингибирование КАТФ под влиянием ТГП. v — скорость реакции (в мкмоль/КоА/мин); c — концентрация ацетил-КоА (в мМ). I — контроль; II — 0,33 мМ ТГП. Концентрация карнитина 0,083 мМ; концентрация ацетил-КоА 0,01—0,5 мМ.

ванной концентрации ацетил-КоА) в присутствии ТГП и в его отсутствие составляет 1,29, для ацетил-КоА (при фиксированной концентрации карнитина) — 3,83 (рис. 2, 3).

Введение ТГП крысам *per os* в течение 10 дней приводит к угнетению окисления $1\text{-}^{14}\text{C}$ -олеиновой кислоты до $^{14}\text{CO}_2$ гомогенатами сердец крыс. Это угнетение является дозозависимым и в большей степени наблюдается при стимуляции окисления свободных ЖК путем содержания животных на богатом жирами рационе (табл. 1).

ТГП в концентрации 100 мкМ, вносимый в инкубационную среду, содержащую гомогенат миокарда интактных животных, усиливает образование $^{14}\text{CO}_2$ и растворимых продуктов из $\text{U-}^{14}\text{C}$ -пальмитата на 24,3 и 14,9 % со-

ответственно и уменьшает стимулирующее влияние L-карнитина на метаболизм пальмитиновой кислоты. Торможение стимулирующего эффекта L-карнитина под влиянием ТГП усиливается с уменьшением концентрации L-карнитина. Так, снижение карнитинзависимой продукции $^{14}\text{CO}_2$ в присутствии ТГП при концентрации L-карнитина 10 мкМ составляло 18,7 %, а при концентрации 1 мкМ — 22,3 %. В отношении образования растворимых продуктов тормозящий эффект ТГП равнялся 19,5 % при концентрации L-карнитина 10 мкМ и 26,3 % при его концентрации 1 мкМ (табл. 2).

ТГП при введении в дозе 200 мг/кг *per os* в течение 10 дней не влияет на окисление $1\text{-}^{14}\text{C}$ -пальмитоил-L-карнитина гомогенатами сердец крыс. DL-карнитин при аналогичной схеме введения в дозе 300 мг/кг *per os* статистически значимо уменьшает (на 33,2 %) количество $^{14}\text{CO}_2$, образующегося из $1\text{-}^{14}\text{C}$ -пальмитоил-L-карнитина (табл. 3).

В условиях *in vitro* ТГП в концентрации 100 мкМ не влияет на окисление $1\text{-}^{14}\text{C}$ -пальмитоил-L-карнитина до $^{14}\text{CO}_2$. L-карнитин в концентрациях 10 и 1 мкМ снижает количество образующегося $^{14}\text{CO}_2$. При совместном внесении в инкубационную среду ТГП и L-карнитина (100 и 1 мкМ) наблюдается статистически значимое уменьшение образования $^{14}\text{CO}_2$ по сравнению с образованием его в присутствии L-карнитина (табл. 4). В опытах с изолированными митохондриями миокарда показано, что ТГП (100 и 1000 мкМ) не влияет на активность карнитинпальмитоилтрансферазы I.

Таблица 1

Окисление $1\text{-}^{14}\text{C}$ -олеата до $^{14}\text{CO}_2$ гомогенатами сердец крыс после курсового введения ТГП на фоне стандартного лабораторного и богатого жирами рационов

Рацион	Номер опыта	Доза ТГП, мг/кг	$^{14}\text{CO}_2$, расп. мин на 100 мг ткани в 1 ч	
			контроль	ТГП
Стандартный лабораторный	1	100	2456 (2121—2884)	1826 (1404—1560)*
	2	200	3958 (3423—4653)	2339 (2012—2543)*
Богатый жирами	3	100	7551 (6508—9024)	3871 (2952—4613)*

Примечание. Звездочка — различия статистически значимы по сравнению с показателями контрольной группы при $p < 0,05$. Животных содержали на стандартном лабораторном и богатом жирами (20 % по весу маргарина, 20 дней) рационах. ТГП в дозах 100 и 200 мг/кг вводили *per os* в виде водного раствора в течение 10 дней. На 10-й день через 1 ч после последнего введения ТГП животных декапитировали, извлекали сердца. После промывания в 8 мМ Na-фосфатном буфере (рН 7,4) готовили 20 % гомогенат миокарда на 0,25 М сахарозе. Инкубацию проб с $1\text{-}^{14}\text{C}$ -олеиновой кислотой и определение $^{14}\text{CO}_2$ проводили по ранее описанным методам [7,9].

Влияние ТГП и L-карнитина на окисление U-¹⁴C-пальмитата до ¹⁴CO₂ и ¹⁴C-растворимых продуктов гомогенатами сердец крыс

Группа животных	Концентрация, мкМ		¹⁴ CO ₂ , расп. мин на 100 мг ткани в 1 ч	¹⁴ C-растворимые продукты, расп. мин на 100 мг ткани в 1 ч
	ТГП	L-карнитин		
1-я	—	—	7 697 (6 994—8 399)	20 544 (20 325—20 925)
2-я	100	—	9 573 (9 343—9 998)*	23 618 (22 752—24 416)*
3-я	—	10	25 632 (24 116—26 540)*,**	48 821 (46 629—52 613)*,**
4-я	—	1	12 195 (10 826—12 939)*,**	29 325 (26 552—31 760)*,**
5-я	100	10	20 830 (18 369—23 682)*,**,***	39 285 (32 946—42 802)*,**,***
6-я	100	1	1 475 (8 738—9 886)*,**,***	21 624 (15 602—26 730)**

Примечания. Различия статистически значимы при $p < 0,05$; одна звездочка — по сравнению с показателями 1-й группы, две — 2-й группы, три — 3-й и 4-й групп. Для приготовления гомогената использовали сердца интактных животных. ТГП и L-карнитин вносили в инкубационную среду в указанных в табл. 2 концентрациях. Остальные условия эксперимента см. в примечании к табл. 1.

В предыдущих работах [5, 6] было установлено, что ТГП при введении крысам *per os* в дозах 50—150 мг/кг в течение 10 дней вызывает зависимое от дозы уменьшение содержания свободного карнитина и его ацилированной формы. В основе механизма этого явления может лежать вызываемое ТГП угнетение γ -бутиробетаингидроксилазы (см. рис. 1). Следствием угнетения активности фермента и уменьшения внутриклеточной концентрации карнитина служит снижение скорости окисления свободных ЖК в миокарде (см. табл. 1).

ТГП оказывает ингибирующее влияние на активность КАТФ, в большей степени выраженное в отношении ацетил-КоА (см. рис. 2, 3). Этот фермент наряду с цитратсинтеазой имеет значение в переносе ацетильных групп из митохондрий в цитоплазму [12, 24, 29] и, возможно, регулирует таким обра-

зом энергетический метаболизм и процесс ресинтеза ЖК.

Усиление ресинтеза ЖК является одним из патогенетических моментов в цепи метаболических нарушений в миокарде при ишемии [15]. С этой точки зрения ингибирование КАТФ наряду с угнетением β -окисления служит фактором, способствующим коррекции метаболизма ишемизированного миокарда. Кроме того, в условиях торможения активности КАТФ в матриксе митохондрий может, по всей видимости, увеличиваться количество ацетил-КоА. Это предположение подтверждается обнаруженной в наших экспериментах стимуляцией образования ¹⁴CO₂ и растворимых продуктов окисления (представляющих собой в основном кетоновые тела) из ¹⁴C-пальмитата под влиянием добавленного *in vitro* ТГП (см. табл. 2). Проявление такого эффекта ТГП в гомогенатах

Таблица 3

Окисление 1-¹⁴C-пальмитоил-L-карнитина до ¹⁴CO₂ гомогенатами сердец крыс после курсового введения ТГП и DL-карнитина

Рацион	Группа животных	Условие опыта	¹⁴ CO ₂ , расп. мин на 100 мг ткани в 1 ч
Стандартный лабораторный Богатый жирами	1-я	Контроль	7 205 (5 679—8 473)
	2-я	Контроль	6 775 (5 368—9 072)
	3-я	ТГП	5 852 (5 096—6 511)
	4-я	DL-карнитин	4 526 (3 259—5 942)*

Примечания. Звездочка — различия статистически значимы по сравнению с показателями 1-й и 2-й групп при $p < 0,05$. Животных содержали на стандартном лабораторном и богатом жирами рационах (см. примечание к табл. 1). ТГП в дозе 200 мг/кг и DL-карнитин в дозе 300 мг/кг вводили *per os* в виде водного раствора в течение 10 дней. Приготовление гомогената и инкубацию проб с 1-¹⁴C-пальмитоил-L-карнитином и определение ¹⁴CO₂ проводили по ранее описанным методам [10, 11, 13].

Таблица 4

Влияние ТГП и L-карнитина на окисление I-¹⁴C-пальмитоил-L-карнитина до ¹⁴CO₂ гомогенатами сердец крыс

Группа животных	Концентрация, мкМ		¹⁴ CO ₂ , расп. мин на 100 мг ткани в 1 ч
	ТГП	L-карнитин	
1-я	—	—	22 473 (18 624—24 502)
2-я	100	—	21 654 (21 186—22 571)
3-я	—	10	16 801 (15 745—18 510)*
4-я	—	1	16 049 (14 634—16 842)*
5-я	100	10	16 017 (14 580—18 292)*
6-я	100	1	13 320 (12 320—14 087)*, **

Примечания. Одна звездочка — различия статистически значимы при $p < 0,05$ по сравнению с показателями 1-й и 2-й групп, две — 3, 4 и 5-й групп. Для приготовления гомогената использовали сердца интактных животных. ТГП и L-карнитин вносили в инкубационную среду в указанных в табл. 4 концентрациях. Остальные условия эксперимента см. в примечании к табл. 3.

те миокарда может быть также объяснено наличием карнитиннезависимого окисления ЖК [14, 22].

Предотвращение вызываемой L-карнитинотимической стимуляции окисления пальмитата указывает на наличие у ТГП способности оказывать ингибирующее влияние на карнитинзависимые процессы активации ЖК (см. табл. 2).

В условиях курсового введения ТГП не обнаружено его влияния на окисление I-¹⁴C-пальмитоил-L-карнитина. Вызываемое введением DL-карнитина снижение образования ¹⁴CO₂ из этого субстрата может быть объяснено вовлечением под влиянием карнитина в метаболизм эндогенных ЖК с последующим образованием из них ацилкарнитина, что вызывает разбавление экзогенной метки (см. табл. 3). Аналогичный эффект был обнаружен при внесении L-карнитина в гомогенат миокарда (см. табл. 4). С учетом отсутствия у ТГП влияния на активность карнитинпальмитоилтрансферазы I снижение под его воздействием создаваемого экзогенным L-карнитином уровня окисления I-¹⁴C-пальмитоил-L-карнитина может указывать на ингибирующее влияние препарата на активность либо карнитинпальмитоилтрансферазы II, либо карнитинацилкарнитинтрансферазы (см. табл. 4).

В основе кардиопротекторного действия ТГП лежат его свойства ингибитора β-окисления. Результаты про-

веденных исследований указывают на наличие нескольких точек приложения в механизме действия ТГП. Интегральным эффектом препарата является угнетение карнитинзависимого метаболизма ЖК. С учетом биохимических изменений, возникающих в ишемизированном миокарде, такого рода регуляция представляет собой патогенетически оправданный подход к метаболической коррекции ишемизированного миокарда.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бриде Я. Л., Озола Р. А., Симхович Б. З. и др. // Актуальные вопросы фармакологии и токсикологии нейротропных средств. — Рига, 1986. — С. 114.
2. Веверис М. М., Кименис А. А. // Там же. — С. 118.
3. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в микро-биологических исследованиях. — Л., 1973.
4. Меерсон Ф. З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. — М., 1984.
5. Симхович Б. З., Мейрена Д. В., Хаги Х. Б. и др. // Проблемы современной биохимии и биотехнологии. — Рига, 1985. — С. 131.
6. Симхович Б. З., Мейрена Д. В., Хаги Х. Б. и др. // Всесоюзный биохимический съезд, 5-й: Тезисы. — М., 1986. — Т. 3. — С. 133.
7. Cornish-Bowden A. Principles of Enzyme Kinetics. — London, 1976.
8. Daveluy A., Parvin R., Pande Sh. // Analyt. Biochem. — 1982. — Vol. 119. — P. 286.
9. Fritz I. B. // Amer. J. Physiol. — 1964. — Vol. 206. — P. 1217.
10. Higgins A. J., Morville M., Burges R. A. et al. // Life Sci. — 1980. — Vol. 27. — P. 963.
11. Higgins A. J., Morville M., Burges R. A., Blackburne K. J. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1981. — Vol. 100. — P. 291.
12. Huckle W. R., Tamblin T. M. // Arch. Biochem. — 1983. — Vol. 226. — P. 94.
13. Hüller J. E., Piper H. M. // Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. — 1983. — Bd 322, Suppl. — S. R-37.
14. Ishii H., Ishii S., Kazama M., Suga T. // Arch. Biochem. — 1983. — Vol. 226. — P. 484.
15. Katz A. M., Messineo F. C. // Circulat. Res. — 1981. — Vol. 48. — P. 1.
16. Korb H., Hoefl A., Hunnemann D. H. et al. // Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. — 1984. — Bd 327. — S. 70.
17. Mannaerts G. P., Thomas J., Debur L. J. et al. // Biochim. biophys. Acta. — 1978. — Vol. 529. — P. 201.
18. Moore K. H., Radloff J. F., Hull F. E., Sweely Ch. C. // Amer. J. Physiol. — 1980. — Vol. 239. — P. H257.
19. Neely J. R., Morgan H. E. // Ann. Rev. Physiol. — 1974. — Vol. 36. — P. 413.
20. Noel H., Parvin R., Pande Sh. // Biochem. J. — 1984. — Vol. 220. — P. 701.
21. Opie L. H. // Amer. J. Cardiol. — 1975. — Vol. 36. — P. 938.

22. Osmundsen O., Christiansen R. Z., Bremer J. // Carnitine Biosynthesis, Metabolism and Functions / Eds. R. A. Frenkel, J. D. McGarry. — New York, 1980. — P. 127.
23. Otto D. A., Ontko J. A. // J. biol. Chem. — 1978. — Vol. 253. — P. 789.
24. Pearson D. J., Tubbs P. K. // Biochem. J. — 1967. — Vol. 105. — P. 953.
25. Saggerson E. D. // Ibid. — 1982. — Vol. 202. — P. 397.
26. Saggerson E. D., Carpenter C. A. // Ibid. — 1983. — Vol. 210. — P. 591.
27. Schmidt F. H., Deasue I. V., Kuhnle H. F. // Life Sci. — 1985. — Vol. 36. — P. 63.
28. Sherrat H. S. A. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1983. — Vol. 117. — P. 653.
29. Shug A. L., Thomsen J. H., Folls J. D. et al. // Arch. Biochem. — 1978. — Vol. 187. — P. 25.
30. Whitmer J. T., Idell-Wenger J. A., Rovetto M. J., Neely J. R. // J. biol. Chem. — 1978. — Vol. 253. — P. 4305.

Поступила 01.12.87

REGULATION OF CARNITINE DEPENDENT METABOLISM OF FATTY ACIDS IN RAT MYOCARDIUM USING 3-(2,2,2-TRIMETHYL HYDRAZINIUM) PROPIONATE

Zh. V. Shutenko, B. Z. Simkhovich, D. V. Meyrena, N. Ya. Kalvin'sh, E. Ya. Lukevitz

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

3-(2,2,2-Trimethyl hydrazinium) propionate (THP), possessing a cardioprotective effect, is a noncompetitive inhibitor of butyrobetaine hydroxylase and inhibits fatty acid oxidation. The effect of THP, detected during the drug medicinal application, was related to inhibition of carnitine biosynthesis. THP exhibited the inhibitory action on carnitine acetyl transferase contributing to an increase in acetyl-CoA availability for intramitochondrial metabolic pathways. The drug prevented L-carnitine induced stimulation of U-¹⁴C-palmitic acid oxidation *in vitro*. During administration as well as after addition into incubation medium THP did not show any significant effects on ¹⁴C-palmitoyl-L-carnitine oxidation but decreased the exogenous L-carnitine induced oxidation of the substrate *in vitro*. The drug did not affect the activity of carnitine palmitoyl transferase I. Action of THP on the carnitine-dependent oxidation of fatty acids might be related to the drug inhibitory effect on activities either of carnitine acyl transferase II or carnitine acylcarnitine translocase. The data obtained suggest that THP carried out the following functions: 1) inhibition of carnitine biosynthesis, 2) direct inhibition of carnitine dependent transport of fatty acids in mitochondria, 3) inhibition of carnitine acetyl transferase. Inhibition of carnitine dependent oxidation of fatty acids at the step of their activation was the drug integral effect.

УДК 615.275.4.015.4:612.112.94.015.3].07

Ю. И. Губский, Г. Б. Афонина, Т. С. Брюзгина, Э. Я. Кравченко,
З. Т. Радловская, Т. П. Прадий, О. В. Задорина, В. Г. Бордонос

ВЛИЯНИЕ ЛЕВАМИЗОЛА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ И ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН ТЕТРАХЛОРМЕТАНОМ

Медицинский институт, Киев

Иштоксикация экзогенными химическими соединениями сопровождается комплексом биохимических и патофизиологических изменений, обозначаемых понятием «токсический стресс» [3]. Однако, несмотря на первостепенное значение системы иммунитета в ответе организма на действие ксенобиотиков, клеточные и молекулярные механизмы реакции лимфоцитов на токсическое повреждение мало изучены. Вместе с тем показано, что введение экспериментальным животным иммуномодуляторов оказывает выраженное защитное действие при иштоксикации тетрахлорметаном (ТхМ) [15, 16], бензолом [7]. Предварительное введение левамизола [15, 16] препят-

ствовало развитию гиперферментемии и активации перекисного окисления липидов (ПОЛ) в печени крыс-самок, получавших ТХМ. В связи с наличием в иммунокомпетентных клетках цитохром Р-450-зависимых монооксигеназ [4], способных к генерации свободнорадикальных метаболитов биотрансформации ксенобиотиков, было высказано предположение о возможности модификации левамизолом токсического действия ТХМ на лимфоциты, подобно эффектам, наблюдаемым в печеночной ткани. Известно, что под влиянием левамизола происходит стимуляция синтеза гликопротенда α₂-макроглобулина — одного из компонентов системы неспецифической ре-

Влияние левамизола на функциональную активность лимфоцитов крыс при интоксикации ТХМ ($M \pm m$)

Показатель	Контроль (1-я группа)	Условия эксперимента			
		однократное введение препаратов		7-дневное введение препаратов	
		ТХМ (2-я группа)	ТХМ лева- мизол (3-я группа)	ТХМ (4-я группа)	ТХМ левамизол (5-я группа)
Включение ^3H -тимидина в ДНК (в имп/мин) при инкубации: с ФГА с КонА без митогенов	13 342 \pm 1288 10 926 \pm 660 1 291 \pm 39	6859 \pm 1129* ¹ 1255 \pm 116* ¹ 2627 \pm 338* ¹	9715 \pm 1157* ² 3839 \pm 1297* ² 2186 \pm 564	7910 \pm 565* ¹ 6772 \pm 313* ¹ 1180 \pm 110	12 650 \pm 830* ⁴ 9 042 \pm 227* ¹ 1 483 \pm 192
Коэффициент РНК/ДНК	0,45 \pm 0,11	0,26 \pm 0,02* ¹	0,3 \pm 0,05	0,36 \pm 0,05* ¹	0,4 \pm 0,06

Примечание. Здесь и в табл. 2 звездочка — различия достоверны при $p < 0,05$; цифрой рядом со звездочкой указана группа сравнения; $n = 7$.

зистентности и регулятора иммунной защиты [1].

В связи с этим целью нашей работы было изучение влияния ТХМ на функциональную активность и жирнокислотный состав фосфолипидов лимфоцитов, а также содержание α_2 -макроглобулина в крови крыс на фоне введения левамизола.

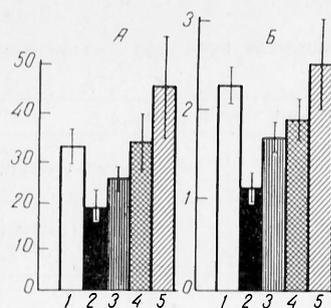
Методика

Опыты проводили на белых крысах Вистар обоего пола массой 150—200 г, содержащихся на стандартном рационе вивария. Контролем служили интактные животные (1-я группа). ТХМ вводили внутривенно однократно по 2 мл на 1 кг массы (2-я и 3-я группы) или ежедневно в течение 7 сут по 1 мл на 1 кг массы (4-я и 5-я группы). Левамизол инъцировали подкожно по 2 мг/кг однократно или в течение 7 сут (3-я и 5-я группы соответственно) перед введением ТХМ. Через 24 ч после однократного или 7-дневного введения ТХМ животных деканитировали под легким эфирным наркозом. Лимфоциты крови и селезенки выделяли по методу [12]. Функциональную активность лимфоцитов определяли в микроварианте реакции бластной трансформации лимфоцитов (РБТЛ). Для этого 100 мкл суспензии клеток инкубировали в среде RPMI-1640 с 15 % фетальной телячьей сыворотки, NERES буфером pH 7,4 и антибиотиками в присутствии 8 мкг/мл фитогемагглютина (ФГА) фирмы «Difco» или 10 мкг/мл конканавалина А (КонА) фирмы «Seriva». За 16 ч до окончания инкубации в каждую пробу добавляли по 1 мкКи/мл ^3H -тимидина. После нанесения на мембранные фильтры пробы обрабатывали трихлоруксусной кислотой и 96° этанолом и определяли радиоактивность на сцинтилляционном счетчике SL-30 «Intertechnique» [14]. Синтетическую активность лимфоцитов оценивали по отношению РНК/ДНК, измеряя интенсивность люминес-

ценции окрашенных акридин-оранжевым (1 : 30 000) препаратов на микроцифлюориметре при длине волны 640 и 520 нм [13]. Жирнокислотный состав мембранных фосфолипидов и содержание свободного холестерина в лимфоцитах определяли методом газожидкостной хроматографии [11]. Фракцию общих фосфолипидов извлекали из суспензии лимфоцитов, содержащей $4 \cdot 10^6$ — $6 \cdot 10^6$ клеток и подвергали метанолизу с 5 мл смеси 1,5 % серной кислоты в метаноле при 85°С в течение 30 мин. Метилловые эфиры жирных кислот упаривали досуха в токе N_2 , растворяли в 3 мл гексана и анализировали на хроматографе «Цвет-164» с ионизационным детектором при чувствительности 10^{-12} А на колонке с полиэтиленгликольсукцинатом, нанесенным на силианизированный хроматон N-AW-HMDS в количестве 5 %. Температура колонки 194°С, газ-носитель N_2 , скорость 30 мл/мин. Пики метиловых эфиров жирных кислот идентифицировали по стандартам. ПОЛ оценивали по накоплению малонового диальдегида (МДА) при инкубации суспензии лимфоцитов в НАДФН- и аскорбатзависимых системах [2]. Содержание α_2 -макроглобулина определяли энзиматическим методом по гидролизу N-бензоил-DL-аргининпаранитроанилида [10]. Полученные данные обрабатывали статистически с использованием критерия t Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Результаты исследования, представленные в табл. 1, показывают, что в условиях интоксикации крыс ТХМ функциональная активность лимфоцитов значительно подавлена. При однократном введении ТХМ включение ^3H -тимидина в ДНК при инкубации лимфоцитов с ФГА и КонА снижается соответственно в 1,9 и 8,7 раза, при 7-дневном действии ксенобиотиками в 1,7 и 1,6 раза соответственно. О сни-



Влияние левамизола на содержание α_2 -макроглобулина в сыворотке крови при отравлении ТХМ.

А — мг на 1 г белка сыворотки; Б — г/л сыворотки. 1 — контроль; 2 — однократное введение ТХМ; 3 — 7-дневное введение ТХМ; 4 — 7-дневное введение ТХМ+левамизол; 5 — 7-дневное введение ТХМ+левамизол+фенobarбитал.

жении синтетической активности лимфоцитов свидетельствует уменьшение отношения РНК/ДНК при однократном и повторном введении ТХМ. В отличие от митогениндуцированной стимуляции лимфоцитов спонтанная бласттрансформация в условиях однократного введения ТХМ резко возрастает, интенсивность включения ^3H -тимидина в ДНК увеличивается при этом в 2 раза.

Введение крысам, отравленным ТХМ, левамизола приводит к существенному возрастанию функциональной активности лимфоцитов. В условиях острой интоксикации ТХМ митогениндуцированное включение ^3H -тимидина в ДНК под действием левамизола увеличивается на 41,6 и 205,9 %, при повторном введении ТХМ — на 59,9 и 33,5 % при инкубации с ФГА и КоНА

соответственно. Как следует из данных, представленных на рисунке, левамизол в дозе 50 мкг/кг оказывает корригирующее влияние на содержание α_2 -макроглобулина в сыворотке крови крыс, отравленных ТХМ. Ранее нами [5] было показано, что введение крысам, отравленным ТХМ, фенобарбитала способствует нормализации процессов полирибосомальной трансляции в гепатоцитах. Поскольку значительная часть α_2 -макроглобулина синтезируется в гепатоцитах, представляло интерес изучить влияние дополнительного левамизола введения фенобарбитала — по 40 мг/кг в течение 7 сут — на сывороточную концентрацию гликопротеида при отравлении ТХМ. Из результатов, представленных на рисунке, видно, что в этих условиях содержание α_2 -макроглобулина в сыворотке крови существенно возрастает. Учитывая иммунорегуляторные свойства α_2 -макроглобулина, можно полагать, что тенденция к нормализации левамизолом спонтанной РБТЛ у крыс, получавших ТХМ, частично обусловлена изменением концентрации в сыворотке этого гликопротеида, взаимодействующего со специфическими рецепторами структурной поверхности мембран лимфоцитов.

В наших экспериментах интоксикация крыс ТХМ сопровождалась значительными изменениями профиля жирных кислот мембранных фосфолипидов лимфоцитов, что особенно отчетливо выражено при повторном 7-дневном введении ТХМ (табл. 2). При од-

Таблица 2

Жирнокислотный состав фосфолипидов и содержание холестерина в лимфоцитах крыс при интоксикации ТХМ и введении левамизола ($M \pm m$)

Показатель	Контроль (1-я группа)	Условия эксперимента			
		однократное введение препаратов		7-дневное введение препаратов	
		ТХМ (2-я группа)	ТХМ левамизол (3-я группа)	ТХМ (4-я группа)	ТХМ левамизол (5-я группа)
Жирные кислоты (%):					
С _{16:0}	29,02±2,4	27,1±1,7	21,02±2,2*2	39,7±6,6*1	23,1±1,0*4
С _{18:0}	27,2±1,3	29,4±1,2	33,8±4,9	44,6±5,3*1	29,7±2,4**
С _{18:1}	11,4±0,8	17,4±2,2*1	12,3±1,3	4,8±5,3*1	18,1±3,0*4
С _{18:2}	6,7±0,7	8,1±1,1	10,7±0,5	4,0±0,6*1	5,8±0,6*4
С _{18:3}	0,5±0,1	1,1±0,2*1	0,3±0,01*2	0,1±0,03*1	0,7±0,1*4
С _{20:4}	24,2±1,8	16,8±1,9*1	22,0±3,8	6,8±2,0*1	22,4±2,0*4
Полиеновые кислоты, %	31,4±2,5	26,0±1,8*1	45,8±3,2*2	10,8±1,7*1	22,8±2,4*4
Холестерин, мкг	0,0034	0,0011*1	0,0017*2	0,0019*1	0,0025*1

Т а б л и ц а 3

Скорость ПОЛ (в мкмоль МДА на 1 мг белка) в НАДФН- и аскорбатзависимых системах в лимфоцитах крыс в норме и при введении ТХМ

Группа	Время инкубации, мин	НАДФН-зависимая система	Аскорбатзависимая система
Контроль	15	2,23±0,45	0,32±0,14
	30	2,82±0,17	0,33±0,08
Опыт	15	2,11±0,25	0,31±0,09
	30	1,85±0,22*	0,25±0,14

Примечание. Звездочка — различия с контролем достоверны при $p < 0,05$; $n = 5$.

нократном введении ТХМ на фоне снижения содержания арахидоновой кислоты и суммарного содержания полиеновых жирных кислот возрастает уровень $C_{18:1}$, $C_{18:3}$ и существенно — на 47% — снижается концентрация холестерина — регулятора фазового состояния мембранных липидов. Поскольку обогащение мембран лимфоцитов холестерином угнетает вызванную митогенами и антигенами РБТЛ [8], не исключена возможность альтернативного влияния сниженной в условиях химического повреждения мембран концентрации холестерина на функциональную активность лимфоцитов. При 7-дневном введении ТХМ интенсивность изменений жирнокислотного состава фосфолипидов лимфоцитов возрастает, что может быть связано с повторным действием на мембраны CCl_3 -радикала — продукта биотрансформации ТХМ и истощением антиоксидантных систем клетки [6]. В этих условиях при снижении в 3,6 раза уровня арахидоновой кислоты отмечается резкое уменьшение содержания олеиновой, линолевой и линоленовой кислот, а содержание $C_{16:0}$ и $C_{18:0}$ возрастает.

Поскольку полиненасыщенные жирные кислоты, главным образом арахидоновая кислота, являются основным субстратом ПОЛ в биомембранах, мы провели исследование интенсивности липопероксидации в лимфоцитах. Как следует из данных табл. 3, лимфоциты крыс характеризуются наличием активного НАДФН-зависимого ПОЛ по сравнению с ферментативным аскорбатзависимым, что объясняется присутствием цитохрома Р-450 и цепи электронного транспорта, подобной монооксигеназной системе гепатоци-

тов. При интоксикации ТХМ активность НАДФН-зависимого ПОЛ в лимфоцитах несколько снижается, что соответствует отмеченному выше уменьшению концентрации полиненасыщенных жирных кислот — основного субстрата ПОЛ.

На фоне введения крысам левамизола ТХМ обуславливает менее выраженные изменения жирнокислотного состава мембранных фосфолипидов. При однократном введении ксенобиотика в лимфоцитах крыс, получавших левамизол, содержание полиненасыщенных жирных кислот нормализуется, а при повторном действии токсина остается достоверно выше, чем у животных без иммуномодулятора. Левамизол нормализует содержание $C_{18:3}$, $C_{18:2}$ и $C_{18:0}$ в лимфоцитах, что свидетельствует о корригирующем действии препарата на процессы ПОЛ, подобно эффекту, обнаруженному в клетках печени [15, 16].

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о повреждающем действии интоксикации ТХМ на фосфолипидную матрицу мембран лимфоцитов. Снижение уровня полиненасыщенных жирных кислот обусловлено, вероятно, их окислительной деструкцией в ходе НАДФН- и цитохром Р-40-зависимого ПОЛ. В свою очередь ослабление при интоксикации ТХМ стимулирующего действия ФГА и КонА на включение 3H -тимидина в ДНК лимфоцитов может зависеть от нарушения структуры мембранных липидов. Действительно, первичным молекулярным актом стимуляции лектинами биосинтеза ДНК и клеточной пролиферации является взаимодействие их с углеводными детерминантами мембранных рецепторов, что приводит к включению Ca^{2+} и циклонуклеотидзависимых внутриклеточных биохимических процессов [9]. Вызванные ТХМ пероксидация мембранных фосфолипидов и снижение концентрации холестерина, изменяя подвижность аннулярных липидов, нарушают эффективность связывания лектинов с рецепторными белками лимфоцитов. Вероятно, наличие в молекуле левамизола атома серы может способствовать, как и у других серосодержащих соединений, регенерации восстановленного железа в мембранах и реактивации липидзависимых мембранных ферментов и белков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеева Н. Е., Кизим А. И., Карпенко Г. Ф. // Укр. биохим. журн. — 1985. — Т. 57, № 1. — С. 58—61.
2. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М., 1972.
3. Голиков С. П., Саноцкий И. В., Тиунов Л. А. Общие механизмы токсического действия. — М., 1986.
4. Головенко И. Я., Галкин В. П. // Цитохром Р-450 и охрана внутренней среды человека — Пуццино, 1985. — С. 11—12.
5. Губский Ю. И., Радзинский В. Е., Смально П. Я., Корнюшина Т. В. // Докл. АН УССР, сер. Б. — 1986. — № 1. — С. 69—72.
6. Губский Ю. И., Хмелевский Ю. В., Сильченко Н. А. // Укр. биохим. журн. — 1983. — Т. 55, № 1. — С. 79—83.
7. Кишов М. Г., Аджиева Е. А., Цадкин Е. А. и др. // Системно-антисистемная регуляция функций в норме и патологии. — Киев, 1987. — С. 127—142.
8. Лопухин Ю. М., Арчаков А. И., Владимиров Ю. А., Коган Е. М. Холестериноз. — М., 1983.
9. Луцик М. Д., Панасюк Е. П., Луцик А. Д. Лектины. — Львов, 1981.
10. Методы определения прекалликреин-калликреиновой системы в крови человека: Метод. рекомендации / Веремеенко К. Н. и др. — Киев, 1978.
11. Сияк К. М., Оргаль М. Я., Крук В. М. // Лаб. дело. — 1976. — № 1. — С. 37—41.
12. Böyum A. // Scand. J. clin. Lab. Invest. — 1968. — Suppl. 97. — P. 28.
13. Karavkhov V. N., Karavkhova N. A., Yashin V. A. Methods and Techniques of Luminescents Cytodiagnosis: Preprint. — Pushchino, 1984.
14. Sohnle P. G., Collins-Lech C. // J. Immunol. — 1981. — Vol. 127, N 9. — P. 612—615.
15. Yoshikawa T., Furukawa J., Wakamatsu J., Kondo M. // Biomed. Express. — 1981. — Vol. 35, N 7. — P. 208—211.
16. Yoshikawa T., Furukawa J., Wakamatsu Y., Kondo M. // Experientia (Basel). — 1982. — Vol. 38, N 4. — P. 501—502.

Поступила 10.09.87

EFFECT OF LEVAMISOLE ON THE FUNCTIONAL ACTIVITY AND FATTY ACID COMPOSITION OF LYMPHOCYTES, CELL MEMBRANE OF WHICH WAS IMPAIRED WITH TETRACHLORMETHANE

Yu. I. Gubsky, G. B. Afonina, T. S. Bryuzgina, E. Ya. Kravchenko, Z. T. Radlovskaaya, T. P. Prady, O. V. Zadorina, V. G. Bordonos

Medical School, Kiev

After administration of tetrachlormethane into rats fatty acid composition of lymphocyte membrane phospholipids was altered, while functional activity of the cells was decreased. Levamisole exhibited protective effect, affecting apparently as an antioxidant.

УДК 616.155.1-008.939.15-02:613.164]-074-092.9

М. М. Мелконян, К. Г. Карагезян, С. Р. Овакимян

ОСОБЕННОСТИ ОБМЕНА ФОСФОЛИПИДОВ-ГЛИЦЕРИДОВ В МЕМБРАНАХ ЭРИТРОЦИТОВ БЕЛЫХ КРЫС ПРИ АКУСТИЧЕСКОМ СТРЕССЕ

Ереванский медицинский институт, Институт экспериментальной биологии АН Армянской ССР, Ереван

Ранее продемонстрированы изменения в антиоксидантной системе и интенсивности ферментативного и неферментативного процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в условиях акустического стресса [3, 5, 6].

Процесс ПОЛ регулируется уровнем эндогенных антиоксидантов, из которых главное место отводится α -токоферолу, а также присутствием фосфолипидов (ФЛ) и холестерина (ХС).

Целью настоящей работы явилось изучение закономерностей в развитии изменений в качественном и количественном составе ФЛ мембран эритроцитов, а также неэстерифицированных жирных кислот (НЭЖК) плазмы крови белых крыс-самцов в условиях острого и хронического акустического

стресса, изученного на фоне профилактического введения α -токоферолацетата (ТА).

Методика

Исследования проводили на белых крысах-самцах массой 150—200 г, содержащихся на обычном пищевом рационе. Животные были разделены на 6 групп: крысы 1-й группы служили контролем, крысы 2—6-й группы подвергали действию шума (91 дБ А) с максимальной энергией в области средних и высоких частот. Кроме того, в каждой опытной группе была выделена подгруппа животных, которым в течение всего эксперимента внутривенно инъецировали ТА в дозе 1 мг/кг. Сроки действия шума составили (соответственно по группам) 1 и 8 ч, 7, 28 и 65 сут ежедневно по 8 ч. Число животных при изучении ФЛ-состава в каждой группе равнялось 7, НЭЖК в зависимости от сроков исследования — от 7 до 12.

Таблица 1

Содержание ФЛ (в мкг липидного фосфора на 1 г сухого остатка) мембран эритроцитов, НЭЖК плазмы (в мкмоль на 1 л плазмы) и величина коэффициента ХС/ФЛ в условиях акустического стресса ($M \pm m$)

Исследуемый параметр	Группа животных					
	1-я	2-я	3-я	4-я	5-я	6-я
ЛФХ (7)	163,6±11,03	253,5±6,91 ^a	215,6±9,24 ^b	299,9±12,32 ^a	279,72±16,38 ^a	307,32±9,24 ^a
ФХ (7)	326,72±10,71	701,35±13,42 ^a	495,88±11,79 ^a	499,8±15,93 ^a	792,54±20,3 ^a	893,72±36,2 ^a
НФЛ (7)	689,73±14,32	1656,87±65,73 ^a	140,94±20,46 ^a	1251,17±35,13 ^a	1860,37±32,95 ^a	1985,03±43,02 ^a
КФЛ (7)	297,41±9,92	461,09±46,4 ^b	409,63±9,64 ^a	399,53±12,39 ^a	606,02±29,06 ^a	695,49±33,04 ^a
Отношение НФЛ/КФЛ (7)	2,32±0,05	3,86±0,58 ^b	2,79±0,09 ^b	3,14±0,07 ^a	3,14±0,14 ^a	2,81±0,13 ^b
Сумма ФЛ (7)	987,17±23,64	2117,96±70,36 ^a	1550,57±21,22 ^a	1649,46±45,85	2466,43±55,33 ^a	2680,51±28,94 ^a
ХС/ФЛ (7)	1,77±0,2	1,05±0,11 ^b	1,04±0,09 ^b	1,26±0,06 ^b	0,9±0,05	0,68±0,07 ^a
НЭЖК плазмы	566,25±56,01 (12)	334,4±36,9 ^b (9)	730,56±52,19 ^b (9)	653,9±73,3 (10)	2539,73±183,53 ^a (7)	735,0±96,5 (9)

Примечание. $p < 0,001$ — а; $p < 0,05$ — в; достоверность по отношению к контролю (1-й группе); в скобках приведено число проб.

Таблица 2

Содержание ФЛ (в мкг липидного фосфора на 1 г сухого остатка) мембран эритроцитов, НЭЖК плазмы (в мкмоль на 1 л плазмы) и величина коэффициента ХС/ФЛ в условиях акустического стресса на фоне введения ТА ($M \pm m$)

Исследуемый параметр	Группа животных					
	1-я	2-я	3-я	4-я	5-я	6-я
ЛФХ (7)	163,6±11,03	257,6±9,87 ^a	250,55±30,5	229,6±9,76 ^{a1}	88,6±4,8 ^{aa1}	136,98±13,92 ^{a1}
ФХ (7)	326,72±10,7	514,0±12,93 ^{aa1}	277,27±10,00 ^{a1}	308,8±11,34 ^a	302,6±10,5 ^{a1}	231,6±7,68 ^{aa1}
НФЛ (7)	689,73±14,32	1248,27±36,93 ^{aa1}	866,04±35,09 ^{aa1}	776,57±33,26 ^{a1}	660,9±25,59 ^{a1}	676,53±17,19 ^{a1}
КФЛ (7)	297,41±9,92	478,3±12,12 ^a	238,1±10,48 ^{aa1}	230,8±14,4 ^{a1}	177,05±13,41 ^{aa}	214,68±12,41 ^{aa}
Отношение НФЛ/КФЛ (7)	2,32±0,05	2,61±0,04 ^a	3,7±0,3 ^a	3,4±0,14 ^a	3,83±0,23 ^a	3,19±0,15 ^a
Сумма ФЛ (7)	987,17±23,64	1726,57±47,11 ^{aa1}	1104,14±31,71 ^{a1}	1007,37±45,88 ^{a1}	837,95±39,0 ^{a1}	891,206±20,67 ^{a1}
ХС/ФЛ	1,77±0,2	0,78±0,036 ^a	1,44±0,05	2,06±0,27	1,59±0,17 ^{a1}	0,5±0,02 ^a
НЭЖК плазмы	566,25±56,01 (12)	402,5±42,2 (8)	649,4±88,7 (9)	635,5±63,4 (10)	969,38±133,3 (8)	668,5±74,9 (10)

Примечание. p_1 — достоверность по отношению к контролю — $< 0,001$ — а; $< 0,05$ — в. p_2 — достоверность по отношению к соответствующим группам стрессированных животных — $< 0,001$ — а₁; $< 0,05$ — в₁; в скобках указано число проб.

Кровь для исследования стабилизировали 1,43 % оксалатом, эритроциты отделяли центрифугированием, эритроцитарные мембраны получали по [12]. Уровень НЭЖК в плазме крови измеряли микроколориметрическим методом и выражали в мкмоль на 1 л плазмы крови [8]. Определение ФЛ производили в суммарном липидном экстракте, полученном по [11] с последующим фракционированием методом одномерной восходящей хроматографии на бумаге Filtrak-FN-11 (ГДР) по [14] в модификациях [9] и [2].

Результаты и обсуждение

Результаты исследований, представленные в табл. 1, свидетельствуют о развитии качественных и количественных изменений как индивидуальных, так и суммарных ФЛ мембран эритроцитов.

Отмечены тенденции к увеличению уровня суммарных ФЛ в течение всего эксперимента, достоверное его увеличение в остром периоде стресса (2-я группа). Определенный интерес представляет доминирование уровня нейтральных ФЛ (НФЛ) над кислыми ФЛ (КФЛ), о чем свидетельствует увеличение коэффициента (К) НФЛ/КФЛ, особенно в остром периоде стресса (~ на 55,2 %). Значительный рост суммы ФЛ обусловлен преимущественно НФЛ, среди которых важную в структурно-функциональном отношении роль играют лизофосфатидилхолины (ЛФХ), оказывающие выраженное мембранолитическое и мембранотоксическое действие. Характерной является и отчетливая однонаправленность сдвигов в уровнях фосфатидилхолинов (ФХ) и ЛФХ. Наблюдаемое увеличение количества ФЛ в исследованной биологической системе может быть как следствием высвобождения их из соответствующих липид-белковых комплексов, так и результатом биосинтеза их *de novo*.

При этом рост уровня ЛФХ, по всей вероятности, обусловлен активированием процессов липолиза вследствие стимулирования фосфолипазы А₂, сопровождающегося параллельным ростом субстратов для данного фермента. Поскольку активирование процессов деацилирования приводит к повышенному выходу жирных кислот, отмечаемому и в наших исследованиях, мы склонны думать, что он обусловлен именно активированием процессов липолиза.

Барьерные функции биологических мембран и активность локализованных

на них ферментов во многом определяются отдельными компонентами ФЛ. При этом наружная мембрана в основном представлена трудноокисляемыми холинфосфатидами, ФХ и сфингомиелинами (СФ), которыми, по-видимому, и обеспечивается защитная функция мембраны. Наблюдаемый в условиях острого и хронического акустического стресса рост ФЛ сопровождается и одновременным увеличением содержания ХС [6]. Однако, как показывают результаты проведенных наблюдений, акустический стресс в целом сопровождается значительным снижением К ХС/ФЛ (см. табл. 1), что указывает на нарушение липид-липидных взаимодействий и, следовательно, вязкости липидного бислоя. Результатом развивающихся структурных превращений является и наблюдавшееся нами ранее изменение активности Na⁺, K⁺-АТФазы мембран эритроцитов, реагирующей на изменение степени текучести биомембран [5]. Снижение жидкостности мембраны приводит к устранению кооперативных взаимодействий между АТФ-связывающими центрами и предотвращает «сшивание» больших субъединиц фермента, что обуславливает отрицательную кооперативность по субстрату, приводя к снижению активности АТФазы [1]. Эксперименты, проведенные в модельной системе, свидетельствуют об ингибирующем действии ЛФХ на активность глюкозо-6-фосфатазы и о блокировании этого процесса ХС [10], что подтверждает роль липидного окружения в функциональной активности мембранных протеинов, в частности ферментов.

Способность к автоокислению является универсальным свойством липидов, входящих в состав клеточных мембран, а скорость и глубина ПОЛ в значительной степени определяют их функциональную активность. Ранее нами было показано активирование ПОЛ в эритроцитах белых крыс при акустическом стрессе, сопровождавшееся понижением уровня эндогенных антиоксидантов [3, 5].

Рост содержания трудноокисляемых ФЛ (СФ и ФХ), НФЛ и ХС, способствующих стабилизации липидного бислоя и тем самым препятствующих чрезмерному активированию свободно-радикального окисления липидов, можно отнести к защитным механизмам,

направленным на снижение окисляемости мембранных липидов, особенно в условиях дефицита токоферола.

Все вышесказанное послужило основанием для разработки превентивных мер, направленных в первую очередь на сохранение и восстановление структурных компонентов и способствующих поддержанию антиоксидантного статуса (клетки) органов и тканей, изучение которых выявило резкое падение активности антирадикальных систем [4] в условиях кратковременного и длительного воздействия шума. С этой целью были проведены исследования эффектов экзогенного ТА на фоне действия шума (табл. 2).

Результаты этих исследований свидетельствуют о тенденции к нормализации суммы ФЛ под действием экзогенного ТА в условиях воздействия шума. При этом наиболее значимым является снижение уровня ЛФХ у животных 5-й и 6-й групп (на 46,2 и 12,2 % соответственно).

При обсуждении механизмов действия ТА необходимо учитывать универсальность протекающих изменений, а следовательно, и влияние его, в частности, на синаптические мембраны. Повидимому, ТА, стабилизируя липидный бислой синаптических мембран, способен также ограничивать стрессорную активацию адренергической и гипоталамико-адреналовой систем [7]. Полученные нами ранее данные свидетельствуют о выраженном регуляторном влиянии ТА на ПОЛ в мозге, печени, сердце, крови в условиях шумового стресса [4, 5]. Наблюдаемые сдвиги могут расцениваться как результат не только локального ингибирования ПОЛ, но и участия ТА в функционировании данной биологической системы и как антиоксиданта, и как мощного регулятора важнейших биосинтетических процессов, что подтверждает необходимость профилактического применения ТА в условиях шумового стресса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Болдырев А. А., Рубцов А. М. // Функциональная активность ферментов и пути ее регуляции. — М., 1981. — С. 82—96.

2. Карагезян К. Г. // Лаб. дело. — 1969. — № 1. — С. 23—25.
3. Мелконян М. М., Мхитарян В. Г., Мелик-Агаева Е. А., Рухкян А. А. // Биол. журн. Армении. — 1983. — Т. 36, № 7. — С. 582—587.
4. Мелконян М. М., Аракелян А. Т., Мхитарян В. Г. // Там же. — Т. 35, № 10. — С. 818—825.
5. Мелконян М. М., Мхитарян В. Г. // Бюл. экспер. биол. — 1985. — № 9. — С. 270—273.
6. Мелконян М. М. // Нейрохимия. — 1984. — Т. 3, № 3. — С. 331—332.
7. Петрова В. А., Мальшева В. В., Манухин Б. П., Меерсон Ф. З. // Вопр. мед. химии. — 1985. — № 6. — С. 115—118.
8. Прохорова М. Ю., Тиунов М. П., Шакалис Д. А. // Лаб. дело. — 1977. — № 9. — С. 535.
9. Смирнов А. А., Чирковская Е. В., Манукян К. Г. // Биохимия. — 1961. — № 6. — С. 1023—1027.
10. Chauhan V. P. S., Ramsammy L. S., Brockerhoff H. // Biochim. biophys. Acta. — 1984. — Vol. 772, N 3. — P. 239—243.
11. Folch J. // J. biol. Chem. — 1949. — Vol. 177, N 2. — P. 497—501.
12. Limber G. R., Davie R. F., Baker A. M. S. // Blood. — 1970. — Vol. 36, N 2. — P. 111—118.
13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265—275.
14. Marinetti G. V., Stoltz E. // Biochim. biophys. Acta. — 1956. — Vol. 21. — P. 168—173.

Поступила 21.11.87

METABOLISM OF PHOSPHOLIPIDS-GLYCERIDES IN RAT ERYTHROCYTE MEMBRANES UNDER CONDITIONS OF ACOUSTIC STRESS

M. M. Melkonian, K. G. Karaguezian, S. S. Novakimyan

Medical School, Institute of Experimental Biology, Academy of Sciences of the Armenian SSR, Yerevan

Metabolism of phospholipids-glycerides was studied in rat erythrocyte membranes under conditions of acute and chronic acoustic stress. Acoustic stress was accompanied by significant qualitative and quantitative alterations both in total phospholipids and in neutral and acid phospholipids (NPL and APL, respectively). The increase in content of neutral phospholipids was more distinct as compared with that of acid phospholipids. The pronounced alterations in physico-chemical properties of the membranes were apparently related to an increase in the ratio NPL/APL. After administration of α -tocopherol acetate content of the erythrocyte membrane phospholipids and the level of endogenous α -tocopherol was normalized.

Т. М. Чулкова

АТЕРОГЕННЫЕ МОДИФИКАЦИИ ЛИПОПРОТЕИДОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ В ПРОЦЕССЕ ОБРАЗОВАНИЯ ФИБРИНА И ФИБРИНОЛИЗА

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Тромботические процессы играют существенную роль в патогенезе атеросклероза, способствуя его началу и прогрессированию [10]. Роль тромбоцитов в тромбо- и атерогенезе интенсивно изучается [2, 14]. Данные о значении внутрисстеночных фибриновых отложений для развития атеросклеротического поражения сосудов крайне ограничены. Морфологические исследования показали, что в атеросклеротически измененной интиме пенистые клетки располагаются в местах скопления фибриновых ремнантов в тесном контакте с ними [11]. В атеросклеротических бляшках, богатых липидами, обнаруживается много фибрина [16].

Ранее нами [4, 5] было показано, что липопротеиды низкой плотности (ЛПНП) взаимодействуют с иммобилизованным фибронектином, фибриногеном и фибриноген-фибронектиновым комплексом, причем взаимодействие с фибронектином значительно усиливается после частичной деградации апопротеина В в молекуле ЛПНП. Мы предполагаем, что в процессе реакций гемостаза возможны изменения свойств ЛПНП и образование комплексов ЛПНП с биологически активными продуктами деградации фибриногена и фибронектина. Подобные модификации ЛПНП могут приводить к повышению их атерогенности. Изучению этого вопроса и посвящена настоящая работа.

Методика

ЛПНП (плотность 1,019—1,063 г/мл) выделяли из сыворотки крови здоровых доноров путем препаративного ультрацентрифугирования [9]. Затем их (1,5 мг белка в 1 мл 0,05 М трис-НСI-буфера рН 7,4, содержащего 0,15 М NaCl и 0,02 М CaCl₂) инкубировали с 2 мг фибриногена и 0,5 мг фибронектина в присутствии 1 ед. тромбина в течение 2 ч при комнатной температуре. Образовавшийся фибриновый сгусток лизировали при помощи плазмина (0,2 ед.) в течение 4 ч при 37 °С. Контролем служили ЛПНП, обработанные аналогичным образом, но без добавления ферментов, фибриногена или фибронектина, и ЛПНП, обработанные тромбином и плазми-

ном. ЛПНП выделяли из инкубационной смеси при помощи хроматографии на колонке (1×33 см) с сефарозой 6В. Колонку уравновешивали и элюировали 0,05 М трис-НСI-буфером рН 7,4, содержащим 0,15 М NaCl, 1 мМ фенолметилсульфонилфторид (ФМСФ) и 1 мМ ЭДТА.

Для определения количества ЛПНП, связывающихся с фибрином, смешивали физиологические концентрации ЛПНП, фибриногена и фибронектина в 2 мл 0,05 М трис-НСI-буфера рН 7,4, содержащего 0,15 М NaCl и 0,02 М CaCl₂, и инкубировали с 2 ед. тромбина в течение 2 ч при комнатной температуре. ЛПНП элюировали из фибринового геля 5 объемами указанного буфера в течение 24 ч при 4 °С и в суммарном элюате определяли количество белка и холестерина.

Содержание белка в пробах определяли по методу Лоури [13] и методом конкурентного иммуноферментного анализа [15]. Антисыворотки против апопротеина В, фибриногена и фибронектина получали при иммунизации кроликов. Фибронектин выделяли из сыворотки крови человека методом аффинной хроматографии на коллаген-сефарозе и последующего фракционирования сульфатом аммония [1]. Используемый в работе коммерческий препарат фибриногена (Каунаское предприятие бактериальных препаратов) предварительно диализовали против 0,15 М NaCl в 0,05 М трис-НСI-буфере рН 7,4. Суммарный холестерин определяли ферментативным методом с применением набора реактивов фирмы «Baker», а свободный холестерин — при помощи набора реактивов фирмы «Вако». Электрофоретическое исследование препаратов ЛПНП проводили в 3 % ПААГ (отношение акриламида к N,N'-метиленбисакриламиду 4:1) в 0,04 М трис-глицериновом буфере рН 8,3. Препарат предварительно обрабатывали раствором судана черного В в этиленгликоле [3]. Электрофоретическую подвижность модифицированных ЛПНП выражали относительно электрофоретической подвижности нативных ЛПНП. Апопротеин В анализировали при электрофорезе на пластинках в 5 % ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) [12]. Гели окрашивали 0,25 % кумасси G-250. ЛПНП ацетилировали при помощи уксусного ангидрида [6]. Аналитическое ультрацентрифугирование ЛПНП проводили на ультрацентрифуге «Спинко Е» при 52 640 об/мин при плотности раствора 1,063 г/мл и 0,5 % концентрации ЛПНП.

Для определения атерогенности ЛПНП проводили изучение накопления холестерина в культуре перитонеальных макрофагов мыши при их инкубации в присутствии нативных и модифицированных ЛПНП [8]. Для получения макрофагов белым беспородным мышам-самцам внутрибрюшинно вводили по 7 мл среды А (среда Игла, 10 % сыворотки крупного рогатого скота, 290 мкг/мл L-глутамина,

100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина), содержащей 80 ЕД/мл гепарина. Из перитонеальной промывной жидкости клетки собирали центрифугированием (900 об/мин, 5 мин, 4 °С), промывали средой А, ресуспендировали в этой же среде и разбавляли до плотности 10^6 — $2 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл. Аликвоты суспензии (2 мл) помещали в пластиковые чашки Петри (40×10 мм, завод «Медполимер», Ленинград) и инкубировали при 37 °С в атмосфере воздуха с 5 % CO_2 . Через 2 ч клетки промывали теплой средой А и в каждую чашку вносили по 2 мл среды А, содержащей нативные или модифицированные ЛПНП (по 50 мкг холестерина на 1 мл), и инкубировали при 37 °С в атмосфере воздуха с 5 % CO_2 . Через 24 ч культуральную среду в чашках Петри заменяли на свежую среду А, вновь добавляли ЛПНП и инкубировали в течение 48 ч при 37 °С в атмосфере воздуха с 5 % CO_2 . Для анализа каждой пробы ЛПНП использовали по 4 чашки Петри. После окончания инкубации культуральную среду сливали и клетки 5 раз промывали 0,15 М NaCl в 0,05 М трис-НСI-буфере рН 7,4 с добавлением альбумина (2 мг/мл) и 3 раза буфером без альбумина. Клетки снимали с помощью резиновой палочки, собирали центрифугированием (900 об/мин, 5 мин) и вновь суспендировали в 1 мл 0,15 М NaCl . Отбирали 50 мкл суспензии для определения количества клеточного белка, надосадочную жидкость отделяли центрифугированием (900 об/мин, 5 мин). Клетки заливали 2 мл хлороформ-метаноловой смеси (2:1), встряхивали в течение минуты и оставляли на 30 мин при 24 °С, затем для разделения фаз добавляли 0,5 мл дистиллированной воды, встряхивали 30 с и центрифугировали в течение 10 мин при 1000 об/мин. Отбирали нижнюю фазу, упаривали и добавляли реактивы для определения общего и свободного холестерина [7].

Результаты и их обсуждение

ЛПНП инкубировали в смеси с фибриногеном и фибронектином в присутствии тромбина, а затем после образования фибрина — в присутствии плазмнна до растворения фибринового сгустка (см. «Методику»). Обработанные таким образом ЛПНП выделяли из инкубационной смеси и освобождали от тромбина и плазмнна при хроматографии на колонке с сефарозой 6В в присутствии 10^{-3} М ФМСФ (рис. 1). Основную массу липопротеидов элюировали из колонки в 4 и 5 фракциях. ЛПНП этих фракций (ЛПНП-Ф) использовали для дальнейших экспериментов. Результаты иммунологического исследования и определения отношения холестерин/белок указывали на наличие в препарате ЛПНП-Ф других белковых компонентов, кроме ЛПНП. Отношение холестерин/белок у контрольных ЛПНП

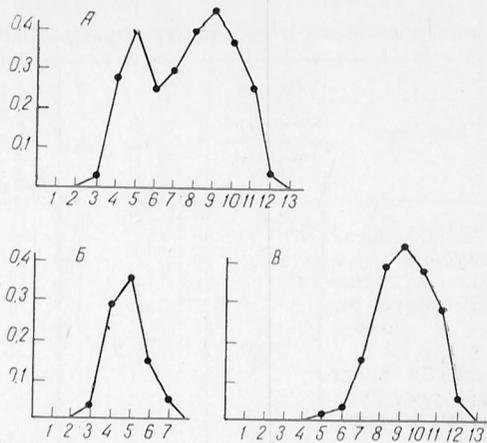


Рис. 1. Хроматография ЛПНП на колонке с сефарозой 6В.

Элюционные кривые, полученные при выделении ЛПНП-Ф (А), хроматографировании нативных ЛПНП (Б) и фибринового лизата (В). По оси абсцисс — номер фракций (каждая фракция содержит 2,5 мл элюата); по оси ординат — оптическая плотность при 280 нм.

равнялось 1,5, а у ЛПНП-Ф — 1. При иммуноферментном анализе было обнаружено, что ЛПНП-Ф ингибируют реакцию фибриногена и фибронектина с соответствующими специфическими антисыворотками. Следовательно, препарат содержал фрагменты фибриногена и фибронектина. Наличие продуктов деградации фибриногена и фибронектина в ЛПНП-Ф не могло быть результатом плохого хроматографического разделения белковой смеси, так как контрольная гель-фильтрация (см. рис. 1) ЛПНП и фибринового лизата показала, что элюционные объемы ЛПНП и продуктов фибринолиза различны. Фрагменты фибриногена и фибронектина не были обнаружены иммуноферментным анализом в 4, 5 и 6 фракциях при контрольной хроматографии фибринового лизата.

Таким образом, можно предполагать, что в процессе образования фибрина и фибринолиза ЛПНП взаимодействуют с фибриногеном и фибронектином или продуктами их превращений и при гель-фильтрации элюируются в комплексе с этими продуктами.

Было определено количество ЛПНП, связывающихся с фибрином, образующимся из 0,3 % раствора фибриногена под действием тромбина. Обнаружено, что до 20 % ЛПНП (по холестерину) остается в фибриновом геле после его пятикратного промывания

Таблица 1
Свойства нативных и модифицированных ЛПНП

Препарат	Относительная электрофоретическая подвижность	S_T ($d=1,063$ г/мл)	Холестерин (в мкг)/Белок (в мкг)
ЛПНП после инкубации в 0,05 М трис-НСI-буфере рН 7,4 в течение 6 ч при 37 °С	1,0	5,2	1,5
ЛПНП после обработки тромбином и плазмином	1,2	—	1,5
ЛПНП-Ф	1,2 и 1,6	3,6	1,0

0,15 М NaCl в 0,05 М трис-НСI-буфере рН 7,4. Липопротеиды высокой плотности в этих же условиях полностью элюировались из геля.

Комплексообразование между ЛПНП, фибриногеном и фибронектином, по-видимому, обусловлено слабым нековалентным взаимодействием, так как оно нарушается в растворах с высокой солевой концентрацией. В препарате ЛПНП, выделенном из фибринового лизата при ультрацентрифугировании в растворе с плотностью 1,12 г/мл, фибриноген и фибронектин не обнаруживались иммуноферментным методом. Не исключена возможность наличия в этом препарате ЛПНП низкомолекулярных фрагментов фибриногена и фибронектина. Этот вопрос требует дальнейшего изучения.

Были исследованы некоторые физико-химические свойства ЛПНП-Ф и контрольных ЛПНП. По сравнению с нативными липопротеидами ЛПНП-Ф, так же как и ЛПНП, обработанные тромбином и плазмином, имели деградированный апопротеин В. После инкубации ЛПНП с тромбином и плазмином при электрофорезе в 5 % ПААГ в присутствии ДСН отмечается появление 5 новых фракций апопротеина В с молекулярной массой от 80 до 250 кД. В препаратах ЛПНП-Ф обнаруживается, кроме этих 5 электрофоретических компонентов, еще 2 с молекулярной массой более 250 кД. Коэффициент флотации при $d=1,063$ г/мл и отношение холестерин/белок у ЛПНП-Ф меньше, чем у контрольных ЛПНП, что указывает на увеличение

Рис. 2. Электрофорез нативных ЛПНП (1) и ЛПНП-Ф (2) в 3 % ПААГ.



плотности частиц ЛПНП в результате их модификации (табл. 1). ЛПНП-Ф обладают большей электрофоретической подвижностью, чем нативные ЛПНП и ЛПНП, обработанные тромбином и плазмином. В 3 из 5 препаратах ЛПНП-Ф, полученных от разных доноров, обнаруживается 2 суданположительных электрофоретических компонента (рис. 2).

Для определения атерогенности ЛПНП-Ф было исследовано накопление холестерина в культуре перитонеальных макрофагов мыши при инкубации в присутствии нативных и модифицированных ЛПНП (табл. 2). Макрофаги, инкубированные с ЛПНП-Ф, содержали в 2,4 раза больше общего холестерина и в 3,8 раза больше эфиров холестерина, чем макрофаги, инкуби-

Таблица 2
Содержание холестерина в культуре макрофагов, инкубированных в течение 72 ч с нативными и модифицированными ЛПНП

Препарат	Общий холестерин (в мкг)/клеточный белок (в мг)	Эфир холестерина (в мкг)/клеточный белок (в мг)
ЛПНП после инкубации в 0,05 М трис-НСI-буфере рН 7,4 в течение 6 ч при 37 °С	46	11
ЛПНП после обработки тромбином и плазмином	43	15
ЛПНП-Ф	114	42
Ацетилированные ЛПНП	125	—

Примечание. Каждая цифра — средняя трех опытов.

рованные в присутствии контрольных ЛПНП (нативных ЛПНП и ЛПНП, обработанных тромбином и плазмином). Причем ЛПНП-Ф оказывают почти такое же действие на накопление холестерина в макрофагах, что и ацетилованные ЛПНП.

Результаты проведенного исследования показали, что ЛПНП при инкубации в присутствии фибриногена, фибронектина, тромбина и плазмина подвергаются модификации. В процессе превращения фибриногена в фибрин часть ЛПНП связывается с фибриновым сгустком. После фибринолиза модифицированные ЛПНП могут находиться в комплексе с продуктами деградации фибриногена и фибронектина. Инкубация таких модифицированных ЛПНП с перитонеальными макрофагами мыши приводит к накоплению эфиров холестерина в клетках.

Таким образом, тромболитические процессы в сосудистой стенке могут способствовать как отложению ЛПНП в межклеточном матриксе, так и накоплению холестерина в клетках.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зыкова Т. А., Златопольский А. Д., Мазуров В. И. // *Вопр. мед. химии.* — 1983. — № 5. — С. 114—117.
2. Лейтин В. Л., Свиридов Д. Д. // *Стенка сосудов в атеро- и тромбогенезе.* — М., 1983. — С. 155—175.
3. Маурер Г. Диск-электрофорез: Пер. с нем. — М., 1971. — С. 93.
4. Чулкова Т. М. // *Вопр. мед. химии.* — 1986. — № 6. — С. 70—73.
5. Чулкова Т. М. // *Бюл. Экспер. биол.* — 1987. — № 9. — С. 309.
6. Bassu S. K., Goldstein J. L., Anderson R. G. W., Braun M. S. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.* — 1976. — Vol. 73. — P. 3178—3182.
7. Gamble W., Vayghan M., Kruth H. S., Avigan J. // *J. Lipid Res.* — 1978. — Vol. 19. — P. 1068—1070.
8. Goldstein J. L., Ho J. K., Bassu S. K., Braun M. S. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.* — 1979. — Vol. 76. — P. 333—337.

УДК 615.357:577.175.722].033.1.076.9

Л. М. Шкуматов

КИНЕТИКА ИСЧЕЗНОВЕНИЯ ИНСУЛИНА ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ КРЫС

Институт радиобиологии АН БССР, Минск

Концентрация инсулина в крови определяется соотношением скоростей поступления (секреции) и выведения (элиминации) гормона. Элиминация —

9. Haavel R. J., Eder H. A., Bragdon J. H. // *J. clin. Invest.* — 1955. — Vol. 34. — P. 1345—1353.
10. Haust M. D. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 1985. — Vol. 454. — P. 154—160.
11. Haust M. D. // *Internist (Berl).* — 1978. — Bd 19. — S. 621—626.
12. Laemmli U. K. // *Nature.* — 1970. — Vol. 227. — P. 680—685.
13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // *J. biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
14. Moore S. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 1985. — Vol. 454. — P. 146—153.
15. Rennard S. L., Berg R., Martin G. R. et al. // *Analyt. Biochem.* — 1980. — Vol. 104. — P. 205—213.
16. Smith E. B., Alexander K. M., Massie J. B. // *Atherosclerosis.* — 1976. — Vol. 23. — P. 19—39.

Поступила 12.11.87

ATHEROGENIC MODIFICATIONS OF LOW DENSITY LIPOPROTEINS DURING FIBRIN FORMATION AND FIBRINOLYSIS

T. M. Chulkova

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

Low density lipoproteins (LDL) were modified after incubation with fibrinogen and fibronectin at physiological concentrations in presence of thrombin and, following the fibrin formation, in presence of plasmin. The modified LDL (LDL-F) isolated from plasmin digested fibrin by means of gel permeation chromatography on Sepharose 6B, were associated with fibrinogen and fibronectin degradation products. The LDL-F differed from control LDL in their physico-chemical properties: LDL-F contained the degraded apoprotein B, its electrophoretic mobility was increased, cholesterol/protein ratio as well as flotation coefficient at $d=1.063$ were decreased. The effect of LDL-F on lipid accumulation was studied. Content of cholesterol esters in macrophages incubated with LDL-F was higher 3.8-fold as compared with that of the cells incubated with control LDL. Thus, after incubation of LDL with fibrinogen and thrombin, 20% of the lipoprotein was bound to fibrin. The data obtained suggest that thrombosis may promote both LDL deposition in the vascular intercellular matrix and cellular lipid accumulation.

совокупность всех процессов, уменьшающих концентрацию инсулина, — к настоящему времени менее изучена, чем его секреция.

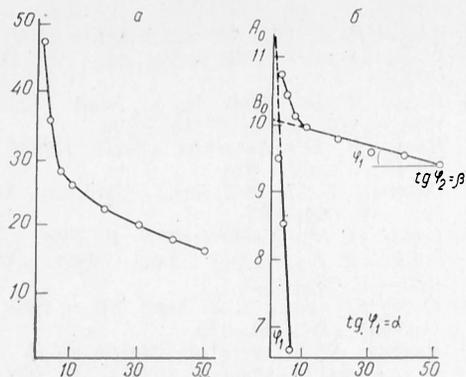


Рис. 1. Изменение концентрации ^{125}I -инсулина в плазме крови крыс.

a — в линейных координатах; *б* — в полулогарифмических координатах. По оси абсцисс — время (в мин); по осям ординат: *a* — имп/мин $\cdot 10^3$, *б* — натуральные логарифмы этих величин

Исчезновение инсулина из плазмы крови (ИИПК) описывается уравнениями фармакокинетических моделей с различным числом компартментов [1, 4, 8]. Определение кинетических параметров ИИПК позволяет дать количественную оценку отдельных этапов обмена инсулина и в определенной мере физиологических механизмов, обуславливающих их. Несмотря на значительную информативность данных о кинетике ИИПК, в общей массе публикаций, относящихся к инсулину, их немного. Причем преимущественно такие работы выполнены в клинике [2, 3, 6]. Экспериментальные результаты получены на животных разных видов с использованием различных методических подходов; поэтому эти данные фрагментарны и не всегда сопоставимы [8—10].

Цель настоящей работы — разработать методику определения кинетических параметров ИИПК белых крыс и обсудить возможность применения кинетических параметров для характеристики процессов распределения и обмена инсулина в организме.

Методика

Работа проведена на молодых (возраст 5—7 мес) самцах белых беспородных крыс, содержащихся на обычном рационе вивария. Наркотизированным крысам (тиопентал, 100 мг/кг внутривенно) в яремную вену и сонную артерию вставляли десятисантиметровые отрезки канюль из пластика КОД 200/520/020 (Югославия). В яремную вену вводили точно дозированное количество фармакокинетического маркера инсулина, в качестве которого использовали инсулин свиньи, меченный йодом-125, с удельной активностью

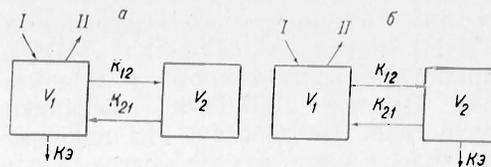


Рис. 2. Двухчастевая фармакокинетическая модель.

a — элиминация происходит из центрального компартмента (модель А); *б* — элиминация происходит из периферического компартмента (модель Б). I — доза; II — проба.

7 МБк/мкг. Крыс обычно вводили 40—60 кБк ^{125}I -инсулина в 0,5—1 мл 0,9 % раствора хлористого натрия, содержащего 100 Е/мл гепарина. Отбор проб проводили из сонной артерии через 2, 4, 7, 10, 20, 30, 40 и 50 мин после введения. Пробу крови (0,5 мл) немедленно центрифугировали 2 мин при $6 \cdot 10^3$ g. Точно отмеренное количество плазмы (100—200 мкл) переносили в пробирку, содержащую 1 мл 4 % раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Через 30—90 мин пробы центрифугировали 20 мин при $3 \cdot 10^3$ g. Радиоактивность осадков и надосадочных жидкостей подсчитывали на стинцилляционном счетчике 1272 фирмы «ЛКБ Валлак» (Финляндия).

После быстрого введения ^{125}I -инсулина радиоактивность осадков (нативного инсулина) вначале быстро, а затем все медленнее уменьшается (рис. 1). В координатах $\ln C$ — время график имеет два линейных участка, что соответствует двухчастевой фармакокинетической модели [1, 4] (рис. 2). Согласно этой модели, концентрация маркера в плазме крови определяется уравнением: $C_t = A_0 \cdot e^{\alpha t} + B_0 \cdot e^{\beta t}$.

Определение кинетических параметров проводили с помощью регрессионного анализа [1]. Расчет кинетических параметров в случае элиминации гормона из центральной камеры модель А (см. рис. 2) проводили по следующим формулам:

$$V_1 = \frac{\text{доза}}{A_0 + B_0};$$

константу скорости переноса инсулина из камеры 2 в камеру 1 (мин^{-1})

$$K_{21} = \frac{A_0 \beta + B_0 \alpha}{A_0 + B_0};$$

константу элиминации (мин^{-1})

$$K_3 = \frac{\alpha \cdot \beta}{K_{21}};$$

константу скорости переноса инсулина из камеры 1 в камеру 2 (мин^{-1})

$$K_{12} = \alpha + \beta - K_{21} - K_3;$$

кажущийся объем распределения внешней камеры (мл)

$$V_2 = \frac{K_{12} + K_{21}}{K_{21}} \cdot V_1;$$

клиренс инсулина (объем, полностью очищаю-

Кинетические параметры исчезновения ¹²⁵I-инсулина из плазмы крови белых крыс

Модель	V ₁ , мл/кг	V ₂ , мл/кг	K ₂₁ , мин ⁻¹	K ₁₂ , мин ⁻¹	K ₃ , мин ⁻¹	T _{1/2} , мин	Cl _у , мл·мин ⁻¹ на 1 кг
А	36,57±2,53	167,3±7,24	0,12583±0,01098	0,44668±0,02453	0,06434±0,00718*	11,38±1,31*	2,29±0,16
Б	36,57±2,53	149,4±8,60	0,11028±0,01000	0,51102±0,02970	0,01554±0,00150*	46,76±4,57*	2,29±0,16

Примечание. Разница между величинами, отмеченными звездочкой, достоверна (p<0,05).

щийся от инсулина в единицу времени) (мл/мин)

$$Cl_T = V_1 \cdot K_3;$$

удельный клиренс (мл/мин на 1 кг)

$$Cl_y = \frac{Cl_T}{m}.$$

Расчет кинетических параметров при элиминации из внешней камеры модель Б (см. рис. 2) проводили согласно [8]. В этом случае принимается, что $K_2 = K_{21} + K_3$, тогда:

$$K_2 = \frac{A_0\beta + B_0\alpha}{A_0 + B_0}; \quad K_{12} = \alpha + \beta - K_2;$$

$$K_{21} = \frac{K_2 \cdot K_{12} - \alpha \cdot \beta}{K_{12}}; \quad V_2 = \frac{K_{12}}{K_{21} + K_3} \cdot V_1;$$

$$Cl_T = \frac{K_{12} \cdot K_3}{K_{21}} \cdot V_1 = V_2 \cdot K_3.$$

Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента. Разницу считали достоверной при p<0,05.

Результаты и их обсуждение

Методика определения кинетических параметров ИИПК предъявляет строгие требования к манипуляциям. Из различных приемов мы выбрали наиболее простые и малотравматичные. Несмотря на значительное упрощение методики по сравнению с описанными ранее [7, 10], значение K₃ (модель А) хорошо согласуется с приведенными в упомянутых работах. Различие величин удельного клиренса, приведенных в указанных работах и полученных нами, можно полностью отнести за счет завышения объема центрального компартмента: 64 : 107 мл/кг [10] против 36,57 мл/кг у нас. Это завышение может быть объяснено не вполне оправданным отнесением точки 15 мин к «быстрому» компоненту фармакокинетической кривой и (или) неполным поступлением маркера в центральный компартмент при введении его через хвостовую вену.

Изучая кинетические параметры ИИПК, важно решить, какой биологический смысл они могут иметь. Причем отождествление объемов реальных биологических сред и физиологических

механизмов, обуславливающих обмен гормона, с кинетическими параметрами ИИПК нужно осуществлять не только на основе сопоставления величин, но и с учетом последовательности реализации гормонального сигнала.

Существующие представления, что центральный компартмент двухкамерной модели формализует кровь и хорошо васкуляризированные ткани (сердце, почки, легкие, печень, эндокринные железы), а периферический — все остальные [4], по-видимому, нельзя применить для кинетики инсулина. В противном случае V₁ должен быть заметно больше установленного нами. Помимо несовпадения величины V₁, такой подход содержит внутреннее противоречие: постулирует наличие 2 групп тканей, до клеточных рецепторов которых гормональный сигнал может дойти за время, различающееся в 30 раз (ср. K₁₂ и K₃, модель Б, см. таблицу).

Скорее всего центральный компартмент соответствует объему плазмы циркулирующей крови, а периферический — объему жидкости межклеточных пространств. В связи с этим константа скорости переноса инсулина из центрального компартмента в периферический K₁₂ может характеризовать проницаемость сосудов для гормона. Ее величины 0,44668±0,02453 (модель А) и 0,51102±0,02970 (модель Б) соответствуют периодам полужизни 1,55±0,09 и 1,35±0,08 мин и указывают на то, что кровеносные сосуды не являются заметным препятствием для распространения инсулина в организме крыс.

Попавший в межклеточные пространства инсулин взаимодействует с рецепторами клеток, активирует системы «вторых» посредников и разрушается (если исходить из гипотезы мембранного механизма действия) либо гормон проникает внутрь клетки, вызывает метаболический эффект, а затем разрушается (согласно гипотезе внутриклеточной

точного механизма действия). По-видимому, наши данные свидетельствуют в пользу первой гипотезы, так как снижение концентрации нативного ^{125}I -инсулина в интервале 10—50 мин после введения можно объяснить исключительно деградацией гормона в периферическом компартменте. Однако как бы ни был механизм действия инсулина, важно то, что в обоих случаях для его реализации необходимо взаимодействие гормона с рецепторами, приводящее к необратимому выведению инсулина из системы. Тогда, согласно модели Б, К₂ может служить характеристикой рецепторзависимой деградации гормона, а ее изменения — динамики рецепции инсулина *in vivo* [5].

Выражаем искреннюю благодарность сотрудникам Института радиобиологии АН БССР В. А. Федорович и Н. К. Клишко за помощь в проведении экспериментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Каркищенко Н. Н., Хоронько В. В. Основы клинической фармакологии: Фармакокинетика. — Ростов н/Д., 1981.
2. Лецицкий Л. А., Трусов В. В., Пименов Л. Т. // Тер. арх. — 1977. — № 5. — С. 54—58.
3. Славнов В. И., Эпштейн Е. В. // Мед. радиол. — 1975. — № 5. — С. 22—24.

4. Соловьев В. Н., Фирсов А. А., Филов В. А. Фармакокинетика. — М., 1980.
5. Ealon R. P., Friedman N., Allen R. C., Shalde D. S. // J. clin. Endocr. — 1984. — Vol. 58. — P. 555—559.
6. Gray R. S., Cowan P., Duncan I. J. P., Clarke B. F. // Diabete Metabol. — 1984. — Vol. 10. — P. 188—193.
7. Jones R., Ilic V., Williamson D. // Biochem. J. — 1984. — Vol. 220. — P. 455—460.
8. Ince B. W. // Gen. comp. Endocr. — 1982. — Vol. 46. — P. 463—472.
9. Kasama T., Oshiro K., Uchida M., Sugiura M. // J. Pharmacol-Bio-Dyn. — 1980. — Vol. 3. — P. 206—212.
10. Wirth A., Holm G., Nilsson B. et al. // Amer. J. Physiol. — 1980. — Vol. 238. — P. E108—E115.

Поступила 12.11.87

KINETICS OF INSULIN ELIMINATION FROM RAT BLOOD PLASMA

L. M. Shkumatov

Institute of Radiobiology, Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Minsk

Kinetics of insulin elimination from blood plasma was studied using intact rats administered intravenously with ^{125}I -insulin. Kinetic parameters of the hormone removal from blood plasma corresponded to two-phase pharmacokinetic model, where insulin disappeared from central and peripheral compartments. The kinetic parameters studied might be used in evaluation of true volumes of blood plasma in circulation and in intracellular space as well as in studies of vessels permeability for insulin and the state of the pool of physiologically active receptors of insulin *in vivo*.

УДК 612.35.015.348].06:612.67].08

Е. Ф. Конопля, О. Н. Детинкин, А. В. Житкович

ПРОЧНОСТЬ СВЯЗЕЙ В ДНК-БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСАХ ЯДЕР КЛЕТОК ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ СТАРЕНИИ

Лаборатория биохимии Института радиобиологии АН БССР, Минск

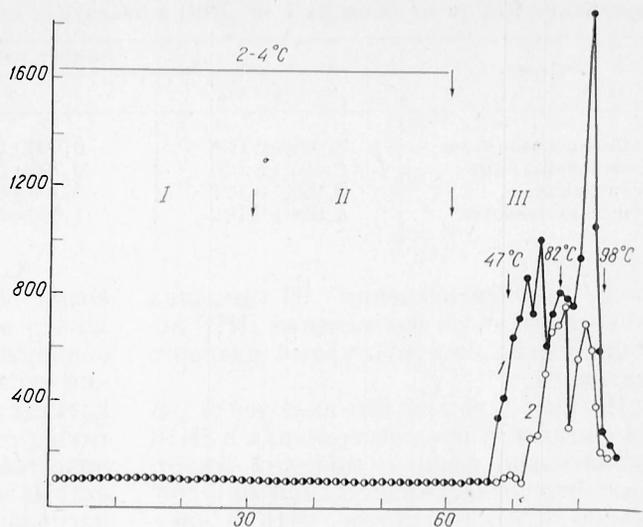
Известно, что функционирование тканей во многом зависит от структурной организации хроматина, в котором заложена практически вся генетическая информация, определяющая жизнедеятельность клеток. Одним из факторов, обуславливающих функциональное состояние дезоксирибонуклеопроанда (ДНП), является степень ассоциации его основных структурных компонентов — белков и ДНК [5]. Исследование их взаимодействия и транскрипционной активности хроматина позволило Катлеру предложить гипотезу, согласно которой пусковым моментом в механизмах старения может

являться накопление в хроматине особо прочных связей ДНК — белок [11].

Основным методическим подходом к изучению степени ассоциации компонентов в дезоксирибонуклеопроандах являлось исследование кривых плавления хроматина; на основании полученных данных было сформулировано представление об упрочении связи ДНК — белок с возрастом [16, 18]. Однако это непрямой метод анализа ДНК-белковых взаимодействий, так как при интерпретации данных о температуре плавления хроматина нельзя исключить другие возможные объяснения (увеличение шивок

Рис. 1. Нуклеопротеид-целитная хроматография ДНК ядер клеток печени крыс разного возраста.

I — молодые животные; 2 — старые животные. I — градиент NaCl (0—2 М); II — градиент LiCl (0—4 М) и мочевины (0—8 М); III — градиент температуры. По оси абсцисс — номера фракций; по оси ординат — имп/мин.



ДНК—белок, ДНК—ДНК) [18]. Поэтому в настоящей работе для изучения ДНК-белковых взаимодействий при старении применен метод нуклеопротеидцелитной хроматографии, принцип которого основан на разделении ДНК в зависимости от прочности ее связи с белками.

Методика

В опытах использовали крыс-самцов линии Вистар стадного разведения, содержащихся на стандартном рационе вивария, 3 возрастных групп: молодые (5—6 мес), зрелые (12 мес) и старые (24 мес). Для ингибирования активности нуклеаз и протеаз во все растворы вносили 1 мМ фенилметилсульфонилфторид и 0,1 % диэтилпирикарбонат. ДНК клеток печени метили ^3H -тимидином (980 ГБк/ммоль, СССР) путем внутрибрюшинной инъекции изотопа животным (10 МБк на 100 г массы по 1 инъекции за 2 дня). Забой осуществляли через 2 дня после последней инъекции. Ядра клеток печени получали, как описано в работе [7].

Проведение нуклеопротеидцелитной хроматографии (НПЦ-хроматографии) осуществляли, как описано в работах [9, 14]. На колонку объемом 15 см³ наносили не более $5 \cdot 10^6$ ядер.

Хроматин и отдельные фракции негистоновых белков (НГБ) получали по методу [6] с некоторыми модификациями. Лабильносвязанные НГБ получали экстракцией 0,35 М NaCl.

Прочносвязанные НГБ экстрагировали 2 М NaCl с 5 М мочевиной после предварительного удаления гистонов 0,4 N серной кислотой. Остаточные белки получали, обрабатывая хроматин 2 % додецилсульфатом натрия (ДСН) с последующим центрифугированием при 200 000 г в течение 4 ч. Разделение белков осуществляли методом ступенчатого градиентного (10—22 %) гель-электрофореза в пластинках полиакриламидного геля (ПААГ) в присутствии 0,1 % ДСН [13].

Радиоактивность препаратов подсчитывали жидкостно-сцинтилляционным методом в диоксановом сцинтилляторе на счетчике «Mark III» («Tracor analytic», США).

Концентрацию белка измеряли по методу Лоури и соавт. [15], ДНК — спектрофотометрическим способом [8].

Результаты и их обсуждение

Метод НПЦ-хроматографии основан на том, что ДНП практически необратимо сорбируется своей белковой частью на целите, а ДНК элюируется из колонки, по мере того как нарушается связь ДНК с белками. Таким образом, положение пика ДНК на хроматографическом профиле элюции будет характеризовать прочность ассоциации нуклеиновой кислоты с белками. В качестве агентов, вызывающих диссоциацию ДНП-комплексов, применяют соли, мочевины и нагревание.

Мы использовали трехступенчатую элюцию ДНК из колонки нуклеопротеид-целита в следующей последовательности: градиент NaCl (0—2 М); градиент LiCl (0—4 М) и мочевины (0—8 М); градиент температуры (4—98 °С). Показано [3], что в градиенте NaCl высвобождается ДНК, связанная с белками хроматина; в градиенте LiCl—мочевина разрушается связь «слабого» типа между ДНК и ядерным матриксом; при повышенной температуре из колонки элюируется ДНК, ассоциированная с ядерным матриксом по типу «сильной» связи.

Так как нашей задачей являлось исследование наиболее прочных связей ДНК с белками, то были подобраны

Содержание НГБ (в мг белка на 1 мг ДНК) в хроматине клеток печени крыс разного возраста

НГБ	Возраст животных, мес		
	6	12	24
Лабильносвязанные	0,909±0,028	0,560±0,018	0,483±0,007
Прочносвязанные	0,683±0,016	0,795±0,017	0,903±0,017
Остаточные	0,092±0,027	0,108±0,020	0,103±0,013
Общее количество	1,684±0,042	1,460±0,032	1,489±0,023

такие условия введения ³H-тимидина животным, когда вся меченая ДНК ассоциирована со структурами ядерного матрикса.

Из рис. 1 видно, что включение радиоактивного предшественника в ДНК значительно выше у молодых животных. Это согласуется с данными о снижении скорости синтеза ДНК в клетках печени с возрастом [1]. Кроме того, элюция меченой ДНК у молодых животных начинается значительно раньше, чем у старых. В соответствии с принципом НПЦ-эроматографии это означает, что с возрастом усиливается степень ассоциации ДНК с наиболее прочносвязанными белками ядер клеток печени. К аналогичным выводам приходили и другие исследователи, изучавшие возрастную динамику температуры плавления хроматина [16, 18]. Однако упрочение связей в ДНК-комплексах часто объяснялось накоплением при старении ковалентных сшивок между структурными компонентами хроматина [5, 16, 18]. Нами же обнаружено возрастание прочности связи ДНК—белок при исследовании вновь синтезированной ДНК, когда спонтанно образующиеся ковалентные сшивки ее с белками накопиться еще не могли. Это позволило предположить, что с возрастом может изменяться содержание и (или) состав белков, наиболее прочно связанных с ДНК.

Нами было изучено содержание фракций НГБ, различающихся степенью ассоциации с ДНК (см. таблицу). Полученные данные указывают на возрастное уменьшение количества лабильносвязанных и увеличение содержания прочносвязанных НГБ. Количество остаточных белков хроматина у животных разного возраста не изменялось.

Имеющиеся данные об участии лабильносвязанных НГБ в активации хроматина [4] и усилении матричной активности под действием этих белков [17] позволяют предположить, что сни-

жение их содержания при старении может являться одним из факторов обнаруживаемого с возрастом ослабления транскрипционных процессов в клетках печени [18]. В работе [10] также было выявлено уменьшение количества белков в ядрах клеток печени старых животных, которое можно экстрагировать из ядер 0,35 М NaCl. Однако является неожиданным присутствие в этой фракции белков очень большого количества коровых гистонов, которые при данных условиях не экстрагируются. По-видимому, в использованных условиях в ядрах развивалась сильная дегградация хроматина и в экстракт переходили образующиеся олигонуклеосомные фрагменты. Проведенный нами ранее электрофоретический анализ лабильносвязанных НГБ не выявил присутствия в них гистонов кор-частиц [2].

Сопоставляя данные таблицы и результаты НПЦ-хроматографии, можно заключить, что количественными возрастными изменениями в содержании белковых фракций с различной прочностью связи с ДНК смещение пиков выхода ДНК из колонки нуклеопротеид-целита объяснить нельзя. Это следует из того факта, что при старении накапливаются только прочносвязанные НГБ, которые экстрагируются 2 М NaCl и 5 М мочевиной, а ДНК освобождается от связи с белками, судя по пикам на НПЦ-хроматограмме, в значительно более «жестких» условиях элюции (4 М LiCl, 8 М мочевина и около 70—80 °С). Таким образом, удерживать ДНК на колонке в таких условиях диссоциации могут только остаточные белки ядра, соответствующие, по всей видимости, белкам ядерного матрикса. Однако содержание данной группы белков, как следует из таблицы, с возрастом не изменялось.

В связи с этим нами было проведено электрофоретическое исследование полипептидного спектра остаточных белков ядер (рис. 2). Как следует из представленных денситограмм, при од-

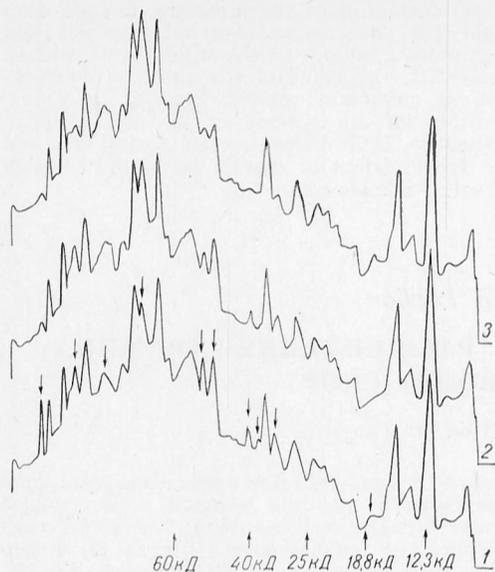


Рис. 2. Денситограмма электрофоретического разделения остаточных белков в градиенте ПААГ 10—22 %.

1 — молодые животные; 2 — зрелые животные; 3 — старые животные. Стрелками указаны полипептидные полосы, в которых отражены возрастные изменения.

ном и том же полипептидном составе белков хроматина животных разного возраста в 10 из примерно 35—40 различных полос заметны количественные различия. Особый интерес представляет триплет полипептидов в области 65—75 кД. Содержание среднего компонента триплета (ламина В) с возрастом заметно увеличивается. Учитывая то, что за счет полипептидов триплета в основном формируется ядерная ламина [12], можно сделать предположение о важной роли такого возрастного изменения в соотношении основных компонентов ламины в модификации структуры ядра и ядерного матрикса при старении. Ламина В оказывается несколько необычной, так как она наиболее прочно связана с внутренней ядерной мембраной и ее синтез не скоординирован с образованием двух других ламин (А и С) [12]. Возможно, что ядерная ламина старых животных, модифицированная повышенным содержанием наиболее прочно ассоциированного компонента, более прочно «заякоривает» ДНК на себя или другие структуры ядерного матрикса.

Оценить функциональное значение других возрастных изменений полипептидного состава остаточных белков

не представляется возможным, поскольку роль остальных (помимо ламин А, В и С) компонентов электрофоретического спектра неясна.

Таким образом, при старении происходит повышение прочности связи ДНК с белками ядерного матрикса, обусловливаемое, по-видимому, изменениями его полипептидного состава. Это может явиться одним из важных факторов возрастной модификации структуры хроматина и снижения его функциональной активности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бердышев Г. Д., Никитин В. И. // Биология старения. — Л., 1982. — С. 195—212.
2. Житкович А. В. // Проблемы современной биологии. — М., 1986. — Ч. 3. — С. 94—97.
3. Забойкин М. М., Алехина Р. П., Лихтенштейн А. В., Шапот В. С. // Докл. АН СССР. — 1985. — Т. 284. — С. 506—509.
4. Зеленин А. В., Куц А. А. // Молекул. биол. — 1985. — Т. 19. — С. 285—294.
5. Качунго М. Биохимия старения: Пер. с англ. — М., 1982.
6. Оксманн А. Я., Ибрагимов Р. Х., Воробьев В. И. // Биоорг. химия. — 1976. — Т. 2. — С. 1558—1565.
7. Романов Г. А., Соколова Н. А., Розен В. Б., Ванюшин Б. Ф. // Биохимия. — 1976. — Т. 41. — С. 1240—1249.
8. Спиринов А. С. // Там же. — 1958. — Т. 23. — С. 656—662.
9. Съяксте Н. И., Забойкин М. М., Лихтенштейн А. В., Шапот В. С. // Молекул. биол. — 1981. — Т. 15. — С. 1321—1329.
10. Brash K. // Canad. J. Biochem. — 1982. — Vol. 60. — P. 204—214.
11. Culler R. G. // Aging, Carcinogenesis and Radiation Biology. — New York, 1976. — P. 646—674.
12. Gerase L., Comeau C., Benson M. // J. Cell. Sci. — 1984. — Suppl. 1. — P. 137—160.
13. Laemmli U. K. // Nature. — 1970. — Vol. 227. — P. 680—685.
14. Lichtenshtein A. V., Sjakste N. I., Zaboikin M. M., Shapot V. S. // Nucl. Acids Res. — 1982. — Vol. 10. — P. 1127—1145.
15. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
16. Medvedev Zh. A. // Mech. Ageing Develop. — 1984. — Vol. 27. — P. 139—154.
17. Montagna R. A., Wang T. Y. // Cancer Res. — 1976. — Vol. 36. — P. 3138—3142.
18. Thakur M. K. // Mech. Ageing Develop. — 1984. — Vol. 27. — P. 263—286.

Поступила 12.11.87

INCREASE IN CONTENT OF TIGHTLY BOUND COMPLEXES OF DNA-PROTEIN IN RAT LIVER CELL NUCLEI WITH AGEING
E. F. Konoplya, O. N. Delinkin, A. V. Zhitkovilch

Institute of Radiobiology, Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Minsk

Elevation in tightness of bonds between newly synthesized DNA and nuclear matrix

proteins was increased in rat liver cells in ageing as shown by means of nucleoproteid-celate chromatography. With ageing content of loosely bound non-histone proteins was decreased in chromatin, tightly bound proteins were increased, while residual proteins remained unchanged. At the same time, elevated level of lamin B and alterations in content of some other polypeptides were found in the fraction

of residual proteins of chromatin in aged animals. The phenomenon observed i. e. elevation of tightly bound DNA-protein complexes, enabled to suggest that alterations in composition of chromatin residual proteins were responsible for an increase in the rate of association in DNP complexes in ageing but not the accumulation of cross-links in the complex structure components.

УДК 615.356:577.174.11].015.4.076.9

С. С. Пузач, З. В. Горбач

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОДУКТОВ РАСЩЕПЛЕНИЯ ТИАМИНА ТИАМИНАЗОЙ I МОЛЛЮСКОВ

Институт биохимии АН БССР, Гродно

Широкое распространение и значительная активность тиаминаз в тканях некоторых видов растений, животных и микроорганизмов обуславливают необходимость детального и всестороннего их изучения. Остается пока неясной функция этих ферментов в тканях организмов — носителей тиаминазной активности. Известные два типа тиаминазы I и II [5] катализируют расщепление тиамина по метиленовому мостику на составляющие его основания [5]. Тиаминаза I характеризуется трансферазным кинетическим механизмом, для нее в качестве субстратов-акцепторов выступают азотсодержащие соединения (никотинамид, анилин, цистеин, аденин и др.). Тиаминаза II функционирует как гидролаза [6]. Установлены отдельные кинетические характеристики тиаминазы I, изолированной из пресноводных двустворчатых моллюсков [2]. При дальнейшем изучении кинетического механизма тиаминазы I моллюсков оказалось, что ферментативное расщепление тиамина возможно и без субстрата-акцептора.

Эти данные предопределили направление настоящего исследования, которое посвящено характеристике процесса взаимодействия тиаминазы I моллюсков с тиамином и идентификации образующихся при этом продуктов реакции.

Методика

Эксперименты проводили на препарате тиаминазы I, частично очищенной по ранее описанному методу [2]. Активность фермента определяли при 30 °C в 0,05 М фосфатном буферном растворе (рН 6,5).

О скорости тиаминазной реакции судили по образованию продукта — ¹⁴C-тиазола — из ме-

ченого тиамина [4]. Для проявления продуктов тиаминазной реакции методом тонкослойной хроматографии использовали смеси уксусная кислота — бутанол — вода (1 : 4 : 5) [7] и изобутанол — метанол — вода (44 : 36 : 6 : 2) [3]. Гидроксилапатит синтезировали по методу [1]. Радиометрические определения выполнены с диоксановым сцинтиллятором в счетчике «Марк-II» («Nuclear Chicago», США).

В исследовании использовали тиазол-2-¹⁴C-тиамин («Amersham», Англия), тиамин («Fergak», Зап. Берлин), тритиевую воду («Изотоп», СССР), пластинки для тонкослойной хроматографии silufol UV254 (ЧССР).

Результаты и обсуждение

Установлено, что инкубация тиаминазы I моллюсков с тиамином приводит к частичному его расщеплению. Реакция характеризуется высокой скоростью образования тиазола в начальной момент после ее инициации, за которым следует относительно медленная стационарная фаза, заканчивающаяся равновесием. Проведение реакции при различных температурах (рис. 1) показывало, что этот фактор существенно изменяет стационарную скорость и необходимое для достижения равновесия время. Однако величина начального всплеска концентрации

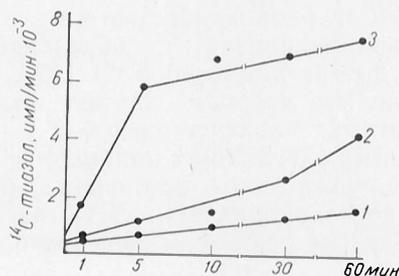


Рис. 1. Зависимость тиаминазной реакции от времени при различной температуре. 1 — 0 °C; 2 — 20 °C; 3 — 50 °C.

Влияние иммобилизации на термоустойчивость (инкубация при 50 °С) тиаминазы I моллюсков

Продолжительность инактивации, мин	Остаточная активность фермента, %	
	растворимого	иммобилизованного
10	100±2	100±2
20	93±5	100±4
40	77±4	93±3

тиазола практически не зависит от температуры. Путем экстраполяции линейной части кинетических кривых, характеризующих ход тиаминазной реакции в зависимости от температуры, к нулевому времени установлено их пересечение в одной точке на оси ординат. Это доказывает, что если начальный всплеск образования тиазола отражает концентрацию каталитически активных форм фермента, то температура не влияет на их соотношение в растворе.

Различные соединения (косубстраты) тиаминазы способствуют увеличению всплеска начального образования тиазола [2]. Это явление, вероятно, связано с обратимым фермент-субстратным взаимодействием, которое осуществляется как в присутствии косубстрата в реакционной среде, так и без него, хотя косубстрат существенно влияет на относительное содержание активной формы фермента. Можно предположить, что наблюдаемая без косубстрата тиаминазная реакция обусловлена влиянием тиамина на каталитическую активность фермента, что приводит к изменению соотношения активных и неактивных форм белка в растворе. Согласно этому предположению, тиазол должен быть единственным продуктом рассматриваемой тиаминазной реакции, протекающей в отсутствие косубстрата. Нами отмечена субстратная активация тиаминазы I моллюсков, иммобилизованной адсорбцией на гидроксилпатите. Пропускание раствора тиамина через загруженный в колонку гидроксилпатит с адсорбированной тиаминазой I сопровождается постепенным возрастанием концентрации тиазола в элюате с последующей ее стабилизацией на определенном уровне.

Тиаминазы I прочно сорбируются гидроксилпатитом, тогда как для тиамина и продуктов его ферментативного расщепления он легко проникает.

Фермент в иммобилизованном состоянии проявляет повышенную устойчивость к температурному воздействию (см. таблицу) и высокую каталитическую активность. При этом общее количество образующегося тиазола в реакции, катализируемой иммобилизованной тиаминазой, определяется не только активностью фермента и концентрацией субстрата, но и объемом элюатов. Это свидетельствует о том, что расщепление тиамина тиаминазой I без субстрата-акцептора должно протекать с формированием двух продуктов реакции, так как для поддержания процесса необходима регенерация замещенной формы фермента. Реакция тиаминазы I с тиамином как с единственным субстратом ранее не была описана. Поэтому представляют интерес механизм ее протекания, а также идентификация образующихся продуктов. Установленное превращение тиамина в тиаминазной реакции может быть связано с нестабильностью замещенной формы фермента, которая, гидролизуясь, приводит к образованию второго продукта реакции и регенерации свободного фермента.

Однако этот путь не реализуется, так как проведение реакции в присутствии $^2\text{H}_2\text{O}$ не вызывает утилизации метки. Ожидаемый продукт реакции гидролиза замещенной формы тиаминазы 2-метил-4-амино-5-оксиметилпиримидин не обнаружен в реакционной среде. Вместе с тем при инкубации иммобилизованной тиаминазы I с тиамином установлено образование наряду с тиазолом соединения, которое по хроматографической подвижности мало отличается от исходного субстрата тиамина. С помощью двумерной хроматографии в указанной выше системе растворителей его удалось отделить от тиамина и показать внедрение мет-

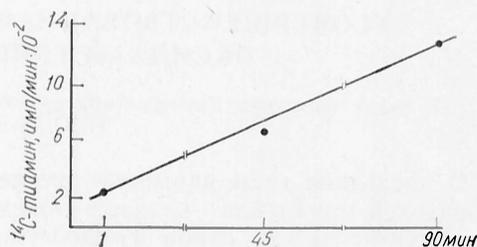


Рис. 2. Кинетика образования ^{14}C -тиамина из ^{14}C -тиазола и «пиримидилтиамина» в присутствии тиаминазы I.

ки из меченного по тиазолу тиамина в присутствии тиаминазы.

По нашим данным, это соединение — продукт тиаминазной реакции, образовавшийся в результате взаимодействия замещенной формы фермента с тиамином, который одновременно выполняет функцию субстрата-донора и субстрата-акцептора переносимой ферментом группировки.

Следовательно, превращения тиамина, катализируемые тиаминазой I, протекают по следующей схеме:



Дополнительные подтверждения обоснованности предположения о механизме реакции, катализируемой тиаминазой I, получены при изучении процесса в обратном направлении, т. е. при использовании «пиримидилтиамин» и тиазола в качестве субстратов. «Пиримидилтиамин» препаративно выделяли методом хроматографии. Инкубация 2-¹⁴C-тиазола с меченым «пиримидилтиамином» в присутствии тиаминазы приводила к утилизации 2-¹⁴C-тиазола и появлению метки в образующемся тиамине (рис. 2). Эти данные показывают, что все стадии ферментативного процесса обратимы, а направление реакции определяется концентрацией реагирующих веществ.

Таким образом, для тиаминазы I

двустворчатых моллюсков тиамин является субстратом-акцептором переносимой ферментом группировки. Проведение реакции в направлении деградации тиамин сопровождается образованием двух продуктов реакции — тиазола и «пиримидилтиамин». Показана обратимость процесса деградации тиамин тиаминазой I моллюсков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. — М., 1980.
2. Пузач С. С., Горбач З. В., Островский Ю. М. // Биохимия. — 1984. — Т. 49, № 7. — С. 1178—1183.
3. Розанов А. Я. // Тиамин: Обмен, механизм действия. — М., 1976. — С. 27—84.
4. Edwin E. E., Jackman R. A. // J. Sci. Food Agricult. — 1974. — Vol. 25, N 4. — P. 357—368.
5. Fujita A. // J. Vitaminol. — 1972. — Vol. 18, N 1. — P. 67—72.
6. Ikehata H. // Ibid. — 1956. — Vol. 2, N 3. — P. 242—244.
7. Murata K. // Review of Japanese Literature on Beri-Beri and Thiamine. — Tokyo, 1965. — P. 220—254.

Поступила 12.11.87

CHARACTERISTICS OF PRODUCTS DEVELOPED AFTER DEGRADATION OF THIAMIN BY MEANS OF MOLLUSC THIAMINASE I

S. S. Puzach, Z. V. Gorbach

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

Thiaminase I (EC 2.5.1.2) catalyzed degradation of thiamin in the reaction mixture free of substrate-acceptor. Thiamin exhibited properties of both substrate-donor and -acceptor of the group transferred by thiaminase I. Identification of the products developed after thiaminase reaction involving thiamin was performed using chromatography and radiometry. Kinetics of the reaction is discussed.

УДК 615.355:577.152.1].012.8

Н. Б. Янкевич, Н. Ф. Лаугалене, В. С. Веса, С. Х. Хадуев,
И. П. Смирнова, Т. Т. Березов

УСОВЕРШЕНСТВОВАННАЯ СХЕМА ОЧИСТКИ L-ЛИЗИН- α -ОКСИДАЗЫ ГРИБА TRICHODERMA sp.

Кафедра биохимии Университета дружбы народов им. Патриса Лумумбы, Москва, НПО «Фермент», Вильнюс

В последние годы внимание исследователей привлекла L-лизин- α -оксидаза (КФ 1.4.3.2) гриба Trichoderma sp. по двум причинам: во-первых, этот фермент стал использоваться в методиках при количественных определениях лизина в биологических жидко-

стях [2] и, во-вторых, в связи с определенной перспективой его использования в энзимотерапии опухолей [6, 7]. В частности, показаны цитостатическая активность ферментного препарата на линии клеток L 5178Y in vitro и противоопухолевое действие на

системе L 1210 in vivo [8]. Особенно важно при исследованиях биологических свойств фермента in vivo использовать препарат высокой степени чистоты.

Впервые L-лизин- α -оксидаза гриба поверхностного культивирования в чистом виде была получена в двух лабораториях: в Японии К. Soda и соавт. [9] и в СССР Т. Т. Березовым и соавт. [4]. Метод выделения и очистки фермента по схеме К. Soda и соавт. [9] включает 6 классических стадий, которые позволяют получить гомогенный фермент с выходом около 8%. На кафедре биохимии медицинского факультета Университета дружбы народов им. Патриса Лумумбы были предприняты исследования по поиску отечественного штамма-продуцента L-лизин- α -оксидазы и по разработке методов выделения и очистки фермента [3, 4]. Первая из разработанных схем позволила сократить число стадий очистки до 4 и получить фермент с выходом около 22%. Очищенные препараты были испытаны на цитостатическую активность в опытах in vitro в лаборатории клеточной фармакологии ВОИЦ АМН СССР на опухолевых клетках двух тестовых систем — саркома ovaris (Caov) и лимфоме Беркитта (штамм R3HRj). Полученные данные свидетельствуют о тормозящем действии фермента на биосинтез ДНК, РНК и белка из меченых предшественников [1, 5] и о необходимости продолжения исследований с этим ферментом.

Целью настоящей работы явился поиск средств, позволяющих сократить время, уменьшить количество стадий и повысить выход выделяемого гомогенного фермента. Для достижения поставленной цели было решено включить в схему очистки фермента известный сорбент L-лизин-сефарозу 4В, который мог бы сыграть роль аффинного сорбента в отношении L-лизин- α -оксидазы в силу того, что сорбент в своей структуре содержит в качестве лиганда L-лизинспецифический субстрат фермента.

Методика

В работе были использованы ДЭАЭ-целлюлоза («Reanal», Венгрия), L-лизин-сефароза 4В, полученная путем присоединения по ϵ -аминогруппе L-лизина к эпоксисефарозе 4В («Pharmacia Fine Chemicals», Швеция) по прописи фирмы (содержание лизина 4—5 мкМ на 1 г сухого сорбента); в качестве реактивов — орто-

дианизидин, L-лизин («Биолар», СССР). Базовый препарат L-лизин- α -оксидазы получали по ранее описанному методу [4]. Ферментативную активность определяли по приросту содержания продукта окисления орто-дианизидина перекисью водорода, образующегося в результате катализируемой ферментом реакции окисления L-лизина кислородом [2]. Белок определяли по методу Лоури [10]. Удельную активность фермента выражали числом единиц (Е) активности на 1 мг белка. Все операции по выделению и очистке фермента проводили в холодной комнате при температуре 1—5°C.

Результаты и обсуждение

I стадия очистки. Фракционирование сульфатом аммония проведено двухступенчато как описано ранее [4]. На первой ступени ферментный раствор насыщался до 35% сульфатом аммония, после чего выпавший осадок центрифугировали и отбрасывали, а надосадок насыщали до 60% и образовавшийся осадок отделяли центрифугированием. Последний растворляли в 0,01 М натрий-фосфатном буфере pH 7,4 и диализовали против того же буфера.

После данной стадии очистки удельная активность фермента составляла 1,8 Е/мг (степень очистки 6 раз).

II стадия очистки. Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе проведена в условиях, примененных ранее [4]. При этом удельная активность на данной стадии очистки в объединенных фракциях возросла в 1,8 раза по сравнению с I стадией.

III стадия очистки. Хроматография на L-лизин-сефарозе 4В. Выбор структуры сорбента обусловлен тем, что фермент специфично реагирует с лизином, вследствие чего можно было думать, что лизин, присоединенный к сефарозной матрице, сыграет роль биоспецифического лиганда, который при сорбции будет взаимодействовать в основном с лизиноксидазой и удерживать ее в колонке, в то время как примеси, сопутствующие ферменту, будут вымываться. Полученный после II стадии очистки раствор объемом 84 мл с удельной активностью 8,21 Е/мг постепенно наносили на колонку с L-лизин-сефарозой 4В, предварительно уравновешенную 0,01 М универсальным буфером pH 5,5. После промывания колонки исходным буфером, а затем буферным раствором, содержащим 0,05 М хлорида натрия, элюировали фермент с колонки. Удельная активность фермента после

Очистка L-лизин- α -оксидазы из *Trichoderma* sp.

Стадия очистки	Белок, мг	Актив-ность, Е	Удельная актив-ность, Е на 1 мг белка	Выход, %	Степень очистки
I	26,87	8,06	0,30	100	0
	4,03	7,59	1,80	93,4	6
II	2,88	5,30	8,21	65,6	27
III	0,15	5,19	30,45	64,4	101

III стадии очистки повышается до 30 Е/мг.

Данные, полученные на всех стадиях очистки L-лизин- α -оксидазы, представлены в таблице.

Полученная в результате проведенной очистки L-лизин- α -оксидаза была гомогенной по данным диск-электрофореза в ПААГ [4].

В результате проведенной работы предложена усовершенствованная схема очистки L-лизин- α -оксидазы гриба *Trichoderma* sp. Схема очистки состоит из трех основных стадий, применение которых позволяет сократить время очистки, значительно увеличить выход фермента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Жукова О. С., Хадиев С. Х., Добрынин Я. В. и др. // Экспер. онкол. — 1985. — № 6. — С. 42—43.
2. Лукашева Е. В., Смирнова И. П., Хадиев С. Х., Березов Т. Х. // Ферменты в биохимических анализах. — Вильнюс, 1984. — С. 102—103.

3. Смирнова И. П., Хадиев С. Х. // Микробиология. — 1984. — Т. 53, № 1. — С. 163—164.
4. Хадиев С. Х., Лукашева Е. В., Смирнова И. П., Березов Т. Т. // Вопр. мед. химии. — 1985. — № 5. — С. 130—134.
5. Хадиев С. Х., Жукова О. С., Добрынин Я. В., Березов Т. Т. // Бюл. exper. биол. — 1987. — № 4. — С. 458—460.
6. Kusakabe H., Sugi M., Kodama K. et al. // *Agricult. Biol. Chem.* — 1979. — Vol. 43, N 6. — P. 1371—1373.
7. Kusakabe H., Kodama K., Nachida H. et al. // *Ibid.* — N 3. — P. 337—343.
8. Kusakabe K., Kodama K., Kuninaka A. et al. // *Ibid.* — 1980. — Vol. 44. — P. 387—392.
9. Kusakabe H., Kodama K., Kuninaka A. et al. // *J. biol. Chem.* — 1980. — Vol. 255, N 3. — P. 976—983.
10. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // *J. biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.

Поступила 26.11.87

AN IMPROVED PROCEDURE FOR PURIFICATION OF L-LYSINE α -OXIDASE FROM *TRICHODERMA* sp.

N. B. Jankevich, N. F. Langalene, V. S. Vesa, S. Kh. Khaduev, I. P. Smirnova, T. T. Berezov

Scientific-Industrial Association "Ferment", Vilnius, Chair of Biochemistry, P. Lumumba Peoples Friendship University, Moscow

Relatively rapid procedure was developed for isolation and purification of the antitumor enzyme L-lysine α -oxidase. The procedure involved three steps instead of six or four steps described previously, with a yield of 64.4%. The homogenous preparation was obtained as shown by gel electrophoresis and ultracentrifugation. The antitumor activity of the enzyme both *in vivo* and *in vitro* is under investigation.

УДК 616-056.43-07:616.153.96-092

А. Г. Шлейкин, Л. Б. Горькова, К. С. Пожиленкова, А. Г. Звездочкин

О МЕХАНИЗМЕ ИЗМЕНЕНИЯ СВЯЗЫВАНИЯ АМИНОВ БЕЛКАМИ ПЛАЗМЫ КРОВИ ПРИ АЛЛЕРГИИ

Кафедра биохимии Санитарно-гигиенического медицинского института, Ленинград

Благодаря обратимому связыванию белками плазмы крови гистамина и других аминов (аминопексии) в русле крови существует высокомолекулярное депо биогенных аминов, имеющее адаптационное значение [3, 5]. Аллергические состояния сопровождаются снижением аминопексии [4, 6, 22]. Определение гистаминапексического индекса (ГПИ) применяется в диагностике аллергических заболеваний [8, 11].

Исследование механизма гистаминапексии выявило тесную зависимость связывающей способности белков от

состояния SH-групп и дисульфидных связей, определяющих конформацию белковых молекул [1, 20, 21]. В частности, у больных аллергическими дерматозами установлена зависимость между величиной тиол-дисульфидного коэффициента крови и связыванием гистамина и парафенилендиамина (ФДА); аналогичная корреляция обнаружена у морских свинок при воздействии продуктов микробиологического синтеза [20].

Приведенные данные позволяют заключить, что в основе структурной модификации белков у больных аллерги-

ческими заболеваниями и у экспериментальных животных лежит нарушение тиол-дисульфидного звена антиоксидантной системы. Возможно, что модификация структуры белков является одним из ведущих механизмов действия тиоловых соединений, прежде всего унитиола, применяемых при лечении аллергических и аутоиммунных заболеваний [7, 10, 13, 16, 17].

Эффективным средством повышения неспецифической резистентности организма, применяемым главным образом при лучевой болезни, является цистамин [9]. Имеемаяся в молекуле цистамин дисульфидная связь делает возможными реакции тиол-дисульфидного обмена с SH-группами белков [15]. Однако данные о влиянии цистамин на связывающую способность белков отсутствуют.

Учитывая важную роль тиол-дисульфидного равновесия в состоянии антиоксидантной системы [14], представляется целесообразным изучить прямое влияние тиоловых соединений на связывающую способность белков крови по отношению к аминам для углубления знаний о механизме гистаминопексии, а также для обоснования возможного применения тиоловых антиоксидантов с целью репарации модифицированных белковых молекул.

В задачу настоящей работы входило изучение связывания ФДА и гистамина у здоровых доноров и больных аллергическими дерматозами, а также влияния унитиола и цистамин на связывание аминов.

Методика

Кровь, полученную из локтевой вены практически здоровых доноров и больных нейродермитом или экземой в стадии обострения, быстро смешивали с 3,8 % раствором цитрата натрия в соотношении 9 : 1 и делили на 3 равные части. В 1-ю пробу вносили раствор унитиола на физиологическом растворе, во 2-ю — цистамин в конечных концентрациях 10^{-3} моль/л, в 3-ю — равный объем физиологического раствора. Пробы перемешивали и оставляли на 30 мин при комнатной температуре. Плазму отделяли центрифугированием при 2500 об/мин в течение 15 мин. 0,2 мл плазмы крови и 2,8 мл 0,15 М фосфатно-цитратного буферного раствора pH 7,2 [18] вносили в менки из пищевого целлофана и диализировали против двукратного объема такого же буферного раствора в течение 24 ч при 5 °С. После диализа в пробы вносили ФДА в конечной концентрации 10^{-3} моль/л и вновь диализировали их в тех же условиях. Для окраски

Таблица 1

Влияние унитиола и цистамин на связывание ФДА плазмой крови (в ммоль/л)¹

Условия опыта	Связывание ФДА
Здоровые доноры:	
унитиол	14,43 ± 1,22
цистамина	12,08 ± 0,99
физиологический раствор	13,13 ± 1,07
Больные аллергическими дерматозами:	
унитиол	9,025 ± 0,71**
цистамина	6,10 ± 0,60
физиологический раствор	5,65 ± 0,41*

Примечание. Одна звездочка — различие статистически достоверно по сравнению со здоровыми донорами (физиологический раствор); $p = 0,001$; две — различие статистически достоверно по сравнению с больными (физиологический раствор); $p = 0,001$. Представлены средние данные ($M \pm m$) из 10—13 опытов.

ФДА к диализатам добавляли пара-диметиламинобензальдегид в конечной концентрации 10^{-3} моль/л. Концентрацию окрашенного комплекса определяли в кислой среде на фотозлектроколориметре с синим светофильтром (λ_{\max} 450 нм) [12]. Количество связанного ФДА рассчитывали по разности оптической плотности проб, содержащих и не содержащих плазму крови. ГПИ определяли по [18]. Статистическую обработку материала проводили по Фишеру — Стьюденту [2].

Результаты и обсуждение

Представленные в табл. 1 данные свидетельствуют, что у больных аллергическими дерматозами связывание ФДА плазмой крови значительно

Таблица 2

Влияние унитиола и цистамин на связывание гистамина плазмой крови

Условия опыта	Гистаминопексический индекс, %
Здоровые доноры:	
унитиол	33,21 ± 1,89
цистамина	26,12 ± 1,11*
физиологический раствор	33,30 ± 2,18
Больные аллергическими дерматозами:	
унитиол	16,70 ± 1,40**
цистамина	8,11 ± 1,54
физиологический раствор	9,60 ± 0,84*

Примечание. Одна звездочка — различия статистически достоверны по сравнению со здоровыми донорами (физиологический раствор); $p = 0,01$; две — различия статистически достоверны по сравнению с больными (физиологический раствор), $p = 0,01$. Представлены средние данные ($M \pm m$) из 10—15 опытов.

снижено по сравнению со здоровыми донорами более чем в 2 раза. При действии унитиола связывание ФДА возрастает у больных на 60 %, у здоровых доноров наблюдается тенденция к увеличению связывания. Цистамин не вызывал достоверных изменений связывания ФДА.

Величина ГПИ у больных аллергическими дерматозами оказалась достоверно ниже, чем у здоровых доноров (табл. 2). Унитиол не изменял связывание гистамина у здоровых доноров и увеличивал его у больных в среднем на 74 %. При действии цистамина связывание гистамина достоверно снижалось у здоровых доноров, тогда как у больных обнаружена лишь тенденция к снижению связывания гистамина.

Таким образом, в условиях *in vitro* унитиол способствует восстановлению аминоксислот белков плазмы крови, полученной от больных аллергическими дерматозами, и практически не влияет на связывание аминов белками плазмы, выделенной из крови здоровых.

Ранее было показано, что восстановленный глутатион в опытах *in vitro* не увеличивает аминоксислот, а в больших концентрациях, как и окисленный глутатион, снижает ее [19]. В то же время при электролитическом расщеплении одной-двух связей $S=S$ в молекуле бычьего сывороточного альбумина связывание ФДА возрастает соответственно на 56—72 %. При этом на поверхности белковой глобулы появляются дополнительные SH-группы [20].

Приведенные факты подтверждают значение поверхностных SH-групп альбумина в связывании аминов и позволяют объяснить снижение аминоксислот при патологических, в частности аллергических, состояниях.

По-видимому, высокоактивные медиаторы и продукты аллергических реакций вызывают истощение антиоксидантной системы и окисление доступных SH-групп белков, что и приводит к снижению аминоксислот. Цистамин также снижает связывание гистамина белками плазмы крови у здоровых, что можно объяснить его окисляющим действием на SH-группы белков [15].

Полученные данные показывают, что восстановление аминоксислот явля-

ется одной из сторон антиаллергического действия унитиола и могут служить основанием для применения низкомолекулярных тиолов с целью нормализации окислительно-восстановительного гомеостаза при аллергических состояниях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ажицкий Г. Ю., Троицкий Г. В., Шараева Т. К. // Всесоюзный биохимический съезд, 5-й: Тезисы. — М., 1985. — Т. 2. — С. 3.
2. Ашмарин И. П., Васильев Н. Н., Амбросов В. А. Быстрые методы статистической обработки и планирование эксперимента. — Л., 1975.
3. Вайсфельд И. Л., Кассиль Г. Н. Гистамин в биохимии и физиологии. — М., 1981.
4. Ишимова Л. Б., Бородин Ю. П. // Сов. мед. — 1962. — № 7. — С. 27—34.
5. Каган М. З. // Лаб. дело. — 1987. — № 9. — С. 712—714.
6. Королев Ю. Ф., Пильченко Л. Ф., Ходюков Э. Я. // Здравоохран. Белоруссии. — 1973. — № 9. — С. 30—32.
7. Лазарева Д. Н., Алехин Е. К. Стимуляторы иммунитета. — М., 1985.
8. Малюк В. И. // Лаб. дело. — 1971. — № 8. — С. 487—490.
9. Машковский М. Д. Лекарственные средства. — М., 1984. — Т. 2.
10. Присадишка И. В. // Труды Ростов н/Д. мед. ин-та. — 1979. — Т. 91. — С. 82—86.
11. Самцов В. И. // Вестн. дерматол. — 1968. — № 2. — С. 12—16.
12. Симонов В. А., Баргенов В. Д., Бреннер Э. С. // Гиг. и сан. — 1970. — № 5. — С. 99—100.
13. Смирнов И. М., Портянко Г. М. // Межобластная науч.-практ. конф. отоларингологов: Тезисы. — М., 1977. — С. 95—96.
14. Соколовский В. В. // Антиоксиданты и адаптация. — Л., 1984. — С. 5—19.
15. Торчинский Ю. М. Сера в белках. — М., 1977.
16. Фломен Е. Д. // Научно-практическая конф. дерматологов-венерологов Карагандинской области: Тезисы докладов. — Караганда, 1970. — С. 99—102.
17. Цыганок С. С. // Вестн. дерматол. — 1978. — № 9. — С. 67—69.
18. Чегер С. И. Транспортная функция сывороточного альбумина. — Бухарест, 1975.
19. Шлейкин А. Г., Макаров В. Г., Мотовилова Т. П. и др. // Антиоксиданты и адаптация. — Л., 1984. — С. 49—52.
20. Шлейкин А. Г., Сорокина В. С., Данилов С. И. и др. // Флюктуации состояния биохимических систем. — Л., 1986. — С. 50—54.
21. Habeeb A. S. // Canad. J. Biochem. — 1968. — Vol. 46. — P. 789—795.
22. Parrot J. L., Urquia D., Laborde C. // C. R. Soc. Biol. — 1951. — Vol. 145. — P. 885—888.

ALTERATIONS OF AMINES BINDING BY
BLOOD SERUM PROTEINS IN PATIENTS
WITH ALLERGIC STATE

A. G. Shleikin, I. B. Gor'kova, K. S. Pozhilenkova, A. G. Zvjozdochkin

Sanitary-Hygienic Medical School, Leningrad

Blood plasma of healthy persons bound 13.13 ± 1.07 mmol/l of p-phenylene diamine

(PDA), histamine pectic index constituted 33.3 ± 2.18 %. In patients with neurodermitis and eczema both these patterns were markedly reduced. Unithiol (10^{-3} mol/l) increased PDA binding and histamine level *in vitro*. The same concentration of cystamine decreased histamine pectic index in healthy persons. Importance of protein SH-groups in binding of amines is discussed.

УДК 616.127-07:[616.153.962.3:517.915]-074

*Н. В. Толкачева, М. М. Левачев, Ф. А. Медведев, С. Н. Кулакова,
А. Ф. Мазурец, В. Г. Борисенко*

**ТРАНСПОРТ ЖИРНЫХ КИСЛОТ И ПРОДУКТОВ
ИХ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ СЫВОРОТОЧНЫМ
АЛЬБУМИНОМ ПРИ ИШЕМИЧЕСКОМ И НЕКОРОНАРОГЕННОМ
ПОВРЕЖДЕНИИ СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ**

Государственный университет имени М. В. Фрунзе, Симферополь, Институт питания
АМН СССР, Москва

Сывороточный альбумин выполняет в крови уникальную роль в качестве переносчика липидов. Наиболее лабильная часть липидов сыворотки крови — свободные жирные кислоты — являются как мобильными субстратами источников энергии, так и наиболее уязвимыми соединениями, вовлекаемыми в процесс переокисления. Как было показано ранее, альбумин сыворотки крови при различных патологических состояниях претерпевает конформационные изменения и приобретает новые, не свойственные нативному белку физико-химические свойства [4, 6, 15, 16]. Возникает естественный вопрос: как отразятся подобные изменения на связывании альбумином низкомолекулярных метаболитов. В данной работе предпринята попытка выяснить функциональные возможности сывороточного альбумина в связывании липидов, жирных кислот и продуктов их перекисного окисления при ишемическом и некоронарогенном повреждении сердечной мышцы. Образующиеся в процессе перекисного окисления липидов (ПОЛ) продукты, будучи физиологически активными, могут оказывать различные повреждающие воздействия на клеточные структуры [1, 3, 7, 9, 14]. Не исключено, что сывороточный альбумин может играть большую роль в инактивации этих реакционно-способных веществ.

Методика

Альбумин сыворотки крови выделяли методом препаративного электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) [12]. Чистоту выделенных препаратов определяли методом диск-электрофореза в ПААГ. Липиды, связанные с альбумином, экстрагировали по Фолчу [17]. Жирные кислоты экстракта метилировали ацетилхлоридом [10]. Газохроматографический анализ полученных эфиров жирных кислот проводили в хроматографе «Intersmal» (Франция) с пламенно-ионизационным детектором. Использовали стеклянную набивную колонку $0,4 \times 210$ см, наполненную 10 % Silar 10С на хромосорбе W/AW 80—100 меш. Скорость газоносителя азота 40 мл/мин, температура колонки 182°, температура детектора и испарителя 220 и 240°С соответственно. Жирные кислоты идентифицированы путем сравнения удерживаемых объемов в исследуемой смеси со стандартными препаратами метиловых эфиров насыщенных и ненасыщенных жирных кислот от C_{12} до C_{24} . Расчет состава жирных кислот проводили методом внутреннего нормирования, индивидуальные жирные кислоты представлены в процентах от суммы всех жирных кислот. Концентрацию общих липидов определяли по Блюру [5]. Содержание продуктов ПОЛ в сывороточном альбумине изучали унифицированным методом Плацарь в модификации Гаврилова и Мишкорудной [8]. В анализируемую группу вошли 30 больных крупно- и мелкоочаговым инфарктом миокарда в остром и подостром периодах. Группа с миокардитом была представлена преимущественно больными с диффузным поражением мышцы сердца, протекающим по типу Абрамова — Фидлера. В группу с вегетативно-дисгормональной миокардиодистрофией (ВДМД) вошли больные женского пола, у которых заболевание развилось на фоне сопутствующей гормональной патологии (страдающие фибромиомами матки, хроническим аднекситом, оперированные по поводу кист яичника). Последние 2 группы включали

Содержание липидов и продуктов ПОЛ в альбумине сыворотки крови в норме и при патологии

Группа обследованных	Липиды, мг/100 мг белка	Диеновые конъюга- ты, усл. ед./100 мг белка	Кетоны, усл. ед./100 мг белка
Доноры	2,3±0,3	0,3±0,04	0,1±0,02
Больные инфарктом миокарда:			
в остром периоде	6,05±0,5***	0,5±0,04***	0,2±0,02***
в подостром периоде	9,87±0,8***	0,5±0,03***	0,2±0,02***
Больные миокардитом	7,6±0,9***	0,4±0,02*	0,2±0,02***
Больные ВДМД	6,1±0,6***	0,45±0,03*	0,2±0,03**

Примечание. Одна звездочка — $p < 0,05$; две — $p < 0,02$, три — $p < 0,001$.

соответственно по 10 больных. Обследованные больные находились на лечении в стационаре Крымского областного кардиологического диспансера. Контрольную группу составили 40 доноров.

Результаты и обсуждение

Количество общих липидов, связываемых альбумином в остром периоде инфаркта миокарда, по сравнению с донорами повышалось приблизительно в 3 раза (табл. 1). Аналогичный уровень общих липидов в белке обнаруживается у больных ВДМД. Более высокое содержание липидов по сравнению с этими 2 группами больных наблюдается при миокардите. Значительное содержание общих липидов, связанных альбумином в подостром периоде инфаркта миокарда, может быть свидетельством повышенных энергозатрат в этом состоянии, так как в условиях нормального функционирования сердечной мышцы жирные кислоты играют существенную роль в качестве источников энергии.

Газохроматографический анализ полученных эфиров жирных кислот свидетельствует о том, что процентное содержание полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) при всех изученных патологиях уменьшалось по сравнению с таковым в контрольной группе. Однако в пересчете на содержание связанных липидов их общее содержание возрастало приблизительно в 2 раза при инфаркте миокарда в остром периоде и ВДМД, при миокардите в 3 раза, при инфаркте миокарда в подостром периоде в 4 раза. Усиленное связывание ПНЖК альбумином может служить фактором, обеспечивающим увеличение транспорта предшественников биосинтеза эйкозаноидов при патологии. Как видно из табл. 2, содержание линоле-

вой кислоты при инфаркте миокарда в остром периоде и ВДМД, а также в меньшей степени при миокардите снижалось по сравнению с контрольной группой приблизительно в 2 раза. Обращает на себя внимание факт уменьшения в альбумине больных доли арахидоновой кислоты. Об этом свидетельствует и снижение соотношения 20:4 18:2, т. е. продукта биосинтеза к его предшественнику. Содержание эйкозатриеновой кислоты в состоянии острого инфаркта миокарда составляло 0,23 % по сравнению с 0,5 % у доноров. Известно, что эйкозатриеновая кислота является заместителем арахидоновой кислоты в мембранных липидах в случаях, когда поступление эссенциальных жирных кислот с пищей ограничено или когда имеет место какое-либо эндогенное нарушение биосинтеза арахидоновой кислоты из алиментарного предшественника [19]. Доля этой кислоты была снижена и при ВДМД. В подостром инфаркте миокарда парциальная доля эйкозатриеновой кислоты приближалась к контролю, что, очевидно, может свидетельствовать о некоторой нормализации состояния метаболизма. У этих больных также отмечается наиболее выраженное связывание альбумином арахидоновой кислоты. Известно, что именно арахидоновая кислота является субстратом для образования простагландинов E_2 и $E_{2\alpha}$, простаглицина I_2 , тромбоксана A_2 , являющихся регуляторами множественных внутриклеточных процессов. Установлено, что простаглицлин является биологически активным веществом, предупреждающим развитие атеросклероза [20]. Возможно, при изученных нами заболеваниях уменьшение доли арахидоновой кислоты, связываемой альбуми-

Состав жирных кислот, связываемых альбумином в норме и при патологии (в %)

Жирные кислоты	Доноры	Инфаркт миокарда		Миокардит	ВДМД
		острый период	подострый период		
12:0	0,8±0,08	0,35±0,04	0,75±0,08	0,73±0,07	0,3±0,03
14:0	4,2±0,4	2,8±0,3	5,25±0,5	4,0±0,4	2,6±0,25
15:0	0,86±0,09	0,25±0,03	1,2±0,1	0,83±0,08	0,27±0,03
16:0	27,1±2,5	32,45±3,0	27,6±2,8	29,4±3,0	35,9±3,6
16:1	7,7±0,8	6,4±0,6	8,33±0,8	7,1±0,7	3,8±0,4
17:0:1	0,13±0,01	0,29±0,03	0,27±0,03	0,21±0,02	0,26±0,03
18:0	7,6±0,8	13,2±1,3	13,0±1,3	14,0±1,4	14,5±1,4
18:1	26,4±2,6	28,6±2,9	24,1±2,4	26,7±2,7	28,7±2,9
18:2	17,2±1,7	9,1±0,9	11,1±1,0	10,0±1,0	8,23±0,8
{ 18:3 20:1	0,14±0,01	0,26±0,02	0,22±0,02	0,23±0,02	0,26±0,02
{ 21:0 20:2	0,07±0,007	0,52±0,05	0,1±0,01	0,45±0,04	0,5±0,05
20:3	0,5±0,05	0,23±0,02	0,48±0,05	0,38±0,04	0,25±0,025
20:4	3,4±0,3	1,4±0,1	2,5±0,25	1,6±0,15	1,1±0,1
23:0	0,17±0,01	0,8±0,08	1,4±0,1	0,9±0,09	0,6±0,06
20:5	0,23±0,02	0,15±0,01	0,7±0,07	0,6±0,06	0,18±0,018
22:3	0,7±0,07	0,5±0,05	0,2±0,02	0,15±0,015	0,2±0,02
22:6	0,8±0,08	0,7±0,07	0,8±0,08	0,72±0,07	0,35±0,035
Насыщенные жир- ные кислоты	40,8	50,3	49,4	50,2	54,6
ПНЖК	22,9	12,5	16,0	13,9	10,8
20:4					
18:2	0,2	0,15	0,2	0,16	0,13

Примечание. Помимо указанных основных жирных кислот, обнаружено также присутствие 20:0, 24:0, 24:1, сумма которых не превышала 2%; при инфаркте миокарда основная сумма падает на 18:3.

ном, может быть свидетельством активного включения ее в синтез простациклипа, т. е. проявлением своеобразной биологической защиты организма, направленной на предупреждение формирования сосудистого тромба. Однако не исключено, что в условиях развившейся патологии уменьшение доли арахидоновой кислоты служит отражением нарушенного равновесия в системе образования простациклипа и тромбоксана в сторону повышенной готовности к тромбообразованию. Наш взгляд, интересным фактом является повышение в 4 раза и более доли эйкозапентаеновой кислоты при миокардите и в подостром периоде инфаркта миокарда по сравнению с инфарктом миокарда в остром периоде и при ВДМД, образующими в организме простагландинны E_3 и $E_{3\alpha}$, частично используемыми для синтеза простациклипа I_3 и тромбоксана A_3 , предупреждающих агрегацию тромбоцитов и образование тромба [18]. Возможно, повышение доли эйкозапентаеновой кислоты может быть свидетель-

ством активации указанного компенсаторного метаболического пути образования эйкозаноидов в подостром периоде инфаркта миокарда и при миокардите. В 30% случаев при инфаркте миокарда в подостром периоде доля линолевой и арахидоновой кислот, связываемых альбумином, составляла в среднем 5,0 и 1,2% соответственно, что, по-видимому, отражает течение заболевания с резко сниженным синтезом арахидоновой кислоты.

При анализе связывания альбумином продуктов ПОЛ также обнаружены значительные изменения (см. табл. 1). Так, уровень дисновых конъюгатов и кетонров, связываемых альбумином, при инфаркте миокарда в остром и подостром периодах составлял $0,5\pm 0,04$ и $0,2\pm 0,02$ усл. ед./100 мг белка против $0,3\pm 0,04$ и $0,1\pm 0,02$ усл. ед./100 мг белка у доноров. Высокое содержание продуктов ПОЛ в альбумине в подостром периоде инфаркта миокарда соответствует литературным данным о том, что при возобновлении кровообращения в дли-

тельно ишемизированных органах не только не нормализуются процессы ПОЛ, усиливающиеся при ишемии, но происходит их дальнейшая интенсификация [11, 13, 22]. Как видно из табл. 2, уровень некоторых насыщенных и ненасыщенных жирных кислот при инфаркте миокарда в подостром периоде также не приходит в соответствие с показателями контрольной группы. Достоверное повышение продуктов ПОЛ отмечается в альбумине больных ВДМД и миокардитом, т. е. обнаруживается неспецифический характер связывания жирных кислот, включаемых в процесс перекисления. Как известно [21, 23], субстратом для образования продуктов ПОЛ является арахидоновая кислота, содержание которой в альбумине при изученных нами патологических состояниях уменьшается. Возможно, у больных наблюдается усиление липоксигеназного пути образования гидроперекисей из арахидоновой кислоты. Ранее А. И. Арчаковым была высказана гипотеза, согласно которой реакционно-способные метаболиты ксенобиотиков инактивируются альбумином [22]. Возможно, активное связывание альбумином продуктов ПОЛ служит характеристикой его защитной функции в уменьшении их повреждающего действия на клеточные структуры при патологии.

На основании полученных данных можно сделать предположение, что изменение объема транспорта липидов, связываемых альбумином, является одним из звеньев биохимической перестройки, обеспечивающей биоэнергетические и другие метаболические процессы при патологии миокарда.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аматуни В. Г., Карагезян Г. Г., Сафарян М. Д. // Тер. арх. — 1980. — № 3. — С. 96—100.
2. Арчаков А. И. Микросомальное окисление. — М., 1975.
3. Аряев Н. Л. // Педиатрия. — 1982. — № 3. — С. 59—61.
4. Багдасарьян С. Н., Толкачева Н. В., Троицкий Г. В. // Лаб. дело. — 1977. — № 10. — С. 617—618.
5. Биохимические методы исследования в клинике / Под ред. А. А. Покровского. — М., 1969.
6. Борисенко В. Г., Касьмова Г. А., Борисенко С. Н. // Укр. биохим. журн. — 1984. — Т. 56, № 2 — С. 185—187.

7. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М., 1972.
8. Гаврилов В. Б., Мишкорудная М. И. // Лаб. дело. — 1983. — № 3. — С. 34—35.
9. Иванова А. С., Архипова О. Г., Купина Л. М., Павловская Л. В. // Вопр. мед. химии. — 1980. — № 5. — С. 585—596.
10. Кейтс М. Техника липидологии: Выделение, анализ и идентификация липидов: Пер. с англ. — М., 1975. — С. 76—77.
11. Литвицкий П. Ф., Коган А. Х. // Бюл. экпер. — биол. — 1981. — № 3. — С. 271—274.
12. Маурер Г. Диск-электрофорез: Пер. с нем. — М., 1971.
13. Никулина С. С., Рамазанов Л. И., Макаренко Т. Г., Козлов Н. Б. // Острая ишемия органов и ранние постишемические расстройства. — М., 1978. — С. 157—158.
14. Спектор Е. Б., Ананенко А. А., Гранова Л. В., Политова Л. И. // Съезд педиатров БССР, 4-й: Тезисы докладов. — Минск, 1981. — С. 79—80.
15. Троицкий Г. В., Багдасарьян С. Н., Толкачева Н. В., Ажицкий Г. Ю. // Лейкозология. — Рига, 1976. — Вып. 5. — С. 33—35.
16. Троицкий Г. В., Кирюхин И. Ф., Толкачева Н. В., Ажицкий Г. Ю. // Вопр. мед. химии. — 1974. — № 1. — С. 24—31.
17. Folch J., Less M., Sloan-Stanlly G. H. // J. biol. Chem. — 1957. — Vol. 226. — P. 497—501.
18. Hamberg M., Svensson J., Samuelsson B. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1975. — Vol. 72. — P. 2993—2998.
19. Holman R. T. // J. Nutr. — 1960. — Vol. 70. — P. 405—411.
20. Hornstra G., Chait A., Karvonen M. J. et al. // Lancet. — 1973. — Vol. 1. — P. 155—157.
21. Lokesh B. R., Mathur S. N., Spector A. A. // J. Lipid Res. — 1981. — Vol. 122. — P. 905—915.
22. Quarnieri C., Ferrari R., Visioli O. et al. // J. molec. cell Cardiol. — 1978. — Vol. 10. — P. 893—906.
23. Shimuzu T., Kondo R., Hayaishi O. // Arch. Biochem. — 1981. — Vol. 206. — P. 271—276.

Поступила 01.12.87

TRANSPORT OF FATTY ACIDS AND PRODUCTS OF THEIR PEROXIDATION BY BLOOD SERUM ALBUMIN IN ISCHEMIC AND NONCORONARY IMPAIRMENTS OF MYOCARDIUM

N. V. Tolkacheva, M. M. Levachev, F. A. Medvedev, S. N. Kulakova, A. F. Mazurets, V. G. Borisenko

State University, Simpheropol, Institute of Nutrition, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Functional ability of blood serum albumin to bind lipids, fatty acids and products of their peroxidation was studied in ischemic and non-coronary impairments of myocardium. Certain alterations were detected in the transport volumes of low molecular substances studied, which suggest the important function of albumin in biochemical shifts of bioenergetic and other metabolic reactions during myocardial impairments.

РЕГЕНЕРАЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ ИШЕМИЗИРОВАННОЙ ПЕЧЕНИ И ВЛИЯНИЕ НА НЕЕ РЕЗЕКЦИИ И ЭКСТРАКТОВ, СТИМУЛИРУЮЩИХ ПРОЛИФЕРАЦИЮ

НИИ лекарственных средств, Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

В последние годы показано, что при ряде патологических состояний печени (циррозе, хронических гепатитах) резекция печени дает лечебный эффект, усиливая пролиферативные процессы в органе [1, 7]. Выраженной способностью стимулировать пролиферативные процессы в печени (синтез ДНК, митозы) обладает также экстракт, полученный из печени новорожденных животных или из резецированной печени взрослых животных. Действие экстракта, стимулирующего пролиферацию (ЭСП), показано при частичной гепатэктомии [2, 19, 22, 24], субтотальной резекции [5], токсическом воздействии на печень СС₁₄ [1], портокавальном анастомозе [23]. Однако влияние ЭСП на регенерационную способность печени после ее длительной острой ишемии практически не исследовано.

В настоящей работе сопоставлена динамика регенерационных процессов (синтеза ДНК) в ишемизированной и резецированной печени, изучено влияние резекции на синтез ДНК в ише-

мизированной печени, а также проведена сравнительная оценка стимулирующих свойств ЭСП, полученных из резецированной и ишемизированной печени.

Методика

Опыты проведены на 300 половозрелых крысах-самках Вистар массой 200—250 г под внутривенным гексеналовым наркозом (50 мг/кг) с добавлением эфира через маску. Использованы 3 экспериментальные модели: 1) модель резекции правых и хвостовых долей печени (модель 30% резекции); 2) модель 2-часовой ишемии центральной и левой долей печени, составляющих 70% печени, с сохранением интактных правых и хвостовых долей печени (модель ишемии без резекции); 3) модель 2-часовой ишемии тех же долей с резекцией интактных долей (модель ишемии с резекцией).

Ишемию создавали наложением микрозажимов на сосудистую ножку долей печени. Через 16, 20, 24, 32, 48 и 72 ч после снятия микрозажимов или резекции крысы декапитировали, печень иссекали, гомогенизировали. Ядерную фракцию получали по методу, описанному ранее [20]. Интенсивность синтеза ДНК оценивали по включению ³H- и ¹⁴C-тимидина (СССР; 100 и 50 мкКи на крысу соответственно). Время мечения 2 ч. Радиоактивность кислотонерастворимой фракции измеряли в ЖС-106, а

Таблица 1

Динамика синтеза ДНК (в имп/мин на 1 мг ДНК) в ядрах ишемизированной и резецированной печени крыс ($M \pm m$)

Модель	Исходная величина	Срок исследования после операции, ч			
		24	32	48	72
I. 30% резекция	3912±353 (100)	8287±745** (212)	16 074±670** (410)	10 671±520** (273)	12 742±432** (326)
II. Ишемия без резекции					
ишемизированные доли	4571±325 (100)	13 893±3493* (304)	21 175±4205* (463)	15 005±2271* (328)	10 401±2052 (228)
неишемизированные доли	4571±325 (100)	26 684±3431** (649)	24 572±4739** (538)	11 861±3981 (260)	9533±1736 (209)
III. Ишемия с резекцией	5893±1138 (100)	27 141±1776** (461)	56 823±2868 (964)	46 911±6061** (796)	36 674±5442** (622)
p_1		<0,01	<0,01	<0,01	<0,05
p_2		<0,05	<0,01	<0,01	<0,01

Примечание. Звездочками отмечена достоверность различий с исходной величиной: одна — $p < 0,05$, две — $p < 0,01$. p_1 — достоверность различий с опытами с 30% резекцией, p_2 — между ишемизированными долями в опытах без резекции и с резекцией. В скобках — % к исходной величине.

Динамика отношения РНК/ДНК в гомогенате ишемизированной и резецированной печени крыс ($M \pm m$)

Модель	Исходная величина	Срок исследования после операции, ч			
		24	32	48	72
I. 30% резекция	$3,10 \pm 0,23$	$3,13 \pm 0,26$	$3,23 \pm 0,14$	$3,10 \pm 0,10$	$3,03 \pm 0,18$
II. Ишемия без резекции ишемизированные доли	$2,53 \pm 0,06$	$2,23 \pm 0,24$	$2,71 \pm 0,02$	$2,65 \pm 0,13$	$2,61 \pm 0,17$
неишемизированные доли	$2,53 \pm 0,06$	$3,11 \pm 0,010^*$	$2,93 \pm 0,08$	$2,90 \pm 0,26$	$2,94 \pm 0,25$
III. Ишемия с резекцией	$2,74 \pm 0,16$	$3,28 \pm 0,10$	$3,83 \pm 0,21$	$3,84 \pm 0,11$	$4,07 \pm 0,47$

* $p < 0,01$ — в сравнении с ишемизированными долями.

кислоторастворимой — в жидкости Брея [12], на сцинтилляционном счетчике Mark-11 (Nuclear Chicago, США). Содержание ДНК и РНК определяли по методу [11], цитохрома Р-450 — по методу [18], белка — биуретовым методом [6] и по Лоури [21].

ЭСР получали из резецированной печени крыс через 48 ч после 70 % резекции по методу [17]. ЭСР из ишемизированной печени получали после 2-часовой ишемии печени с резекцией также через 48 ч. Методика приготовления ЭСР в обоих случаях была одинаковой [1] и представляла модификацию метода LaBrecque [19]. Оба экстракта хранили при -20°C и вводили внутривенно по 4 мл на крысу после операции. К опытам с введением ЭСР ставили параллельные контроли. При проведении электрофореза в полиакриламидном геле показано, что ЭСР из резецированной печени содержит термостабильные белки с мол. м. от 10 000 до 70 000 дальтон в концентрации 6—7 мг/мл.

Каждая точка включает 3—5 исследований.

Статистическая обработка результатов проведена по методу Стьюдента.

Результаты и обсуждение

В предварительных опытах было показано отсутствие различий удельной радиоактивности кислоторастворимой фракции гомогенатов интактной, ишемизированной и резецированной печени, следовательно, изменения во включении меченого тимидина в ДНК свидетельствуют об истинном изменении процессов синтеза ДНК в клетках печени.

Результаты изучения динамики синтеза ДНК в печени крыс представлены в табл. 1. Как видно, синтез ДНК в клетках ишемизированной печени без резекции интактных долей (II модель) достоверно возрастал через 24 ч, достигал максимальной скорости через 32 ч (в 4,6 раза выше исходного значения) и сохранялся на высоком уровне в течение 2 дней после операции. Динамика синтеза ДНК в этих долях существенно не отличалась от

динамики синтеза ДНК, наблюдающейся в печени после ее 30 % резекции.

Синтез ДНК в неишемизированных долях у тех же животных (II модель) через 24 ч был в 2 раза выше, чем в ишемизированных долях и в печени резецированных животных. Последнее, по-видимому, указывает, что в опытах на модели ишемии без резекции ишемизированные доли печени оказывают стимулирующее влияние на синтез ДНК в интактных долях.

В опытах с ишемией и резекцией печени (III модель) синтез ДНК в ишемизированных долях был усилен в течение всех 3 дней послеоперационного периода и был достоверно выше, чем в ишемизированных долях в условиях сохранения интактных долей и чем в резецированной печени, т. е. резекция печени оказывала стимулирующее влияние на репаративные процессы при ишемии.

Содержание ДНК в гомогенате печени во всех опытах практически не изменялось, содержание РНК умеренно и недостоверно возрастало, особенно через 32—48 ч, и наиболее значительно в опытах с 2-часовой ишемией и резекцией. Это вело к умеренному увеличению отношения РНК — ДНК (табл. 2).

Удельное содержание белка во всех опытах снижалось на 30 % через 24 ч и на 20 % через 32—72 ч. Это совпадает с данными Вауег и соавт. [10] о снижении концентрации белка на 20 % в первые сутки после частичной гепатэктомии, причем восстановление было неполным даже через 10—14 дней. Уменьшение содержания белка после длительной ишемии, по-видимому, обусловлено снижением синтеза клеточных белков [16], а также сни-

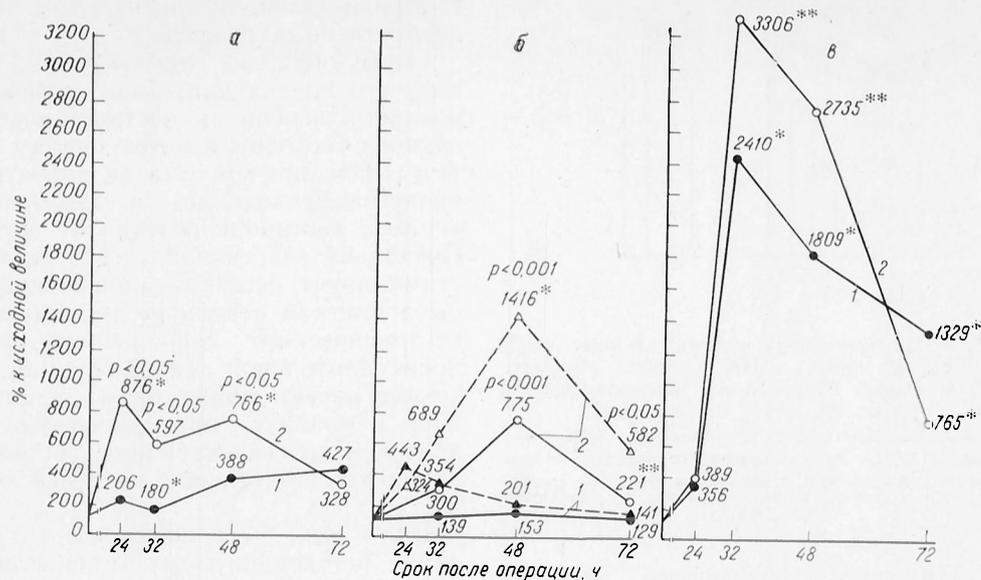


Рис. 1. Влияние ЭСП_р на динамику синтеза ДНК в ядрах резецированной и ишемизированной печени крыс.

а — модель 30 % резекции; б — модель ишемии без резекции (пунктиром обозначены неишемизированные доли); в — модель ишемии с резекцией. 1 — без введения ЭСП; 2 — с введением ЭСП. Звездочки — достоверность различий с исходом: одна — $p < 0,05$; две — $p < 0,001$; р — достоверность различий в опытах без введения и с введением ЭСП.

жением образования экскреторных белков из-за подавления функциональной активности печени [14].

Данные о влиянии ЭСП, полученного из регенерирующей печени (ЭСП_р), на синтез ДНК в ишемизированной и резецированной печени крыс приведены на рис. 1. Как видно, динамика синтеза ДНК в параллельно проведенных контрольных опытах была примерно аналогична ранее описанной (см. табл. 1), за исключением более низких цифр включения метки в ДНК на всех сроках исследования (особенно через 24 ч) в ишемизированных долях в опытах с ишемией без резекции (см. рис. 1, б).

Введение ЭСП_р (см. рис. 1, а) животным с 30 % резекцией печени приводило к достоверному усилению синтеза ДНК по сравнению с контролем, а также сместило пик синтеза ДНК к более раннему сроку (через 24 ч против 32 ч в контроле) и вызывало возникновение второго пика синтеза ДНК через 48 ч. Введение ЭСП_р животным с ишемией печени без резекции (см. рис. 1, б) достоверно усиливало синтез ДНК как в неишемизированных, так и в ишемизированных долях через 48 и 72 ч. Введение ЭСП животным с ишемией и резекцией печени не ока-

зывало на синтез ДНК достоверного стимулирующего действия.

Высокая способность ишемизированной печени к регенерации и показанное выше влияние ишемизированных долей на регенерационные процессы в неишемизированных долях печени (см. табл. 1) явились основанием для предположения о вероятном образовании в ишемизированных долях печени в раннем постинфарктном периоде веществ, стимулирующих пролиферативные процессы. Действительно ЭСП, выделенный из ишемизированной печени (ЭСП_и) на модели 30 % резекции, давал более выраженный стимулирующий синтез ДНК эффект, чем ЭСП_р (рис. 2).

На модели ишемии с резекцией, т. е. на фоне исходно более резко стимулированных регенерационных процессов — влияния ЭСП_р и ЭСП_и не наблюдалось.

Известно, что между регенерационными процессами и специфической функцией клеток существуют реципрокные отношения [4, 9, 15], а различные функции клетки по отношению к регенерации могут быть высоко- и низкоприоритетными [13]. Так как цитохром Р-450 (зависимая система детоксикации ксенобиотиков печени

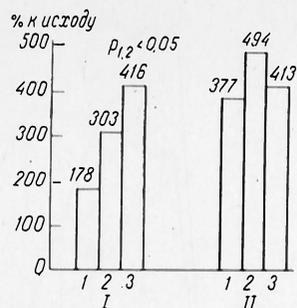


Рис. 2. Сравнительная оценка влияния ЭСП_r и ЭСП_и на синтез ДНК в ядрах резецированной (через 24 ч, I) и ишемизированной (через 48 ч, II) печени крыс.

1 — без введения ЭСП; 2 — введение ЭСП_r; 3 — введение ЭСП_и. p_1 — достоверность различий с опытами без введения и с введением ЭСП; p_2 — достоверность различий между опытами с введением ЭСП_r и ЭСП_и.

по критериям токсического действия CCl_4 , парацетамола, активности микросомальных ферментов и другим показателям) относится к низкоприоритетным функциям [8, 9, 25], представляет интерес оценка ее состояния при усилении регенерационных процессов в клетках ишемизированной печени. Исследования показали (рис. 3), что содержание цитохрома P-450 в печени умеренно снижалось после резекции и значительно сильнее уменьшалось после 2 ч ишемии с резекцией. Последнее может быть обусловлено высокой чувствительностью цитохрома P-450 к ишемии [3]. Введение ЭСП_r на обеих использованных моделях не влияло на содержание цитохрома P-450, что весьма существенно для сохранения в поврежденном органе ме-

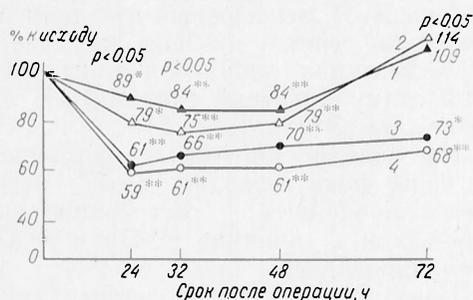


Рис. 3. Влияние ЭСП_r на содержание цитохрома P-450 в клетках ишемизированной и резецированной печени крыс.

1 — 30% резекция без введения ЭСП_r; 2 — 30% резекция с введением ЭСП_r; 3 — ишемия с резекцией без введения ЭСП_r; 4 — ишемия с резекцией с введением ЭСП. Звездочки — достоверность различий с исходом: одна — $p < 0,05$, две — $p < 0,001$, p — достоверность различий между опытами 1 и 3.

таболизма ксенобиотиков, в том числе лекарственных средств.

Таким образом, показано, во-первых, что клетки длительно ишемизированной печени в постишемическом периоде способны к интенсивному синтезу ДНК, причем эта активность не является предельной, а может быть усилена частичной резекцией органа. Поскольку частичная гепатэктомия стимулирует регенерационные процессы в клетках печени не только после ее токсического повреждения, но и после длительной острой ишемии, резекция печени может быть использована в клинике при трансплантации печени и других ситуациях, сопровождающихся длительной ишемией органа.

Во-вторых, было выявлено, что усиление регенерационных процессов в ишемизированной печени обусловлено активным образованием в ней пока не идентифицированных факторов, стимулирующих пролиферацию. Этот вывод вытекает из следующих наблюдений: 1) усиление синтеза ДНК в интактных долях печени в присутствии ишемизированных долей; 2) более высокая стимулирующая синтез ДНК активность у ЭСП, выделенного из ишемизированной печени, по сравнению с ЭСП, выделенным из регенерирующей печени. Это открывает возможность для разработки нового метода получения активного ЭСП из печени, предварительно подвергнутой острой ишемии.

В-третьих, из представленных данных очевидно, что ЭСП стимулирует синтез ДНК в резецированной печени, а также в интактных и ишемизированных долях печени (модель ишемии без резекции), но существенно не усиливает синтез ДНК в ишемизированной печени в условиях резекции интактных долей. Это скорее всего связано с уже достигнутым «критическим уровнем» синтеза ДНК в клетках ишемизированной и стимулированной резекцией ткани.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абакумова О. Ю., Котаев А. Ю., Карагюлян С. Р. и др. // *Вопр. мед. химии.* — 1985. — № 5. — С. 95—97.
2. Абакумова О. Ю., Саанадзе Н. Л., Карагюлян С. Р. // *Сравнительные аспекты изучения регенерации и клеточной пролиферации.* — М., 1985. — Ч. 1. — С. 1.
3. Биленко М. В., Каган В. Е., Велиханова Д. М., Комаров П. Г. // *Бюл. exper. биол.* — 1983. — № 4. — С. 30—32.

4. Бойков П. Я., Шевченко Н. А., Сидоренко Л. И., Тодоров И. Н. // Биохимия. — 1984. — Т. 49, № 9. — С. 1470—1477.
5. Гальперин Э. И., Караголян С. Р., Абакумова О. Ю. и др. // Хирургия. — 1985. — № 4. — С. 82—87.
6. Соловьева Г. А. Руководство для малого практикума по биохимии животных. — М., 1979. — С. 16.
7. Солопаев Б. П. Регенерация нормальной и патологически измененной печени: Экспериментальные основы регенерационной терапии болезней печени. — Горький, 1980.
8. Уриваева И. В., Фактор В. М. // Цитология. — 1976. — Т. 18, № 11. — С. 1354—1358.
9. Barbason H. R., Van Cantfort J., Houbrechts N. // Cell Tissue Kinet. — 1974. — Vol. 7. — P. 319—326.
10. Bauer C. H., Hassels B. E., Reutter W. G. // Biochem. J. — 1976. — Vol. 154. — P. 141—147.
11. Blobel G., Potter V. R. // Biochim. biophys. Acta. — 1968. — Vol. 166. — P. 48—57.
12. Bray G. A. // Analyt. Biochem. — 1960. — Vol. 1. — P. 279—285.
13. Brodsky W. Ya., Uryavaeva I. V. // Int. Rev. Cytol. — 1977. — Vol. 50. — P. 275—323.
14. Cairo G., Schiaffonali L., Aletti M. G. et al. // Biochem. J. — 1982. — Vol. 204. — P. 197—202.
15. Epijanova O. I., Terskikh V. V. // Cell Tissue Kinet. — 1969. — Vol. 2. — P. 75—93.
16. Hasselgren P., Fornander J., Jagenburg R., Sundstrom E. // Acta physiol. scand. — 1982. — Vol. 114. — P. 143—148.
17. Higgins G. M., Anderson R. M. // Arch. Path. — 1931. — Vol. 12. — P. 186—202.
18. Johannesen K. A. M., Pierre J. W. // Analyt. Biochem. — 1978. — Vol. 86. — P. 725—732.
19. LaBrecque D. R., LeRoy A. P. // J. Physiol. (Lond.). — 1975. — Vol. 248. — P. 273—284.
20. Lerman M. I., Abacumova O. Yu., Kucenco N. G. et al. // Cancer Res. — 1974. — Vol. 34. — P. 1536—1541.
21. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
22. Makowka L., Falk R. E., Falk J. A. // Cancer (Philad.). — 1983. — Vol. 51. — P. 2181—2190.
23. Starzl T. E., Terblanche J., Porter K. A. et al. // Lancet. — 1979. — Vol. 1. — P. 127—130.
24. Starzl T. E., Porter K. A., Hayashida N. et al. // J. surg. Res. — 1980. — Vol. 29. — P. 471—474.
25. Wilson J. T., Spelsberg T. C. // Biochem. J. — 1976. — Vol. 154. — P. 433—438.

Поступила 01.12.87

REGENERATING ABILITY OF ISCHEMIC LIVER TISSUE AND EFFECT OF RESECTION AND OF PROLIFERATION-STIMULATING FACTORS ON LIVER TISSUE REGENERATION

M. V. Bilenko, L. A. Seregina, P. G. Komarov, O. Yu. Abacumova

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

DNA synthesis was studied in liver nuclei of Wistar rats after 30 % liver tissue resection, 2 hr ischemia of 70 % liver tissue or 2 hr ischemia of 70 % liver tissue with resection of intact lobes. DNA synthesis was markedly increased in ischemic lobes and was especially high in ischemic lobes if simultaneous resection of intact lobes occurred; maximum of the synthesis was observed within 32 hrs after the operation. Proliferation stimulating extracts, isolated from liver tissue within 48 hrs after the resection or after ischemia, intensified the regenerating processes in the resected liver tissue; the first preparation (from resected liver tissue) exhibited the most distinct effect as compared with the second extract (from ischemic liver tissue). Proliferation stimulating extracts did not affect the cytochrome P-450, content of which was decreased after resection and ischemia. The data obtained suggest the important role of proliferation stimulating factors in regeneration of liver tissue after ischemia or resection; these factors proved to be possible to isolate from ischemized and reperfused liver tissue; the medicinal effect of resection was shown.

УДК 616.36-008.939.15-39]+616.36-008.931:577.152.199.2]-02.615.917]-085.356:577.164.1

Т. Л. Корсова, Н. А. Морозова, А. А. Познанская, Б. И. Курганов

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ КОФЕРМЕНТНЫХ ФОРМ ВИТАМИНА В₁₂ НА МОНООКСИГЕНАЗНУЮ СИСТЕМУ И ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В ПЕЧЕНИ КРОЛИКОВ ПРИ ОТРАВЛЕНИИ ФЕНИЛГИДРАЗИНОМ

ИПО «Витамины», Москва

Фенилгидразин (ФГ), как и многие производные гидразина, широко используется в медицинской и химической промышленности. Длительный контакт рабочих с этим соединением на производстве приводит к развитию

хронических интоксикаций [8]. Наиболее сильно ФГ поражает кровь и печень. Введение ФГ лабораторным животным вызывает у них гемолитическую гиперхромную анемию [1], сходную по картине крови с перни-

циозной анемией, наблюдаемой при авитаминозе V_{12} [11]. Биохимические механизмы токсического действия ФГ, особенно в отношении печени, остаются невыясненными, хотя их изучение способствовало бы созданию соответствующих антидотов. Выявлены снижение содержания гликогена, серосодержащих аминокислот и восстановленного глутатиона в печени, ее жировое перерождение, вызванные интоксикацией ФГ [13]. Поскольку в гепатоцитах система инактивации ксенобиотиков, к которым относится ФГ, взаимосвязана с перекисным окислением липидов (ПОЛ), большой интерес представляет изучение монооксигеназной системы (МОС) и ПОЛ в микросомах печени в условиях отравления ФГ. Однако в литературе сведения по этому вопросу отсутствуют. Сообщалось о торможении обмена ряда лекарственных препаратов (фенobarбитал, гексобарбитал, N-деметилирование аминопиррина) под влиянием разных производных гидразина [15, 17], а также об усилении ПОЛ и изменениях в содержании цитохрома P-450 в печени крыс, отравленных солями гидразина [5]. Установлено, что при взаимодействии ФГ с цитохромом P-450 происходит образование фенилдиазена, который связывается с гемом цитохрома P-450, а образовавшийся двойной комплекс необратимо инактивируется в присутствии кислорода [16]. Отмечалось, что производные гидразина нарушают обмен витаминов группы В [8]. Длительное применение противотуберкулезных препаратов на основе гидразидов (тубазид, фтивазид и др.) снижало в крови уровень витаминов V_6 и V_{12} [6]. В то же время показана целесообразность лечебного применения витамина V_{12} при ряде химических токсикозов (отравление сулемой, свинцом, CCl_4) [9, 10, 12], что обосновано вовлечением этого витамина в синтез белка, в поддержание восстановленного глутатиона, в реакции метилирования [2].

В настоящей работе изучены некоторые показатели МОС и ПОЛ в микросомах печени кроликов при экспериментальном отравлении ФГ и влияние на них введения двух коферментных форм витамина V_{12} — метилкобаламина (MeCbl) и аденозилкобаламина (AdoCbl).

Методика

Опыт проведен на беспородных кроликах-самцах массой 1,5—2 кг, содержащихся на обычном рационе вивария и разделенных на 5 групп (по 5—6 животных в каждой): 1-я группа служила контролем; животным остальных групп ежедневно в течение 3 дней вводили подкожно солянокислый ФГ в дозе 15 мг/кг. Животных 2-й группы забивали внутривенной воздушной эмболией на 7-й день опыта (т. е. на 4-й день после последнего введения ФГ), 3-й группы — на 14-й день. Кроликам 4-й и 5-й групп, начиная с 7-го дня опыта, ежедневно в течение 7 дней вводили внутримышечно соответственно AdoCbl и MeCbl в дозе 500 мкг/кг, после чего кроликов забивали. Во фракции микросом, выделенных по методу [7], определяли содержание цитохромов P-450 и b_5 [19], N-деметилазную и п-гидроксилазную активности, используя в качестве субстрата соответственно N,N-диметиланилин и анилин [7]. Электронтранспортную активность НАДФ·Н-специфического флавопротеида (НАДФ·Н-цитохром P-450-редуктаза) оценивали по НАДФ·Н-цитохром c- и НАДФ·Н-2,6-дихлорфенолиндифенолредуктазным реакциям; активность среднего компонента НАДФ·Н-зависимой цепи переноса электронов — по НАДФ·Н-нитротетразолийредуктазной реакции. Электронтранспортную активность НАДФ·Н-специфического флавопротеида (НАДФ·Н-цитохром b_5 -редуктаза) определяли по НАДФ·Н-цитохром c-редуктазной реакции [7].

О скорости спонтанного ПОЛ в микросомах печени судили по накоплению малонового диальдегида (МДА) за 30 мин инкубации [4]. Содержание белка определяли по методу Лоури [18]. Полученные данные обрабатывали статистически с использованием критерия t Стьюдента. Препараты MeCbl и AdoCbl синтезированы в ИПО «Витамины» под руководством проф. А. М. Юркевича.

Результаты и обсуждение

По величине LD_{50} , составляющей для кроликов 80 мг/кг, ФГ относится к высокотоксичным веществам. Введение кроликам ФГ по 15 мг/кг в течение 3 дней на 7-е сутки опыта вызвало поражение печени. У кроликов 2-й группы, отравленных ФГ, относительная масса печени увеличилась на 26 %, а количество микросомального белка возросло более чем в 2 раза, что свидетельствует об интенсивной пролиферации эндоплазматической сети (см. таблицу).

Отравление ФГ не изменяло содержания цитохромов P-450 и b_5 во фракции микросом печени. Однако введение ФГ более чем в 2 раза снижало скорость N-деметилирования диметиланилина (субстрат типа I), что, по-видимому, связано со снижением каталитической эффективности цитохрома P-450, но не изменяло

Влияние AдоСb1 и MeСb1 на показатели МОС и ПОЛ в микросомах печени кроликов при отравлении ФГ ($M \pm m$)

Показатель	Контроль (1-я группа)	ФГ-анемия		ФГ-анемия + AдоСb1	ФГ-анемия + MeСb1
		7-й день	14-й день		
Относительная масса печени, г/100 г	4,2±0,2	5,3±0,2*	4,5±0,2	3,9±0,1	4,5±0,4
Микросомальный белок, мг/г	8,5±0,8	20,7±2,2*	10,3±1,7	16,0±1,3*	7,0±0,26
Цитохром Р-450, нмоль на 1 мг белка	0,50±0,02	0,43±0,07	0,43±0,08	0,40±0,06	0,62±0,07
Цитохром α_6 , нмоль на 1 мг белка	0,27±0,03	0,29±0,03	0,27±0,07	0,16±0,04	0,36±0,04
N-деметилование диметиланилина:					
нмоль/мин на 1 мг белка	3,55±0,38	1,29±0,09*	3,59±0,41	2,39±0,16*	4,58±0,39
нмоль/мин на 1 нмоль Р-450	7,08±0,54	3,37±0,52*	8,74±0,70	7,03±1,79	7,90±1,42
p-Гидроксилирование анилина:					
нмоль/мин на 1 мг белка	0,36±0,05	0,30±0,02	0,33±0,04	0,27±0,02	0,41±0,04
нмоль/мин на 1 нмоль Р-450	0,73±0,10	0,74±0,08	0,79±0,06	0,77±0,02	0,69±0,09
НАДФ·Н-цитохром Р-450-редуктаза:					
нмоль цитохрома с за 1 мин на 1 мг белка	45,0±5,9	31,4±1,9	48,1±7,2	29,4±3,9	52,2±6,22
нмоль 2,6-ДХФИФ за 1 мин на 1 мг белка	28,2±1,4	22,2±1,2*	34,6±6,0	35,5±7,4	66,2±7,3*
нмоль нитротетразолия за 1 мин на 1 мг белка	10,6±1,4	13,7±0,8	17,2±2,6	7,34±0,7	19,0±2,4*
НАД·Н-цитохром α_6 -редуктаза, нмоль цитохрома с за 1 мин на 1 мг белка	405±27	471±46	455±49	316±32	728±110*
ПОЛ, нмоль МДА за 30 мин на 1 мг белка	0,36±0,03	0,96±0,12*	0,69±0,05*	0,28±0,05	0,45±0,03*

Примечание. Звездочка— $P < 0,05$ по сравнению с контролем. 2,6-ДХФИФ — 2,6-дихлорфенолинидофенол.

скорость *p*-гидроксилирования анилина (субстрат типа II). Поражение печени ФГ приводило также к изменению активности НАДФ·Н-зависимой цепи переноса электронов: скорость НАДФ·Н-цитохром *c*-редуктазной реакции снижалась, а скорость НАДФ·Н-нитротетразолийредуктазной реакции, напротив, возрастала. Можно думать, что увеличение активности среднего звена цепи переноса электронов (нитротетразолийредуктазная реакция) является компенсаторным процессом, обеспечивающим в условиях отравления ФГ переброс электронов с НАДФ·Н-зависимой цепи на цитохром Р-450. Достоверного изменения активности НАДФ·Н-зависимой цепи переноса электронов при использовании в качестве субстрата цитохрома *c* не обнаружено.

На 7-й день развития интоксикации скорость спонтанного ПОЛ в микросомальной фракции печени возрастала почти в 3 раза по сравнению с контролем. Увеличение содержания продуктов ПОЛ, вероятно, связано с

уменьшением при этом состоянии уровня эндогенных антиоксидантов — восстановленного глутатиона [8]. Такая интенсификация процесса ПОЛ свидетельствует о мембранопоражающем действии ФГ и (или) продуктов его обмена и может служить одной из причин выявленного снижения активности встроенной в мембрану МОС.

Влияние коферментных форм витамина В₁₂ на активность микросомальной МОС и скорость ПОЛ в печени было оценено после 7 дней их введения (4-я и 5-я группы) и сопоставлено с состоянием этих систем при спонтанной реабилитации (3-я группа). Как видно из таблицы, при спонтанном выздоровлении животных масса печени возвращалась к исходному уровню. Содержание микросомального белка превышало норму, но разница была недостоверной. N-деметиловая активность восстанавливалась до нормы, по-видимому, за счет каталитической эффективности цитохрома Р-450, поскольку его со-

держание не изменялось. Отмеченные на 7-й день опыта у отравленных кроликов изменения активности НАДФ·Н-зависимого переноса электронов нивелировались, исключение составила НАДФ·Н-зависимая нитротетразолийредуктазная активность, которая еще больше повысилась. При спонтанной реабилитации скорость спонтанного ПОЛ снижалась, но все же значительно (в 2 раза) превышала норму.

Таким образом, при спонтанной реабилитации нормализуются многие показатели МОС, однако ткань печени остается пораженной, о чем свидетельствовали повышенный уровень микросомального белка и увеличенная скорость спонтанного ПОЛ.

У кроликов, получавших после отравления препарат AдоСbl (4-я группа), как и у спонтанно выздоравливающих животных, относительная масса печени была близка к норме, а содержание микросомального белка также сохранялось повышенным. Введение AдоСbl подавляло восстановление N-деметилазной активности, которая оставалась на 30 % ниже, чем в 3-й группе; каталитическая эффективность цитохрома P-450 при этом нормализовалась. Эти данные позволяют предположить, что одной из причин неполного восстановления N-деметилазной активности цитохрома P-450 может служить торможение синтеза специфического белка под влиянием введенного AдоСbl.

Влияние AдоСbl на восстановление активности НАДФ·Н-цитохром P-450-редуктазы зависело от вида использованного акцептора электронов: AдоСbl тормозил восстановление цитохром с-редуктазной активности, которая сохранялась на уровне активности фермента у отравленных животных. В то же время на нормализацию НАДФ·Н-2,6-дихлорфенолиндифенолредуктазной активности AдоСbl не влиял. НАДФ·Н-нитротетразолийредуктазная активность, увеличивающаяся при отравлении и в последующий период реабилитации животных, снижалась при введении AдоСbl и была на 30 % ниже активности у интактных кроликов. Таким образом, AдоСbl тормозил восстановление системы детоксикации ксенобиотиков, нарушенной введением ФГ.

В то же время введение AдоСbl полностью нормализовало скорость спонтанного ПОЛ в микросомах печени.

Введение кроликам, отравленным ФГ, MeСbl (5-я группа) восстанавливало до нормы не только массу печени, как у животных при спонтанной реабилитации и введении AдоСbl, но и содержание в печени микросомального белка. MeСbl стимулировал восстановление активности МОС, сниженной в результате отравления. Так, у животных, получавших этот препарат, содержание цитохрома P-450 превышало его уровень в микросомах печени контрольных и спонтанно выздоравливающих животных, но это различие не было достоверным. Хотя отравление кроликов ФГ не влияло на содержание цитохрома b_5 , при введении MeСbl отмечалась тенденция к некоторому его повышению. MeСbl увеличивал N-деметилирование диметиланилина и п-гидроксилирование анилина выше уровня этих процессов в микросомах печени контрольных животных. Поскольку каталитическая эффективность цитохрома P-450 в группе отравленных кроликов, получавших MeСbl, не отличалась от таковой в 1-й и 2-й группах, повышение N-деметилазной и п-гидроксилазной активности, по-видимому, можно объяснить стимуляцией синтеза цитохрома P-450 *de novo*. Введение MeСbl отравленным кроликам существенно стимулировало активность НАДФХ·Н- и НАД·Н-зависимых цепей переноса электронов. Так, показатели НАДФ·Н-2,6-дихлорфенолиндифенолредуктазной и НАД·Н-цитохром с-редуктазной активности в микросомах печени кроликов этой группы превышали таковые в микросомах интактных животных соответственно в 2,5 и 1,8 раза. Активность среднего звена цепи переноса электронов (НАДФХ·Н-нитротетразолийредуктазная) также существенно превышала контрольный уровень (в 1,8 раза). Таким образом, MeСbl не только стимулировал спонтанную реабилитацию кроликов после отравления их ФГ, но и индуцировал практически все изученные активности МОС. Как видно из таблицы, введение MeСbl существенно снижало скорость спонтанного ПОЛ по сравнению со скоростью этого процесса в

случае спонтанной реабилитации, однако полной нормализации ПОЛ не происходило. В этом отношении мембранопротекторное свойство у MeCbl было выражено менее сильно, чем у AdoCbl.

Результаты проведенного исследования позволили впервые обнаружить модулирующее влияние двух коферментных форм витамина B₁₂ на активность МОС, причем наибольший интерес представляет разнонаправленный характер этого влияния: MeCbl проявил себя как индуктор МОС, а AdoCbl, наоборот, как ингибитор. При этом большинство изученных параметров у соответствующих групп животных (4-я и 5-я) по своим величинам отличаются между собой в 1,5—2 раза. Стимулирующее влияние MeCbl на МОС может быть связано с вовлечением этого кофермента в синтез РНК и ДНК [2], а следовательно, с белоксинтезирующей системой. Труднее объяснить ингибирующее влияние другого кофермента — AdoCbl. Хорошо известно, что AdoCbl вовлечен в обмен холестерина и фосфолипидов [2], соотношение которых весьма существенно для поддержания нормальной структуры липидного слоя клеточных мембран, в которые встроена МОС. Возможно, что введение AdoCbl вызывает увеличение индекса холестерин/фосфолипиды, что влечет за собой повышение вязкости биологических мембран и снижает скорость тех ферментативных реакций, у которых имеются лимитирующие диффузионно-зависимые стадии [14]. Предполагается, что такие стадии имеются в МОС [3].

Известно, что воздействия, ведущие к изменению фосфолипидного компонента микросомных мембран, по-разному отражаются на связывании и метаболизме различных субстратов МОС. Выявленное нами разное влияние AdoCbl на активность НАДФ-Н-цитохром Р-450-редуктазы в зависимости от используемого субстрата, вероятно, связано с неодинаковым изменением участков липидного матрикса эндоплазматической сети, ответственных за их метаболизм.

Хотя в отношении активности МОС MeCbl и AdoCbl проявили разнонаправленное действие, оба кофермента способствовали нормализации

ПОЛ в печени отравленных животных. В этом случае можно думать, что их действие на ПОЛ опосредовано вовлечением витамина B₁₂ в поддержание в клетке пула восстановленных SH-групп [2], изменение которого определяет скорость ПОЛ как на стадии иницирования ПОЛ, так и на стадии обрыва цепей этого процесса.

Важность обнаружения у обоих коферментных форм витамина B₁₂ способности изменять скорость обмена ксенобиотиков и мембранопротекторных свойств определяется тем, что MeCbl и AdoCbl являются природными соединениями. В связи с этим кажется весьма перспективным использование их при создании средств профилактики и лечения различного вида интоксикаций.

Поскольку МОС участвует в окислительном обмене лекарственных препаратов, а коферментные формы витамина B₁₂ могут выступать в качестве ее модуляторов, то назначение MeCbl и AdoCbl совместно с лекарственными средствами может привести к изменению фармакологического эффекта и токсичности этих препаратов, что необходимо учитывать в практической медицине.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алекперов Б. А. // Грузинская респ. науч. конф. физиологов высших учебных заведений, 4-я: Материалы. — Тбилиси, 1977. — С. 77.
2. Арешкина Л. Я. Витамин B₁₂ в животном организме. — М., 1976.
3. Бородин Е. А., Добрецов Г. Е., Карасевич Е. И. и др. // Биохимия. — 1981. — Т. 46, № 6. — С. 1109—1118.
4. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М., 1972.
5. Горнштейн Э. С., Копылова Т. Н. // Биохимические исследования патологических процессов. — Рига, 1983. — С. 22—26.
6. Запрудская Д. С. // Пробл. туб. — 1958. — № 1. — С. 80—86.
7. Карузина И. И., Арчаков А. И. // Современные методы биохимии. — М., 1977. — С. 49—63.
8. Колла В. Э., Бердинский И. С. Фармакология и химия производных гидразина. — Йошкар-Ола, 1976. — С. 56.

9. Набиджанова Е. Н. // Экспериментальная патология печени. — Душанбе, 1973. — Вып. 1. — С. 80—83.
10. Песков Д. Д. // Вопросы профессиональной патологии. Рязань, 1972.
11. Познанская А. А. // Вопр. мед. химии. — 1970. — № 2. — С. 122—136.
12. Рашевская А. И., Зорина Л. А. // Вопросы профессиональной патологии. — М., 1974. — С. 8—13.
13. Туинов Л. А. // Основы общей промышленной токсикологии. — Л., 1976. — С. 184—197.
14. Халидов Э. М., Ли В. С., Азизова О. А. и др. // Вопр. мед. химии. — 1982. — № 11. — С. 81—82.
15. Clark R., Thompson J. W., Widdrington A. // Brit. J. Pharmacol. — 1972. — Vol. 44. — P. 89—99.
16. Jonen H. G., Werringloer J., Prough R. A., Estabrook R. W. // J. biol. Chem. — 1982. — Vol. 257, N 8. — P. 4404—4411.
17. Kato R., Tokonaka A., Shoji H. // Jap. J. Pharmacol. — 1969. — Vol. 19. — P. 315—322.

Поступила 11.12.87

EFFECT OF VITAMIN B₁₂ COENZYMES ON THE MONOOXYGENASE SYSTEM AND LIPID PEROXIDATION IN LIVER TISSUE OF RABBITS POISONED WITH PHENYLHYDRAZINE

T. L. Korsova, N. A. Morosova, A. A. Poznan-skaya, B. I. Kurganov

All-Union Vitamin Research Institute, Moscow

Distinct activation of lipid peroxidation, reduction in N-demethylation of dimethyl aniline and in NADPH-dependent electron transport chain were observed in liver microsomes of rabbits poisoned with phenylhydrazine. Methylcobalamine and adenosylcobalamine, two coenzyme forms of vitamin B₁₂, were firstly shown to serve as modulators of the monooxygenase system, whereas methylcobalamine proved to be inductor and adenosylcobalamine — repressor of the system. Administration of methylcobalamine into the poisoned rabbits stimulated much higher the activities of dimethyl aniline N-demethylase, aniline p-hydroxylase, NADPH-cytochrome P-450- and NODH-cytochrome b₅ reductases as compared with normal state, while adenosylcobalamine inhibited the reduction of all the monooxygenase system patterns studied. At the same time, both these coenzymes contributed to normalization of lipid peroxidation in liver microsomes of poisoned rabbits.

УДК 615.355:577.152.1]015.4:612.17]07

С. А. Струмило, Ю. В. Киселевский, Н. И. Таранда, С. В. Забродская,
Д. А. Опарин

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПИРУВАТДЕГИДРОГЕНАЗНОГО КОМПЛЕКСА ИЗ СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ С ТИАМИНДИФОСФАТОМ И ЕГО ПРОИЗВОДНЫМИ

Институт биохимии АН БССР, Гродно

Пируватдегидрогеназа (КФ 1.2.4.1) входит в состав одноименного полиферментного комплекса (ПДК), который является важнейшим функциональным и регуляторным звеном клеточного метаболизма [4]. Именно пусковой пируватдегидрогеназный компонент комплекса воспринимает множество регуляторных сигналов, реагируя на них посредством механизма «фосфорилирования — дефосфорилирования». Данный механизм интенсивно исследуется в ряде лабораторий [11, 13, 14], однако возможности коферментно-антикоферментной регуляции активности пируватдегидрогеназы изучены далеко не полно.

В настоящей работе проведена оценка ингибиторной способности ряда производных тиамина, синтезированных в Институте биохимии АН

БССР, в отношении ПДК из сердца быка и исследовано влияние ионов фосфата и двухвалентных металлов на особенности взаимодействия ПДК с тиаминдифосфатом (ТДФ) и его аналогами.

Функционирование ПДК в миокарде имеет исключительное значение для метаболического обеспечения биоэнергетики сердечной мышцы [12]. Это предопределяет неослабевающей интерес к всестороннему и углубленному изучению свойств ПДК из данного органа.

Методика

Выделение и очистку ПДК из сердца быка осуществляли описанным методом [15]. В результате очистки ПДК был преимущественно представлен апоформой.

Начальную скорость реакции, катализируемой ПДК, регистрировали по восстановлению

Таблица 1

Активность пируватдегидрогеназного комплекса при фиксированной концентрации ТДФ (10 мкМ) в присутствии различных производных тиамин (в % от контроля)

Производное тиамин	Концентрация производных тиамин, мМ	
	0,1	1
Окситиамин (ОТ)	—	103
ОТ-фталилацетат	100	93
ОТ-бис(хлорэтил)аминопропионат	96	86
ОТ-никотинат	100	100
ОТ-сукцинат	100	97
ОТ-суберат	100	90
ОТ-себацнат	96	86
Хлор-ОТ	—	100
ОТ-дисульфит	82	—
ОТ-монофосфат	88	61
ОТ-дифосфат	15	2
Тетрагидротиамин (ТГТ)	—	39
ТГТ-монофосфат	70	14
ТГТ-дифосфат	8	0
Тетрагидроокситиамин (ТГОТ)	—	103
ТГОТ-монофосфат	89	40
ТГОТ-дифосфат	85	36
Тиохром	100	50
Тиохроммонофосфат	81	29
Тиохромдифосфат	92	—
Тиазол	—	102
Тиазолмонофосфат	—	100
Тиазолдифосфат	62	25

НАД при 340 нм на спектрофотометре «Spectord UV VIS» (ГДР) в термостатируемых кюветках (30 °С). Реакционная среда общим объемом 1 мл включала 50 мМ трис-НСI или калий-фосфатный буфер (рН 7,5), 1 мМ дитиотреитол, 0,1 мМ MgCl₂ или MnCl₂, 0,1 мМ кофермент А, 2,5 мМ НАД, 2 мМ пируват, 3—4 мкг ферментного препарата ПДК и различные концентрации ТДФ и его аналогов. Реакцию начинали добавлением фермента.

Синтез окситиамина (ОТ) [5], его сложных эфиров с органическими кислотами — (3,3-диметил-1-фенил-1-фталил) уксусной, 3-бис(2-хлорэтил) аминпропионовой, пробоковой, себацновой [6], никотиновой [2], янтарной [3]; хлорокситиамина; продуктов окисления витамина В₁ — тиохрома и тиольной формы ОТ — окситиаминдисульфида; производных на основе тиамин и ОТ с полностью гидрогенизированным тиазоловым циклом — тетрагидротиамин и тетрагидроокситиамина; тиазолового компонента тиамин, а также моно- и дифосфорных эфиров производных тиамин осуществлен известными методами [1, 9].

Результаты и обсуждение

Определение активности апоформы ПДК при фиксированной концентрации ТДФ (10 мкМ) и двух довольно высоких концентрациях аналогов тиамин (0,1 и 1 мМ) позволило провести первичный скрининг этих аналогов в качестве ингибиторов (табл.

1). Оказалось, что нефосфорилированные окситиамин, тетрагидротиамин, а также хлорокситиамин, тиазоловый фрагмент и тиазолмонофосфат в концентрациях, превышающих в 100 раз концентрацию ТДФ, не влияют на активность ПДК. Эфиры окситиамина с различными кислотами, которые при введении *in vivo* подвергаются биотрансформации и оказывают избирательное торможение активности ТДФ-специфичных ферментов в некоторых тканях [6], *in vitro* обнаруживают очень слабые ингибиторные свойства в отношении ПДК из сердца быка (см. табл. 1). Фосфорилированные же окситиамин, тетрагидротиамин, тетрагидроокситиамин, тиохром и тиазоловый фрагмент способны ингибировать ПДК. Особенно сильное действие оказывают дифосфорные эфиры первых двух производных тиамин. Это закономерно, поскольку наличие пиррофосфатной группировки придает им большее структурное сходство с истинным коферментом — ТДФ. В результате дифосфорные эфиры окситиамина и тетрагидротиамин эффективно конкурируют с ТДФ за связывание в активных центрах ПДК, о чем свидетельствует чисто конкурентный тип ингибирования, наблюдаемый при графическом представлении кинетических данных в координатах Лайнуивера — Берка.

В реакционной среде с фосфатным буфером и ионами магния константа Михаэлиса (K_м) для ТДФ составляет 0,17 мкМ, а константы ингибирования (K_i) для окситиаминдифосфата

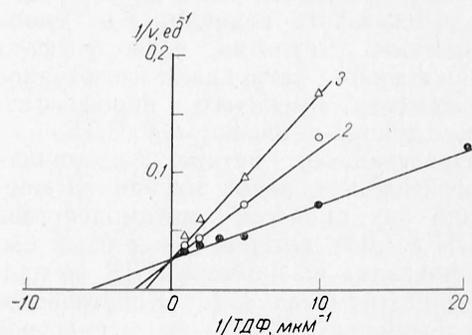


Рис. 1. Зависимость скорости реакции (v), катализируемой ПДК, от концентрации ТДФ в двойных обратных координатах при использовании фосфатного буфера и ионов магния. 1 — в отсутствие антикоферментных производных; 2 — 1 мкМ окситиаминдифосфата; 3 — 1 мкМ тетрагидротиаминдифосфата.

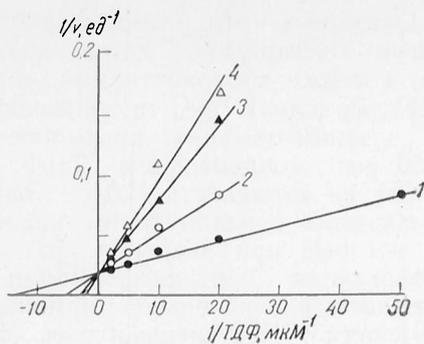


Рис. 2. Зависимость скорости реакции ПДК от концентрации ТДФ в координатах Лайнуивера — Берка при использовании трис-НСI и Mg^{2+} .

1 — в отсутствие антикоферментных производных; 2 — 1 мкМ тетрагидроокситиаминдифосфата; 3 — 0,2 мкМ тетрагидротиаминдифосфата; 4 — 0,2 мкМ окситиаминдифосфата.

та и тетрагидротиаминдифосфата — соответственно 0,40 и 0,23 мкМ (рис. 1). Ранее при исследовании ПДК из другого источника — надпочечников быка — нами определена более высокая величина K_M для ТДФ и более низкие значения K_i для ингибиторов в сходных условиях кинетического эксперимента [8]. Более высокий показатель K_M для ТДФ выявлен у ПДК из сердца свиньи [10]. Как видно, кинетические параметры одной и той же ферментной системы из различных источников имеют видовые и тканевые различия.

В реакционной среде с трис-НСI, не содержащим ионов фосфата, K_M для ТДФ равна 0,07 мкМ (рис. 2). Это понижение, очевидно, связано не с компонентом «трис», а обуславливается отсутствием ионов фосфата, поскольку при добавлении к трис-буферу ортофосфата величина K_M снова возрастает. Вероятно, ионы фосфата существенно затрудняют связывание кофермента, имеющего пирофосфатную группу, с апоформой ПДК.

Представляет интерес различная эффективность ионов магния и марганца в процессе взаимодействия ПДК с ТДФ, которая ранее нами была показана на примере ПДК из надпочечников быка [7]. Кинетическое исследование ПДК из сердечной мышцы также свидетельствует, что ионы марганца более эффективны, чем ионы магния, в качестве активаторов пируватдегидрогеназной реакции при ненасыщающих концентрациях ТДФ (см. рис. 2 и 3). Так, в при-

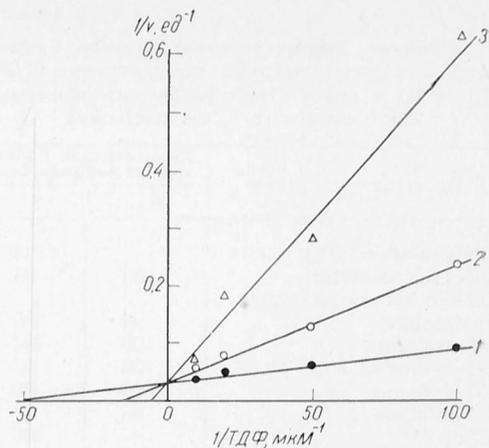


Рис. 3. Зависимость скорости реакции ПДК от концентрации ТДФ в двойных обратных координатах при использовании трис-НСI и ионов марганца.

1 — в отсутствие антикоферментных производных; 2 — 0,2 мкМ тетрагидротиаминдифосфата; 3 — 0,2 мкМ окситиаминдифосфата.

сутствии Mn^{2+} K_M для ТДФ в 3,5 раза ниже аналогичного показателя, определяемого в среде с Mg^{2+} (табл. 2). Интересно, что величина K_i для тетрагидротиаминдифосфата в присутствии Mn^{2+} в 2 раза выше, чем в присутствии Mg^{2+} , в то время как показатель K_i для окситиаминдифосфата в этих сравниваемых условиях изменяется менее значительно, причем в сторону уменьшения (см. табл. 2).

При сопоставлении величин K_M для ТДФ и K_i для антикоферментных аналогов тиамина в присутствии двух разновидностей ионов металлов можно сделать вывод о том, что ингибиторные способности окситиаминдифосфата и тетрагидротиаминдифосфата проявляются в гораздо большей мере

Таблица 2
Кинетические показатели ПДК из сердца быка при взаимодействии с ТДФ и аналогами в различных условиях

Показатель, мкМ	Условия определения		
	фосфатный буфер + Mg^{2+}	трис-НСI + Mg^{2+}	трис-НСI + Mn^{2+}
K_M для ТДФ	0,17	0,07	0,02
K_i для окситиаминдифосфата	0,40	0,04	0,03
K_i для тетрагидротиаминдифосфата	0,23	0,05	0,10

в среде с ионами магния, чем с Mn^{2+} . Ионы двухвалентных металлов играют, как известно, роль связующего мостика между некоторыми группировками молекулы ТДФ и апоферментом пируватдегидрогеназы. Из группировок ТДФ наиболее вероятными комплексообразователями с металлами являются атом азота в первом положении пиримидинового компонента и оксиэтилпирофосфатный радикал [4]. Эти же группировки в неизменном виде сохраняются и в молекулах окситиаминдифосфата и тетрагидротиаминдифосфата. Однако наличие других модифицированных фрагментов у антикоферментных производных тиаминина, вероятно, оказывает влияние на процессы комплексообразования с разными металлами, а следовательно, на взаимодействие их с апоформой ПДК.

Из полученных нами результатов следует также отметить гораздо более слабые ингибиторные возможности тетрагидроокситиаминдифосфата ($K_i = 0,67 \text{ мкМ}$) по сравнению с окситиаминдифосфатом и тетрагидротиаминдифосфатом в отношении ПДК из сердца. Аналогичные данные ранее были получены в нашей лаборатории при использовании ПДК из надпочечников быка [1]. Вывод из этих исследований таков: двойная модификация молекулы ТДФ ухудшает связывание с апоформой ПДК и снижает способность таких ингибиторных производных тиаминина к конкуренции с истинным коферментом. Для эффективного связывания и антикоферментного блокирования активных центров ПДК; по-видимому, оптимальными являются аналоги ТДФ с модификацией какой-либо одной существенной функциональной группировки.

Таким образом, проведенное исследование раскрывает некоторые возможности и особенности коферментно-антикоферментной регуляции ПДК из сердечной мышцы, что может представлять определенный практический интерес.

ЛИТЕРАТУРА

1. Забродская С. В., Таранда Н. И., Опарин Д. А. и др. // Докл. АН БССР. — 1987. — Т. 31, № 5. — С. 468—470.

2. Зиматкина Т. И., Опарин Д. А., Островский Ю. М. // Изв. АН БССР, сер. биол. наук. — 1985. — № 4. — С. 48—51.
3. Зиматкина Т. И., Опарин Д. А., Островский Ю. М. // Там же. — 1986. — № 3. — С. 58—60.
4. Кочетов Г. А. Тиаминные ферменты. — М., 1978.
5. Опарин Д. А., Зиматкина Т. И., Островский Ю. М. // Вопр. мед. химии. — 1987. — № 1. — С. 70—72.
6. Островский Ю. М., Опарин Д. А., Зиматкина Т. И. и др. // Изв. АН БССР, сер. биол. наук. — 1982. — № 6. — С. 102—108.
7. Струмило С. А. // Вопр. мед. химии. — 1983. — № 1. — С. 94—97.
8. Струмило С. А., Сенкевич С. Б., Забродская С. В. и др. // Укр. биохим. журн. — 1981. — Т. 53, № 5. — С. 65—68.
9. Экспериментальная витаминология / Под ред. Ю. М. Островского. — Минск, 1979. — С. 218—221.
10. Alkonyi I., Gyocsi L., Sümegi B. // Acta biochem. biophys. Acad. Sci. hung. — 1978. — Vol. 18, N 4. — P. 253—258.
11. Cate R. L., Roche T. E. // J. biol. Chem. — 1978. — Vol. 253, N 2. — P. 496—503.
12. Cooney G. J., Taegtmeier H., Newsholme E. A. // Biochem. J. — 1981. — Vol. 200, N 3. — P. 701—703.
13. Cooper R. H., Randle R. J., Denton R. M. // Ibid. — 1974. — Vol. 143, N 3. — P. 625—641.
14. Pettit F. H., Pelley J. W., Reed L. J. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1975. — Vol. 65, N 2. — P. 575—582.
15. Stanley C. J., Perham R. N. // Biochem. J. — 1980. — Vol. 191, N 1. — P. 147—154.

Поступила 15.12.87

INTERACTION OF THE PYRUVATE DEHYDROGENASE COMPLEX FROM HEART MUSCLE WITH THIAMIN DIPHOSPHATE AND ITS DERIVATIVES

S. A. Strumilo, Yu. V. Kiselevsky, N. I. Tarand, S. V. Zabrodskaya, D. A. Oparin

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

Inhibitory effects of 23 thiamin derivatives on the bovine heart pyruvate dehydrogenase complex (PDC) were studied. Oxythiamin diphosphate and tetrahydroxythiamin diphosphate exhibited the most pronounced effect on the PDC activity, affecting the complex by a competitive type of inhibition for thiamin diphosphate (TDP). The apparent affinity of TDP and the anticoenzyme derivatives for apo PDC depended on presence of phosphate and divalent metal ions. Phosphate considerably increased the K_m values for TDP (up to $0,17 \text{ }\mu\text{M}$) and the K_i values for oxythiamin diphosphate ($0,40 \text{ }\mu\text{M}$) as well as for tetrahydroxythiamin diphosphate ($0,23 \text{ }\mu\text{M}$). In presence of Mn^{2+} , K_m value for TDP was 3.5-fold lower as compared with Mg^{2+} containing medium.

Е. П. Харченко, В. Н. Калихевич, Т. В. Соколова, К. И. Шестак,
З. А. Ардемасова

ВЫСОКОАКТИВНЫЕ АНАЛОГИ ОПИАТОПОДОБНЫХ ПЕПТИДОВ ГИСТОРФИНА И КАППОРФИНА

Институт эволюционной физиологии и биохимии АН СССР, Государственный университет, Ленинград

Известно, что модуляция восприятия боли может осуществляться пептидами, различающимися как по первичной структуре, так и по уровню приложения их действия на опиатные системы [1, 13]. Поэтому особое внимание привлекает распространенность среди самых различных белков энкефалиноподобных последовательностей и возможная их роль в модуляции опиатных рецепторов. Эти пептиды в отличие от энкефалинов характеризуются положением фенилаланина не в 4-й, а в 3-й позиции, и по этому признаку их можно условно объединить в подсемейство дерморфина $\text{Tyr} - \text{D-Ala} - \text{Phe} - \text{Gly} - \text{Tyr} - \text{Pro} - \text{Ser} - \text{NH}_2$. Среди них нами были описаны пептиды гисторфин $\text{Tyr} - \text{Gly} - \text{Phe} - \text{Gly} - \text{Gly}$ из гистона H4 [3] и каппорфин $\text{Tyr} - \text{Ser} - \text{Phe} - \text{Gly} - \text{Gly}$ [4] из каппа-цепи иммуноглобулина кролика. Различные по длине аналоги дерморфина обладают по отношению к нему неизменной или пониженной опиоидной активностью, судя по тестам *in vitro* [13]. Накопившиеся многочисленные данные свидетельствуют о том, что укорочение длины аналогов опиоидных пептидов существенно снижает шансы увеличения их активности [1]. По-видимому, более перспективными для изыскания высокоактивных аналогов являются пента- и более длинные пептиды (как об этом свидетельствуют данные по аналогам подсемейства энкефалинов), поскольку для них возможно большое число вариантов структурных модификаций и конформаций у самих аналогов. Выявив у гисторфина и каппорфина опиатоподобную активность [3, 4], мы решили изучить анальгетическую активность их аналогов, полученных посредством структурных модификаций. Оказалось, что они в $10^3 - 10^4$ раз активнее лей-энкефалина при центральном введении и не уступают по активности дерморфину, наиболее

сильному анальгетику среди природных опиоидных пептидов. Описание их свойств составляет предмет настоящей публикации.

Методика

Пептиды синтезировали, исходя из дипептида глицил — глицина, последовательным наращиванием цепи с использованием N-оксисуцинимидного эфира бензилоксикарбонилфенил-D-аланина, п-нитрофенильного эфира бензилоксикарбонил-D-аланина, пентафторфенилового эфира бензилоксикарбонил-D-серина, пентафторфенилового эфира ди-трет-бутилоксикарбонилтирозина. Амидирование защищенных пентапептидов осуществлялось дициклогексилкарбодимидным методом с использованием соли пентафторфенола и аммиака. Деблокирование промежуточных бензилоксикарбоксилпептидов проводилось каталитическим гидрогенолизом. Конечные продукты деблокировались HCl/A-OH.

Анальгетическую активность пептидов, введенных интрацестернально мышам в 5 мкл в дозе 0,025—2648 мкг на 1 кг массы внутривенно, внутривенно и подкожно в дозе 0,1—0,5 мг на мышь, оценивали по тестам прижигания хвоста и горячей пластины (60°C). Каждую концентрацию пептида исследовали на группе, включающей не менее 7 нелинейных мышей. В тесте по прижиганию хвоста статистическое сравнение в контрольной и опытной группах мышей проводили по разностям между значениями болевого порога до и после инъекции соответственно физиологического раствора и пептида (через 5, 10, 20 и 30 мин и затем через каждые 30 мин до исчезновения анальгетического эффекта пептида). По тесту горячей пластины определяли длительность латентного периода от момента помещения мыши на горячую пластину (60°C) до реакции на температуру — лизание передних лап, поднятие на задние лапы. Температуру животных определяли с помощью полупроводникового микросопротивления МТ-54. Статистическую оценку результатов проводили по критерию Стьюдента [2].

Результаты и обсуждение

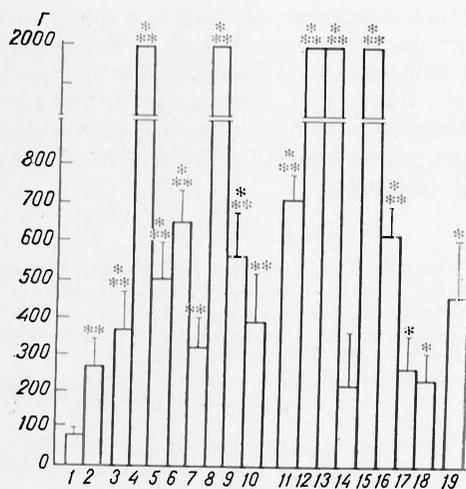
Перечень синтезированных и исследованных пептидов и результаты анализа их анальгетической активности приведены в таблице и на рисунке. Замены второй позиции D-аланином в гисторфине и D-серином в каппорфине резко усилили их активность — каждый из полученных аналогов, су-

Высокоактивные аналоги дерморфиноподобных пептидов

Последовательность пептидов и их аналогов	Пептид	Источник пептида
Tyr—Gly—Phe—Gly—Gly Tyr—D-Ala—Phe—Gly—Gly Tyr—D-Ala—Phe—Gly—Gly—NH ₂	Гисторфин	Гистон Н4
Tyr—Ser—Phe—Gly—Gly Tyr—D-Ser—Phe—Gly—Gly Tyr—D-Ser—Phe—Gly—Gly—NH ₂	Каппорфин	Каппа-цепь иммуноглобулина кролика 2717

для по тесту прижатия хвоста, сохранял выраженную анальгетическую активность при интрацестеральном введении в дозе 0,26 мкг/кг. Амидирование С-концевого глицина обоих аналогов с D-аминокислотами во второй позиции увеличивало их активность еще примерно на порядок, а в случае Tyr—D-Ser—Phe—Gly—Gly—NH₂ и более. Анальгетический эффект пептидов снимался налоксоном. Время резистентности по тесту горячей пластины для Tyr—D-Ser—Phe—Gly—Gly—NH₂ достигало в среднем 1 мин при дозе пептида 26,4 мкг/кг, для Tyr—D-Ala—Phe—Gly—Gly—NH₂ до 30 с при 257 мкг/кг. При более низких дозах

0,026—0,256 мкг/кг аналоги гисторфина были неэффективны. В отношении аналогов каппорфина следует заметить, что хотя они и не вызывали такого резкого увеличения времени резистентности по тесту горячей пластины как аналоги гисторфина, однако в дозах 0,264 и 0,132 мкг/кг Tyr—D-Ser—Phe—Gly—Gly—NH₂ достоверно увеличивал этот показатель. При интрацестеральном введении анальгетические эффекты всех исследованных опиатоподобных пептидов зависели от дозы введенного пептида. Время действия пептида также коррелировало с дозой введенного пептида. Полная потеря чувствительности животных к травматическому механическому воздействию (нагрузка более 2 кг на хвост) отмечалась по крайней мере на протяжении 3 ч для Tyr—D-Ala—Phe—Gly—Gly—NH₂ в дозе 25,6 мкг/кг. Эффекты его были прослежены также и при системном введении. При внутрибрюшинном введении значения болевого порога обнаруживали зависимость от введенной дозы пептида. Выраженный противоболевой эффект был отмечен при введении дозы 0,25 мг на мышь, а его максимум приходился на 20-ю минуту. При подкожном введении эта же доза вызывала максимальный эффект на 40-й минуте. При дозе 0,256—0,264 мкг/кг аналоги гисторфина и каппорфина достоверно снижали температуру тела животных соответственно на 3,5 и 2,1 °С.



Анальгезирующий эффект пептидов.

Изменение болевого порога после интрацестерального введения мышам физиологического раствора (1); 5,6 мкг/кг лей-энкефалина (2); 257 мкг/кг гисторфина (3); 257 мкг/кг Tyr—D-Ala—Phe—Gly—Gly (4); налоксон+257 мкг/кг Tyr—D-Ala—Phe—Gly—Gly (5); 2,56 мкг/кг (6) и 0,256 мкг/кг (7) Tyr—D-Ala—Phe—Gly—Gly; 25,6 мкг/кг (8), 0,257 мкг/кг (9) и 0,026 мкг/кг (10) Tyr—D-Ala—Phe—Gly—Gly—NH₂; 265 мкг/кг каппорфина (11); 265 мкг/кг (12), 2,65 мкг/кг (13) и 0,265 мкг/кг (14) Tyr—D-Ser—Phe—Gly—Gly; 264 мкг/кг (15), 2,64 мкг/кг (16), 0,132 мкг/кг (17) и 0,026 мкг/кг (18) Tyr—D-Ser—Phe—Gly—Gly—NH₂; 0,401 мкг/кг дерморфина (19). Одна звездочка — $p < 0,05$, две — $p < 0,01$, три — $p < 0,001$ по критерию Стьюдента.

Особый интерес представляло сравнение активности аналогов каппорфина и гисторфина с дерморфином. Оказалось, что при интрацестеральном введении аналог гисторфина Tyr—D-Ala—Phe—Gly—Gly—NH₂ и аналог каппорфина Tyr—D-Ser—Phe—Gly—Gly—NH₂ не уступают по анальгетической активности дерморфину Tyr—D-Ala—Phe—Gly—

Тур — Про — Сер — NH₂, а аналог гисторфина даже превосходил по активности дерморфин при дозе 0,256 мкг/кг. Особенность эффекта дерморфина состояла в том, что индуцируемая им анальгезия развивалась не сразу после введения, а нарастала постепенно. При внутрибрюшинном введении в дозе 0,25 мг на мышь указанные пептиды и дерморфин проявляли сходную анальгетическую активность.

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что природные дерморфиноподобные пептиды с фенилаланином в 3-й позиции могут быть весьма успешно использованы для получения аналогов с очень высокой анальгетической активностью. Увеличение в 10⁴ раз их активности по сравнению с лей-энкефалином было достигнуто только за счет введения D-аминокислоты во 2-ю позицию и амидирования C-концевого глицина. По-видимому, аналог гисторфина Тур — D-Ала — Phe — Gly — Gly — NH₂ и аналог каппорфина Тур — D-Ser — Phe — Gly — Gly — NH₂ являются наиболее простыми по структуре из числа известных нам высокоактивных аналогов опиоидных пептидов.

Среди множества изученных аналогов дерморфина, в том числе и тех, которые имеют замены аминокислот и их делеции [5—9, 11—14], мы не выявили таких, которые бы совпадали по первичной структуре с каппорфином и гисторфином, за исключением тетрапептида Тур — D-Ала — Phe — Gly — NH₂ [5, 12]. Практически у всех аналогов дерморфина анальгетическая активность либо снижалась, либо исчезала. С учетом высокой активности аналога каппорфина Тур — D-Ser — Phe — Gly — Gly — NH₂ и аналога гисторфина Тур — D-Ала — Phe — Gly — Gly — NH₂ их можно рассматривать как перспективные последовательности для более сложных модификаций их структуры с целью получения более высокоактивных аналогов.

Исследованный нами широкий спектр пептидов позволил выявить, что анальгетической активностью, снимаемой налоксоном, обладают и пептиды, отличающиеся по первичной структуре от энкефалинов, что согласуется с ранее полученными ре-

зультатами других авторов [10]. Уровни же воздействия их на ноцицептивные системы, по-видимому, не совпадают с опиоидными пептидами, поскольку те же модификации их первичной структуры, которые резко усиливают анальгетическую активность подсемейств энкефалиноподобных пептидов с фенилаланином в 4-й и 3-й позициях, не изменяют их анальгетическую активность. Так, аналоги Phe — D-Ала — Тур — Gly — Gly, Phe — Gly — Тур — Gly — D-Ала, Phe — D-Ала — Тур — Gly — Gly — NH₂, Phe — Gly — Тур — Gly — D-Ала — NH₂ выявленного нами в основном миелиновом белке пептида Phe — Gly — Тур — Gly — Gly (миелорфин) с анальгетической активностью не характеризуются большей анальгетической активностью.

В заключение хотелось бы отметить, что перечень подсемейства опиоидных пептидов с фенилаланином в 3-й позиции не исчерпывается дерморфином, гисторфином и каппорфином. Другие выявленные нами опиоидоподобные пептиды из различных белков отличаются от каппорфина и гисторфина более сложным составом аминокислот во 2, 4 и 5-й позициях и подтверждают тот факт, что экзогенные пептиды с тирозином в 1-й и фенилаланином в 3-й позициях могут проявлять выраженную анальгетическую активность, как и опиоидные пептиды из специализированных предшественников.

ЛИТЕРАТУРА

1. Розенталь Г. Ф., Чипенс Г. И. // Биорган. химия. — 1986. — Т. 12. — С. 869.
2. Урбах В. Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. — М., 1975. — С. 102—107.
3. Харченко Е. П., Багров А. Я. // Докл. АН СССР. — 1986. — Т. 289. — С. 1009—1012.
4. Харченко Е. П., Калихевич В. Н., Шестак К. И., Соколова Т. В. // Там же. — 1987. — Т. 297. — С. 740—743.
5. Blaha K., Malon P. // Peptides 1982. — Berlin, 1983. — P. 495—499.
6. Brantl V., Pfeiffer A., Herz A. et al. // Peptides. — 1982. — Vol. 3. — P. 793—797.
7. Broccardo M., Erspamer V., Falconieri Erspamer G. et al. // Brit. J. Pharmacol. — 1981. — Vol. 73. — P. 625—631.
8. Cervini M. A., Rossi A. C., Perseo G., de Castiglione R. // Peptides. — 1985. — Vol. 6. — P. 433—437.
9. De Castiglione R. // Highlights in Receptor Chemistry / Eds. C. Melchiorre, M. Gianella. — Amsterdam, 1984. — P. 149—168.

10. *Jurna I., Zeller G.* // *Europ. J. Pharmacol.* — 1981. — Vol. 73. — P. 323—331.
11. *Salvadori S., Sarto G., Tomatis R.* // *Int. J. Peptide Protein Res.* — 1982. — Vol. 19. — P. 536—542.
12. *Salvadori S., Marastoni M., Balboni G.* et al. // *J. med. Chem.* — 1985. — Vol. 28. — P. 769—774.
13. *Udenfriend S., Meienhofer J.* // *The Peptides.* — 1984. — Vol. 6.
14. *Vavrek R. J., Cui R. L., Stewart J. M.* // *Life Sci.* — 1982. — Vol. 31. — P. 2249—2252.

Поступила 21.12.87

HIGHLY ACTIVE ANALOGUES OF OPIATE-LIKE PEPTIDES HISTORPHINE AND CAPPORPHINE

E. P. Kharchenko, V. N. Kalikhevich, T. V. Sokolova, K. I. Shestak, Z. A. Adremasova

Institute of Evolutional Physiology and Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, State University, Leningrad

Analgetic activity of analogues of new opioid peptides historphine Tyr-Gly-Phe-Gly-Gly and capporphine Tyr-Ser-Phe-Gly-Gly was studied. Analogues of historphine Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Gly and of capporphine Tyr-D-Ser-Phe-Gly-Gly exceeded 10^3 -fold the Leu-enkephaline efficiency using a tail-jerk test and their derivatives containing amide group in the C-end position — 10^4 -fold. All the four analogues increased the resistance period in the heat plate test. Naloxone removed or decreased the effect of these peptides studied. After repeated administration peptides Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Gly-NH₂ and Tyr-D-Ser-Phe-Gly-NH₂ were similar in the activity to the most strong native opioid peptide desmorphine. Considering that analogues of historphine and capporphine exhibited high analgetic activity, they may be used as promising structures in more complicated modifications in order to produce highly effective analogues of opioid peptides.

УДК 616.13-004.6-085.38.015.2:615.246.2]-036.8-07:[616.153.1.577.152.231-074

Е. С. Фортинская, Т. И. Торховская, Е. С. Наливайко, Ж. И. Ключникова, Э. М. Халилов

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ТРЕХКРАТНОЙ ГЕМОСОРБЦИИ НА АКТИВНОСТЬ ЛЕЦИТИНХОЛЕСТЕРИНАЦИЛТРАНСФЕРАЗЫ

НИИ физико-химической медицины, Москва

Методика

В настоящее время гемосорбционная терапия успешно применяется в комплексе лечения больных атеросклерозом различной локализации [2, 6, 7, 9]. Нормализация липидного обмена, наблюдаемая после проведения гемосорбции (ГС), считается одним из главных моментов положительного клинического эффекта последней. В то же время действие ГС на ферменты, участвующие в липидном обмене, изучено недостаточно. Один из этих ферментов — лецитинхолестеринацилтрансфераза (ЛХАТ; КФ 2.3.1.43) катализирует вне клеток перенос ненасыщенной жирной кислоты с лецитина на холестерин (ХС), в результате чего образуются эфир ХС и лизолецитин. Сведения о состоянии этого фермента важны, так как в силу своих физиологических функций он замедляет процесс атеросклеротических изменений в организме [3, 18].

Цель данной работы — исследовать активность ЛХАТ в крови больных атеросклерозом и ее изменение при проведении курса гемосорбционной терапии с использованием неселективных углеродных сорбентов.

Активность ЛХАТ исследовали у 26 больных атеросклерозом различной локализации (сосуды сердца, сосуды головного мозга и сосуды нижних конечностей) в возрасте от 35 до 63 лет (в среднем 52 ± 2 года). Преобладали больные со II-A и II-B типами гиперлипидемии (ГЛ). Средние уровни ХС (300 ± 28 мг/дл), триглицеридов — ТГ (221 ± 16 мг/дл), ХС липопротеинов высокой плотности — ЛПВП ($39,8 \pm 3,9$ мг/дл) позволили оценить состояние этих больных как высокую степень риска развития атеросклероза [15].

Гемосорбционную терапию проводили венозным путем неселективными углеродными гемосорбентами марки СКН-4М и СКН-1К в объеме, соответствующем количеству циркулирующей крови (5—6 л). Программное лечение больных атеросклерозом состояло в проведении 2 сеансов ГС в год, каждый из которых включал 3 процедуры ГС, проводимых с интервалом 7 дней. Данный курс гемосорбционной терапии благоприятен по клиническим показаниям: он уменьшает количество приступов стенокардии, повышает толерантность к физической нагрузке (по данным велоэргометрии) и т. д.

Кровь для исследования брали из локтевой вены перед началом и по окончании процедуры. У части больных определяли активность ЛХАТ через 7—10 дней после последней (3-й) ГС. В связи с тем что под наблюдением находились больные с глубокими нарушениями липидного обмена, мы выбрали метод определения активности ЛХАТ, описанный в работе [13]. Этот метод полностью исключает влияние собственных липопротеинов (ЛП) плазмы, уда-

Изменение активности ЛХАТ в результате трех ГС

ГС	I группа		II группа		Достоверность различий между I и II группами
	число больных	активность ЛХАТ, нмоль/(мл·ч)	число больных	активность ЛХАТ, нмоль/(мл·ч)	
1-я	10	$76,8 \pm 4,05$ $48,6 \pm 4,8$ $p < 0,002$	6	$49,1 \pm 9,2$ $71,5 \pm 12,4$ $p > 0,1$	$t = 2,7$ $p < 0,01$ $t = 1,7$ $p > 0,1$
2-я	7	$69,3 \pm 5,3$ $48,6 \pm 6,0$ $p < 0,05$	5	$34,3 \pm 9,8$ $54,3 \pm 9,8$ $p > 0,1$	$t = 3,1$ $p < 0,01$ $t = 0,5$ $p > 0,1$
3-я	8	$74,5 \pm 6,3$ $63,5 \pm 6,3$ $p > 0,1$	5	$38,8 \pm 7,8$ $47,9 \pm 6,6$ $p > 0,1$	$t = 3,6$ $p < 0,01$ $t = 1,7$ $p > 0,1$

Примечание. Цифра над чертой — до ГС, под чертой — после ГС.

ляемых осаждением, полноту которого контролировали путем определения количества ХС; в плазме остался фермент и его активатор — апопротсин А-1. В реагирующую смесь вносили экзогенный постоянный субстрат в виде липосом, состоящих из лецитина, ХС и дицетилфосфата в молярном соотношении 7 : 2 : 1. Определение активности ЛХАТ в нашей модификации проводили, как указано ранее [10]. Активность выражали в наномолях свободного ХС, убывающего за 1 ч в 1 мл делинидированной сыворотки.

У 10 здоровых лиц активность ЛХАТ в среднем равнялась $117 \pm 5,2$ нмоль/(мл·ч), что соответствует данным других авторов [4, 13, 19].

Результаты и обсуждение

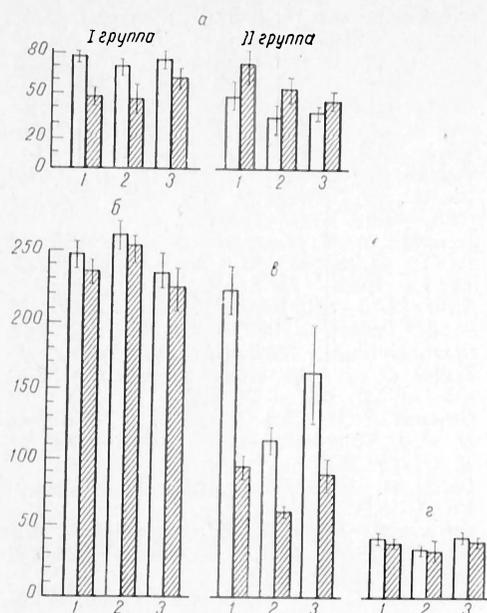
У всех больных независимо от возраста, пола и локализации атеросклеротического процесса активность ЛХАТ была снижена по сравнению с нормой ($p < 0,01$) и составляла в среднем $68,0 \pm 4,7$ нмоль/(мл·ч) до начала лечения. Подобное снижение активности (молярной скорости этерификации) при атеросклерозе наблюдали ранее [3, 8]. Известны данные о достоверной обратной корреляции между степенью выраженности коронарного атеросклероза и активностью ЛХАТ. В то же время имеются сведения о повышении как фракционной, так и молярной активности фермента при атеросклерозе и ГЛ [12, 19]. Отчасти такие противоречия объясняются иным методическим подходом к исследованию ЛХАТ, ког-

да в реакцию этерификации ХС вступают разные субстраты, ингибиторы и активаторы.

По направленности изменений активности ЛХАТ в результате ГС мы различаем две группы больных (см. таблицу). В I группе (61 % наблюдений) активность ЛХАТ достоверно снижалась в результате 1-й и 2-й ГС и почти не изменялась после 3-й. При этом к началу каждой последующей сорбции активность нарастала, а по окончании лечения возвращалась к исходным цифрам ($p > 0,1$). В 39 % наблюдений, составивших II группу, активность ЛХАТ имела тенденцию к повышению в результате проведенной ГС и снижалась к началу каждой последующей. Следует отметить, что в двух группах больных исходная активность перед каждой ГС значительно различалась, а после этой процедуры разница становилась недостоверной (см. таблицу). Под воздействием ГС активность ЛХАТ выравнивалась: повышение исходно низких цифр (II группа) и снижение более высоких (I группа). В послесорбционный период активность ЛХАТ возвращалась к исходному уровню — возрастала в I группе и снижалась во II. Определенная направленность влияния последующих ГС на активность ЛХАТ повторялась. Данная закономерность свидетельствует о том, что различия во влиянии ГС на активность фермента у больных двух групп не являются случайными, а определяются особенностями ЛХАТ-системы. По всей вероятности, последующие изменения зависят от исходной величины активности ЛХАТ: $76,8 \pm 4,05$ нмоль/(мл·ч) в I группе и $49,1 \pm 9,2$ нмоль/(мл·ч) — во II.

В небольшой группе больных (6 человек) активность ЛХАТ определяли через 7—10 дней после 3-й ГС. Обнаружено незначительное нарастание активности: с $56,7$ до $65,5$ нмоль/(мл·ч) ($p > 0,1$).

Наряду с исследованием активности ЛХАТ проводили анализ изменения таких параметров липидного обмена, как общий ХС, ХС ЛПВП, ТГ, имевшего место в результате 3 сорбций (см. рисунок). Концентрация ХС снижалась после каждой ГС на 4—5 %. Концентрация ТГ снижалась значительно ($p < 0,001$, $p <$



Изменение показателей липидного обмена.
 а — активность ЛХАТ [μ моль/(мл·ч)]; б—г — содержание (в мг/дл) соответственно XС, ТГ и XС ЛПВП до ГС (светлые столбики) и после ГС (заштрихованные столбики). 1, 2, 3 — соответственно 1, 2 и 3-я ГС. Представлены данные в виде $M \pm m$.

$<0,001$ и $p < 0,01$ в результате 3 последовательных процедур). Следует отметить, что, несмотря на некоторое снижение в середине процесса, содержание XС ЛПВП практически не изменялось, а известно, что в динамике после сорбции его количество нарастает [11].

Результаты наблюдений, описанные выше, получены по средним цифрам, обработанным по методу Стьюдента. Для выяснения взаимозависимости изменения активности ЛХАТ и количества липидов (XС, ТГ, XС ЛПВП) в процессе 3 ГС было проведено исследование ранговой корреляции между этими показателями по формуле Спирмена [1, 5].

Если при сравнении активности ЛХАТ с количеством общего XС до ГС зависимости не обнаружено, то после нее коэффициент корреляции этих величин был равен $-0,71$ ($p < 0,05$). Действительно, было найдено, что в случае положительного терапевтического эффекта ГС значительно снижению общего XС соответствовал подъем активности ЛХАТ. Кроме того, известно, что активность ЛХАТ отрицательно коррелирует с уровнем XС при низком содержании в крови липопротеинов

низкой и очень низкой плотности (соответственно ЛПНП и ЛПОНП), а количество этих фракций значительно снижается после трехкратной сорбции [6, 17].

Отрицательная корреляционная зависимость между количеством ТГ и активностью ЛХАТ после однократной ГС описана в предыдущей работе [10]. Подобная тенденция наблюдается и в случае трехкратной сорбции, однако корреляционной зависимости тут не найдено. По-видимому, следует рассматривать отдельно положительное воздействие самого механизма ГС на обмен липидов и снижение количества ТГ под воздействием вводимого больным гепарина, дополнительно активирующего внепеченочную липопротеинлипазу.

Несмотря на то что активность ЛХАТ определялась в нашей работе с использованием экзогенного субстрата при полном отсутствии в реакционной среде собственных ЛП больного, наблюдалась положительная корреляция как до, так и после сорбции (соответственно $r = 0,52 \pm 0,13$, $p < 0,01$ и $r = 0,61 \pm 0,11$, $p < 0,001$), между активностью ЛХАТ и количеством XС ЛПВП, являющегося ее субстратом *in vivo*. Данные различных авторов о взаимозависимости этих величин разнозначны. Описывали [12, 17, 19] обратную корреляцию между этими компонентами липидного обмена. Найдена слабая отрицательная корреляция активности фермента с XС всей фракции ЛПВП [17]. Находят положительную корреляцию между активностью ЛХАТ и XС ЛПВП [3, 8]. Известно, что подфракция ЛПВП₃ служит субстратом для ЛХАТ, тогда как ЛПВП₂ переносит образовавшиеся эфиры XС в печень и является ингибитором фермента [3, 17]. По-видимому, в условиях ГС при гиперхолестеринемии высокая положительная корреляция имеет место между активностью ЛХАТ и XС ЛПВП₃. Низкое количество частиц ЛПВП₂ затрудняет перенос эфиров XС в печень, и возможна нежелательная интенсификация их передвижения к ЛПНП и ЛПОНП с помощью белка — переносчика эфиров XС, количество которого повышается при гиперхолестеринемии [14]. В таких условиях значительное повышение

активности ЛХАТ могло бы привести к перегрузке эфирами ХС ЛПНП и поступлению избыточного количества ХС в сосудистую стенку. Возникает предположение, что ГС инициирует процесс саморегуляции системы ЛХАТ — ЛПВП и в результате активность фермента остается на среднем уровне (см. таблицу). Это явление имеет охранительное, адаптационное значение.

Таким образом, в процессе трех ГС активность ЛХАТ изменяется рационально. Это определяется особенностями ЛХАТ-системы и исходным ее состоянием у больных. По окончании курса трехкратной гемосорбционной терапии активность фермента возвращается к первоначальному уровню с некоторой тенденцией к повышению. Нормальное функционирование этого антиатерогенного фермента является еще одним положительным фактором в оценке ГС. Более того, возникает вопрос о существовании механизмов, способствующих стабилизации обмена липидов в условиях трехкратной ГС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бейли Н. Статистические методы в биологии. Пер. с англ. — М., 1963.
2. Благосклонов А. С., Иаливайко Е. С., Быков Г. А. и др. // Кардиология. — 1986. — № 10. — С. 28—31.
3. Герасимова Е. Н., Перова Н. В. // Вопр. мед. химии. — 1985. — № 1. — С. 32—40.
4. Добиашева М. // Липиды биологических мембран. — Ташкент, 1982. — С. 24—29.
5. Кудрин А. Н., Пономарева Г. Т. Применение математики в экспериментальной и клинической медицине. — М., 1967.
6. Лопухин Ю. М., Белоусов Ю. Б., Кузнецов В. Н. и др. // Кардиология. — 1986. — № 10. — С. 12—18.
7. Маркин С. С., Белоусов Ю. Б., Андрианова И. П. и др. // Всесоюзный съезд кар-

диологов, 4-й: Тезисы докладов. — М., 1986. — С. 210—211.

8. Озерова И. И., Герасимова Е. Н. // Вопр. мед. химии. — 1984. — № 5. — С. 118—125.
9. Федин А. И., Жбанкова О. В., Благосклонов А. С., Тетерина Е. Б. // Кардиология. — 1986. — № 10. — С. 28—31.
10. Фортинская Е. С., Торховская Т. И., Халилов Э. М., Сухова Н. В. // Лаб. дело. — 1986. — № 7. — С. 423—426.
11. Халилов Э. М., Торховская Т. И., Иванов А. С., Лопухин Ю. М. // Казан. мед. журн. — 1983. — № 2. — С. 92—97.
12. Albers J. J., Adolphson J. L., Chen C. // J. clin. Invest. — 1981. — Vol. 67. — P. 141.
13. Bartholome M., Niedmann D., Wieland H., Seidel D. // Biochim. biophys. Acta. — 1981. — Vol. 664. — P. 327.
14. Groener J. M., Van Rosen A. J., Erkelens D. W. // Atherosclerosis. — 1984. — Vol. 50, № 3. — P. 261.
15. Lacko A. G. // Clin. Biochem. — 1976. — Vol. 9. — P. 212.
16. Jeffery M., Hoeg M. D., Gregg R. E., Brewer H. H. // J. A. M. A. — 1986. — Vol. 255, № 4. — P. 512.
17. Pinon J. C. // J. Lipid Res. — 1980. — Vol. 21, № 4. — P. 406.
18. Soloff L. A. // Amer. Heart J. — 1973. — Vol. 85, № 2. — P. 153.
19. Wallentin L. // Atherosclerosis. — 1977. — Vol. 26. — P. 233.

Поступила 22.12.87

EFFECT OF THREE-FOLD HEMOSORPTION ON ACTIVITY OF LECITHINE-CHOLESTEROL ACYLTRANSFERASE

E. S. Fortinskaya, T. I. Torkhovskaya, E. S. Nalivayko, Zh. I. Klyuchnikova, E. M. Khalilov
Institute of Physico-Chemical Medicine, Moscow

Activity of lecithine-cholesterol acyltransferase (LCAT) was studied in blood of 26 patients with atherosclerosis of various localization after course of treatment involving three-fold hemisorption. The initial activity of the enzyme, decreased distinctly as compared with normal state, was dissimilarly altered during hemisorption. The system LCAT-HDL was stabilized after the third hemisorption. These results relevant to programming hemisorption therapy of patients with atherosclerosis.

УДК 616.132-008.929.22-02:577.175.859]-07

Ли Хава Рен, А. В. Васильев, А. Н. Орехов, В. А. Тутельян

ВЛИЯНИЕ ЭЙКОЗАПЕНТАЕНОВОЙ КИСЛОТЫ И ПРОСТАГЛАНДИНОВ РАЗЛИЧНОГО РЯДА НА АККУМУЛЯЦИЮ ХОЛЕСТЕРИНА И ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК ИНТИМЫ АОРТЫ ЧЕЛОВЕКА

Институт питания АМН СССР, Москва

Имеются многочисленные свидетельства о гипохолестеринемическом, антиатеросклеротическом действии эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК),

что связывают с конкурентным по отношению к арахидоновой кислоте (АК) участием ЭПК в синтезе фосфолипидов и регуляции синтеза проста-

Содержание ЭПК, АК и ОЖК в сыворотке крови здоровых доноров, принимавших препарат ЭПК

Условие опыта	ЭПК, %	АК, %	ЭПК/АК	ОЖК, мкг/мл
До приема ЭПК	2,03±0,84	5,60±0,98	0,36±0,08	2593±541
После приема ЭПК	6,83±1,54*	6,13±1,05	1,11±0,35*	2703±385

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3: средние ($M \pm m$) данные из 6—8 опытов; звездочка — $p < 0,05$.

гландинов [8]. Так, длительное потребление препаратов ЭПК приводило к увеличению содержания PGI_3 в аорте крыс в 3 раза [3]. В свою очередь имеются данные, что ЭПК подавляла поглощение АК и ее превращение до PGI_2 (простациклина) в культуре эндотелиальных клеток аорты быка. Однако переход ЭПК в эйкозаноиды при этом не выявлен [10]. Таким образом, помимо баланса между содержанием ЭПК и АК в составе жирных кислот сыворотки крови, необходимо учитывать и возможные сочетанные перекрестные эффекты предшественников (ЭПК и АК) простагландинов различных серий (PGI_3 , TXA_3 и PGI_2 , TXA_2) в процессе атерогенеза.

Задачей настоящей работы явилось исследование влияния различных эйкозаноидов в сочетании с сывороткой здоровых лиц и больных ИБС на процесс накопления холестерина в субэндотелиальных клетках интимы аорты человека в культуре с целью разработки подходов для оценки эффективности комплексной терапии атеросклероза.

Методика

Практически здоровые лица и больные ИБС в течение 3 дней получали ежедневно по 15 г препарата ЭПК. На 4-й день через 4 ч после приема ЭПК из локтевой вены брали кровь и получали сыворотку. До взятия крови больные пищу не получали. Контролем служила сыворотка, полученная непосредственно до начала приема ЭПК. Полученные сыворотки сохраняли до использования при -20°C . Общее содержание жирных кислот (ОЖК) в сыворотке и содержание в них ЭПК и АК определяли по методу [14].

Препарат ЭПК получали из жира горбуши по методу [2, 13], в состав которого по данным ГЖХ входило 35—45 % ЭПК и 30—40 % докозгексаеновой кислоты (22:6 ω 3).

В работе использовали аорты мужчин, взятые аспитически спустя 1—3 ч после внезапной смерти. Непораженные или атеросклеротически измененные участки интимы аорты чело-

века подвергали ферментативному диспергированию 0,15 % коллагеназой тип IV («Sigma», США) в течение 3—4 ч [9—10]. Выделенные клетки сажали в культуру плотностью $2 \cdot 10^4$ клеток/см² (эффективность посадки 50—60 %). Клетки культивировали в среде 199, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2,5 мкг/мл фунгизона, 2 мМ L-глутамин при 37°C в атмосфере CO_2 — воздух (5:95), насыщенной водой. На 7-й день культивирования к культуре клеток добавляли среду 199 с 20 % сыворотки крови здоровых доноров или больных ИБС, полученной до и после приема препарата ЭПК. Одновременно добавляли [³H]-тимидин (1 мкКи/мл) и стабильные аналоги PGI_2 и TXA_2 — соответственно карбацикли и U46619 в концентрации 150, 300 или 600 нг/мл или PGI_2 в концентрации 2,5, 5 или 10 мкг/мл («Urhjohnn Cox», США). Спустя 24 ч клетки 5 раз промывали изотоническим фосфатным буфером (PBS), после чего экстрагировали клеточные липиды смесью гексан:изопропанол (3:2, объем/объем) по методу [4]. В полученном экстракте определяли содержание холестерина с помощью набора «Boehringer Mannheim», ФРГ, а в делинидированном материале — содержание белка [5] и степень включения [³H]-тимидина [12].

Результаты и обсуждение

Как видно из табл. 1, прием здоровыми донорами в течение 4 дней препарата ЭПК приводил к увеличению содержания ЭПК в составе ОЖК сыворотки в 3,4 раза. При этом содержание АК в составе ОЖК не менялось и концентрация ОЖК в сыворотке сохранялась на исходном уровне. В этих условиях соотношение ЭПК/АК возрастало в 3,1 раза, что позволяет с достаточной уверенностью констатировать увеличение содержания в сыворотке концентрации ЭПК в результате приема полученного препарата.

В дальнейшем исследовали влияние сыворотки с повышенным содержанием ЭПК на культуру клеток интимы аорты человека в сочетании с различными эйкозаноидами. Введение в культуру сыворотки как здоровых

Таблица 2

Влияние эйкозаноидов и сыворотки крови больных ИБС, принимавших препарат ЭПК, на содержание холестерина и пролиферацию непораженных интимальных клеток аорты человека

Условие опыта	Содержание холестерина, мкг на 1 мг белка	Включение [³ H]-тимидина, имп/мкг белка
Делипидированная сыворотка	61±7	50±6
Сыворотка А (контроль)	198±20	135±10
Сыворотка Б	151±13	105±12
U46619 (300 нг/мл) + сыворотка А	489±55*	206±20*
U46619 (300 нг/мл) + сыворотка Б	209±41	140±18
Карбациклин (300 нг/мл) + сыворотка А	166±15	120±18
Карбациклин (300 нг/мл) + сыворотка Б	105±20*	101±10*
PGI ₂ (5 мкг/мл) + сыворотка А	170±21	98±15
PGI ₂ (5 мкг/мл) + сыворотка Б	120±18	111±9

Примечание. Здесь и в табл. 3: сыворотка А — до приема препарата ЭПК; сыворотка Б — после приема препарата ЭПК.

доноров, так и больных ИБС, принимавших препарат ЭПК, не вызывало достоверных изменений ни в содержании внутриклеточного холестерина, ни в интенсивности клеточной пролиферации (табл. 2, 3). Вместе с тем введение аналога ТХА₂ — U46619 в сочетании с контрольной сывороткой больных ИБС приводило к резкому накоплению холестерина в нормальных клетках интимы и степени включения в них [³H]-тимидина (в 2,5 и 1,5 раза соответственно). Напротив, введение U46619 в сочетании с сывороткой, полученной от больных после приема препарата ЭПК, в значительной степени ограничивало атерогенный эффект данного эйкозаноида. В свою очередь если карбациклин и PGI₂ в сочетании с контрольной сывороткой практически не оказывали влияния на уровень холестерина и интенсивность включения [³H]-тимидина в клетки интимы, то их введение в культуру совместно с сывороткой с повышенным содержанием ЭПК вызывало некоторое снижение этих показателей (см. табл. 2).

Таблица 3

Влияние эйкозаноидов и сыворотки крови здоровых доноров, принимавших препарат ЭПК, на содержание холестерина и пролиферацию атеросклеротических интимальных клеток аорты человека

Условие опыта	Содержание холестерина, мкг/мг белка	Включение [³ H]-тимидина, имп/мкг белка
Сыворотка А (контроль)	393±51	158±10
Сыворотка Б	301±25	120±13
U46619 (300 нг/мл) + сыворотка А	738±60*	211±18*
U46619 (300 нг/мл) + сыворотка Б	610±75	185±21
Карбациклин (300 нг/мл) + сыворотка А	311±30	150±18
Карбациклин (300 нг/мл) + сыворотка Б	210±50*	101±15*
PGI ₂ (5 мкг/мл) + сыворотка А	320±41	150±18
PGI ₂ (5 мкг/мл) + сыворотка Б	225±35*	103±18*

Исследование влияния эйкозаноидов в сочетании с сывороткой здоровых доноров, принимавших препарат ЭПК, на накопление внутриклеточного холестерина в атеросклеротически пораженных клетках интимы аорты позволило выявить изменения, в целом сходные с результатами, полученными на нормальных клетках (см. табл. 3). Однако в этом случае антиатерогенное действие ЭПК нивелировалось аналогом ТХА₂ в значительно большей степени, тогда как при совместном введении в культуру атеросклеротических клеток сыворотки с высоким содержанием ЭПК и карбациклина и PGI₂ также обнаружено достоверное снижение содержания в них холестерина на 32 и 30 % соответственно с одновременным уменьшением пролиферативной активности в среднем на 33 %.

Учитывая имеющиеся сведения об атерогенном действии U46619 и антиатеросклеротической активности карбациклина [1], а также данные о снижении синтеза PGI₂ и PGI₃ в аорте кролика при экспериментальном атеросклерозе [6], есть основания не только рассматривать ЭПК как предшественник PGI₃, но и связывать ее антиатерогенное действие с регуляцией баланса между простагландинами группы А и I.

ЛИТЕРАТУРА

1. Габриелян Э. С., Акопов С. Э., Паносян А. Г. и др. // Бюл. exper. биол. — 1988. — № 1. — С. 35—37.
2. Abu-Nasr A. M., Polls W. M., Holman P. T. // J. Amer. Oil chem. Soc. — 1954. — Vol. 31. — P. 16—20.
3. Hamazaki T., Hirai A., Terano T. et al. // Prostaglandins. — 1982. — Vol. 23. — P. 557.
4. Hara A., Randin N. S. // Analyt. Biochem. — 1978. — Vol. 90. — P. 420—426.
5. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
6. Muroda M. // J. Jap. Oil chem. Soc. — 1981. — Vol. 30. — P. 717.
7. Nakamura G. // J. Jap. N. Med. — 1981. — Vol. 36. — P. 834.
8. Nickolson R. C., Town M. H., Vorbrüggen H. // Med. Res. Rev. — 1985. — Vol. 5. — P. 1—53.
9. Orekhov A. N., Kosykh V. A., Repin V. S., Smirnov V. N. // Lab. Invest. — 1983. — Vol. 48. — P. 395—398.
10. Orekhov A. N., Tertov V. V., Kudryashov S. A. et al. // Atherosclerosis. — 1986. — Vol. 60. — P. 101—110.
11. Phillipso B. E., Rothrock D. W., Connor W. E. et al. // New Engl. J. Med. — 1985. — Vol. 312. — P. 1210—1216.
12. Tertov V. V., Orekhov A. N., Repin V. S., Smirnov V. N. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1982. — Vol. 109. — P. 1228—1233.
13. Teshima S., Kanazawa A., Tokiwa S. // Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. — 1978. — Vol. 44. — P. 927.
14. Vorbeck M. L., Nattick L. R., Lee F. A., Pederson C. S. // Analyt. Chem. — 1969. — Vol. 33. — P. 1512.
15. Wills A. L. // Nutr. Rev. — 1981. — Vol. 39. — P. 289—301.

Поступила 21.05.88

EFFECT OF EICOSAPENTAENIC ACID AND VARIOUS PROSTAGLANDINS ON CHOLESTEROL ACCUMULATION AND PROLIFERATION OF HUMAN AORTA INTIMA

Li Khva Ren, A. V. Vasil'ev, A. N. Orekhov, V. A. Tutel'yan

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

Consumption of 15 g of 40 % eicosapentaenic acid within 3 days resulted in 3-fold increase of its content in blood serum of healthy persons and of patients with heart ischemic disease, whereas concentration of arachidonic acid was unaltered. Administration of blood serum containing increased content of eicosapentaenic acid into cell culture of human aorta intima caused a decrease in accumulation of the intracellular cholesterol and in ³H-thymidine incorporation. Simultaneous addition of the blood serum containing eicosapentaenic acid and the structure derivative of A₂ thromboxane V 46619 into the aorta intima cell culture led to a distinct decrease in the atherosclerotic effect of the latter drug. Combination of the blood serum with carbocycline or with prostaglandin I₂ resulted in the most pronounced lowering of intracellular cholesterol content and of the cell proliferating activity. The antiatherosclerotic effect of eicosapentaenic acid appears to relate not only to the fact that the drug is precursor of prostaglandine I₂ and I₃ but also to the regulating effect on a balance of various prostaglandins.

УДК 616.9-07:616.153.915-074:543.544:681.31

А. С. Миримский, О. Г. Милова, И. М. Рослый, Ю. Я. Венгеров,
Т. Н. Ермак, Л. Г. Коюденко, Л. В. Дегтярева, Б. М. Сидakov,
Л. Ф. Линберг

КОМПЬЮТЕРНАЯ ДИАГНОСТИКА НЕКОТОРЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ ПО ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОМУ ПРОФИЛЮ ЛИПИДОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ

ЦНИИ эпидемиологии Минздрава СССР, Москва

Создание методов анализа метаболических профилей началось с работ Williams [12] и Horning [7]. К настоящему времени в этой области накоплен значительный объем информации [6]. В последние годы наблюдается переход от экспериментальных работ к созданию коммерческих методов, которые находят применение в медико-биологических исследованиях, медицинской практике и некоторых

других сферах. Научные прогнозы оптимистично оценивают дальнейшее развитие исследований в этой области [6, 8]. Таким образом, метаболический профильный анализ является сформировавшимся в последние годы новым химико-аналитическим подходом, который может быть определен как мультикомпонентный анализ, характеризующий группы метаболически или аналитически связанных компо-

нентов. При этом важными критериями являются не только абсолютные количества отдельных веществ, но и их соотношения. Существует большое разнообразие в подходах к формированию метаболического профиля на основе использования различной аналитической техники для исследования отдельных физиологических жидкостей [кровь, моча, ликвор и др.] и разных классов биологически активных соединений.

Ранее нами была предпринята попытка создания профильного метода на основе газохроматографического анализа липидной фракции сыворотки крови [3]. Настоящая работа посвящена изучению возможностей компьютерной диагностики некоторых инфекционных болезней с помощью данного метаболического профиля.

Методика

Метаболические профили липидов сыворотки крови в виде гексафторизопропиловых, пentaфторацилильных производных анализировали с помощью газового хроматографа TRACOR 560, оснащенного электронно-захватным детектором и интегратором «Chromatorac S-R1B», на гибкой кварцевой капиллярной колонке с привитой фазой «Bonded FSOT-1» («Alltech») по методу, описанному ранее [3].

Обработку профилей проводили на ЭВМ «Nova-3/12» («Dada General»). В качестве исходной была использована компьютерная система «INCOS-2000 Disk Operating System Finnigan Corporation», известная как IDOS с программным обеспечением MSDS.

Для изучения таких сложных многопараметрических систем, какими являются метаболические профили, содержащие десятки пиков, в настоящее время используют различные математические программы сравнения [2, 5, 6, 10]. Нами была использована аналогичная программа, применяемая в масс-спектрометрии для проведения библиотечного поиска неизвестных веществ. Для удобства машинного сравнения и сохранения естественных пропорций профиля при введении данных каждому пику присваивали номер по шкале масс, соответствующий времени удерживания, умноженному на 10. Таким образом, хроматограмма формально представляется в виде масс-спектра, на котором абсцисса каждого пика характеризует его время удерживания, умноженное на 10, а ордината — относительную концентрацию компонента в пробе. В таком виде профили подвергались компьютерной обработке.

Исходный материал для изучения — кровь здоровых (37) и больных с различными инфекционными заболеваниями — вирусным гепатитом А и В (16), гнойным менингитом различной этиологии (19), острой дизентерией (30), с гастроинтестинальной формой сальмонеллеза (9). Кровь брали в динамике заболевания — в остром периоде, периоде стихания клинических проявлений и реконвалесценции. При создании библиотеки для изучения возможностей

компьютерной диагностики в нее включали по 1 профилю липидов от каждого пациента, соответствующего по срокам острому периоду болезни.

Результаты и обсуждение

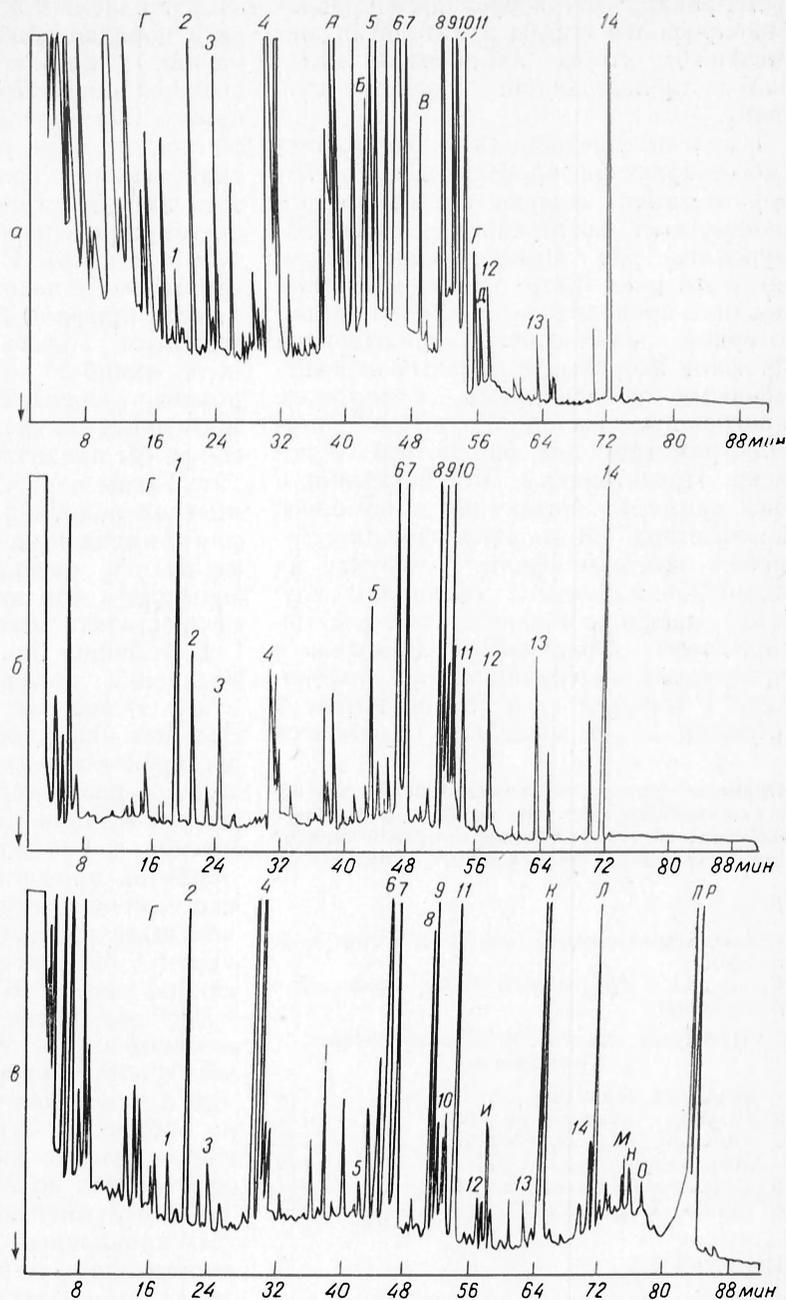
Газохроматографический профиль липидов сыворотки крови содержит набор из нескольких десятков пиков, состав которого может варьировать в зависимости от индивидуальных особенностей метаболизма и исследуемой нозологической формы.

На рисунке представлены три типичных газохроматографических профиля липидов сыворотки крови больного вирусным гепатитом (в), гнойным менингитом (а) и профиль здорового человека (б). Для удобства визуального сравнения ряд максимальных пиков пронумерован от 1 до 14. Эти пики присутствуют во всех трех профилях, отличаясь друг от друга по концентрации. На профиле а больного гнойным менингитом буквами А—D отмечены пики, специфичные для этой нозологической формы, а на профиле в — пики И — П, характерные для вирусного гепатита. За каждым регистрируемым компонентом закрепляется определенный индекс, соответствующий его времени удерживания, чтобы сохранить естественные пропорции профиля при вводе данных в машину. Всего при анализе 400 профилей липидов сыворотки крови здоровых и больных перечисленными заболеваниями было выделено и зарегистрировано 152 хроматографических пика. В каждой отдельной хроматограмме обычно присутствуют в регистрируемых количествах около 40—50 пиков из общего количества. Несмотря на очень высокую разрешающую способность метода капиллярной хроматографии, в данном профиле содержится много пиков, представляющих не индивидуальные вещества, а смеси различных, но близких по хроматографическим свойствам веществ и изомеров.

В основе профильного подхода лежит концепция специфичности метаболического профиля индивидуума [12], однако опыт свидетельствует, что почти все компоненты, из которых он состоит, вплоть до мельчайших, стабильно присутствуют на хроматограммах. Для изучения особенностей профиля липидов при различных патологических процессах необходимо

Газохроматографические
профили липидов сыво-
ротки крови.

а — профиль больного гной-
ным менингитом; *б* — здоро-
вого; *в* — больного вирус-
ным гепатитом.



изучить его характеристики в норме и иметь представление об их воспроизводимости во времени. Многие исследователи отмечают сложность данного вопроса [8, 9, 11]. На гомеостаз организма может оказывать воздействие большое число факторов внешней среды, что находит отражение и в метаболическом профиле. Такими факторами могут быть изменения в питании, прием лекарственных препаратов, сезонные особенности и др. Кроме того,

«норма», конечно, не может быть однородной [13]. При изучении метаболических профилей здоровых наблюдается наличие ряда компактных групп (кластеров) в зависимости от пола, возраста, генетических особенностей и пр. Несмотря на перечисленные факторы, все профили нормы, которыми мы располагали, представляли собой некое единство по сравнению с профилями исследованных заболеваний, и компьютер их уверенно диффе-

ренцировал. Для корректного сравнения профилей нормы и патологии желательнее, чтобы их носители изначально принадлежали к одному кластеру.

Имелись предпосылки биохимического характера: профиль, в состав которого входят жирные кислоты и стероиды, даст возможность дифференцировать ряд позологических форм, хотя это и не было очевидно. Исследование проводилось на основе компьютерной библиотеки, включающей профили здоровых и больных перечисленными заболеваниями, с помощью программы, используемой в масс-спектрометрии для библиотечного поиска. Представлены для наглядности два примера диагностики с помощью компьютера. В машину вводили запрос — найти профили, похожие на некий исследуемый (в данном случае — профиль больного гнойным менингитом). Сравнение проводили с профилями, содержащимися в библиотеке 1 (пример 1) и в библиотеке 2 (пример 2). В последней содержится

Примеры протоколов компьютерной диагностики гнойного менингита на базе сравнения с библиотекой метаболических профилей липидов при различных инфекционных заболеваниях

Пример 1.

Сравниваемый образец: менингит, Козик, и. б. № 4807.

Сравнение с библиотечной 1 (57 профилей в библиотеке).

Патология, пациент, № истории болезни, сходимость

1. Менингит, Мадалиев, № 4154,	784.
2. Менингит, Званцов, № 3226,	771.
3. Менингит, Талибов, № 3197,	705.
4. Менингит, Мохов, № 3241.	691.
5. Дизентерия, Рузин, № 19431,	687.
6. Норма, Корин, № 217,	684.

Пример 2

Сравниваемый образец: менингит, Козик, и. б. № 4807.

Сравнение с библиотечной 2 (111 профилей в библиотеке).

Патология, пациент № истории болезни, сходимость

1. Менингит, Кормилицина, № 3724,	785.
2. Менингит, Мадалиев, № 4154,	784.
3. Менингит, Званцов, № 3226,	771.
4. Менингит, Парамонов, № 4251.	738.
5. Менингит, Байрамунов, № 4050,	728.
6. Норма, Гришков, № 198,	711.

111 различных профилей. Выполняя команду, машина формирует список

запрашиваемых профилей, располагая их в порядке убывания сходства. Для каждого профиля указывается трехзначный параметр сходимости. Для самого образца он равен 1000 и уменьшается по мере уменьшения сходства сравниваемых профилей; таким образом, каждая строка в списке соответствует определенному рангу сходимости (с 1 по 6). Из примера 2 видно, что наиболее похожими на образец являются профили больных гнойным менингитом. Только в 6-й строке допущена «ошибка» — указан профиль здорового человека. Если бы болезнь данного пациента была неизвестна, то мы могли бы предположить у него менингит. Таким образом, в результате проведения подобной процедуры сравнения с имеющимися в библиотеке можно делать вывод о принадлежности профиля к той или иной группе, т. е. осуществлять диагностику по подобию.

В таблице приведены результаты сравнения профилей с целью диагностики. В ней для здоровых и 3 групп больных инфекционными заболеваниями представлены данные о результатах компьютерной диагностики в процентах от общего числа случаев. Например, в библиотеке содержится 19 образцов профилей от больных гнойными менингитами. Для каждого из них была проведена процедура сравнения с библиотекой аналогично описанной выше. В 14 из 19 случаев в 1-й строке списка был указан профиль менингита, т. е. по 1-му рангу сходимости достоверность (Д) компьютерной диагностики гнойных менингитов по библиотеке 2 равна 74 %. В следующем столбце указана достоверность диагностики по 2-му рангу сходимости (т. е. учитывались образцы, для которых правильный диагноз проходил по первым двум строкам списка сравнения); она составляет 47 %. Аналогично по 3-му рангу сходимости достоверность диагностики гнойных менингитов составила 42 %, по 4-му — 21 %, по 5-му — 21 % и по 6-му — 5 %. Таким образом, достоверность, т. е. свойство выборки отражать принадлежность к генеральной совокупности [4], как и следовало ожидать, снижается при увеличении ранга сходимости. Для сравнения в таблице представлены значения случайной вероятности (В) выпадения правильного диагноза по рангам сходимости, рассчитанные

Оценка достоверности и надежности компьютерной диагностики

Группа сравнения		Ранг сходимости						
		1	2	3	4	5	6	
Библиотека 1 (57)	Норма (20)	Д	80	70	55	55	45	40
		В	35	11	3,9	1,2	0,37	0,1
		β	0,56	0,84	0,93	0,98	0,991	0,998
	Вирусный гепатит (8)	Д	100	100	100	100	100	50
		В	14	1,7	0,2	0,02	0,001	0,00007
		β	0,86	0,98	0,998	0,9998	0,99999	0,999998
	Менингит (10)	Д	70	50	10	10	—	—
		В	17	2,8	0,4	0,05	0,006	0,0006
		β	0,76	0,94	0,96	0,995	—	—
	Кишечные инфекции (19)	Д	79	58	26	21	11	5
		В	33	11	3,3	1	0,2	0,07
		β	0,58	0,81	0,87	0,95	0,98	0,986
Библиотека 2 (111)	Норма (37)	Д	92	76	57	51	46	43
		В	33	11	3,5	1	0,3	0,1
		β	0,64	0,85	0,94	0,98	0,993	0,998
	Вирусный гепатит (16)	Д	100	100	100	100	100	100
		В	14	2	0,25	0,03	0,003	0,0003
		β	0,84	0,98	0,9975	0,9997	0,99997	0,999997
	Менингит (19)	Д	74	47	42	21	21	5
		В	17	2,8	0,4	0,06	0,009	0,001
		β	0,77	0,94	0,99	0,997	0,9994	0,9998
	Кишечные инфекции (39)	Д	85	74	72	56	51	49
		В	35	12	4,1	1,4	0,4	0,1
		β	0,59	0,84	0,94	0,975	0,992	0,998

Примечание. В скобках — число пациентов.

на основании теоремы о произведении вероятностей [1]. Например, случайная вероятность выпадения диагноза гнойного менингита для библиотеки 2 по 1-му рангу сходимости равна 17 %, по 2-му — 2,8 %, по 3-му — 0,4 %, по 4-му — 0,06 %, по 5-му — 0,009 %, по 6-му — 0,001 %, т. е. случайная вероятность стремительно уменьшается с увеличением сходимости. Надежность диагноза, или вероятность безошибочного прогноза — β [4], зависит от отношения достоверного диагноза и вероятности случайного выбора: $\beta = 1 - В/Д$, где отношение В/Д — вероятность ошибочного прогноза. Таким образом, надежность диагноза повышается с увеличением ранга сходимости. Для рассматриваемого случая диагностики менингита по библиотеке 2 надежность диагноза увеличивается от 0,77 (по 1-му рангу сходимости) до 0,9998 (по 6-му рангу). Уже для 3-го ранга надежность диагностики гнойных менингитов в 42 % случаев составляет 0,99 и удовлетворяет традиционному уровню требований, принятому в медико-биологических исследованиях. Надежность диагностики вирусных гепатитов (без различия серотипов) еще более высока: $\beta = 0,98$ (уже по 2-му

рангу сходимости), а по 6-му рангу в 100 % случаев равна 0,999997. Вообще диагностика вирусных гепатитов в данной системе является наиболее удачной. Ее достоверность наиболее высока и равна 100 %.

Очевидно, что надежность диагноза должна, в частности, зависеть от объема библиотеки. Чем больше образцов различных клинических вариантов на разных этапах развития данной нозологической формы содержит библиотека, тем больше шансов, что для исследуемого образца найдутся подобные. Действительно, в библиотеке 1 (57 больных) достоверность диагноза для здоровых лиц и для групп с гнойными менингитами и кишечными инфекциями по 1-му рангу составляла соответственно 80, 70 и 79 %. При работе с библиотекой 2 (111 больных), число профилей в которой было увеличено почти в 2 раза, достоверность для этих групп увеличилась соответственно до 92, 74 и 85 % по 1-му рангу и соответственно возросла по другим рангам. При увеличении библиотеки улучшается не только достоверность, но и надежность диагностики, что хорошо видно на рис. 2. При работе с меньшей библиотекой 1 ошибки были

допущены в 5-й и 6-й строках списка, а при работе с большей библиотекой 2 — только в последней строке.

Эффект 100 % диагностики вирусных гепатитов может объясняться существенным отличием концевой части профиля, включающей пики холевых кислот, и использованием масс-спектрометрической программы, которая придает высокомолекулярным соединениям, находящимся в конечной части спектра, гораздо больший удельный вес при сравнении, так что удача с диагностикой вирусных гепатитов по липидам сыворотки крови является в каком-то смысле закономерностью. Однако в случае кишечных инфекций трудно заранее быть уверенным, что используемый метод позволит успешно дифференцировать их по липидам сыворотки. Следует подчеркнуть, что, пользуясь лишь визуальным методом, такие результаты получить невозможно.

Характеризуя существо возникающих при компьютерной диагностике ошибок, можно отметить, что в случае сравнения, например, профиля больного гнойным менингитом с библиотекой, используемая программа может ошибочно включить в список сравнения профили здоровых или лиц с кишечными инфекциями, но никогда с вирусными гепатитами. А при сравнении профилей больных с кишечными инфекциями (почему они и выделены в отдельную группу) машина может спутать дизентерию с сальмонеллезом или пищевой токсикоинфекцией, но, как правило, не с нормой или другими инфекционными заболеваниями. Это объясняется тем, что при небольшом количестве профилей машина может их не узнать из-за принадлежности к различным кластерам. По мере накопления материала в библиотеке число подобных, относящихся к общим кластерам профилей возрастает, и, следовательно, возрастает точность диагностики. Библиотека для ее качественного использования должна содержать несколько сотен или даже тысяч профилей. Значительно улучшит работу системы автоматизация всех стадий процесса, а также использование специализированных математических программ. Однако уже на данном этапе исследований можно считать установленным, что профили липидов сыво-

ротки крови больных инфекционными заболеваниями несут специфическую информацию, позволяющую использовать их для решения диагностических задач.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Вентцель Е. С.* Теория вероятностей. — М., 1964.
2. *Гублер Е. В.* Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. — Л., 1978.
3. *Линберг Л. Ф., Миримский А. С., Милова О. Г.* и др. // *Вопр. мед. химии.* — 1988. — № 4. — С. 86—90.
4. *Плохинский Н. А.* Алгоритмы биометрии. — М., 1980.
5. *Dunn W. J. III, Woid S., Marlin Y. C.* // *J. med. Chem.* — 1978. — Vol. 21, N 9. — P. 922—930.
6. *Holland J. F., Leary J. J.* // *J. Chromatogr.* — 1986. — Vol. 379. — P. 3—26.
7. *Horning E. C., Horning M. G.* // *J. chromatogr. Sci.* — 1971. — Vol. 9. — P. 129—140.
8. *Jellum E.* // *Trends analyt. Chem.* — 1981. — Vol. 1. — P. 12—16.
9. *Marcuson R., Burbeck S. L., Emond R. L.* et al. // *Clin. Chem.* — 1982. — Vol. 28. — P. 1346—1348.
10. *McConnell M. L., Rhodes G., Watson V., Novolny M.* // *J. Chromatogr.* — 1979. — Vol. 162. — P. 495—506.
11. *Spiteller G.* // *Pure appl. Chem.* — 1978. — Vol. 50. — P. 206—217.
12. *Williams R. J.* // *Biochemical Institute Studies in Individual Metabolic Patterns.* — Austin, 1951. — P. 7—22.
13. *Williams R. J.* *Biochemical Individuality: The Basis for the Genetotrophic Concept.* — New York, 1956.

Поступила 25.01.88

DIAGNOSIS OF SOME INFECTIOUS DISEASES USING COMPUTER BASED ANALYSIS OF GAS CHROMATOGRAPHIC PROFILES OF BLOOD SERUM LIPIDS

A. S. Mirimsky, O. G. Milova, I. M. Rosly, T. N. Ermak, Yu. Ya. Vengerov, L. G. Koyudenko, I. V. Deglyareva, B. M. Sidakov, L. F. Linberg

Central Institute of Epidemiology, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

Potentialities of computer based diagnosis of some diseases were studied, where mathematical recognition programs involved gas chromatographic profiles of blood serum lipids. Evaluation of lipids was carried out under conditions of viral hepatitis, purulent meningitis and some intestinal infections. Validity and reliability of the computer based diagnosis of these nosologic forms of diseases was analyzed depending on parameters of similarity, amount of the profiles in the information bank etc. Profiles of the metabolizing lipids were shown to be of importance in diagnosis of some diseases.

А. В. Васильев, Т. А. Воробейчик, К. Д. Плещитый, В. А. Тутельян

АКТИВНОСТЬ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ПРОТЕИНАЗ В ПЕЧЕНИ, СЕЛЕЗЕНКЕ, ТИМУСЕ И ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГАХ МЫШЕЙ ПРИ ИММУНИЗАЦИИ ТИМУСЗАВИСИМЫМ И ТИМУСНЕЗАВИСИМЫМ АНТИГЕНАМИ

Институт питания АМН СССР, Москва

Участие лизосомального аппарата клетки в процессе иммуногенеза в значительной степени реализуется за счет функционирования его ферментных систем [6, 7, 8, 13], причем наиболее значимой в этом отношении является, по-видимому, система лизосомальных протеиназ, что обусловлено белковой природой антигенного материала и антител. Вместе с тем роль индивидуальных лизосомальных протеиназ в зависимости от характера иммунного ответа до настоящего времени остается практически не изученной. В связи с этим целью работы явилось сравнительное исследование активности лизосомальных протеиназ в иммунокомпетентных органах при введении различных доз Т-зависимого (эритроциты барана — ЭБ) и Т-независимого (Vi-антиген) антигенного материала.

Методика

В работе использовали мышей СВАХС97В/6 массой 33—38 г. Животным соответствующих групп вводили внутривенно 0,5 мл 5% и 25% суспензию отмытых ЭБ или раствор Vi-антигена в 0,9% NaCl в концентрации 2 и 10 мкг/мл. Через 4 дня после антигенной стимуляции (АС) животных декапитировали, выделяли суспензию перитонеальных макрофагов и извлекали печень, селезенку и тимус. Определение содержания антителообразующих клеток (АОК) в селезенке проводили методом

Ерне [10]. При проведении биохимических исследований из полученного материала готовили гомогенаты по стандартной методике с использованием 0,25 М сахарозы, pH 7,4, содержащей 1 мМ ЭДТА [7], в которых определяли активность 6 лизосомальных протеиназ: катепсинов А, В, С, D, H и L, используя в качестве субстратов соответственно КБЗ-глу-L-тир; бензоил-арг-метокси-β-нафтиламид; гли-фен-β-нафтиламид; гемоглобин, L-арг-7-амидо-4-метилкумарин и N-КБЗ-фен-арг-7-амидо-4-метилкумарин («Sigma», США) с помощью спектрофлуориметрических и спектрофотометрических методов [1, 2, 11]; содержание белка определяли методом Лоури [12].

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований было отмечено, что иммунизация животных как ЭБ, так и Vi-антигеном вызывает генерацию АОК в селезенке, причем полученные значения уровня АОК в целом соответствовали данным, полученным ранее [3—5].

Анализ результатов энзимологического исследования свидетельствует, что независимо от характера АС и дозы антигена в печени (табл. 1) не было выявлено каких-либо значимых изменений в активности лизосомальных протеиназ. Это совпадает с результатами наших предыдущих исследований [3] об отсутствии реакции протосолитической системы лизосом печени в ответ на АС.

Таблица 1

Активность лизосомальных протеиназ в печени мышей при введении Т-зависимого и Т-независимого антигенов (в мкмоль/мин на 1 г белка)

Ферменты (катепсины)	Контроль	ЭБ		Vi-антиген	
		5%	25%	2 мкг/мл	10 мкг/мл
A	6,37±0,516	4,85±0,274*	6,19±0,259	5,87±0,153	4,92±0,238*
B	15,00±0,676	13,71±0,794	14,92±0,524	13,60±0,835	12,33±0,383
C	8,24±0,522	6,80±0,571	—	7,99±0,487	6,79±0,523
D	24,32±0,846	23,83±2,21	26,30±0,989	26,03±1,51	21,6±1,34
H	0,022±0,001	0,016±0,001**	0,017±0,001**	0,017±0,001*	0,017±0,002*
L	0,146±0,012	0,147±0,003	0,153±0,020	0,142±0,017	0,128±0,004

Примечание. Здесь и в табл. 2—4: одна звездочка — $p < 0,05$; две — $p < 0,01$; три — $p < 0,001$.

Таблица 2

Активность лизосомальных протеиназ в селезенке мышей при введении Т-зависимого и Т-независимого антигенов (в мкмоль/мин на 1 г белка)

Ферменты (катепсины)	Контроль	ЭБ		Vi-антиген	
		5 %	25 %	2 мкг/мл	10 мкг/мл
A	14,1±0,79	18,2±2,37	21,6±2,96*	14,4±1,93	16,7±0,41*
B	3,39±0,372	3,48±0,342	17,10±2,99**	12,34±1,50**	10,54±0,796**
C	12,75±1,47	9,82±0,914	17,69±0,979*	11,61±1,12	11,66±1,03
D	19,50±1,48	21,92±2,30	19,79±1,64	25,35±1,73*	29,07±1,44**
H	4,46·10 ⁻³ ±	5,11·10 ⁻³ ±	7,50·10 ⁻³ ±	3,18·10 ⁻³ ±	5,87·10 ⁻³ ±
	0,47·10 ⁻³	0,59·10 ⁻³	0,60·10 ⁻³ **	0,61·10 ⁻³	0,68·10 ⁻³
L	0,170±0,018	0,194±0,027	0,173±0,001	0,129±0,004*	0,165±0,009

Существенный интерес представляют данные по изменению активности катепсинов в иммунокомпетентных органах и перитонеальных макрофагах. В селезенке (табл. 2) при АС 5 % раствором ЭБ активность лизосомальных протеиназ достоверно не изменилась, тогда как при введении 25 % раствора ЭБ обнаружено увеличение активности катепсинов С на 39 %, Н на 68 % и В в 5 раз по сравнению с контролем с одновременным снижением активности катепсина А на 47 %. При АС животных Vi-антигеном отмечено независимое от дозы увеличение активности катепсина D на 30—49 % и активности катепсина В в 3,1—3,6 раза. В тимусе (табл. 3) АС даже при максимальной дозе ЭБ не вызывала значимых изменений активности исследованных ферментов, тогда как Т-независимая АС приводила к увеличению активности тиоловых протеиназ, что особенно отчетливо проявлялось при введении Vi-антигена в дозе 10 мкг/мл. В этом случае обнаружено возрастание активности катепсина L на 90 % и катепсина H в 2,3 раза.

Наиболее характерные изменения в активности лизосомальных протеиназ

обнаружены в перитонеальных макрофагах (табл. 4), лизосомальный аппарат которых несет значительную функциональную нагрузку при иммунном ответе. При этом привлекает внимание то обстоятельство, что при Т-независимой АС обнаружено прямое дозозависимое изменение активности катепсинов А, В, D и L, тогда как введение больших доз Т-зависимого антигена вызывает выраженное угнетение активности всех исследованных протеиназ лизосом — в 2—5 раз. Сам факт активации лизосомальных ферментов макрофагов при иммунизации — закономерное явление, свидетельствующее об активации этих клеток при контакте с антигеном. При введении же ЭБ в нефизиологически высокой дозе вследствие избытка антигена активации ферментов не происходит, что коррелирует с общеизвестными данными о том, что введение антигена в слишком больших количествах может приводить к иммунологической неотвечаемости [9]. Существенным также представляется то обстоятельство, что ЭБ являются корпускулярным антигеном, избирательно накапливающимся в макрофагах, тогда как Vi-антиген яв-

Таблица 3

Активность лизосомальных протеиназ в тимусе мышей при введении Т-зависимого и Т-независимого антигена (в мкмоль/мин на 1 г белка)

Ферменты (катепсины)	Контроль	ЭБ		Vi-антиген	
		25 %		2 мкг/мл	10 мкг/мл
A	18,8±2,0	16,9±1,1		16,6±0,5	18,4±0,8
B	3,9±0,2	3,9±0,2		5,0±0,2*	3,9±0,4
C	9,7±0,8	9,8±1,0		7,7±0,3*	14,9±2,8
D	36,0±1,3	34,9±0,8		37,0±2,2	37,7±1,3
H	6,12·10 ⁻³ ±0,34·10 ⁻³	0,941·10 ⁻³ ±0,038·10 ⁻³		7,53·10 ⁻³ ±0,71·10 ⁻³	20,24·10 ⁻³ ±2,35·10 ⁻³
L	0,219±0,018	0,258±0,029		0,215±0,022	0,471±0,020***

Активность лизосомальных протеиназ в макрофагах мышей при введении Т-зависимого и Т-независимого антигенов (в мкмоль/мин на 1 г белка)

Ферменты (катепсины)	Контроль	ЭБ		Vi-антиген	
		5 %	25 %	2 мкг/мл	10 мкг/мл
A	$0,592 \cdot 10^3 \pm 0,054 \cdot 10^3$	$3,686 \cdot 10^3 \pm 0,76 \cdot 10^3$	$1,268 \cdot 10^3 \pm 0,068 \cdot 10^3$	$1,63 \cdot 10^3 \pm 0,106 \cdot 10^3$	$2,975 \cdot 10^3 \pm 0,250 \cdot 10^3$
B	$1,00 \pm 0,09$	$2,30 \pm 0,22^{***}$	$0,82 \pm 0,13$	$1,51 \pm 0,18^*$	$1,70 \pm 0,12^{**}$
C	$3,15 \pm 0,49$	$5,97 \pm 0,52^{**}$	$2,88 \pm 0,27$	$2,91 \pm 0,40$	$2,20 \pm 0,11$
D	$300,0 \pm 43,9$	$753,7 \pm 82,0^{**}$	$473,8 \pm 54,9^*$	$592,2 \pm 54,9^*$	$840,0 \pm 87,5^{***}$
H	$0,200 \pm 0,017$	$1,201 \pm 0,082^{***}$	$0,260 \pm 0,024$	$0,335 \pm 0,022$	—
L	$17,4 \pm 0,82$	$37,4 \pm 1,0^{***}$	$16,7 \pm 2,7$	$20,0 \pm 0,5^*$	$23,6 \pm 0,4^{**}$

ляется растворимым антигеном со значительно меньшей иммуногенностью.

Анализ полученных данных по влиянию иммунизации на активность лизосомальных протеиназ макрофагов в совокупности с результатами по изменению активности ферментов в тимусе при введении Vi-антигена позволяет считать, что в реализации Т-независимой реакции иммунной системы принимают участие преимущественно тиоловые протеиназы лизосом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баррет А. Дж., Хит М. // Лизосомы: Методы исследования / Под ред. Дж. Дингла: Пер. с англ. — М., 1980. — С. 25—156.
2. Васильев А. В., Капелевич Т. А., Тутельян В. А. // Вопр. мед. химии. — 1983. — № 3. — С. 127—130.
3. Васильев А. В., Коновалова Л. С., Плещитый К. Д. и др. // Там же. — 1987. — № 5. — С. 81—83.
4. Васильев А. В., Коновалова Л. С., Плещитый К. Д. и др. // Там же. — 1988. — № 2. — С. 97—99.
5. Васильев А. В., Коновалова Л. С., Плещитый К. Д. и др. // Бюл. exper. биол. — 1988. — № 2. — С. 181—184.
6. Коньшев В. А. Питание и регулирующие системы организма. — М., 1985.
7. Покровский А. А., Тутельян В. А. Лизосомы. — М., 1976.
8. Burnett D., Crocher J., Afford S. C. et al. // Biochim. biophys. Acta. — 1986. — Vol. 887. — P. 283—290.
9. Hahn H., Kaufmann S. H. E., Faldenberg F. et al. // Immunology. — 1979. — Vol. 38. — P. 51—55.
10. Jerne R. K., Nordin A. A. // Science. — 1963. — Vol. 140. — P. 405.

11. Kirchke H. // Proteinases in Mammalian Tissues and Cells. — Halle, 1982. — P. 125—128.
12. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
13. Pilatte Y., Bignon J., Lambre C. R. // Biochim. biophys. Acta. — 1987. — Vol. 923. — P. 150—155.

Поступила 21.04.88

ACTIVITY OF LYSOSOMAL PROTEINASES IN LIVER, SPLEEN, THYMUS TISSUES AND IN PERITONEAL MACROPHAGES AFTER IMMUNIZATION OF MICE WITH THYMUS-DEPENDENT AND -INDEPENDENT ANTIGENS.

A. V. Vasil'ev, T. A. Vorobeychik, K. D. Plecity, V. A. Tutel'yan

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

Mice of the CBAx C97B/6 strain were immunized with sheep erythrocytes at a dose of 0.5 ml containing 5% and 25% of the cell suspension and with Vi-antigen at doses of 2 µg/ml and 10 µg/ml, respectively. Sheep erythrocytes caused dose-dependent stimulation of cathepsin B, C and H in spleen, whereas cathepsin B was activated 3.1-3.6-fold after administration of Vi-antigen. Functional state of the lysosomal proteolytic system did not alter in thymus in response to sheep erythrocytes, while Vi-antigen activated distinctly thiol-dependent proteinases. In peritoneal macrophages administration of sheep erythrocytes led to 2-5-fold decrease in activity of all the lysosomal proteinases studied (cathepsins A, B, C, D, H and L), however Vi-antigen exhibited direct dose-dependent effect on activity of cathepsins A, B, D and L. The data obtained suggest that T-independent reactions of the immune system were realized via thiol-dependent lysosomal proteinases.

Л. Н. Овчинникова, В. З. Горкин, И. П. Анохина

ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЙ КАТАЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МЕМБРАНОСВЯЗАННЫХ МОНОАМИНОКСИДАЗ ПРИ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Всесоюзный научный центр медико-биологических проблем наркологии Минздрава СССР, Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Исследования биохимических основ развития острой и хронической алкогольной интоксикации указывают на важное значение нарушений при этих патологических состояниях каталитических свойств ключевых ферментов обмена таких биогенных аминов, как дофамин, норадреналин, серотонин и др. [1, 2, 13]. Актуальной проблемой является, в частности, изучение особенностей изменений каталитических свойств мембраносвязанных моноаминоксидаз (МАО) (КФ 1.4.3.4) типов А и Б, активность которых при алкогольной интоксикации в условиях усиленного перекисного окисления липидов (ПОЛ) может быть не только снижена [1, 2, 17] или повышена [1, 2], но также изменена качественно [4, 5].

Целью настоящей работы было дальнейшее изучение особенностей нарушений каталитических свойств мембраносвязанных МАО при алкогольной интоксикации в аспекте выявления именно их качественных изменений, которые являются обратимыми [4] и поэтому представляются особенно важными в связи с проблемами лечения алкоголизма [13].

Методика

Для воспроизведения экспериментальной хронической алкогольной интоксикации белых беспородных крыс-самцов (масса тела в начале эксперимента 150—180 г) содержали 10 мес на рационе, в котором вода была последовательно заменена в течение 2 нед на 5%, 10% и 15% раствор этанола. Контрольных животных содержали в идентичных условиях, но воду на этанол не заменяли. Подопытные и контрольные животные были любезно предоставлены канд. мед. наук А. З. Дроздовым.

Контрольных и подопытных животных декапитировали в соответствии с методическими рекомендациями Минздрава СССР (приложения к приказу от 12.08.77). Печень быстро извлекали, промывали охлажденным 0,9% раствором хлористого калия и гомогенизировали (1:9, тefлон-стекло) в 0,1 М К-фосфатном буфере рН 7,4. Гомогенат диализовали в течение 24 ч против 3 смесей 100-кратного объема 0,01 М К-фосфатного буфера рН 7,4 при 4°C.

Навески органов трупов лиц мужского по-

ла (25—55 лет) были любезно предоставлены канд. мед. наук А. И. Угрюмовым в пределах 10 ч после момента наступления смерти. Из 10% тканевых гомогенатов в 0,25 М сахарозе выделяли митохондриальные фракции путем дифференциального центрифугирования. Содержание белка определяли колориметрически по методу Лоури с альбумином сыворотки крови быка или человека в качестве стандарта.

Для исследования скорости дезаминирования азотистых соединений в пробы (конечный объем 1,8 мл) вносили по 2—3 мг белка митохондрий (или по 4—6 мг белка тканевых гомогенатов) в 0,1 М фосфатном буфере рН 7,4 и один из субстратов в следующих оптимальных конечных концентрациях (мМ): тирамин·HCl («Serva», ФРГ) — 3; серотонин креатининсульфат («Reanal», ВНР) — 5; триптамин·HCl («Serva») — 4; бета-фенилэтиламин·HCl (отечественный) — 0,8; кадаверин·2HCl («Serva») — 10; дофамин·HCl («Ferak», ФРГ) — 5; гистамин·2HCl («Calbiochem», США) — 10; гамма-аминомасляная кислота («Calbiochem») — 10; глюкозамин·HCl («Sigma», США) — 10. Пробы инкубировали при 37°C в атмосфере кислорода в течение 15 мин (в опытах с бета-фенилэтиламином в качестве субстрата) или 30 мин (в опытах со всеми другими субстратами). За это время количество освобождаемого аммиака было прямо пропорционально длительности инкубации. После окончания инкубации пробы фиксировали добавлением ТХУ (конечная концентрация 5%), образующийся осадок отделяли центрифугированием, а в надосадочной жидкости определяли содержание аммиака методом изотермической диффузии с последующей нesslerизацией [4].

Для характеристики процессов ПОЛ исследовали колориметрически содержание и кинетику образования [9] малонового диальдегида (МДА) по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой [3]. Пробы инкубировали в аэробных условиях при 37°C в течение 30, 60, 90 и 120 мин в присутствии 0,5 мкМ FeSO₄·H₂O и 5 мкМ аскорбиновой кислоты [6]. При спектрофотометрическом определении дисновых конъюгатов [8] неопределенные жирные кислоты экстрагировали смесью гептана с изопропиловым спиртом (1:1). О содержании гидроперекисей липидов [7] судили по реакции тиоцианата аммония с образующимся в их присутствии трехвалентным железом. Липофусциноподобные пигменты [11, 20] определяли флуориметрически при 435 нм (длина волны света, возбуждающего флуоресценцию, 365 нм) после экстракции смесью хлороформа с метанолом (2:1).

Результаты опытов обрабатывали статистически по методу Стьюдента при условии нормальности распределения вариант в вариационных рядах [12]. Различия между средними

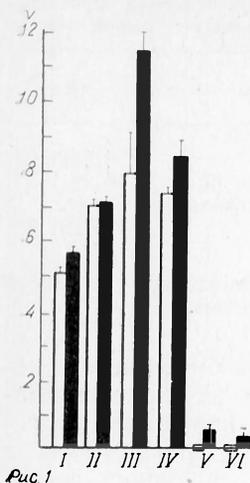


Рис. 1

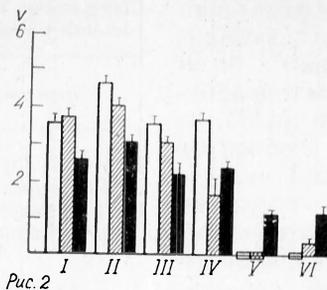


Рис. 2

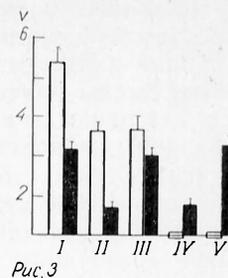


Рис. 3

Рис. 1. Деаминация азотистых соединений в диализованном гомогенате печени крысы при хронической алкогольной интоксикации. Здесь, а также на рис. 2 и 3: по оси ординат — скорость деаминации в нмолях освобождаемого аммиака на 1 мг белка за 1 мин I — триптамин; II — серотонин; III — бета-фенилэтиламин; IV — дофамин; V — кадаверин; VI — глюкозамин. Представлены средние данные 4–6 определений.

Рис. 2. Деаминация азотистых соединений в диализованном гомогенате печени человека при алкогольной интоксикации.

Светлые столбики — контроль (печень лиц, погибших от травм, ишемической болезни сердца и других причин, не связанных с алкогольной интоксикацией), темные — хроническая алкогольная интоксикация (делириозное состояние), столбики со штриховкой — острая смертельная алкогольная интоксикация. I — триптамин; II — серотонин; III — триптамин; IV — бета-фенилэтиламин; V — кадаверин; VI — глюкозамин. Здесь и на рис. 3 представлены средние данные 15–25 определений.

Рис. 3. Деаминация азотистых соединений в митохондриальной фракции стволовой части головного мозга человека при хронической алкогольной интоксикации. Светлые столбики — контроль, темные — хроническая алкогольная интоксикация. I — триптамин; II — серотонин; III — дофамин; IV — гистамин; V — глюкозамин.

арифметическими величинами считали статистически достоверными при $p < 0.05$.

Результаты и обсуждение

Как можно было ожидать на основании результатов предшествующих экспериментов [5], при хронической алкогольной интоксикации у крыс обнаружили в гомогенате печени наряду с количественными также и качественные изменения процессов деаминации азотистых соединений, а именно появление отсутствующих в норме реакций деаминации субстрата диаминооксидазы кадаверина (1,5-пентаметиленамин) и глюкозамина, относящегося к категории аминсахаров, деаминация которых аминоксидазы не катализируют (рис. 1).

При оптимальных условиях измерения скорость реакций деаминации кадаверина или глюкозамина была относительно небольшой; по сравнению с величиной V_{\max} для реакции деаминации серотонина в диализованном гомогенате печени крысы она не превышала 10%. В значительно большей степени такие качественные изменения процессов деаминации азотистых соединений были выражены при хронической алкогольной интоксикации у человека (рис. 2 и 3).

Так, при хронической алкогольной интоксикации, сопровождающейся делириозным состоянием, в диализованном гомогенате печени человека максимальная скорость реакций деаминации кадаверина или глюкозамина составляла величину, превышавшую 25% от V_{\max} для деаминации серотонина в контроле. При этом в митохондриальной фракции гомогената стволовой части головного мозга мы обнаружили реакцию деаминации глюкозамина, отсутствующую в норме, но достигавшую при хроническом алкоголизме 80% от V_{\max} для деаминации серотонина в контроле; одновременно было отмечено появление качественно новой для данного биологического объекта реакции деаминации гистамина (30% от величины V_{\max} для деаминации серотонина).

Следует отметить, что по сравнению с хронической алкогольной интоксикацией при острой смертельной алкогольной интоксикации скорость деаминации глюкозамина в печени была в 3 раза ниже, а реакцию деаминации кадаверина вообще не удавалось обнаружить, как это имеет место и в норме.

Подобные качественные изменения процессов ферментативного дезаминации азотистых соединений были обнаружены ранее [4] после обработки очищенных препаратов МАО из различных биологических объектов окислителями, вызывавшими частичное обратимое окисление тиоловых групп МАО, а также при патологических состояниях, сопровождающихся стимуляцией ПОЛ (лучевые поражения, интоксикации кислородом под высоким давлением, гипервитаминоз D и другие). Методами ингибиторного анализа было показано, что обычно появление в биологических объектах при патологических состояниях отсутствующих в норме реакций дезаминации азотистых соединений, не относящихся к числу субстратов МАО, обусловлено патогенетически существенным качественным обратимым модифицированием каталитических свойств МАО типа А, инициируемых частичным окислением их тиоловых групп. Предотвращение или устранение явлений качественного модифицирования каталитических свойств мембраносвязанных МАО можно рассматривать в качестве одного из подходов к медикаментозной терапии и профилактике патологических состояний, сопровождающихся стимуляцией ПОЛ. К числу таких патологических состояний, по современным представлениям, относится и алкогольная интоксикация [19], протекающая на фоне ясно выраженных мембранотропных эффектов [14, 18].

В условиях экспериментальной хронической алкогольной интоксикации мы не обнаружили изменений дезаминации серотонина (субстрат МАО типа А) после его инкубации с диализованным гомогенатом печени крысы при одновременной стимуляции дезаминации бета-фенилэтиламина (субстрат МАО типа Б); исследования дезаминации триптамина и дофамина, катализируемого в печени как МАО-А, так и МАО-Б, указали на тенденцию к некоторой стимуляции этих ферментативных реакций (см. рис. 1).

При хроническом алкоголизме у человека на фоне значительно более резко выраженных патоморфологических и биохимических признаков поражения печени этанолом, чем у экспериментальных животных [16], мы обнаружили существенное снижение скоро-

Содержание МДА в печени человека при алкогольной интоксикации (нмоль/г сырой массы)

Исследованные группы	МДА
Контроль (5)	8,5±1,07
Хронический алкоголизм (9)	10,2±1,5
Острая смертельная алкогольная интоксикация (10)	15,7±1,9*

Примечание. Звездочка — $p < 0,05$; в скобках — число исследований.

сти дезаминации биогенных моноаминов — субстратов мембраносвязанных МАО — как в диализованных гомогенатах печени (см. рис. 2), так и в митохондриальных фракциях гомогенатов стволовой части головного мозга (см. рис. 3). При острой смертельной алкогольной интоксикации у лиц, не страдавших хроническим алкоголизмом при жизни, снижение по сравнению с контролем скоростей дезаминации серотонина (5-окситриптамина) и триптамина в диализованном гомогенате печени было выражено в меньшей мере, чем при хроническом алкоголизме. Исследования реакции дезаминации тирамина при острой смертельной алкогольной интоксикации свидетельствовали об отсутствии изменений скорости этой реакции по сравнению с нормой (при отчетливом ее снижении в условиях хронического алкоголизма), тогда как скорость дезаминации бета-фенилэтиламина при острой смертельной алкогольной интоксикации была снижена по сравнению с нормой в еще большей мере, чем при хроническом алкоголизме. Эти данные можно рассматривать как дополнительный довод в пользу представлений о возможном участии в окислительном дезаминации тирамина аминоксидаз особого типа, не идентичных МАО-А или МАО-Б [4].

С целью характеристики особенностей изменений процессов ПОЛ в печени при алкогольной интоксикации в связи с обнаруженными нарушениями функций мембраносвязанных МАО мы обратились в первую очередь к исследованиям исходного уровня МДА [15]. Между величинами содержания МДА в печени при острой алкогольной интоксикации и при хроническом алкоголизме статистически достоверных различий отмечено не было (см. таблицу).

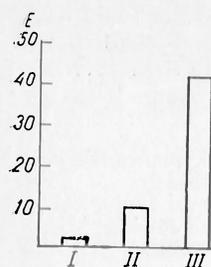


Рис. 4. Содержание липофусциноподобных пигментов в гомогенатах печени человека при алкогольной интоксикации.

По оси ординат — относительные единицы флуоресценции. I — контроль; II — хронический алкоголизм; III — острая смертельная алкогольная интоксикация. Представлены данные 3—5 определений.

Результаты исследований содержания весьма лабильных диеновых конъюгатов (характеризующих первичные этапы ПОЛ) и гидронперекисей высших жирных кислот (промежуточных продуктов ПОЛ) не позволяли выявить различия между процессами ПОЛ в печени человека при острой и хронической алкогольной интоксикации. На существование таких различий указывали результаты исследований содержания липофусциноподобных пигментов — стабильных продуктов взаимодействия МДА с биохимическими компонентами гепатоцитов или других клеточных элементов (рис. 4). При хроническом алкоголизме содержание этих пигментов в печени было в среднем в 5 раз, а при острой смертельной алкогольной интоксикации — в 20 раз выше, чем в норме.

Кинетические исследования, накопленные МДА в процессе аскорбатзависимого ПОЛ в гомогенатах печени человека при хроническом алкоголизме, указывают на существование резко выраженных, статистически достоверных различий в динамике прироста

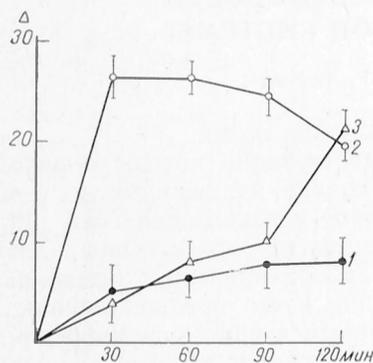


Рис. 5. Накопление МДА в гомогенате печени человека при алкогольной интоксикации в ходе аскорбатзависимого перекисного окисления липидов.

По оси ординат — прирост МДА, %; по оси абсцисс — длительность инкубации, мин при 37 °С. I — контроль; 2 — хронический алкоголизм; 3 — острая алкогольная интоксикация. Представлены средние данные 5—12 определений.

МДА, особенно за первые 30—60 мин инкубации по сравнению не только с контролем, но и с печенью людей, которые погибли от острой алкогольной интоксикации (рис. 5). Так, например, за первые 30 мин инкубации в сопоставимых условиях средний прирост МДА на единицу массы ткани печени в случаях хронического алкоголизма был в 5 раз выше, чем в контроле или при острой смертельной алкогольной интоксикации. Результаты таких хорошо воспроизводимых и методически простых исследований могли бы дать полезную информацию для посмертной дифференциальной диагностики хронического алкоголизма и острой смертельной алкогольной интоксикации у человека. Значительно более интенсивное неферментативное аскорбатзависимое ПОЛ при хроническом алкоголизме соответствует и более глубоким нарушениям дезаминирования биогенных моноаминов и других азотистых соединений при хроническом алкоголизме по сравнению с острой смертельной алкогольной интоксикацией. Ранее [10] было отмечено соответствие между появлением признаков качественно модифицирования каталитических свойств МАО в печени животных-опухоленосителей [4] и динамикой нарастания именно процесса аскорбатзависимого ПОЛ в митохондриях [10].

ЛИТЕРАТУРА

1. Анохина И. П., Дроздов А. З. // Биологические и медицинские аспекты алкоголизма. — М., 1984. — С. 29—38.
2. Анохина И. П., Коган Б. М., Дроздов А. З., Губский Л. В. // Алкоголизм. — М., 1983. — С. 62—69.
3. Гаврилов В. Б., Гаврилова А. Р., Мажуль Л. М. // Вопр. мед. химии. — 1987. — № 1. — С. 118—122.
4. Горкин В. З. Аминоксидазы и их значение в медицине. — М., 1981.
5. Исаханян Г. Д., Горкин В. З. // Вопр. мед. химии. — 1976. — № 1. — С. 76—81.
6. Каган В. Е., Смирнов А. В., Савов В. М., Горкин В. З. // Там же. — 1984. — № 1. — С. 112—118.
7. Колесова О. Е., Маркин А. А., Федорова Т. П. // Лаб. дело. — 1984. — № 9. — С. 540—546.
8. Костюк В. А., Потапович А. И., Лунец А. И. // Вопр. мед. химии. — 1984. — № 4. — С. 125—127.
9. Ланкин В. З., Гуревич С. М., Бурлакова Е. Б. // Биоантиокислители. — М., 1975. — С. 73—79.
10. Ланкин В. З., Поляков В. М., Гуревич С. М. // Липиды: Структура, биосинтез, превращения и функции. — М., 1977. — С. 93—103.

11. *Логонов А. С., Матюшин Б. Н., Ткачев В. Д., Павлова Н. М.* // Тер. арх. — 1985. — № 2. — С. 63—67.
12. *Урбах В. Ю.* Математическая статистика для биологов и медиков. — М., 1963.
13. *Апоkhина I. P., Ivanets N. N., Burov Yu. V., Kogan B. M.* // Brit. J. Addict. — 1987. — Vol. 82, N 1. — P. 23—30.
14. *Hiltzemann R. J., Schueler H. E., Graham-Brittain C., Kreishman G. P.* // Biochim. biophys. Acta. — 1986. — Vol. 859, N 2. — P. 189—197.
15. *Poirier J., Barbeau A.* // Neurosci. Lett. — 1987. — Vol. 75, N 3. — P. 345—348.
16. *Sewell R. B., Grinpukel S. A., Yeomans N. D.* // Clin. exp. Pharmacol. — 1986. — Vol. 13, N 3. — P. 745—750.
17. *Tabakoff B., Lee J. M., De Leon-Jones F., Hoffman P. L.* // Psychopharmacology. — 1985. — Vol. 87, N 2. — P. 152—156.
18. *Tarashi T., Rubin E.* // Lab. Invest. — 1985. — Vol. 52, N 1. — P. 120—131.
19. *Uysal M., Burlur H., Erdine-Demirelli S., Demiroglu C.* // Drug Alcohol Depend. — 1986. — Vol. 18, N 4. — P. 385—388.
20. *Wilhelm J., Sonka J.* // Experientia (Basel). — 1981. — Vol. 37, N 6. — P. 573—574.

Поступила 25.01.88

ALTERATIONS IN CATALYTIC PROPERTIES OF MEMBRANE-BOUND MONOAMINE OXIDASES IN ALCOHOL INTOXICATION

L. N. Ouchinnikova, V. Z. Gorkin, I. P. Anokhina

All-Union Research Centre of Medico-Biological Problems in Narcology, Ministry of Public Health of the USSR, Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Chronic alcohol intoxication was accompanied by qualitatively new deamination reactions of cadaverine or glucosamine in dialyzed fraction of rat liver tissue homogenate. The rate of reactions was considerably more distinct in human liver and brain tissues obtained, *post mortem* from patients with chronic alcoholism. At the same time, impairments were observed both in deamination of biogenic monoamines by membrane-bound monoamine oxidases and in ascorbate-dependent lipid peroxidation. The qualitative modifications in catalytic properties of membrane-bound monoamine oxidase, related to reactions of deamination and lipid peroxidation, appear to be of importance in chronic alcoholism and acute lethal alcohol intoxication.

МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 616.153.1:577.152.34+616.154:577.175.85]-074

В. Л. Доценко, Г. А. Яровая, Е. А. Нешкова

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТРИПЕПТИДНОГО ХРОМОГЕННОГО СУБСТРАТА ДЛЯ ОДНОВРЕМЕННОЙ ОЦЕНКИ ЧЕТЫРЕХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ АКТИВНОСТИ КАЛЛИКРЕИН-КИНИНОВОЙ СИСТЕМЫ

ЦОЛИУВ Минздрава СССР, Москва

Необходимость оценки состояния калликреин-кининовой системы плазмы крови обусловлена непосредственным участием этой системы в различных патологических состояниях и часто возникающей потребностью коррекции нарушений активности протеолитических систем в клинике.

Однако до сих пор отсутствует стандартный и специфический метод определения активности калликреина, основного фермента этой системы, являющегося ключевым ферментом не только в кининогенезе, но и в регуляции других протеолитических систем плазмы крови, в частности системы

свертывания крови.

Существующие методы определения калликреина, основанные на оценке его биологического действия [19, 22], трудоемки и малодоступны клиническим лабораториям. Определение калликреина и его предшественника после соответствующего активирования по N-ациларгининэстеразной активности в цельной плазме крови [11] недостаточно специфично, поскольку в активированной контактом плазме имеются другие протеиназы с аргининэстеразной активностью [8, 15, 16, 20].

Достаточно специфичным, но трудоемким является хроматографический

метод определения количества калликреина и прекалликреина по N-ациларгининэстеразной активности фермента после его отделения от других протеиназ, проявляющих подобную активность, на ионообменнике [3, 4].

Наиболее перспективными методами определения количества калликреина в условиях клиники являются методы с использованием специфических трипептид-хромогенных субстратов. Определение количества прекалликреина осуществляется после инкубации плазмы крови с активаторами фактора Хагемана — фХ (XII фактора системы свертывания крови): каолином [6], эллаговой кислотой [7, 12] и сульфатом декстрана [2, 7, 18].

Однако оценка количества прекалликреина в результате контактного активирования имеет ряд существенных недостатков, поскольку, во-первых, дефект контактной фазы может проявиться в его неполном активировании [23] и, во-вторых, активирование прекалликреина в присутствии сывороточных ингибиторов неизбежно приводит к снижению количества определяемого предшественника [7].

Попытка преодолеть недостатки описанных методов предпринята Alving и соавт. [5], предложившими способ активирования прекалликреина экзогенным активатором — активным фрагментом фХ — в плазме крови, лишенной ингибиторов.

В настоящей работе предлагаем метод определения 4 показателей активности калликреин-кининовой системы плазмы крови, основанный на использовании как экзогенного активатора, так и активации внутренней контактной фазы. Использование метода позволяет оценить: 1) исходную активность калликреина; 2) содержание прекалликреина при его активировании экзогенным активатором; 3) активность калликреина при активировании эндогенной контактной фазы (тест на ее сохранность); 4) антикалликреиновый потенциал (при сохранной контактной фазе).

Методика

Получение материала для исследования. Кровь собирали в полиэтиленовую пробирку, сгусток отделяли центрифугированием при комнатной температуре, сыворотку замораживали и хранили при -80°C . Плазму крови получали из крови, взятой в полиэтиленовую

пробирку, содержащую 3,8 % раствора цитрата натрия (1:9). фХ и прекалликреин выделяли из свежесполученной сыворотки крови.

Выделение прекалликреина. Прекалликреин получали из сыворотки крови в две хроматографические стадии: на QAE- и CM-сепадксах, как описано в [17]. Активность препарата прекалликреина оценивали после активации трипсином по скорости расщепления БАЭЭ.

Выделение фХ. фХ выделяли описанным ранее методом [1]. Полученные препараты фХ имели активность $0,5\text{—}1,5$ мкмоль/мг·мин $^{-2}$, рассчитанную по скорости активирования прекалликреина; при SDS-электрофорезе давали основную полосу, соответствующую белку с молекулярной массой 80 000, и несколько минорных полос, не обладали эстеразной или амидазной активностью. После активирования трипсином препарат фХ приобрел способность расщеплять хромогенный субстрат S-2302 (D-Pro-Phe-Arg-pNA) с K_m $2,6 \cdot 10^{-5}$ моль/л, но не проявлял эстеразной активности по отношению к БАЭЭ.

Определение активности фХ и приготовления активатора. Активность фХ оценивали по его способности активировать прекалликреин. Для этого в 3 пробирки, содержащие 0,05 мл исследуемого препарата, добавляли 0,1 мл 0,5 моль/л трис-НСl рН 8,0 и 0,1 мл трипсина (3,3 мкг в 0,02 н. НСl). Пробы инкубировали 15 мин при 25°C , после чего активность трипсина подавляли 0,1 мл овомуконда (2 мг/мл). По истечении 5 мин во все пробирки добавляли 0,1 мл прекалликреина и инкубировали их 1, 5, 10 и 20 мин при 37°C . Перед измерением активности объем проб доводили до 2 мл 0,05 моль/л трис-НСl рН 8,0 и добавляли 1 мл раствора БАЭЭ в концентрации $1,5 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Для расчета активности фХ использовали начальную скорость реакции. Активность выражали в мкмоль·мл $^{-1}$ ·мин $^{-1}$ или в ммоль·мл $^{-1}$ ·мин $^{-1}$ БАЭЭ, расщепляемого калликреином за 1 мин активирования.

Активирование фХ для получения экзогенного активатора проводили следующим образом: к 0,5 мл фХ добавляли 0,5 мл 0,5 моль/л трис-НСl рН 8,0 и 0,5 мл трипсина (40 мкг/мл в 0,02 н. НСl). После 15 мин инкубации в смесь добавляли 0,5 мл раствора овомуконда (2 мг/мл) для подавления активности трипсина. Активированный фХ хранили при 4°C в течение 3—5 сут.

Активирование прекалликреина эндогенной контактной фазой и экзогенным активатором. Активацию эндогенной контактной фазы сыворотки крови производили с помощью сульфата декстрана (СД) в концентрации 5 мг в 100 мл дистиллированной воды, внося в реакционную смесь 0,1 мл раствора. Инактивацию плазменных ингибиторов калликреина ацетоном и активирование прекалликреина экзогенным активатором проводили по схеме Alving и соавт. [5], используя в качестве активатора обработанный трипсином фХ.

Измерение скорости расщепления трипептидного субстрата S-2302 некоторыми тканевыми и плазменными ферментами. Сравнительный анализ специфичности субстрата S-2302 по отношению к некоторым ферментам был произведен путем расчета K_m в координатах Лайнуивера — Бэрка. В работе использованы следующие коммерческие препараты ферментов: панкреатический калликреин (ап-

Значения K_m , рассчитанные по скорости расщепления S-2302 некоторыми сериновыми протеиназами плазмы крови и тканей

Протеолитический фермент	K_m	Протеолитический фермент	K_m
Калликреин плазмы крови	$1,2 \cdot 10^{-4}$	Тромбин	$0,7 \cdot 10^{-3}$
Панкреатический калликреин (андекалин)	$0,9 \cdot 10^{-4}$	Урокиназа	Следовая активность
Трипсин	$0,5 \cdot 10^{-3}$	Химотрипсин	То же
Эластаза	Следовая активность	ФХ	$0,26 \cdot 10^{-4}$

декалин) — препарат объединения «Минмед-препараты», Минск; трипсин — «Srofa» (ЧССР); эластаза — «Calbiochem-Behring» (США); тромбин — предприятие бактериологических препаратов, Каунас; урокиназа — «Green Cross Corp.» (Япония); химотрипсин — «Miles» (Англия). Калликреин плазмы крови человека — препарат, активированный из прекалликреина [17], с удельной активностью по отношению к БАЭЭ $1,5$ мкмоль/мг; активированный фХ с удельной активностью $0,5-1,5$ мкмоль·мг⁻¹·мин⁻² [1]. При измерении K_m были использованы следующие концентрации субстрата: $0,5 \cdot 10^{-3}$; $0,25 \cdot 10^{-3}$; $1,25 \cdot 10^{-4}$; $0,625 \cdot 10^{-4}$ моль/л.

SDS-электрофорез в полиакриламидном геле проводили по методу Weber и Osborn [25], используя для калибровки сывороточный альбумин, овалбумин, химотрипсиноген и рибонуклеазу.

Используемые реактивы. Препарат гексадимедринбромид (полиброма) производства фирмы «Aldrich Chem. Co Inc.» (США); QAE-иСМ-сефадексы и сефадексы G-150, G-200 и белки для калибровки из наборов, выпускаемых «Pharm-Fine. Chem.» (Швеция); азид натрия — «Serva» (США); трипсин — «Srofa» (ЧССР); БАЭЭ (этиловый эфир N-бензоил-L-аргинина) — «Reanal» (ВНР); субстрат S-2302 — «Serva» (ФРГ); омомуконид — завод химических реактивов (Олайн, ССР).

Результаты и обсуждение

Оценка исходной амидазной активности сывотки или плазмы крови. Использование в качестве субстрата трипептиднитроанилида S-2302 позволяет судить об активности калликрена сывотки (плазмы) крови по скорости амидазной реакции в связи с его высокой специфичностью по отношению к данному субстрату. Этот вывод сделан на основании анализа K_m , рассчитанных для нескольких сериновых протеиназ тканевого и плазменного происхождения (см. таблицу). Для измерения исходной амидазной активности сывотки в кварцевую кювету, содержащую $1,8$ мл $0,05$ М трис-HCl рН $8,0$ с $0,12$ М NaCl, вносили $0,015$ мл цельной сывотки или плазмы крови, тщательно перемешивали, добавляли

$0,2$ мл субстрата ($4 \cdot 10^{-3}$ М раствора S-2302) и немедленно измеряли прирост оптической плотности при 405 нм и 37°C в течение 3 мин. Предварительное разведение сывотки в 7 раз используемым буфером и ее преинкубация в течение 1 ч при комнатной температуре в силиконированной пробирке приводили к некоторому увеличению исследуемой активности (рис. 1). Для расчета активности пользовались формулой:

$$A = \frac{\Delta E \times 2}{9 \times 0,015},$$

где 2 — объем пробы; 9 — разница экстинкций растворов субстрата и продукта реакции (нитроанилина) при концентрации 1 мкмоль/мл (1×10^{-3} моль/мл); $0,015$ — объем внесенного образца в мл; ΔE — прирост оптической плотности пробы за 1 мин при 405 нм. Расчет начальной активности 8 образцов сывотки или плазмы крови у 4 доноров показывает, что значения этой активности составляют в

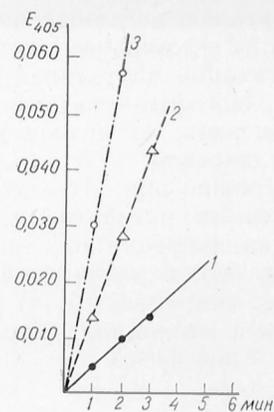


Рис. 1. Зависимость исходной амидазной активности сывотки крови от разведения и времени преинкубации.

По оси абсцисс — время, мин; по оси ординат — оптическая плотность при 405 нм. 1 — сывотка без разведения. Разведенная сывотка крови: 2 — 20 мин преинкубации; 3 — 60 мин преинкубации.

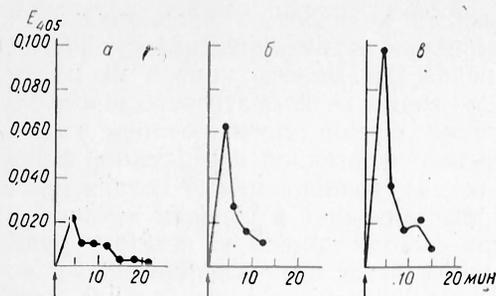


Рис. 2. Оптическая плотность проб, не содержащих субстрат, при добавлении СД. Здесь и на рис. 3: а, б — сыворотка крови; в — плазма крови доноров. По оси абсцисс — время, мин; по оси ординат — прирост оптической плотности при 405 нм. Стрелка — момент внесения СД.

среднем 0,104 мкмоль/мин·мл, причем величины, полученные при анализе плазмы крови, не отличаются от соответствующих величин, полученных при исследовании сыворотки.

Определение степени активирования прекалликреина под воздействием эндогенной контактной фазы. Для активирования эндогенной контактной фазы и перевода прекалликреина в калликреин использовали раствор СД (3—5 мг в 100 мл дистиллированной воды). В предварительно подготовленную смесь, содержащую 1,7 мл 0,05 М трис-НСI рН 8,0 с 0,12 М NaCl, 15 мкл цельной плазмы или сыворотки крови и 0,2 мл субстрата, через 3 мин оценки исходной амидазной активности образца добавляли 0,1 мл раствора СД, перемешивали содержимое кюветы и продолжали измерение оптической плотности пробы, делая отсчеты через каждые 3 мин в течение 30—40 мин. Активирование эндогенной контактной фазы при сохранности всех компонентов (фХ, высокомолекулярного кининогена и прекалликреина) приводило к резкому возрастанию активности с максимумом на 9—15 мин, последующим уменьшением и выходом на плато через 20—30 мин после начала измерения. Раствор СД (3—5 мкг в 0,1 мл) не изменял плотности пробы, содержащей буферный раствор без сыворотки крови, однако оптическая плотность пробы, содержащей сыворотку или плазму крови, до добавления субстрата при внесении в нее активатора во многих случаях резко возрастала. На рис. 2 приведены примеры измерения оптической плотности проб при 405 нм, полученные при сме-

шивании 0,1 мл СД (5 мг) с 1,9 мл трис-НСI с предварительно разведенными в нем 15 мкл сыворотки крови. Как видно из рис. 2, высота пика не зависит от количества внесенного активатора и может определяться, очевидно, концентрацией белков в сыворотке, комплексирующихся с СД, — липопротеидов [9, 24] и С-реактивного белка [21]. На основании этих данных был сделан вывод, что использование СД в качестве активатора контактной фазы приводит к увеличению оптической плотности, не связанному с амидазным действием образующегося фермента. В связи с этим при определении активности калликреина, выявляемой по скорости увеличения оптической плотности пробы после добавления СД, обязательно вводилась поправка. Контролем на неферментный прирост оптической плотности пробы служила кювета, содержащая то же количество образца, 1,7 мл трис-НСI с NaCl и 0,1 мл СД. Для построения кривой активации калликреина из соответствующих величин прироста оптической плотности вычитали значение прироста в контрольной пробе. На рис. 3 представлены типичные кривые амидазной активности калликреина, появляющегося в пробе в результате активирования эндогенной контактной фазы. Активность калликреина до активирования, на пике активации и при выходе на плато составила при 8 определениях у 4 доноров следующие величины: исходная активность колебалась от 0 до 270 нмоль/мин·мл (в среднем 104 нмоль/мин·мл); на пике активность была 1,18—1,50 мкмоль/мин·мл (в среднем 1,230 мкмоль/

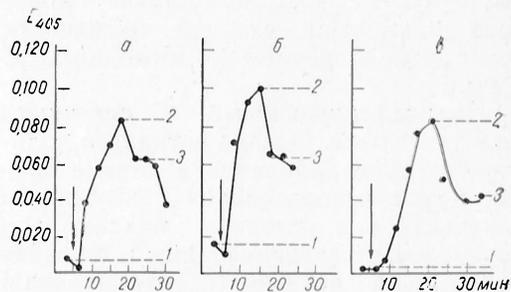


Рис. 3. Амидазная активность в сыворотке и плазме крови при активации эндогенной контактной фазы.

1 — исходная активность; 2 — при активации эндогенной контактной фазы; 3 — при действии ингибиторов.

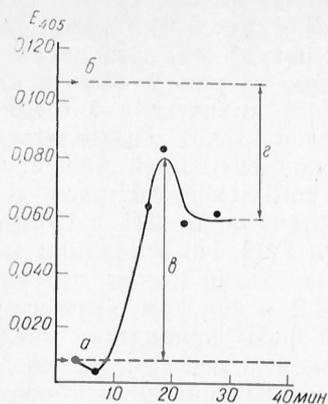


Рис. 4. Суммарные значения амидазной активности в сыворотке и плазме крови.

а — исходная активность; *б* — активность прекалликреина при инактивации ингибиторов и экзогенном активировании; *в* — активация прекалликреина под действием СД; *г* — степень ингибирования калликреина.

/мл·мин.), а затем снижалась до 0,60—0,90 мкмоль/мл·мин (в среднем 0,70 мкмоль/мин·мл).

Амидазная активность сыворотки в условиях инактивации ингибиторов протеиназ и под воздействием экзогенного активатора. Активирующая смесь включала 800 мкл 0,02 М трис-НСI рН 7,3 с 0,15 М NaCl, 300 мкл ацетона и 400 мкл обработанного трипсином фХ. Сыворотку или плазму крови (15 мкл) разводили непосредственно в кварцевой кювете 85 мкл указанного выше буфера и добавляли 25 мкл ацетона. После перемешивания к содержимому кюветы добавляли 125 мкл активатора и инкубировали 20 мин при 37 °С. Перед измерением объем пробы доводили до 1,8 мл 0,05 М трис-НСI рН 8,0, добавляли 0,2 мл субстрата и измеряли активность в течение 3—4 мин. Эта величина в сыворотке и плазме 4 доноров за вычетом исходной активности составила в среднем 1,4 мкмоль/мин × мкл.

Антикалликреиновый потенциал плазмы крови. Оценка истинного количества прекалликреина в плазме крови путем использования экзогенного активатора в условиях максимально возможного активирования и наличие данных об активности калликреина, полученных при его активировании в присутствии ингибиторов, позволили оценить уровень антикалликреинового потенциала исследуемых образцов сыворотки или плазмы крови. Для этого из величины активности, характери-

зующей количество прекалликреина, вычитали величину активности калликреина при выходе кривой на плато. Как видно из схематического изображения кривой активирования калликреина эндогенной контактной фазой (рис. 4), разница между содержанием прекалликреина и уровнем активности при выходе кривой на плато будет определяться антикалликреиновым потенциалом исследуемого образца сыворотки. Эта величина в среднем составила 0,700 ИЕ/мл, если за 1 ИЕ принять количество ингибитора, подавляющего единицу активности фермента (мкмоль/мин·мл). Расчет количества ингибитора может, по всей вероятности, проводиться только при сохранности контактных факторов и достаточном активировании прекалликреина под действием СД.

Итак, предлагаемый метод одновременной оценки 4 показателей калликреин-кининовой системы отличается от уже используемых методов определения содержания прекалликреина по скорости расщепления трипептид-параитроанилида калликреином следующим: 1) метод позволяет измерять исходную амидазную активность образца, что, помимо представления о суммарной активности протеиназ плазмы крови, характеризует и активность калликреина в связи с его более высокой субстратной специфичностью [10]; 2) метод предлагает не ограничиваться измерением амидазной активности через строго определенный промежуток времени после активирования контактной фазы, а регистрировать всю кривую активирования прекалликреина вплоть до ее выхода на плато, что позволяет более достоверно судить о сохранности контактных факторов активирования; 3) поскольку пониженная температура активации прекалликреина — недостаточное условие для предотвращения связывания образующегося калликреина с плазменными ингибиторами [13, 14], метод позволяет проводить активирование при 37 °С, так как вводится дополнительный этап исследования: активирование прекалликреина в условиях инактивации ингибиторов; 4) метод позволяет проводить оценку содержания в образце прекалликреина при дефиците контактных факторов; использование экзогенного активатора, безусловно, усложняет задачу оценки реального уровня прекал-

ликреина в условиях клиники, но зато позволяет избежать ошибок определения количества прекалликреина, связанных с дефицитом фХ или кининогена; 5) метод позволяет дать количественную характеристику антикалликреиновому потенциалу, что существенно отличает его от всех используемых современных методов определения уровня прекалликреина; 6) измерение всех показателей активности калликреин-кининовой системы проводится при конечной концентрации субстрата $0,4 \times 10^{-3}$ моль/л, что более чем в 3 раза превышает соответствующее значение K_m . При регистрации реакции активирования калликреина концентрация субстрата уменьшается на 15—17%, что не изменяет нулевой порядок амидазной реакции калликреина. Метод может быть модифицирован для измерения в микрокуветках с автоматической записью кривой активности и расчетом ее значений в критических точках (начальное значение, значения на пике и при выходе на плато).

ЛИТЕРАТУРА

1. Доценко В. Л., Серова Н. Б., Логунов А. И. и др. // Вопр. мед. химии. — 1987. — № 4. — С. 104—109.
2. Кузнецов В. А. // Лаб. дело. — 1985. — № 7. — С. 400—402.
3. Пасхина Т. С., Яровая Г. А. // Биохимия. — 1970. — Т. 35. — С. 1055—1058.
4. Пасхина Т. С., Доценко В. Л., Блинникова Е. И. // Там же. — 1973. — Т. 38. — С. 420—423.
5. Alving B. M., Tankersley D. L., Mason B. L. // J. Lab. clin. Med. — 1983. — Vol. 101. — P. 226—241.
6. Amundsen E., Svendsen L., Vennerod A. M., Laake K. // Chemistry and Biology of the Kallikrein-Kinin System in Health and Disease / Eds J. J. Pisan, K. F. Austen. — Washington, 1976. — P. 215—220.
7. Amundsen E., Gallimore M. J., Aasen A. O. et al. // Thrombos. Res. — 1978. — Vol. 13. — P. 625—636.
8. Arntzen F., Briseid K., Ovigstad E. // Acta pharmacol. (Kbh.). — 1975. — Vol. 36. — P. 145—155.
9. Bourne F. J. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1969. — Vol. 36. — P. 138—145.
10. Claeson G., Aurell L., Karlsson G. et al. // Chromogenic Peptide Substrates: Chemical and Clinical Usage / Eds M. F. Scully, W. Kakkur. — Edinburgh, 1979. — P. 20—31.
11. Colman H. W., Mason J. W., Sherry S. // Ann. intern. Med. — 1969. — Vol. 71. — P. 763—773.
12. Fisher C. A., Schmaier A. H., Addonizio V. P., Colman P. W. // Blood. — 1982. — Vol. 59. — P. 963—970.
13. Callimore M. J., Amundsen E., Larsbraaten M. et al. // Thrombos. Res. — 1979. — Vol. 16. — P. 695—703.
14. Harpel P. C., Lewin M. F., Kaplan A. P. // J. biol. Chem. — 1985. — Vol. 260. — P. 4257—4263.
15. Henriques O. B., Allan L. // Biochem. Pharmacol. — 1972. — Vol. 21. — P. 3163—3169.
16. Jahrreiss R., Haberman E. // Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. — 1971. — Bd 269. — S. 85—100.
17. Kawiak J., Kawalec M., Dolsenko V. L., Yarovaya G. A. // Clin. chim. Acta. — 1984. — Vol. 141. — P. 287—292.
18. Klujt C. // J. Lab. clin. Med. — 1978. — Vol. 9. — P. 83—95.
19. Moriwaki C., Hojima G., Moriya H. // Chem. pharm. Bull. — 1974. — Vol. 22. — P. 975—983.
20. Oh-Ishi S., Webster M. // Biochem. Pharmacol. — 1975. — Vol. 24. — P. 591—598.
21. Pepys M. B., Balts M. L. // Advanc. Immunol. — 1983. — Vol. 34. — P. 141—212.
22. Seki T., Abe K., Mouri T. et al. // Tohoku J. exp. Med. — 1968. — Vol. 96. — P. 113—118.
23. Scott C. F., Colman R. W. // J. clin. Invest. — 1980. — Vol. 65. — P. 413—421.
24. Vaerman J. P., Heremans J. F. // Protides of the Biological Fluids / Ed. H. Peeters. — Amsterdam, 1968. — P. 615—618.
25. Weber K., Osborn M. // J. biol. Chem. — 1969. — Vol. 244. — P. 4406—4412.

Поступила 08.06.87

SIMULTANEOUS ESTIMATION OF FOUR PATTERNS OF THE KALLIKREIN-KININE SYSTEM USING CHROMOGENOUS TRIPEPTIDE AS A SUBSTRATE

V. L. Dolsenko, G. A. Yarovaya, E. A. Neshkova

Central Institute for Postgraduate Training of Physicians, Moscow

Evaluation of the kallikrein-kinine system activity in blood plasma is of importance due to participation of the components of this system in regulation of blood plasma proteolysis. Using D-Pro-Phe-Arg-pNA as a substrate, a procedure for simultaneous estimation of four patterns of the kallikrein-kinine system activity was developed: 1. maintenance of contact phase, 2. content of prekallikrein (1.49 un/ml in normal state), 3. activity of kallikrein (0.104 un/ml), 4. antikallikrein potential (0.700 IU/ml).

И. Л. Хайдукова, Ю. А. Шахов, Н. П. Чернышева, В. Н. Малахов

ПОЛУЧЕНИЕ ФРАКЦИЙ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА, ПРИГОДНЫХ ДЛЯ ИЗБИРАТЕЛЬНОГО ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ ЛИПИДОВ И АПОЛИПОПРОТЕИДОВ ПРИ ПРИГОТОВЛЕНИИ СТАНДАРТНЫХ СЫВОРОТОК

Институт профилактической кардиологии ВКНЦ АМН СССР, Москва

Количественный анализ компонентов липопротеидов (ЛП) сыворотки (плазмы) крови человека, концентрации которых являются важными показателями риска развития коронарного атеросклероза и соответственно ишемической болезни сердца, широко используется в клинико-диагностических и научно-исследовательских лабораториях. В подавляющем большинстве случаев при этом анализируются такие компоненты ЛП, как общий холестерин (ХС), холестерин ЛП низкой и высокой плотности (соответственно ЛПНП-ХС и ЛПВП-ХС), триглицериды (ТГ), аполипопротеиды А-1 и В (апо А-1 и апо В). Для проведения необходимых в таких случаях стандартизации и контроля качества выполняемых анализов используют контрольные и калибровочные материалы (стандарты), к которым предъявляется ряд требований; важнейшими из них являются близость состава каждого из стандартов (матрикса) к составу анализируемых проб и наличие стандартов с широким диапазоном концентраций определяемых компонентов, покрывающим большую часть «нормальных» и «патологических» значений.

Близость матрикса стандартов к матриксу анализируемых проб в наибольшей степени обеспечивается при приготовлении стандартов непосредственно из сыворотки крови человека, например из слитых остатков анализируемых в лабораториях сывороток. Такие слитые сыворотки, имеющие, как правило, нормальные уровни анализируемых компонентов, служат исходным материалом для приготовления сывороток с пониженным и повышенным содержанием анализируемых компонентов. Стандарты с пониженным содержанием компонентов готовят, например, разбавлением исходного материала физиологическим раствором — 0,9 % раствором хлористого натрия [9] или делипопротеидиро-

ванной сывороткой [14]. Использование последней в качестве разбавителя более желательно, так как позволяет в наибольшей степени обеспечить сохранность исходного сывороточного матрикса.

Приготовление сывороток с повышенным содержанием липидов или аполипопротеидов осложняется тем, что прямое добавление этих компонентов в свободном виде в исходную сыворотку невозможно ввиду их водонерастворимости. Это обстоятельство наряду с необходимостью сохранения сывороточного матрикса делает единственно приемлемым способом повышения содержания липидов и аполипопротеидов в контрольно-калибровочных сыворотках добавление к ним нативных ЛП тех классов, в составе которых преобладают соответствующие компоненты. Так, известно, что ТГ сыворотки крови находятся преимущественно в составе ЛП очень низкой плотности (ЛПОНП, а также хиломикрон, которые в крови, полученной паточак, отсутствуют), ХС — в составе ЛПНП и ЛПВП, апо В входит в состав ЛПНП и ЛПОНП, апо А-1 — только в состав ЛПВП.

В литературе представлены разные способы получения фракций сыворотки крови, обогащенных определенным классом ЛП. Классическое разделение ЛП на отдельные классы путем поочередной флотации при ультрацентрифугировании сыворотки в разных плотностях позволяет получить основные классы ЛП в отдельных фракциях [7, 16], однако является весьма трудоемким и дорогостоящим способом, не позволяющим обрабатывать достаточно большие объемы сыворотки.

Указанных недостатков лишено спиртовое осаждение из сыворотки фракций, обогащенных липидами [13, 15]. Этот метод достаточно прост, дает возможность обрабатывать большие объемы сыворотки, но, по нашим данным, получаемый осадок представ-

ляет собой смесь разных классов ЛП, что не позволяет использовать его для избирательного повышения концентрации ХС и ТГ.

Фракционированием ЛП полианионами в присутствии ионов кальция или магния можно отделить ЛПВП от ЛПОНП и ЛПНП [4, 18]. Использование ЛПВП, полученных таким образом, в качестве источника ХС при приготовлении стандартной сыворотки с повышенным содержанием этого компонента, описано ранее [17]. Недостатком данного способа является его низкая эффективность, поскольку из исходной сыворотки выделяется только ЛПВП-ХС, составляющий лишь $\frac{1}{3}$ от общего количества ХС в сыворотке.

Цель настоящей работы заключалась в разработке метода препаративного разделения сыворотки крови человека на фракции, обогащенные преимущественно тем или иным классом ЛП, пригодные для использования при приготовлении контрольно-калибровочных сывороток с избирательно повышенным содержанием ХС, ЛПВП-ХС, ТГ, апо А-1 и апо В.

Методика

В работе использовали сыворотку донорской крови или слитые остатки проб сыворотки крови, поступавшие на анализ в лаборатории Института профилактической кардиологии ВКНЦ АМН СССР и хранившиеся при -80°C не более 6 мес. Реактивы: судановый черный Б («Serva», ФРГ), гепарин 5000 ЕД/мл («Richter», ВНР), сульфат декстрана, полученный из декстрана мол. М. 500 кД, акриламид, N, N-метиленбисакриламид (все «Sigma», США), $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ («Merck», ФРГ). Остальные реактивы отечественного производства марок х.ч. или ос.ч.

Концентрацию ХС определяли методом [3], ЛПВП-ХС — этим же методом в надосадочной жидкости (НЖ), полученной после осаждения ЛПОНП и ЛПНП гепариново-марганцевой смесью [5], ТГ — по методу [11] с расчетом весового содержания по молекулярной массе триолеина, белка — биуретовым методом [2], аполипопротеидов — ракетным иммуноэлектрофорезом [8, 12]. Электрофорез ЛП в полиакриламидном геле (ПААГ) проводили, как описано в [1]. Денситометрию гелей осуществляли с использованием лазерного денситометра «Ультраскан 2202» (ЛКВ, Швеция). Разделение ЛПОНП и ЛПНП фракции ЛПОНП+ЛПНП с применением ультрацентрифугирования проводили по методу [16]. При этом на 4 мл фракции насливали 2 мл раствора хлористого натрия с плотностью 1,006 г/мл и центрифугировали 19 ч при 17°C и 40 000 об/мин в роторе 50,3 на центрифуге L5-50 «Beckman» (Авст-

рия), после чего из пробирок отбирали 2 мл верхнего слоя НЖ, содержащего ЛПОНП.

Получение фракции ЛПОНП+ЛПНП. 1. К сыворотке крови при комнатной температуре добавляли раствор сульфата декстрана (ДС) до конечной концентрации 0,1 % (0,9 мл 11 % раствора ДС в 0,9 % растворе хлористого натрия). Через 30 мин образовавшийся осадок отделяли центрифугированием при 1500 г и 4°C в течение 30 мин и растворяли в таком объеме 5 % раствора хлористого натрия, чтобы конечный объем полученного раствора (фракция ЛПОНП+ЛПНП) составлял $\frac{1}{10}$ объема исходной сыворотки.

2. Для удаления избытка ДС к полученному раствору добавляли 10 % раствор хлористого бария до конечной концентрации 1,5 % и через 25 мин отделяли образовавшийся осадок центрифугированием при 1500 г и 4°C в течение 30 мин. Осадок отбрасывали, а НЖ диализовали при 4°C против трех объемов (по 2 л каждый) 20 мМ трис-солянокислого буфера рН 7,8 с 0,9 % хлористым натрием.

Получение фракций ЛПНП и ЛПОНП. 3. К фракции, полученной на стадии 1, добавляли 2 М раствор хлористого магния до конечной концентрации 0,2 М. Через 45 мин полученную суспензию центрифугировали при 1500 г и 4°C в течение 30 мин. Образовавшийся на поверхности раствора кремовидный слой тщательно отделяли и растворяли в минимальном количестве 10 % хлористого натрия. Полученный раствор (фракция ЛПОНП), объем которого не превышал $\frac{1}{10}$ объема исходной сыворотки, обрабатывали, как указано в стадии 2, используя при этом вместо трис-солянокислого буфера 0,04 М фосфатный буфер рН 7,4.

4. Раствор, оставшийся после отделения кремовидного слоя на стадии 3, обрабатывали, как описано в п. 2 (фракция ЛПНП).

Получение фракции ЛПВП. 5. К НЖ, полученной на стадии 1, добавляли последовательно 11 % раствор ДС и 4,3 М раствор хлористого марганца до конечной концентрации соответственно 0,5 % и 0,2 М. После однократной инкубации при комнатной температуре образовавшийся осадок отделяли центрифугированием в течение 30 мин при 1500 г и 4°C растворяли в 10 % NaCl , содержащем 2 % цитрат натрия; НЖ сохраняли. Конечный объем полученной фракции составлял около 10 % от объема исходной сыворотки. Избыток ионов Mn^{2+} удаляли добавлением 1 М NaOH до рН 8,0, отделяя осадок, образовавшийся при перемешивании на магнитной мешалке в течение 30 мин при комнатной температуре, центрифугированием в течение 20 мин при 1500 г и 4°C . Полученную НЖ обрабатывали, как указано в описании стадии 2, получая фракцию ЛПВП.

Получение фракции «делипопротеидированная сыворотка». 6. Избыток ионов Mn^{2+} из НЖ, полученной на предыдущей стадии после добавления ДС и MnCl_2 , удаляли, как описано в п. 5. Осадок отбрасывали, а к полученной НЖ для удаления ДС добавляли 10 % раствор BaCl_2 до конечной концентрации 1,5 %. Через 25 мин отделяли образовавшийся осадок центрифугированием при 1500 г и 4°C в течение 30 мин. Осадок отбрасывали, а к НЖ для удаления избытка ионов Ba^{2+} добавляли углекислый натрий до конечной концен-

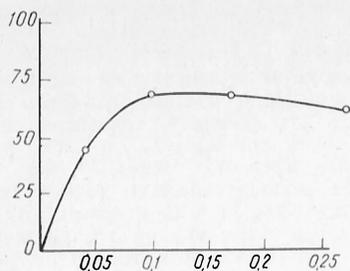


Рис. 1. Доля ХС (в % от содержания ХС в сыворотке), переходящая в осадок при добавлении ДС к сыворотке.

По оси абсцисс — концентрация ДС (в %), по оси ординат — доля ХС в осадке (в %), вычисленная как разность между содержанием ХС в исходной сыворотке и растворе после отделения образовавшегося осадка.

трации 1,5 %. Через 3 ч инкубации при 0°C образовавшийся осадок отделяли центрифугированием при 2000 g и 4°C в течение 20 мин.

Результаты и их обсуждение

На рис. 1 представлена зависимость доли ХС исходной сыворотки, переходящей в осадок при добавлении ДС, от конечной концентрации последнего в сыворотке. Видно, что при концентрации ДС 0,1 %, использованной для разделения ЛП на стадии I, в осадок переходит наибольшее количество ХС, составляющее около 70 % ХС исходной сыворотки.

Приведенные на рис. 2 результаты электрофоретического анализа ЛП показывают, что наличие ХС в осадке, образуемом в этих условиях, обусловлено осаждением ЛПОНП и ЛПНП исходной сыворотки. При этом ЛПВП остаются в НЖ наряду с небольшим количеством ЛПОНП и (или) ЛПНП. Таким образом, фракция, получаемая на стадии I из осадка, образующегося из сыворотки при добавлении к ней ДС до концентрации 0,1 %, содержит только ЛПОНП и ЛПНП, что и дало основание для названия этой фракции (фракция ЛПОНП + ЛПНП).

Добавление к указанной фракции хлористого магния приводило к появлению в ней мелкодисперсных частиц, которые флотировали при центрифугировании при 1500 g, образуя на поверхности раствора кремовидный слой. На рис. 3 представлена полученная в одном из экспериментов зависимость долей ХС и ТГ фракции ЛПОНП + ЛПНП, переходящих в образовавшийся поверхностный слой, а также их

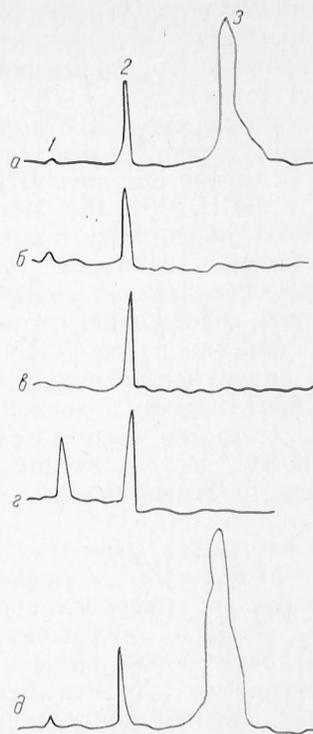


Рис. 2. Результаты электрофоретического анализа ЛП сыворотки и фракций.

a — исходная сыворотка; *б* — фракция ЛПОНП + ЛПНП; *в* — фракция ЛПНП; *г* — фракция ЛПВП. 1 — ЛПОНП; 2 — ЛПНП; 3 — ЛПВП.

отношения (доля ХС к доле ТГ) от конечной концентрации хлористого магния. Видно, что в диапазоне концентраций ионов Mg^{2+} от нулевой до 0,2 M с ростом значения концентрации происходило резкое увеличение доли ТГ, переходящей в состав флотируемых частиц, при относительно медленном увеличении доли ХС и отношения

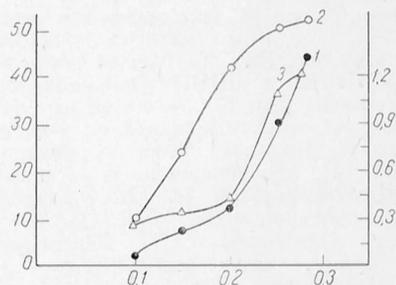


Рис. 3. Зависимость долей ХС (1) и ТГ (2) фракции ЛПОНП + ЛПНП, переходящих в поверхностный слой, и их отношения (3) в этом слое от конечной концентрации ионов Mg.

По оси абсцисс — концентрация $MgCl_2$ в растворе (в M); по осям ординат: слева — доля ХС и ТГ (в %); справа — отношение ХС/ТГ (в мг/мг).

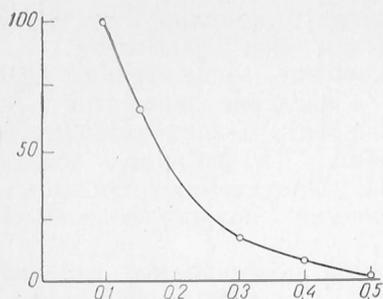


Рис. 4. Осаждение ХС из НЖ, полученной на стадии I при увеличении концентрации ДС в присутствии 0,2 М $MgCl_2$.

По оси абсцисс — концентрация ДС (в %), по оси ординат — концентрация ХС в растворе (в %).

ХС/ТГ. Наиболее полное разделение ХС и ТГ происходило при концентрации $MgCl_2$ 0,2 М. При этой концентрации ионов Mg^{2+} в состав частиц переходило более 40 % исходного количества ТГ и только 12 % ХС (при фракционировании разных сывороток эти значения колебались и в ряде случаев достигали соответственно 70 и 25 %). Отношение ХС/ТГ оставалось весьма низким, характерным для ЛПОНП; это наряду с указанными особенностями изменений долей ХС и ТГ, переходящих в состав флотируемых частиц при разных концентрациях Mg^{2+} , дало основание полагать, что в этих условиях в состав кремовидного слоя переходят в основном ЛПОНП. В соответствии с этим получаемый из кремовидного слоя раствор был обозначен как фракция ЛПОНП, а фракция, получаемая из оставшегося раствора, — как фракция ЛПНП. Отношение ХС/ТГ в последней равнялось 2,9, что указывает на преобладание в ней ЛПНП.

Электрофоретический анализ ЛП указанных фракций (см. рис. 2) показал, что фракция ЛПНП действи-

тельно содержит единственный класс ЛП, соответствующий ее названию, в то время как фракция ЛПОНП наряду с одноименным классом ЛП содержит значительное количество ЛПНП. Последнее обстоятельство, вероятно, связано с неполным разделением ЛП этих классов наряду с низким с исходным содержанием ЛПОНП в сыворотке.

Добавление к НЖ, полученной на стадии I, хлористого марганца до конечной концентрации 0,2 М и дополнительных количеств ДС приводило к образованию осадка, отделяемого при центрифугировании при 1500 г. Данные, представленные на рис. 4, показывают, что при увеличении концентрации ДС до 0,5 % происходит практически полный переход ХС из раствора в осадок. Электрофоретический анализ липопротеидного состава полученного осадка (см. рис. 2) показал, что содержащийся в осадке ХС обусловлен присутствием в нем ЛПВП, что послужило основанием для названия полученного из осадка раствора фракцией ЛПВП. Полученная после центрифугирования НЖ (фракция «делипопротеидированная сыворотка») не обнаруживала присутствия ЛП при электрофоретическом анализе, а концентрация в ней ХС была на пороге чувствительности использованного метода определения.

В таблице приведены конечные концентрации ХС, ТГ, апо А-1 и апо В во фракциях, полученных в типичном опыте при обработке одной из сывороток крови. Видно, что соотношения концентраций указанных липидов и аполипопротеидов в каждой из фракций весьма схожи с таковыми для класса ЛП, преобладающего в данной фракции. Как следствие фракция ЛПОНП + ЛПНП обогащена по сравнению с исходной сывороткой всеми рассматриваемыми компонентами — ХС, ТГ, апо А-1 и апо В; фракция ЛПОНП обогащена преимущественно ТГ, фракция ЛПНП — ХС и апо В. Наибольшая концентрация апо А-1 наряду со значительным содержанием ХС получена во фракции ЛПВП. Таким образом, добавляя к исходной сыворотке полученные указанным способом индивидуальные фракции или их сочетания, можно селективно повышать в ней концентрацию определенных ЛП и их компонентов.

Белково-липидный состав полученных фракций

Фракция	ХС, мм	ТГ, мм	Апо В, мг/дл	Апо А-1, мг/дл
Исходная сыворотка	4,3	0,8	63,5	119,0
ЛПОНП + ЛПНП	22,6	5,6	633,0	24,0
ЛПОНП	4,2	3,9	30,0	Следы
ЛПНП	14,6	1,6	465,1	16,0
ЛПВП	12,1	1,6	145,3	564,2

В настоящей работе для фракционирования ЛП сыворотки крови человека использована их разная способность образовывать нерастворимые комплексы с ДС. Указанный полианион широко применяют для осаждения ЛП, в основном в виде его препаратов с разными молекулярными массами. Нами использована высокомолекулярная форма ДС, получаемая из декстрана с молекулярной массой 500 кД, что позволило осаждать ЛП при более низких весовых концентрациях ДС по сравнению с его формами меньшей молекулярной массы [10]. Избыток ДС легко удаляется из раствора в виде нерастворимого осадка, образующегося при добавлении ионов бария.

Хотя в большинстве случаев для осаждения ЛП с использованием ДС в реакционную смесь вводят ионы Mg^{2+} или Ca^{2+} [4], нами была предпринята попытка осуществить разделение ЛП сульфатом декстрана без введения таковых. Было найдено, что введение в сыворотку крови ДС до конечной концентрации 0,1 % приводит к избирательному осаждению суммы ЛПНП и ЛПОНП (стадия 1).

Отсутствие экзогенно вводимых ионов металлов при получении фракции ЛПОНП + ЛПНП позволило, на наш взгляд, более эффективно использовать это воздействие при разделении ЛП указанной фракции. При подборе условий, обеспечивающих такое разделение, были приняты во внимание следующие положения [4]: 1) прочность связывания с полианионом выше в случае ЛПОНП, чем в случае ЛПНП; 2) повышение ионной силы ослабляет взаимодействие ЛП с полианионами; 3) использование таких катионов, как Mg^{2+} и Ca^{2+} , приводит к образованию менее прочных комплексов ДС с ЛП, чем применение катиона Mn^{2+} . В результате проведенного исследования установлено, что добавление к фракции ЛПОНП + ЛПНП ДС в концентрации 0,2 М приводит к полному осаждению ЛПОНП и лишь частичному — ЛПНП. При этом большая часть последних остается в растворе. Указанные условия не позволяют добиться полной избирательности в осаждении ЛПОНП, но являются вполне приемлемыми для получения фракции, обогащенной данным классом ЛП и соответственно его

основными компонентами — ТГ и апо В (см. рис. 2, таблицу).

Увеличение концентрации ДС до 0,5 % и введение ионов Mn^{2+} (но не Mg или Ca) в концентрации 0,2 М приводило к полному осаждению ЛПНП. Получаемая при этом НЖ практически полностью свободна от ЛП.

Важной особенностью изложенного способа препаративного разделения ЛП является отсутствие ощутимых потерь ЛП: по нашим оценкам, суммарное количество ХС и ТГ в получаемых фракциях составляет не менее 90 % по отношению к исходному количеству каждого из этих липидов.

Необходимо особо отметить, что возможность получения делипопротеинированной сыворотки позволяет использовать ее в качестве разбавителя для понижения концентрации ЛП и их компонентов в исходной сыворотке с сохранением концентраций ее остальных компонентов, что, как указывалось, является одним из важнейших требований к свойствам контрольно-калибровочных материалов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Магачева Е. Л. // *Вопр. мед. химии.* — 1973. — № 6. — С. 652—655.
2. Малый практикум по биохимии. — М., 1979. — С. 124—125.
3. Abel L. L., Levy B. B., Brody B. B., Kendall F. E. // *J. biol. Chem.* — 1952. — Vol. 195. — P. 357—366.
4. Burstein M., Legmann P. *Lipoprotein Precipitation.* — Basel, 1982.
5. Burstein M., Samaille J. // *Clin. chim. Acta.* — 1960. — Vol. 5. — P. 609—613.
6. Burstein M., Scholnik H. K., Morfin R. // *J. Lipid Res.* — 1970. — Vol. 11. — P. 583—595.
7. Chapman J. M., Golgstein S., Lagrange D., Laplaud P. M. // *Ibid.* — 1981. — Vol. 22. — P. 339—358.
8. Curry M. D., Alaupovic P., Suenram C. A. // *Clin. Chem.* — 1976. — Vol. 22. — P. 315—322.
9. Demacker P. N. M., Hijmans A. G. M., van Sommeren-Zondag D. F., Jansen A. P. // *Clin. Chem.* — 1982. — Vol. 28. — P. 155—157.
10. Gidez L. I., Miller G. J., Burstein M., Eder H. A. // *Report of the High Density Lipoprotein Methodology Workshop* / Ed K. Lippel et al. — Bethesda, 1979. — P. 328—342.

11. *Gottfried S. P., Rosenberg B.* // Clin. Chem. — 1973. — Vol. 19. — P. 1077—1078.
12. *Gustafson A., Curry M. D., Alaupovic P., McNally W. J.* // Ibid. — 1978. — Vol. 24. — P. 280—286.
13. *Kuchmak M., Hazlehurst J. S., Olansky A. S., Taylor L.* // Clin. chim. Acta. — 1984. — Vol. 144. — P. 237—243.
14. *Kuchmak M., Taylor L., Olansky A. S.* // Ibid. — 1981. — Vol. 116. — P. 125—130.
15. *Kuchmak M., Taylor L., Olansky A. S.* // Ibid. — Vol. 114. — P. 127—135.
16. *Lindgren F. T.* // Analysis of Lipids and Lipoproteins / Ed. E. C. Perkins. — Champaign, 1975. — P. 204—224.
17. *Proksch G. J., Bonderman D. P.* USA Patent № 4.045.176, 1977.
18. *Proksch G. J., Bonderman D. P.* // Clin. Chem. — 1979. — Vol. 28. — P. 1377—1380.

Поступила 29.08.87

PREPARATION OF HUMAN BLOOD SERUM FRACTIONS, AVAILABLE FOR SELECTIVE ALTERATION IN CONTENT OF LIPIDS AND APOLIPOPROTEINS IN PRODUCTION OF STANDARD SERA

I. I. Khaydukova, Yu. A. Shakhov, N. P. Chernysheva, V. N. Malakhov

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

A procedure is developed for isolation of human blood serum fractions, enriched with lipoproteins of definite classes and meant for production of standard human blood sera. Addition of one of these fractions to native human blood serum enabled to increase distinctly selectively the content of main components of corresponding lipoproteins. Lipoprotein-free blood serum might be used as a diluent for a decrease in concentration of lipoproteins and their components in the initial blood serum, while content of the other components was maintained.

СОДЕРЖАНИЕ

- Горошинская И. А.* Роль изменения каталитических свойств моноаминоксидазы мозга в ответной реакции организма на экстремальные воздействия (Обзор)
- Дайхин Е. И., Федюшкина Н. А., Гусейнов А. Т.* Клиническое значение исследования фактора активации тромбоцитов (Обзор)
- Сургучев А. П.* Полнморфизм генов человека, методы его выявления и связь с сердечно-сосудистыми заболеваниями (Обзор)
- Фещенко С. П., Краснопольская К. Д., Ребрин И. А., Рудаков С. С.* Молекулярная гетерогенность компонентов протеогликановых агрегатов гиалинового хряща человека в норме и при системных костных дисплазиях
- Калашиников С. Г., Кузник Б. И.* Изучение роли тимуса в регуляции синтеза цитокинов
- Коневалова Н. Ю., Чиркина И. А., Чиркин А. А.* Действие факторов, стимулирующих пролиферацию гепатоцитов, на процесс эстерификации холестерина в сыворотке крови при регенерации печени
- Розанов В. А., Копелевич В. М., Савицкий И. В.* Изменения в системе ГАМК головного мозга при многократном инъектировании пиридоксаль-5'-фосфата и его шиффа основания с ГАМК
- Косухин А. Б., Махонина Л. А., Ким Э. А., Сыздыкова Р. Т.* Механизм формирования спектра неэстерифицированных жирных кислот в биологических жидкостях у кроликов с алиментарной гиперхолестеринемией
- Глинка Е. Ю., Сокольников А. А., Коденцова В. М.* Об использовании ПАЛФ-эф-

CONTENTS

- Goroshinskaya, I. A.* Role of alterations in catalytic properties of brain monoamine oxidase in response to extremal conditions 2
- Daikhin, E. I., Fedyushkina, N. A., Guseynov, A. T.* Clinical meaning of the analysis of the platelet activation factor (a review) 10
- Surguchov A. P.* Human gene polymorphism. The methods of its analysis and correlation with cardiovascular diseases 16
- Feschenko, S. P., Krasnopol'skaya, K. D., Rebrin, I. A., Rudakov, S. S.* Molecular heterogeneity of proteoglycan aggregates of human hyalin cartilage in normal state and in systemic bone dysplasia 24
- Kalashnikov, S. G., Kuznik, B. I.* Role of thymus in regulation of cytokines synthesis 33
- Konevalova, N. Yu., Chirkina, I. A., Chirkin, A. A.* Effect of factors stimulating hepatocyte proliferation, on esterification of cholesterol in blood serum during liver tissue regeneration 37
- Rozanov, V. A., Kopelevich, V. M., Savitsky, I. V.* Alterations in GABA-system of brain after multiple administration of pyridoxal-5'-phosphate and its Schiff base with GABA 42
- Kosukhin, A. B., Makhonina, L. A., Kim, E. A., Syzdykova, R. T.* Development of unesterified fatty acids spectrum in biological fluids of rabbits with alimentary hypercholesterolemia 46
- Glinka, E. Yu., Sokol'nikov, A. A., Kodentsova, V. M.* Use of the PALP-effect as

- фекта как показателя обеспеченности витамином В₆
- 52 Шутенко Ж. В., Симхович Б. З., Мейрена Д. В., Калвинш И. Я., Лукевиц Э. Я. Регуляция карнитинзависимого метаболизма жирных кислот в миокарде крыс при помощи 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионата
- 59 Шутенко Ж. В., Симхович, Б. З., Мейрена, Д. В., Kalvin'sh, N. Ya., Lukevitz, E. Ya. Regulation of carnitine dependent metabolism of fatty acids in rat myocardium using 3-(2,2,2-trimethyl hydrazinium) propionate
- 59 Губский Ю. И., Афонина Г. Б., Брюзгина Т. С., Кравченко Э. Я., Радловская З. Т., Прадий Т. П., Задорина О. В., Бордонос В. Г. Влияние левамизола на функциональную активность и жирнокислотный состав лимфоцитов при повреждении клеточных мембран тетрахлорметаном
- 64 Gubsky, Yu. I., Afonina, G. B., Bryuzgina, T. S., Kravchenko, E. Ya., Radlovskaya, Z. T., Prady, T. P., Zadorina, O. V., Bordonos, V. G. Effect of levamisole on the functional activity and fatty acid composition of lymphocytes, cell membrane of which was impaired with tetrachlormethane
- 64 Мелконян М. М., Карагезян К. Г., Овакьян С. Р. Особенности обмена фосфолипидов-глицеридов в мембранах эритроцитов белых крыс при акустическом стрессе
- 64 Melkonian, M. M., Karaguezian, K. G., Novakimyan, S. S. Metabolism of phospholipids-glycerides in rat erythrocyte membranes under conditions of acoustic stress
- 68 Чулкова Т. М. Атерогенные модификации липопротеидов низкой плотности в процессе образования фибрина и фибринолиза
- 72 Chulkova, T. M. Atherogenic modifications of low density lipoproteins during fibrin formation and fibrinolysis
- 72 Шкуматов Л. М. Кинетика исчезновения инсулина из плазмы крови крыс
- 75 Shkumatov, L. M. Kinetics of insulin elimination from rat blood plasma
- 75 Конопля Е. Ф., Детинкин О. Н., Житкович А. В. Прочность связей в ДНК-белковых комплексах ядер клеток печени крыс при старении
- 78 Konoplya, E. F., Detinkin, O. N., Zhitkovitch, A. V. Increase in content of lightly bound complexes of DNA-protein in rat liver cell nuclei with ageing
- 78 Пузач С. С., Горбач З. В. Характеристика продуктов расщепления тиамин-азой I моллюсков
- 82 Puzach, S. S., Gorbach, Z. V. Characteristics of products developed after degradation of thiamin by means of mollusc thiaminase I
- 82 Янкевич Н. Б., Лаугалене Н. Ф., Веса В. С., Хадиев С. Х., Смирнова И. П., Березов Т. Т. Усовершенствованная схема очистки L-лизин- α -оксидазы гриба *Trichoderma* sp.
- 84 Jankevich, N. B., Langalene, N. F., Vesa, V. S., Khaduev, S. Kh., Smirnova, I. P., Berezov, T. T. An improved procedure for purification of L-lysine- α -oxidase from *Trichoderma* sp.
- 84 Шлейкин А. Г., Горькова Л. Б., Пожиленкова К. С., Звездочкин А. Г. О механизме изменения связывания аминов белками плазмы крови при аллергии
- 84 Shleikin, A. G., Gor'kova, L. B., Pozhilenkova, K. S., Zvjozdochkin, A. G. Alterations of amines binding by blood serum proteins in patients with allergic state
- 86 Толкачева Н. В., Левачев М. М., Медведев Ф. А., Кулакова С. Н., Мазурец А. Ф., Борисенко В. Г. Транспорт жирных кислот и продуктов их перекисного окисления сывороточным альбумином при ишемическом и некоронарогенном повреждении сердечной мышцы
- 86 Tolkacheva, N. V., Levachev, M. M., Medvedev, F. A., Kulakova, S. N., Mazurets, A. F., Borisenko, V. G. Transport of fatty acids and products of their peroxidation by blood serum albumin in ischemic and noncoronary impairments of myocardium
- 89 Биленко М. В., Серегина Л. А., Комаров Н. Г., Абикумова О. Ю. Регенерационная способность ишемизированной печени и влияние на нее резекции и экстракта, стимулирующих пролиферацию
- 93 Bilenko, M. V., Seregina, L. A., Komarov, P. G., Abakumova, O. Yu. Regenerating ability of ischemic liver tissue and effect of resection and of proliferation-stimulating factors on liver tissue regeneration
- 93 Корсова Т. Л., Морозова Н. А., Познанская А. А., Курганов Б. И. Сравнительное изучение влияния коферментных форм витамина В₁₂ на монооксигеназную систему и перекисное окисление липидов в печени кроликов при отравлении фенилгидразином
- 97 Korsova, T. L., Morosova, N. A., Poznanskaya, A. A., Kurganov, B. I. Effect of vitamin B₁₂ coenzymes on the monooxygenase system and lipid peroxidation in liver tissue of rabbits poisoned with phenylhydrazine
- 97 Струмило С. А., Киселевский Ю. В., Таранда Н. И., Забродская С. В., Опарин Д. А. Взаимодействие пируватдегидрогеназного комплекса из сердечной мышцы с тиаминдифосфатом и его производными
- 102 Strumilo, S. A., Kiselevsky, Yu. V., Taranda, N. I., Zabrodskaya, S. V., Oparin, D. A. Interaction of the pyruvate dehydrogenase complex from heart muscle with thiamin diphosphate and its derivatives
- 102 Харченко Е. П., Калихевич В. Н., Соколова Т. В., Шестак К. И., Ардемасова З. А. Высокоактивные аналоги опиатоподобных пептидов гисторфина и каппорфина
- 106 Kharchenko, E. P., Kalikhevich, V. N., Sokolova, T. V., Shestak, K. I., Adremasova, Z. A. Highly active analogues of opiate-like peptides historphine and caporphine
- 106 Фортинская Е. С., Торховская Т. И., Нали-

- вайко Е. С., Ключникова Ж. И., Халилов Э. М. Исследование влияния трехкратной гемосорбции на активность лецитинхолестеринацилтрансферазы . . . 109
Li Kha Ren, Vasil'ev, A. V., Orekhov, A. N., Tutel'yan, V. A. Влияние эйкозапентаеновой кислоты и простагландинов различного ряда на аккумуляцию холестерина и пролиферацию клеток интимы аорты человека . . . 112
Mirimskiy, A. S., Milova, O. G., Rosly, I. M., Ermak, T. N., Vengerov, Yu. Ya., Koyudenko, L. G., Deglyareva, L. V., Sidakov, B. M., Linberg, L. F. Компьютерная диагностика некоторых инфекционных болезней по газохроматографическому профилю липидов сыворотки крови . . . 115
Vasil'ev, A. V., Vorobeychik, T. A., Plecitskiy, K. D., Tutel'yan, V. A. Активность лизосомальных протеиназ в печени, селезенке, тимусе и перитонеальных макрофагах мышей при иммунизации тимусзависимым и тимуснезависимым антигенами . . . 121
Ovchinnikova, L. N., Gorkin, V. Z., Anokhina, I. P. Особенности изменений каталитических свойств мембраносвязанных моноаминоксидаз при алкогольной интоксикации . . . 124

Методы биохимических исследований

- Доценко В. Л., Яровая Г. А., Нешкова Е. А. Использование трипептидного хромогенного субстрата для одновременной оценки четырех показателей активности калликреин-кининовой системы . . . 128
Dolsenko, V. L., Yarovaya, G. A., Neshkova, E. A. Simultaneous estimation of four patterns of the kallikrein-kinine system using chromogenous tripeptide as a substrate . . . 128
Khaydukova, I. I., Shakhov, Yu. A., Chernysheva, N. P., Malakhov, V. N. Получение фракций сыворотки крови человека, пригодных для избирательного изменения уровня липидов и аполипопротеинов при приготовлении стандартных сывороток . . . 134

Methods of Biochemical Investigations

- Доценко В. Л., Яровая Г. А., Нешкова Е. А. Simultaneous estimation of four patterns of the kallikrein-kinine system using chromogenous tripeptide as a substrate . . . 128
Khaydukova, I. I., Shakhov, Yu. A., Chernysheva, N. P., Malakhov, V. N. Preparation of human blood serum fractions, available for selective alteration in content of lipids and apolipoproteins in production of standard sera . . . 134

Адрес редакции журнала:

Москва 109801, Солянка, 14
 АМН СССР
 Тел. 297-16-44

Зав. редакцией Л. А. Фирсова

Редактор К. И. Кочкирёва

Художественный редактор Р. Р. Катеева

Технический редактор Н. К. Евстигнеева

Корректор Л. Г. Воронина

Сдано в набор 23.01.89. Подписано в печать 14.02.89. Формат 70×108¹/₁₆. Бумага кп.-ж. нмп.
 Печать высокая. Усл. печ. л. 12,60. Усл. кр.-отт. 13,13. Уч.-изд. л. 14,89.
 Тираж 1558. Заказ 146. Цена 1 р. 30 к.

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

СПИСОК СТАТЕЙ, ДЕПОНИРОВАННЫХ В ВИНИТИ

УДК 577.121.9

Хромато-масс-спектрометрический профиль метаболитов мочи. Антошечкин А. Г., Татур В. Ю. (Рукопись деп. в ВИНИТИ 23.04.87, № 2863-В)

УДК 612.398.12:617.723

Белки сыворотки крови больных церебральным атеросклерозом и при экспериментальной гиперхолестеринемии. Кулабухов В. М., Волошин П. В., Костюковская Л. С., Точилковский А. С., Божко Г. Х. (Рукопись деп. в ВИНИТИ 23.04.87, № 2862-В).

УДК 577.125:611.71/72:616-092.9

Роль перекисного окисления липидов в развитии атрофии костной ткани альвеолярного отростка. Козлянина Н. П., Левицкий А. П., Скляр В. Е. (Рукопись деп. в ВИНИТИ 23.04.87, № 2864-В)

УДК 616.127-005.8:616-008.9:616.45-001.1/3

Особенности перекисного окисления липидов в коре головного мозга при некрозе миокарда и значении эмоционального стресса в их возникновении. Якушев В. С., Давыдов В. В. (Рукопись деп. в ВИНИТИ 23.04.87, № 2865-В)

УДК 613.6:615.9:547.724

Антирадикальные свойства некоторых соединений фуранового ряда. Тарасов В. В., Шнейвайс В. Б. (Рукопись деп. в ВИНИТИ 03.06.87, № 3928-В)

УДК 617.7-089.243:341.64

Кинетика и термодинамика диффузионных процессов транспорта лекарственных препаратов, вводимых в глаз с помощью мягких контактных линз. Киваев А. А., Михайлов А. И., Кешелава М. Г., Бабич Г. А., Шведова М. К., Зеленская М. В., Шилова И. А. (Рукопись деп. в ВИНИТИ 02.06.87, № 3929-В)

УДК 616-008.922.1-092:612.275.1-092.9

Динамика структуры тканевого окисления в организме при горной болезни. Аллик Т. А. (Рукопись деп. в ВИНИТИ 03.06.87, № 3927-В)

УДК 577.175.822:547.262

Сравнительное исследование компонентов холинергической системы мозга крыс, различающихся по выраженности алкогольной мотивации. Чумакова О. В., Островский Ю. М. (Рукопись деп. в ВИНИТИ 03.06.87, № 3925-В)

УДК 577.17+616.831:577.147

Циклические нуклеотиды и простагландины головного мозга крыс при воздействии на организм кардиотоксической дозы адреналина. Денисов В. М., Рукавишников С. М., Горбач Т. В. (Рукопись деп. в ВИНИТИ 03.06.87, № 3926-В)

УДК 612.233-088.1+616.24-008.7-074

Применение хромато-масс-спектрометрии для прецизионного исследования биологических сред детского организма. Дмитриев М. Т., Растильников Е. Г., Малышева А. Г. (Рукопись деп. во ВНИИМИ 05.06.87, № Д-13544)

УДК 616-074:543.422.25(048.8)

Исследование изменения времени ЯМР спинрешеточной релаксации протонов воды в сыворотке крови онкологических больных. Аксенев С. И., Галил-Оглы Г. А., Калачихина О. Д., Боженко В. К. (Рукопись деп. в ВИНИТИ 17.07.87, № 5184-В)

УДК 616.61-089.843-097-06:616.633.1-06-039.11

Семидневный ритм отторжения в энзимурии при аллотрансплантации почки в эксперименте. Тюнина Г. К., Макаров А. А. (Рукопись деп. в ВИНИТИ 17.07.07, № 5181-В)

УДК 577.17:616.12+616-002.4+661.127

Динамика содержания простагландинов и циклических нуклеотидов в сердце крыс при экспериментальном некрозе миокарда. Денисов В. М., Рукавишников С. М., Горбач Т. В. (Рукопись деп. в ВИНИТИ 17.07.87, № 5182-В)

УДК 612.397.2-591.424:616-007.17

Влияние селенита натрия на состав липидов и их перекисное окисление в ткани легкого при белково-энергетической недостаточности.

Бродский И. З., Зуев И. В., Мазгу-
тов В. З.
(Рукопись деп. в ВИНТИ 17.07.87,
№ 5183-В)

УДК 543.42:[576.3.31+576.72

Спектрофотометрический метод определения
структурной целостности лизосом из тканей
животных. Сяткин С. П., Фролов В. А.
(Рукопись деп. в ВИНТИ 25.11.87,
№ 8330-В)

УДК 615.225.22

Исследование α_2 - и β_1 -адренореактивных си-
стем у крыс *in vivo*. Кулинский В. И.,
Герцог Г. Е., Плотников Н. Ю.
(Рукопись деп. в ВИНТИ 25.11.87,
№ 8331-В)

УДК 591.1.017.3

Влияние стрессирующего воздействия на уро-
вень продуктов перекисидации липидов и на
морфологию митохондрий печени крыс.
В. Г. Голотин, В. А. Гоненко, Л. М.
Фригидова
Таблиц 2. Иллюстраций 4. Библиография: 12
названий. Рукопись депонирована в ВИНТИ
24.02.88, № 1510—13)

УДК 615.322.015:616.36—008.6+616—008.
939.15:616.36—002—009

Влияние флавоноидных препаратов на желче-
образование и перекисное окисление липидов
при поражении печени. Н. П. Скакун, Н. А.
Ковальчук, И. П. Мосейчук, Я. Я.
Гиль
Таблиц 1. Библиография: 27 названий.
(Рукопись депонирована в ВИНТИ 24.02.88,
№ 1509—13)

УДК 612.115.015.3

Обоснование возможности использования
[¹³¹I]-гепарина в исследовательских целях.
И. В. Михалева, Е. Л. Рудзевич, О. А.
Терсенов
Иллюстраций 4. Библиография: 4 названия.
(Рукопись депонирована в ВИНТИ 24.02.88,
№ 1508-13)

УДК 577.124:616.391.04

Влияние различных доз окситиамина на ак-
тивность ключевых ферментов пентозофосфат-
ного пути в эпидидимальной жировой ткани
крыс. Т. Н. Пыжик
Таблиц 2. Библиография: 14 названий.
(Рукопись депонирована в ВИНТИ 15.03.88,
№ 2041—13)

УДК 577.1:681.3

Сравнение нескольких алгоритмов расчета ко-
эффициентов уравнения Михаэлиса — Ментен.
В. В. Бергольц
Библиография: 16 названий.
(Рукопись депонирована в ВИНТИ 4.05.88,
№ 3402—13)

УДК 577.158

Тетразолий — редуктазная активность сыво-
роточных липопротеидов и неионных детер-
гентов полиоксиэтиленового ряда. Т. Я. На-
дилова, И. П. Слуцкий
Таблица 1. Иллюстраций 3. Библиография: 25
названий.
(Рукопись депонирована в ВИНТИ 4.05.88,
№ 3403—13)

УДК 615.322:577.125.33:577.175.8

Экстракт *Eleutherococcus senticosus* и его
гликозиды — модуляторы биосинтеза эйко-
занов и высвобождения арахидоновой кис-
лоты в тромбоцитах человека. В. Г. Спры-
ги, И. В. Дардымов, А. Г. Паносян,
Г. А. Геворкян
Таблиц 2. Библиография: 7 названий
(Рукопись депонирована в ВИНТИ 4.05.88,
№ 3404—13)

УДК 615.272.4.014.425:547.587.1/2].015.4

Биологические свойства некоторых йодокси-
бензиламино-производных карбоновых кис-
лот. В. А. Матвеев, Т. В. Тарасова,
Г. Н. Пименова, И. И. Слободяник
Таблиц 5. Библиография: 11 названий.
(Рукопись депонирована в ВИНТИ 5.05.88,
№ 3458-13)

УДК 616-018.2-031.81+616.13.14.002.2:616
153.1—073.584

Количественное определение изоэнзимов кис-
лой и щелочной фосфатазы в сыворотке кро-
ви. О. М. Демидова, И. И. Глазыри-
на, С. Н. Зайцева.
Таблица 1. Библиография: 18 названий.
(Рукопись депонирована в ВИНТИ 5.05.88,
№ 3459—13)

УДК 615.015.43:577.152.313

Активность фосфатаз соединительноткан-
ных капсул, лизосом и митохондрий печени крыс
при подкожной имплантации антиалкогольно-
го препарата пролонгированного действия.
К. Л. Коноплицкая, Г. А. Пхакадзе,
Т. Н. Позднякова, Л. Ф. Наражайко
Таблиц 2. Библиография: 22 названия.
(Рукопись депонирована в ВИНТИ 5.05.88,
№ 3460—13)

УДК 615.246.2:547.963—018.54

Иммуносорбенты медицинского назначения на основе силикохромов. Д. В. Кулаев, И. П. Андрианова, Т. К. Люкова, Д. Д. Петруни, А. Б. Рабовский, О. В. Силахтьева
Таблиц 2. Библиография: 21 название.
(Рукопись депонирована в ВИНТИ 5.05.88, № 3461—13)

УДК 613.287.3:613.295.1-07:612.398

О начальном этапе ассимиляции белков у детей раннего возраста. В. Р. Николаевская, О. К. Нетребенко
Таблиц 3. Иллюстраций 2. Библиография: 11 названий.
(Рукопись депонирована в ВИНТИ 5.05.88, № 3462—13)

УДК 615.916'1.815/819-057-085.327:553.741-036.8-07

Экспериментальное изучение влияния сульфидной минеральной воды «Редант 4Р» на организм животных при хроническом воздействии свинца. В. Н. Гобеев, И. В. Насонов, А. С. Туаева, Т. Т. Березов
Таблиц 2. Библиография: 8 названий.
(Рукопись депонирована в ВИНТИ 5.05.88, № 3463—13)

УДК 615.365:577.164.111.042.2.012.8

Особенности проявления авитаминоза В₁ у мышей при парентеральном введении суспензированного в масле окситиамина. Т. И. Зиматкина, Р. В. Требухина, Д. А. Опарин, Ю. М. Островский
Таблиц 2. Иллюстраций 3. Библиография: 7 названий.
(Рукопись депонирована в ВИНТИ 25.05.88, № 3464—13)

УДК 616-097+616.33-002.44+616.342-002.44

Изучение некоторых свойств иммуноглобулинов сыворотки крови при язвенной болезни двенадцатиперстной кишки. Клинецова С. П., Буглак Н. П., Мелешкина К. Г. (Рукопись деп. в ВИНТИ 20.06.88, № 4804-В).

УДК 577.121.547:898.057:543.51

Ферментативная модификация остатка глицина в молекуле мембраноактивного комплек-

сона. Головенко Н. Я., Зиньковский В. Г., Грень А. И., Мазепа А. В., Тимофеев О. С., Плотникова Е. К., Лукьяненко Н. Г., Басок С. С. (Рукопись деп. в ВИНТИ 20.06.88, № 4805-В).

УДК 616.65-097

Белки секрета предстательной железы человека. Николаев А. А., Аншакова Н. И., Ильков А. Л. (Рукопись деп. в ВИНТИ 20.06.88, № 4800-В).

УДК 577.3/632.95

Ингибирование окисления НАД-зависимых субстратов митохондриями как возможный механизм действия зеллека на метаболизм. Загородняя С. В., Кур Д. А., Гайнутдинов М. Х., Букреева С. А., Пак Л. В., Бойко И. Б., Нуритов Н. Р. (Рукопись деп. в ВИНТИ 20.06.88, № 4802-В).

УДК 616.379-008.64:615.246.2

Характеристика гормонопоглотительной способности неселективных углеродных сорбентов. Трусев В. В., Ситников В. А., Марзин С. А., Пушкарев В. П., Мартиросов Ю. К., Портной О. А. (Рукопись деп. в ВИНТИ 20.06.88, № 4803-В).

УДК 616.81

Влияние хронической алкогольной интоксикации на обмен лития у крыс. Скальный А. В. (Рукопись деп. в ВИНТИ 20.06.88, № 4807-В).

УДК 616.36.-002-009-02:615.917:547.412.133-085.246.9

Влияние гепатопротекторов фосфолипидной природы на активность ферментов печени и сыворотки крови при экспериментальном СС₄-гепатите. Венгеровский В. И., Саратиков А. С., Паульс О. В., (Рукопись деп. в ВИНТИ 20.06.88, № 4806-В).

УДК 616.151.514:612.124:547.968.32

Содержание ДНК в плазме крови больных гемофилией. А. Паньков В. Н., Садыков С. А., Халтурина Т. И., Ворожцова С. И. (Рукопись деп. во ВНИИМИ 16.05.88, № Д-15394).