

ТОМ 35

ВЫПУСК 4

ИЮЛЬ — АВГУСТ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

ВОПРОСЫ  
МЕДИЦИНСКОЙ  
ХИМИИ



МОСКВА · МЕДИЦИНА · 1989



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

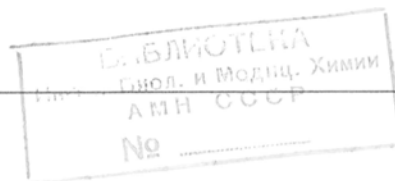
Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. Б. СПИРИЧЕВ (зам. редактора), И. П. ЛШМАРИН, 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:

БАЕВ А. А. (Москва)  
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)  
ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)



Т. М. Чулкова

**РОЛЬ ПРОЦЕССОВ ТРОМБООБРАЗОВАНИЯ В АТЕРОСКЛЕРОЗЕ  
(ОБЗОР)**

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Атеросклероз представляет собой заболевание, характеризующееся очаговым утолщением интимы крупных и средних артерий. Ключевую роль в развитии атеросклеротического процесса играет накопление липидов в стенке артерий [3, 14, 53]. На ранних стадиях заболевания липиды накапливаются главным образом виутриклеточно, образуя типичные липидные пятна или липидные полосы, а позднее обнаруживаются и вне клеток среди соединительнотканых волокон субэндотелия. Липидные пятна либо подвергаются регрессии, либо служат основой для образования фиброзных бляшек. Атеросклеротические бляшки характеризуются плеоморфизмом, отражающим как множество факторов, предрасполагающих к их формированию, так и продолжительность периода их развития. На всех этапах развития атеросклероза обнаруживаются отложение липидов, главным образом холестерина и его эфиров, пролиферация гладкомышечных клеток, накопление соединительнотканых компонентов. Механизмы этих процессов, а также факторы, являющиеся первичными и иницирующими, до сих пор не выяснены. Экспериментальные и клинические исследования, проводимые за последние 30 лет, свидетельствуют о том, что в атерогенезе принимают участие клеточные элементы артериальной стенки, липопротеиды крови и тромбогенные факторы [2, 50, 75].

В настоящее время наиболее популярными теориями патогенеза атеросклероза являются «липопротеидная» или «липидная инфильтрация» и теория «ответа на повреждение». Главную роль в генезе атеросклероза, по мнению одних авторов, играют липопротеиды, по мнению других — тром-

богенные механизмы. Значение плазменных липидов, в частности холестерина, в атерогенезе впервые было доказано в работах Н. Н. Личикова и его школы еще в 1913 г. Последующие клинические и популяционные исследования подтвердили эти работы и показали, что распространенность и выраженность ишемической болезни сердца и других клинических проявлений атеросклероза часто соответствуют уровню холестерина в крови [4, 16].

Основной транспортной формой холестерина в сосудистом русле, а также регулятором метаболизма холестерина в тканях являются липопротеиды низкой плотности (ЛНП). При развитии атеросклеротического поражения главным источником холестерина, накапливающегося в сосудистой стенке, считаются ЛНП [33]. Ангиографические исследования выявили связь между высоким уровнем холестерина циркулирующих ЛНП и коронарным атеросклерозом [28, 34, 40]. Повышение концентрации ЛНП в крови является одним из главных факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний [55]. Однако клинические проявления атеросклероза (ишемическая болезнь сердца, преходящая ишемия мозга, перемежающаяся хромота и др.) можно наблюдать и при нормальном уровне холестерина в крови [32, 51], что не позволяет объяснить патогенез атеросклероза лишь отложением холестерина в сосудистой стенке. Несомненно, механизмы, приводящие к пролиферации артериальных гладкомышечных клеток, имеют существенное значение в патогенезе атеросклероза, и тромбогенным факторам отводится важное место в этом процессе [53].

Отцом тромбогенной теории атеросклероза является Рокитанский, кото-

рый еще 140 лет назад указывал, что ремнанты неорганизованных тромбоцитарных веществ, откладывающиеся на поверхности артерий, со временем дают начало жировым компонентам атеросклеротических бляшек [57]. Но ни он, ни его последователи не могли объяснить, каким образом ремнанты белковой природы «превращаются» в липиды [20, 27, 29, 42, 43].

Как известно, тромбоз является одним из осложнений атеросклероза, так как атеросклеротическое поражение сосудов, приводящее к повреждению и гибели эндотелиального слоя, создает условия для тромбообразования. На изъязвлениях и трещинах атеросклеротических бляшек для непосредственного взаимодействия с тромбоцитами становятся доступными гладкомышечные клетки субэндотелия и фибриллярный коллаген [25]. Тромботические процессы не только являются последствием атеросклероза, но и могут участвовать в его генезе и прогрессировании [54, 59].

Механизмы тромбообразования сложны и включают следующие основные факторы: а) тромбоциты и факторы активации свертывания; б) гемодинамические и реологические факторы; в) факторы, ответственные за повреждение сосудистой стенки, в частности эндотелия.

В патогенезе атеросклероза повреждение эндотелия (приводящее к тромбозу, а в последующем при организации тромба к фиброзу) также играет важную роль. Атеросклеротическая бляшка рассматривается как реакция сосудистой стенки на ее повреждение. Большое значение в развитии этих представлений о происхождении атеросклероза имеют работы [60], согласно которым атеросклероз развивается в результате повторных повреждений артериальной интимы или эндотелиального покрова, что ведет к миграции и пролиферации гладкомышечных клеток. Развитие бляшки с регионарным разрастанием клеток в интимальном слое является ответной реакцией сосудистой стенки на ее повреждение. Функцию медиатора репарации стенки осуществляют тромбоциты, адгезирующие на месте повреждения и секретирующие ростовые факторы.

Однако митогены могут продуцироваться не только тромбоцитами, но и клетками артериальной стенки: макро-

фагами, эндотелиальными и гладкомышечными клетками [13, 50]. Следовательно, участие тромбоцитов в тромбоцитарных и эмболических осложнениях атеросклеротического поражения является очевидным, но их роль в инициации атеросклероза остается неясной.

Значение тромбоцитарных процессов для атерогенеза исследуется главным образом в опытах на животных с экспериментально индуцированным атеросклерозом, который развивается в результате либо механического и токсического повреждения эндотелиального слоя, либо диеты, приводящей к гиперхолестеринемии. Участие тромбоцитов наиболее отчетливо проявляется в связи с атеромой, индуцированной механическим и токсическим повреждением артериальной стенки [19, 23, 24, 44, 45]. Было показано, что при повторных введениях полиэтиленового катетера в аорту кроликов, содержащихся на нормальной диете, в местах контакта инородного тела с сосудистой стенкой образуются тромбоцитарно-фибриновые тромбы. Эти повреждения быстро обогащаются липидами [45]; увеличивается количество свободного холестерина и значительно возрастает количество эфиров холестерина. После этих механических воздействий развивались повреждения, подобные жировым пятнам, а также бляшки, состоящие из гладкомышечных клеток, но не дающие положительного окрашивания на липиды. Если катетер оставляли внутри сосуда, наблюдали образование повреждений, подобных атеросклеротическим бляшкам человека, с глубоко локализованными липидными скоплениями, пенными клетками, кальцификацией. Повреждение могло быть ингибировано или предотвращено при введении антитромбоцитарной сыворотки [46, 47].

Аналогичные атероматозные повреждения сосудистой стенки были получены при введении в сонную артерию кролика в течение 4 нед человеческой сыворотки, являющейся цитотоксичной для лимфоцитов кролика [23]. Прогрессирование и рост подобных повреждений происходят в результате освобождения тромбоцитарных ростовых факторов, которые вместе с другими факторами крови вызывают миграцию и пролиферацию гладкомышечных клеток в интиму артерий [76]. При прекращении механических и токсических

воздействий на сосуды наблюдали регрессно повреждений [24].

Совершенно иной ответ артериальной стенки получали после однократового удаления эндотелия при помощи катетера с резиновым баллончиком. Взаимодействие тромбоцитов с поврежденной поверхностью было кратковременным и имело характер монослойного. Развитие повреждения наблюдали в течение 2 лет. Было отмечено отложение в интиме большого количества липидов, главным образом эфиров холестерина [10, 26, 27, 58]. Через 6 мес после деэндотелизации обнаруживали бляшки, подобные атеромам у человека [48].

Эти два типа повреждений имели общие проявления: вызывали тромбоцитарную реакцию, ингибировались или предотвращались при резком снижении уровня циркулирующих тромбоцитов, характеризовались миграцией из меди гладкомышечных клеток, их пролиферацией, формированием неоинтимы и накоплением липидов. Но если первое повреждение, индуцированное введением полиэтиленового катетера, регрессировало после прекращения воздействия на сосудистую стенку, то второе, вызываемое удалением эндотелиального слоя, являлось прогрессирующим в отношении как пролиферации гладкомышечных клеток, так и накопления липидов. Накопление липидов связано, по-видимому, с увеличением синтеза гладкомышечными клетками сульфатированных гликозамингликанов в местах повреждения, а также с усилением проникновения липопротеидов из крови в сосудистую стенку [11, 49]. Почему одно повреждение является регрессирующим, а другое — нет, неизвестно. Эти исследования указывают на возможность формирования холестеринсодержащих атеросклеротических бляшек при отсутствии гиперхолестеринемии, когда основным этиологическим фактором является повреждение сосудистой стенки.

При изучении артериальных повреждений, индуцированных диетой, роль тромбоцитов оставалась не совсем ясной. У животных с гиперлипидемией при электронно-микроскопическом исследовании аорты раньше всего обнаруживаются адгезия и проникновение моноцитов в субэндотелиальный слой, в то время как адгезию и активацию тромбоцитов отмечают при разрыве эн-

дотелиального покрова. Гиперлипидемическая диета может способствовать повреждению эндотелия [18, 61, 69, 74, 78]. Богатая холестерином диета способствует десквамации эндотелия и некрозу гладкомышечных клеток сосудистой стенки [35]. Изменения интимы, особенно интимальные утолщения и образование неоинтимы, обычно предшествуют появлению липидов при атеросклеротических поражениях, вызываемых диетой.

Может ли движение эндотелиальных клеток, их миграция или сокращение, приводить к обнажению субэндотелиальных структур, прикреплению и активации тромбоцитов с последующей пролиферацией гладкомышечных клеток? При длительной гипертензии, вызванной введением ангиотензина, происходит не только прилипание тромбоцитов к эндотелию, но и утолщение интимы [37]. Эндотелиальные клетки после воздействия на них сигаретного дыма выглядят интактными при микроскопическом исследовании, но тем не менее индуцируют адгезию тромбоцитов на своей поверхности [77]. В перфузируемых сосудах тромбоциты адгезируются в местах соединения эндотелиальных клеток [21]. Возможно, что фибриллярный матрикс вытесняет из субэндотелия вещества, посредством которых прикрепляются адгезированные тромбоциты.

Активацию тромбоцитов может вызывать как обнажение субэндотелия, так и уменьшение образования или ингибирование мощного ингибитора агрегации тромбоцитов простаглицлина. Неповрежденный эндотелий сосудистой стенки обладает атромбогенными свойствами, определяющимися прежде всего способностью синтезировать и секретировать простаглицлин. В местах повреждения сосудистой стенки, лишенной слоя эндотелиальных клеток, резко снижены биосинтез и секреция простаглицлина, и тромбоциты беспрепятственно контактируют с компонентами субэндотелия. Это приводит к активации фосфолипазы  $A_2$  мембран тромбоцитов, образованию тромбоксана  $A_2$  и, следовательно, к усилению агрегации тромбоцитов на поверхности деэндотелизированной сосудистой стенки. Возможным механизмом ингибирования синтеза простаглицлина является наблюдаемое при гиперхолестеринемии увеличение перекисного окисления ли-

пидов, приводящего к образованию 15-гидроперокси арахидоновой кислоты и 13-гидроперокси линолевой кислоты, ингибиторов синтеза простаглицлина [41]. Липиды могут вызывать гиперреактивность тромбоцитов; увеличение количества холестерина и ЛНП в крови повышает агрегационную способность тромбоцитов [63, 72, 79].

Изучение роли тромботических процессов в атерогенезе показало, что началу и прогрессированию атеросклероза способствуют не только тромбоцитарные реакции, но и фибриновые отложения в стенках артерий [65, 76]. Гиперхолестеринемия может активировать образование фибрина; лица, содержащиеся на диете, богатой холестерином, обладают повышенной свертываемостью крови [36, 39, 70, 50]. Липопротеиды очень низкой плотности, и в большей степени ЛНП, сорбируют на своей поверхности кинингенирующие компоненты: калликреин, прекалликреин, XII фактор и высокомолекулярный кининоген [6, 52]. Кининогеназная активность фракций ЛНП, обусловленная калликреином, в 4 раза выше у больных с гиперлипемией при нефротическом синдроме, чем у здоровых людей. Проникновение ЛНП, ассоциированных с калликреином, в сосудистую стенку может вызывать образование внутривеночных тромбов и отложение фибрина. При морфологических исследованиях атеросклеротически измененных сосудов обнаруживают массивные накопления фибрина в местах наибольшего отложения липидов [76]. Эпидемиологические исследования указывают на связь между гиперфибриногемией, развитием атеросклероза и увеличением смертности от сердечно-сосудистых заболеваний [68].

При церебральном атеросклерозе отложение фибрина чаще всего обнаруживают в области бифуркаций средней церебральной артерии, где и происходит отложение липидов [62]. По-видимому, отложение фибриногена в интима предшествует отложению липопротеидов, особенно на ранних стадиях развития атеросклероза. С возрастом наблюдается увеличение накопления как фибрина, так и ЛНП.

При иммобилизации ЛНП в сосудистой стенке [65] в организуемом тромбе, главными компонентами которого являются фибриноген и фибрин, содержатся низкие концентрации неас-

социированного с липопротеидами холестерина и высокие концентрации неиммобилизованных ЛНП. Концентрация ЛНП в организуемом тромбе в 2—3 раза больше, чем в набухшей интимае в начальных стадиях атеросклероза. Однако в более развитых фибриновых бляшках содержится большое количество холестерина ЛНП и фибрина. Преобладающую часть ЛНП составляют прочно связанные ЛНП. По мере прогрессирования атеросклероза значительно увеличивается концентрация прочно связанных ЛНП в атеросклеротических бляшках. Иммобилизованные ЛНП освобождались под действием плазмина. Предполагают, что ЛНП ассоциированы с нерастворимым фибрином, который является компонентом атеросклеротических бляшек. Вдоль фибрина, лежащего под коллагеном, мигрируют гладкомышечные клетки. Отложение липидов обнаруживается по ходу фибриновых волокон в местах инвазии гладкомышечных клеток. Фибрин может играть важную роль не только в обеспечении подложки для миграции и пролиферации гладкомышечных клеток, но и в «привлечении» макрофагов в артериальную стенку и в специфическом связывании ЛНП. Прочное связывание ЛНП может быть главным фактором накопления холестерина при атерогенезе.

При повторных тромботических отложениях на стенке артерий (аорта и коронарные артерии) фибрин, остающийся неорганизованным в глубине повреждений, обязательно связан с пенящими клетками, которые тесно прилегали к фибриновым ремнантам и казались погруженными в них [30]. Эта картина была морфологически идентична той, которую наблюдали в атеросклеротических бляшках, иницированных и прогрессирующих при фибриноидном пропитывании интимы аорты. Остается неясным происхождение пенящих клеток (макрофаги, гладкомышечные клетки или миогиостициты) и механизмы связи между пенящими клетками и фибриновыми ремнантами.

В процессах гемостаза и регенерации принимает активное участие фибронектин [1, 5]. В стенках крупных и средних сосудов он обнаруживается преимущественно в гликокаликсе, субэндотелии и базальной мембране эндотелиальных клеток. Именно эти структуры вовлекаются в начальные стадии

тромботического и атеросклеротического процессов. Фибронектин выполняет функцию коллагенового рецептора, обеспечивает прилипание тромбоцитов к субэндотелиальному остову сосудов. Он участвует в организации тромботических масс и эндотелизации мест повреждения сосудов. В фибрино-тромботическом сгустке нити фибронектина откладываются вокруг тромбоцитов, окутывая весь микросгусток, а также по ходу волокон фибрина, соединяясь с ним как путем нековалентной адсорбции, так и путем ковалентного связывания, катализируемого XIIIa фактором. Ковалентное связывание фибрина и фибронектина стимулирует миграцию фибробластов, эндотелиальных клеток и макрофагов, тем самым способствуя регенерации повреждения. Следовательно, фибронектин может участвовать как в начальных стадиях атеросклеротического процесса, так и в развитии его осложнений, таких как тромбообразование и артериолосклероз. Было показано, что в начальных стадиях атеросклероза происходит накопление фибронектина в интиме в местах повреждения сосудов. На последующих стадиях атеросклероза фибронектин появляется в фиброзных бляшках в количестве, прямо пропорциональном содержанию клеточных элементов. Позднее он равномерно распределяется по фиброзной бляшке, однако его абсолютное количество несколько уменьшено [67].

С целью выяснения механизма накопления липидов в сосудистой стенке при атеросклеротическом поражении и роли фибриногена и фибронектина в этом процессе нами было исследовано взаимодействие липопротеидов с иммобилизованным фибронектином и фибриногеном. Было показано, что ЛНП взаимодействуют как с фибриногеном так и с фибронектином, но обладают большим сродством к фибронектину. Связывание ЛНП с иммобилизованным фибриногеном значительно увеличивалось в присутствии низких концентраций растворимого фибронектина, что свидетельствовало о возможности образования на поверхности трехкомпонентных комплексов фибриноген — фибронектин — ЛНП [8]. Взаимодействие ЛНП с фибронектином увеличивается в 10 раз после частичной деградации апопротеина В в молекуле ЛНП тромбином [7]. Очевидно, в про-

цессе реакций тромбообразования возможны ферментативная модификация ЛНП и образование комплексов ЛНП либо с фибриногеном или фибронектином, либо с продуктами их деградации. При инкубации ЛНП с физиологическими концентрациями фибриногена и фибронектина в присутствии тромбина до 20 % ЛНП, находящихся в растворе, связывается с фибриновым гелем. После обработки фибринового сгустка плазмином освобождающиеся ЛНП находились в комплексе с продуктами деградации фибронектина и фибрина, имели деградированный апо В и больший отрицательный заряд, чем исходные ЛНП. При инкубации перитонеальных макрофагов мыши с такими модифицированными липопротеидами клетки накапливали в 4 раза больше эфиров холестерина, чем при инкубации с нативными ЛНП [9].

Прочно иммобилизованные в атеросклеротической бляшке ЛНП освобождаются при инкубации гомогената поврежденной ткани с плазмином [66]. Количество освобождающихся ЛНП соответствует количеству освобождающихся продуктов деградации фибрина. По-видимому, в фиброзной бляшке ЛНП ассоциированы с нерастворимым фибриногеном. Возможно, для такой иммобилизации существенно взаимодействие ЛНП и фибрина с фибронектином. Образование трехкомпонентных комплексов фибрин — фибронектин — ЛНП может быть важным фактором накопления ЛНП при атеросклеротическом поражении сосудов. Взаимодействие ЛНП с сульфатированными гликозамингликанами и фибронектином, который в свою очередь взаимодействует с фибриногеном и коллагеном и с гликозамингликанами приводит к иммобилизации ЛНП в сосудистой стенке как на ранних стадиях атерогенеза, так и при его осложнениях. Образование растворимых комплексов ЛНП с продуктами деградации фибриногена и фибронектина может способствовать внутриклеточному накоплению липидов и образованию пенных клеток.

Механизмы, лежащие в основе взаимодействия ЛНП с фибриногеном и фибронектином, неизвестны. Данные о структуре апо (а) липопротеидов (а) — ЛП (а), возможно, позволят объяснить сродство ЛНП к фибрину и фибронектину [15, 38]. ЛП (а) — это ЛНП, у которых к апоВ—100 присое-

динены одна или две молекулы апо (а) дисульфидными связями [22, 71]. ЛП(а) обнаруживаются в небольших концентрациях (1—100 мг/дл) в крови здоровых людей. Высокий уровень ЛП(а) строго ассоциирован с атеросклерозом [12, 17, 56]. Если концентрация ЛП(а) выше 30 мг/дл, как это обнаруживается у 20% здоровых людей, относительный риск коронарного атеросклероза возрастает в 2 раза, когда же увеличивается концентрация и ЛНП и ЛП(а), риск возрастает в 5 раз. В результате определения аминокислотной последовательности апо (а) было установлено, что этот белок имеет структуру, гомологичную четвертому, пятому и протеазному доменам плазминогена. В молекуле апо (а) остаток аргинина в расщепляемой при активации плазминогена арг-вал связи, заменен на серин. В связи с этим обнаружить фибринолитическую активность после воздействия на ЛП(а) тканевым активатором плазминогена, урокиназой или стрептокиназой не удалось. Тем не менее можно допустить, что сродство ЛНП к плазминогенподобным структурам, а через них к фибриногену и фибронектину, является причиной атерогенности ЛНП и ЛП(а).

Итак, атеросклеротическое поражение сосудов возникает и развивается в результате действия многочисленных этиологических факторов и патогенетических механизмов. Не подлежит сомнению, что тромботические факторы имеют важное значение для начала и прогрессирования атерогенеза. В организме сосуды постоянно подвергаются физиологической травматизации и дегенеративным процессам, а также различным механическим, токсическим, химическим, иммунологическим воздействиям, и гемостатическая функция является обязательной, обеспечивающей нормальную жизнедеятельность организма. Кроме того, возможно, что сама гиперхолестеринемия, образование продуктов окисления холестерина, а также модифицированных ЛНП и их комплексов с биологически активными веществами, могут вызывать повреждение эндотелиального покрова, активировать тромбообразование, изменять метаболизм клеточных элементов сосудистой стенки, приводя к атеросклерозу.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Балуда В. П., Мельников А. П., Лукьянова Т. И. // Казан. мед. журн. — 1984. — № 3. — С. 213—217.
2. Вихерт А. М., Розина В. Н. // Стенка сосудов в атеро- и тромбогенезе. — М., 1983. — С. 5—14.
3. Климов А. Н., Никульчева Н. Г. Липопротеиды, дислипидемии и атеросклероз. — Л., 1984. — С. 79—98.
4. Климов А. Н. // Дислипидемии и ишемическая болезнь сердца. — М., 1980. — С. 10—25.
5. Литвинов Р. И. // Казан. мед. журн. — 1984. — № 3. — С. 203—213.
6. Пасхина Т. С., Полянцева Л. Р., Егорова Т. П. и др. // Всесоюзный биохимический съезд, 5-й: Тезисы. — М., 1986. — Т. 2. — С. 295.
7. Чулкова Т. М. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 6. — С. 70—73.
8. Чулкова Т. М., Панасюк А. Ф. // Бюл. экспер. биол. — 1987. — № 9. — С. 309—311.
9. Чулкова Т. М. // Всесоюзный симпозиум по биохимии липидов: Тезисы докладов. — Алма-Ата, 1987. — С. 173.
10. Alavi M., Dannett C. W., Moor S. // Arteriosclerosis. — 1983. — Vol. 3. — P. 413—419.
11. Alavi M., Moor S. // Exp. molec. Path. — 1985. — Vol. 42. — P. 389—400.
12. Armstrong V. M. // Atherosclerosis. — 1986. — Vol. 62. — P. 249—257.
13. Barrett T. B., Benditt E. P. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1987. — Vol. 84. — P. 1099—1103.
14. Bottecher C. F., Boelsma-van Houë E., Ter Haar Romeny-Wachter C. C. et al. // Lancet. — 1960. — Vol. 2. — P. 1162—1166.
15. Brown M. S., Goldstein J. L. // Nature. — 1987. — Vol. 330. — P. 113—117.
16. Carlson L. A. // Metabolic Risk Factors in Ischemic Heart Disease. — New York, 1982. — P. 1—15.
17. Dahlen G. // Circulation. — 1986. — Vol. 74. — P. 758—765.
18. Davies P. F., Reidy M. A., Goude T. B., Bowyer D. E. // Atherosclerosis. — 1976. — Vol. 25. — P. 125—130.
19. Day A. J., Bell F. P., Moore S., Friedman R. J. // Circulat. Res. — 1974. — Vol. 34. — P. 467—476.
20. Duguid J. B. // J. Path. Bact. — 1948. — Vol. 60. — P. 57—61.
21. Fuster V., Badimon L., Chesebro J. H. // Atheroma and Thrombosis / Ed. V. V. Kakkar. — London, 1985. — P. 59—72.
22. Fless G. M., Mallen M. E., Scam A. M. // J. biol. Chem. — 1986. — Vol. 261. — P. 8712—8718.
23. Friedman R. J., Moor S., Singal D. P. // Lab. Invest. — 1975. — Vol. 30. — P. 404—415.
24. Friedman R. J., Moor S., Singal D. P. // Arch. Path. Lab. Med. — 1976. — Vol. 100. — P. 185—195.
25. Gordon J. L., Milner A. S. // Platelets in Biology and Pathology / Ed. J. L. Gordon. — Amsterdam, 1976. — P. 3—22.
26. Groves H. M., Kinlough-Rathbone R. L., Richardson M. et al. // Lab. Invest. — 1979. — Vol. 40. — P. 194—200.
27. Groves H. M., Kinlough-Rathbone Richardson M. et al. // Ibid. — 46. — P. 605—612.

28. *Hamsten A., Wollidins G., Izamosi A.* et al. // *Circulation.* — 1986. — Vol. 73. — P. 1097—1103.
29. *Haust M. D., More R. H.* // *Heart Bull.* — 1960. — Vol. 9. — P. 90—92.
30. *Haust M. D.* // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 1985. — Vol. 454. — P. 154—157.
31. *Heard J. B.* // *J. Path. Bact.* — 1949. — Vol. 61. — P. 635—637.
32. *Heyden S., Williams S.* // *Cardiology.* — 1982. — Vol. 69. — P. 110—122.
33. *Hoff H. F., Heideman C. L., Gaubatz J. W.* et al. // *Lab. Invest.* — 1978. — Vol. 38. — P. 560—567.
34. *Holmes D. R., Elveback L. R., Frye R. L.* et al. // *Circulation.* — 1981. — Vol. 63. — P. 293—299.
35. *Imai H., Werthessen N. T., Taylor B., Lee K. T.* // *Arch. Path. Lab. Med.* — 1976. — Vol. 100. — P. 656—672.
36. *Korsan-Bengtson K.* // *Acta med. scand.* — 1962. — Vol. 171. — P. 113—123.
37. *Lewis G. P.* // *Atheroma and Thrombosis* / Ed. V. V. Kakkar. — London, 1985. — P. 35—39.
38. *McLeen J. W., Tomlinson J. E., Kuang W. J.* et al. // *Nature.* — 1987. — Vol. 330. — P. 132—137.
39. *Miller G. J., Martin J. C., Webster J.* et al. // *Atherosclerosis.* — 1986. — Vol. 60. — P. 269—277.
40. *Miller N. E., Hammelt F., Saltissi S.* et al. // *Brit. med. J.* — 1981. — Vol. 282. — P. 1741—1744.
41. *Moncada S.* // *Atheroma and Trombosis* / Ed. V. V. Kakkar. — London, 1985. — P. 188—198.
42. *More R. H., Haust M. D.* // *Amer. J. Path.* — 1961. — Vol. 38. — P. 527—537.
43. *Moore S.* // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 1985. — Vol. 454. — P. 146—153.
44. *Moore S., Friedman M., Gent M.* // *Blood Vessels.* — 1977. — Vol. 14. — P. 193—203.
45. *Moore S.* // *Lab. Invest.* — 1973. — Vol. 29. — P. 478—487.
46. *Moore S., Friedman R. J., Singal D. P.* et al. // *Thrombos. Haemostas.* — 1976. — Vol. 35. — P. 70—81.
47. *Moore S., Belbeck L. W., Gaudie J.* // *Circulation.* — 1977. — Vol. 56. — P. 111—120.
48. *Moore S., Belbeck L. W., Richardson M., Taylor W.* // *Lab. Invest.* — 1982. — Vol. 47. — P. 32—42.
49. *Moore S., Richardson M.* // *Atherosclerosis.* — 1985. — Vol. 55. — P. 313—330.
50. *Nilson J.* // *Ibid.* — 1986. — Vol. 62. — P. 185—199.
51. *Oliver M. F.* // *Lancet.* — 1981. — Vol. 1. — P. 1090—1095.
52. *Pashkina T. S., Polyantseva L. R., Krinskaya A. V.* et al. // *Kinins* 111. — New York, 1983. — P. 1119—1131.
53. *Pielita K., Nikkari T.* // *Med. Biol.* — 1983. — Vol. 61. — P. 31—44.
54. *Potvliege P. R., Bourgain R. H.* // *Brit. J. exp. Path.* — 1977. — Vol. 58. — P. 670—676.
55. *Pollak O. J.* // *Atherosclerosis.* — 1987. — Vol. 63. — P. 257—262.
56. *Rhoads G. G., Dahleu G., Berg K.* et al. // *J. A. M. A.* — 1986. — Vol. 256. — P. 2540—2544.
57. *von Rokitsansky K.* // *Lehrbuch der pathologischer Anatomie.* — London, 1952. — Bd 4. — S. 1841—1846.
58. *Richardson M., Kintlough-Rathbone-R. L., Groves H. M.* et al. // *Brit. J. exp. Path.* — 1984. — Vol. 65. — P. 597—611.
59. *Ross R., Glomest J.* // *New Engl. J. Med.* — 1976. — Vol. 295. — P. 369—377.
60. *Ross R., Glomest J. A.* // *Ibid.* — P. 420—425.
61. *Ross R., Harker L.* // *Science.* — 1976. — Vol. 193. — P. 1094—1100.
62. *Sadoshima S., Tanaka K.* // *Atherosclerosis.* — 1979. — Vol. 34. — P. 93—103.
63. *Shattil S. J., Galindo A. R., Bennett J.* et al. // *J. clin. Invest.* — 1975. — Vol. 55. — P. 636—643.
64. *Smith E. B., Alexander R. M., Massie I. B.* // *Atherosclerosis.* — 1976. — Vol. 23. — P. 19—39.
65. *Smith E. B.* // *Atheroma and Thrombosis* / Ed. V. V. Kakkar. — London, 1985. — P. 22—28.
66. *Smith E. B., Massie I. B., Alexander K. M.* // *Atherosclerosis.* — 1976. — Vol. 25. — P. 71—84.
67. *Stenman S., Smitten K., von Vacheri A.* // *Acta med. scand.* — 1980. — Vol. 642. — P. 165—170.
68. *Stone M. C., Thorp J. M.* // *Atherosclerosis and Cardiovascular Diseases.* — Bologna, 1984. — P. 3.
69. *Svedsen E.* // *Acta path. microbiol. scand.* — 1979. — Vol. 87. — P. 123—130.
70. *Tompkins M. J., Dayton S., Pearce M. L.* // *J. Lab. clin. Med.* — 1964. — Vol. 64. — P. 763—772.
71. *Uterman G.* // *J. clin. Invest.* — 1987. — Vol. 80. — P. 458—465.
72. *Viener A., Aviram M., Brook J. G.* // *Europ. J. clin. Invest.* — 1984. — Vol. 14. — P. 207—213.
73. *Vogel A., Raines E., Kariya B.* et al. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.* — 1978. — Vol. 77. — P. 6644—6648.
74. *Weber G., Fabrini P., Resi Z.* // *Virchow's Arch. path. Anat. Abt. A.* — 1974. — Bd 364. — S. 325—331.
75. *Wissler R. W.* // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 1985. — Vol. 454. — P. 316—320.
76. *Woolf N.* // *Haemostasis and Thrombosis.* — Edinburgh, 1981. — P. 527—553.
77. *Woolf N.* // *Atheroma and Thrombosis.* — London, 1985. — P. 73—75.
78. *Wu K. K., Armstrong M. L., Hoak J. C., Began M. B.* // *Thrombos. Res.* — 1975. — Vol. 7. — P. 917—924.
79. *Zahavi J., Betteridge J. D., Jones N. A.* et al. // *Amer. J. Med.* — 1982. — Vol. 28. — P. 101—109.

Поступила 15.03.88



А. А. Свешников, Н. В. Офицерова, С. В. Ральникова, А. П. Кузнецов

## РОЛЬ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ В РЕПАРАТИВНОМ КОСТЕОБРАЗОВАНИИ

Курганский педагогический институт

Циклические нуклеотиды играют существенную роль в жизнедеятельности клеток: под их влиянием изменяются функциональные, биохимические и морфологические характеристики клеток. В условиях стресса повышается проницаемость соединительнотканых барьеров, развивается асептическая воспалительная реакция [7, 12]. Изменения концентрации циклических нуклеотидов при лечении переломов практически не исследованы, этой проблеме посвящены единичные работы [3, 5, 6, 8]. Вместе с тем определение их содержания может иметь существенное значение для суждения о тяжести повреждения при травме, об активности репаративного процесса.

На основании изложенного в задачу исследования входило определение концентрации циклических нуклеотидов в процессе лечения переломов костей голени.

## Методика

Исследовали кровь 133 больных с косыми, винтообразными и поперечными закрытыми переломами костей голени (лечение проводилось по методу Г. А. Илизарова), взятую через 4—5 ч после травмы, на 3, 7-й дни и далее 1 раз в неделю до окончания лечения. Пробы крови брали с 8 до 9 ч утра.

Концентрацию циклических нуклеотидов в плазме крови определяли радиокомпаративным методом с помощью наборов фирмы «Амершам». Подсчет активности производился на бета-счетчике «Magk-III». О достоверности результатов судили по критерию Стьюдента.

## Результаты и обсуждение

В ответ на травму прежде всего реагирует гипофиз-адреналовая система, в силу чего в ближайшие часы после травмы повышается концентрация кортикотропина, гормонов коры надпочечников и паращитовидных желез [3, 8, 9].

Как видно на рис. 1, в первые 4—5 ч после травмы концентрация цАМФ увеличена в 2,2 раза, что может являться отражением напряжения адренергических механизмов [7, 13]. Через 1 сут отмечается тенденция к

снижению концентрации цАМФ, которая в последующие 7 дней резко падает, тогда как в период с 7-го по 14-й день лечения концентрация цАМФ снижается менее интенсивно. К 21-му дню содержание цАМФ находится в пределах нормы.

Концентрация цГМФ повышается только на 3-й день, прогрессивно нарастает, достигая максимальных значений к 14-му дню. В дальнейшем концентрация цГМФ в плазме крови снижается и к моменту окончания лечения (фиксация аппаратом Г. А. Илизарова) приближается к верхней границе нормы. Полная ее нормализация происходит в течение 1-й недели после снятия аппарата.

Представлял интерес анализ изменения отношения цАМФ/цГМФ. Сразу после перелома оно было увеличено (в 2 раза). Со 2-х суток отношение цАМФ/цГМФ снижалось, достигая нормы на 5-е сутки лечения. Уменьшение отношения цАМФ/цГМФ продолжалось в процессе лечения до 14-х суток. В дальнейшем отмечено его увеличе-

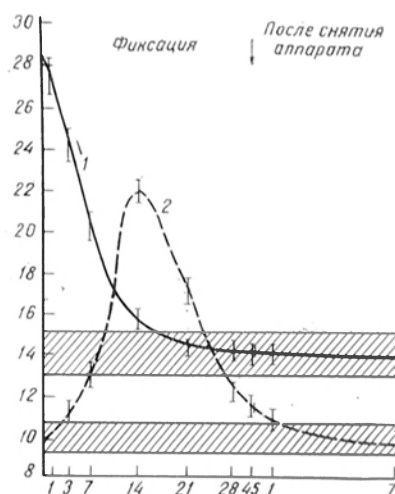


Рис. 1. Изменение концентрации циклических нуклеотидов (в пмоль/мл) в процессе лечения переломов костей голени.

1 — цАМФ; 2 — цГМФ. Здесь и на рис. 2: по оси абсцисс — дни лечения; заштрихованная полоса — границы нормы.

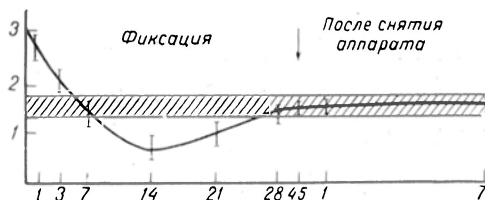


Рис. 2. Динамика отношения цАМФ/цГМФ при лечении переломов костей голени.

ние с нормализацией на 28-й день (рис. 2). Уменьшение этого отношения отражает наиболее интенсивную клеточную пролиферацию [1—3, 8—10, 17]. Следовательно, определение концентрации циклических нуклеотидов и их отношения в плазме крови больных с закрытыми переломами может иметь существенное значение для прогнозирования исхода лечения [10].

цАМФ играет регулируемую роль в пролиферативном ответе стволовых клеток — предшественников костного мозга [8]. Можно предположить, что в период образования костного регенерата в месте перелома факторы микроокружения стволовых клеток костного мозга реализуют свое действие через индукцию синтеза цАМФ, который в свою очередь изменяет межклеточные контакты в дифференцирующихся тканях остеогенного аппарата [2, 3].

В регуляции клеточного деления важна роль и цГМФ [14]: он инициирует пролиферацию, а также цепь реакций, ведущих к митозу, и клеточную пролиферацию. Индукторы пролиферации стволовых клеток, взаимодействуя с рецепторами мембран, усиливают транспорт ионов кальция внутрь клетки [1]. Противоположная зависимость уровня цАМФ от содержания кальция обуславливает реципрокные отношения между этими циклическими нуклеотидами, а не антагонистический характер [7]. Повышенный уровень цГМФ стимулирует также освобождение лизосомальных ферментов и гистамина [15].

Следует также подчеркнуть, что при ответе организма на травму происходит одновременное воздействие на клетки ряда гормонов [8, 9]. Значительное увеличение содержания паратиринина в начальном периоде после перелома, концентрации кальцитонина и цГМФ на более поздних этапах согласуется с мнением авторов [16] об активации мезенхимальных клеток, усилении про-

лиферации костного мозга и резорбции костной ткани [1, 4, 11].

Результаты проведенных исследований дают основание считать, что жесткая фиксация травмированной конечности в аппарате не только стабилизирует процессы в месте перелома, но и способствует нормализации гомеостаза организма, свидетельством чего является устойчивая динамика концентрации изученных гормонов [3, 8, 9] и циклических нуклеотидов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Десятниченко К. С., Сакс Р. Г., Барабаш А. П., Камерин В. К. // Лечение переломов и их последствий методом чрескостного остеосинтеза. — Курган, 1979. — С. 242—245.
2. Илизаров Г. А., Палиенко Л. А., Шрейнер А. А. // Онтогенез. — 1984. — Т. 15, № 2. — С. 146—152.
3. Клиническая оценка функционального состояния конечности методами ядерной медицины при чрескостном компрессионном остеосинтезе костей голени // Отчет / КНИИЭКОТ / Рук. работы А. А. Свешников № ГР 01830066826, инв. № 02850088079. — Курган, 1985.
4. Кожемякин Л. А., Коростовцев Д. С., Королева Т. Р. // Циклические нуклеотиды. — М., 1979. — С. 92—135.
5. Матвеев В. Н. // Циклазная система и ее роль в регуляции клеточного обмена. — Ташкент, 1978. — С. 76—77.
6. Матвеев В. Н., Камерин В. К. // Лечение переломов и их последствий методом чрескостного остеосинтеза. — Курган, 1979. — С. 245—247.
7. Попова Г. Н. // Арх. пат. — 1976. — № 7. — С. 78—89.
8. Свешников А. А., Смотрова Л. А., Мингазова Н. Б. и др. // Экспериментально-теоретические и клинические аспекты разрабатываемого в КНИИЭКОТ метода чрескостного остеосинтеза. — Курган, 1983. — С. 40—41.
9. Свешников А. А., Офицерова Н. В., Ральникова С. В. // Стресс, адаптация и функциональные нарушения. — Кишинев, 1984. — С. 291—291.
10. Свешников А. А., Офицерова Н. В. // Ортопед. травматол. — 1986. — № 2. — С. 67—70.
11. Туракалов Я. Х. // Циклазная система и ее роль в регуляции клеточного обмена. — Ташкент, 1979. — С. 5—8.
12. Федоров Н. А. Биологическое и клиническое значение циклических нуклеотидов. — М., 1979.
13. Birge S. J., Hahn T. J., Whyte M. R., Avioli L. V. // Int. Rev. Physiol. — 1981. — Vol. 24. — P. 201—204.
14. Greengard P., Robinson R. A. // Advanc. Cyclic Nucl. Res. — New York, 1979. — Vol. 11. — P. 387—392.
15. Kram R., Moens W., Vokaer E. // Cyclic Nucleotides and Cell Growth. — New York, 1976. — P. 773—793.
16. Rasmussen M., Bordier P., Kurokawa K. et al. // Amer. J. Med. — 1974. — Vol. 56. — P. 751—758.

17. Rodan G. A., Martin T. J. // *Calcif. Tissue Int.* — 1981. — Vol. 33. — P. 349—351.

Поступила 24.05.88

ROLE OF CYCLIC NUCLEOTIDES IN REPARATIVE OSTEOGENESIS DURING TREATMENT OF CRUS FRACTURES BY G. A. ILI-ZAROV METHOD

A. A. Sveshnikov, N. V. Ofitserova, S. V. Ral'nikova, A. P. Kuznetsov

Pedagogical Institute, Kurgan

Distinct alterations in content of cyclic nucleotides were observed during treatment of 133 patients with fractures of long tubular bones. The following effects were found after initial increase in cAMP content: increase in tissue permeability, aseptic inflammation, inhibition of cell mitosis, acceleration of cell enzymes synthesis, of protein biosynthesis and of the rate of microcirculation in the traumatized region. Elevation of cGMP concentration led to initiation of bone marrow proliferation, to augmented formation of organic matrix and its mineralization. Monitoring of cyclic nucleotides concentration enabled to evaluate the reparative osteogenesis activity.

УДК 616-002.5-07:[616.155.1-008.939.15-39+616.155.1-008.931]-074

К. Г. Карагезян, Э. Т. Карапетян, М. Д. Сафарян

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И АКТИВНОСТИ СУПЕРОКСИДИСМУТАЗЫ В ЭРИТРОЦИТАХ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ

Институт экспериментальной биологии АН Армянской ССР, Ереванский медицинский институт

Известно, что в нормально функционирующей клетке образуются активные формы кислорода — анион-радикал ( $O_2^-$ ) и синглетный кислород ( $O_2$ ). Однако их уровень в физиологических условиях лимитирован, благодаря главным образом функционированию супероксиддисмутазы (СОД).

При патологических состояниях возможно повышение уровня активных форм кислорода, сопровождающееся перекисным окислением липидов (ПОЛ) [1—6].

Задачей настоящего исследования являлось изучение ПОЛ и активирования СОД в мембранах эритроцитов при туберкулезе.

Методика

Динамику ПОЛ в НАДФ·Н-зависимой и аскорбатзависимой системах изучали в мембранах эритроцитов [7]. Мембраны эритроцитов изолировали по [8]. О процессах ПОЛ судили по реакции с тиобарбитуровой кислотой. Активность фермента СОД определяли методом, рассмотренным в [9].

Под наблюдением находилось 42 больных туберкулезом (13 очаговым, 29 инфильтративным и диссеминированным); в возрасте до 30 лет было 25 человек, 31—40 лет — 10 человек, старше 41 года — 7 человек. Во всех группах больные были обследованы при поступлении в стационар, до начала лечения. Контрольную группу составили 20 практически здоровых лиц. Динамику ПОЛ и активированных СОД изучали у больных очаговым и инфильтративным диссеминированным туберкулезом.

Результаты и обсуждение

Как показали результаты проведенных наблюдений, туберкулезный процесс во всех случаях сопровождается заметным стимулированием ПОЛ как в НАДФ·Н-зависимой, так и в аскорбатзависимой системах (см. таблицу). Этот сдвиг оказывается наиболее демонстративным при инфильтративном туберкулезе и наименее выраженным — при очаговом, что указывает на прямую зависимость между интенсивностью ПОЛ и выраженностью патологического процесса.

Как следует из таблицы, очаговый туберкулез характеризуется достоверным повышением активности СОД по сравнению с контрольными величинами, а инфильтративный — ее снижением.

Таким образом, усиление ПОЛ при очаговом и инфильтративном туберкулезе происходит при совершенно различной активности СОД. Низкие величины активности СОД в крови при инфильтративном туберкулезе, обнаруживаемые на фоне интенсификации реакций ПОЛ, мы склонны расценивать как проявление декомпенсации систем антирадикальной защиты клетки. Стимуляция ПОЛ приводит к усилению активности СОД. На основании описанных изменений при туберкулезе можно

Уровень ПОЛ в мембранах эритроцитов [в НАДФ-Н-зависимой (А), аскорбатзависимой (Б) системах] и активности СОД (В) у больных туберкулезом

Группа обследованных	Показатель		
	А	Б	В
Контрольная	4,30±0,18	2,95±0,67	180,0±0,59
С очаговым туберкулезом	7,31±0,21	4,8±0,15	207,0±0,61
<i>p</i>	<0,05	<0,05	<0,001
С инфильтративным туберкулезом	9,3±0,24	5,4±0,21	173,3±0,78
<i>p</i>	<0,05	<0,05	<0,05

говорить о компенсаторном усилении систем антирадикальной защиты клетки, наиболее четко проявляющемся при очаговом туберкулезе. Наличие обратной корреляционной связи между изученными показателями свидетельствует о том, что повышение активности СОД является своеобразным индикатором состояния компенсаторной реакции организма. При изучении изменений показателей системы ПОЛ — антиокислительная активность важна не только оценка абсолютных уровней ПОЛ и активности СОД, но и учет их взаимоотношений.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Амагуни В. Г., Карагезян К. Г., Сафарян М. Д. // Тер. арх. — 1980. — № 3. — С. 96—100.
2. Амагуни В. Г., Сафарян М. Д. // Журн. экспер. и клин. мед. — 1982. — № 5. — С. 414—417.
3. Крепс Е. М. Фосфолипиды клеточных мембран нервной системы в развитии животного мира. — Л., 1967.
4. Крепс Е. М. Липиды клеточных мембран: Эволюция липидов мозга: Адаптационная функция липидов. — Л., 1981.

5. Мерзляк М. И. // Биофизика. — 1975. — № 5. — С. 118—121.
6. Мишин В. М., Ляхович В. В. // Успехи совр. биол. — 1976. — Т. 82, № 4. — С. 338—343.
7. Gajdos A. // Nouv. Presse méd. — 1972. — Vol. 2. — P. 2405.
8. Linmer G. R., Davic H. F. // Blood. — 1970. — Vol. 36. — P. 111.
9. Voshirimi M., Rao N. A. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1972. — Vol. 46. — P. 349.

Поступила 20.12.88

#### DYNAMICS OF LIPID PEROXIDATION AND THE SUPEROXIDE DISMUTASE ACTIVITY IN ERYTHROCYTES OF PATIENTS WITH TUBERCULOSIS

K. G. Karagezyan, E. T. Karapetyan, M. D. Sa-faryan

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

Evaluation of the lipid peroxidation rate and the superoxide dismutase activity in patients with tuberculosis showed that lipid peroxidation was distinctly increased in focal and infiltrative forms of the disease, while the enzymatic activity was altered dissimilarly. Activation of superoxide dismutase observed in focal tuberculosis appears to have a compensatory importance.

УДК [577.115:542.943-678.048.004.14]:534.322.3

М. М. Мелконян

### ПРОЦЕССЫ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И ДИНАМИКА СДВИГОВ В УРОВНЕ ХОЛЕСТЕРИНА В ПЛАЗМЕ И МЕМБРАНАХ ЭРИТРОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ НИЗКОЧАСТОТНЫХ АКУСТИЧЕСКИХ КОЛЕБАНИЙ

Ереванский медицинский институт

В современных условиях в связи с интенсивным развитием промышленного производства, транспорта, бытовой аппаратуры действие низкочастотных акустических колебаний

(НАК) на организм становится предметом всестороннего изучения. Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о значительных физиологических, морфологических, гистохимических,

мических, биохимических сдвигах в органах и тканях различных экспериментальных животных и человека в условиях воздействия НАК [3, 7, 8]. Однако сопоставление имеющихся данных с выделением патогенетических механизмов реализации воздействия данного стрессорного фактора затруднено в связи с использованием НАК различного уровня и частотных характеристик, разных экспериментальных животных.

Участие процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в реализации различного рода стрессовых воздействий на организм в настоящее время доказано [2, 10, 17], однако в условиях воздействия НАК исследование указанных метаболических путей не проводилось. В этой связи особое значение приобретают данные о развитии свободнорадикальных реакций в модельной системе под влиянием акустических колебаний частотой 7--200 Гц [5].

Нами ранее с целью выявления роли процессов ПОЛ и антиоксидантной системы тканей в патогенезе акустического стресса и шумовой болезни были изучены процессы ПОЛ в тканях белых крыс-самцов, подвергающихся длительному воздействию широкополосного шума 91 дБ А с максимальной энергией в области средних и высоких частот, и выявлены значительные изменения в уровне  $\alpha$ -токоферола (ТФ), интенсивности процессов ПОЛ и активности ферментов антирадикальной защиты клетки [6].

В связи с вышеизложенным и с целью изучения зависимости характера метаболических изменений от частотного спектра акустических колебаний в настоящей работе были изучены уровни ТФ и фракций хо-

лестерина (Х) в плазме крови и мембранах эритроцитов (МЭ), уровень фоновых липидных перекисей (ЛП) плазмы, интенсивность индуцированных процессов ПОЛ в МЭ, активность супероксиддисмутазы (СОД) и  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы эритроцитов белых крыс-самцов в условиях воздействия НАК.

#### Методика

Эксперименты выполнены на белых крысах-самцах массой 150—200 г, содержащихся на обычном пищевом рационе. Экспериментальные животные были разделены на 7 групп: крысы 1-й группы служили контролем, крысы 2--6-й групп подвергали действию НАК уровнем 105 дБ с максимальной энергией в области 16 Гц. Сроки действия НАК составили соответственно по группам 2, 3, 4, 8, 12, и 16 нед круглосуточно.

Животных декапитировали. Уровень фоновых ЛП в плазме определяли по методу [13] и выражали в наномолях малонового диальдегида (МДА) на 1 мл плазмы. МЭ выделяли по методу [14]. Об интенсивности индуцированных процессов ПОЛ в МЭ судили по накоплению МДА за 30 мин инкубации, количество которого выражали в наномолях на 1 мг белка. При исследовании аскорбатзависимого (неферментативного) ПОЛ (АЗП) инкубационная среда содержала 40 мМ трис-НСI-буфера (рН 7,4), 0,8 мМ аскорбата,  $12 \cdot 10^{-16}$  М соли Мора; при исследовании НАДФ-Н-зависимого (ферментативного) ПОЛ (НЗП) —  $2 \cdot 10^{-4}$  М пирофосфата натрия,  $12 \cdot 10^{-6}$  М соли Мора, 1 мМ НАДФ-Н [1]. Содержание общего (ОХ), свободного (СХ) и эстерифицированного (ЭХ) холестерина определяли по унифицированному методу Златкиса — Зака и выражали в миллиграмм-процентах и микрограммах на 1 мг белка соответственно для плазмы и МЭ [9]. Содержание ТФ определяли флуориметрически [12] и выражали в миллиграмм-процентах и микрограммах на 1 мг белка соответственно для плазмы и МЭ. Активность  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы определяли по методу, описанному [11], и выражали в наномолях неорганического фосфора на 1 мг белка в 1 мин. Активность СОД эритроцитов выражали в условных единицах активности на 1 мг белка [16]. Концентрацию белка определяли по Лоури [15]. Результаты подвергали статистической обработке по методу Стьюдента.

Таблица 1

Содержание  $\alpha$ -токоферола (в нмоль/дл) и уровень фоновых ЛП (в нмоль МДА на 1 мл) плазмы белых крыс-самцов в условиях действия НАК (105 дБ)

Показатели	Группа животных						
	1-я (контроль)	2-я	3-я	4-я	5-я	6-я	7-я
$\alpha$ -Токоферол	1,4±0,1	1,4±0,4	3,6±0,1*	1,8±0,2**	1,31±0,05	1,2±0,1	1,31±0,03
Фоновые ЛП	6,1±0,3	2,1±0,2*	0,7±0,2*	2,6±0,1*	—	8,2±0,2**	4,3±0,1*

Примечание. В табл. 1 и 2: звездочки — достоверность различий с контролем: одна —  $p < 0,001$ , две —  $p < 0,01$ , три —  $p < 0,05$ . В опытных группах  $n = 9$ .

## Результаты и обсуждение

Результаты исследований свидетельствуют о том, что через 2 нед в результате воздействия НАК в МЭ отмечается незначительное снижение отношения ТФ/белок мембран с последующим значительным ростом через 3—4 нед (табл. 1). Однако к концу 8-недельного пребывания животных в экспериментальных условиях отмечается уменьшение отношения ТФ/белок в МЭ с последующим возвратом к контрольному уровню через 12 нед. При этом отмечается обратная направленность в динамике сдвигов АЗП и НЗП МЭ, проявляющаяся значительным подавлением в первые сроки исследования с последующей тенденцией к нормализации у животных 6-й группы, хотя уровень их продолжает оставаться ниже контроля (рис. 1). Как известно, в биомембранах отсутствует прямая корреляция между степенью ненасыщенности липидов биомембран и скоростью их окисления [4]. Вероятно, низкий уровень АЗП и НЗП в МЭ у животных 3—4-й групп обусловлен

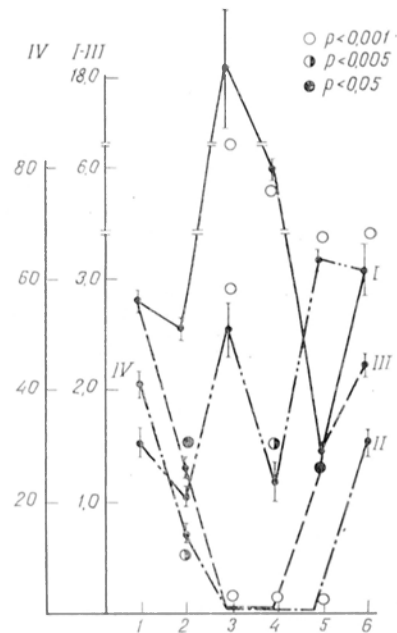


Рис. 1. Уровень ТФ (I) (в нмоль/мг белка), АЗП (II), НЗП (III) МЭ (в нмоль МДА на 1 мг белка), активность СОД (IV) (в ед. на 1 мг белка) эритроцитов белых крыс в условиях воздействия НАК.

По оси абсцисс — группы животных: 1 — контроль, 2 — 2 нед, 3 — 3 нед, 5 — 8 нед, 6 — 12 нед воздействия НАК.

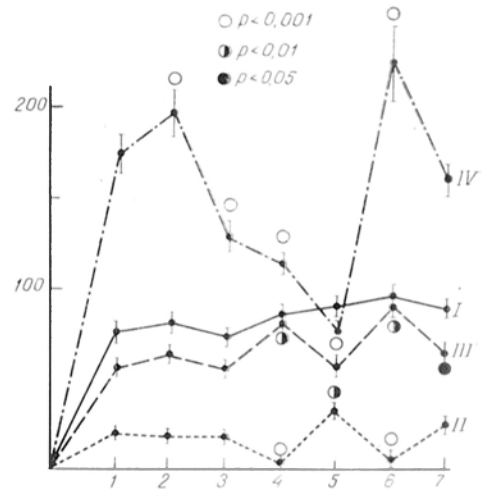


Рис. 2. Уровень ОХ (I), СХ (II) и ЭХ (III) в плазме крови (μмоль/дл) и ОХ МЭ (IV) (нмоль/мг белка) белых крыс в условиях воздействия НАК.

Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

значительным возрастанием отношения ТФ/белок МЭ. Безусловно, значительный вклад в регуляцию уровня процессов ПОЛ в эритроцитах осуществляет СОД, активность которой повышена в течение всего эксперимента (см. рис. 1). Уровень ТФ, важнейшего природного антиоксиданта, в плазме и МЭ значительно возрастает через 3 нед с последующим возвратом к контрольному (см. рис. 1), в то время как содержание фоновых ЛП выражено снижено в течение первых 8 нед воздействия НАК с последующим ростом через 12 нед (см. табл. 1). В ходе эксперимента отмечается рост уровня ОХ плазмы с одновременным изменением фракционного состава, при этом у животных 4-й и 6-й групп резко снижается уровень СХ и возрастает уровень ЭХ (рис. 2). Интересна, на наш взгляд, обратная направленность сдвигов в содержании Х плазмы и МЭ у животных 3—5-й групп, что подтверждает наличие активного обмена между Х плазмы и МЭ (см. рис. 2). Так, несмотря на некоторое увеличение уровня ОХ плазмы, в МЭ отмечается снижение отношения ОХ/белок, в то время, как уже отмечалось, в те же сроки эксперимента значительно растет отношение ТФ/белок. В целом отмечается снижение отношения Х/ТФ, что, безусловно, свидетельствует

Активность АТФазы (в нмоль неорганического фосфора на 1 мг белка в 1 мин) и отношение фракций X и  $\alpha$ -токоферола МЭ белых крыс-самцов в условиях действия НАК (105 дБ)

Показатель	Группа животных					
	1-я (контроль)	2-я	4-я	5-я	6-я	7-я
Общая АТФазная активность	46,7±0,7 (n = 18)	26,2±1,46*	10,4±0,3*	108±6*	37,1±1,1*	22,2±1,5*
Mg <sup>2+</sup>	36,6±0,5 (n = 18)	20,1±1,35*	7,9±0,5*	19,8±1,2*	34,0±2,16	12,5±0,3*
Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup>	13,1±0,5 (n = 18)	6,15±0,46*	2,6±0,25*	88,2±3,5*	3,11±0,1*	9,71±0,9***
ОХ/ТФ	29,7±2,0 (n = 16)	36,2±1,4***	9,1±0,7*	26,7±2,2	33,2±2,1	11,0±0,2*

ет о структурных изменениях МЭ и сдвигах их физико-химических свойств (табл. 2).

Изучение активности мембранно-связанного липидзависимого фермента Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазы, относящегося к классу так называемых вискозитропных ферментов, показало, что у животных 2—4-й групп подавлена активность как Mg<sup>2+</sup>-зависимого, так и убаинингибируемого компонента с последующим значительным ростом активности последнего (см. табл. 2). Наиболее существенным является максимальный рост активности фермента, обусловленный в основном повышением активности убаинингибируемого компонента фермента у животных 5-й группы, характеризующихся наиболее низким уровнем как ТФ, так и фракций X в МЭ. Учитывая важную роль X и ТФ в стабилизации мембранных структур, обеспечении микровязкости липидной компоненты, в значительной мере определяющей интенсивность и направленность метаболизма в клетке, можно сделать вывод о безусловном изменении уровня клеточного метаболизма при продолжительном пребывании в условиях действия НАК, что подтверждается наблюдаемыми изменениями в активности Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазы.

В МЭ отмечается восстановление уровня ТФ у животных 6-й группы и значительное превышение его у 7-й. Уровень X в те же сроки эксперимента несколько превышает контрольный. Полученные результаты свидетельствуют о развитии дисбаланса в системе ПОЛ — антиоксидантная система, сопровождающаяся

ростом X как в плазме, так и в МЭ. При этом после относительно непродолжительного воздействия отмечается значительный рост ТФ в плазме и МЭ, что, возможно, является следствием выброса его из жировых депо, богатых ТФ. По-видимому, для объяснения этого явления необходимо признать существенным в действии НАК не только уровень, частоту и время воздействия, но и «заинтересованность» органов к действующим частотам, так как, по мнению ряда исследователей [3], в основе действия НАК на организм, как и вибрации, лежит способность возбуждать резонансы.

Таким образом, изучаемые параметры претерпевают значительные изменения в ходе действия НАК и могут быть использованы как в качестве критериев при осуществлении контроля за действием НАК на организм, так и для разработки допустимых норм (уровня, длительности, частотных характеристик) действующих НАК.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М., 1972.
2. Журавлев А. И. Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии. — М., 1982. — С. 3.
3. Карпова Н. И., Малышев Э. Н. Низкочастотные акустические колебания на производстве. — М., 1981.
4. Ланкин В. З. // Укр. биохим. журн. — 1984. — № 3. — С. 317.
5. Маргулис М. А., Грундель Л. М. // Докл. АН СССР. — 1982. — № 4. — С. 914.
6. Мелконян М. М., Мхитарян В. Г. // Бюл. exper. биол. и мед. — 1985. — № 9. — С. 70.

7. Нономарев В. Л., Курнаева В. П., Васильева Л. А. и др. // Шум и вибрация и борьба с ними на производстве. Республ. конф.: Тезисы. — Л., 1979. — С. 204.
8. Сивистунов Н. Г., Алексеев С. В., Бухарин Е. А. и др. // Ленинград. сан.-гиг. ин-т: Труды. — Л., 1978. — С. 114.
9. Сентебова Н. А. // Лаб. дело. — 1977. — № 6. — С. 375.
10. Всесоюзная конф. «Биоантioxidант», 2-я: Тезисы. — Черноголовка, 1986. — Т. 1, 2.
11. Цильмер М. К., Тарве У. С. // Укр. биохим. журн. — 1975. — № 4. — С. 458.
12. Duggan D. E. // Arch. Biochem. Biophys. — 1959. — Vol. 84. — P. 116.
13. Yochioka I., Kawada K., Shimada T., Mori M. // Amer. J. Obstet. Gynecol. — 1979. — Vol. 135, N 1. — P. 372.
14. Limber G. K., Davis R. F., Bakerman S. // Blood. — 1970. — Vol. 36. — P. 111.
15. Lowry O. H., Rosebrough N. I., Faur A. L., Randall R. I. // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265.
16. Nishikimi M., Appaji R. N., Yagi K. // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1972. — Vol. 46, N 3. — P. 849.
17. Tappel A. L. // Fed. Proc. — 1973. — Vol. 32, N 8. — P. 1970.

Поступила 20.03.88

## ALTERATIONS OF LIPID PEROXIDATION AND CHOLESTEROL CONTENT IN RAT BLOOD PLASMA AND ERYTHROCYTE MEMBRANES UNDER CONDITIONS OF LOW-FREQUENCY ACOUSTIC OSCILLATIONS

M. M. Melkonyan

Chair of Biochemistry, Medical School, Yerevan

Distinct alterations in lipid peroxidation, in content of  $\alpha$ -tocopherol and cholesterol fractions were observed in rat blood plasma and erythrocyte membranes after long-term low-frequency acoustic oscillations (105 decibels, diurnally, within 3 months). Under these conditions activities of superoxide dismutase and erythrocyte  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase were also altered. The rate and direction of the enzymatic activity alterations correlated with the duration of the acoustic oscillation exposure and the patterns studied. Enrichment of blood plasma and erythrocyte membranes with  $\alpha$ -tocopherol within 2-4 weeks of the acoustic oscillation is considered as an important phenomenon.

УДК 616.89-008.441.13-092.9-07:[616.127+616.45+616.839]-02:615.917:547.262].015.156

В. П. Нужный, Е. Б. Тезиков, И. Г. Забирова, А. И. Угрюмов

## ПОВРЕЖДЕНИЕ МИОКАРДА И СИМПАТИКО-АДРЕНАЛОВАЯ СИСТЕМА ПРИ СИНДРОМЕ ОТМЕНЫ ЭТАНОЛА У КРЫС

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

Синдром отмены этанола у крыс сопровождается нарушением сократительной функции и ритма сердца, стимуляцией гликолиза и гликогенолиза в миокарде, а также развитием диссеминированных кардионекрозов [11]. Сходные функциональные, морфологические и биохимические проявления имеют место при введении животным высоких доз адреналина [5, 10] и при интоксикации ацетальдегидом, кардиотоксическое действие которого в значительной степени опосредовано катехоламинами (КА) [4]. Активация симпатико-адреналовой системы, наблюдающаяся при синдроме отмены этанола [15, 21], позволяет предположить участие КА в развитии повреждений сердца.

Целью работы явилось сравнение динамики показателей, характеризующих повреждение сердца и активность симпатико-адреналовой системы крыс, после интенсивной алкоголизации, приводящей к развитию синдрома отмены.

### Методика

Синдром отмены этанола воспроизводили на нелинейных белых крысах-самцах массой 200—300 г путем введения 25 % раствора этанола в желудок в дозе 4—5 г/кг с интервалом 12 ч на протяжении 5 сут [1]. Животных деканитировали через 2—6, 12 ч, 1, 2, 3 и 7 сут после последнего введения этанола.

Сердца крыс изолировали по Лангендорфу и перфузировали раствором Кребса—Гензельта, насыщенным карбогеном (95 %  $\text{O}_2$  и 5 %  $\text{CO}_2$ ), при температуре 37 °С и постоянном коронарном протоке со скоростью 13 мл/мин. Через 10 мин проточной перфузии сердца переводили в режим реперфузии, которую продолжали в течение 30 мин при объеме рециркулирующего раствора 35 мл. После завершения перфузии в рециркулирующей жидкости определяли активность креатинфосфокиназы (КФК) флуорометрическим методом [6].

Активность дофамин- $\beta$ -гидроксилазы (ДБГ) сыворотки крови исследовали спектрофотометрическим методом, основанным на ферментативном превращении тирамина в октопамин с последующей регистрацией спектров поглощения пара-оксибензальдегида, образующегося при окислении октопамина перйодатом натрия. 1 мл инкубационной смеси состоял из 0,33 мл воды, 0,3 мл сыворотки и 0,37 мл рабочего раствора, содержащего следующие ингредиенты: ацетатный буфер (рН 5,0) с концентрацией



200 мМ; фумарат натрия — 10 мМ; аскорбиновую кислоту — 10 мМ; паргилина гидрохлорид — 1 мМ; N-этилмаленимид — 10 мМ; сульфат меди — 0,025 мМ; тирамина гидрохлорид — 20 мМ и каталазу с активностью 7500 ед. К контрольным пробам сыворотки добавляли воду, выдерживали их в течение 6 мин в кипящей водяной бане и затем вносили в них рабочий раствор. Длительность инкубации составляла 60 мин при 37 °С. Последующие этапы определения проводили как описано в работе [16]. Регистрацию спектров пара-оксibenзальдегида осуществляли на спектрофотометре DU 8B «Вестан».

Во II серии опытов определяли содержание норадреналина (НА) и адреналина (А) в ткани желудочков сердца и А в надпочечниках, а также концентрацию 11-оксикортикостероидов (11-ОКС) и активность КФК в плазме крови флюорометрическими методами [6, 12, 18]. Регистрацию осуществляли на флюоресцентном спектрофотометре MPF-2A «Hitachi».

В III серии опытов проводили гистохимическое исследование КА в сердце глиоксальевым методом [17]. Изучение и фотосъемку срезов осуществляли на люминесцентном микроскопе Polyvar «Reichert». Количественную оценку плотности КА-содержащих нервных волокон и площади диффузного (вне волокон) распределения КА проводили отдельно стереометрическим методом [2], выражая в процентах количество точек стереометрической сетки, совпавших с КА-содержащими волокнами или зонами диффузного, экстранейронального распределения КА.

Концентрацию этанола в крови определяли методом газовой хроматографии [13].

Данные статистически обрабатывали с использованием критерия Стьюдента.

В работе использовано 160 крыс.

## Результаты и обсуждение

На протяжении 6 ч после последнего введения этанола крысы находились в состоянии атаксии. Спустя 12 ч у животных развивались признаки синдрома отмены (явления мышечной ригидности, гиперактивности и гипервозбудимости), которые достигали максимальной выраженности через 20—25 ч и исчезали к концу 2-х суток. Концентрация этанола в крови крыс через 3 и 12 ч от момента последнего его введения составила  $88 \pm 10$  и  $10 \pm 4$  мМ, а спустя 20 ч была менее 0,2 мМ.

Истечение КФК в рециркулирующий раствор из сердец крыс, бравшихся в опыт через 1 и 2 сут после последнего введения этанола, по сравнению с контролем было увеличено на 66 и 80 %, а спустя 3 и 7 сут выход фермента возрастал на 147 и 136 % соответственно. Активность КФК плазмы через 1 сут после последнего введения этанола увеличилась в 1,5 раза, достигала макси-

Т а б л и ц а  
Скорость истечения КФК из изолированного перфузируемого сердца и активность КФК плазмы крыс в разные сроки после отмены этанола

Срок после последнего введения этанола	Скорость истечения КФК из сердца	Активность КФК плазмы
Контроль (интактные крысы)	$0,732 \pm 0,053$ (7)	$182 \pm 33$ (8)
2—6 ч	$1,086 \pm 0,192$ (7)	$208 \pm 16$ (8)
1 сут	$1,212 \pm 0,205^*$ (7)	$281 \pm 21^*$ (9)
2 сут	$1,321 \pm 0,154^*$ (7)	—
3 сут	$1,809 \pm 0,081^*$ (7)	$314 \pm 28^*$
7 сут	$1,728 \pm 0,153^*$ (7)	$304 \pm 17^*$ (8)

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3: звездочка —  $p < 0,05$  по сравнению с контролем. В скобках — число наблюдений. Скорость истечения КФК из сердца выражали в единицах на 1 г сухой ткани сердца за 30 мин перфузии. Объем рециркулирующей жидкости составлял 35 мл. Активность КФК плазмы выражали в микромолях креатина, образуемого 1 л сыворотки за 1 мин при 37 °С.

мальной величины на 3-и сутки и оставалась на этом уровне до 7 сут (табл. 1). В период, предшествующий развитию синдрома отмены, эти показатели статистически не отличались от контрольных.

Активность ДБГ сыворотки крови спустя 3 ч и 1 сут после последнего введения этанола была в 3 раза выше, чем у интактных животных. На 2-е сутки активность фермента резко снижалась и полностью нормализовалась к 3-м суткам после отмены этанола (табл. 2).

Концентрация НА в ткани желудочков сердца во все периоды исследования была ниже, чем в контроле. Максимальное падение уровня НА отмечалось в первые 2 сут. В последующем отмечалась тенденция к восстановлению его уровня. Концентрация А в сердце на высоте алкогольной интоксикации была в 2 раза выше, чем у интактных животных и продолжала нарастать, достигая максимальных величин спустя 1 и 2 сут после отмены этанола. Через 3 сут содержание А в сердце снижа-

Активность ДБГ сыворотки, содержание 11-ОКС в плазме, НА и А в сердце и А в надпочечниках крыс в разные сроки после отмены этанола

Срок после последнего введения этанола	Активность ДБГ в сыворотке	Содержание 11-ОКС в плазме, мкмоль/л	Содержание НА в сердце, мкг/г	Содержание А в сердце, мкг/г	Уровень А в надпочечниках, мкг/г
Контроль (интактные крысы)	$0,180 \pm 0,031$ (6)	$0,40 \pm 0,09$ (8)	$0,53 \pm 0,06$ (8)	$0,08 \pm 0,02$ (8)	$1207 \pm 149$ (8)
3 ч	$0,547 \pm 0,119^*$ (8)	$1,10 \pm 0,15^*$ (8)	$0,32 \pm 0,04^*$ (13)	$0,19 \pm 0,03^*$ (13)	$477 \pm 60^*$ (15)
12 ч	—	—	$0,31 \pm 0,05^*$ (7)	$0,19 \pm 0,05$ (7)	$450 \pm 65^*$ (7)
1 сут	$0,577 \pm 0,139^*$ (7)	$1,10 \pm 0,14^*$ (8)	$0,24 \pm 0,03^*$ (13)	$0,28 \pm 0,02^*$ (13)	$427 \pm 60^*$ (13)
2 сут	$0,305 \pm 0,116$ (7)	—	$0,32 \pm 0,04^*$ (7)	$0,25 \pm 0,03^*$ (7)	$534 \pm 58^*$ (7)
3 сут	$0,183 \pm 0,031$ (7)	$0,95 \pm 0,14^*$ (8)	$0,40 \pm 0,04$ (8)	$0,15 \pm 0,02$ (8)	$804 \pm 33$ (8)
7 сут	$0,195 \pm 0,029$ (7)	$0,43 \pm 0,09$ (8)	$0,39 \pm 0,05$ (8)	$0,18 \pm 0,03$ (8)	$1751 \pm 154^*$ (7)

Примечание. Активность ДБГ выражали в мкмоль октопамина, образуемого 1 л сыворотки за 1 мин.

лось и достигало контрольного уровня спустя 7 суток.

Содержание А в надпочечниках через 3, 12 и 24 ч от последнего введения этанола было в 2,5—3 раза ниже, чем у интактных животных. На 2-е и 3-и сутки наблюдалось повышение его уровня по сравнению с предыдущим периодом, а спустя 7 сут содержание А в надпочечниках резко возросло, на 45 % превысив контрольный уровень.

При исследовании характера распределения КА-содержащих структур (см. рисунок на вклейке; табл. 3) выявлено, что плотность КА-содержащих нервных волокон после отмены этанола резко снижается, достигая минимума на 3-и сутки, а изменение площади сечения КА, расположенных экстранейронально, носит прямо противоположный характер. Через 2—6 ч после последнего введения этанола обнаруживаются мелкие очаги диффузии КА из нервных волокон в кардиомиоциты, площадь экстранейронального свечения достигает максимума на 3-и сутки и уменьшается на 7-е сутки после отмены этанола. Наиболее характерным было накопление КА в кардиомиоцитах, расположенных субэндокардиально и вокруг крупных ветвей коронарных артерий сердца.

Концентрация 11-ОКС в плазме в первые 3 сут на 140—175 % превы-

Таблица 3  
Количественная оценка плотности КА-содержащих структур в сердце крыс в разные сроки после отмены этанола

Срок после последнего введения этанола	Характер распределения КА-содержащих структур	
	плотность КА-содержащих волокон, %	площадь КА-содержащих структур, расположенных диффузно (вне волокон), %
Контроль (8)	$86,0 \pm 11,4$	$2,0 \pm 0,2$
2—6 ч (8)	$64,0 \pm 4,5$	$19,0 \pm 3,4^*$
1 сут (8)	$29,0 \pm 6,2^*$	$46,0 \pm 5,6^*$
3 сут (8)	$7,0 \pm 0,9^*$	$82,0 \pm 4,8^*$
7 сут	$38,2 \pm 6,5^*$	$4,0 \pm 1,2$

Примечание. Плотность (площадь) КА-содержащих структур выражали как отношение количества точек стереометрической сетки, совпавших с КА-содержащими волокнами или зонами свечения КА, расположенными диффузно вне волокон, к общему количеству точек в процентах. Резкое снижение плотности КА-содержащих волокон на 3-и сутки после последнего введения этанола могло быть связано с высокой интенсивностью флюоресценции КА-расположенных экстранейронально, которая маскировала свечение КА в нервных волокнах.

шала контрольный уровень и нормализовалась спустя 7 сут от последнего введения этанола (см. табл. 2). Масса надпочечников через 3 ч, 1, 3 и 7 сут после последнего введения этанола составила  $61 \pm 3$ ,  $58 \pm 2$ ,  $55 \pm 3$  и  $45 \pm 3$  мг соответственно при  $49 \pm 3$  мг в контроле.

#### Обсуждение результатов

Интенсивная 5-суточная алкоголизация крыс сопровождается развитием стресс-реакции. Об этом свидетельствуют увеличение уровня 11-ОКС в плазме и массы надпочечников, высокая активность ДБГ сыворотки крови, снижение концентрации А в надпочечниках с одновременным накоплением его в миокарде, падение уровня НА в сердце и уменьшение плотности КА-содержащих волокон в миокарде.

Отмена этанола, судя по динамике содержания КА в сердце и надпочечниках, приводит к дополнительной стимуляции симпатико-адреналовой системы, которая совпадает во времени с максимумом соматовегетативных и поведенческих проявлений синдрома отмены. Обратное развитие внешних проявлений реакции отмены сопровождается отчетливым снижением активности симпатико-адреналовой системы.

Данные о скорости истечения КФК из изолированного сердца и активности ее в плазме крови крыс свидетельствуют о том, что развитие деструктивных изменений в миокарде достигает максимальной выраженности спустя 2 сут после периода пост-алкогольной активации симпатико-адреналовой системы. Это полностью соответствует закономерности стрессорного повреждения сердца, выявленной в работах [7—9], в которых отмечено, что структурные и метаболические изменения в сердечной мышце крыс после перенесенного эмоционально-болевого стресса развиваются в период нормализации активности симпатико-адреналовой и гипофизарно-надпочечниковой систем и достигают наибольшей выраженности спустя 39—45 ч.

Вместе с тем совпадение максимумов деструктивного процесса в миокарде и экстранейронального накопления КА в сердце свидетельствует

о взаимосвязи этих явлений [5] и позволяет предположить, что после отмены этанола возникают местные нарушения симпатической регуляции и обмена КА в сердце.

Причины массивного накопления КА в экстранейрональных структурах в этот период неясны. Отсутствие корреляции между динамикой экстранейронального накопления КА и динамикой уровня 11-ОКС в плазме, являющихся модуляторами экстранейронального захвата, O-метилирования и рецепции КА в сердце [14, 20, 22], делает маловероятным участие глюкокортикоидов в развитии нарушений обмена КА в сердце.

Принципиально важным представляется тот факт, что нарушения структуры, функции и метаболизма сердца, судя по результатам настоящей и предшествующей [11] работ, развиваются не в период интенсивной алкоголизации, представляющей собой мощный стрессорный фактор, а после прекращения действия этанола. Отсутствие выраженных нарушений структуры и функции сердца на высоте алкогольной интоксикации обусловлено, по-видимому, способностью этанола ослаблять кардиотоксическое действие КА на миокард [3, 19].

Таким образом, деструктивный процесс в миокарде, развивающийся после прекращения интенсивной алкоголизации крыс, представляет собой разновидность стрессорного поражения сердца. При этом местные нарушения обмена КА могут выступать в качестве дополнительного патогенетического фактора повреждения миокарда.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Абдрашитов А. Х., Листвина В. П., Нужный В. П., Успенский А. Е. // Фармакол. и токсикол. — 1983. — № 6. — С. 94—98.
2. Автандилов Г. Г. Морфометрия в патологии. — М., 1973.
3. Забирова И. Г., Нужный В. П. // Пат. физиол. — 1982. — № 2. — С. 25—28.
4. Забирова И. Г., Нужный В. П., Успенский А. Е. // Бюл. exper. биол. — 1982. — № 12. — С. 65—67.
5. Клибанер М. И., Нужный В. П. // Вестн. АМН СССР. — 1978. — № 1. — С. 87—93.
6. Левин Ф. Б., Якобсон И. М. // Лаб. дело. — 1978. — № 4. — С. 223—224.
7. Малышев В. В., Лифантьев В. И., Меерсон Ф. З. // Кардиология. — 1982. — № 6. — С. 113—115.

8. Малышев В. В., Петрова В. А., Манухин Б. Н. // Бюл. экспер. биол. — 1985. — № 3. — С. 267—269.
9. Меерсон Ф. З., Малышев В. В., Коган В. Е. и др. // Арх. пат. — 1980. — № 2. — С. 9—12.
10. Меерсон Ф. З., Гомазков О. Б. // Кардиология. — 1971. — № 9. — С. 140—153.
11. Нужный В. П., Тезиков Е. Б., Савицкая Е. В., Угрюмов А. И. // Бюл. экспер. биол. — 1986. — № 5. — С. 575—578.
12. Усватова И. Я., Панков Ю. А. // Современные методы определения стероидных гормонов в биологических жидкостях. — М., 1968. — С. 38—48.
13. Успенский А. Е., Абдрашитов А. Х., Смирнов В. М., Листвина В. П. // Суд.-мед. эксперт. — 1982. — № 3. — С. 45—48.
14. Abrass I. B., Scarpace Ph. J. // Endocrinology. — 1981. — Vol. 108, N 3. — P. 977—980.
15. Adams M. A., Hirst M. // Pharmacol. Biochem. Behav. — 1984. — Vol. 21, N 1. — P. 125—131.
16. Algate D. R., Leach G. D. // J. Pharm. Pharmacol. — 1978. — Vol. 30, N 1. — P. 162—166.
17. Axelsson S., Bjoklund A., Falck B. et al. // Acta physiol. scand. — 1973. — Vol. 87, N 1. — P. 57—62.
18. Euler U. S., von Lishojko F. // Ibid. — 1961. — Vol. 51, N 4. — P. 348—355.
19. Malov S. // Stress and Alcohol Use. — New York, 1983. — P. 369—386.
20. Morton A. J., Mills R. G. // Stress: The Role of Catecholamines and Other Neurotransmitters. — New York, 1984. — Vol. 2. — P. 675—688.
21. Pohorecky L. A. // Fed. Proc. — 1982. — Vol. 41, N 8. — P. 2452—2455.
22. Trendelenburg U., Böisch H. // Life Sci. — 1973. — Vol. 13. — P. Elxii-Elxiv.

Поступила 14.11.88

#### IMPAIRMENT OF MYOCARDIUM AND FUNCTIONS OF THE SYMPATHOADRENAL SYSTEM IN RATS WITH ABSTINENT SYNDROME

V. P. Nuzhny, E. B. Tezikov, I. G. Zabirowa, A. I. Ugryumov

All-Union Research Centre of Narcology, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

Increase in content of 11-oxycorticosteroids and in activity of dopamine- $\beta$ -hydroxylase in blood serum, decrease in concentration of adrenaline in adrenal glands with simultaneous accumulation of the catecholamine in myocardium were observed in rats after intensive alcoholization within 5 days (intra-gastric administration of ethanol 4-5 g/kg twice daily). In this case content of noradrenaline and its density in the catecholamine-containing nervous fibers were decreased. Ethanol abolishing, as shown by dynamics of catecholamines in heart and adrenal glands, caused an additive stimulation of the sympathoadrenal system, which reached the maximal level within a day and accomplished within 3 days after the last ethanol injection. Abolishing of ethanol led to an increase in the rate of creatine kinase elimination from isolated perfused heart and to activation of the enzyme in rat blood, which reached the maximal value within 3-7 days after the last injection of ethanol. Development of myocardium impairments correlated with accumulation of catecholamines in extraneuronal structures of heart tissue.

УДК 616.33+616.342-002.44-07:[616.33-008.83+616.33-008.93]:577.112.853]-02:613.863

П. Н. Шараев, В. Г. Иванов, Л. И. Кутявин

### ИЗУЧЕНИЕ ОБМЕНА ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НА ОРГАНИЗМ СТРЕССОГЕННЫМИ ФАКТОРАМИ

Ижевский медицинский институт

Данные об изменениях гликозаминогликанов (ГАГ) в составе защитной слизи желудка при язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки противоречивы [1, 13, 16]. По-видимому, это связано с тем, что авторы не рассматривали отдельно группу больных с выраженным стрессорным компонентом при развитии или обострении заболевания. Известно, что нервно-психические перегрузки могут быть причиной развития язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки [1]. Между тем эти состояния, как правило, сопровождаются резким увеличением в

крови содержания катехоламинов, а также кортикостероидных гормонов, которые способны угнетать пролиферацию фибробластов и снижать содержание ГАГ в тканях [10, 16]. Дефицит ГАГ в составе поверхностной слизи может резко снизить барьерные возможности желудка по отношению к агрессии факторов желудочного сока.

Целью данной работы было исследование характера изменений показателей обмена ГАГ желудка при продолжительном стрессе в клинике и эксперименте.

## Методика

Обследованы 10 практически здоровых (контрольная группа) и 28 больных язвенной болезнью желудка (процесс локализовался на малой кривизне тела желудка) и двенадцатиперстной кишки (17 мужчин и 11 женщин). Больные были в возрасте от 19 до 46 лет; обследование проводили в осенний период. Обострение заболевания происходило в условиях 5—10-дневной бытовой или производственной стрессовой ситуации. В эту группу включали только больных с повышенным на 20 % и более содержанием 11-оксикортикостероидов (11-ОКС) в плазме крови. Диагноз подтверждался клинически, рентгенологически, эндоскопически. Других заболеваний у больных не выявлено. Биохимическому анализу подвергали желудочный сок (базальная секреция) и слизистую оболочку желудка (материал биопсии). Биоптат брали из малой кривизны тела желудка на расстоянии 2—3 см от язвы на 2—3-й день поступления в стационар (МСЧ автозавода Ижевска).

Эксперименты проведены на 82 белых крысах массой 130—150 г в один и тот же сезон года. Основную часть подопытных животных (54 крысы) подвергали ежедневному иммобилизационному стрессу (фиксация на спине, 2 ч) в сроки до 8 дней. 12 крысам ежедневно в течение 8 дней внутримышечно вводили гидрокортизон («Richter», ВНР) в дозе 50 мг/кг. В разные сроки животных забивали под эфирным наркозом. Наличие эрозий и язв определяли визуально. Исследовали плазму крови и свежесывленную ткань желудка (железистая часть, все слои).

ГАГ из 0,5 мл надосадка желудочного сока (3000 об/мин, 5—6 мин) осаждали 2 мл охлажденного 94—95 % этанола, содержащего 0,1 М уксуснокислого калия и 0,15 М уксусной кислоты [14]. Полученный осадок эмульгировали в 3 мл 6 % ТХУ и гидролизовали в кипящей бане 30 мин, пользуясь каплеуловителем. Затем пробу охлаждали до 18—22 °С и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин [7]. В надосадке определяли содержание гексуриновых кислот карбазольным методом [8]. С целью проверки чувствительности и специфичности метода к 5 различным исследуемым пробам желудочного сока (рН 1,4—3,4) добавляли по 10, 20 и 30 мг/л гиалуроновой кислоты и хондроитин-4-сульфата. При этом выход стандарта составлял 96—100 %. Эта величина сохранялась и при добавлении в одну из проб желудочного сока (рН 1,4) альбумина, глюкозы и рибозы по 100 мг/л.

Для определения ГАГ в сухой обезжиренной (ацетоном, этиловым эфиром) слизистой оболочке желудка человека и стенке желудка крыс брали соответственно 2 и 20 мг ткани. Кусочки ткани гомогенизировали в 0,5 мл дистиллированной воды, добавляли по 2 мл этанола и все последующие процедуры проводили как указано выше. ГАГ выражали в миллимолях гексуриновых кислот на 1 л желудочного сока или на 1 кг сухой обезжиренной ткани.

В плазме крови в клинике и в эксперименте исследовали содержание 11-ОКС [4], которое выражали в микрограммах на 1 л плазмы крови.

Гексозаминсинтазную (ГАСА) и глюкуро-натсинтазную (ГСА) активность в ткани желудка, катализируемую в основном глюкозамин-6-фосфатсинтазой (КФ 5.3.1.19) и

УДФ-глюкозодегидрогеназой (КФ 1.1.1.22) соответственно, определяли по методу Malathy и соавт. [12] в нашей модификации.

В качестве препарата, обладающего ГАСА, использовали надосадочную жидкость (5000 об/мин, 15 мин, 1—2 °С) гомогената, полученную с добавлением к 0,5 г ткани стенки желудка крысы 1,5 мл смеси следующего состава: 66 мМ фосфатный буфер (рН 7,5), 0,154 М КСl, 0,001 М ЭДТА и 0,012 М глюкозо-6-фосфатдинатриевая соль («Reanal», ВНР). Смесь, содержащую 6 мМ фруктозо-6-фосфатдинатриевой соли («Serva», ФРГ) 12 мМ глутамин, 1 мМ ЭДТА, 0,5 мл ферментного препарата на 1 мл конечного объема в 66 мМ фосфатном буфере, инкубировали при 37 °С в течение 1 ч. В контроле использовали инактивированный препарат (при 100 °С, 3 мин). Содержание гексозаминов в инкубационных смесях определяли с реактивом Эрлиха [11].

Для выделения препарата, обладающего ГСА, 1 г ткани стенки желудка крысы гомогенизировали в 4 мл 0,66 мМ фосфатного буфера рН 6,2. Надосадок гомогената (6000 об/мин, 15 мин, 1—2 °С) после добавления равного объема насыщенного раствора сернистого аммония оставляли на 24 ч при 1—2 °С. Осадок этой смеси (4000 об/мин, 15 мин, 1—2 °С) диализировали против 0,001 М фосфатного буфера рН 6,2 в течение 24 ч в холодильнике. С целью инактивации балластных ферментов диализат-ферментный препарат прогрели в течение 2 мин в водяной бане при 54 °С [15]. В состав инкубационной смеси включали по 0,5 мл ферментного препарата, 0,88 мМ УДФ-глюкозы («Reanal», ВНР) в 0,05 М глициновом буфере рН 8,7 и 1,58 мМ НАД в том же буфере. Смесь инкубировали в течение 60 мин при 37 °С. Контроль ставили с инактивированным ферментным препаратом (100 °С, 3 мин). Содержание глюкуроновой кислоты, образовавшейся в смеси в виде УДФ-глюкуроновой кислоты, определяли карбазольным методом [8]. ГАСА и ГСА выражали соответственно в наномолях глюкозамина или глюкуроновой кислоты на 1 мг белка инкубационной смеси за 1 ч — нмоль/(мг·ч). Белки в инкубационных смесях находили по Лоури.

## Результаты и обсуждение

В норме (контрольная группа) содержание 11-ОКС в плазме крови составило  $310 \pm 27$  мкг/л. У больных уровень этого гормона коры надпочечников был повышен на 81,3 % ( $562 \pm 49$  мкг/л;  $p < 0,001$ ), что соответствует стрессовому состоянию организма [3]. У обследованных контрольной группы в желудочном соке обнаружено 10,1 мкмоль/л ГАГ, что не противоречит опубликованным данным [9]. При язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, обострение которой произошло при продолжительном воздействии стресса, уровень ГАГ в желудочном соке понизился на 32 %. Аналогично изменялась концентрация сум-

Таблица 1  
Содержание ГАГ при язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки

Исследуемый материал	Число анализов	Содержание ГАГ	
		$M \pm m$	разница с контролем, %
Слизистая оболочка, ммоль/кг контроль больные	10	12,60±0,42	-27,0*
	16	9,20±0,48	
Желудочный сок, мкмоль/л контроль больные	10	10,17±0,53	-32,8*
	25	6,84±0,98	

Примечание. Здесь и в табл. 2: звездочка — достоверные различия по сравнению с контролем.

марных ГАГ в слизистой оболочке желудка (табл. 1).

В опыте с многократным иммобилизационным стрессом в первые 3 дня и в конце опыта в стенке желудка найдены множественные эрозии и язвы у 80—90 и 40 % подопытных животных соответственно. Уровень 11-ОКС в плазме крови крыс повышался с  $412 \pm 18$  до  $936 \pm 27$ ;  $802 \pm 36$ ;  $630 \pm 42$  и  $546 \pm 51$  мкг/л соответственно на 1, 3, 5 и 8-й дни эксперимента. Во всех случаях повышение уровня 11-ОКС было достоверным ( $p < 0,05$ ).

Длительное введение гидрокортизона сопровождалось как повышением уровня 11-ОКС в плазме крови (до  $723 \pm 84$  мкг/л;  $p < 0,05$ ), так и появлением в слизистой оболочке желудка язв у 10 из 12 подопытных животных.

При анализе полученных в клинике и в эксперименте данных выявлена прямая связь между язвообразо-

ванием и повышением уровня 11-ОКС в плазме крови. Одной из причин этого можно считать нарушение обмена ГАГ. Так, в клинике установлено снижение уровня ГАГ в желудочном соке и слизистой оболочке желудка вблизи язвы. Сходный характер изменения содержания ГАГ в стенке желудка обнаружен и в эксперименте (табл. 2).

Следует отметить, что эти данные совпадают с существующими представлениями о роли нервно-психических факторов, глюкокортикоидов и нарушения обмена углеводсодержащих биополимеров в возникновении и рецидивировании язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки [1, 3].

Структурными компонентами ГАГ являются чередующиеся остатки гексааминов и гексурановых кислот. Активность синтеза этих производных моносахаридов в тканях является необходимым условием для образования ГАГ [2], составляющих основу слизистых образований желудка. Как указано в табл. 2, в первые 5 дней иммобилизации, а также при введении больших доз гидрокортизона угнетение синтеза гексааминов совпадало с уменьшением содержания ГАГ в стенке желудка. Кстати, именно в этот период отмечен наибольший подъем в крови содержания исследуемых глюкокортикостероидов (на 52—127 %). И наоборот, менее выраженное повышение их уровня (на 32 %) соответствует по сроку опыта резкой активации ГАСА и нормализации содержания ГАГ в гомогенате стенки желудка. Отсюда можно предположить, что незначительно повышенный пул 11-ОКС стимулирует процессы биосинтеза ГАГ. На такую

Таблица 2  
Показатели обмена ГАГ в стенке желудка при многократном иммобилизационном стрессе

Условия эксперимента	Число опытов	ГАГ, ммоль/кг	ГАСА, нмоль/(мг · ч)	ГСА, нмоль/(мг · ч)
Контроль	16	3,08±0,10	39,2±2,04	2,21±0,08
Иммобилизация, дни:				
1-й	15	2,73±0,21	19,9±2,16*	2,03±0,07
3-й	14	1,97±0,12*	30,3±3,29*	2,24±0,09
5-й	12	1,78±0,11*	31,2±3,17*	2,37±0,08
8-й	13	3,02±0,22	59,6±4,30*	2,92±0,06*
Гидрокортизон, 8 дней	12	1,87±0,18	21,3±3,68*	2,03±0,09

возможность указывает рост уровня ГАГ в тканях при продолжительном введении небольших доз гидрокортизона [6]. Что касается зависимости скорости биосинтеза гексурановых кислот от концентрации 11-ОКС, то ее обнаружить не удалось. По-видимому, повышение ГСА к 8-му дню иммобилизации следует связать с интенсификацией биосинтеза ГАГ.

Таким образом, как в клинике, так и в эксперименте стрессовые воздействия сопровождаются снижением уровня ГАГ в желудке при язвенном поражении и резким увеличением содержания 11-ОКС. Большие дозы экзогенного гидрокортизона и значительно повышенный уровень 11-ОКС в крови угнетают биосинтез гексозаминов в гомогенате стенки желудка крыс. Действие повышенных концентраций глюкокортикостероидов как одного из факторов язвообразования при стрессе может быть реализовано путем угнетения образования ГАГ и последующего снижения защитных свойств поверхностной слизи.

Незначительное повышение уровня глюкокортикостероидов в крови, что характерно для слабых стрессогенных воздействий, влияет на стенку желудка благоприятно. Все это не противоречит особенностям процессов адаптации к сильным стрессогенным воздействиям [5].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Василенко В. Х., Гребнев А. Л., Шептулин А. А. Язвенная болезнь: Современные представления о патогенезе, диагностическое лечение. — М., 1987.
2. Видершайн Г. Я. Биохимические основы гликозидозов. — М., 1980.
3. Рабинович П. А. // Клин. мед. — 1984. — № 8. — С. 146—148.
4. Резников А. Г. Методы определения гормонов. — Киев, 1980.
5. Физиология адаптационных процессов /Под

- ред. О. Г. Газенко, Ф. З. Меерсона. — М., 1986.
6. Хомуло П. С., Коннова Л. А. // Бюл. экпер. биол. — 1986. — № 8. — С. 956—957.
  7. Шараев П. Н., Пишков В. Н., Соловьева Н. И. и др. // Лаб. дело. — 1987. — № 5. — С. 330—332.
  8. Bitter T., Muir H. M. // *Analyt. Biochem.* — 1962. — Vol. 4. — P. 330.
  9. Chacha A., Chmiel J. // *Diagn. Lab.* — 1975. — Vol. 11. — P. 111—120.
  10. Elders M. J., Mc Natt M. L., Kilgore B. S. et al. // *Biochem. biophys. Res. Commun.* — 1977. — Vol. 77. — P. 557—565.
  11. Exley D. // *Biochem. J.* — 1957. — Vol. 67. — P. 52—59.
  12. Malathy K., Kurup P. A. // *Indian J. Biochem. Biophys.* — 1971. — Vol. 8. — P. 147—149.
  13. Parke D. V. // *Brit. med. Bull.* — 1978. — Vol. 34. — P. 89—94.
  14. Pearce R. H. et al. // *Canad. J. Res. Sect. E.* — 1949. — Vol. 27. — P. 43.
  15. Sivaswami A. et al. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1972. — Vol. 276. — P. 43—52.
  16. Suzuki Y., Ito M., Sudo Y. // *Jap. J. Pharmacol.* — 1979. — Vol. 29. — P. 821—828.

Поступила 06.03.88

#### METABOLISM OF GLYCOSAMINOGLYCANS UNDER STRESS CONDITIONS

P. N. Sharaev, V. G. Ivanov, L. I. Kutuyavin

Medical School, Izhevsk

Several patterns of glycosaminoglycans (GAG's) metabolism in gastric tissue were studied in patients with acute form of gastric and duodenal ulcerous disease, caused and accompanied by multiple stressory agents. Similar studies were carried out in rats under conditions of stress caused by daily immobilization (in dorsal position) within 8 days. Under these stressory conditions distinct increase of II-oxycorticosteroids content in blood was related to inhibition of hexosamines biosynthesis in gastric wall and to a decrease in content of GAG-s in gastric juice, mucosal membrane and wall cells. The rate of synthesis of hexosamines and hexuronic acids was increased, while content of GAG's was normalized in gastric tissues during adaptation of rats to the immobilization stress conditions, when moderate elevation in the II-oxycorticosteroids content was observed.

Т. К. Гаскина, С. А. Курилович, В. Н. Горчаков

## ИЗМЕНЕНИЕ СКОРОСТИ ЛЕЦИТИНХОЛЕСТЕРОЛАЦИЛТРАНСФЕРАЗНОЙ РЕАКЦИИ И ЛИПИДНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПОД ВЛИЯНИЕМ КАТЕРГЕНА В УСЛОВИЯХ ОСТРОГО ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ПЕЧЕНИ

Институт терапии Сибирского отделения АМН СССР, Новосибирск

Химизация быта и производства, широкое распространение употребления алкоголя [7] увеличивают частоту токсических поражений печени. Токсическое повреждение печени сопровождается изменением липидных показателей крови, так как она играет центральную роль в обмене липидов и липопротеидов. В то же время методы лекарственной коррекции липидных нарушений до конца не разработаны. При лечении заболеваний печени, в том числе токсического генеза, широко применяют лекарственные препараты, обладающие способностью нормализовать структуру и функцию мембран клеток печени. Таким препаратом является и катерген [(+)-цианидолол-3], выпускаемый фармацевтическим заводом «Биогал» (ВНР). Однако терапевтический эффект катергена оценивается неоднозначно [4, 12, 15], что связано с недостаточно полными представлениями о механизме его действия.

В связи с этим мы изучили в эксперименте действие катергена на основные липидные показатели и скорость лецитинхолестеролацилтрансферазной (ЛХАТ)-реакции сыворотки крови и структуру печени при остром токсическом повреждении печени, вызванном введением  $CCl_4$  и этанола.

### Методика

Эксперимент выполнен на 120 крысах-самцах Вистар массой 180—200 г. Животных содержали на стандартном рационе. Модель острого поражения печени создавали путем однократного внутривентрального введения  $CCl_4$  в дозе 1 мг/кг (40 крыс) [9] и этанола в дозе 6 г/кг (40 крыс). Половине животных обеих групп предварительно вводили катерген в дозе 120 мг/кг 1 раз в сутки в течение 2 нед. Контрольные группы составили 20 интактных крыс и 20 крыс, которые получали только катерген без заправки. Через 24 ч после введения  $CCl_4$  и этанола крыс декапитировали. В сыворотке крови определяли уровень общего холестерина (ОХС), триглицеридов (ТГ),  $\alpha$ -

холестерина (ХС липопротеидов высокой плотности — ЛПВП) на автоанализаторе «Техникон АА-11» (США). Концентрацию неэстерифицированного холестерина (СХС) и эфиров холестерина (ЭХС) в сыворотке крови определяли следующим способом: липиды экстрагировали из сыворотки крови по методу Фолча [10], проводили их разделение методом одномомерной ТСХ на силикагеле в двух системах растворителей (гексан — диэтиловый эфир — ледяная уксусная кислота в соотношениях соответственно 60:40:1 и 90:10:1). Фракции СХС и ЭХС количественно определяли по реакции Златкиса — Зака [20]. Скорость ЛХАТ-реакции определяли по методу [17]. Радиоактивность подсчитывали на счетчике «Magk-III» (США). Результаты выражали в процентах холестерина (ХС), подвергшегося эстерификации за 1 ч инкубации (фракционная скорость эстерификации), а также в абсолютных количествах ХС, эстерифицированного за 1 ч инкубации в 1 л сыворотки (молярная скорость эстерификации). Молярную скорость эстерификации ХС (в  $\mu\text{кмоль/л/ч}$ ) рассчитывали на всю фракцию СХС сыворотки и на ХС ЛПВП.

Гистологические срезы печени окрашивали гематоксилином и эозином и ШИФФ-реактивом. Проводили описание гистологических препаратов и морфометрию. За структурно-функциональную единицу печени был принят ацинус. В ацинусе подсчитывали количество некротических клеток и рассчитывали их площадь по отношению к общей площади ацинуса.

Полученные результаты обработаны методом параллельных рядов с использованием критерия Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

Введение катергена в течение 2 нед у интактных животных не изменяло концентрацию липидов (табл. 1), фракционную и молярную скорость ЛХАТ-реакции сыворотки крови (табл. 2). На исходном уровне оставалось и процентное содержание СХС (рис. 1).

Через 24 ч после введения  $CCl_4$  в печени крыс обнаружены дистрофические изменения в гепатоцитах и центрлобулярные некрозы. В сыворотке крови при этом увеличивалась концентрация СХС до  $40,7 \pm 2,95$  мг/дл по сравнению с  $27,3 \pm 1,80$  мг/дл в контроле ( $p < 0,001$ ). Одновременно про-



Таблица 1

Изменение основных липидных показателей сыворотки крови у крыс под влиянием катергена при остром повреждении печени  $\text{CCl}_4$  и этанолом ( $\bar{X} \pm m$ )

Условия эксперимента	ОХС	ХС	ТГ	Коэффициент эстерификации ХС. ЭХС/СХС
	мг/дл			
1. Контроль	85±3,5	34±2,5	58±7,7	2,0±0,14
2. Катерген	82±6,0	33±2,0	40±5,8	2,1±0,16
3. $\text{CCl}_4$	80±15,7	12±0,9	54±9,1	1,0±0,07
4. $\text{CCl}_4$ + катерген	86±15,8 ( $p_{1-3} < 0,001$ )	16±1,1	67±4,2	( $p_{1-3} < 0,001$ ) 1,9±0,18 ( $p_{3-4} < 0,001$ )
5. Этанол	102±3,0 ( $p_{1-5} < 0,001$ )	28±4,7	89±6,3 ( $p_{1-5} < 0,001$ )	1,4±0,06 ( $p_{1-5} < 0,001$ )
6. Этанол + катерген	94±4,0 ( $p_{1-6} < 0,001$ )	33±3,1	90±9,7 ( $p_{1-6} < 0,001$ )	1,9±0,13 ( $p_{6-6} < 0,001$ )

исходило достоверное снижение содержания ЭХС и соответственно коэффициента эстерификации. Более чем в 2 раза уменьшилась скорость ЛХАТ-реакции и снизилась концентрация ХС ЛПВП.

Гепатотоксический эффект  $\text{CCl}_4$  обусловлен внутриклеточным накоплением свободных радикалов, которые, реагируя с ненасыщенными жирными кислотами липидного слоя клеточных мембран, вызывают ценную реакцию перекисного окисления липидов (ПОЛ). В первую очередь в гепатоцитах страдают мембраны эндоплазматического ретикулума, где локализованы ферменты синтеза белка и митохондриальной системы окисления [1, 2]. Это ведет к нарушению белково-синтетической функции гепатоцитов и последующей гибели клеток. Избирательное накопление радикалов  $\text{CCl}_4$  в гепатоцитах с высоким содержанием ферментов системы цитохром

P-450 объясняет центрлобулярную локализацию некроза гепатоцитов [16]. Изменение концентрации и состава липидов крови является одним из компонентов патогенеза токсического действия  $\text{CCl}_4$ .

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что увеличение содержания СХС и одновременное снижение концентрации ЭХС в сыворотке крови связано с нарушением процесса эстерификации СХС. У крыс в отличие от человека пул ЭХС в сыворотке крови образуется при участии лецитинхолестеролацилтрансферазы (ЛХАТ) и ацил-КоА-холестерол-О-ацилтрансферазы [19]. Последний образует ЭХС внутри клеток, затем ЭХС секретируется в кровь в составе липопротеидов (преимущественно липопротеидов очень низкой плотности — ЛПОНП). ЛХАТ синтезируется в гепатоцитах и секретируется в кровь, где катализирует перенос жирных ки-

Таблица 2

Изменение скорости эстерификации ХС сыворотки крови у крыс под влиянием катергена,  $\text{CCl}_4$ , этанола ( $\bar{X} \pm m$ )

Условия эксперимента	Фракционная скорость эстерификации ХС, % в час	Молярная скорость эстерификации ХС, мкмоль/л/ч	
		СХС	ХС ЛПВП
1. Контроль	4,9±0,38	46±4,6	56±5,8
2. Катерген	4,8±0,17	48±6,0	62±4,3
3. $\text{CCl}_4$	2,0±0,11 ( $p_{1-3} < 0,05$ )	32±2,6	10±0,98 ( $p_{1-3} < 0,05$ )
4. Катерген + $\text{CCl}_4$	2,6±0,18 ( $p_{1-4} < 0,05$ ; $p_{3-4} < 0,05$ )	32±3,6	16±1,6 ( $p_{1-4} < 0,05$ ; $p_{3-4} < 0,05$ )
5. Этанол	7,6±0,35 ( $p_{1-5} < 0,05$ )	116±5,1 ( $p_{1-5} < 0,05$ )	80±11,6
6. Катерген + этанол	9,9±0,45 ( $p_{1-6} < 0,05$ ; $p_{5-6} < 0,05$ )	145±14,9 ( $p_{1-6} < 0,05$ )	138±16,1 ( $p_{1-6} < 0,05$ )

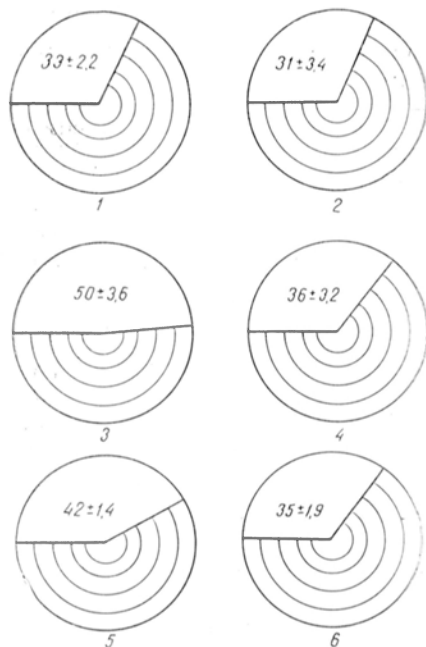


Рис. 1. Соотношение свободной и эстерифицированной фракций ХС сыворотки крови крыс при воздействии  $CCl_4$ , этанола и катергена.

СХС выражен в процентах к ОХС ( $\bar{X} \pm m$ ). Заштрихованный сектор — содержание ЭХС (в %). 1 — контроль; 2 — катерген; 3 —  $CCl_4$ ; 4 — катерген +  $CCl_4$ ; 5 — этанол; 6 — катерген + этанол.

слот с лецитина на СХС ЛПВП с образованием ЭХС и лизолецитина [13]. Данная реакция эстерификации ХС протекает при участии апопротеинов апо $A_1$  и апо $A_2$ , также синтезируемых гепатоцитами. Использованный нами метод определения активности ЛХАТ [17] отражает состояние всей системы ЛХАТ-реакции: концентрацию и состав субстратов, кофакторов и активность энзима. Значительное снижение концентрации ХС ЛПВП, фракционной и молярной скорости эстерификации СХС указывает на то, что нарушение образования ЭХС при введении  $CCl_4$  связано с поражением клеток печени.

Предварительное введение катергена предотвращало повышение уровня СХС в крови крыс после токсического действия  $CCl_4$ , но концентрация ЭХС от контроля почти не отличалась (см. рис. 1). В то же время на фоне предварительного введения катергена снижение фракционной скорости ЛХАТ-реакции и уровня ХС ЛПВП произошло в достоверно меньшей степени, чем у животных, не получавших катерген. Молярная скорость эстерифи-

кации ХС в расчете на СХС существенно не изменилась. При изучении гистологических срезов печени животных, получавших катерген и  $CCl_4$ , также выявлены участки гепатонекроза. Однако введение катергена способствовало уменьшению числа некротических клеток и поэтому отношение их площади к площади ацинуса было существенно меньше (рис. 2). В условиях токсического повреждения печени  $CCl_4$  гепатопротекторное действие катергена объясняется его способностью нейтрализовать свободные радикалы и тем самым подавлять развитие ПОЛ, генерируемое  $CCl_4$  [14]. Воздействие катергена на показатели липидного обмена опосредовано через предотвращение некроза гепатоцитов.

После приема этанола в дозе 6 г/кг в клетках печени возникают высокая концентрация ацетальдегида, избыточное содержание восстановленного НАД, жирных кислот, что приводит к развитию дистрофии клеток [6]. В нашем эксперименте однократное введение этанола не вызвало нарушения структуры долек печени у крыс. Наблюдалась сосудистая реакция в виде расширения сосудов. Гепатоциты в центрлобулярных зонах долек были более мелкими, светлыми, отдельные клетки — дистрофичными. Единичные гепатоциты находились в состоянии некробиоза. Отмечена активация купферовских клеток. Изменение липидов сыворотки крови после введения этанола выражалось в повышении концентрации ТГ и ОХС за счет незэстерифицированной фракции ( $p < 0,001$ ). Соответственно снижался коэффициент эстерификации ХС. У крыс большая часть ХС в плазме крови нахо-

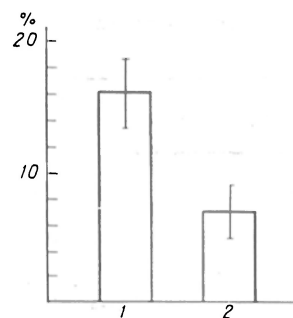


Рис. 2. Площадь некроза гепатоцитов при введении  $CCl_4$  (1) и катергена +  $CCl_4$  (2). Площадь некротизированных гепатоцитов выражена в процентах к площади ацинуса печени.

дится в составе ЛПВП [3], но через 24 ч после введения этанола уровень ХС ЛПВП в нашем исследовании не отличался от контроля. В то же время фракционная и молярная скорости эстерификации ХС оказались достоверно выше, чем в контроле, но в последнем случае особенно наглядно — при пересчете на ХС ЛПВП. Вероятно, наблюдавшееся увеличение концентрации ХС произошло за счет фракции ХС ЛПОНП. Известно, что однократное введение этанола способно вызывать обратимую индукцию многих ферментных систем печени, в том числе и микросомальных ферментов [1, 5, 6]. Это обуславливает ускоренный синтез ряда соединений (жирных кислот, апоА<sub>I</sub>, апоА<sub>II</sub>) и ТГ [5, 18]. Вновь синтезированные ТГ секретируются в кровь в составе ЛПОНП [5]. Ряд исследователей предполагают, что и ЛПВП играют определенную роль во внутрисосудистом обмене ТГ [8]. Увеличение скорости ЛХАТ-реакции в этих условиях, по-видимому, направлено на ликвидацию гиперлипидемии.

Из литературы известно, что катерген нормализует соотношение НАД<sup>+</sup>ХН/НАД, увеличивает активность АТФ и стабилизирует лизосомные мембраны в клетках печени, подвергшихся действию этанола [11], но не предотвращает повреждения микросомальной системы цитохром Р-450 печени крыс метаболитами этанола [14]. В нашем эксперименте не отмечено положительного влияния катергена при развитии посталкогольной дистрофии гепатоцитов. У животных, получавших этанол на фоне введения катергена, уровни ТГ и ОХС в сыворотке крови оставались повышенными. Тем не менее доля ЭХС оказалась больше, а доля СХС — уменьшилась, что соответствует нормализации коэффициента эстерификации. Скорость ЛХАТ-реакции возросла в среднем на 30 % по сравнению с таковой у крыс, получавших только этанол ( $p < 0,001$ ).

Таким образом, использование экспериментальной модели острого поражения печени ССl<sub>4</sub> и этанолом позволило уточнить действие катергена на липиды сыворотки крови. Снижение скорости ЛХАТ-реакции при однократном введении ССl<sub>4</sub> связано с некрозом клеток печени, поэтому улуч-

шение данного показателя при введении катергена может быть свидетельством протекторного действия препарата. Положительный терапевтический эффект катергена в условиях острого воздействия этанолом заключается в увеличении фракционной и молярной скорости ЛХАТ-реакции и нормализации коэффициента эстерификации ХС сыворотки крови. Гепатопротекторный эффект катергена при воздействии ССl<sub>4</sub> выше, чем при введении этанола.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Арчаков А. И., Карузина И. И. // Успехи гепатологии. — Рига, 1973. — Вып. 4. — С. 39—59.
2. Блюгер А. Ф., Ремберга А. А., Майоре А. Я., Горкин В. З. // Там же. — 1984. — Вып. 11. — С. 28—29.
3. Ловягина Т. П., Баныковская Э. Б. // Журн. эволюц. биохим. — 1970. — № 3. — С. 255—261.
4. Логинов А. С., Джалалов К. Д., Блок Ю. Е. и др. // Тер. арх. — 1986. — № 2. — С. 73—74.
5. Титов В. Н., Пицин Д. П. // Биохимия. — 1978. — Т. 43, № 1. — С. 83—86.
6. Успенский А. Е. // Токсикология. — М., 1984. — Т. 13. — С. 6—56.
7. Colliver I., Doernberg D., Grant B. // J. A. M. A. — 1986. — Vol. 256. — P. 3337—3338.
8. Eisenberg S., Levy R. I. // Advanc. Lipid Res. — 1975. — Vol. 13. — P. 1—89.
9. Ferreyra E. C., Fenos O. M., Gastro I. A. // Res. Commun. chem. Pharmacol. — 1983. — Vol. 40. — P. 515—518.
10. Folch I., Lees M., Sloane G. H. // J. biol. Chem. — 1957. — Vol. 226. — P. 497—505.
11. Gajdos A., Gajdos-Torok M., Horn R. // Biochem. Pharmacol. — 1972. — Vol. 21. — P. 595—600.
12. Gladys A., Iuszczyk J. // Wiad. Lek. — 1985. — Vol. 38. — P. 1039—1042.
13. Glomset I. A., Wright I. L. // Biochim. biophys. Acta. — 1964. — Vol. 89. — P. 266—276.
14. Javor T., Horvath T., Wittmann J. et al. // Cytochrome P-450. Biochemistry, Biophysics and Induction. — Budapest, 1985. — P. 67—70.
15. Mordan M. J., Colman I. C., Schener P. J., Sherlock S. // International Workshop on (+)-Cyanidolon-3 in Diseases of the Liver/ Ed. H. O. Conn. — London, 1981. — P. 177—179.
16. Slater T. F., Checseman K. H., Ingolo K. U. // Phil. Trans. roy. Soc. Lond. — 1986. — Vol. 311. — P. 633—645.
17. Stokke K. T., Norum K. R. // Scand. J. clin. Lab. Invest. — 1971. — Vol. 27. — P. 21—27.
18. Taskinen M. R., Nikkila E. A., Valimaki M. et al. // Amer. Heart J. — 1987. — Vol. 113. — P. 458—464.
19. Ueno K., Sakuma N., Kawaguchi M. et al. // J. Biochem. (Tokyo). — 1986. — Vol. 99. — P. 541—547.

20. Zlatkis A., Zak B., Boyle A. // J. Lab. clin. Med. — 1953. — Vol. 41. — P. 486—492.

Поступила 09.09.88

ALTERATIONS IN THE RATE OF LCAT-CATABOLYZED REACTION AND IN LIPID SPECTRUM OF BLOOD SERUM AFTER TREATMENT WITH CATHERGENE UNDER CONDITIONS OF ACUTE EXPERIMENTAL LIVER TISSUE IMPAIRMENT

T. K. Gaskina, S. A. Kurilovich, V. N. Gorchakov

Institute of Therapy, Siberian Branch of the Academy of Medical Sciences of the USSR, Novosibirsk

Fractional and molar rates of lecithin: cholesterol aminotransferase (LCAT)-catabolyzed reaction were decreased, while free cholesterol fraction was increased in blood serum of rats within 24 hrs after single administration of CCl<sub>4</sub> 1 mg/kg. Cathergene, contributing to a decrease in hepatocyte necrosis, affected positively the blood lipid spectrum in CCl<sub>4</sub> treated rats. The cathergene protective effect, observed also after acute ethanol poisoning (6 g/kg), involved an increase by about 30 % of the fractional and molar rates of LCAT-reactions; it also normalized the cholesterol esterification coefficient in blood serum. The drug did not prevent the postalcohol dystrophy of hepatocytes, hypertriglyceridemia, hypercholesterolemia.

УДК 617-001.17-07:616.153.915-39]-02:615.355

М. И. Агаджанов, М. А. Симолян, Ш. А. Казарян

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ  
НА СОДЕРЖАНИЕ ЭНДОГЕННОЙ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ  
И ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ ПРИ ТЕРМИЧЕСКИХ  
ОЖОГАХ

Кафедра биохимии медицинского института, Ереван

Термический ожог сопровождается значительным повышением уровня перекисного окисления липидов (ПОЛ) в различных органах и тканях уже в первые минуты после ожога и в течение последующих 30 дней [1, 4]. Эти изменения вызывают значительные сдвиги в состоянии тканевых антиоксидантных систем, в том числе в содержании  $\alpha$ -токоферола [2], ферментов антирадикальной защиты клетки (глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы) [3]. Важную роль в функционировании защитной системы организма играет супероксиддисмутаза (СОД), катализирующая диспропорционирование супероксидных анионрадикалов. Образование последних отмечено в клеточных органеллах [14], эндоплазматическом ретикулуме [16] и в щелочных растворах перекиси водорода [20]. Было постулировано образование синглетного кислорода в липоксигеназной реакции [12], в реакции распада перекиси водорода, катализируемой пероксидазой хрена [11].

Можно было ожидать, что при состояниях, сопровождаемых изменениями в ПОЛ, изменится интенсивность образования супероксидного аниона, что должно сопровождаться соответствующими сдвигами в активности

СОД. Представляло интерес изучить изменения в содержании и активности СОД в условиях стимуляции ПОЛ. Одновременно ставилась задача выявить влияние экзогенной СОД на процессы ПОЛ при стимуляции ПОЛ в условиях ожоговой травмы.

Методика

Опыты ставили на белых крысах-самках массой 120—160 г. Ожог III степени 12—15 % поверхности тела вызывали горячей водой под легким эфирным наркозом [2]. 1-я группа (40 животных) служили контролем, 2-ю группу составляли 40 крыс с ожогом. Животным 3-й группы (40 крыс) за 1 ч до ожога внутривентриально вводили СОД (по 2 мг на 1 кг массы), введение препарата повторяли через каждые 10 ч. Через 50 ч из каждой группы по 20 крыс декапитировали, выделяли печень (60 г) и приступали к ее обработке для получения СОД. Остальных животных оставляли для исследования на выживаемость. При этом животным 3-й группы продолжали вводить СОД по 1 разу в день в течение 3 дней, затем дозу снижали до 1 раза в 2 дня в течение 10 дней. Описанный опыт повторяли трижды.

Использовали препарат Cu, Zn-СОД, выделенный из печени быка и очищенный по методу [6]. Удельная активность препарата СОД, определенная по методу [15], составляет 2200—2500 ед. на 1 мг белка.

Содержание СОД в ткани печени после ожога определяли методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), сравнивая интегральные интенсивности для известной и неизвестной концентраций СОД.

Таблица 1

## Содержание и активность СОД в печени крыс после ожоговой травмы

Группа животных	2-й день		10-й день	
	содержание, мг·10 <sup>-3</sup> М	активность, Ед на 1 г ткани	содержание, мг·10 <sup>-3</sup> М	активность Ед. на 1 г ткани
Интактные	5±0,2	400±50	5,2±0,15	410±30
Ожог	3±0,1	160±30	4±0,2	310±40
Ожог + СОД	4±0,08	330±35	4,5±0,17	350±25

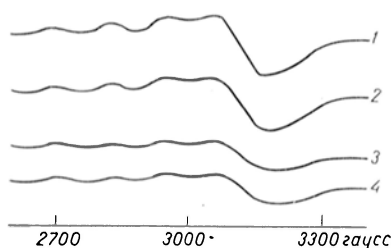
Примечание. За единицу активности СОД принимали количество белка, вызывающее 50 % ингибирование процесса образования адrenoхрома при окислении адrenalина супероксидными анионами.

Спектры ЭПР регистрировали на спектрометре «Varian E-4» (США) при следующих условиях: микроволновая частота 9,08 ГГц, мощность 10 мВт, постоянная времени 0,3 с, амплитуда модуляции 10 Тс, температура 190°C, чувствительность записи спектров 10<sup>3</sup>.

Активность СОД в исследуемых растворах определяли при 25°C. Уровень ПОЛ определяли по содержанию малонового диальдегида (МДА) [5] и выражали в миллимолях на 1 г ткани. В течение 10 дней регистрировали гибель животных в опытной (ожог+СОД) и контрольной (ожог) группах.

## Результаты и обсуждение

Как показали наши исследования, содержание и активность эндогенной СОД в печени крыс (табл. 1) через 2 дня после ожоговой травмы понизились примерно на 40 %; через 10 дней они несколько повысились, оставаясь, однако, ниже нормы (в пределах 20 %). При этом не обнаружено различий в форме спектров ЭПР для СОД, выделенных из печени интактных животных и крыс с ожоговой травмой (см. рисунок).  $G_1$  и  $A_{II}$  в обоих случаях имеют величину 2,08 и 140 Гс соответственно. Экзогенно вве-



Спектры ЭПР эндогенной СОД.

Ферментный препарат, выделенный из печени интактных крыс (1); фермент из печени крыс через 2 дня после нанесения ожоговой травмы с одновременным введением экзогенной СОД (2); фермент из печени крыс через 2 дня после ожоговой травмы (3); фермент из печени крыс через 2 дня после ожоговой травмы при пропускании кислорода через раствор СОД в течение 1 ч (4). Интегральные интенсивности сигналов ЭПР для 1, 2, 3 и 4 равны (в отн. ед.) 3±0,5, 2,6±0,2, 1,6±0,4 и 1,5±0,6 соответственно.

денная СОД также имеет спектр ЭПР с аналогичными значениями  $G_1$  и  $A_{II}$ . Не наблюдали и восстановления меди в активном центре фермента, поскольку после аэрации в течение 1 ч раствора СОД, имеющего спектр ЭПР, приведенный на рисунке, не происходит увеличения его интегральной интенсивности, что могло бы иметь место при наличии  $Cu^+$  (в результате его окисления до  $Cu^{2+}$ ).

В указанные сроки после ожога увеличивается содержание МДА в печени крыс (табл. 2). Введение экзогенной СОД по указанной выше схеме несколько нормализует изучаемые показатели. Так, уровень эндогенной СОД заметно повысился, оставаясь ниже нормы через 2 и 10 дней соответственно на 20 и 10 %. Содержание МДА при этом снизилось аналогичным образом.

Протекторное действие экзогенной СОД на состояние защитной системы организма выразилось и в повышении выживаемости животных (табл. 3).

Заметное понижение содержания и активности СОД в печени, особенно на начальных этапах патологического процесса, может быть связано с повышением содержания активных форм кислорода (супероксидный анион,  $HO^*$ , перекись водорода, липоперекиси). Супероксидный анион способен

Таблица 2

Содержание МДА (в 10<sup>-2</sup> ммоль на 1 г ткани) в печени крыс после ожоговой травмы

Группа животных	2-й день	10-й день
Интактные	3,4±0,3	3,3±0,2
Ожог	8,0±0,25	5,1±0,5
Ожог + СОД	5,5±0,6	4,0±0,7

Выживаемость крыс после ожога

День после ожога	Число оставшихся в живых крыс	
	ожог (n=20)	ожог+СОД (n=20)
1-й	11	17
3-й	5	9
5-й	3	7

инактивировать каталазу [13] и глутатионпероксидазу [10], в результате чего уровень эндоперекисей, особенно перекиси водорода, может стать более значительным. В процессе дисмутации  $O_2^-$  также образуется перекись водорода; липоперекиси и перекись водорода способны соответственно обратимо [7] или необратимо [18] инактивировать СОД. Можно предполагать, что в процессе необратимых изменений СОД при ожоговой травме важная роль принадлежит перекиси водорода.

При ожоговой травме имеет место убыль не удельной активности (в данном случае она составляет примерно 2200 ед/мг), а общей активности СОД как результат уменьшения содержания фермента, а не восстановления меди в активном центре, как это наблюдалось на начальных стадиях некоторых патологических состояний, в том числе при действии ионизирующей радиации [19], судорожных припадках [8], остром алкогольном отравлении [9] и др.

Ожоговая травма, будучи исключительно сильным воздействием, создает в организме стрессовое состояние, сопровождаемое образованием одновременно в больших количествах активных форм кислорода. Организм не успевает в ответ синтезировать соответствующее количество СОД. Введение экзогенной СОД способствует нейтрализации активных форм кислорода, предохраняет эндогенную СОД, повышает выживаемость животных.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о целесообразности дальнейших исследований по использованию препарата СОД в терапии ожоговой травмы.

1. Агаджанов М. И. // Журн. exper. и клин. мед. — 1977. — Т. 17, № 5. — С. 68—78.
2. Агаджанов М. И. // Биол. журн. Армении. — 1978. — Т. 31, № 2. — С. 128—134.
3. Агаджанов М. И. // Журн. exper. и клин. мед. — 1979. — Т. 19, № 3. — С. 248—260.
4. Аристархова С. А., Бурлакова Е. Б., Заец Т. Л. // Вопр. мед. химии. — 1983. — № 4. — С. 102—105.
5. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М., 1972.
6. Симонян М. А., Галстян Д. А., Демирчоглян И. Г. // Биохимия. — 1985. — Т. 50, № 5. — С. 768—773.
7. Симонян М. А. // Там же. — 1984. — Т. 49, № 11. — С. 1792—1798.
8. Симонян М. А., Табачникова С. И., Громов Л. А. // Нейрохимия. — 1984. — Т. 3, № 2. — С. 124—129.
9. Симонян М. А., Амирханян Л. Т., Карагезян К. Г. // Всесоюзная конф. «Биоантиоксидант», 2-я: Тезисы. — Черноголовка, 1986. — Т. 1. — С. 84.
10. Blum J., Fridovich I. // J. biol. Chem. — 1985. — Vol. 240. — P. 500—505.
11. Chan H. W. // J. Amer. Chem. Soc. — 1971. — Vol. 93. — P. 4632—4637.
12. Hamberg M., Samuelson B. G. // J. biol. Chem. — 1967. — Vol. 242. — P. 5329—5334.
13. Kono Y., Fridovich I. // Ibid. — 1982. — Vol. 257. — P. 5751—5754.
14. Loschen G., Azzi A., Richter Ch., Flohe L. // FEBS. Lett. — 1974. — Vol. 42. — P. 68—71.
15. Misra H. P., Fridovich I. // J. biol. Chem. — 1972. — Vol. 247. — P. 3170—3175.
16. Nakamura S., Yamazani I. // Biochim. biophys. Acta. — 1969. — Vol. 189. — P. 29—35.
17. Oliveira O. M., Sanioto I. L., Cilento G. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1974. — Vol. 53. — P. 391—395.
18. Symonyan M. A., Nalbandyan R. M. // FEBS Lett. — 1972. — Vol. 28. — P. 22—24.
19. Symonyan M. A., Nalbandyan R. M. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1979. — Vol. 90. — P. 1207—1213.
20. Symonyan M. A., Nalbandyan R. M. // Biochim. biophys. Acta. — 1979. — Vol. 583. — P. 279—286.

Поступила 09.09.88

#### EFFECT OF EXOGENOUS SUPEROXIDE DISMUTASE ON CONTENT OF THE ENDOGENOUS ENZYME AND LIPID PEROXIDATION IN THERMIC BURNS

M. I. Agadzhanov, M. A. Simonyan, Sh. A. Kazaryan

Chair of Biochemistry, Medical School, Yerevan

Content and activity of endogenous superoxide dismutase (SOD) were decreased simultaneously with an increase in the rate of lipid peroxidation under conditions of burns trauma. At the same time, parameters of the EPR signal were unaltered. Administration of exogenous SOD normalized the patterns studied and increased distinctly the survival rate of rats.

М. И. Калинин, Ю. И. Губский, Н. Д. Рудницкая, М. Д. Курский

## АТР-ЗАВИСИМЫЙ ТРАНСПОРТ КАЛЬЦИЯ В САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОМ РЕТИКУЛУМЕ МИОКАРДА ПРИ АДАПТАЦИИ К МЫШЕЧНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

Киевский институт физической культуры, Киевский медицинский институт им. А. А. Богомольца

Увеличение силы сокращения мышц, в частности миокарда, при тренировке с использованием физических нагрузок прямо зависит от концентрации внутриклеточного ионизированного кальция, способного взаимодействовать с сократительными белками [5, 11]. Поскольку ионизированный кальций играет ключевую роль в сопряжении возбуждения с сокращением в миокарде, предполагается, что физические нагрузки вызывают увеличение активности  $Ca^{2+}$ -транспортующих систем [9], способных регулировать концентрацию ионизированного кальция в кардиомиоцитах.

Основной структурой, участвующей в поддержании внутриклеточного гомеостаза  $Ca^{2+}$  в миокарде крыс, является саркоплазматический ретикулум (СР) [4]. Аккумуляция  $Ca^{2+}$  в СР сопряжена с гидролизом АТР и сопровождается расслаблением мышцы, тогда как сокращение, как полагают, инициируется высвобождением  $Ca^{2+}$  из СР [7].

Известно, что транспорт  $Ca^{2+}$  в СР находится под контролем сАМР-зависимой протеинкиназы, которая, фосфорилируя мембранный белок фосфоламбан, повышает скорость АТР-зависимого транспорта  $Ca^{2+}$ , способствуя таким образом более быстрой релаксации мышцы [7, 13]. Вместе с тем свойства  $Ca^{2+}$ -насоса СР и механизмов его регуляции при адаптации миокарда к мышечной деятельности малоизучены.

С учетом важной роли отдельных  $Ca^{2+}$ -транспортующих систем и механизмов их регуляции, поддерживающих внутриклеточный гомеостаз  $Ca^{2+}$  на определенном уровне, нами изучены АТР-зависимый транспорт  $Ca^{2+}$  в СР и влияние сАМР-зависимого фосфорилирования на этот процесс при адаптации сердечной мышцы к физическим нагрузкам.

### Методика

Опыты проводили на крысах-самцах линии Wistar массой 200 г, разделенных на 2 группы: контрольную (25 крыс) и опытную (40 крыс). Подопытных животных подвергали тренировке длительными физическими нагрузками (бег в тредбане) в течение 6 нед с постепенным увеличением их длительности и интенсивности. Через 2 сут после окончания тренировки животных декапитировали под легким эфирным наркозом, извлекали сердца и замораживали в жидком азоте. Одновременно декапитировали контрольную группу.

Фрагменты мембран СР из сердец выделяли по методу [6], а растворимую форму сАМР-зависимой протеинкиназы — по методу [1].

АТР-зависимый транспорт кальция в мембранах СР изучали следующим образом. В реакционную среду (2 мл), содержащую 40 мМ гистидин-НСl (рН 6,8), 120 мМ КСl, 5 мМ  $MgCl_2$ , 5 мМ К-оксалат, 60—100 мкг белка СР и 5 мМ NaF, добавляли 5 мМ АТР, прогревали 3 мин при 30 °С для уравнивания температуры и реакцию инициировали  $^{45}Ca^{2+}$  (конечная концентрация 100 мкМ). Останавливали реакцию фильтрацией проб на миллиметровых фильтрах («Millipore», диаметр 0,45 мкм). Фильтры промывали 10 мл 20 мМ гистидин-НСl (рН 6,8), содержащего 140 мМ КСl и 1 мМ  $KH_2PO_4$ , высушивали и определяли радиоактивность на жидкостно-сцинтилляционном счетчике «Beckman LS 7000».

сАМР-зависимое фосфорилирование фрагментов мембран СР проводили в среде инкубации (0,2 мл), содержащей 20 мМ гистидин-НСl (рН 6,8), 5 мМ  $MgCl_2$ , 80 мМ КСl, 20 мМ NaF, 0,2 мМ  $[\gamma\text{-}^{32}P]$  АТР (~2·10<sup>4</sup> БК в пробе), 10<sup>-5</sup> М сАМР, различные концентрации протеинкиназы и 60—100 мкг белка мембран СР. Реакцию инициировали внесением в среду инкубации  $[\gamma\text{-}^{32}P]$  АТР и проводили при 30 °С в течение 5 мин с 3-минутной преинкубацией. Останавливали реакцию добавлением 20 мл 10 % трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Белок собирали на миллиметровых фильтрах («Millipore», диаметр 0,45 мкм) и промывали 15 мл 5 % ТХУ.

При изучении влияния сАМР-зависимого фосфорилирования на АТР-зависимый транспорт кальция в среду инкубации, необходимую для транспорта кальция, дополнительно вносили сАМР-зависимую протеинкиназу, непосредственно перед добавлением АТР и 10<sup>-5</sup> М сАМР. Белок определяли по [10].

### Результаты и обсуждение

Из рис. 1 видно, что препараты мембран СР, выделенные из сердца

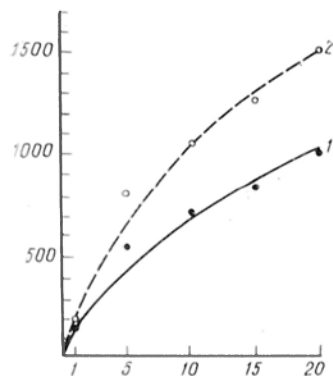


Рис. 1. АТР-зависимый транспорт  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  в СР сердца крыс при тренировке физическими нагрузками.

1 — контроль, 2 — тренировка. Обозначения по осям координат (здесь и на рис. 3): по оси ординат — концентрация  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , нмоль на 1 мг белка; по оси абсцисс — время, мин.

как контрольных, так и подопытных животных, обладают свойством накапливать  $\text{Ca}^{2+}$  в АТР-зависимом процессе, причем скорость его накопления препаратами, выделенными из сердца подопытных животных, была в 1,5 раза выше, чем у контрольных животных — соответственно 799 и 546 нмоль на 1 мг белка за 5 мин.

Компонент накопления, проявленный в отсутствие АТР и  $\text{Mg}^{2+}$ , мы высчитывали из полученных данных как адсорбцию. Кинетика накопления  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  демонстрирует, что этот процесс в обоих случаях в присутствии оксалата как преципитирующего агента развивается довольно медленно, не достигая максимума даже через 20 мин. Поскольку при тренировке физическими нагрузками резко возрастает  $\text{Ca}^{2+}$ -аккумулирующая способность миокарда, это может приводить к тому, что в систолу большее количество  $\text{Ca}^{2+}$  будет выбрасываться из СР, вызывая таким образом усиление сократимости.

Эти данные, свидетельствующие, что при тренировке физическими нагрузками резко возрастает мощность  $\text{Ca}^{2+}$ -насоса СР, согласуются с представлениями о том, что адаптация животных к мышечной деятельности повышает активность  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортирующих систем [9]. Поскольку известно, что  $\text{Ca}^{2+}$ -насос СР сердца находится под контролем сАМР-зависимого фосфорилирования фосфоламбана [7, 13, 14], представляло интерес также изу-

чение АТР-зависимого транспорта кальция при тренировке физическими нагрузками в условиях фосфорилирования. Фосфоламбан может фосфорилироваться как эндогенной, так и экзогенной сАМР-зависимой протеинкиназой [7, 14], однако уровень фосфорилирования в присутствии экзогенной растворимой протеинкиназы выше и, следовательно, можно получить более выраженный эффект фосфорилирования на транспорт  $\text{Ca}^{2+}$ . Поэтому в своих исследованиях мы использовали для фосфорилирования мембран СР растворимую протеинкиназу (форма I), выделенную из миокарда крыс. Форма II, как показано нами ранее [3], практически отсутствует в сердце как контрольных, так и тренированных крыс. Прежде чем приступить к изучению влияния сАМР-зависимого фосфорилирования на АТР-зависимый транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  в фрагментах мембран СР при физических нагрузках, нами были подобраны некоторые оптимальные условия фосфорилирования, в частности учтена зависимость от концентрации выделенной протеинкиназы. Несомненный интерес представляло изучить уровень фосфорилирования мембран СР в норме и при тренировке физическими нагрузками.

На рис. 2 представлена зависимость уровня фосфорилирования фрагментов мембран СР у контрольных и тренированных животных от концентрации растворимой сАМР-зависимой протеинкиназы. Видно, что в обоих случаях фосфорилирование выходит почти на плато при концентрации протеинкиназы 100 мкг/мл. Концентрация белка

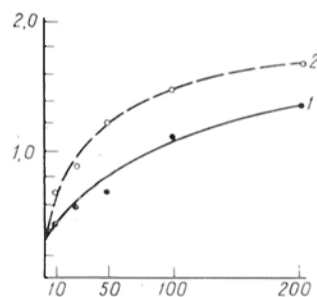


Рис. 2. Зависимость фосфорилирования СР сердца крыс при тренировке физическими нагрузками от концентрации сАМР-зависимой протеинкиназы.

1 — контроль, 2 — тренировка. По оси ординат: фосфорилирование, мкмоль  $^{32}\text{P}$  на 1 мг белка за 2 мин. По оси абсцисс: содержание (мкг/мл) сАМР-зависимой протеинкиназы.



СР при этом составляла 1 мг/мл, т. е. соотношение белка СР до концентрации протеникиназы было 5:1, что согласуется с данными других авторов [8, 14]. Оба препарата мембран СР обладали эндогенной протеникиназной активностью, составляющей ~280 нмоль  $^{32}\text{P}$  на 1 мг белка за 2 мин при фосфорилировании эндогенных субстратов.

В некоторых экспериментах уровень эндогенного включения  $^{32}\text{P}$  в белки мембран подопытных животных был несколько выше. В присутствии  $10^{-5}$  М сАМР и концентрации экзогенной протеникиназы 100 мкг/мл фосфорилирование мембран СР, выделенных из сердец подопытных животных, было в 1,3 раза выше, чем у контрольных, и составляло 1450 нмоль  $^{32}\text{P}$  на 1 мг белка за 2 мин. То, что оптимальные концентрации сАМР при фосфорилировании мембран СР составляют  $10^{-6}$ — $10^{-5}$  М, нами было продемонстрировано ранее [2]. Поскольку в обоих случаях для фосфорилирования использовалась одна и та же растворимая протеникиназа, можно предположить, что в СР, выделенном из сердец тренированных животных, увеличивается количество фосфоламбана на 1 мг суммарного белка (в СР сердца способ фосфорилироваться только фосфоламбан [13]). Таким образом, при тренировке физическими нагрузками возможно увеличение мощности не только  $\text{Ca}^{2+}$ -насоса, но и регуля-

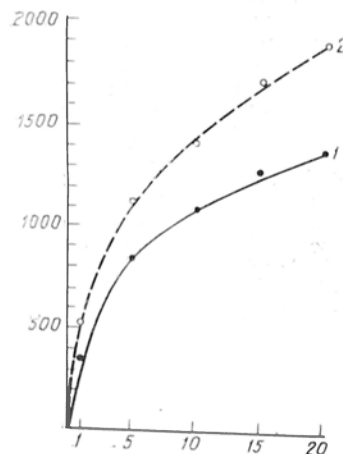


Рис. 3. Влияние сАМР-зависимого фосфорилирования на АТР-зависимый транспорт  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  в СР сердца при тренировке физическими нагрузками.

1 — контроль, 2 — тренировка.

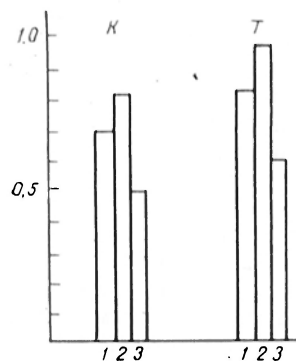


Рис. 4. Влияние термостабильного белкового ингибитора на активированное сАМР-зависимое фосфорилирование АТР-зависимое накопление  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -везикулами СР миокарда.

1 — эндогенное фосфорилирование, 2 — фосфорилирование в присутствии растворимой протеникиназы, 3 — фосфорилирование в присутствии растворимой протеникиназы и термостабильного белкового ингибитора протеникиназ. К — контроль; Т — тренировка.

торных систем, модулирующих его активность.

В условиях сАМР-зависимого фосфорилирования с участием экзогенной растворимой протеникиназы АТР-зависимый транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  в СР контрольных животных увеличивался в 1,5 раза (с 546 до 828 нмоль на 1 мг белка за 5 мин) по сравнению с нефосфорилированными везикулами (рис. 3, см. также рис. 1). В СР, выделенном из миокарда тренированных животных, транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  увеличивался в 1,4 раза (с 799 до 1125 нмоль на 1 мг белка за 5 мин), т. е. на такую же величину, как и у контрольных животных.

Известно, что одним из регуляторов сАМР-зависимой протеникиназы в различных тканях является термостабильный белковый ингибитор протеникиназ [12, 15], который, связываясь со свободной каталитической субъединицей протеникиназы, ингибирует ее активность [12]. Исходя из этого представляло интерес изучить влияние термостабильного белкового ингибитора на активированное фосфорилирование АТР-зависимое накопление  $\text{Ca}^{2+}$  в СР контрольных и тренированных животных. Мы использовали термостабильный ингибитор сАМР-зависимой протеникиназы фирмы «Sigma» (США). Из рис. 4 видно, что ингибитор в концентрации 200 мкг/мл практически в одинаковой степени (на 39%) ингибирует активированное

cAMP-зависимым фосфорилированием с участием экзогенной протеинкиназы АТР-зависимое накопление  $\text{Ca}^{2+}$  везикулами СР контрольных и тренированных животных. Это обусловлено тем, что экзогенная протеинкиназа в обоих случаях была одна и та же. Однако АТР-зависимое накопление  $\text{Ca}^{2+}$  в СР контрольных и подопытных животных, активируемое эндогенной протеинкиназой, ингибировалось термостабильным белковым ингибитором в разной степени — соответственно на 30 и 26 %, что свидетельствует о некотором изменении чувствительности мембранно-связанной протеинкиназы к термостабильному белковому ингибитору в процессе тренировки.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что тренировка животных физическими нагрузками приводит к значительному повышению  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортирующей способности  $\text{Ca}^{2+}$ -насоса СР, что *in vivo* может способствовать более быстрой релаксации мышцы. При этом в СР миокарда тренированных животных происходит более интенсивное фосфорилирование фосфоламбана — белка, регулирующего активность  $\text{Ca}^{2+}$ -насоса. В СР миокарда контрольных и тренированных животных cAMP-зависимое фосфорилирование практически в одинаковой степени активирует АТР-зависимый транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  (в 1,4—1,5 раза), однако поскольку у тренированных животных исходный уровень в 1,5 раза выше, чем у контрольных, то и при фосфорилировании данный показатель у них выше во столько же раз.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Воробец З. Д., Курский М. Д., Кондратюк Т. П. // Укр. биохим. журн. — 1979. — Т. 51, № 2. — С. 165—169.
2. Калинин М. И., Воробец З. Д., Федотова Е. Ю. // Докл. АН УССР. — Сер. Б. — 1985, № 1. — С. 68—70.
3. Калинин М. И., Курский М. Д., Осипенко А. А. Биомеханические механизмы адаптации при мышечной деятельности. — Киев, 1986. — С. 80—104.

4. Левицкий Д. О., Бонсволевский Д. С., Левченко Т. С. // Метаболизм миокарда. — М., 1981. — С. 35—47.
5. Adams R. J., Schwartz A. // Chest. — 1980. — Vol. 78, Suppl. 1. — P. 123—139.
6. Jones L. R., Besch H. R., Jr., Fleming J. W. et al. // J. biol. Chem. — 1979. — Vol. 254, N 2. — P. 530—539.
7. Katz A. M. // Advanc. Cycl. Nucl. Res. — 1979. — Vol. 11. — P. 303—343.
8. Kirchberger M. A., Tada M., Katz A. M. // J. biol. Chem. — 1974. — Vol. 249, N 19. — P. 6166—6173.
9. Levine S. N., Kinasewitz D. T. // J. appl. Physiol. — 1986. — Vol. 60, N 5. — P. 1673—1679.
10. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 93. — P. 265—275.
11. Sheuer J. // Circulation. — 1973. — Vol. 47. — P. 677—680.
12. Szmigielski A., Duidotti A., Costa E. // J. biol. Chem. — 1977. — Vol. 252, N 1. — P. 3848—3853.
13. Tada M., Katz A. M. // Ann. Rev. Physiol. — 1982. — Vol. 44, N 4. — P. 401—423.
14. Tada M., Kirchberger M. A., Repke D. J., Katz A. M. // J. biol. Chem. — 1979. — Vol. 249, N 19. — P. 6174—6180.
15. Walsh D. A., Ashby C. D., Donzalez C. et al. // Ibid. — 1971. — Vol. 246, N 7. — P. 1977—1985.

Поступила 20.11.88

#### ATP-DEPENDENT TRANSPORT OF $\text{Ca}^{2+}$ IN MYOCARDIAL SARCOPLASMIC RETICULUM DURING ADAPTATION TO MUSCULAR ACTIVITY

M. I. Kalinsky, Yu. I. Gubsky, N. D. Rudnitskaya, M. D. Kursky

Institute of Physical Culture, Medical School, Kiev

Two-fold increase in  $\text{Ca}^{2+}$ -transport properties of  $\text{Ca}^{2+}$ -pump was detected in myocardial sarcoplasmic reticulum (SR) during adaptation of animals to muscular activity (training by means of running in treadmill within 6 weeks, with gradual increase in duration and intensity). Besides, the rate of SR membranes phosphorylation via cAMP-dependent protein kinase was increased 1.3-fold. At the same time, cAMP-dependent phosphorylation accelerated 1.4-1.5-fold the rate of ATP-dependent transport of  $\text{Ca}^{2+}$  in myocardial SR of both control and trained animals. The data obtained suggest that increase in the  $\text{Ca}^{2+}$ -pump activity and in the rate of phosphorylation of SR membranes via cAMP-dependent protein kinase are of importance for adaptation of animal heart muscle to elevated activity.

## ИССЛЕДОВАНИЕ СВЯЗИ РЕЗИТЕНТНОСТИ ЛЕГКОГО К РАЗВИТИЮ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ С ЕГО ЖИРНОКИСЛОТНЫМ СОСТАВОМ

Кафедра биохимии Владивостокского медицинского института

Для легкого характерно специфическое соединение его функций с обменом липидов [1—4, 8] при ведущей роли метаболизма жирных кислот — ЖК [8, 11, 12], что касается и выполнения защитных функций аэрогематическим барьером [9].

В связи с этим представляет интерес исследование зависимости возникновения и развития патологических процессов в органе от обмена липидов. Регионарная неравномерность их локализации и состава липидов показана ранее [6, 10].

В настоящей работе эту зависимость изучали у жителей Владивостока с помощью корреляционной модели, основанной на статистическом распределении по долям легкого различных форм неспецифических заболеваний (НЗЛ) и неравномерности жирнокислотного состава (ЖКС) фосфолипидов (ФЛ).

### Методика

Исследовали ткань долей легких без патологических изменений 23 человек одной возрастной группы, погибших от травм в зимний период. Липиды экстрагировали из гомогенатов ткани методом Фолча. ФЛ выделяли осаждением холодным ацетоном [5]. ЖКС ФЛ исследовали методом ГЖХ на хроматографе «Шимадзу» GC-1C (колонка стальная размером 300×0,3 см, 15 % реоплекс-400).

Проведен также анализ 1244 историй болезни людей с НЗЛ, находившихся на лечении в отделении пульмонологии городской больницы.

Людей по сходству ЖКС легких классифицировали по группам. Задачу классификации решали следующим образом. Каждый из 23 объектов рассматривался как точка в 25-мерном евклидовом пространстве, координатами которой являлись относительные проценты 5 ЖК (18:2, 16:0, 18:0, 18:1, 20:4) в каждой из 5 долей легких. В качестве расстояния между двумя точками брали евклидово расстояние, деленное на число измерений — 25. На основе определенных таким образом расстояний с помощью алгоритма [7] строили дендрограмму сходства — различий объектов.

Анализ связи между ЖКС ФЛ легкого и вероятностью возникновения заболевания проводили с помощью построения корреляционных матриц. Вычисляли коэффициенты корреляции между каждым из показателей ЖКС ФЛ долей легких и частотами их поражений.

### Результаты и обсуждение

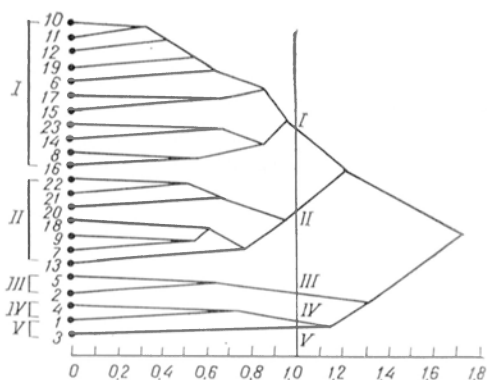
Анализ локализации НЗЛ показал (табл. 1) преимущественное поражение нижних долей (68,5%), особенно правых. Исключение составляют абсцессы, возникающие чаще в правой верхней доле (41%). Нижнедолевая локализация особенно характерна для очаговой пневмонии (73%). Более резистентна к повреждению ткань левой верхней доли (7%) даже по сравнению с правой верхней (14%).

Очевидно, способность к адаптивным реакциям неравномерно представлена в различных долях легкого. Это принято связывать с морфофункциональными особенностями дренирова-

Таблица 1

Частоты локализации патологических процессов в долях легких (количество случаев)

Патологические процессы	Доли легких					Сумма частот
	правые			левые		
	верхняя	средняя	нижняя	нижняя	верхняя	
Крупозная пневмония	23	17	42	33	8	123
Очаговая пневмония	106	86	350	317	56	915
ХНЗЛ	16	9	35	29	18	107
Абсцессы	24	6	11	13	5	59
Опухоли	7	6	13	9	5	40
Всего поражений	176	124	451	401	92	1244



Дендрограмма расстояний сходства между объектами и вариант группировки.

I—23 — номера объектов; I—V — выделенные группы. По оси абсцисс — расстояние между объектами.

ния, аэрогенного инфицирования, гемодинамики долей. Однако следует полагать, что эти особенности не являются определяющими в реализации адаптивных реакций, так как степень выраженности их связана непосредственно с особенностями липидного обмена органа [1, 3].

В исследованных легких 23 человек мы выявили долевые различия липидного состава, имеющие выраженный индивидуальный характер. Вместе с тем намечалась возможность выделения сходных групп [10]. На рисунке приведена дендрограмма сходства объектов, построенная на основе данных о содержании отдельных ЖК в до-

лях. Как видно из рисунка, в зависимости от выбранного порога можно провести различные разделения объектов на группы. При пороге различия, равном единице, рассматриваемая совокупность людей делится на 5 групп. Так как III, IV, V группы для обобщения результатов малочисленны, нами рассмотрены I и II группы, которые являются преобладающими (78%) в представленной выборке. В каждой группе получены средние показатели ЖК для статистической обработки.

I группа характеризуется (табл. 2) более высоким содержанием в легочной ткани насыщенных, пальмитиновой и олеиновой ЖК, но меньшим содержанием ненасыщенных, как моноеновых, так и полиеновых, в числе их линолевой и арахидоновой. Легочная ткань людей II группы отличается повышенным содержанием ненасыщенных ЖК за счет полиеновых, линолевой и арахидоновой кислот.

Корреляционный анализ ЖКС липидов и частот поражений ткани (табл. 3) показал наличие определенной зависимости. Так, кислоты 18:0, 18:1 и сумма моноеновых имеют слабую отрицательную корреляцию со всеми НЗЛ. Но обращает внимание значительная отрицательная корреляция содержания этих кислот с хроническими НЗЛ (ХНЗЛ): 69, 79, 85% соответственно. Имеется положительная корреляция содержания пальмитиновой кис-

Таблица 2  
Сравнительный состав ЖК и факторы риска поражения НЗЛ двух групп людей

ЖК	Знаки корреляции		I группа $M \pm m, \%$ (n=11)	II группа $M \pm m, \%$ (n=7)	I группа — II группа				
					$\Delta, \%$	$p$	$\omega, \%$	$d, \%$	
	2	3	2	3					
16:0	+	+	40,2±0,4	34,3±0,6	+5,9	<0,001	+0,17	+10,5	+12,0
18:0	—	—	13,5±0,4	13,5±0,6	0,0	—	0,00	0,0	0,0
18:1	—	—	22,0±0,6	20,3±0,5	+1,8	<0,05	+0,09	+4,6	+7,2
18:2	—	+	6,8±0,3	8,8±0,4	-2,0	<0,01	-0,23	-2,3	-5,3
20:4	+	—	7,9±0,3	10,1±0,5	-2,2	<0,01	-0,22	-2,5	-0,7
Насыщенные	+	+	59,0±0,4	52,5±0,5	+6,5	<0,001	+0,12	+1,4	+1,8
Ненасыщенные	+	—	40,6±0,4	47,2±0,5	-6,6	<0,001	-0,14	-1,7	-0,9
Моноеновые	—	—	22,8±0,4	23,8±0,5	-1,0	<0,05	-0,04	-2,3	-3,4
Полиеновые	+	+	17,8±0,5	23,0±0,6	-5,2	<0,001	-0,23	-5,0	-5,2
Суммы  d : совпавшие по знакам с $p$								16,5	18,8
не совпавшие по знакам с $p$								13,8	17,7
Показатель риска ( $\pm$ ПР), %								+2,7	+1,1

Примечание. 2 и 3 — номера столбцов табл. 3, соответствующие очаговой пневмонии и ХНЗЛ; n — объем выборки;  $\Delta$  — абсолютная разность;  $\omega$  — относительная разность;  $p$  — вероятность погрешности разности.

Коэффициенты корреляции ( $\rho$ ) между компонентами ЖКС липидов легкого и частотами (в %) различных поражений

ЖКС	Крупозная пневмония	Очаговая пневмония	ХНЗЛ	Абсцессы	Опухоли	Всего острых пневмоний	Всего поражений
	1	2	3	4	5	6	7
16:0	30,16	59,12	70,73	-46,02	36,67	56,83	55,12
18:0	-36,94	-38,85	-69,53	-6,91	-55,74	-38,85	-41,51
18:1	-43,97	-50,78	-79,77	-21,01	-55,76	-50,40	-53,33
18:2	-0,49	-9,86	22,90	42,91	12,22	-9,08	-4,57
20:4	42,79	11,19	-3,35	74,83	34,87	14,01	16,79
Насыщенные	-20,33	11,65	14,64	-55,15	-22,85	8,89	5,99
Ненасыщенные	43,77	12,25	-6,05	64,41	36,55	15,08	17,15
Моноеновые	-47,22	-58,57	-85,36	-13,29	-57,65	-57,83	-60,16
Полиненасыщенные	49,91	21,75	22,45	73,53	50,20	24,32	28,14

лоты с ХНЗЛ (71 %) и очаговой пневмонией (59 %). Концентрация арахидоновой и полиненасыщенных кислот положительно коррелирует с частотой возникновения абсцессов (75 и 74 %) и опухолей (35 и 50 %).

Поскольку коэффициент корреляции ( $\rho$ ) является вероятностной мерой связи отдельных ЖКС с резистентностью легочной ткани, влияние конкретных различий в составе ЖКС, например в I и II группах, можно выразить произведением  $\rho$  на величину относительного различия ( $\pm\omega$ ) каждой кислоты. Это произведение названо нами фактором риска (см. табл. 2)

$$\pm d = \pm \omega \cdot |\rho|.$$

Наибольший фактор риска в развитии очаговой пневмонии и ХНЗЛ в нашем случае представляет сравнительно высокое содержание в легких людей I группы пальмитиновой кислоты.

Знак корреляции (см. табл. 2 и 3) в зависимости от увеличения ( $+\omega$ ) или уменьшения ( $-\omega$ ) процента ЖКС в составе липидов может совпадать или не совпадать со знаком фактора риска. В первом случае вероятность поражения легкого повышается, во втором — понижается.

Если суммировать модули факторов риска отдельно, совпавших и не совпавших по знаку со знаком корреляции, и вычислить разность этих сумм, то можно оценить влияние всей композиции ЖКС на вероятность поражения легкого. Разность сумм модулей  $|d|$  с соответствующим знаком названа нами показателем риска:

$$\pm \text{ПР} = \Sigma |d|_c - \Sigma |d|_n,$$

где  $|d|_c$  — модули совпавших,  $|d|_n$  —

модули не совпавших по знаку факторов риска со знаком корреляции.

В табл. 2 приведены примеры расчета показателей риска поражения легкого очаговой пневмонией и ХНЗЛ в I группе людей по сравнению со II (условно контрольной). По данным  $\pm \text{ПР}$  в I группе более выражена вероятность возникновения очаговой пневмонии и ХНЗЛ ( $+3$  и  $+1$  %). Аналогично был сделан расчет  $\pm \text{ПР}$  поражения легкого абсцессами и крупозной пневмонией у людей II группы в сравнении с I. Он оказался очень высоким: соответственно 68 и 26 %.

По данной схеме можно рассчитать  $\pm \text{ПР}$  для отдельных долей легкого.

Рассмотренная корреляционная модель зависимости НЗЛ от ЖКС липидов позволяет условно перенести ее на конкретного человека. Модель может быть реальной, если ЖКС липидов на фоне других факторов [9], например иммунных, является ведущим в поддержании резистентности ткани в сложившейся ситуации.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Авцын А. П., Дубинин Т. Л., Жаворонков А. А. и др. // Пробл. туб. — 1975. — № 9. — С. 60—64.
2. Березовский В. А., Горчаков В. Ю. Поверхностно-активные вещества легкого. — Киев, 1982.
3. Жаворонков А. Н., Ламперт Б. А., Маричев А. Г. и др. // Медико-биологические проблемы адаптации населения в условиях Крайнего Севера. — Новосибирск, 1974. — С. 98.
4. Легкое в норме (Под ред. И. К. Есиповой. — Новосибирск, 1975.
5. Кейтс М. Техника липидологии: Пер. с англ. — М., 1975.
6. Кодолова И. М. Морфология и патогенез неспецифических воспалительных процессов в легких в свете учения о легочных сегмен-

- тах: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1964.
7. Ратнер В. А., Канянян Г. Х. Исследования по математической генетике. — Новосибирск, 1975.
  8. Сыромятникова Н. В., Гончарова В. А., Котенко Т. В. Метаболическая активность легких. — Л., 1987.
  9. Федосеев Г. Б., Лаврова Т. Р., Жихарев С. С. Клеточные и субклеточные механизмы защиты и повреждения бронхов и легких. — Л., 1980.
  10. Хасина М. А., Зуев Ю. Ф. // Физиол. журн. — 1987. — Т. 33, № 3. — С. 81—85.
  11. Lichey J., Nigem S., Fridrich T. et al. // Atemwegs-Lungenkr. — 1985. — Bd 11. — S. 13—16.
  12. Possmayer F., Yu S. H. et al. // Canad. J. Biochem. — 1984. — Vol. 62. — P. 1121—1133.

Поступила 04.04.88

## FATTY ACID COMPOSITION DEPENDENT RESISTANCE OF LUNGS TO SOME PATHOLOGICAL STATES

M. A. Khasina, Yu. F. Zuev

Chair of Biochemistry, Medical School, Vladivostok

Selective localization of unspecific pathological processes was detected in lung lobes of 1244 patients, whereas irregular fatty acid composition of phospholipids was observed in the tissue lobes of 23 patients. The correlation curve, reflecting the fatty acid spectrum dependent development of impairments in lungs, was plotted and risk factors were calculated for various groups of persons with various fatty acid spectra in lungs.

УДК 616.438-008.6:577.112.6]-074:543.544

М. Н. Короткова, И. В. Санина, В. Я. Арион

## АНАЛИЗ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ ПЕПТИДОВ ТИМУСА МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

НИИ физико-химической медицины Минздрава РСФСР, Москва

Важную роль в функционировании организма и регуляции межклеточных взаимодействий иммунной системы играют пептиды, синтезируемые в тимусе [9, 15]. Работы по выделению и характеристике пептидных тимических факторов ведутся в разных странах мира, в том числе в СССР [1, 6, 11, 14, 16]. Из тимуса телят выделен пептидный тимический препарат Т-активин, который широко применяется в клинике с целью коррекции нарушений Т-клеточного звена иммунитета, сопровождающего многие заболевания (инфекционные, гнойно-септические, аутоиммунные, псориаз, рассеянный склероз, злокачественные новообразования) [2, 4, 5].

Т-активин представляет собой сложную смесь пептидов, содержащую 25—30 компонентов с мол. массой 1—6 кД и изоэлектрическими точками в области 3,5—9,5. Установлена функциональная гетерогенность Т-активина. Компоненты, полученные из него методом ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе, по-разному влияют на Т-клетки, находящиеся на разных стадиях дифференцировки (костномозговые предшественники Т-лимфоцитов, незрелые Т-лимфоциты селезенки). Однако при выделении функционально различных фракций этим методом около 50 % нанесенного на колонку Т-ак-

тивина, а именно пептиды с рI в области 4,0 и ниже, прочно связываются с материалом колонки и остаются неизученными [3, 10]. Для анализа состава Т-активина и сравнения его с другими тимическими факторами нами использовался метод изоэлектрического фокусирования в агарозе. Данная методика проста, воспроизводима, но позволяет исследовать, как правило, пептиды с мол. массой не менее 3 кД. Низкомолекулярные компоненты препарата, составляющие значительную часть Т-активина, остаются неучтенными, так как при фиксации пластины в ТХУ и при ее дальнейшей отмывке они вымываются из агарозы вместе с амфолинами.

В связи с этим возникла необходимость подобрать новый метод, позволяющий учитывать все компоненты Т-активина, независимо от их молекулярной массы. Такой метод необходим для сравнительного анализа состава препаратов Т-активина, полученных из тимусов других животных, для сравнения Т-активина с другими известными тимическими факторами, а также для возможного разделения Т-активина на биологически активные компоненты.

Особый интерес вызывает возможность использования для изучения иммунорегуляторных пептидов тимуса жидкостной хроматографии высокого

давления (ЖХВД) с присущей ей повышенной эффективностью разделения [7]. Высокоэффективная хроматография в обращенной фазе с успехом была использована для выделения  $\alpha_1$ -тимозина и  $\beta_4$ -тимозина из суммарной фракции тимозин-5 из тимуса телят [13].

В настоящей работе исследована возможность использования метода ЖХВД (гель-фильтрация, хроматография в обращенной фазе) для анализа состава Т-активина, а также для разделения препарата на субфракции с иммунорегуляторными свойствами.

### Методика

Препарат Т-активин выделяли из тимуса телят, полученного на производственном объединении Мосмясопром. Тимус очищали от соединительной ткани, гомогенизировали в 0,15 М NaCl (13), подвергали аутолизу при 4°C в течение 18 ч, центрифугировали 30 мин при 2000 g. Надосадочную жидкость фильтровали, нагревали до 80°C и выдерживали при этой температуре 15 мин. После охлаждения денатурированные белковые компоненты удаляли центрифугированием при 2000 g 30 мин. Надосадочную жидкость смешивали по каплям с охлажденным ацетоном (1:7), осадок собирали центрифугированием и проводили последовательное высаливание  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  до 25 % насыщения при pH 7,0, затем до 50 % насыщения при pH 4,0. Надосадочную жидкость отделяли центрифугированием при 30 000 g 40 мин. Осадок растворяли в 10 mM трис-HCl-буфере pH 8,0, доводили концентрацию белка до 10 мг/мл и проводили ультрафильтрацию на фильтре Pellicon PSED («Millipore», Франция) с трехкратной промывкой буфером. Фильтрат после лиофилизации обессоливали гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-15 (2,5 × 25 см), затем подвергали гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-50 (2,5 × 90 см) в 10 mM трис-HCl 0,15 М NaCl-буфере, pH 8,0, отбирали фракцию с мол. массой 1—6 кД, содержащую биологически активный материал, и повторно обессоливали полученный препарат Т-активин.

ЖХВД в обращенной фазе проводили на колонке Lichrosorb RP-8 (0,4 × 25 см), уравновешенной 1 М Na-ацетатным буфером pH 7,2. В колонку вносили 100 мкл Т-активина или суммарной фракции тимозин-5 («Hoffman La Roche», США) в концентрации 5 мг/мл. Элюцию вели линейным градиентом концентрации пропанола (0—75 %) при скорости подачи элюата 0,6 мл/мин.

Гель-хроматографию высокого давления проводили на колонке TSKG 2000 SW (7,5 × 600 мм), уравновешенной 0,1 М Na-фосфатным буфером pH 7,0 в присутствии 0,1 М KCl. В колонку вносили 100 мкл (1,5 мг/мл) Т-активина и вели элюцию тем же буфером при скорости подачи элюата 1 мл/мин. Субфракции Т-активина получали на той же колонке. В колонку вносили 200 мкл Т-активина (25 мг/мл), элюцию вели при скорости поступления раствора 0,5 мл/мин.

Содержание белка определяли по методу Лоури.

Изофокусирование Т-активина и полученных субфракций проводили в 0,8 % агарозном геле (агароза АФ; ЛКВ, Швеция), содержащем 10 % сорбитола и амфолиты в диапазоне pH 3,5—9,5 («ЛКВ», Швеция) [8]. Денситометрию электрофореграмм осуществляли с помощью лазерного денситометра «Ультроскан XI» (ЛКВ, Швеция).

Биологическую активность Т-активина и его субфракций определяли в тесте восстановления чувствительности фоновых розеткообразующих клеток (фРОК) селезенки взрослых мышей после тимэктомии к ингибирующему действию азатиоприна [12]. В данном тесте клетками-мишенями для тимических факторов являются незрелые Т-клетки, которые под их влиянием могут превращаться в зрелые. Активными считались концентрации препаратов, вызывающие снижение количества фРОК по сравнению с контролем на 50 % и выше.

### Результаты и обсуждение

При разработке метода высокоэффективной жидкостной хроматографии в обращенной фазе для разделения Т-активина были исследованы следующие условия: 0,1 % трифторуксусная кислота (ТФУ) — градиент н-пропанола (0—75 %), 0,1 % ТФУ — градиент метанола (0—40 %), 0,6 М уксусно-ацетатный буфер pH 3,8 — градиент пропанола (0—40 %), 1 М Na-ацетатный буфер pH 7,2 — градиент пропанола (0—75 %) при хроматографии образцов на колонках Lichrosorb RP-18 и RP-8. Наилучшее разделение было получено на колонке Lichrosorb RP-8 при использовании буфера высокой концентрации (1 М Na-ацетатный буфер pH 7,2), подавляющего ионное взаимодействие белка с силанольными группами матрицы. В качестве органического компонента элюента использовали градиент концентрации пропанола. На рис. 1 представлен график элюции Т-активина и коммерческого препарата тимозина Ф-5. Т-активин распределяется широкой зоной, содержащей более 20 компонентов, не разделяющихся до конца. Однако в отличие от тимозина Ф-5, некоторые компоненты которого элюируются отдельными пиками, препаративное выделение пептидов из Т-активина представляется сложным. Целесообразно разделить Т-активин предварительно на фракции пептидов по размеру или по заряду, с тем чтобы для каждой биологически активной группы молекул можно было подобрать оптимальные условия хроматографии. Вместе

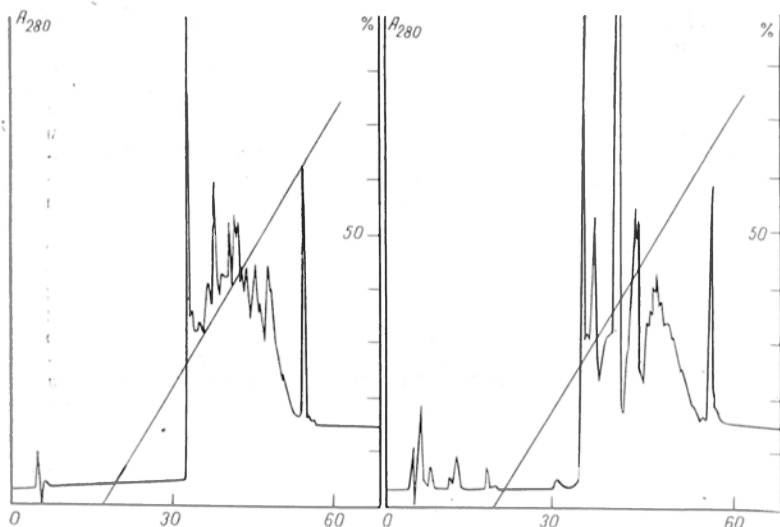


Рис. 1. Хроматография высокого давления препаратов Т-активина (а) и тимозина Ф-5 (б) на колонке Lichrosorb RP-8 (0,4×25 см) в системе 1 М Na-ацетатного буфера рН 7,2 и пропанола. В колонку вносили 0,5 мг образца, вели элюцию линейным градиентом концентрации пропанола от 0 до 75 % в течение 50 мин. Детекция при 280 нм. По оси абсцисс — время выхода, мин.

с тем хроматографию в данных условиях (занимает 50 мин при скорости элюции 0,6 мл/мин) можно использовать для сравнительного анализа препаратов Т-активина, выделенных из разных источников, а также для сравнения иммунорегуляторных пептидов тимуса, выделенных разными методами.

В качестве первой стадии очистки Т-активина использовали хроматографию высокого давления на колонке TSK G 2000 SW. Увеличение разрешающей способности процесса при повы-

шенном давлении по сравнению с традиционной гель-хроматографией позволяет уточнить молекулярные массы пептидов Т-активина. На рис. 2 представлен график элюции Т-активина в условиях высокой ионной силы (0,1 М Na-фосфатный буфер рН 7,0 в присутствии 0,1 М КСl). Показано, что пептиды распределяются в примерном диапазоне мол. масс от 0,5 до 1,5 кД. Измерение площади, описываемой профилем элюции препарата, показало, что молекулы с мол. массой 1—6 кД составляют примерно 50—60 % элюируемого материала в зависимости от серии препарата. Материал с мол. массой свыше 6 кД составлял 30—35 %, а пептиды с мол. массой ниже 1 кД — 10—15 % элюируемого материала. На профиле элюции Т-активина можно выделить не менее 10 компонентов с мол. массой 15; 5; 4; 3,1; 2,5; 1,3; 1 и 0,8 кД. Хроматография в данных условиях не является оптимальной и, хотя позволяет уточнить пределы молекулярных масс для Т-активина, не дает возможность выделить отдельные субфракции препарата.

Известно, что, используя ионные взаимодействия белков с матрицей при низкой ионной силе элюента, можно добиться хорошего разделения близких по молекулярной массе белков [7]. Действительно, гель-хроматография высокого давления в условиях низкой ионной силы позволила улучшить разделение Т-активина. На профиле элюции Т-активина (см. рис. 2) можно выделить 3 зоны, последняя из которых представляет собой довольно

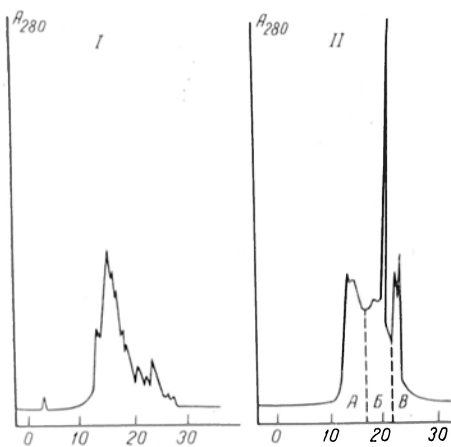


Рис. 2. Хроматография высокого давления препарата Т-активина (0,15 мг) на колонке TSK G2000SW (7,5×600 мм), уравновешенной 0,1 М Na-фосфатным буфером рН 7,0 в присутствии 0,1 М КСl (I) или 0,05 М Na-фосфатного буфера рН 7,0 (II).

Скорость элюции 1 мл/мин. Детекция при 280 нм. По оси абсцисс — время выхода, мин. А, Б, В — обозначение субфракций.



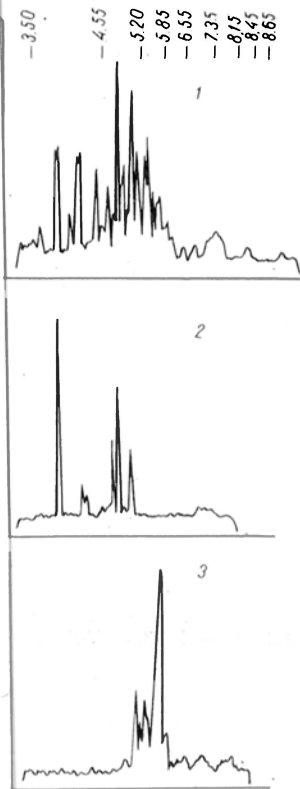


Рис. 3. Денситограммы изоэлектрофореграмм препарата Т-активина (1) и полученных из него субфракций А (2) и Б (3).

Сканирование геля при 630 нм. Вверху — изоэлектрические точки маркерных белков.

узкую область с двумя пиками. Элюируемый материал разделили на субфракции А, Б и В, собрали, подвергли лиофилизации, повторной хроматографии и обессоливаю на том же носителе.

Полученный материал исследовали методом изоэлектрического фокусирования (ИЭФ) в тонком слое агарозы. На рис. 3 представлена денситограмма исходного препарата Т-активина, подвергнутого ИЭФ. Выявляется более 20 пиков, имеющих изоэлектрические точки главным образом в области от 3,5 до 6,0. Основными являются пептиды с рI 3,8; 4,1—4,2; 4,45; 4,75; 5,1; 5,2; 5,45—5,5; 5,85. Относительно меньшее содержание индивидуальных компонентов было выявлено в области рI от 6,0 до 9,5 (менее 7% всех окрашенных компонентов образца). К ним относились пептиды с рI 6,5; 7,1; 7,35; 8,15 и 9,0. В состав субфракции А (см. рис. 3) входят пептиды с изоэлектрическими точками в области от 3,5 до 5,1. Измерение площади, описываемой профилем денситограммы, позволило определить, что основными компонентами данной субфракции являются пептиды с рI 3,85 (36,5%), 4,2 (5,6%),

4,55 (12,46%), 4,75 (18,35%), 5,1 (20,3%). Таким образом, субфракция А представляет собой наименее изученный нами ранее материал, в том числе кислые пептиды с рI ниже 4,0. Пептиды субфракции Б (см. рис. 3) распределяются при ИЭФ в агарозе в относительно менее кислой зоне с изоэлектрическими точками от 5,0 до 6,75. Основными компонентами являются пептиды с рI 5,15 (7,3%), 5,25 (5,1%), 5,45 (12,85%), 5,75 (67,7%).

Гель-хроматография субфракций Т-активина на колонке TSK G 2000 SW в условиях высокой ионной силы (0,1 М Na-фосфатный буфер рН 7,0 в присутствии 0,1 М KCl) показала, что наиболее высокомолекулярной является субфракция А с мол. массой 15—3,5 кД. Субфракция Б имеет мол. массу 9—3,5 кД, наконец, пептиды субфракции В расположены в области мол. масс 3,5—1 кД. Таким образом, использование низкой ионной силы для разделения Т-активина на субфракции методом гель-хроматографии высокого давления позволяет довольно эффективно разделить молекулы по заряду.

Для сравнения биологической активности выделенных субфракций Т-активина использовали тест восстановления чувствительности фРОК селезенки взрослых мышей после тимэктомии к ингибирующему действию азатиоприна. Обнаружено, что наибольшую биологическую активность в этом тесте проявляла субфракция В — в

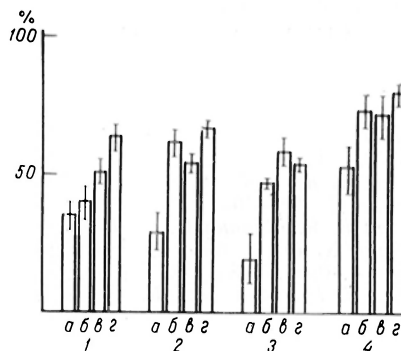


Рис. 4. Восстановление чувствительности фРОК селезенки взрослых мышей после тимэктомии к ингибирующему действию азатиоприна под влиянием Т-активина (1) и полученных из него субфракций А (2), Б (3), В (4).

По оси абсцисс — концентрация препарата в пробе: а — 0,1 мкг/мл; б — 1 мкг/мл; в — 5 мкг/мл; г — 10 мкг/мл; по оси ординат — процент восстановления чувствительности фРОК к азатиоприну ( $M \pm m$ ).

минимальной дозе 1 мкг/мл чувствительность ФРОК к азатиоприну восстанавливалась на  $71 \pm 9,5\%$  (рис. 4). В присутствии субфракции А в той же концентрации чувствительность ФРОК к азатиоприну восстанавливалась в меньшей степени — на  $60—8,5\%$ . Субфракция Б оказалась в этих концентрациях неактивна. Исходный препарат Т-активин проявлял активность в минимальной концентрации 5 мкг/мл (чувствительность при этом восстанавливалась на  $49 \pm 5\%$ ). Таким образом, максимальной биологической активностью обладали пептиды с мол. массой менее 3,5 кД. Этот факт коррелирует с полученными ранее данными [10] о том, что среди субфракций выделенных методом ионообменной хроматографии, наиболее активны в данном тесте компоненты с мол. массой 1,4—1,8 кД. Следует отметить, что биологически активной оказалась и относительно высокомолекулярная субфракция А, в состав которой входят неизученные пептиды с  $pI$  3,5—4,0.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что ЖХВД в обращенной фазе может использоваться в качестве метода для сравнительного анализа иммунорегуляторных пептидов тимуса из разных источников и выделенных разными методами. Разработаны условия для гель-хроматографии высокого давления, позволяющие выделить из состава Т-активина компоненты, обладающие наибольшей биологической активностью, а также наиболее кислые компоненты, функциональная гетерогенность которых ранее не была исследована.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Арион В. Я. // Иммунология. — М., 1982. — Т. 10. — С. 45—53.
2. Арион В. Я. // Журн. микробиол. — 1987. — № 4. — С. 98—104.
3. Арион В. Я., Санина И. В., Бреусов Ю. Н. и др. // Химия и биология иммунорегуляторов. — Рига, 1985. — С. 39—52.
4. Гусев Е. И., Арион В. Я., Аристова Р. А.

- и др. // Журн. невропатол. и психиатр. — 1984. — № 2. — С. 168—174.
5. Лопухин Ю. М., Петров Р. В., Арион В. Я. и др. // Иммунологические аспекты инфекционной патологии. — Таллинн, 1981. — С. 9—10.
  6. Морозов В. Г., Хавинсон В. Х., Писарев О. А. // Докл. АН СССР. — 1977. — Т. 233, № 3. — С. 491—494.
  7. Остерман Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. — М., 1985. — С. 491—494.
  8. Падюков Л. Н., Цветкова Н. В., Лавренчик Е. И., Фрадкин В. А. // Журн. микробиол. — 1987. — № 8. — С. 94—97.
  9. Петров Р. В., Михайлова А. А., Захарова Л. А. // Пробл. эндокринол. — 1985. — № 5. — С. 13—20.
  10. Санина И. В. // Коррекция нарушений иммунитета в клинике и эксперименте. — М., 1985. — С. 13—16.
  11. Bach J.-F., Dardenne M., Pleau J.-M., Bach M. A. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1975. — Vol. 249. — P. 186—210.
  12. Dardenne M., Bach J.-F. // Biological Activity of Thymic Hormones. — Rotterdam, 1975. — P. 235—245.
  13. Gabriel T. F., Meinhofer J., Michalevsky J. // J. Lipid Chromatogr. — 1983. — Vol. 6, N 4. — P. 647—654.
  14. Goldstein G. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1975. — Vol. 249. — P. 177—183.
  15. Ho A. D., Ma D. F., Price G. et al. // Immunology. — 1983. — Vol. 50, N 3. — P. 471—476.
  16. Hooper J. A., McDaniel M. C., Thurman G. B. et al. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1975. — Vol. 249. — P. 125—144.

Поступила 15.01.88

#### ANALYSIS OF THYMUS IMMUNOREGULATING PEPTIDES BY MEANS OF HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

M. N. Korotkova, I. V. Sanina, V. Ya. Arion

Institute of Physico-Chemical Medicine, Ministry of Public Health of the RSFSR, Moscow

High performance liquid chromatography (gel filtration and chromatography in the reverse phase) was applied to analyse a composition of the heterogenous immunoregulating peptide preparation T-activine isolated from calf thymus. Gel chromatography at high pressure on the column TSK G2000 SW enabled to separate T-activine into 3 subfractions at a preparative scale. Physico-chemical properties and biological activity of these fractions were studied *in vitro*. Subfraction B with molecular mass of 1.0-3.5 kD and  $pI$  below 5.9 proved to be the most active.

К. А. Кожевникова, Л. Г. Петрова-Маслакова, Н. С. Парфенова,  
Е. В. Белова, В. Ф. Трюфанов, В. А. Носкин, Р. З. Ваврин

## АКЦЕПЦИЯ ХОЛЕСТЕРИНА ЛИПОПРОТЕИНАМИ ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ У ЛИЦ С ДИС- $\alpha$ -ЛИПОПРОТЕИНЕМИЕЙ И ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ В ЭТОМ ПРОЦЕССЕ АПОПРОТЕИНА Е

НИИ экспериментальной медицины АМН СССР, Институт ядерной физики им. Б. П. Константинова АН СССР, Ленинград

Одним из возможных механизмов антиатерогенного действия липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) является акцепция ими холестерина (ХС) из мембран клеток периферических тканей, в том числе артериальной стенки, и его обратный транспорт в печень для окисления в желчные кислоты. Работами последних лет установлена ведущая роль в данном процессе подфракции ЛПВП<sub>3</sub> [6, 17, 21, 26].

Существование обратной корреляционной зависимости между концентрацией в крови подфракции ЛПВП<sub>2</sub> и ангиографически подтвержденной ишемической болезнью сердца (ИБС), а также более высокий уровень ЛПВП<sub>2</sub>-частиц в крови у молодых женщин, чем у мужчин того же возраста, при меньшей заболеваемости женщин ИБС дали основание приписывать антиатерогенные свойства и подфракции ЛПВП<sub>2</sub> [8, 10, 18, 25]. Данный класс липопротеинов, выделенный из плазмы крови человека, наиболее богат среди подфракций ЛПВП апопротеином Е [17]. Апопротеин Е в составе ЛПВП является лигандом для узнавания апо В, Е- и апо Е-рецепторов клеток [23]. Возможно, данный белок, обладая способностью связывать ХС *in vitro* [15], благоприятствует также акцепции ХС из клеточных мембран ЛПВП-частицами. Однако лишь единичные литературные данные свидетельствуют о способности ЛПВП<sub>2</sub>-частиц захватывать ХС из мембран клеток [16].

Не исключено, что частичная потеря при ультрацентрифугировании апопротеина Е [17] может приводить к снижению ХС-акцепторной способности ЛПВП<sub>2</sub>-частиц. Возможно также, что изменение структуры и молекулярной организации поверхностного слоя ЛПВП, наблюдаемые, в частности, при дис- $\alpha$ -липопротеинемии [14], влияют

на ХС-акцепторные свойства подфракций ЛПВП.

Безусловно, решение вопроса о наличии (или отсутствии) ХС-акцепторных свойств ЛПВП-частиц и выяснение роли апопротеина Е в этом процессе во многом способствовало бы расшифровке механизмов антиатерогенного действия отдельных подфракций ЛПВП. В связи с этим задачами настоящей работы были: 1) выяснение вопроса, присущи ли ХС-акцепторные свойства ЛПВП<sub>2</sub>-частицам, содержащим апопротеин Е, и имеются ли различия в способности акцептировать ХС подфракциями ЛПВП, выделенными от лиц с дис- $\alpha$ -липопротеинемией; 2) изучение роли апопротеина Е в данном процессе, а также исследование способности данного белка захватывать ХС из клеточных мембран.

### Методика

Для выделения ЛПВП использовали донорскую плазму крови. В каждом образце плазмы определяли содержание общего ХС, триглицеридов (ТГ), ХС ЛПВП ( $\alpha$ -ХС) на автотитраторе АА-2 («Техникон», США). Подфракции ЛПВП<sub>2</sub> и ЛПВП<sub>3</sub> выделяли в диапазонах солевой плотности 1,067—1,110 и 1,125—1,210 г/мл соответственно методом препаративного ультрацентрифугирования на центрифуге Spinco L2-65B в роторе 70 Ti при 10°C, 45000 об/мин в течение 24 ч. Выделенные липопротеины были объединены в 3 группы в соответствии с содержанием в плазме крови  $\alpha$ -ХС: ниже 37 мг/дл (гипо- $\alpha$ -липопротеинемия), 38—75 мг/дл (нормо- $\alpha$ -липопротеинемия), выше 75 мг/дл (гипер- $\alpha$ -липопротеинемия).

Эритроциты получали из крови доноров при 1500 об/мин, 4°C в течение 30 мин с последующей 3-кратной промывкой 0,05 М трис-НСI буферным раствором, содержащим 0,15 М NaCl pH 7,4. Апопротеин Е выделяли из липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) донорской плазмы крови человека с помощью гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-150 [5]. При электрофорезе в полиакриламидном геле с 8 М мочевиной выделенный белок давал одну полосу, соответствующую положению апопротеина Е при электрофорезе делипидированных ЛПОНП. Содержание аргинина

Захват ХС подфракциями ЛПВП от лиц с дис- $\alpha$ -липопротеинемиями при 4-часовой инкубации с эритроцитами

Условия опыта	n	Содержание общего ХС и белка (мг/мл) во фракции с плотностью ЛПВП <sub>3</sub> , изолированной после инкубации		ХС/белок
		ХС	белок	
<b>Гипо-<math>\alpha</math>-липопротеинемия</b>				
ЛПВП <sub>3</sub>	3	0,261±0,008	0,94±0,09	0,28
ЛПВП <sub>3</sub> + эритроциты	3	0,272±0,018	0,94±0,11	0,29
ЛПВП <sub>3</sub> + эритроциты + апо Е	3	0,289±0,031	0,99±0,10	0,29
ЛПВП <sub>2</sub>	4	0,201±0,007	0,42±0,01	0,48
ЛПВП <sub>2</sub> + эритроциты	4	0,243±0,016	0,46±0,016	0,53
ЛПВП <sub>2</sub> + эритроциты + апо Е	4	$p_{1,2} < 0,05$ 0,214±0,017	0,49±0,06	0,42
<b>Нормо-<math>\alpha</math>-липопротеинемия</b>				
ЛПВП <sub>3</sub>	7	0,267±0,013	0,93±0,06	0,29
ЛПВП <sub>3</sub> + эритроциты	7	0,325±0,009	0,92±0,05	0,35
ЛПВП <sub>3</sub> + эритроциты + апо Е	5	$p_{1,2} < 0,01$ 0,404±0,039	1,08±0,11	0,37
ЛПВП <sub>2</sub>	7	$p_{1,3} < 0,01$ 0,307±0,054	0,64±0,051	0,48
ЛПВП <sub>2</sub> + эритроциты	7	$p_{2,3} < 0,05$ 0,339±0,031	0,64±0,07	0,53
ЛПВП <sub>2</sub> + эритроциты + апо Е	5	0,328±0,02	0,69±0,06	0,48
<b>Гипер-<math>\alpha</math>-липопротеинемия</b>				
ЛПВП <sub>3</sub>	7	0,311±0,01	1,08±0,09	0,29
ЛПВП <sub>3</sub> + эритроциты	7	0,283±0,023	0,92±0,09	0,31
ЛПВП <sub>3</sub> + эритроциты + апо Е	6	0,282±0,036	0,91±0,11	0,31
ЛПВП <sub>2</sub>	3	0,476±0,035	1,02±0,05	0,47
ЛПВП <sub>2</sub> + эритроциты	3	0,416±0,052	0,97±0,08	0,43
ЛПВП <sub>2</sub> + эритроциты + апо Е	3	0,456±0,05	1,03±0,07	0,44

нина в полученном препарате составляло в среднем 10 %.

Изучение ХС-акцепторной функции подфракций ЛПВП проводили в инкубационной системе следующего состава: 2 мл упакованных эритроцитов; 1—2,5 мг по белку подфракции ЛПВП; 0,05 М трис-НСI буфер (рН 7,4), содержащий 0,15 М NaCl, до общего объема 2,5 мл. В опытах с добавлением апопротеина Е белок вносили в пробу в объеме 0,3—0,5 мл (около 350 мкг). Инкубацию проводили при 37 °С в течение 4 ч с медленным покачиванием. Затем пробы центрифугировали при 1500 об/мин 15 мин при 4 °С для отделения эритроцитов. Эритроциты дважды промывали физиологическим раствором. Супернатанты, полученные после центрифугирования проб и промывки эритроцитов, объединяли, и их плотность доводили NaBr до 1,21— или 1,125 г/мл (при инкубации с ЛПВП<sub>3</sub> или ЛПВП<sub>2</sub> соответственно). Липопротеины выделяли ультрацентрифугированием при 40 000 об/мин, 10 °С, в течение 24 ч в роторе 50 Ti на центрифуге Spinco L2-65B.

Содержание ХС (общего и свободного) в пробе определяли, используя «монотест на холестерин» ("Boehringer", ФРГ). Белок определяли по Lowry. В расчет принимали лишь результаты, полученные при инкубации ЛП с эритроцитами в отсутствие видимого гемолиза последних. Для определения содержания ХС в эритроцитах 0,5 мл отмытых клеток разводили 0,9 % NaCl и полученную взвесь использовали для экстракции ХС изопропиловым

спиртом по методу, аналогичному примененному для плазмы крови [24]. Содержание ХС в изопропиловых экстрактах определяли на автоанализаторе АА-2 («Техникон», США). Размеры частиц ЛП1 определяли методом корреляционной лазерной спектроскопии [11]. Статистическую обработку данных проводили по [3].

### Результаты и обсуждение

Для решения поставленных задач проведены эксперименты с инкубацией подфракций ЛПВП, выделенных от лиц с различным уровнем  $\alpha$ -ХС, с эритроцитами, использованием как традиционных биохимических методов, так и развивающихся в последние годы методов корреляционной лазерной спектроскопии [9, 11]. Как было указано выше, в ходе ультрацентрифугирования ЛПВП теряется часть апопротеина Е [17]; поэтому казалось целесообразным изучить акцепцию ХС отдельными подфракциями ЛПВП, добавляя в среду инкубации апопротеин Е.

Из табл. 1 видно, что при инкубации эритроцитов с подфракцией ЛПВП<sub>3</sub>,

выделенной от доноров с гипо- $\alpha$ -липопротеинемией, содержание ХС в ЛПВП<sub>3</sub> не изменилось. Напротив, инкубация ЛПВП<sub>2</sub>-частиц, выделенных из плазмы крови лиц с низким содержанием  $\alpha$ -ХС, с эритроцитами вызвала достоверное увеличение содержания ХС в липопротеинах на 21%. В присутствии апопротеина Е достоверных изменений в содержании ХС в ЛПВП-частицах по сравнению с контролем не наблюдалось.

Согласно литературным данным, при гипо- $\alpha$ -липопротеинемии только ЛПВП<sub>2</sub>-частицы обладают способностью солубилизовать ХС [14]. Избирательное снижение способности сорбировать спинмеченый ХС подфракцией ЛПВП<sub>3</sub>, выделенной от лиц с гипо- $\alpha$ -липопротеинемией [14], а также некоторое обеднение этих частиц ХС [13] указывают на возможное уменьшение ХС-акцепторной функции подфракции ЛПВП<sub>3</sub> при данном состоянии. В пользу этого свидетельствуют результаты наших исследований: способностью захватывать ХС из мембран эритроцитов обладала лишь подфракция ЛПВП<sub>2</sub>. Однако доля ЛПВП<sub>2</sub> в общем пуле ЛПВП, выделенных от лиц с низким уровнем  $\alpha$ -ХС, незначительна [4], поэтому способность данной подфракции акцептировать ХС из клеточных мембран не может существенно повлиять на катаболизм ХС в целом.

Иные результаты получены при инкубации с эритроцитами подфракций ЛПВП, выделенных от лиц с нормальным уровнем  $\alpha$ -ХС. Инкубация ЛПВП<sub>3</sub> с эритроцитами (см. табл. 1) сопровождалась достоверным увеличением содержания ХС в липопротеинах на 22% (в среднем с 0,267 до 0,325 мг/мл фракции липопротеинов). В присутствии апопротеина Е уровень ХС в плотности ЛПВП<sub>3</sub> возрастал в еще большей степени (на 51% по сравнению с контролем). В аналогичных условиях содержание ХС в подфракции ЛПВП<sub>2</sub> достоверно не увеличивалось и апопротеин Е не оказывал видимого эффекта.

Исходя из этих данных, можно полагать, что у лиц с нормо- $\alpha$ -липопротеинемией захват ХС из клеточных мембран осуществляется главным образом ЛПВП<sub>3</sub>-частицами, преобладающими в спектре ЛПВП [4] и обогащенными апопротеином А-1 [12, 13]. В литературе, однако, имеются данные, что

спинмеченый ХС встраивается в обе подфракции ЛПВП, выделенные от лиц с нормальным уровнем  $\alpha$ -ХС [14]. Нельзя с определенностью сказать поэтому, что в условиях *in vivo* подфракция ЛПВП<sub>2</sub> не будет обладать ХС-акцепторными свойствами.

Изучение ХС-акцепторной функции подфракций ЛПВП, выделенных от лиц с высоким уровнем  $\alpha$ -ХС, показало, что как ЛПВП<sub>3</sub>, так и ЛПВП<sub>2</sub> не акцентируют ХС из эритроцитов (см. табл. 1). Более того, в ряде экспериментов отмечена тенденция к отдаче ХС подфракциями ЛПВП на эритроцитные мембраны. Добавление апопротеина Е в среду инкубации не оказывало существенного влияния на данный процесс. В случае же проявления подфракциями ЛПВП ХС-донорных свойств добавление белка устраняло данный эффект.

Известно, что при гипер- $\alpha$ -липопротеинемии в плазме крови увеличивается концентрация как общей фракции ЛПВП, так и субфракций [4]. Особенно значительно изменяется количество ЛПВП<sub>2</sub>-частиц. Перенасыщение этих липопротеинов ХС [4, 12] должно приводить к понижению их способности акцептировать ХС. Это, вероятно, является одной из причин отсутствия захвата ХС из клеточных мембран подфракциями ЛПВП, выделенными от лиц с высоким уровнем  $\alpha$ -ХС. Нельзя исключить, однако, и возможности истощения системы лецитин — холестерол ацилтрансферазы (ЛХАТ) при увеличенном образовании эфиров ХС (ЭХС) в ЛПВП при гипер- $\alpha$ -липопротеинемии и вследствие этого отсутствие транспорта ХС из эритроцитных мембран на ЛПВП в условиях нашего эксперимента.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что способностью захватывать ХС из мембран эритроцитов обладает как подфракция ЛПВП<sub>2</sub> (у лиц с гипо- $\alpha$ -липопротеинемией), так и подфракция ЛПВП<sub>3</sub> (у лиц с нормальным уровнем  $\alpha$ -холестерина). В первом случае наблюдаемый эффект может быть связан с физико-химическими особенностями ЛПВП<sub>2</sub>-частиц, в частности, с молекулярной организацией их поверхностного слоя [2, 14], во втором случае — еще и с наличием в ЛПВП<sub>3</sub> высокой активности ЛХАТ [17], обеспечивающей превращение свободного ХС в эфиры ХС

Влияние апопротеина Е на захват ХС подфракцией ЛПВП<sub>3</sub> при 4-часовой инкубации с эритроцитами (данные 2 экспериментов)

Условия эксперимента	Содержание общего ХС и белка во фракции с плотностью ЛПВП <sub>3</sub> , изолированной после инкубации, мг/мл		ЭХС/НЭХС	Содержание белка в ЛПВП <sub>3</sub> , мг/мл
	НЭХС	ЭХС		
ЛПВП <sub>3</sub>	0,029±0,001	0,201±0,018	6,9	1,47
ЛПВП <sub>3</sub> + эритроциты	0,047±0,001	0,238±0,017	5,1	1,46
ЛПВП <sub>3</sub> + эритроциты + апо Е	$p_{1,2} < 0,01$	н. д.	5,0	1,59
	0,060±0,001	0,297±0,018		
	$p_{1,3} < 0,01$ $p_{2,3} < 0,05$	$p_{1,3} < 0,01$ $p_{2,3}$ — н. д.		

Примечание.  $p$  рассчитаны по [1] для оценки различий единичных результатов.

и тем самым дающей возможность захвата новых порций ХС частицей из клеточных мембран.

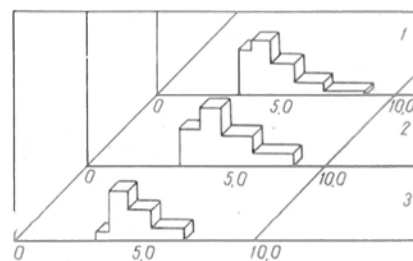
Как следует из литературных [19] и полученных нами данных, апопротейн Е, входящий в состав ЛПВП (главным образом ЛПВП<sub>2</sub>-частиц), не играет определяющей роли для проявления ЛПВП-частицами их ХС-акцепторных свойств. Более того, подфракция ЛПВП<sub>3</sub>, выделенная от лиц с нормальным уровнем  $\alpha$ -холестерина и содержащая минимальное количество апо Е, обладает высокой способностью захватывать ХС из мембран эритроцитов (см. табл. 1). Не обнаружено стимулирующего влияния апопротеина Е на ХС-акцепторные свойства ЛПВП<sub>2</sub> и при внесении данного белка в среду инкубации липопротеинов с эритроцитами. В то же время в аналогичных условиях наблюдалось повышение уровня ХС во фракции с плотностью ЛПВП<sub>3</sub>.

Наблюдаемое увеличение содержания ХС во фракции с плотностью ЛПВП<sub>3</sub> после инкубации ЛПВП<sub>3</sub> с эритроцитами и апопротейном Е может происходить за счет захвата ХС мембран эритроцитов этим белком с последующим встраиванием липид-белкового комплекса в липопротеиновую частицу или самостоятельной флоатацией комплекса в плотности ЛПВП<sub>3</sub>. Возможно также, что апопротейн Е в данных условиях акцептирует ЭХС из ЛПВП<sub>3</sub>-частиц, способствуя тем самым захвату липопротеинами дополнительных количеств ХС из клетки.

Определенную ясность в данный вопрос вносит изучение влияния апопротеина Е на содержание неэстерифицированного ХС (НЭХС) и ЭХС в ЛПВП<sub>3</sub> при их инкубации с эритроци-

тами. Как видно из табл. 2, захват ХС подфракцией ЛПВП<sub>3</sub>, выделенной от лиц с нормальным уровнем  $\alpha$ -ХС, ведет к увеличению в плотности ЛПВП<sub>3</sub> содержания НЭХС (на 62%) и менее выраженному повышению уровня ЭХС. Добавление апопротеина Е в среду инкубации способствует еще большему увеличению содержания НЭХС (в 2 раза по сравнению с контролем) и значительному нарастанию содержания ЭХС (на 48%).

Согласно литературным данным, при инкубации плазмы или сыворотки крови с апопротейном Е и источником ХС (перитонеальными макрофагами мыши или целитом, нагруженным ХС) происходит образование из ЛПВП-частиц богатых ЭХС ЛПВП<sub>1</sub>-частиц [20, 22]. Чтобы ответить на вопрос, не происходит ли образования подобных частиц или по крайней мере укрупнения ЛПВП<sub>3</sub>-частиц в условиях нашего эксперимента, было проведено определение размера ЛПВП-частиц с помощью метода лазерной корреляционной спектроскопии. На рисунке при-



Распределение ЛПВП<sub>3</sub>-частиц по размерам. По оси абсцисс — размер частиц, нм; по оси ординат — относительная масса частиц данного размера при условии, что полная площадь под кривой принята за 100% (в произвольных ед.); 1 — ЛПВП<sub>3</sub>,  $R_m=4,33$  нм; 2 — ЛПВП<sub>3</sub> + эритроциты,  $R_m=5,16$  нм; 3 — ЛПВП<sub>3</sub> + эритроциты + апо Е,  $R_m=4,33$  нм.

Таблица 3

Средние ( $\bar{R}$ ) и максимальные ( $R_m$ ) радиусы ЛПВП<sub>3</sub> (в нм), определенные с помощью лазерной спектроскопии, и их отношение ( $R/R_m$ ), характеризующее полидисперсность системы

Среда инкубации	Средние значения 3 экспериментов		
	$R_m$	$\bar{R}$	$R/R_m$
ЛПВП <sub>3</sub>	3,99±0,17	4,99±0,24	1,25
ЛПВП <sub>3</sub> + эритроциты	4,60±0,21	5,56±0,11	1,21
ЛПВП <sub>3</sub> + эритроциты + апо Е	4,11±0,22	4,66±0,11	1,13

ведены гистограммы одного из экспериментов, а в табл. 3 — характеристики параметров подобных гистограмм, усредненные по 3 независимым измерениям.

Из табл. 3 видно, что у лиц с нормальным уровнем  $\alpha$ -ХС радиус частиц ЛПВП<sub>3</sub>, дающих максимальный вклад в весовое распределение  $W(R)$ , составляет в среднем 3,99 нм. Инкубация ЛПВП<sub>3</sub> с эритроцитами приводила к увеличению радиуса  $R_m$  частиц до 4,60 нм. Подобным образом ведет себя и другая характеристика распределения  $\bar{R}$ . Добавление апопротеина Е в среду инкубации, напротив, приводило к уменьшению как  $R_m$  и  $\bar{R}$ , так и их отношения. Последнее обстоятельство свидетельствует об эффективном уменьшении в  $W(R)$  вклада фракции крупных частиц при наличии в инкубационной смеси апопротеина Е.

Из приведенных данных можно сделать следующие заключения: 1) увеличение размера ЛПВП<sub>3</sub>-частиц при инкубации с эритроцитами при одновременном возрастании в них содержания ХС свидетельствует о превращении этого класса липопротеинов в ЛПВП<sub>2</sub>-подобные частицы; 2) отсутствие увеличения гидродинамического радиуса ЛПВП<sub>3</sub>-частиц при их инкубации с апопротеином Е и источником ХС (эритроцитами) по сравнению с контролем свидетельствует об отсутствии превращения ЛПВП<sub>3</sub> в богатые ЭХС липопротеины в условиях нашего эксперимента. Наблюдаемое при этом нарастание НЭХС и ЭХС во фракции с плотностью ЛПВП<sub>3</sub> без увеличения размера частиц указывает на возможность связывания апо-

протеином Е ХС эритроцитов и ЭХС ЛПВП<sub>3</sub> (или ЛПВП<sub>2</sub>-подобных частиц) с флотацией образующегося комплекса апопротеин Е—ХС в плотности 1,21 г/мл.

Эксперименты, предпринятые для подтверждения данного предположения, показали, что при инкубации апопротеина Е с эритроцитами содержание ХС в клетках уменьшается с 0,990 до 0,930 мг/мл упакованных эритроцитов. Одновременно в той же мере наблюдается соответствующий прирост ХС в среде инкубации. Инкубация апопротеина Е с подфракцией ЛПВП<sub>3</sub> не вызывала достоверного изменения в содержании НЭХС в липопротеинах. Захват ЭХС данным белком с уменьшением размера ЛПВП<sub>3</sub>-частиц наблюдался лишь в случае, когда отношение ЭХС/НЭХС в последних превышало 6,0.

Таким образом, нарастание содержания НЭХС и ЭХС во фракции с плотностью ЛПВП<sub>3</sub> при их инкубации с эритроцитами и апопротеином Е (см. табл. 2) без увеличения размеров липопротеидных частиц (см. табл. 3) может происходить за счет захвата НЭХС из эритроцитных мембран и ЭХС из ЛПВП<sub>3</sub> (или ЛПВП<sub>2</sub>-подобных частиц) апопротеином Е с образованием самостоятельного комплекса, флотирующего в плотности 1,21 г/мл.

Отметим, что образование комплекса апопротеин Е—НЭХС при непосредственном взаимодействии стерина с белком показано ранее [7, 15]. Не исключена возможность, что данный комплекс присутствует в плазме крови человека, представляя собой промежуточное звено на пути транспорта ХС из клеточных мембран на ЛПВП или из одной подфракции ЛПВП на другую. Этот комплекс может участвовать также в формировании липопротеиновых частиц, богатых ЭХС и апопротеином Е, в частности ЛПВП<sub>1</sub>-частиц.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ашмарин И. П., Воробьев А. А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. — Л., 1962. — С. 30—31.
2. Бергельсон Л. Д., Молотковский Ю. Г., Герасимова Е. Н. // Липопротеиды высокой плотности и атеросклероз. — М., 1983. — С. 67—79.
3. Бессмертный Б. С. Математическая статистика в клинической, профилактической и экспериментальной медицине. — М., 1967.

4. Денисенко А. Д., Усатенко М. С., Лозовский В. Т. и др. // *Вопр. мед. химии.* — 1981. — № 2. — С. 272—280.
5. Климов А. Н., Усатенко М. С., Денисенко А. Д. и др. // *Биохимия.* — 1981. — Т. 46, № 4. — С. 590—602.
6. Климов А. Н., Петрова-Маслакова Л. Г., Мамонтова И. Ф. и др. // *Вопр. мед. химии.* — 1982. — № 2. — С. 122—125.
7. Климов А. Н., Кожевникова К. А., Клюева Н. Н. и др. // *Там же.* — 1984. — № 3. — С. 86—90.
8. Липовецкий Б. М., Шестов Д. Б., Плавинская С. И. и др. // *Тер. арх.* — 1984. — № 4. — С. 44—48.
9. Лозовский В. Т., Шмелев Г. Е., Носкин В. А. // *Биофизика.* — 1987. — Т. 32, № 2. — С. 285—291.
10. Никульчева Н. Г., Липовецкий Б. М., Шестов Д. Б., Хоптяр В. П. // *Тер. арх.* — 1982. — № 10. — С. 63—67.
11. Носкин В. А., Шмелев Е. Г., Ломакин А. В. и др. // *Биополимеры и клетка.* — 1986. — Т. 2, № 6. — С. 293—301.
12. Перова Н. В., Метельская В. Д., Озерова И. Н. и др. // *Вопр. мед. химии.* — 1980. — № 5. — С. 688—693.
13. Перова Н. В., Щербакова И. А., Никитина Н. А. и др. // *Там же.* — 1985. — № 6. — С. 118—123.
14. Рууге Э. К., Герасимова Е. Н., Горшкова И. Н., Перова Н. В. // *Липопротеиды высокой плотности и атеросклероз.* — М., 1983. — С. 103—112.
15. Титова Г. В., Клюева Н. Н., Кожевникова К. А., Климов А. Н. // *Биохимия.* — 1980. — Т. 45, № 1. — С. 51—54.
16. Торховская Т. И., Горбатенкова Е. А., Дудаева В. А. // *Вопр. мед. химии.* — 1986. — № 2. — С. 101—106.
17. Альберс Дж., Ченг М. С. // *Липопротеиды высокой плотности и атеросклероз.* — М., 1983. — С. 37—51.
18. Epstein F. H. // *Atherosclerosis V.* / Ed. A. M. Gotto et al. — New York, 1980. — P. 484—487.
19. Fielding Ch. J., Fielding P. E. // *Med. Clin. N. Amer.* — 1982. — Vol. 66. — P. 363—373.
20. Gordon V., Innerarity T. L., Mahley R. W. // *J. biol. Chem.* — 1983. — Vol. 258. — P. 6202—6212.
21. Jonas A., Hesterberg L. K., Dregler S. M. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1978. — Vol. 528. — P. 47—57.
22. Koo C., Innerarity Th. L., Mahley R. W. // *J. biol. Chem.* — 1985. — Vol. 260. — P. 11934—11943.
23. Mahley R. W., Innerarity Th. L., Rall S. C., Weisgraber K. H. // *J. Lipid Res.* — 1984. — Vol. 25. — P. 12—77.
24. *Manual of Laboratory Operations: Lipid Research Clinic Program.* — Washington, 1974. — Vol. 1. — P. 56—58.
25. Miller N. F., Hammett F., Saitissi S. et al. // *Brit. med. J.* — 1981. — Vol. 282. — P. 1741—1744.
26. Oram J. F. // *Arteriosclerosis.* — 1983. — Vol. 3. — P. 420—432.

Поступила 29.01.88

#### ACCEPTION OF CHOLESTEROL BY HIGH DENSITY LIPOPROTEINS IN PATIENTS WITH DIS- $\alpha$ -LIPOPROTEINEMIA AND POSSIBLE ROLE OF APOPROTEIN E IN THE REACTION

K. A. Kozhevnikova, L. G. Petrova-Maslakova, N. S. Parfenova, E. V. Belova, V. F. Tryufanov, V. A. Noskin, R. Z. Vavrin

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

Both subfraction "2" of high density lipoproteins (HDL<sub>2</sub>) from patients with hypo- $\alpha$ -lipoproteinemia and subfraction HDL<sub>3</sub> from persons with normal content of cholesterol were shown to accept the erythrocyte membranes cholesterol *in vitro*. Under these conditions HDL<sub>3</sub> subfraction was transformed into HDL<sub>2</sub>-like particles, where content of unesterified cholesterol and its esters was increased simultaneously with enlargement of the particles size. The HDL subfraction, isolated from persons with high content of cholesterol, did not accept cholesterol under the experimental conditions. Apoprotein E, containing in the HDL subfractions, was not responsible for the particles cholesterol-accepting properties. Apoprotein E itself was capable of cholesterol elimination from erythrocytes as well as of cholesterol esters from HDL<sub>3</sub> and HDL<sub>2</sub>-like particles with formation of a specific complex.

УДК 612.352.3.015.36:547.963.32].06:613.863].014.49

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

#### ПОДАВЛЕНИЕ РЕПЛИКАЦИИ И АКТИВАЦИЯ РЕПАРАТИВНОГО СИНТЕЗА ДНК ПРИ СТРЕССЕ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ ЭТИХ ЯВЛЕНИЙ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ АДАПТАЦИЕЙ

НИИ общей патологии и патологической физиологии АМН СССР, Москва, Оренбургский медицинский институт

Известно, что под влиянием однократного длительного эмоционально-болевого стресса во внутренних органах происходят активация перекисного окисления липидов [3], повреждение ДНК и одновременно быстро реализу-

ется «вспышка» ее репаративного синтеза [2]. В последнее время показано, что в печени, которая является органом, наиболее чувствительным к стрессу, активация репаративного синтеза ДНК сочетается с подавлением



репликации, а в сердце — напротив, с активацией репликативного синтеза ДНК [4].

Поскольку известно, что предварительная адаптация животных к гипоксии и повторным стрессорным воздействиям предупреждает или ограничивает стрессорные повреждения внутренних органов [1, 5], представлялось целесообразным оценить возможность предупреждения стрессорных нарушений синтеза ДНК с помощью такой адаптации. Цель данной работы состояла в том, чтобы оценить влияние предварительной адаптации животных к кратковременным повторным стрессорным воздействиям или периодическому действию гипоксии на изменения репаративного и репликативного синтеза ДНК в сердце и печени.

### Методика

Опыты проводили на крысах-самцах линии Вистар массой 300—350 г. Эмоционально-болевым стресс (ЭБС) воспроизводили в форме невроза тревоги по Десидерато [7] в течение 6 ч. Животных брали для исследования через 12 ч после окончания стрессорного воздействия, так как именно в этот период ранее была доказана максимальная активация репаративного синтеза ДНК в печени [4].

Адаптацию к повторным стрессорным воздействиям проводили с помощью одночасовых эмоционально-болевым воздействий по Десидерато через день в течение 3 нед. Адаптацию к гипоксии осуществляли, помещая животных в барокамеру ежедневно на 6 ч в течение 6 нед. Исследовали 6 групп животных: 1-я — контроль, 2-я — ЭБС, 3-я — адаптация к кратковременным стрессорным воздействиям, 4-я — адаптация к кратковременным стрессорным воздействиям + ЭБС; 5-я — адаптация к гипоксии, 6-я — адаптация к гипоксии + ЭБС. В каждой группе было 18 животных.

О скорости синтеза ДНК судили по включению  $^3\text{H}$ -тимидина, введенного животным внутрибрюшинно из расчета 50 мкКи на 100 г массы тела. Время экспозиции составляло 2 ч. Исследовали скорость репликации и репарации ДНК в ядрах клеток сердца и печени, а также скорость синтеза ДНК в митохондриях печени.

Для изучения репаративного синтеза ядерной ДНК животным внутрибрюшинно вводили ингибитор репликации — оксимочевину — из расчета 5 мг на 100 г массы животного за 30 мин до введения  $^3\text{H}$ -тимидина. Ядра клеток сердца и печени выделяли из соответствующего гомогената, приготовленного на 0,32 М сахарозе, 0,003  $\text{MgCl}_2$  и 0,010 М трис-НСI pH 7,6 осаждением при 2000 g. Митохондрии выделяли из полученного надосадка центрифугированием при 12 000 g в течение 30 мин.

Определение содержания ДНК в ядрах, митохондриях проводили по методу Блобели и Поттера [6]. Радиоактивность образцов измеряли в жидкости Брея на сцинтилляционном

счетчике и выражали числом распадов в минуту на 1 мг ДНК.

### Результаты и обсуждение

Результаты исследования скорости репарации ДНК в ядрах клеток сердца и печени представлены в табл. 1.

Из табл. 1 видно, что длительный ЭБС, как было описано ранее [2, 4], вызывает «вспышку» репаративного синтеза, которая сохраняется через 12 ч после окончания стрессорного воздействия. У животных, адаптированных к кратковременным стрессорным воздействиям, это явление выражено в значительно меньшей степени. Так, у неадаптированных животных в условиях ЭБС скорость репарации ДНК в ядрах клеток сердца по сравнению с контролем возросла на 87 %, в ядрах клеток печени — на 77 %. У животных, адаптированных к кратковременным воздействиям, это увеличение скорости репарации ДНК в клетках сердца составляло 47 %, в клетках печени — 44 %. При адаптации к гипоксии «вспышка» репаративного синтеза ядерной ДНК была еще меньше: для сердца и печени показатели равнялись соответственно 33 и 26 %.

Таким образом, адаптация животных к кратковременным стрессорным воздействиям или периодической гипоксии не устраняет полностью, но в значительной степени снижает активацию репаративного синтеза ДНК, а следовательно, и стрессорное повреждение ДНК. Этот факт соответствует

Таблица 1  
Влияние адаптации и длительного ЭБС на репаративный синтез ДНК в ядрах клеток сердца и печени

Условия исследования животных	Скорость репарации ДНК расп/мин на 1 мг ДНК	
	сердце	печень
Контроль	1660	3700
ЭБС	3000	6500
Адаптация к кратковременным стрессорным воздействиям	1700	3600
То же + ЭБС	2500	5300
Адаптация к гипоксии	1800	3950
То же + ЭБС	2400	5000

Примечание. Здесь и в табл. 2: каждая цифра — среднее из 3 опытов, в опыте использовано 2—3 животных.

Таблица 2

Влияние адаптации и длительного ЭБС на репликацию ядерной и митохондриальной ДНК в клетках печени ( $M \pm m$ )

Условия исследования животных	Скорость репликации ДНК, расп/мин на 1 мг ДНК	
	ядра	митохондрии
Контроль	27 000	38 000
Длительность ЭБС	16 000	22 100
Адаптация к кратковременным ЭБС	26 700	40 000
Адаптация к кратковременным ЭБС + длительный ЭБС	21 000	28 000
Адаптация к гипоксии	25 200	52 000
Адаптация к гипоксии + длительный ЭБС	20 300	40 000

данным о том, что адаптация к указанным факторам уменьшает как стресс-реакцию [8], так и повреждение сердца и печени при стрессе [1, 5].

При изучении влияния предварительной адаптации на вызываемые стрессом изменения репликации ДНК результаты, полученные для сердца и печени, оказались различными. В сердце обнаружена активация репликации на 60%. Этот сдвиг, как свидетельствуют многочисленные работы, посвященные изучению компенсаторной гиперфункции сердца, может зависеть от увеличения синтеза ДНК в фибробластах и других клетках межтканевой соединительной ткани, которые составляют 75% от общего клеточного фонда сердечной мышцы [9]. Предварительная адаптация к повторным стрессорным воздействиям уменьшала активацию репликативного синтеза ДНК на 35%, а адаптация к гипоксии предупреждала ее полностью (данные не приведены).

Результаты изучения влияния предварительной адаптации на изменения репликации ДНК в печени представлены в табл. 2. Из табл. 2 следует, что ЭБС, как и в предыдущих исследованиях, влиял на репликацию ДНК в печени иначе, чем в сердце, т. е. не активировал, а подавлял этот процесс примерно на 40%. Предварительная адаптация к кратковременным стрессорным воздействиям умеренно ограничивала подавление биосинтеза. Адаптация к гипоксии вдвое уменьшала степень снижения синтеза ДНК

(20% вместо 40%) в ядрах и полностью предотвращала это явление в митохондриях. Наиболее интересный факт, вытекающий из полученных результатов, состоит в том, что адаптация к гипоксии сама по себе увеличивает скорость репликации ДНК в митохондриях печени почти на 40%. В целом выявленный эффект адаптации к гипоксии соответствует данным о том, что такая адаптация предупреждает стрессорное повреждение печени и атерогенные дислипидемии [5]. Полученные данные позволяют думать, что гепатопротекторный эффект адаптации к периодической гипоксии при стрессе связан как с адаптационным ограничением стресс-реакции, так и с изменениями, развивающимися в самой печени, в частности с повышением активности ферментов антиоксидантной защиты.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Меерсон Ф. З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. — М., 1984.
2. Меерсон Ф. З., Васильев В. К. // Бюл. exper. биол. — 1981. — № 9. — С. 297—299.
3. Меерсон Ф. З., Казан В. Е., Архипенко Ю. В. // Кардиология. — 1981. — № 12. — С. 55—60.
4. Меерсон Ф. З., Явич М. П., Рожицкая И. И. // Вопр. мед. химии. — 1988.
5. Твердохлиб В. П., Лобанова Г. Т., Меерсон Ф. З. // Бюл. exper. биол. — 1986. — № 12. — С. 681—683.
6. Blobel J., Potter V. R. // Biochim. biophys. Acta. — 1968. — Vol. 166, N 1. — P. 48—57.
7. Desiderato O. et al. // J. comp. Physiol. — 1974. — Vol. 87, N 2. — P. 208—215.
8. Dubiel W., Müller M., Rapport S. // Acta biol. med. germ. — 1981. — Bd 40. — S. 25—29.
9. Morkin E. // Cardiac Hypertrophy / Ed. N. R. Alpert. — New York, 1971. — P. 259—271.

Поступила 29.01.88

STRESS-INDUCED SUPPRESSION OF REPLICATION AND ACTIVATION OF DNA REPARATIVE SYNTHESIS; PREVENTION OF THESE PHENOMENA BY PRELIMINARY ADAPTATION

F. Z. Meerson, M. P. Yavitch, I. I. Rojitskaya, V. P. Tverdochlib

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

Effects of preliminary adaptation to short-term stress or to regular hypoxia on disturbances of DNA biosynthesis were studied in liver and heart tissues under conditions of emotional-painful stress (EPS). EPS was found to induced activation of DNA reparative synthe-

sis in heart and liver tissues and affected differently DNA replication in these tissues: activation of the reaction in heart and suppression — in liver tissue. Adaptation to regular hypoxia limited distinctly the burst of DNA reparative synthesis in cells of both these tissues,

reduced activation of the DNA replicative synthesis in heart and prevented the stress induced depression of DNA replication in hepatic cell nuclei and mitochondria. Mechanisms of the hepatoprotective effect of adaptation to hypoxia is discussed.

УДК 616-008.922.1-008.64-07:616.831-008.939.15-39]-092.9

*А. И. Джафаров, Н. М. Магомедов, Х. Ф. Бабаев, Г. Ш. Ахмедова,  
З. А. Бехбудова*

## **ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ И АКТИВНОСТЬ АТФаз В СИНАПСОМАЛЬНЫХ И МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ФРАКЦИЯХ МОЗГА ПРИ ГИПОКСИИ**

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

В патогенезе гипоксии и ишемии важен дефицит АТФ, приводящий к нарушению работы катионных насосов [7]. За последние годы возрос интерес к изучению АТФаз при различных формах гипоксии и ишемии [1, 3—8, 11, 17—19, 21, 23].

Имеющиеся в литературе данные об изменениях активности транспортных АТФаз при ишемии и гипоксии противоречивы. Так, по данным некоторых авторов, ишемия и гипоксия приводят к снижению активности АТФаз [5, 7, 8, 17, 19]. По мнению других авторов [6, 21], гипоксия может вызывать повышение активности Na, K- и Mg-АТФаз. В некоторых работах установлено, что изменение активности Na, K-АТФазы в мозге и эритроцитах при гипоксии носит фазовый характер [1, 3, 4].

Изучению физико-химического механизма изменения активности АТФаз при гипоксии и ишемии посвящены многочисленные работы [2, 9, 17—19, 23, 25], но полученные данные также противоречивы. Многие исследователи считают, что подавление активности АТФаз связано с интенсификацией перекисного окисления липидов (ПОЛ) [2, 7—9, 25], хотя имеются факты об отсутствии корреляции между изменением активности АТФаз и накоплением продуктов ПОЛ [17]. Некоторые авторы связывают подавление активности АТФаз при ишемии и гипоксии с накоплением в клетке ненасыщенных жирных кислот и их лизофосфолипидов [10, 13, 16, 24] или лактата [23].

В данной работе исследована взаимосвязь между изменением активности Na, K- и Mg-АТФаз и интенсивностью ПОЛ в отдельных областях мозга, си-

напсосомах и митохондриях при гипоксии.

### **Методика**

Опыты проведены на 480 белых крысах линии Вистар (масса тела 180—250 г). Тяжелую степень гипоксии, определяемую как описано в работе [12], создавали путем полного замещения воздуха азотом в герметичной камере объемом 0,12 м<sup>3</sup> в течение 14—16 мин. Реоксигенацию осуществляли, пропуская в камеру кислород под небольшим давлением в течение 15 мин. Витамин Е вводили внутримышечно в дозе 300 мг/кг, а ионол — внутривентрикулярно в дозе 80 мг/кг за 16 ч до гипоксического воздействия. После периодов гипоксии или гипоксии с реоксигенацией животных декапитировали. Фракцию неочищенных синапсом и митохондрий из различных отделов мозга получили по методике [20]. Активность Na, K- и Mg-АТФаз определяли, как описано в работе [15]; об интенсивности ПОЛ в тканях и синапсосомах и митохондриях судили по изменению количества гидроперекисей (ГП) и малонового диальдегида (МДА), определяемых по методу [14]. Содержание белка определяли по [22]. Результаты опытов статистически обработаны по критерию Стьюдента.

### **Результаты и обсуждение**

Полученные данные показали, что действие острой гипоксии приводит к повышению содержания продуктов ПОЛ во всех исследованных структурах мозга (табл. 1 и 2). Максимальное увеличение содержания ГП наблюдали в сенсомоторной коре (42%), МДА — в мозжечке (32%).

При аналогичных воздействиях установлено подавление активности Na, K- и Mg-АТФаз во всех исследованных областях мозга (табл. 3). Наибольшая степень ингибирования активности Na, K-АТФазы обнаружена в продолговатом мозге (26,5%), наи-

меньшая — в зрительной коре (13,3%). Аналогичные изменения отмечены в отношении Mg-АТФазы (см. табл. 3).

Во всех исследуемых структурах мозга реоксигенация после острой гипоксии вызывала еще более существенное повышение содержания продуктов ПОЛ (см. табл. 1), что сопровождалось дальнейшим подавлением активности Na, K- и Mg-АТФаз (см. табл. 3).

Увеличение интенсивности ПОЛ при реоксигенации после ишемии и гипоксии является результатом накопления в клетке различных восстановленных метаболитов (АМФ, лактат, НАДФХ, жирных кислот, металлов переменной валентности и т. д.), а также активации оксигеназных реакций, вследствие чего усиливается генерация активных форм кислорода ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH$ ) [7]. При этом, очевидно, происходит более интенсивное расходование эндогенных антиоксидантов. Нами предпринята попытка выяснения возможности стабилизации ПОЛ мембраны антиоксидантами при гипоксии и гипоксии с последующей реоксигенацией.

Полученные данные показали, что предварительное введение животным антиоксидантов (витамин Е и ионол) вызывает во всех исследуемых областях мозга снижение накопления продуктов ПОЛ (см. табл. 1), что предотвращает снижение активности АТФазы (см. табл. 3).

Острая гипоксия вызывает более заметное увеличение накопления продуктов ПОЛ в синапсомальных и митохондриальных фракциях, чем в нефракционированных тканевых гомогенатах (см. табл. 2). При этом гипоксия вызывала также подавление активности АТФаз. Наибольшая степень ингибирования активности Na, K-АТФазы была обнаружена в синапсоматомах зрительной коры (52%), а Mg-АТФазы — в продолговатом мозге (табл. 4); в митохондриях наиболее существенное подавление активности Mg-АТФазы обнаружили в зрительной коре.

Реоксигенация после гипоксии существенных изменений в синапсоматомах и митохондриях в интенсивности ПОЛ (см. табл. 2) и активности АТФаз не вызывала (см. табл. 4). По-

Таблица 1

Накопление ГП (в отн. ед.) и МДА (в нмоль на 1 мг белка) в различных отделах мозга при гипоксии

№ п/п	Условия опыта	Продолговатый мозг		Мозжечок		Зрительная кора		Сенсомоторная кора	
		ГП	МДА	ГП	МДА	ГП	МДА	ГП	МДА
1	Контроль	3,5±0,26	2,87±0,21	3,48±0,3	2,89±0,17	4,19±0,31	3,54±0,28	3,75±0,25	3,31±0,23
2	Гипоксия P <sub>1-1</sub>	4,67±0,34 <0,05	3,58±0,29	4,5±0,36 <0,05	3,82±0,3	5,26±0,41 <0,05	4,65±0,34 <0,05	5,35±0,46 <0,05	3,98±0,31
3	Гипоксия + реоксигенация P <sub>3-2</sub>	5,05±0,43	4,34±0,36	4,68±0,39	4,12±0,30	6,37±0,52 <0,05	5,12±0,45	6,19±0,49	5,67±0,43 <0,05
4	Витамин Е + гипоксия P <sub>4-2</sub>	4,27±0,33	3,37±0,27	4,00±0,26	3,18±0,23	3,99±0,28 <0,05	3,04±0,21 <0,05	3,86±0,3 <0,05	3,52±0,29
5	Ионол + гипоксия P <sub>5-2</sub>	3,53±0,26 <0,05	2,65±0,18 <0,05	3,44±0,23 <0,05	2,95±0,20 <0,05	4,02±0,31 <0,05	2,95±0,19 <0,01	4,28±0,32 <0,05	3,20±0,27 <0,05
6	Витамин Е + гипоксия + реоксигенация P <sub>6-3</sub>	4,48±0,36	3,54±0,26 <0,05	4,09±0,30	4,30±0,33	4,23±0,36 <0,01	3,93±0,36 <0,05	3,88±0,32 <0,01	3,64±0,28 <0,01
7	Ионол + гипоксия + реоксигенация P <sub>7-3</sub>	3,82±0,30 <0,05	4,20±0,35	4,06±0,36	3,40±0,25	4,46±0,37 <0,05	3,15±0,26 <0,01	5,29±0,41	3,72±0,30

Таблица 2

Накопление ГП (в отн. ед.) и МДА (в нмоль на 1 мг белка) в синапсосамах и митохондриях различных отделов мозга при гипоксии

№ п/п	Условия опыта	Продолговатый мозг				Мозжечок				Зрительная кора				Сенсомоторная кора			
		синапсосы		митохондрии		синапсосы		митохондрии		синапсосы		митохондрии		синапсосы		митохондрии	
		ГП	МДА	ГП	МДА	ГП	МДА	ГП	МДА	ГП	МДА	ГП	МДА	ГП	МДА	ГП	МДА
1	Контроль	1,7 ±0,13	2,11 ±0,17	22,2 ±0,14	2,21 ±0,18	2,73 ±0,20	1,84 ±0,09	2,44 ±0,21	2,03 ±0,16	3,35 ±0,28	2,88 ±0,36	4,72 ±0,36	3,69 ±0,23	2,41 ±0,19	1,74 ±0,10	1,93 ±0,17	1,50 ±0,09
2	Гипоксия <i>p</i> <sub>2-1</sub>	3,8 ±0,30 <0,01	3,37 ±0,32 <0,01	2,97 ±0,21 <0,05	3,56 ±0,29 <0,05	4,52 ±0,33 <0,01	3,43 ±0,35 <0,01	4,14 ±0,33 <0,05	3,26 ±0,25 <0,05	5,80 ±0,39 <0,05	4,82 ±0,40 <0,01	7,24 ±0,57 <0,01	5,67 ±0,45 <0,05	3,95 ±0,31 <0,05	2,83 ±0,20 <0,05	3,27 ±0,24 <0,05	2,82 ±0,20 <0,01
3	Гипоксия + реоксигенация <i>p</i> <sub>3-2</sub>	2,55 ±0,17	4,64 ±0,35 <0,05	3,42 ±0,28	3,32 ±0,27	4,11 ±0,30	2,86 ±0,17	3,05 ±0,26	2,46 ±0,19	5,30 ±0,41	4,87 ±0,35	6,80 ±0,57	6,15 ±0,47	4,92 ±0,35	3,93 ±0,25 <0,05	3,33 ±0,27	2,65 ±0,20
4	Витамин Е + гипоксия <i>p</i> <sub>4-2</sub>	2,04 ±0,16 <0,01	1,89 ±0,09 <0,01	1,50 ±0,09 <0,01	2,99 ±0,21	2,88 ±0,19 <0,01	2,13 ±0,15 <0,01	2,67 ±0,19 <0,01	2,41 ±0,35 <0,05	2,70 ±0,20 <0,05	2,39 ±0,16 <0,01	5,32 ±0,43 <0,05	4,04 ±0,31 <0,05	2,60 ±0,19 <0,05	1,80 ±0,13 <0,01	2,48 ±0,19 <0,05	1,87 ±0,13 <0,95
5	Ионол + гипоксия <i>p</i> <sub>5-2</sub>	2,01 ±0,15 <0,01	1,64 ±0,11 <0,01	2,02 ±0,15 <0,05	1,68 ±0,14 <0,01	—	—	—	—	3,26 ±0,26 <0,05	2,53 ±0,21 <0,01	4,25 ±0,35 <0,05	3,13 ±0,26 <0,01	—	—	—	—
6	Витамин Е + гипоксия + реоксигенация <i>p</i> <sub>6-3</sub>	2,45 ±0,23	2,78 ±0,21 <0,05	2,10 ±0,15 <0,05	2,22 ±0,11 <0,05	—	—	—	—	3,96 ±0,25 <0,05	3,6 ±0,24 <0,05	4,78 ±0,38 <0,01	3,47 ±0,28 <0,01	—	—	—	—
7	Ионол + гипоксия + реоксигенация <i>p</i> <sub>7-3</sub>	2,53 ±0,13	2,59 ±0,16 <0,05	2,15 ±0,15 <0,05	2,62 ±0,21	3,91 ±0,28	2,06 ±0,15 <0,05	2,47 ±0,16	1,98 ±0,14	3,75 ±0,27 <0,05	3,07 ±0,20 <0,05	6,70 ±0,5	4,98 ±0,31 <0,05	4,07 ±0,28	3,18 ±0,20	2,60 ±0,18	2,09 ±0,15

Таблица 3

Изменение активности Na, K- и Mg-АТФаз (в мкмоль неорганического фосфата на 1 мг белка за 45 мин) в различных отделах мозга крыс при острой гипоксии

№ п/п	Условия опыта	Продолговатый мозг		Мозжечок	
		Na, K-АТФаза	Mg-АТФаза	Na, K-АТФаза	Mg-АТФаза
1	Контроль	8,07±0,64	17,96±1,10	7,72±0,44	19,78±1,41
2	Гипоксия	6,38±0,53	14,74±1,09	6,62±0,66	16,88±1,23
3	Гипоксия + реоксигенация <i>p</i> <sub>2-1</sub>	<0,05			
3	Гипоксия + реоксигенация <i>p</i> <sub>3-2</sub>	5,93±0,41	13,55±0,98	6,58±0,47	15,61±0,14
4	Витамин Е + гипоксия <i>p</i> <sub>4-2</sub>	9,04±0,65	19,8±1,71	7,56±0,48	18,47±1,12
5	Ионол + гипоксия <i>p</i> <sub>5-2</sub>	7,97±0,52	16,29±1,11	6,56±0,51	16,93±1,13
6	Витамин Е + гипоксия + реоксигенация <i>p</i> <sub>6-3</sub>	7,47±0,60	15,45±1,05	7,3±0,60	22,19±1,77
7	Ионол + гипоксия + реоксигенация <i>p</i> <sub>7-3</sub>	<0,05			
7	Ионол + гипоксия + реоксигенация <i>p</i> <sub>7-3</sub>	8,44±0,64	18,61±1,14	8,13±0,65	20,91±1,63
		<0,01	<0,05	<0,05	<0,05

Продолжение

№ п/п	Условия опыта	Зрительная кора		Сенсомоторная кора	
		Na, K-АТФаза	Mg-АТФаза	Na, K-АТФаза	Mg-АТФаза
1	Контроль	7,57±0,57	19,07±0,90	5,8±0,29	17,32±1,22
2	Гипоксия	6,68±0,52	17,83±1,50	4,9±0,32	15,05±1,07
3	Гипоксия + реоксигенация <i>p</i> <sub>2-1</sub>				
3	Гипоксия + реоксигенация <i>p</i> <sub>3-2</sub>	5,73±0,39	15,29±1,30	4,3±0,31	14,75±1,11
4	Витамин Е + гипоксия <i>p</i> <sub>4-2</sub>	6,79±0,50	15,94±1,25	4,75±0,39	18,14±1,95
5	Ионол + гипоксия <i>p</i> <sub>5-2</sub>	7,43±0,45	16,53±1,27	7,2±0,57	17,28±1,42
6	Витамин Е + гипоксия + реоксигенация <i>p</i> <sub>6-3</sub>	6,89±0,64	16,67±1,35	6,4±0,47	20,55±1,63
7	Ионол + гипоксия + реоксигенация <i>p</i> <sub>7-3</sub>	8,95±0,77	21,4±1,70	5,89±0,47	17,37±1,52
		<0,01	<0,01	<0,01	<0,05

видимому, при выделении синапсоматальных и митохондриальных фракций из тканей мозга после гипоксии биомембраны контактируют с кислородом среды выделения, благодаря чему процесс ПОЛ достигает уровня, характерного для реоксигенации.

Предварительное введение животным антиоксидантов способствовало значительной стабилизации ПОЛ в исследуемых фракциях (см. табл. 2) и сохранению активности изучаемых ферментов (см. табл. 4) как на фоне гипоксии, так и гипоксии с реоксигенацией.

Полученные данные показали, что острая гипоксия приводит к усилению

интенсивности ПОЛ как в отдельных областях мозга, так и в соответствующих синапсоматальных и митохондриальных фракциях, что сопровождается подавлением активности АТФаз. При введении антиоксидантов в условиях гипоксии установлено существенное снижение интенсивности ПОЛ и сохранение активности АТФаз. Можно предположить, что подавление активности АТФаз головного мозга при гипоксии является следствием накопления в тканях продуктов ПОЛ, что может быть одной из причин структурно-функциональных нарушений нервной системы при гипоксии.

Таблица 4

Изменение активности Na, K- и Mg-АТФаз (в мкмоль неорганического фосфата на 1 мг белка за 45 мин) в синапсомальных и митохондриальных фракциях различных отделов мозга крыс при острой гипоксии

№ п/п	Условия опыта	Продолговатый мозг			Мозжечок			Зрительная кора			Сенсомоторная кора		
		синапсомы		митохондрии	синапсомы		митохондрии	синапсомы		митохондрии	синапсомы		митохондрии
		Na, K-АТФаза	Mg-АТФаза	Mg-АТФаза	Na, K-АТФаза	Mg-АТФаза	Mg-АТФаза	Na, K-АТФаза	Mg-АТФаза	Mg-АТФаза	Na, K-АТФаза	Mg-АТФаза	Mg-АТФаза
1	Контроль	14,78± ±1,31	64,17± ±5,25	45,46± ±3,92	14,14± ±1,11	65,76± ±5,20	34,6± ±2,92	17,33± ±1,44	68,82± ±5,83	43,19± ±3,29	11,9± ±0,95	49,2± ±4,00	38,96± ±3,22
2	Гипоксия <i>p</i> <sub>2-1</sub>	12,96± ±1,10	52,02± ±4,63 <0,05	34,77± ±2,67 <0,05	10,73± ±0,73 <0,05	56,02± ±5,02	30,44± ±2,24	11,37± ±0,94 <0,01	54,56± ±4,16 <0,05	31,61± ±2,13 <0,05	10,64± ±0,77	43,61± ±3,36	32,86± ±2,27
3	Гипоксия + реоксигенация <i>p</i> <sub>3-2</sub>	11,84± ±0,92	58,34± ±5,13	36,77± ±2,75	11,09± ±0,66	57,46± ±6,34	2,07± ±2,17	11,85± ±0,86	53,74± ±4,47	34,85± ±2,26	10,21± ±0,63	36,24± ±2,95	31,65± ±2,13
4	Витамин Е + гипоксия <i>p</i> <sub>4-2</sub>	18,33± ±1,19 <0,01	66,59± ±5,33 <0,05	45,39± ±3,73 <0,05	16,59± ±1,19 <0,05	68,38± ±5,15 <0,05	39,98± ±3,11	23,24± ±1,95 <0,01	56,41± ±4,53	43,39± ±3,27 <0,05	16,18± ±1,43 <0,05	49,48± ±4,00	37,9± ±3,10
5	Ионол + гипоксия <i>p</i> <sub>5-2</sub>	17,89± ±1,44 <0,05	60,23± ±5,03	42,02± ±3,29 <0,05	—	—	—	21,45± ±1,17 <0,01	71,71± ±6,07 <0,05	37,38± ±3,01	—	—	—
6	Витамин Е + гипоксия + реоксигенация <i>p</i> <sub>6-3</sub>	17,12± ±1,42 <0,05	64,13± ±5,55	46,0± ±3,92 <0,05	—	—	—	19,44± ±1,51 <0,01	63,91± ±5,20	41,19± ±3,00	—	—	—
7	Ионол + гипоксия + реоксигенация <i>p</i> <sub>7-3</sub>	15,33± ±1,12 <0,05	65,75± ±5,43	43,49± ±3,19	15,87± ±1,11 <0,05	66,92± ±5,90	35,62± ±2,27	15,08± ±1,08 <0,05	70,62± ±6,03 <0,05	40,99± ±3,17	16,43± ±1,12 <0,01	44,9± ±2,99 <0,05	40,08± ±3,41 <0,05

## ЛИТЕРАТУРА

1. Александрова А. Е., Говорова Л. В. // Фармакол. и токсикол. — 1977. — № 1. — С. 53—55.
2. Архипенко Ю. В., Биленко М. В., Добринна С. К. и др. // Бюл. экспер. биол. — 1977. — № 6. — С. 683—686.
3. Говорова Л. В. // Вопр. мед. химии. — 1977. — № 3. — С. 302—308.
4. Говорова Л. В., Александрова А. Е., Теплов С. И. // Там же. — 1975. — № 1. — С. 23—27.
5. Давыдов В. В., Скурыгин В. П., Якушев В. С. // Там же. — 1984. — № 2. — С. 61—63.
6. Моляйн Э. С., Буравкова Л. Б., Коваленко Е. А., Соловьянова О. Б. // Пат. физиол. — 1979. — № 1. — С. 17—20.
7. Меерсон Ф. З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. — М., 1984.
8. Меерсон Ф. З., Медведев Л. Н., Голубева Л. Ю., Устинова Е. Е. // Бюл. экспер. биол. — 1982. — № 8. — С. 61—62.
9. Меерсон Ф. З., Сазонтова Т. Г., Коган В. Е. и др. // Там же. — 1983. — № 12. — С. 42—44.
10. Смирнов Н. Е., Васильева Е. М., Зябкина А. Г., Марков Х. М. // Вопр. питания. — 1983. — № 6. — С. 59—63.
11. Шерстнева И. Я., Броновицкая З. Г. // Укр. биохим. журн. — 1976. — Т. 48, № 1. — С. 417—420.
12. Хватова Е. И., Сидоркина А. И., Миронова Г. В., Биличина И. Н. Способ определения степени тяжести гипоксии мозговой ткани: А. с. 1020777А. СССР, 1983.
13. Allgayer H., Brown L., Krus W. et al. // Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. — 1986. — Bd 332, N 4. — S. 398—402.
14. Asakawa T., Matsushita S. // Lipids. — 1980. — Vol. 15, N 3. — P. 137—140.
15. Bonling S. L., Caravaggio L. L., Canady M. R. // Exp. Eye Res. — 1964. — Vol. 3. — P. 47—56.
16. Brelton M., Wolf C., Colard O. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1983. — Vol. 117, N 3. — P. 809—816.
17. Goldberg W. J., Watson B. D., Busto R. et al. // Neurochem. Res. — 1984. — Vol. 9, N 12. — P. 1737—1747.
18. Daly N. J., Elz J. S., Nayler W. G. // Amer. J. Physiol. — 1984. — Vol. 247, N 2. — Pt 2. — P. 11237—11243.
19. Gotoh O., Koide T., Asano T., Tokakura K. // J. Cerebr. Blood Flow. — 1983. — Vol. 3, Suppl. 1. — P. 289—290.
20. Hajos F. // Brain Res. — 1975. — Vol. 93, N 3. — P. 485—489.
21. Kinimoto M., Tsubone H., Tsujii N. et al. // Toxicol. appl. Pharmacol. — 1984. — Vol. 74, N 1. — P. 10—16.
22. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
23. Mac Millan V., Shonkaran R. // Brain Res. — 1984. — Vol. 303, N 1. — P. 125—132.
24. Ridard J. N., Rossi B., Renaul J., Lazolunski M. // Biochim. biophys. Acta. — 1984. — Vol. 769, N 1. — P. 245—252.
25. Ventura C., Guarnieri C., Caldara C. M. // Ital. J. Biochem. — 1985. — Vol. 34, N 4. — P. 267—274.

Поступила 16.02.88

### LIPID PEROXIDATION AND ATPase ACTIVITY IN SYNAPTOSOMAL AND MITOCHONDRIAL BRAIN FRACTIONS IN HYPOXIA

A. I. Dzhaifarov, N. M. Magomedov, Kh. F. Babayev, G. Sh. Akhmedova, Z. A. Bekhbudova

A. I. Karaev Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Azerbaijan SSR, Baku

Acute hypoxia was accompanied by intensification of lipid peroxidation in synaptosomal and mitochondrial rat brain fractions as well as by inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and Mg<sup>2+</sup>-ATPases. Preadministration of antioxidants vitamin E and ionol into animals prevented distinctly the increase in lipid peroxidation rate, while the ATPases activity was unaltered. Inhibition of the ATPases may be considered as a result of impairing effect of the lipid peroxidation products, which appears to be of importance for structure-functional deteriorations of the nervous system in hypoxia.

УДК 616.127-005.4-092.9-07:[616.127-008.931:577.152.6]-074

**Р. Р. Стапуленис, Л. Л. Иванов, Л. Ю. Лукошавичюс, И. С. Даукантайте,  
Д. З. Кондратас, А. К. Прашкявичюс**

### ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ЛЕЙЦИЛ-ТРНК-СИНТЕАЗЫ ИЗ МИОКАРДА СВИНЬИ В НОРМЕ И ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

Центральная научно-исследовательская лаборатория Каунасского медицинского института

При ишемии в миокарде происходят глубокие изменения биосинтеза белка [7], однако молекулярные механизмы этого явления еще недостаточно изучены. Ранее было показано, что нарушения биосинтеза белка в клетках миокарда при ишемии сопро-

вождаются изменением биологической активности ряда аминокислот-ТРНК-синтетаз (АРСаэ) [6]. Однако эти исследования проводились с суммарными препаратами ферментов и оставалось неясным, обусловлены ли обнаруженные изменения активности



АРСаз влиянием внутриклеточных факторов или ишемии миокарда приводит к изменению самих ферментов. Ответ на эти вопросы могло дать изучение индивидуальных АРСаз и их высокомолекулярных комплексов, в составе которых эти ферменты функционируют в клетках высших эукариотов [12]. Подходящим объектом для таких исследований является лейцил-тРНК-синтетаза (лейРС, КФ. 6.1.1.4), которая, с одной стороны, прочно ассоциирована в комплекс с другими АРСазами [9], а с другой — достаточно хорошо изучена в других эукариотических клетках, в том числе в печени при ишемии миокарда [1].

В настоящей работе проведено изучение каталитических свойств и термостабильности лейРС, выделенной из миокарда свиньи в свободном состоянии и в составе высокомолекулярных комплексов в норме и при экспериментальной ишемии.

#### Методика

Моделью тотальной ишемии служил аутолиз изолированного сердца свиньи, проводимый в течение 15 и 30 мин при 37°C, как описано ранее [6].

Препараты суммарной тРНК из миокарда контрольных сердец получали методом фенольной депротенизации гомогената ткани с последующей хроматографией РНК на ДЭАЭ-целлюлозе. Препараты суммарной тРНК деацелировали по методу [8] и дополнительно очищали гель-хроматографией на сефардексе G-100.

Свободную лейРС и в составе очищенного высокомолекулярного комплекса выделяли по следующей схеме: получение безрибосомного экстракта, фракционирование сульфатом аммония, хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе, «высаливающая» хроматография на сефарозе 4В, хроматография на оксипатите и сефарозе 6В [5]. Неочищенный высокомолекулярный комплекс АРСаз из миокарда свиньи выделяли гель-хроматографией безрибосомного экстракта ткани на сефарозе 6В.

Активность лейРС определяли по начальной скорости реакции аминоацилирования тРНК  $^{14}\text{C}$ -лейцином. В объеме 0,1 мл реакционная смесь содержала: 150 мМ трис- $\text{HCl}$  рН 7,7, 15 мМ  $\text{KCl}$ , 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 10 мМ АТФ, 0,05 мМ  $^{14}\text{C}$ -лейцина, 50 мкг суммарной тРНК и 3—20 мкг фермента. Реакционную смесь инкубировали 4—10 мин при 25°C. Реакцию останавливали добавлением двойного объема 10 % трихлоруксусной кислоты, осадки промывали на нитроцеллюлозных фильтрах «Synproг Nr3» («Chemapol», ЧССР), радиоактивность проб измеряли на сцинтилляционном счетчике «Delta-300» («Tracor Europe», Голландия).

Кинетические параметры реакции аминоацилирования лейРС исследовали, варьируя

концентрацию одного субстрата при насыщающих концентрациях других. Кинетические данные обработаны по методу двойных обратных величин Лайнуивера—Берка [3].

Термоинактивацию лейРС изучали, определяя остаточную активность фермента в зависимости от времени прогревания при постоянной температуре инактивации, как описано ранее [5].

Для статистической обработки данных применяли *t*-критерий Стьюдента [4].

#### Результаты и обсуждение

В предыдущих исследованиях [5] было показано, что при хроматографии на оксипатите лейРС миокарда свиньи разделяется на две формы: свободный фермент с мол. массой 130 кДа и фермент, ассоциированный в макромолекулярный комплекс АРСаз, мол. масса которого составляет 840 кДа. Неочищенный комплекс АРСаз характеризуется несколько большими размерами (мол. масса 970 кДа).

Результаты кинетического изучения индивидуальной лейРС, а также в составе очищенного и неочищенного комплексов представлены в табл. 1. Сравнение кинетических констант разных форм фермента, выделенных из миокарда в норме и при 15- и 30-минутной ишемии, не указывает на значительные различия этих параметров ферментов. Значения  $K_m$  для всех форм лейРС в норме и при ишемии являются величинами одного порядка и типичны для этого класса ферментов. Следует отметить, что значение  $K_m$  по лейцину для свободной лейРС несколько увеличивается, а по тРНК снижается при 15- и 30-минутной ишемии по сравнению с нормой. В эти сроки ишемии практически не изменяются значения  $K_m$  по лейцину и тРНК для лейРС в составе очищенного и неочищенного комплексов. Возможно, что относительная стабильность лейРС в составе высокомолекулярных комплексов обусловлена стабилизацией этого фермента другими компонентами комплекса. Свободная форма лейРС, выделенная из миокарда в норме и при 15- и 30-минутной ишемии, характеризуется близкими значениями максимальной скорости ( $V_{max}$ ) реакции аминоацилирования тРНК. Таким образом, обнаруженные ранее повышение активности лейРС в экстракте миокарда свиньи при 15-

Таблица 1

Кинетические параметры реакции аминоацилирования для лейРС в норме и при экспериментальной ишемии (средние данные 8—12 опытов)

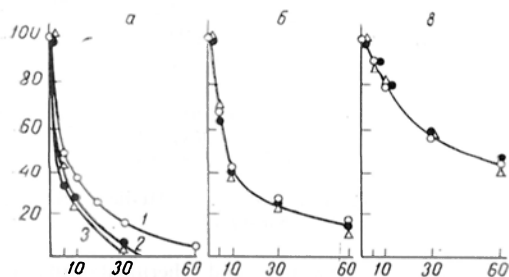
Препарат лейРС	$K_M$			$V_{max}$ М/мин/мг · 10 <sup>-6</sup>
	АТР, М · 10 <sup>-3</sup>	лейцин, М · 10 <sup>-3</sup>	ТРНК <sup>Leu</sup> , М · 10 <sup>-6</sup>	
Контроль				
Свободная форма	3,9±0,3	0,7±0,1	1,6±0,4	20,6±5,4
В составе очищенного комплекса	12,3±0,6	2,7±0,3	0,4±0,06	15,3±1,6*
В составе неочищенного комплекса	—	2,9±0,3	0,35±0,02	6,13±0,57*
15-минутная ишемия				
Свободная форма	6,9±0,7	1,7±0,3	0,4±0,1	19,2±3,1
В составе очищенного комплекса	3,0±0,5	2,9±0,3	0,6±0,1	15,1±2,4*
В составе неочищенного комплекса	—	4,9±0,3	0,7±0,03	12,3±0,8*
30-минутная ишемия				
Свободная форма	4,1±0,1	2,0±0,2	0,5±0,1	20,7±1,6
В составе очищенного комплекса	4,2±0,1	3,0±0,2	0,6±0,1	18,1±2,0*
В составе неочищенного комплекса	—	4,4±0,2	0,6±0,05	7,5±0,57*

Примечание. Величины  $V_{max}$  рассчитаны на 1 мг белка комплексов.

минутной ишемии и снижение ее при 30-минутной ишемии [6] не являются следствием изменения каталитической активности этого фермента, а, по-видимому, обусловлены влиянием внутриклеточных факторов. В то же время отсутствие существенных различий в значениях  $K_M$  для свободной и ассоциированной лейРС свидетельствует о том, что комплексообразование не влияет на каталитические свойства фермента, т. е. подтверждает предположение о функциональной независимости АРСаз в высокомолекулярных комплексах [14]. Тем не менее данные о  $V_{max}$  реакции аминоацилирования, катализируемой свободной и ассоциированной лейРС, указывают на определенное повышение каталитической активности этого фермента в составе комплексов. Свободная и ассоциированная лейРС характеризуются близкими значениями  $V_{max}$  при расчете на 1 мг белка. Однако, поскольку содержание каждого компонента в комплексе, судя по результатам электрофореза, вряд ли превышает  $1/10$  содержания суммарного белка, реальная  $V_{max}$  (и, следовательно, молекулярная активность) для синтетаз в составе ком-

плексов существенно выше по сравнению с очищенными ферментами.

Ранее нами было установлено, что лейРС в составе очищенного комплекса более устойчива к тепловой инактивации, чем свободная форма фермента при 42 °С [5]. Исследования термостабильности лейРС в свободном состоянии и в составе очищенного и неочищенного комплексов, выделенной из миокарда при 15- и 30-минутной ишемии, показали, что в данном случае комплексообразование стабилизирует активность лейРС (см. рисунок). Свободная лейРС из ишемического миокарда более чувствительна к термоинактивации, чем фермент из миокарда контрольных сердец. На термостабильность лейРС, находящейся в составе высокомолекулярных комплексов, ишемия миокарда не оказывает заметного влияния. Таким образом, результаты исследований подтверждают предположение, высказанное в работе [10], о том, что одна из функций комплексов заключается в предохранении АРСаз от тепловой инактивации. Возможно, что это происходит благодаря белок-белковым взаимодействиям между компонентами высокомолеку-



Термоинактивация свободной лейРС (а), в составе очищенного комплекса (б) и неочищенного комплекса (в) при 42°С.

По оси абсцисс — длительность прогрева (в мин); по оси ординат — остаточная активность (в %). 1 — контроль; 2 — 15-минутная ишемия; 3 — 30-минутная ишемия.

лярных комплексов. С другой стороны, полученные нами данные свидетельствуют об относительной стабильности белоксинтезирующего аппарата клеток миокарда при кратковременной ишемии.

Имеются сведения о том, что при некоторых физиологических и патологических изменениях состояния организма происходит перераспределение активности АРСаз между высокомолекулярным комплексом и фракцией свободного фермента [11, 13]. Поскольку в безрибосомном экстракте миокарда свиньи лейРС присутствует как в составе высокомолекулярного комплекса, так и в свободном состоянии, в дальнейших экспериментах мы определили активность лейРС этих фракций. Данные табл. 2 свидетельствуют, что при 15-минутной ишемии в составе комплекса активность лейРС повышается на 20%. После 30-минутной ишемии обнаружено снижение активности этого фермента в комплексе на 27% по сравнению с нормой. В те же сроки ишемии была изучена активность лейРС в низкомолекулярной фракции, полученной при гель-хроматографии безрибосомного экстракта. Полученные данные указывают на разнонаправленные изменения при ишемии активности этого фермента в низкомолекулярной фракции и в составе неочищенного комплекса (см. табл. 2). Можно предположить, что это связано с частичным перераспределением свободной лейРС в состав высокомолекулярного комплекса при 15-минутной ишемии и диссоциацией из него при 30-минутной ишемии. Это предположение под-

Таблица 2  
Активность лейРС в безрибосомном экстракте миокарда свиньи ( $M \pm m$ ;  $n = 6$ )

Условия исследования	Активность лейРС, пмоль лейцил-ТРНК на 1 мг белка за 1 мин	
	в составе комплекса	в низкомолекулярной фракции
Контроль	291,2 ± 7,5	61,6 ± 5,5
Ишемия:		
15 мин	350,8 ± 10,3	55,1 ± 3,2
<i>p</i>	< 0,05	> 0,05
30 мин	261,1 ± 21,4	86,9 ± 3,4
<i>p</i>	< 0,05	< 0,05

тверждают результаты определения  $V_{\max}$  реакции аминокислотирования для лейРС в составе неочищенного комплекса (см. табл. 1). Так,  $V_{\max}$  при 15-минутной ишемии увеличивается, а при 30-минутной уменьшается, что может свидетельствовать об изменении содержания лейРС в составе такого комплекса.

Обнаруженное ранее увеличение активности ряда АРСаз в миокарде и печени при ишемии миокарда авторы работы [2] объясняют повышенной активностью эндогенной неорганической пирофосфатазы. Полученные нами данные указывают на то, что повышение активности лейРС в составе неочищенного комплекса при 15-минутной ишемии может быть связано с перераспределением этого фермента из низкомолекулярной фракции в комплекс. Вопрос, каким образом происходит ассоциация свободной лейРС в комплекс, требует дальнейшего исследования. Причиной снижения активности лейРС в составе комплекса при 30-минутной ишемии, по видимому, является переход одного фермента в свободное состояние вследствие нарушения структуры комплекса.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Иванов Л. Л., Прашквявичюс А. К., Лукошьявичюс Л. Ю. и др. // Теоретические и практические аспекты познания биохимических процессов. — Вильнюс, 1983. — С. 71.
2. Иванов Л. Л., Тамулявичюс А.-А. И., Лукошьявичюс Л. Ю. и др. // Молекул. биол. — 1984. — № 5. — С. 1326—1329.
3. Корнши-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики: Пер. с англ. — М., 1979.
4. Лакин Г. Ф. Биометрия. — М., 1980.

5. *Stapulenis P. P., Иванов Л. Л., Лукошьявичюс Л. Ю.* и др. // Биополимеры и клетка. — 1986. — Т. 2. — С. 302—307.
6. *Тамулявичюс А.-А. Й., Иванов Л. Л., Лукошьявичюс Л. Ю., Прашкьявичюс А. К.* // Вопр. мед. химии. — 1985. — № 5. — С. 104—107.
7. *Фетисова Т. В., Фролькис Р. А.* Биохимия инфаркта миокарда. — Киев, 1976.
8. *Choo A. H. F., Logan D. M.* // Molec. cell. Biochem. — 1977. — Vol. 17. — P. 31—38.
9. *Cirakoglu B., Waller J.-P.* // Europ. J. Biochem. — 1985. — Vol. 151. — P. 101—110.
10. *Dang C. V.* // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1982. — Vol. 106. — P. 44—47.
11. *Del Monte U., Capaccioli S., Neri Cini G.* et al. // Biochem. J. — 1986. — Vol. 236. — P. 163—169.
12. *Deutscher M. P.* // J. Cell Biol. — 1984. — Vol. 99. — P. 373—377.
13. *Klekamp M., Pahuski E., Hampel A.* // Somat. Cell Genet. — 1981. — Vol. 7. — P. 725—735.
14. *Mirande M., Cirakoglu B., Waller J.-P.* // Europ. J. Biochem. — 1983. — Vol. 131. — P. 163—170.

Поступила 22.02.88

## PROPERTIES OF LEUCYL-tRNA-SYNTHE-TASE FROM PIG MYOCARDIUM UNDER NORMAL AND ISCHEMIC CONDITIONS

*R. R. Stapulenis, L. I. Ivanov, L. Yu. Lukoshyavichus, I. S. Daukantayte, D. Z. Kondratas, A. K. Prashkyavichus*

Central Research Laboratory, Medical School, Kaunas

Catalytic properties and thermostability of leucyl-tRNA-synthetase were studied both in free form and in the form of high molecular complexes, isolated from pig myocardium under normal state and after 15 min and 30 min ischemia.  $K_m$  values of free and associated forms of leucyl-tRNA-synthetase were similar either in normal state or after 15-30 min ischemia. Complex-formation protected the enzyme from thermic inactivation under normal and ischemic conditions. Reverse redistribution of the leucyl-tRNA-synthetase activity was found in the fractions of free enzyme and high molecular complex depending on duration of ischemia.

УДК 612.17+612.111.7].015.1:577.152.633].019:599.323.4

*В. П. Мирошниченко, О. Г. Бусыгина, И. С. Северина*

## АНАЛОГИЯ И РАЗЛИЧИЕ В СВОЙСТВАХ РАСТВОРИМЫХ ФОРМ ГУАНИЛАТЦИКЛАЗЫ СЕРДЦА И ТРОМБОЦИТОВ КРОВИ КРЫСЫ

НИИ медицинской энзимологии АМН СССР, Москва

Гуанилатциклаза — ГЦ (ГТФ-пиррофосфатлиаза циклизующая, КФ 4.6.1.2) катализирует биосинтез циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ). Необходимость детального изучения обмена цГМФ обусловлена значительной ролью этого нуклеотида в регуляции различных процессов и функциональной активности клеток органов и тканей [3]. В частности, цГМФ является одним из регуляторов сократительной активности сердца [21] и процесса агрегации и дезагрегации тромбоцитов [22].

Изменение уровня цГМФ в тканях (определяемое в основном функционированием ГЦ) не только нарушает функции клетки, но и способствует возникновению и развитию патологических состояний [9].

Фермент существует в 2 формах: растворимой и мембранно-связанной, являющихся, по-видимому, разными белками с различными механизмами регуляции [10—12]. В ткани миокарда присутствуют обе формы фермента [11], в тромбоцитах, по крайней

мере в тромбоцитах человека [6], — в основном растворимая форма ГЦ.

Ранее нами были обнаружены черты сходства и различий мембранно-связанной и растворимой форм ГЦ сердца кролика; была показана более высокая активность растворимой формы фермента и ее большая чувствительность к различным воздействиям [1]. Дальнейшие наши исследования по сопоставлению свойств растворимых ГЦ одновременно в ткани миокарда и тромбоцитах крови кролика обнаружили аналогию в изменениях активности этих ферментов на разных стадиях развития экспериментального аллергического миокарда со значительно более резко выраженными изменениями в активности ГЦ тромбоцитов [2]. Эти данные о высокой чувствительности ГЦ тромбоцитов к изменениям, происходящим в ткани миокарда при развитии патологического процесса, указали на целесообразность дальнейших исследований по сопоставлению свойств растворимых форм фер-

мента в сердце и тромбоцитах экспериментальных животных. Подобные исследования важны как в теоретическом плане, так и для практической медицины, поскольку тромбоциты, помимо своей важной роли в гемостазе, являются также удобным объектом для выявления возникающих при патологии нарушений в ферментативных процессах в органах и тканях, а следовательно, и для характеристики развития и течения патологического процесса. К тому же тромбоциты характеризуются высокой активностью ГЦ [2, 6].

Известно, что активность растворимых форм фермента регулируется окислительно-восстановительными соединениями, однако четкого представления о механизме этого процесса пока нет. Целью настоящей работы было сопоставление свойств растворимых форм ГЦ сердца и тромбоцитов крови крысы при изучении влияния на активность ферментов окислительно-восстановительных агентов: дитиотреитола (ДТТ) и нитропруссид натрия. Последний содержит свободно-радикальную группу NO и является лекарственным препаратом, обладающим сосудорасширяющим свойством.

### Методика

Экспериментальными животными служили беспородные крысы-самцы (15 особей); животных декалцитировали.

Растворимую форму ГЦ из сердечной мышцы выделяли по ранее описанной методике [2].

Для изучения свойств ГЦ тромбоцитов кровь крысы (5 мл) собирали в пробирку, содержащую в качестве антикоагулянта 0,2 М раствор этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в 0,9 % растворе NaCl, pH 7,4, в соотношении с кровью 1:10. Тромбоциты выделяли при комнатной температуре по ранее описанному методу с некоторыми модификациями. Для получения богатой тромбоцитами плазмы (БТП) цельную кровь разводили 20 мМ трис-НСI-буфером в 0,9 % растворе NaCl, pH 7,4

(буфер А), в соотношении 1:1. БТП наплавали на Ficoll-Paque («Pharmacia», Швеция) в соотношении 1:1 и центрифугировали 20 мин при 300 g. Образовавшееся на границе раздела фаз «тромбоцитарное кольцо» отбирали, суспендировали в равном объеме буфера А и центрифугировали 15 мин при 1400 g. Осадок ресуспендировали в 1 мл буфера А и центрифугировали 10 мин при 1400 g; процедуру промывания проводили дважды. Окончательный осадок тромбоцитов ресуспендировали при 4 °С в 1 мл 20 мМ трис-НСI-буфера, pH 7,6, содержащего или не содержащего ДТТ в зависимости от задач эксперимента. Проводили микроскопический контроль чистоты выделенных тромбоцитов; присутствие других форменных элементов крови не обнаружено. Тромбоциты разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе MSE 5-78 (Великобритания) в течение 20 с (2 раза по 10 с) при амплитуде 16 мкм, при 4—6 °С. Полученную суспензию центрифугировали 60 мин при 105 000 g; надосадочную жидкость использовали в качестве препарата гуанилатциклазы.

Активность фермента определяли по количеству образовавшегося цГМФ из ГТФ согласно [1]. Пробы (конечный объем 150 мкл) содержали 50 мМ трис-НСI-буфера (pH 7,6), 1 мМ ГТФ, 4 мМ MnCl<sub>2</sub> (или 4 мМ MgCl<sub>2</sub>), 4 мМ креатинфосфата, 20 мкг (120—160 ед.), креатинфосфокиназы («Reanal», ВНР), 10 мМ теофиллина, препарат ГЦ (супернатант 105 000 g) сердца крысы — 20 мкг белка, тромбоцитов — 10 мкг. Реакцию начинали добавлением субстрата. Пробы инкубировали при 37 °С в течение 10 мин. Реакцию останавливали нагреванием проб в кипящей водяной бане в течение 2 мин с последующим охлаждением в ледяной бане. После отделения денатурированного белка центрифугированием (10 мин при 1500 g) в полученной надосадочной жидкости определяли содержание образовавшегося цГМФ при помощи наборов реактивов (cGMP Ria kit; «Amersham», Великобритания) по прилагаемой методике. При исследовании влияния ДТТ, нитропруссид натрия, гемоглобина и гемина-НСI перечисленные соединения вносили в инкубационную среду (по отдельности или вместе, в зависимости от задач эксперимента) в указанных концентрациях и преинкубировали с ферментом в течение 45 мин (при 4 °С) до добавления субстрата. Гемин-НСI до внесения в пробу растворяли в 0,1 н. NaOH с последующим восстановлением образовавшегося гематина ДТТ (1,5·10<sup>-3</sup> М). Белок определяли по методу Лоури [18]. Использовали: ГТФ-динатриевую соль («Fluka», Швейцария), ДТТ («Serva», ФРГ), нитропруссид натрия («Chemapol», ЧССР); остальные реактивы и соли — фирмы «Sigma» (США).

Активность растворимых форм гуанилатциклазы сердца и тромбоцитов крови крысы

Объект исследования	Активность ГЦ, пкмоль цГМФ/(мин·мг)		Активность ГЦ в тромбоцитах	Активность ГЦ в сердце
	Mn <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>		
Тромбоциты	75,4±7,3 (5)	15,2±3,2 (8)	3,2	6,6
Сердце	23,8±2,8 (8)	2,3±0,15 (9)		

Примечание. В скобках — число экспериментов.

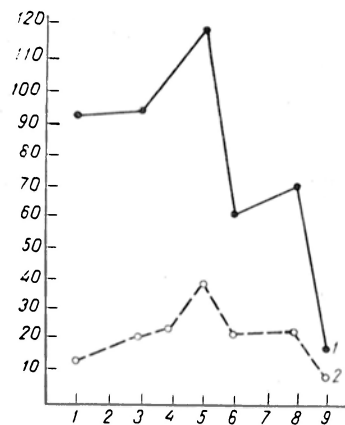


Рис. 1. Активность ГЦ (в присутствии  $Mn^{2+}$ ) тромбоцитов (1) и сердца (2) разных крыс. По оси абсцисс — номер опыта; по оси ординат — количество образовавшегося цГМФ (в пкмоль в 1 мин на 1 мг белка). Здесь и на рис. 2—5: состав проб и условия опыта описаны в разделе «Методика»

### Результаты исследований

В таблице сопоставлены активности растворимых форм ГЦ сердца и тромбоцитов крови крысы. Величины активности фермента в сердечной мышце, определенные в присутствии  $Mn^{2+}$  или  $Mg^{2+}$  (см. таблицу), соответствуют тем результатам, которые получены ранее на этой ткани животных [5].

Из таблицы видно, что активность ГЦ в сердце ниже, чем в тромбоцитах, в 3 раза при использовании в качестве кофактора  $Mn^{2+}$  и в 6 раз — при использовании  $Mg^{2+}$ .

В присутствии  $Mn^{2+}$  активность ГЦ в тромбоцитах выше, чем в сердечной мышце у всех животных (рис. 1).

Из таблицы также видно, что активность ГЦ в присутствии  $Mn^{2+}$  выше, чем при использовании  $Mg^{2+}$ . Для сердечной мышцы это отноше-

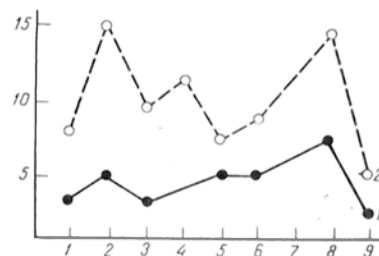


Рис. 2. Отношение величин активности ГЦ (измеренной в присутствии  $Mn^{2+}$ ) к активности ГЦ (с  $Mg^{2+}$ ) для фермента сердца (1) и тромбоцитов (2) разных крыс.

По оси абсцисс — номер опыта; по оси ординат — отношение величин активности.

ние равно в среднем 10, для тромбоцитов — 5.

Рис. 2 показывает, что эти соотношения наблюдаются у всех использованных животных.

Восстанавливающий агент ДТТ при внесении в пробы повышает активность гуанилатциклазы (в присутствии  $Mg^{2+}$ ) как ткани миокарда, так и тромбоцитов крысы.

Представленные на рис. 3 данные показывают, что стимулирующее действие ДТТ наблюдается в интервале концентраций последнего в пробе от  $2 \cdot 10^{-5}$  до  $2 \cdot 10^{-2}$  М. Максимальный стимулирующий эффект ДТТ (в среднем для ГЦ сердца в 3 раза, тромбоцитов — в 4,5 раза) проявляется при его концентрации  $2 \cdot 10^{-3}$  М.

Для ГЦ сердечной мышцы величина базальной активности фермента (с  $Mg^{2+}$ ) и степень активации его ДТТ не зависит от того, присутствует ДТТ при гомогенизации ткани миокарда или его добавляют сразу в инкубационную среду (данные не приводятся). В опытах же с ГЦ тромбоцитов величина базальной активно-

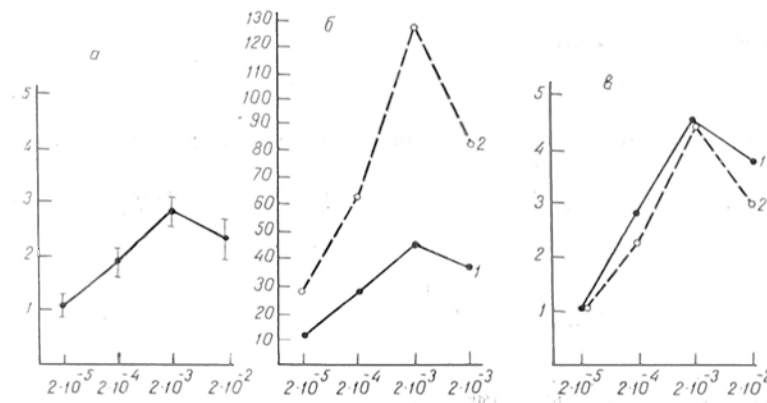


Рис. 3. Влияние ДТТ на активность ГЦ (измеренной в присутствии  $Mg^{2+}$ ) сердца (а) и тромбоцитов (б, в) крысы.

По оси абсцисс — концентрация (в М) ДТТ в пробе; по оси ординат — степень активации ГЦ ДТТ (а, б) и активность ГЦ (в пкмоль цГМФ в 1 мин на 1 мг белка; в). Озвучивание суспензии тромбоцитов: 1 — без ДТТ, 2 — в присутствии ДТТ ( $1.5 \cdot 10^{-4}$  М).

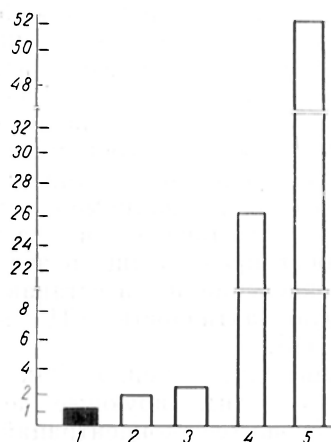


Рис. 4. Влияние ДТТ и гемоглобина на активацию ГЦ сердца крысы нитропруссидом натрия.

По вертикали: кратность стимуляции ГЦ по отношению к базальной активности (измеренной в присутствии  $Mg^{2+}$ ), принятой за 1; по горизонтали: 1 — базальная активность, 2 — активность в присутствии: ДТТ ( $2 \cdot 10^{-4}$  М); 3 — нитропруссид натрия ( $1 \cdot 10^{-4}$  М), 4 — нитропруссид натрия ( $1 \cdot 10^{-4}$  М) + ДТТ ( $2 \cdot 10^{-4}$  М), 5 — нитропруссид натрия ( $1 \cdot 10^{-4}$  М) + ДТТ ( $2 \cdot 10^{-4}$  М) + гемоглобин (3 мкг).

сти значительно изменяется в зависимости от условий озвучивания, т.е. от того, присутствует ли при этом ДТТ.

Как видно на рис. 3, озвучивание тромбоцитов крысы в присутствии ДТТ ( $1,5 \cdot 10^{-4}$  М) повышает базальную активность ГЦ в 2,8 раза, что соответствует кратности активации ГЦ, полученной при добавлении ДТТ в аналогичной концентрации ( $2 \cdot 10^{-4}$  М) непосредственно в инкубационную среду (см. рис. 3, в). Степень же активации фермента тромбоцитов за счет дополнительного внесения в пробы ДТТ (в увеличивающихся концентрациях) не зависит от условий озвучивания и она одинакова при использовании суспензии тромбоцитов, озвученной как в присутствии  $1,5 \cdot 10^{-4}$  М ДТТ, так и без него (см. рис. 3, в).

При изучении регуляции ГЦ нитропруссидом натрия в качестве катиона металла использовали  $Mg^{2+}$ , так как в его присутствии стимулирующий эффект нитропруссиды выражен сильнее, чем в присутствии  $Mn^{2+}$ . В опытах с ГЦ сердечной мышцы крысы нитропруссид, добавленный в инкубационную среду в конечной концентрации  $1 \cdot 10^{-4}$  М, лишь незначительно (в 2 раза) активует фермент (рис. 4).

Попытка увеличить эту степень активации изменением концентрации нитропруссиды не увенчалась успехом. Значительно повысить активацию ГЦ сердечной мышцы нитропруссидом удалось в результате преинкубации фермента в течение 45 мин (при  $4^\circ C$ ) с  $1 \cdot 10^{-4}$  М нитропруссидом в присутствии  $2 \cdot 10^{-4}$  М ДТТ. В этих условиях активность ГЦ возрастает в 26 раз по сравнению с базальной активностью и в 14 раз по сравнению с активностью фермента, измеренной с  $Mg^{2+}$ , в присутствии  $2 \cdot 10^{-4}$  М ДТТ (см. рис. 4). Дополнительное повышение активируемости ГЦ ткани миокарда крысы нитропруссидом ( $1 \cdot 10^{-4}$  М) в присутствии ДТТ ( $2 \cdot 10^{-4}$  М) было достигнуто внесением в среду преинкубации гемоглобина (3 мкг). В этих условиях активность ГЦ возрастает в 52 раза по сравнению с базальной активностью и в 28 раз по сравнению с активностью фермента в присутствии  $2 \cdot 10^{-4}$  М ДТТ (см. рис. 4).

Таким образом, максимальное стимулирующее действие  $1 \cdot 10^{-4}$  М нитропруссиды на ГЦ ткани миокарда крысы было достигнуто в присутствии ДТТ ( $2 \cdot 10^{-4}$  М) и гемоглобина (3 мкг).

В опытах с ГЦ тромбоцитов крысы не удалось выявить активации фермента нитропруссидом (рис. 5). Нитропруссид натрия в концентрациях  $1 \cdot 10^{-5}$  —  $1 \cdot 10^{-4}$  М не оказывает влияния на фермент ни сам по себе, ни при совместном добавлении с

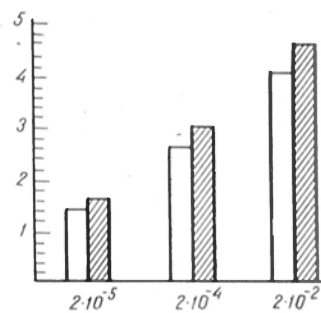


Рис. 5. Влияние нитропруссиды натрия на активность ГЦ (в присутствии  $Mg^{2+}$ ) тромбоцитов крысы на фоне различных концентраций ДТТ.

Светлые столбики — без нитропруссиды натрия; заштрихованные — в присутствии нитропруссиды натрия ( $1 \cdot 10^{-4}$  М). По вертикали — кратность активации ГЦ по отношению к базальной (принятой за 1); по горизонтали — концентрация ДТТ в пробах (в М).

ДТТ в интервале концентраций последнего от  $2 \cdot 10^{-5}$  до  $2 \cdot 10^{-2}$  М и преникубации с ферментом в течение 45 мин (при  $4^\circ\text{C}$ ).

Увеличение же концентрации нитропрусида в пробе до  $1 \cdot 10^{-3}$  —  $1 \cdot 10^{-2}$  М приводит к значительному снижению активности ГЦ. В ряде опытов при внесении в пробу вместо 10 мкг белка 4—5 мкг наблюдается инактивация фермента даже при добавлении нитропрусида в концентрации  $1 \cdot 10^{-4}$  М (данные не приводятся). Поскольку активирующее действие NO-соединений на ГЦ связано с присутствием в ферменте гема (являющегося протетической группой ГЦ), была проведена попытка выявить стимулирующее действие нитропрусида при дополнительном внесении в пробу гемоглобина (3 и 9 мкг) и восстановленного ДТТ гематина (в количестве 1 и 5 мкг). В обоих случаях не наблюдалось изменений в величинах базальной активности, но и активация ГЦ тромбоцитов крысы нитропрусидом натрия в использованных условиях также отсутствовала (данные не приводятся).

#### Обсуждение результатов

Известно, что белковая молекула ГЦ характеризуется наличием лабильных SH-групп, легкоокисляемых при действии различных окислителей (кислород воздуха, нитросоединения, свободные радикалы и др.), что сопровождается активацией фермента [7]. Известно, что активность ГЦ во всех органах и тканях в присутствии  $\text{Mn}^{2+}$  выше, чем при использовании  $\text{Mg}^{2+}$ , что подтверждается и в наших опытах (см. таблицу, а также [4]).  $\text{Mn}^{2+}$  в отличие от  $\text{Mg}^{2+}$  является металлом с переменной валентностью, и потому более высокая активность ГЦ с  $\text{Mn}^{2+}$  (см. таблицу) может быть обусловлена дополнительным окисляющим и потому активирующим влиянием  $\text{Mn}^{2+}$  на фермент [17]. В связи с этим активность ГЦ с  $\text{Mn}^{2+}$  следует считать стимулированной, а активность с  $\text{Mg}^{2+}$  — истинной базальной [4]. Активация ГЦ при окислении лабильных SH-групп фермента — обратимый процесс [19].

Добавление восстановителей — снимает активацию и возвращает сти-

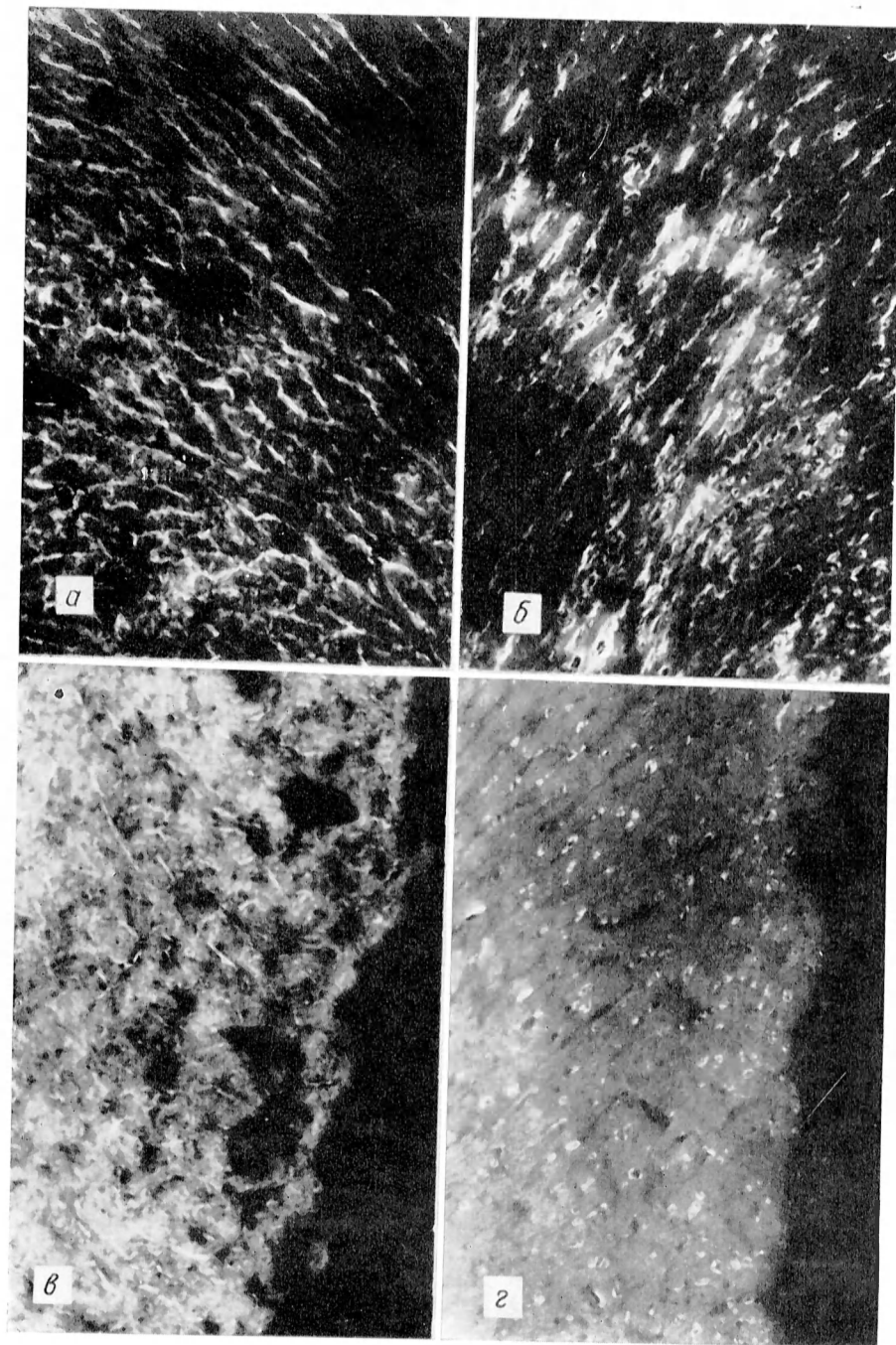
мулированную активность к базальной. Дальнейшее восстановление ингибирует фермент. Более длительное действие окислителей или использование их в высоких концентрациях приводит к более глубокому окислению фермента и его инактивации [8]. Восстановители, например тиолсодержащие соединения, в частности ДТТ, могут предотвращать это избыточное окисление и восстанавливать сниженную активность ГЦ до базальной [5].

По-видимому, именно так надо объяснить стимулирующее действие увеличивающихся концентраций ДТТ на активность ГЦ сердечной мышцы (см. рис. 3, а) и тромбоцитов (см. рис. 3, б) крысы. В аналогичных опытах с тромбоцитами человека ДТТ в концентрации  $2 \cdot 10^{-3}$  М не стимулировал, а наоборот, ингибировал базальную активность ГЦ примерно на 50 % [4]. Следовательно, можно предположить, что по сравнению с ГЦ тромбоцитов человека использованные в наших опытах растворимые формы ГЦ тромбоцитов и ткани миокарда крысы содержат фермент в большей степени окисленности. Значение ДТТ как агента, предотвращающего ГЦ от избыточного окисления и связанной с этим инактивацией фермента, наглядно показывают данные по сопоставлению величин базальной активности ГЦ при использовании суспензии тромбоцитов крыс, озвученной в присутствии  $1,5 \cdot 10^{-4}$  М ДТТ и без него (см. рис. 3, б). Сопоставление кривых 1 и 2 на рис. 3, б показывает, что контакт ГЦ с ДТТ особенно важен именно в момент разрушения клеток ультразвуком, когда фермент выходит в среду. Другими словами, степень окисленности фермента, а следовательно, и величина базальной активности и ее регуляция определяются концентрацией ДТТ, присутствующего в среде при озвучивании, а степень активации фермента за счет ДТТ, дополнительно вносимого в пробы, уже не зависит от условий озвучивания.

Полученные нами результаты по активации ГЦ ткани миокарда крысы нитропрусидом натрия полностью согласуются с общепринятым в настоящее время механизмом стимулирующего влияния NO-содержащих соединений на активность ГЦ.







Распределение КА-содержащих структур в сердце крысы после отмены этанола. Реакция с глюксальевой кислотой.

*а* — КА-содержащие нервные волокна в сердце интактной крысы.  $\times 250$ ; *б* — мелкие очаги диффузии КА из нервных волокон в кардиомиоциты через 2–6 ч после отмены этанола.  $\times 250$ ; *в* — множественные очаги экстранейронально расположенных КА-содержащих структур (3-и сутки отмены этанола).  $\times 250$ ; *г* — появление КА-содержащих нервных волокон (7-е сутки отмены этанола).  $\times 250$ .

Согласно современным представлениям, истинным активатором фермента является комплекс NO—гем [20]. Последний образуется при взаимодействии свободно-радикальной группы NO нитрозосоединений (в том числе и нитропруссидом) с гемом ГЦ. В результате происходящих при этом конформационных изменений [13] структура образовавшегося комплекса нитрозил—гем приближается к структуре протопорфирина IX — одного из наиболее сильных активаторов ГЦ [4].

Значительное повышение активности ГЦ крысы нитропруссидом натрия ( $1 \cdot 10^{-4}$  М) при добавлении в пробу ДТТ ( $2 \cdot 10^{-4}$  М) и предварительной 45-минутной инкубации с ферментом (при  $4^\circ\text{C}$ , см. рис. 4), подтверждает роль тиолов в стимуляции активности ГЦ NO-соединениями.

Согласно [15], нитропруссид (или другие нитрозосоединения) легко взаимодействуют с тиолами с образованием соответствующих нитрозотиолов. Последние являются нестойкими соединениями, быстро распадаются с образованием свободно-радикальной группы NO и таким образом способствуют активации ГЦ, что и наблюдается в наших опытах (см. рис. 4). Дополнительное стимулирование ГЦ нитропруссидом (в присутствии ДТТ) при внесении в пробу гемоглобина (см. рис. 4), по-видимому, обусловлено образованием дополнительных количеств комплекса нитрозил—гем за счет гема гемоглобина и NO нитропруссидом и усиления стимуляции гуанилатциклазы [16].

Особый интерес представляет неудавшаяся пока попытка выявить стимуляцию нитропруссидом активности ГЦ тромбоцитов крысы (см. рис. 5). Одной из возможных причин этого могла бы быть значительно более высокая степень окисленности тромбоцитарного фермента по сравнению с ферментом сердца крысы, с которым удалось достигнуть достаточно высокой активации ГЦ (см. рис. 4.) С таким предположением согласуются наши данные о том, что более высокие, чем  $1 \cdot 10^{-4}$  М, концентрации нитропруссидом (до  $1 \cdot 10^{-2}$  М) не изменяют степени активации ГЦ сердца (2-кратной в присутствии  $1 \cdot 10^{-4}$  М нитропруссидом), но ингибируют активность ГЦ тромбоцитов,

предположительно находящейся в большей степени окисленности.

В то же время, поскольку стимулирующий эффект нитропруссидом изучался на фоне увеличивающихся концентраций ДТТ, можно было бы ожидать хотя бы незначительной стимуляции ГЦ тромбоцитов нитропруссидом при высоких концентрациях ДТТ. Однако и этого не было обнаружено. Допущение, что ГЦ тромбоцитов крысы в отличие от ГЦ сердца является гемдефицитной, также не согласуется с нашими данными о полном отсутствии хотя бы тенденции к стимуляции активности фермента при дополнительном внесении в пробу, содержащую нитропруссид ( $1 \cdot 10^{-4}$  М) и ДТТ ( $2 \cdot 10^{-4}$  М) гемоглобина (3 и 9 мкг) или восстановленного ДТТ гематина (1 и 5 мкг).

Таким образом, вопрос о степени окисленности и возможной гемдефицитности ГЦ тромбоцитов крысы, а также о причине отсутствия стимуляции этого фермента нитропруссидом натрия остается открытым.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Мирошниценко В. П., Крюкова Г. В., Зубовская А. М. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 2. — С. 109—113.
2. Мирошниценко В. П., Рясосова И. К., Чаракчян И. А. и др. // Там же. — 1988. — № 2. — С. 34—38.
3. Северина И. С. // Вестн. АМН СССР. — 1987. — № 7. — С. 41—47.
4. Чирков Ю. Ю., Тыщук И. А., Белушкина Н. Н., Северина И. С. // Биохимия. — 1987. — Т. 52. — С. 956—963.
5. Brandwein H. J., Lewicki J. A., Murad F. // J. biol. Chem. — 1981. — Vol. 256. — P. 2958—2962.
6. Braughler J. M. // Biochim. biophys. Acta. — 1980. — Vol. 616. — P. 94—104.
7. Braughler J. M. // Biochem. Pharmacol. — 1983. — Vol. 32. — P. 811—818.
8. Braughler J. M., Mittal C. K., Murad F. // J. biol. Chem. — 1979. — Vol. 254. — P. 12450—12454.
9. Carpentieri B., Munguett J., Gardner F. H. // Blood. — 1981. — Vol. 57. — P. 975—978.
10. El Deib M. M. R., Parker C. D., White A. A. // Biochim. biophys. Acta. — 1987. — Vol. 928. — P. 83—91.
11. Garbers D. L., Radany E. W. // Advanc. Cycl. Nucl. Res. — 1981. — Vol. 14. — P. 229—239.
12. Ignarro L. J. // Ann. Rev. Pharmacol. — 1985. — Vol. 25. — P. 171—191.
13. Ignarro L. J., Wood K. S., Wolin M. S. // Advanc. Cycl. Nucl. Res. — 1984. — Vol. 17. — P. 267—273.

14. Ignarro L. J., Wood K. S., Wolin M. S. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1982. — Vol. 79. — P. 2870—2873.
15. Ignarro L. J., Lipton H., Edwards J. C. et al. // J. Pharmacol. exp. Ther. — 1981. — Vol. 218. — P. 739—749.
16. Ignarro L. J., Adams J. B., Horwitz P. M., Wood K. S. // J. biol. Chem. — 1986. — Vol. 261. — P. 4997—5002.
17. Katsuki S., Arnold W. P., Mittal C. K., Murad F. // J. Cycl. Nucl. Res. — 1977. — Vol. 3. — P. 1829—1833.
18. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 93. — P. 265—275.
19. Mittal C. K., Kimura H., Murad F. // Ibid. — 1977. — Vol. 252. — P. 4384—4390.
20. Ohlstein E. H., Wood K. S., Ignarro L. J. // Arch. Biochem. — 1982. — Vol. 208. — P. 75—86.
21. Opie H. L. // Cardiovasc. Res. — 1982. — Vol. 16. — P. 483—507.
22. Steer M. L., Salzman E. W. // Advanc. Cycl. Nucl. Res. — 1980. — Vol. 12. — P. 71—93.

Поступила 22.02.88

УДК 616.74-008.931:577.152.111]-092.9-07

*А. Е. Алексеева, О. Г. Гребенищикова, Т. А. Потапкина,  
В. Н. Прозоровский*

### АНТИГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ N-КОНЦЕВОГО ПЕПТИДА ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ МЫШЦЫ СВИНЬИ, ПОЛУЧЕННОГО ПРИ БРОМЦИАНОВОМ РАСЩЕПЛЕНИИ

НИИ медицинской энзимологии АМН СССР, Москва

Лактатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.27) (ЛДГ) — гликолитический фермент, обратимо катализирующий окисление L-лактата в пировиноградную кислоту. Для ЛДГ в качестве промежуточного акцептора водорода требуется кофермент никотинамидадениннуклеотид (НАД).

ЛДГ — тетрамер с мол. массой 144 000 Д [18], представленный двумя типами субъединиц — М и Н. Органы и ткани человека и животных содержат 5 изоферментов ЛДГ (ЛДГ-1 — ЛДГ-5), которые представляют собой комбинации субъединиц (М и Н) фермента — гомотетрамеры и 3 гибридные формы — МН<sub>3</sub>, М<sub>2</sub>Н<sub>2</sub> и М<sub>3</sub>Н [4]. Изоферменты М<sub>4</sub> (ЛДГ-5) в основном содержатся в скелетной мышце, Н<sub>4</sub> (ЛДГ-1) — в тканях сердечной мышцы [10].

### SIMILARITY AND VARIATIONS IN PROPERTIES OF THE GUANYLATE CYCLASE SOLUBLE FORMS FROM RAT HEART AND THROMBOCYTES

*V. M. Miroshnichenko, O. G. Busygina, I. S. Severina*

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

Activity of guanylate cyclase in rat thrombocytes exceeded the enzymatic activity in heart tissue 3.2- and 6.6-fold, if Mn<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> were used as cofactors, respectively. Dithiothreitol (DTT) at concentrations 2·10<sup>-5</sup> M-2·10<sup>-2</sup> M activated guanylate cyclase both in rat heart and thrombocytes, while 2·10<sup>-3</sup> M of DTT exhibited the maximal stimulating effect: 3-fold in heart tissue and 4.5-fold in thrombocytes. Only slight 2-fold activation of guanylate cyclase was observed in myocardium in presence of 1·10<sup>-4</sup> M nitroprusside, whereas this effect was distinctly augmented up to 26-fold after preincubation of the enzyme with 1·10<sup>-4</sup> M of nitroprusside within 45 min at 4° in presence of 2·10<sup>-4</sup> M DTT. The stimulating effect of nitroprusside was increased up to 52-fold after addition of 3 μg hemoglobin into the sample. Nitroprusside did not show any stimulating effect on the guanylate cyclase activity in rat thrombocytes under experimental conditions used. Possible causes of the phenomenon observed are discussed.

ферментов ЛДГ свиньи отмечено 75 % идентичности аминокислотной последовательности, основные различия в структуре (аминокислотные замены) приходится на N-концевой участок (1—20 аминокислоты) — 60 % и C-концевой (260—332) — 47 % [20]. На участке, представляющем активные домены фермента, отмечены 1 или 2 замены аминокислот в последовательности 20 аминокислот и более; основная часть N- и C-концевых участков ЛДГ-5 располагается на поверхности тетрамерной молекулы [15].

Каждая антигенная молекула имеет в своем составе участки определенного строения — антигенные детерминанты, которые и обеспечивают ее способность вызывать специфические иммунологические реакции. Показана [23] возможность индуцировать синтез антител, специфически направленных на уникальную ограниченную область в макромолекуле и в то же время на нативный белок: получены антипептидные антитела к «петлевому пептиду» из лизоцима, которые реагировали и с нативным белком; эти антитела направлены против конформационно-зависимых детерминант.

В настоящее время получение антипептидных антител на антигенные детерминанты белковых молекул нашло широкое применение, особенно при создании искусственных вакцин. Молекула антигена, как правило, несет несколько антигенных детерминант. Участки в структурах белков, богатые гидрофильными аминокислотными остатками, локализуются на поверхности белковой молекулы [16] и обычно являются антигенными детерминантами. Так как N-концевой участок различных изоформ ЛДГ отличается по структуре в большей степени, чем остальная часть молекулы, и достаточно большое количество гидрофильных аминокислот находится в этой области, можно предположить, что этот фрагмент является антигенной детерминантой.

Целью настоящей работы является исследование антигенных свойств N-концевого района ЛДГ-5 мышцы свиньи, характеризующегося значительными отличиями по первичной структуре от ЛДГ-1 именно в этом районе, получение конъюгатов к фрагменту из этого района, изучение их

антигенных свойств, а в дальнейшем получение антипептидных антител и их использование для избирательного связывания различных изоферментов ЛДГ человека. Были исследованы фрагменты ЛДГ-5 мышцы свиньи, полученные при расщеплении бромцианом по остаткам метионина, изучены их антигенные свойства с антисывороткой и специфическими антителами к нативной ЛДГ-5 мышцы свиньи.

### Методика

Выделение ЛДГ-5 ( $M_4$ ) из коммерческого препарата ЛДГ проводили фракционированием на колонке (2,5×45 см) с ДЕАЕ-целлюлозой-52, уравновешенной 0,005 М трис-НСl-буфером, рН 7,6. Скорость элюции 40 мл/ч. Содержание белка во фракциях определяли по поглощению при 280 нм (Uvicord III, LKB, Швеция).

Анализ гомогенности ЛДГ-5, фрагментов бромцианового расщепления проводили электрофорезом в 20 % полиакриламидном геле (ПААГ) в трис-глициновом буфере, рН 8,3, на пластинках на приборе GE-2/4 (Pharmacia, Швеция). Электрофорез проводили в присутствии 0,1 % натрия додецилсульфата (ДС) и 0,1 % дитиотрептола («Serva», ФРГ). Белки окрашивали 0,25 % кумасси яркоголубым G-250 («Serva», ФРГ) в смеси изопропанол — уксусная кислота ледяная — вода (5 : 4 : 1).

Карбоксиметилирование ЛДГ-5 проводили по методике, описанной ранее [22]. Расщепление ЛДГ-5 бромцианом проводили по методу [13]. ЛДГ-5 (500 мг) предварительно карбоксиметилировали, растворяли в 40 мл 70 % муравьиной кислоты, при перемешивании добавляли 2,5 г кристаллического бромциана (200-кратный молярный избыток), растворенного в 30 мл 70 % муравьиной кислоты, оставляли при 25 °С 24 ч. Смесь разбавляли водой в 10 раз и лиофилизировали до полного удаления кислоты.

Разделение продуктов бромцианового расщепления карбоксиметилированной ЛДГ-5 проводили геле-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50 (fine) (2,5×100 см), уравновешенной 0,05 М трис-НСl-буфером, рН 8,1, с 8 М мочевиной, элюирование проводили тем же буфером со скоростью 10 мл/ч. Содержание пептидов в элюате определяли по поглощению при 280 нм (Uvicord III, LKB, Швеция). Дальнейшую очистку проводили рехроматографией.

Анализ N-концевых аминокислот в пептидах проводили дансильным (ДНС)-методом [11]. ДНС-аминокислоты идентифицировали методом тонкослойной хроматографии на пластинках с полиамидом [12] в 4 системах растворителей [19]. Идентификацию ДНС-аминокислот осуществляли также методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе «Altex», модель 324 («Beckman», США). Разделение ДНС-аминокислот проводили на колонке Ultrasphere ODS, 5 мкм (10×250 мм) с помощью градиентного элюирования двухбуферной системой [1].

Для анализа аминокислотного состава пробы фрагментов (300 мкг) гидролизировали в

запаянных под вакуумом ампулах с 6 н. HCl, содержащей 0,01 %  $\beta$ -меркаптоэтанол, при 110°C в течение 24 ч. Содержание аминокислот в гидролизатах определяли на аминокислотном анализаторе (ЛКВ, модель 3201).

Энзимофорез проводили на пластинках (14×8 см) с 1 % агарозой в вероналовом буфере, pH 8,55 [3]. Толщина слоя агарозы 1,5 см, сила тока 50 мА на пластинку. Для выявления изоферментов ЛДГ использовали метод тетразольного окрашивания [14].

Для получения антисыворотки к нативной ЛДГ-5 иммунизировали кроликов-самок породы шиншилла (масса тела 2,5 кг) нативной ЛДГ-5 из мышц свиньи сначала подкожной инъекцией в бок, а затем вдоль позвоночника в 8—10 мест, вводили с полным адьювантом Фрейнда (равные объемы) с интервалом 7 дней в течение 2 мес. Кровь отбирали из ушной вены кролика через неделю после последней иммунизации, выдерживали при 37°C в течение 2 ч, центрифугировали при 3000 об/мин 10 мин. Сыворотку лиофилизировали. Определение титра антисыворотки проводили методом двойной иммунодиффузии [5].

Иммуносорбенты для выделения специфических антител к ЛДГ-5 получали на основе АН-сефарозы 4В ("Pharmacia", Швеция). Имобилизацию ЛДГ-5 на АН-сефарозе проводили ковалентным связыванием ЛДГ через глутаровый альдегид. 7 г сефарозы отмывали от консервантов согласно инструкции. Кристаллическую ЛДГ-5 (300 мг) диализовали против 0,05 М фосфатного буфера, pH 7,6, в течение 20 ч при 4°C с 3-кратной сменой буфера. После центрифугирования 50 мл раствора фермента добавляли к 25 мл геля сефарозы. После тщательного перемешивания по каплям добавляли 25 % глутаровый альдегид ("Serva", ФРГ) до конечной концентрации 2 %. Инкубацию вели 18 ч при 4°C при слабом встряхивании. Надосадочную жидкость отделяли и к гелю добавляли раствор NaBH<sub>4</sub> в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,6, до конечной концентрации 5 мг/мл. Восстановление проводили в течение 2 ч, затем гель тщательно отмывали фосфатным буфером с 0,5 NaCl, 0,2 М глицин-HCl буфером, pH 2,8, и вновь 0,05 М фосфатным буфером с NaCl.

Для выделения специфических антител к ЛДГ-5 на колонку с сорбентом (0,8×15 см) нанесли 10 мл кроличьей антисыворотки против данной изоформы фермента. Элюцию не связанного с сорбентом материала проводили 0,1 М фосфатным буфером с 0,15 М NaCl и 0,1 % тритон-X-100 со скоростью 10 мл/ч до установления исходного поглощения при 280 нм. Элюцию антител осуществляли 0,2 М глицин-HCl-буфером, pH 2,8. Собирали фракцию соответственно пику поглощения при 280 нм (Uvicord III, ЛКВ, Швеция). pH полученной фракции доводили до 7,0 добавлением 1 М раствора трис-основания, лиофилизировали, хранили при 0°C. Перед использованием антитела диализовали против соответствующего буфера.

При твердофазном иммуноферментном анализе (ИФА) постановку теста Элиса осуществляли в 96-луночных микроплатах ("Titertek", Великобритания, и "Dunatck", США). Для оценки уровня антител использовали диагностические антитела против иммуноглобулина кролика, меченные пероксидазой (ИЭМ им. Н. Ф. Гамален). В качестве субстрата исполь-

зовали о-фенилендиамин (BDH, Англия). Имобилизацию антигена (ЛДГ) на твердой фазе проводили в 0,01 М растворе Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 9,4, в объеме 200 мкл при 4°C в течение ночи. Несвязавшийся антиген удаляли промытием дистиллированной водой, а затем 0,01 М фосфатным буфером, pH 7,4, с 0,1 М NaCl и 0,05 % тритон-X-100 (ТФБ). Антисыворотку к нативной ЛДГ или специфические антитела, растворенные в ТФБ, смешивали с различными концентрациями тестируемого фрагмента, инкубировали в пробирках при 37°C в течение 2,5 ч, 200 мкл смеси вносили в лунки платы с сорбированной ЛДГ, инкубировали при 37°C 2,5 ч, отмывали, как указано выше, и добавляли 200 мкл раствора (1 мкг/мл) связанных с пероксидазой диагностических антител. После инкубации при 37°C в течение 2,5 ч отмывали от избытка антител и добавляли 200 мкл субстратной смеси (0,01 % спиртовой раствор о-фенилендиамина, 0,06 % раствор H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в 0,05 М Na-цитратном буфере, pH 4,8). Через 30—40 мин реакцию останавливали добавлением 50 % раствора H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Количество продукта реакции в каждой лунке определяли спектрофотометрически при 490 нм на спектрофотометре "Uniscam" SP-800 (Англия).

Конъюгат N-концевого пептида ЛДГ-5 мышцы свиньи получали связыванием пептида с высокомолекулярным белком-носителем бычьим сывороточным альбумином (БСА) с помощью глутарового альдегида при молярном соотношении пептид—БСА 10:1 [6]. 10 мг БСА ("Serva", ФРГ) растворяли в 10 мл 0,15 М Na-фосфатного буфера, pH 7,35, добавляли 25 % глутаровый альдегид (по каплям) до конечной концентрации 1 %, реакцию вели при постоянном помешивании в течение ночи и останавливали добавлением NaBH<sub>4</sub> до конечной концентрации 10 мг/мл. Пробы инкубировали в течение 1 ч и диализовали против 0,02 М аммонийно-ацетатного буфера, pH 7,2, в течение суток и лиофилизировали.

## Результаты и обсуждение

ЛДГ-5 выделяли из коммерческого кристаллического препарата ЛДГ мышцы свиньи («Rcanal», Венгрия) фракционированием на колонке (2,5×40 см) с ДЕАЕ-целлюлозой-52. Предварительно ЛДГ (700 мг) диализовали против 0,005 М трис-солянокислого буфера, pH 7,6, в течение 36 ч и наносили на колонку; элюировали тем же буфером. ЛДГ-5 (M<sub>4</sub>-изоформа) в этих условиях не связывалась с ионообменников. Кристаллическую ЛДГ-5 получали высаливанием (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Гомогенность полученной изоформы ЛДГ проверяли электрофорезом в 20 % ПААГ, в 0,1 % ДС и энзимофорезом на пластинках с 1 % агарозой по окрашиванию изоферментов тетразольным реагентом (рис. 1, см. вклейку). Как видно из электрофореграммы, в полу-

ченной с ДЕАЕ-целлюлозы белковой фракции содержится гомогенная M<sub>4</sub>-изоформа ЛДГ (ЛДГ-5).

ЛДГ-5 (500 мг) предварительно карбоксиметилировали и обрабатывали бромцианом (200-кратный молярный избыток) в 70 % муравьиной кислоте при 20 °С в течение 24 ч. Гидролизат лиофилизировали из воды до полного удаления кислоты. Разделение продуктов гидролиза после бромцианового расщепления ЛДГ-5 проводили гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50 (2,5×100 см), уравновешенной 0,05 М трис-НСl-буфером, рН 8,1, с 8 М мочевиной. Получено 5 фракций пептидов (CN-I — CN-V), соответственно пикам поглощения при 280 нм (рис. 2). Дополнительной рехроматографией белковых фракций на колонке с сефадексом G-50 были выделены из соответствующих фракций два фрагмента, обозначенные как CN-II и CN-IV. Данные электрофореза в ПААГ с 0,1 % ДС (рис. 3, см. вклейку) и анализ N-концевых аминокислот с помощью ДНС-метода показали, что фрагменты выделены в высокоочищенном состоянии.

Анализ пептидов электрофорезом в 20 % ПААГ с 0,1 % ДС со стандартными белками с известными величинами молекулярных масс позволил установить мол. массу полученных фрагментов CN-II и CN-IV ~9кД и ~4 кД соответственно (см. рис. 3). В качестве стандартных белков использовали β-цепь гистидиндекарбоксилазы (M<sub>r</sub>=8,5 кД) и β-цепь инсулина (M<sub>r</sub>=3,9 кД, Serva, ФРГ).

Из результатов анализа аминокис-

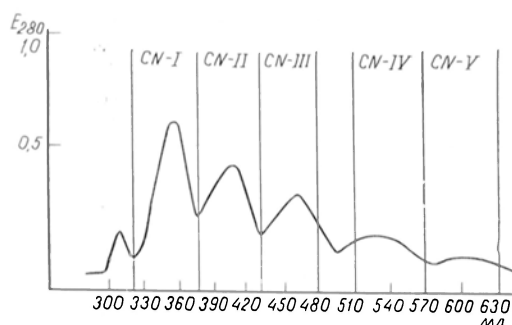


Рис. 2. Разделение продуктов гидролиза бромцианового расщепления ЛДГ-5 мышцы свиньи гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50 (2,5×100 см), уравновешенной 0,05 М трис-НСl-буфером, рН 8,1, с 8 М мочевиной.

Скорость элюции 10 мл/ч.

Таблица 1

Результаты анализа фрагментов бромцианового расщепления ЛДГ-5 мышцы свиньи

Аминокислоты	CN-IV N-концевой пептид	N-концевой пептид (1—32) теоретичес. к/м*	CN-II-пеп- тид	CN-пептид (175—264) теоретичес. к/м*
KM-Cys*	—	—	1	1
Asp	3	3	9	8
Thr	2	2	2	2
Ser	1	1	10	9
Glu	3—4	3	8	7
Pro	1	1	3	3
Gly	3	3	10	10
Ala	2	2	8	7
Val	3—4	3	7	11
Met	—	1	—	1
Ile	2	2	4	4
Leu	4	4	9	9
Tyr	—	—	2	2
Phe	—	—	—	—
His	2	3	6	6
Lys	3	3	6	6
Arg	—	—	1	1
Trp	н. опр.	—	н. опр.	4
Общее число остатков	31	32	86	89
N-концевая аминокислота	—	—	gly	gly

Примечания. Одна звездочка — KM-Cys-карбоксиметилцистеин. Значения даны как молярные отношения после гидролиза без поправки на разрушение, неполный гидролиз и загрязнения; две звездочки — по данным [20].

лотного состава фрагментов (табл. 1) следует, что количество остатков валина в полученных пептидах занижено по сравнению с теоретическим содержанием [20]. Вероятно, это связано с трудностью гидролиза соляной кислотой пептидной связи с участием валина.

При определении N-концевой аминокислоты в пептиде CN-IV ДНС-методом с идентификацией ДНС-аминокислот на пластинах с полиамидом и ВЭЖХ аминокислоту с N-конца не обнаружили, так как α-аминогруппа ацилирована [20].

Данные литературы по первичной структуре ЛДГ-5 мышцы свиньи [8, 20] и полученные нами результаты анализа N-концевых аминокислот и аминокислотного состава дают возможность заключить, что выделенный нами фрагмент CN-IV является

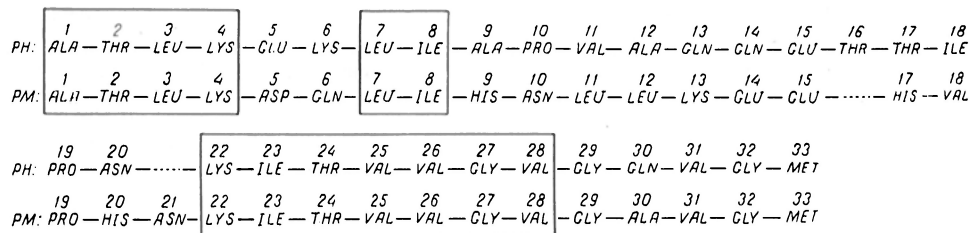


Рис. 4. N-концевая аминокислотная последовательность М и Н изоферментов ЛДГ свиньи.

N-концевым участком фермента с последовательностью аминокислот с 1—32 (рис. 4), а пептид CN-II соответствует последовательности аминокислот в структуре ЛДГ с 175—264. На рис. 4 представлена аминокислотная последовательность N-концевого участка изоферментов М<sub>4</sub> и Н<sub>4</sub> свиньи [20], где обнаруживаются значительные различия в последовательности аминокислот на участке с 1—20 аминокислоты. В большинстве случаев участки структуры, которые являются наиболее вариабельными в разных изоформах антигенов, содержат в своем составе антигенные детерминанты.

Следующим этапом работы была проверка антигенных свойств выделенного N-концевого пептида ЛДГ-5 мышцы свиньи и CN-II пептида ЛДГ мышцы свиньи. Антигенную активность (т.е. способность связываться с антителами против нативного фермента) фрагментов бромцианового расщепления ЛДГ-5 определяли с помощью метода ИФА по торможению реакции взаимодействия антигена (ЛДГ-5) с антителами к нативной ЛДГ-5 свиньи. Использовали твердофазный ИФА — по конкуренции. Количество продукта реакции определяли спектрофотометрически при 490 нм. Исследования проводили как с антисывороткой, полученной к целой молекуле фермента, так и со специфическими антителами, выделенными с помощью иммуносорбента на основе АН-сефарозы 4В (ЛДГ-5, иммобилизованная на АН-сефарозе 4В). Титр антисыворотки был равен 1:2000.

Исследованы различные разведения антисыворотки к ЛДГ-5 (1:200—1:500) и различные концентрации специфических антител к ЛДГ с разными концентрациями фрагментов (10<sup>-3</sup>—10<sup>-2</sup> мкМ). Были выбраны оптималь-

ные концентрации антител к нативному ферменту, которые в дальнейшем использовали для проверки антигенных свойств исследуемых фрагментов. Отмечено снижение взаимодействия ЛДГ-5 с антителами к нативному ферменту (снижение величины поглощения при 490 нм), если антитела предварительно инкубировали с различными концентрациями пептидов (табл. 2). Показано, что пептид CN-IV (N-концевой пептид) тормозил реакцию связывания антигена с антителами к ЛДГ-5 на 25—33 %, пептид CN-IV — на 20 %, ЛДГ ингибировала реакцию на 50—60 %. Отмечена зависимость увеличения торможения реакции связывания ЛДГ-5 с антителами с повышением концентрации исследуемых фрагментов. Фракция низкомолекулярных пептидов (CN-V) бромцианового расщепления ЛДГ-5 не взаимодействовала с антителами к нативному ферменту.

Таким образом, полученные данные позволяют сделать вывод, что выделенные при бромциановом расщепле-

Таблица 2  
Антигенные характеристики бромциановых фрагментов ЛДГ-5 мышцы свиньи

Пептиды	Ингибирующая активность
N-концевой пептид (CN-IV) (1—32)	25—35
Фрагмент CN-II (175—264)	20
ЛДГ-5 мышцы свиньи	50—60
Конъюгат-N-концевой пептид—БСА	20—25

Примечания. Результаты даны как процент торможения пептидом реакции связывания ЛДГ-5 со специфическими антителами к нативному ферменту. Реакция связывания антигена с антителами выражена величиной оптической плотности при 490 нм.



нии ЛДГ-5 N-концевой фрагмент (CN-IV) и пептид CN-II обладают антигенной активностью и что по крайней мере по одной антигенной детерминанте входит в состав этих пептидов. Фрагмент CN-II с последовательностью аминокислот (175—264) включает участок структуры, входящий в активный центр фермента [20]. Полученные результаты о его антигенных свойствах хорошо согласуются с данными об антигенности триптического пептида ЛДГ-5, выделенного из активного центра ЛДГ.

Обсуждая природу антигенных детерминант [24], число и расположение эпитопов связывают с участками структуры, отличающими друг от друга антигены различных видов [7]. Показано, что N-концевой участок актина из скелетных мышц (18 аминокислот), в котором структурные различия в разных изоформах актина наиболее выражены (50—80%), содержат в своем составе антигенную детерминанту. Антигена к этому пептиду избирательно взаимодействуют с различными изоформами актина (скелетной мышцы, сердечной гладкой мышцы, немышечными  $\beta$ - $\gamma$ -изозимами актина).

Полученные нами данные об антигенности N-концевого пептида ЛДГ-5 мышцы свиньи, который имеет большие структурные отличия (в последовательности аминокислот) в различных изоферментах ЛДГ, согласуются с приведенным выше представлением о природе антигенных детерминант.

Выделенный нами N-концевой фрагмент ЛДГ-5 мышцы свиньи в дальнейшем предполагалось использовать для получения изофермент-специфических антипептидных антител.

Антигены с мол. массой менее 5000 обладают слабой иммуногенностью [9], так как быстро выводятся из кровяного русла; небольшие пептиды могут терять вторичную структуру, обеспечивающую иммуногенность [17]. Для повышения иммуногенности низкомолекулярных пептидов их обычно конъюгируют с высокомолекулярными белками-носителями, полисахаридами или полиэлектролитами и полученные конъюгаты используют для иммунизации животных. Так как N-концевой пептид ЛДГ-5 (CN-IV) имеет молекулярную массу  $\sim 4$  кД,

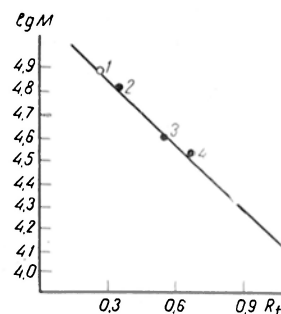


Рис. 5. Определение молекулярной массы конъюгата N-концевой пептид—БСА в 10% ПААГ с 0,1% ДС.

1 — конъюгат (N-концевой пептид—БСА); 2 — альбумин бычий сывороточный ( $M_r=67$  кД); 3 — альдолаза мышцы кролика ( $M_r=40$  кД); 4 — ЛДГ мышцы свиньи ( $M_r=35$  кД).

мы предварительно получали конъюгат этого пептида с высокомолекулярным белком-носителем БСА с помощью глutarового альдегида. Реакцию связывания проводили при молярном соотношении БСА — пептид 1:10, прекращая процесс добавлением боргидрида натрия. После диализа реакционной смеси против аммонийно-ацетатного буфера, pH 7,2, конъюгат лиофилизировали, определяли чистоту и эпитопную плотность остатков N-концевого пептида, присоединенных к молекуле БСА.

Данные электрофореза в 10% ПААГ с 0,1% ДС показали отсутствие в конъюгате нековалентно связанного пептида при наличии высокомолекулярной белковой фракции, по видимому, агрегированных молекул БСА. Эпитопную плотность остатков N-пептида, присоединенных к молекуле БСА, в конъюгате определяли по разнице аминокислотного состава конъюгата и БСА. Показано, что с одной молекулой белка-носителя связано 4—5 молекул N-концевого пептида. Молекулярная масса конъюгата, как показали данные электрофореза в 10% ПААГ с 0,1% ДС со стандартными белками, равна  $\sim 80$  кД (рис. 5), что позволяет заключить о связывании с БСА 3—4 молекул пептида. Таким образом, молярное соотношение пептид — БСА в полученном конъюгате равно 4:1.

Антигенные характеристики пептида в составе конъюгата исследовали методом ИФА, как описано выше. Пептид в конъюгате сохраняет антигенную активность, т. е. конъюгат тормо-

зит реакцию связывания ЛДГ с антителами к нативному ферменту (20—25 %) (см. табл. 2). Антигенная специфичность N-концевого пептида в конъюгате несколько снижена по сравнению со свободным пептидом, что, возможно, обусловлено модификацией ε-групп лизина в пептиде глутаровым альдегидом (данные аминокислотного анализа), так как аминокислоты лизина предварительно не защищали цитраконовым или малеиновым ангидридом [6].

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать вывод, что N-концевой район ЛДГ-5, характеризующийся значительными отличиями по первичной структуре от ЛДГ-1 именно в этом районе, содержит антигенную детерминанту. Выделенный N-концевой пептид фермента и конъюгат на основе этого пептида с БСА обладают антигенной активностью в отношении антител к нативной ЛДГ. В дальнейшем такой конъюгат может быть использован для получения изоферментспецифических антипептидных антител для избирательного связывания различных изоферментов ЛДГ человека.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеева А. Е., Прозоровский В. П., Гребенщикова О. Г. // Биохимия. — 1985. — № 8. — С. 1330—1335.
2. Вилкинсон Д. Принципы и методы диагностической энзимологии: Пер. с англ. — М., 1981. — С. 61—71.
3. Иванов И. И., Коровкин Б. Ф., Маркелов И. М. Введение в клиническую энзимологию. — М., 1974.
4. Appella E., Markert C. I. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1961. — Vol. 6. — P. 171—176.
5. Bailey G. S., Clifton N. J. // Meth. molec. Biol. — 1984. — Vol. 1. — P. 301—310.
6. Briand J. P., Muller S., Regenmortel M. H. // J. immunol. Meth. — 1985. — Vol. 78. — P. 59—69.
7. Bulinski G., Kumar S., Titani K., Hauschka S. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1983. — Vol. 80. — P. 1506—1510.
8. Cahn R. D., Kaplan N. O., Levine L., Zwilling E. // Science. — 1962. — Vol. 136. — P. 962—969.
9. Erlanger B. F. // Meth. Enzymol. — 1980. — Vol. 70. — P. 85—104.
10. Everse J., Berger R. L., Kaplan N. //

- Science. — 1970. — Vol. 168. — P. 1236—1238.
11. Gray W. R. // Meth. Enzymol. — 1972. — Vol. 25. — P. 333—337.
  12. Gray W. R., Hartley B. S. // Biochem. J. — 1963. — Vol. 89. — P. 379—382.
  13. Gross E., Wilkop B. J. // J. biol. Chem. — 1962. — Vol. 237. — P. 1856—1860.
  14. Helm H. J. // Clin. chim. Acta. — 1962. — Vol. 7. — P. 124.
  15. Holbrook J. J., Liljas A., Steindel S. J., Rossmann M. G. // The Enzymes/Ed. P. D. Boyer. — New York, 1975. — Vol. 11. — P. 192—292.
  16. Hopp T. P., Wood K. R. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1981. — Vol. 78. — P. 3824—3828.
  17. Hurn B. A., Chantler S. M. // Meth. Enzymol. — 1980. — Vol. 70. — P. 104—142.
  18. Janicke R., Knof S. // Europ. J. Biochem. — 1968. — Vol. 4. — P. 157—163.
  19. Jorntal H. // Ibid. — 1970. — Vol. 14. — P. 521—529.
  20. Kiltz H., Kell W., Griesbach M. et al. // Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. — 1977. — Bd 358. — S. 123—127.
  21. Markert C., Appella E. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1963. — Vol. 103. — P. 915.
  22. Prozorowski V., Jorntal H. // Europ. J. Biochem. — 1974. — Vol. 42. — P. 405—409.
  23. Sela M. // Bull. Inst. Pasteur. — 1974. — Vol. 72. — P. 73—86.
  24. Urbanki C. J., Margoliash E. // J. biol. Chem. — 1979. — Vol. 254. — P. 12707—12716.
  25. Wachsmuth E. D., Pfeleiderer G., Wieland T. // Biochem. Z. — 1964. — Bd 340. — S. 80—94.

Поступила 13.01.88

#### ANTIGEN ACTIVITY OF N-TERMINAL PEPTIDE FROM PIG MUSCLE LACTATE DEHYDROGENASE OBTAINED AFTER BrCN HYDROLYSIS

A. E. Alexeeva, O. G. Grebenshikova, T. A. Polapkina, V. N. Prozorovsky

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

N-terminal peptide was isolated from BrCN hydrolysate of pig muscle lactate dehydrogenase (LDH), its antigenic properties were studied using solid-phase immunoenzyme assay. N-terminal fragment containing 1-32 amino acids of LDH exhibited the antigenic activity towards antiserum and specific antibodies to native LDH<sub>5</sub> and inhibited formation of the antigen-antibody complex by 25-35 %, thus suggesting the presence of at least one antigenic determinant in the N-terminal fragment. The N-terminal peptide of LDH<sub>5</sub> conjugated with bovine albumin maintained the antigenic activity towards specific antibodies against native LDH<sub>5</sub> (inhibition by 20-25 %).

## УРОВЕНЬ цАМФ и цГМФ В КЛЕТКАХ СПОНТАННЫХ АБОРТУСОВ С ТРИСОМНЫМ И ТРИПЛОИДНЫМ КАРИОТИПОМ

Институт медицинской генетики АМН СССР, Институт ревматологии АМН СССР, Москва

В норме жизнедеятельность клетки находится под контролем различных регуляторных систем, в частности системы циклических нуклеотидов. Циклический аденозин-3',5'-монофосфат (цАМФ) и циклический гуанозин-3',5'-монофосфат (цГМФ) опосредуют воздействие на клетку ряда гормонов, факторов воспаления и других биологически активных веществ [6, 8]. Процессы клеточного деления, роста, дифференцировки клеток сопряжены с изменением содержания цАМФ [11]. Активность ферментов, обеспечивающих биосинтетический путь, подавляется при повышении уровня цАМФ, а активность ферментов катаболизма повышается [6, 7]. Таким образом, цАМФ участвует в обмене различных белков, в том числе и белков межклеточного матрикса. Показано, что увеличение содержания цАМФ в клетках приводит к снижению продукции коллагена [9]. Уровень цАМФ в клетках может изменяться при различных наследственных заболеваниях, связанных с дефектом межклеточного матрикса [3, 10]. Ранее отмечалось, что в клетках спонтанных абортусов с трисомным и триплоидным набором хромосом резко снижен синтез основного белка межклеточного матрикса — коллагена [4, 5, 13]. В свете этих данных представлялось целесообразным изучить в клетках абортного происхождения с трисомным и триплоидным кариотипом уровень внутриклеточных посредников цАМФ и цГМФ.

### Методика

В работе использованы штаммы клеток, полученные из материала 3 спонтанных абортусов с трисомией по хромосоме 7 (ЛЦЧ—162, 446, 522), спонтанного абортуса с трисомией по хромосоме 9 (ЛЦЧ—400) и 4 абортусов с триплоидным набором хромосом, в том числе 2 спонтанных абортуса (ЛЦЧ—478, 707) и 2 медицинских (ИМГ—1046, 1062) [2]. Все исследованные спонтанные и медицинские абортусы являются эмбриолеталями, и эти хромосомные аномалии практически не встречаются даже у поворожденных детей. В качестве контроля использовано 6 диплоидных штаммов, выведенных из материала медицин-

ских абортусов. Возраст абортусов с аномальным кариотипом 9—13 нед беременности, контрольных абортусов — 8—12 нед беременности. Клетки культивировали на среде МЕМ с добавлением глутамина, сыворотки крупного рогатого скота (5%) и пуповинной сыворотки человека (5%). Для проведения экспериментов по определению уровня цАМФ клетки высевали на сцинтилляционные флаконы (площадь дна 5 см<sup>2</sup>, 150 тыс. клеток во флаконе), для определения уровня цГМФ клетки рассевали на пластиковые матрасы фирмы "Nunk" (площадь дна 25 см<sup>2</sup>, 750 тыс. клеток на матрас). На следующий день после посадки во всех флаконах и матрасах проводили смену среды, на 5-й день — смену среды с 1% сывороткой и через 20 ч начинали определение уровня циклических нуклеотидов. Для экстракции цАМФ и цГМФ использовали 0,6 н. HClO<sub>4</sub>. Концентрацию циклических нуклеотидов определяли радиоиммунологическим методом с использованием стандартных наборов фирмы "Amersham" [18].

### Результаты и обсуждение

Результаты нескольких серий экспериментов по определению уровня цАМФ в клетках с аномальным кариотипом и в диплоидных штаммах представлены в таблице. Из этих данных следует, что уровень цАМФ в трисомных клетках выше на 40% при пересчете на 1 мг белка и на 100% при пересчете на 1 млн клеток по сравнению с контролем. В триплоидных и диплоидных штаммах уровень цАМФ в пересчете на 1 мг белка не различался, а в пересчете на 1 млн клеток в триплоидных клетках был на 50% выше. Определен уровень цГМФ в 3 диплоидных штаммах (ИМГ—820, 821, 845) —  $12,8 \pm 0,55$  пмоль на 1 мг белка, в 3 трисомных штаммах (ЛЦЧ—162, 400, 522) —  $9,1 \pm 1,16$  пмоль на 1 мг белка, в 3 триплоидных штаммах (ЛЦЧ—478, 707, ИМГ—1046) —  $12,0 \pm 1,24$  пмоль на 1 мг белка; различия между диплоидными и трисомными клетками были статистически достоверными ( $p < 0,05$ ). Также достоверны различия между диплоидными и трисомными штаммами по определению соотношения цАМФ/цГМФ ( $3,3 \pm 0,66$  и  $7,5 \pm 1,41$  соответственно,  $p < 0,05$ ). Различий между диплоидными и триплоидными штаммами не най-

Содержание цАМФ в диплоидных, трисомных и триплоидных клетках ( $M \pm m$ )

№ серии экспериментов	Штаммы	Уровень цАМФ	
		пмоль на 1 мг белка	пмоль на 1 млн клеток
1	5 диплоидных	44,4±3,32* (11)	15,1±1,42* (11)
	4 трисомных	64,4±6,84* (14)	30,2±5,40* (12)
2	4 диплоидных	50,5±4,31 (13)	32,5±3,38** (13)
	4 с триплоидией	50,9±5,03 (12)	49,8±4,79** (12)

Примечание. Одна звездочка —  $p < 0,02$ , две —  $p < 0,01$ ; в скобках — число наблюдений.

дено как по уровню цГМФ (при пересчете на клеточный белок), так и по соотношению цАМФ/цГМФ ( $3,3 \pm 0,66$  и  $3,7 \pm 0,80$  соответственно).

Таким образом, в клетках спонтанных абортусов человека с трисомным кариотипом обнаружено резкое увеличение уровня цАМФ при пересчете данных как на белок, так и на количество клеток; при кратном увеличении плоидности (триплоидия) отмечено увеличение уровня цАМФ только при пересчете на количество клеток. Отклонение от нормы содержания цАМФ вызывает соответственно изменение такого важного показателя, как соотношение концентраций цАМФ и цГМФ в трисомных клетках.

Почти полное отсутствие в литературе данных изучения физиологии клеток спонтанных абортусов человека с аномальным кариотипом позволяет провести некоторые параллели только с работами по обследованию больных с такой наиболее часто встречающейся хромосомной аномалией как трисомия по хромосоме 21 (синдром Дауна). При измерении уровня цАМФ в слюне больных с синдромом Дауна было показано, что у детей с трисомным кариотипом он был значительно выше, чем у детей контрольной группы [17]. Имеются сведения о наличии гиперчувствительности клеток с трисомией 21 к  $\beta$ -адренергическим веществам (эпинефрину, изопротеринулу [15]). При обследовании больных с синдромом Дауна показано снижение активности АТФаз, в частности Na/K-АТФазы, наличие аномальной реакции этого фермента на уабаин [14, 16]. Эти данные могут свидетельствовать о том, что в клетках человека с трисомным кариотипом нарушены механизмы функционирования мембранного комплекса, и это приводит к каскаду реакций, нарушающих активность многих ферментов. Вероятно, этим

можно объяснить повышение скорости обмена белков, обнаруженное при исследовании клеток спонтанного абортуса с трисомией 7 [5].

Нормальный органогенез плода человека может проходить только при четком выполнении генетической программы, важнейшими этапами которой является миграция клеток-предшественников, пролиферация, дифференциация, гибель части клеток. Для успешного прохождения этих этапов большое значение имеет состояние межклеточного матрикса [19]. В клетках спонтанных абортусов с аномальным кариотипом резко снижен синтез важных белков межклеточного матрикса не только коллагена, но и фибронектина [1]. Повышение уровня цАМФ, как правило, сопровождается снижением пролиферативной активности; помимо этого, повышение уровня цАМФ приводит к повышению адгезивности клеток, уменьшению их подвижности [12, 20]. Следовательно, нарушение синтеза межклеточного матрикса, аномальный уровень цАМФ, изменение соотношения цАМФ/цГМФ могут повлечь за собой нарушения генетической программы развития плода, приводящие к образованию у эмбрионов с трисомным (и триплоидным) кариотипом множественных пороков развития, к спонтанному прерыванию беременности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белкин В. М., Кухаренко В. И., Володарская С. М. и др. // *Вопр. мед. химии.* — 1985. — № 1. — С. 125—130.
2. Гринберг К. Н. // *Прогресс в медицинской генетике.* — М., 1978. — С. 151—186.
3. Гроздова М. Д., Хохлова Ю. В., Панасюк А. Ф., Гусева Н. Г. // *Вопр. мед. химии.* — 1982. — № 6. — С. 51—56.
4. Кухаренко В. И., Дельвиц А. А. // *Акуш. и гин.* — 1986. — № 6. — С. 63—64.
5. Подобед О. В., Кухаренко В. И., Соловьева Н. В. и др. // *Биохимия.* — 1987. — № 1. — С. 82—88.

6. Северин Е. С., Кочеткова М. И. Роль фосфорилирования в регуляции клеточной активности. — М., 1985.
7. Ткачук В. А. Введение в молекулярную эндокринологию. — М., 1983.
8. Федоров Н. А. Биологическое и клиническое значение циклических нуклеотидов. — М., 1979.
9. Baum B. J., Moss J., Bruel S. et al. // J. biol. Chem. — 1980. — Vol. 255. — P. 2843—2847.
10. Bourret L. A., Goetinck P. F., Hintz R. et al. // FEBS Lett. — 1979. — Vol. 108. — P. 353—355.
11. Cramer H., Schultt J. // Cyclic 3'5'-Nucleotides, Mechanism of Action. — London, 1977. — P. 128—146.
12. Katzin W. E., Howard G. // J. Cell. Sci. — 1984. — Vol. 65. — P. 177—192.
13. Kukhareno V. I., Delvig A. A., Grinberg K. N. // Hum. Genet. — 1984. — Vol. 68. — P. 269—271.
14. McCoy E. E., Segal S. M., Bayer S. M. et al. // New Engl. J. Med. — 1974. — Vol. 291. — P. 950—954.
15. McSwigan J. D., Sheppard J. B. // Europ. J. Cell Biol. — 1980. — Vol. 22. — P. 575.
16. Qi-ning X., Ding-guo S., Wei D. // Clin. Genet. — 1984. — Vol. 26. — P. 429—432.
17. Sproles A. // J. dent. Res. — 1973. — Vol. 52. — P. 915—917.
18. Steiner A. L., Pagliara A. S., Chase L. R. et al. // J. biol. Chem. — 1972. — Vol. 247. — P. 1114—1120.
19. Toole B. P. // Neuronal Recognition / Ed. S. H. Barondes. — New York, 1976. — P. 275—329.
20. Willingham M. C., Pastan I. // J. Cell Biol. — 1975. — Vol. 67. — P. 146—159.

Поступила 22.01.88

#### LEVEL OF cAMP and cGMP IN CELLS OF SPONTANEOUS ABORTUSES WITH TRISOMIC AND TRIPLOID KARYOTYPE

V. I. Kukhareno, Yu. V. Khokhlova

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

Contents of intracellular cAMP and cGMP were studied in cultivated fibroblasts from 4 spontaneous abortuses with trisomy 7 and trisomy 9 as well as in 4 triploid cell strains. Six diploid cell strains from medical abortuses were used as controls. Distinct increase in cAMP content both calculated per 1 mg of cell protein or per a cell was found in trisomic strains, whereas the cAMP content increase in triploid strains was detected only per a cell. The data obtained suggest that functions of membrane complexes were impaired in the cells with anomalous karyotype.

УДК 612.115.06:[612.112.94.015.2:612.6].085.2

Л. В. Лютова, Г. В. Андреевко, М. А. Карабасова, Е. Г. Рыбакина,  
И. А. Козинец, И. П. Ашмарин

#### ИНТЕРЛЕЙКИН-1 И ФИБРИНОЛИЗ. ИССЛЕДОВАНИЯ В УСЛОВИЯХ IN VIVO

МГУ им. М. В. Ломоносова

Интерлейкин-1 (ИЛ-1), открытый как эндогенный лейкоцитарный пироген [7], затем был описан как лимфоцитактивирующий фактор макрофагального происхождения, стимулирующий пролиферацию мышинных тимоцитов в присутствии субмитогенных количеств лектинов [11, 12], и лейкоцитарный эндогенный медиатор, индуцирующий острую фазу воспаления [13]. Имеющиеся данные позволяют сформулировать представление об ИЛ-1 как лейкопептиде с полифункциональными свойствами, модулирующее влияние которого на развитие иммунного ответа сочетается с участием в реакциях неспецифической резистентности организма, включающим как центральные, так и периферические эффекты [4]. Таким образом, ИЛ-1 является универсальным медиатором, инициирующим комплекс реакций за-

щиты (как специфических, так и неспецифических), совместное действие которых обеспечивает устойчивость организма к повреждающим воздействиям различной природы.

В работах последних лет показано участие ИЛ-1 в процессах свертывания крови и фибринолиза. Влияние ИЛ-1 на фибринолитическую активность изучено в основном in vitro. Показано, что добавление ИЛ-1 в культуру клеток сосудистого эндотелия стимулирует освобождение ингибитора тканевого активатора плазминогена [15], фактора, активирующего тромбоциты [8], простаглицлина [8]. Эксперименты, проведенные in vivo, единичны.

Целью настоящей работы было изучение функции системы фибринолиза при внутривенном введении белым крысам ИЛ-1.

## Методика

В работе использован приготовленный в лаборатории общей патологии НИИЭМ АМН СССР стандартный препарат ИЛ-1 кролика, полученный из лейкоцитов 18-часового перитонсального экссудата [2] и очищенный этаноловым методом в собственной модификации [5]. Препарат с молекулярной массой около 17 кД [3] обладал как пирогенной активностью, так и лимфоцитактивирующим действием. Являясь эндогенным пирогеном, препарат повышал температуру тела кроликов на 0,7—0,8 °С при внутривенном введении его животным в дозе 7 мкг на 1 кг массы.

Лимфоцитактивирующие свойства препарата ИЛ-1 определяли по его способности оказывать комитогенный эффект на пролиферацию тимоцитов, стимулированных субоптимальными дозами лектинов [3], и рассчитывали как удельную комитогенную активность, выраженную в единицах специфической активности на 1 мг белка. За единицу активности принимали такую его концентрацию, которая вызывала 50 % от максимального усиления пролиферации тимоцитов, оцениваемой по включению <sup>3</sup>H-тимидина. Удельная комитогенная активность использованного в работе препарата ИЛ-1 составляла 1,0·10<sup>5</sup> ед/мг белка.

Эксперименты проводили на белых нелнейных крысах-самцах с массой тела 180—200 г. ИЛ-1 вводили в *v. jugularis*. Кровь брали из той же вены шприцем с 3,8 % цитратом натрия в соотношении 9:1. Плазму отделяли центрифугированием в течение 10 мин при 2000 об/мин и хранили при -30 °С. Контрольным животным вводили равный объем физиологического раствора (0,85 % раствор хлорида натрия).

В плазме крови определяли концентрацию фибриногена и фибринолитическую активность [1], антиплазмины [1] и время рекальцификации. В эуглобулиновой фракции плазмы крови определяли время лизиса сгустка [16], фибринолитическую активность на стандартных фибриновых чашках [6], активатор плазминогена и плазмин [14]. Было изучено действие ИЛ-1 при однократном внутривенном введении 50 мкг/кг, а также 0,5, 5 и 150 мкг/кг массы тела через 30 мин, 2, 4 и 24 ч. В хроническом эксперименте ИЛ-1 вводили в течение 3 дней. Кровь брали до и через 30 мин после последнего введения.

### Результаты и обсуждение

Через 30 мин после внутривенного введения ИЛ-1 в дозе 50 мкг/кг не отмечено существенных изменений в исследуемых параметрах, за исключением ускорения времени лизиса сгустка эуглобулинов (рис. 1).

В крови, взятой через 4 ч, выявлено четкое угнетение фибринолитической активности, проявляющееся как в цельной плазме, так и в ее эуглобулиновой фракции. Так, время лизиса сгустка эуглобулинов возросло вдвое в основном за счет падения содержа-

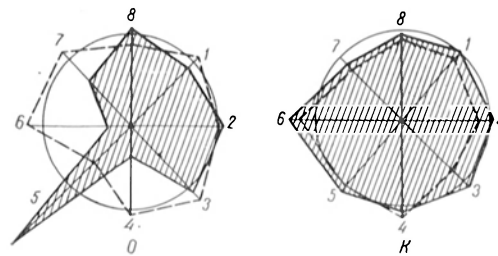


Рис. 1. Номограмма показателей свертывающей и фибринолитической систем крови в опыте (О) и в контроле (К) до внутривенного введения ИЛ-1 (50 мкг/кг; окружность); через 30 мин (пунктирная линия) и через 4 ч (сплошная линия).

1 — фибриноген; 2 — остаточный фибриноген; 3 — время рекальцификации; 4 — фибринолитическая активность цельной плазмы; 5 — время лизиса сгустка эуглобулинов; 6 — активатор плазминогена; 7 — плазмин; 8 — антиплазмины. Принцип построения номограммы: на окружности отложены принятые за 100 исходные показатели свертывания и фибринолиза; по радиусам — их изменения (в % к исходному уровню).

ния активатора плазминогена и в меньшей степени за счет плазмина. По-видимому, описанные изменения происходят вследствие ингибирования активатора плазминогена антиактиватором. Это согласуется с данными работы [10], в которой было показано, что в эуглобулиновой фракции происходит ингибирование активатора плазминогена через 2—4 ч после внутривенного введения ИЛ-1. В наших исследованиях эффект торможения отмечался и в цельной плазме, причем он не был связан с возрастанием антиплазминовой активности или с изменением концентрации фибриногена (см. рис. 1). Время рекальцификации также не изменялось, что указывает на первичность нарушений функций фибринолитической системы, а не системы гемостаза.

При изменении дозы вводимого ИЛ-1 как в сторону повышения (до 150 мкг/кг), так и снижения (5 и 0,5 мкг/кг) получены аналогичные результаты. Торможение фибринолиза выражалось в удлинении времени лизиса эуглобулинового сгустка и снижении общего фибринолиза через 2 и 4 ч после инъекции ИЛ-1 (рис. 2). Однако степень выраженности эффекта была разной в зависимости от вводимой дозы. Через 24 ч в эуглобулиновой фракции намечалась тенденция к нормализации фибринолиза.

Известно, что клетки сосудистого эндотелия являются местом синтеза и

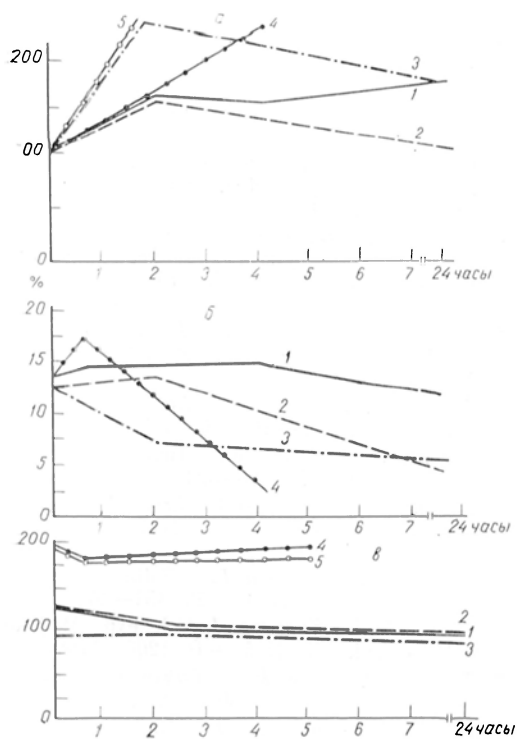


Рис. 2. Время лизиса эуглобулинов (а), фибринолитическая активность цельной плазмы (б), содержание антиплазминов (в) при однократном внутривенном введении ИЛ-1 крысам в различных дозах. 1 — контроль; 2 — 0,5 мкг/кг; 3 — 5 мкг/кг; 4 — 50 мкг/кг; 5 — 50 мкг/кг.

хранения как активатора плазминогена, так и его ингибиторов и играют важную роль в регуляции фибринолиза [9]. Поэтому, обнаружив *in vivo* снижение активности активатора плазминогена под действием ИЛ-1 и учитывая данные литературы о высвобождении ингибитора активатора плазминогена из клеток эндотелия при добавлении препарата в культуру клеток [15], мы решили выяснить взаимосвязь нарушений фибринолиза, проявляющихся в крови, с содержанием активатора плазминогена в тканях.

С этой целью определяли фибринолитическую активность в тканях почек, сердца, легких — органов, сосуды которых наиболее богаты активатором плазминогена, и в селезенке, ткани которой проявляют наименьшую фибринолитическую активность.

Результаты гистохимического исследования фибринолиза тканей представлены на рис. 3, из которого вид-

но, что в тканях органов животных подопытной группы фибринолитическая активность повышена по сравнению с тканями контрольных крыс. Это особенно четко проявляется в тканях почек и сердца. По-видимому, полученный эффект обусловлен высвобождением из клеток эндотелия сосудов ингибитора активатора плазминогена и появлением его в кровотоке, вследствие чего фибринолитическая активность в самих клетках эндотелия возрастает. Полученные результаты являются дополнительным подтверждением того, что механизм торможения процесса фибринолиза связан с выходом антиактиватора из клеток сосудистого эндотелия.

Представляло интерес выяснить, произойдет ли углубление депрессии фибринолиза при многократном внутривенном введении 50 мкг/кг ИЛ-1. Препарат вводили в течение 3 дней, и кровь брали через 30 мин после последнего введения, в срок, когда депрессии фибринолиза не наступало в ответ на однократное введение ИЛ-1, а, напротив, отмечалось некоторое ускорение времени лизиса эуглобулинового сгустка. В новых условиях эксперимента в этот срок фибринолитическая активность эуглобулиновой фракции была почти вдвое ниже исходной, однако подобные изменения имели место и в крови контрольных животных, что, очевидно, связано с дополнительным стрессорным воздействием на животных ежедневных манипуляций (повторные иммобилизации, инъекции

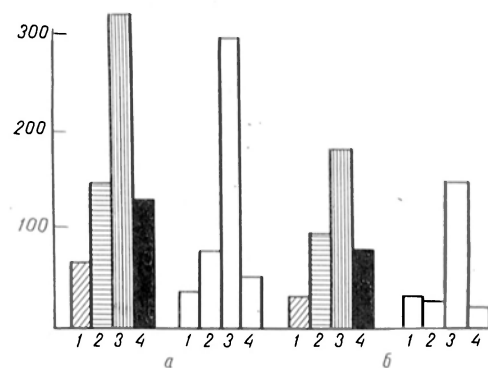


Рис. 3. Фибринолитическая активность тканей крыс после внутривенного введения ИЛ-1 (50 мкг/кг).

а — через 4 ч; б — после 3-кратного ежедневного введения. 1 — сердце; 2 — почки; 3 — легкие; 4 — селезенка. Светлые столбики — ткани органов контрольных животных. По оси ординат — % лизиса фибрина за 1 ч.

и т. д.), приводящих к освобождению в кровотоке активатора плазминогена. Действительно, при изучении фибринолитической активности тканей тех же органов, что и в остром опыте (см. рис. 3), видно, что и в опыте, и в контроле во всех исследованных образцах тканей происходит снижение фибринолитической активности; следовательно, в обеих группах активатор плазминогена высвобождается из эндотелиальных клеток в кровотоке. Но и в это же время ткани животных, получавших ИЛ-1, в большей мере насыщены активатором плазминогена, чем ткани интактных крыс. Это свидетельствует о том, что при многократном введении препарата, кроме активатора плазминогена, в кровоток поступает и его ингибитор. Однако следует отметить, что высвобождение ингибитора фибринолиза не приводит к тотальному истощению его уровня в клетке и уровень фибринолиза ткани после введения ИЛ-1 ближе к норме, чем в контроле.

Значительным отличием эффекта многократного введения ИЛ-1 от однократного было повышение в крови концентрации фибриногена (с  $302 \pm 14,6$  до  $494 \pm 39,1$  мг%,  $p < 0,01$ ) и антиплазминовой активности (с  $189 \pm 12,6$ , до  $429 \pm 37,2$  с;  $p < 0,01$ ). Гиперфибриногенемия под действием ИЛ-1, на наш взгляд, связана не со специфической активацией системы гемостаза, так как последняя не подтверждается повышением общей свертываемости крови (время рекальцификации в начале и конце опыта укорачивалось так же, как и в контрольной группе крыс), а является результатом стимулирования ИЛ-1 белков острой фазы воспаления.

Таким образом, эксперименты, проведенные на белых крысах, показали, что внутривенное введение ИЛ-1 приводит к выраженному снижению фибринолитической активности как в цельной плазме, так и ее эуглобулиновой фракции за счет выхода в кровоток ингибитора активатора плазминогена. При этом происходит нарастание активаторной активности в тканях почек, сердца, селезенки и легких. Трехкратное введение ИЛ-1 вызывает значительное увеличение концентрации фибриногена и антиплазминов по сравнению с контролем.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Андреев Г. В. // Лаб. дело. — 1969. — № 6. — С. 477—479.
2. Рыбакина Е. Г., Сорокин А. В. // Бюл. экспер. биол. — 1978. — № 8. — С. 203—207.
3. Симбирцев А. С., Рыбакина Е. Г., Перунов Н. Д. и др. // Иммунология. — 1987. — № 4. — С. 79—82.
4. Сорокин А. В., Рыбакина Е. Г., Ефремов О. М. // Нейро-гуморальная регуляция иммунного гомеостаза. — Л., 1986. — С. 156—158.
5. Федоров Н. А., Веселкин П. Н., Кахетелидзе М. Г. и др. // Пат. физиол. — 1982. — № 2. — С. 28—32.
6. Astrup T., Mullertz S. // Arch. Biochem. — 1952. — Vol. 40. — P. 346—351.
7. Beeson P. B. // J. clin. Invest. — 1948. — Vol. 27, N 4. — P. 524—524.
8. De Jana E., Brevetario F., Erroi A. et al. // Blood. — 1987. — Vol. 69, N 2. — P. 695—699.
9. Donner L., Vodakova L. // Folia haemat. — 1986. — Bd 113, N 4. — P. 451—459.
10. Emeis J. J., Koaistra J. // J. exp. Med. — 1986. — Vol. 163, N 5. — P. 1260—1266.
11. Gery I., Gershon R., Waksman B. H. // Ibid. — 1972. — Vol. 136. — P. 128—138.
12. Gery I., Waksman B. H. // Ibid. — P. 143—148.
13. Kampschmidt R. F., Pulliam L. A., Merriam C. R. // Amer. J. Physiol. — 1978. — Vol. 235, N 3. — P. C118—C121.
14. Lassen M. // Acta physiol. scand. — 1952. — Vol. 27. — P. 351—356.
15. Nachman R. L., Hajjar K. A., Silerstein R., Dinarello C. A. // J. exp. Med. — 1986. — Vol. 163, N 6. — P. 1595—1600.
16. Niewiarowski S. Krzepnicie krwi-Warszawa, 1960. — P. 150—152.

Поступила 22.02.88

## INTERLEUKIN-1 AND FIBRINOLYSIS. IN VIVO STUDIES

L. V. Lyutova, G. V. Andreenko, M. A. Karabasova, E. G. Rybakina, I. A. Kozinets, I. P. Ashmarin

Biological Faculty, M. V. Lomonosov State University, Moscow

Distinct decrease in fibrinolytic activity of both whole blood plasma and its euglobulin fraction, occurring due to liberation of an inhibitor of plasminogen activator into circulation, was observed within 2-4 hrs after a single intravenous administration of rabbit interleukin-1 into rats at a dose of 50 µg/kg, while the activator activity was increased in kidney, heart, spleen and lung tissues. The similar data were obtained if the dose was either increased up to 150 µg/kg or decreased down to 5 µg/kg and 0.5 µg/kg, but the effect observed proved to be dose-dependent. Three injections of interleukin-1 caused more pronounced increase in concentration of fibrinogen and antiplasmins as compared with controls.



*Н. П. Прокопенко, Р. А. Тигранян, Г. Л. Муратова, В. И. Плохой,  
В. Х. Хавинсон*

## ХАРАКТЕРИСТИКА КИСЛОТНОГО ЭКСТРАКТА ЭПИФИЗА И ЕГО ФРАКЦИЙ

Научно-исследовательский институт по стандартизации и контролю лекарственных средств Минздрава СССР, Москва

Исследования последних лет значительно углубили понимание роли эпифиза в организме как органа, находящегося в многосторонних регуляторных отношениях с различными отделами нейроэндокринной системы [3, 4, 12—15]. Интерес к физиологии и биохимии эпифиза особенно возрос после того, как из его ткани удалось выделить ряд физиологически активных соединений, в частности мелатонин и адреногломерулотропин. Оба эти соединения оказывают гормоноподобное действие и по структуре являются производными серотонина.

Если раньше гормональные эффекты эпифиза связывали с действием мелатонина и других индольных производных, то позднее появились убедительные данные о такой же активности выделенных из эпифиза низкомолекулярных веществ полипептидной природы [2, 14, 16—19]. Экстракт из эпифиза, содержащий полипептиды, использующийся в качестве исходного сырья для получения препарата «Эпиталамин», был получен и изучен ленинградскими исследователями [1, 2, 5, 6, 8—10].

Показано, что «Эпиталамин» регулирует нейроэндокринную систему, повышает чувствительность гипоталамуса к эндогенным гормональным воздействиям, восстанавливает гормональную саморегуляцию при гормонозависимых опухолях и старении, повышает сопротивляемость организма к воздействию стрессорных факторов, стимулирует реакции клеточного иммунитета, восстанавливает центральную регуляцию репродуктивной системы на уровне гипоталамуса, нормализует цикличность выделения фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) и лютеинизирующего гормона (ЛГ), являясь своеобразным и сложным ингибитором по отношению к регуляторным механизмам половой функции [2, 8].

Целью настоящей работы явилось

изучение состава кислотного экстракта из эпифизов крупного рогатого скота (КЭЭ), используемого для получения «Эпиталамина» и представляющего собой малоизученный комплекс полипептидов.

### Методика

В работе использовали КЭЭ [9, 10]. Гель-фильтрацию КЭЭ проводили на колонке (1,5×50 см) с сефадексом G-50 (тонкий), уравновешенным 5% уксусной кислотой. На колонку наносили 0,25 г КЭЭ в 2,5 мл 5% уксусной кислоты. Элюцию проводили 5% уксусной кислотой со скоростью 1 мл в минуту, собирая фракции объемом 5 мл. Высокомолекулярную фракцию, выходящую с фронтом элюата, обозначали I, а низкомолекулярную — II.

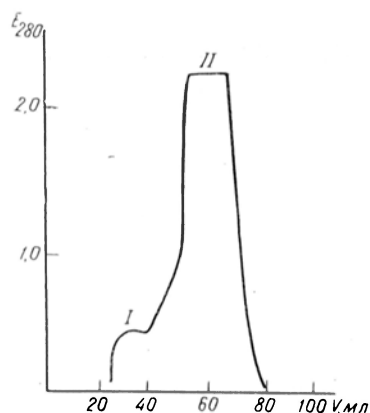
По 10 мкл каждой фракции наносили на пластинки «Силуфол» (ЧССР) и проводили хроматографирование в системе растворителей: н-бутанол — вода — уксусная кислота (60 : 25 : 15) [7]. Пластинки затем обрабатывали 0,25% раствором нингидрина в ацетоне.

Аминокислотный состав гидролизатов КЭЭ и фракций I и II исследовали на автоматическом аминокислотном анализаторе типа KLA-5 ("Hitachi", Япония).

Биологическую активность КЭЭ и фракций I и II определяли по разработанной нами методике антигонадотропного действия с использованием половозрелых самок крыс. Животным, разделенным на 3 группы способом случайной выборки (по 10 в каждой), в течение 3 дней подкожно вводили КЭЭ и хорионический гонадотропин (ХГ) в физиологическом растворе. Первая (контрольная) группа животных получала только физиологический раствор (по 0,2 мл), вторая — одновременно ХГ по 0,5 ЕД и либо КЭЭ, либо фракцию I или II по 0,005, 0,05, 0,5 мг соответственно. Через сутки после последней инъекции животных забивали, извлекали матку (рога и непарную часть), очищали от окружающих тканей, взвешивали с точностью до 1 мг и определяли среднеарифметическую массу матки для каждой группы животных. Данные по каждой группе обрабатывали статистически.

### Результаты и обсуждение

С помощью гель-фильтрации на сефадексе G-50 КЭЭ разделен на 2 фракции: высокомолекулярную (I),



Гель-фильтрация КЭЭ на сефадексе G-50.  
I — высокомолекулярная фракция; II — низкомолекулярная фракция.

выходящую с фронтом элюата, и низкомолекулярную (II) (см. рисунок). Масса фракции I составила примерно 1/10 массы КЭЭ.

Определение аминокислотного состава гидролизатов КЭЭ и фракций I и II показало, что в их состав в больших количествах входят кислые и основные аминокислоты (табл. 1). Для аминокислотного состава КЭЭ соотношение кислых и основных аминокислот составляет 3 : 1, для фракции I то же соотношение равно 2 : 1, а для фракции II — 2,7 : 1. Отличительной особенностью аминокислотного состава фракции I является высокое содержание пролина. Как в КЭЭ, так и во фракциях I и II обнаружен тирозин

Таблица 1  
Аминокислотный состав КЭЭ и фракций I и II  
(в нмоль на 1 мг КЭЭ)

Аминокислота	КЭЭ	Фракция	
		I	II
Lys	494,0	606,0	440,0
His	104,0	94,0	108,0
Arg	418,0	404,0	428,0
ASP	1040,0	706,0	838,0
Thr	400,0	444,0	278,0
Ser	584,0	782,0	432,0
Pro	404,0	760,0	216,0
Gly	2146,0	1274,0	1750,0
Glu	820,0	1086,0	532,0
Ala	748,0	1056,0	542,0
Cys	42,0	46,0	36,0
Val	516,0	610,0	392,0
Met	116,0	120,0	90,0
Ile	268,0	292,0	206,0
Leu	430,0	484,0	340,0
Tyr	114,0	110,0	106,0
Phe	136,0	130,0	128,0

примерно в одинаковых количествах.

Хроматография в тонком слое сорбента показала гетерогенность полипептидного состава КЭЭ и фракции II: на хроматограмме обнаружено около 10 нингидринположительных веществ. Фракция I хроматографически однородна: на хроматограмме одно нингидринположительное пятно в точке нанесения.

Биологическая активность КЭЭ и выделенных из него фракций I и II была определена с использованием антигонадотропного теста, заключающегося в уменьшении массы матки в группе животных, получавших одновременно ХГ и КЭЭ (или ХГ и фракцию I или II соответственно), по сравнению с массой матки животных, получавших только ХГ, что рассматривается как показатель подавления гонадотропной функции гипофиза [3, 11].

КЭЭ в дозе 1,5 мг достоверно ингибировал на 20—40 % действие ХГ (табл. 2). Фракция II оказывает то же действие не только в дозе 1,5 мг, но и (в отличие от КЭЭ) в 100 раз меньшей дозе (0,015 мг). Фракция I,

Таблица 2  
Сравнительная характеристика биологической активности КЭЭ и его фракций

Вводимое вещество	Доза, мг	Ингибирование роста матки крыс, %
КЭЭ	1,5	28,5*
		40,4*
	0,15	6,7
Фракция I	0,015	2,4
	1,5	—18,1*
		14,5
Фракция II	0,15	52,9*
	0,015	22,8
	1,5	51,1*
	0,15	30,4*
	0,015	31,1*

Примечание. Звездочка — достоверные различия между группами животных, получавших одновременно ХГ и исследуемое вещество (КЭЭ либо фракцию I или II) и группами животных, получавших только ХГ. Процент ингибирования рассчитывали по формуле:

$$K = \frac{XГ - (XГ + И)}{XГ} \cdot 100\%,$$

где K — ингибирование роста матки крыс (в %); XГ — средняя масса матки животных, получивших XГ; XГ + И — средняя масса матки крыс, получивших одновременно XГ и исследуемое вещество.

составляющая  $1/10$  массы КЭЭ, проявляла достоверный антигонадотропный эффект только в дозе, равной  $1/10$  эффективной дозы КЭЭ, т. е. 0,15 мг. В дозе 0,015 мг фракция I не была активна, в дозе 1,5 мг, в которой обычно эффективно действует КЭЭ, не давала антигонадотропного эффекта, а в некоторых опытах проявляла даже потенцирующий ХГ эффект (в табл. 2 — отрицательное значение процента ингибирования роста матки крыс).

Таким образом, исследования состава КЭЭ показали наличие большого количества низкомолекулярных пептидов, а также высокомолекулярного пептидного материала, составляющего примерно  $1/10$  массы КЭЭ.

Анализ аминокислотного состава гидролизатов КЭЭ и обеих фракций выявил наличие высокого содержания в них кислых и основных аминокислот.

Сравнительная оценка биологической активности КЭЭ и его полипептидных фракций показала, что удаление из КЭЭ высокомолекулярной фракции I достоверно повышает его антигонадотропное действие.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Анисимов В. Н., Остроумова М. Н., Дильман В. М. // Бюл. экспер. биол. — 1974. — № 4. — С. 100—102.
2. Анисимов В. Н., Хавинсон В. Х., Морозов В. Г. // Успехи совр. биол. — 1980. — Т. 89, № 2. — С. 283—291.
3. Дильман В. М. // Старение, климакс и рак. — Л., 1968. — С. 183; 198.
4. Дильман В. М. Эндокринологическая онкология. — Л., 1974.
5. Дильман В. М. // Бюл. экспер. биол. — 1975. — № 11. — С. 96—98.
6. Дильман В. М. // Вопр. онкол. — 1977. — № 6. — С. 7—9.
7. Дэвени Т., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды и белки: Пер. с англ. — М., 1976. — С. 192—193.

8. Использование препаратов энифиза в клинической практике / Карпов Ф. С., Слепушкин В. Д., Мордовин В. Ф. и др. — Томск, 1985.
9. Морозов В. Г., Хавинсон В. Х. // Науч. конф. слушателей: Материалы. Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова. — Л., 1971. — С. 127—128.
10. Морозов В. Г., Хавинсон В. Х. // Экспер. хир. — 1974. — № 1. — С. 34—38.
11. Остроумова М. Н., Анисимов В. Н., Сыромятников А. А., Дильман В. М. // Вопр. онкол. — 1976. — № 9. — С. 39—43.
12. Хелимский А. М. Энифиз: (Шипковидная железа). — М., 1969.
13. Чазов Е. И., Исаченков В. А. Энифиз: место и роль в системе нейроэндокринной регуляции. — М., 1974.
14. Эндокринология и метаболизм / Под ред. Ф. Фелига: Пер. с англ. — М., 1985. — Т. 1.
15. Diltan V. M. // Lancet. — 1971. — Vol. 1. — P. 1211—1219.
16. Milcu S. M., Pavel S., Neacsu C. // Endocrinology. — 1963. — Vol. 72, N 4. — P. 563—566.
17. Neacsu C. // Rev. roum. Physiol. — 1972. — Vol. 9, N 2. — P. 161—169.
18. Pavel S. // Endocrinology. — 1965. — Vol. 77, N 5. — P. 812—817.
19. Pavel S., Petrescu S. // Nature. — 1966. — Vol. 212. — P. 1054—1058.

Поступила 08.02.88

#### PROPERTIES OF THE ACID EXTRACT FRACTIONS FROM EPIPHYSIS

N. P. Prokopenko, R. A. Tigranyan, G. L. Muratova, V. I. Plokhoy, V. Kh. Khavinson

Institute on Standardization and Control of Drugs, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

Acid extract of bovine epiphyses was separated by means of gel filtration on Sephadex G-50 into two fractions: high and low molecular preparations. Estimation of biological activity of the acid extract and its polypeptide fractions, which was carried out using the procedure of antagonodotropic effect on preadolescent rat females, showed that the antagonodotropic effect was distinctly higher in the preparation free of high molecular substances.

УДК 616.721.5/6-018.3-07:616.153.295-02:615.874.24

**И. И. Корф, Т. А. Цагикян, В. А. Мещерякова, М. М. Левачев,  
М. Б. Арутюнова**

#### ИЗМЕНЕНИЕ СОСТАВА ЖИРНЫХ КИСЛОТ ПЛАЗМЫ КРОВИ И ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ОСТЕОХОНДРОЗЕ

Институт питания АМН СССР, Москва

В настоящее время в терапии ряда заболеваний внутренних органов, опорно-двигательного аппарата, кожных и других болезней начал применяться

метод дозированного лечебного голодания, или разгрузочно-диетическая терапия (РДТ) [1—3]. Применение РДТ связано с постепенным исчерпа-

нием энергетических ресурсов и вовлечением в энергетическое обеспечение организма пластических веществ, в том числе жиров. При этом происходит интенсивное расходование жировых депо и липидов, содержащихся во всех органах. Пока не установлено, в какой мере в условиях применяемых схем РДТ расходуются различные жирные кислоты, не возникает ли дефицит незаменимых полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) в организме. Известно, например, что при неполном парентеральном питании смесями, не содержащими жировой эмульсии, симптомы недостаточности ПНЖК проявляются уже через 2 нед [6]. В задачу исследования входило выяснение характера, глубины и обратимости изменений в жирнокислотном составе плазмы крови и клеточных мембран (на примере мембран эритроцитов) у группы больных, которым в клинике лечебного питания Института АМН СССР был проведен курс РДТ.

#### Методика

Под наблюдением находилось 14 женщин в возрасте от 38 до 54 лет с распространенным деформирующим спондилезом и остеохондрозом позвоночника с выраженным вторичным корешковым синдромом. Масса тела больных колебалась от 48 до 93 кг (в среднем по группе 81,7 кг). Срок проведенного курса РДТ составлял от 28 до 38 дней. Полный голод (со свободным питьевым режимом) назначали на 14—21 день, затем в течение 14—16 дней проводили восстановительную диетотерапию. У всех больных отмечена хорошая толерантность к полному голоданию, каких-либо побочных явлений или осложнений не было. Убыль массы тела за период голодания в среднем по группе составила 8,1 кг (от 6,1 до 12,4 кг у отдельных больных, или 10—12 % от исходных величин). В процессе восстановительной диетотерапии масса тела возрастала в среднем на 4,4 кг (при индивидуальных колебаниях от 1,2 до 7 кг). Во время полного голодания (с 5-го—7-го дня) наблюдалось заметное ослабление или полное исчезновение болевого синдрома, увеличение объема движения в позвоночнике. Исследование крови у больных в процессе наблюдения проводили 3 раза: до начала голодания, на высоте голодания (14—21-й день) и в конце восстановительного периода. Для определения жирнокислотного состава плазмы и эритроцитов больных использовали цитратную кровь. Мембраны эритроцитов выделяли по методу [4]. Липиды из плазмы и мембран эритроцитов экстрагировали по методу [5]. Метилловые эфиры жирных кислот получали по методу [7] в модификации, используемой в лаборатории липидного обмена Института питания АМН СССР. Газохроматографический анализ метиловых эфиров

жирных кислот осуществляли на хроматографе "Intersinat IGS-131" с пламенно-ионизационным детектором. Использовали колонку диаметром 4 мм, длиной 2 м, наполненную Sughomogorb waw 80/100 меш с 10 % Silag 10C в качестве жидкой фазы. Скорость газа-носителя (азот) 42 мл/мин, температура колонки, испарителя и детектора соответственно 180, 220 и 240 °С. Идентификацию жирных кислот осуществляли путем сравнения рассчитанных значений их эквивалентных длин цепей (ЭДЦ) с величинами ЭДЦ реперных соединений, а также с данными литературы.

#### Результаты и обсуждение

Состав жирных кислот плазмы крови и мембран эритроцитов обследованных больных приведен соответственно в табл. 1 и 2. Результаты выражены в процентах от общей суммы жирных кислот и рассчитаны как среднее по группе из 14 человек. Оценку достоверности различий проводили с использованием критерия *t* Стьюдента. При сравнении данных о жирнокислотном составе плазмы крови, взятой на высоте голодания, с аналогичными данными, полученными в исходном периоде, отмечено достоверное снижение содержания линолевой (18 : 2ω6) и эйкозатриеновой (20 : 3ω9) кислот (соответственно на 22,48 и на 57 %) при достоверном повышении содержания пальмитиновой (16 : 0), олеиновой (18 : 1ω9) и арахидоновой (20 : 4ω6) кислот. Снижение парци-

Таблица 1

Состав жирных кислот липидов плазмы крови у больных остеохондрозом в ходе применения РДТ ( $M \pm m$ )

Жирные кислоты	До лечения	В конце периода голодания	В конце восстановительного периода
12:0	0,05±0,01	0,07±0,01	0,06±0,01
14:0	1,10±0,09	0,75±0,05	1,08±0,07
15:0, 1 <sup>а</sup>	0,54±0,03	0,41±0,04	0,42±0,02
16:0	22,92±0,62	25,95±0,53**	23,60±0,47
16:1	3,85±0,31	2,73±0,34*	3,84±0,30
17:1	0,10±0,02	0,07±0,01	0,11±0,02
18:0	5,67±0,26	4,81±0,23	5,84±0,19
18:1	21,21±0,75	25,30±0,91**	22,94±0,82
18:2	28,74±1,12	22,28±1,08**	29,84±1,68
18:3	0,13±0,02	0,09±0,01	0,10±0,01
20:1	0,22±0,02	0,37±0,04	0,23±0,01
20:2	0,11±0,02	0,07±0,01	0,15±0,02
20:3	0,93±0,08	0,40±0,05***	0,68±0,06
20:4	7,67±0,68	10,36±0,59**	6,03±0,53
20:5	1,34±0,18	1,27±0,16	1,04±0,12
22:4 <sup>б</sup>	1,89±0,22	1,82±0,19	1,17±0,15
24:1+			
22:5	0,45±0,03	0,38±0,02	0,33±0,02
22:6	3,08±0,22	2,87±0,26	2,34±0,18*

Примечание. а—включая диметилацетал 16:0; б—в сумме кислот преобладает 22:4. Достоверность различий: одна звездочка— $p < 0,05$ , две— $p < 0,01$ , три— $p < 0,001$ .

Таблица 2

Состав жирных кислот липидов эритроцитарных мембран у больных в ходе применения РДТ

Жирные кислоты	До лечения	В конце периода голодания	В конце восстановительного периода
12:0	0,13±0,01	0,14±0,02	0,11±0,01
13:0	0,17±0,02	0,31±0,05*	0,26±0,04
14:0	1,01±0,12	1,21±0,18	1,37±0,17
15:0; 1+ <sup>a</sup>	2,50±0,21	2,25±0,18	2,28±0,23
ДМА 16:0			
16:0; 1 <sup>b</sup>	25,05±1,20	24,52±1,12	25,08±0,98
17:0+	1,03±0,09	1,46±0,12	1,44±0,11
18:0	12,53±0,64	12,95±0,35	11,79±0,45
18:1	14,27±0,58	15,21±0,70	15,53±0,62
18:2	9,35±0,55	7,13±0,51*	9,59±0,67
18:3+20:1 <sup>в</sup>	0,19±0,02	0,23±0,03	0,18±0,01
20:2	0,13±0,02	0,14±0,02	0,16±0,03
20:3	0,89±0,06	0,78±0,04	0,77±0,05
20:4	14,30±0,56	16,46±0,80*	13,93±0,74
20:5	1,18±0,11	0,99±0,10	0,85±0,08
22:4+24:0 <sup>г</sup>	5,25±0,40	5,01±0,33	5,78±0,53
24:1	3,27±0,31	3,08±0,28	2,87±0,22
22:5	2,65±0,16	2,22±0,18	2,32±0,15
22:6	6,10±0,58	5,92±0,55	5,69±0,47
Σ ПНЖК	38,89	37,76	38,02

Примечание. Примерное соотношение кислот в неполностью разделенных пиках: а) 1:2:1; б) 9:1; в) 1:2; г) 4:1. ДМА — диметилацетали.

альной доли отдельных жирных кислот, по-видимому, свидетельствует об их преимущественном использовании в условиях метаболической ситуации в организме, создаваемой при голодании. Связано ли преимущественное использование линолевой кислоты с расходом ее на энергетические нужды или оно является отражением интенсификации ее дальнейших метаболических превращений в более ненасыщенные длинноцепочечные жирные кислоты? Наблюдаемое наряду с уменьшением доли линолевой кислоты увеличение процентного содержания арахидоновой кислоты, продукта метаболизма первой, по нашим представлениям служит отражением процесса активизации метаболизма линолевой кислоты по пути превращения ее в более биологически активное соединение — арахидоновую кислоту. Последняя является субстратом для образования различных эйкозаноидов, участвующих в регуляции многих систем организма. Снижение содержания минорного компонента жирных кислот — эйкозатриеновой кислоты, которая в случае выраженного дефицита линолевой кислоты является заместителем арахидоновой, свидетельствует о том, что в данном случае этот механизм не проявлялся и организм обеспечивался собственными ресурсами для

достаточного синтеза арахидоновой кислоты. Увеличение содержания моноеновой кислоты 18:1ω9 может отражать компенсаторную реакцию на снижение содержания полиеновой линолевой кислоты, направленную на поддержание определенного уровня ненасыщенности жирных кислот плазмы. Все изменения жирнокислотного спектра, связанные с периодом полного голодания, почти или полностью нормализовались после 2 нед восстановительного периода.

Данные табл. 2 о составе жирных кислот липидов мембран эритроцитов свидетельствуют о менее выраженных изменениях уровня линолевой и арахидоновой кислот (при той же направленности, что и в жирнокислотном спектре липидов плазмы крови). Незначительные изменения в содержании других жирных кислот, отмеченные в период голодания, указывают на достаточную резистентность жирнокислотного спектра эритроцитов. Учитывая также относительное постоянство суммарной доли ПНЖК в липидах эритроцитарных мембран у обследованных больных, можно заключить, что в условиях применявшейся схемы РДТ не возникает дефицита полиненасыщенных жирных кислот в мембранах клеток, что обеспечивает их структурно-функциональную стабильность, а также нормальные условия для синтеза эйкозаноидов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Кокосов А. Н. // Опыт лечения бронхиальной астмы методом разгрузочно-диетической терапии. — Л., 1986. — С. 7—12.
2. Николаев Ю. С., Ромашов Ф. Н., Мионов В. А., Страхова Н. С. // Там же. — С. 63—66.
3. Тисленко А. Н., Каргер Е. А., Гучко Е. Е., Сарова М. А. // Там же. — С. 36—38.
4. Aloni B., Shinitzky M., Livne A. // Biochim. biophys. Acta. — 1974. — Vol. 348. — P. 438—441.
5. Folch J., Lees M., Sloan-Stanlye G. H. // J. biol. Chem. — 1957. — Vol. 226. — P. 497—506.
6. Hirono H., Suzuki H., Igarashi Y., Konno T. // Amer. J. clin. Nutr. — 1977. — Vol. 30. — P. 1670—1676.
7. Stoffel W., Chu F., Achrens E. H. // Analyt. Chem. — 1959. — Vol. 31. — P. 307—311.

Поступила 11.09.88

ALTERATION OF FATTY ACID COMPOSITION IN BLOOD PLASMA AND ERYTHROCYTES OF PATIENTS WITH OSTEOCHONDROSIS

I. I. Korf, T. A. Tsagikyan, V. A. Mescheryakova, M. M. Levachev, M. B. Arutyunova

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

Alteration of fatty acid composition was studied in blood plasma and erythrocytes of 14 patients with osteochondrosis under condi-

tions of relief-dietic therapy. During the period of full starvation distinct decrease in content of linoleic and eicosatrienic acids as well as an increase in content of palmitic, oleic and arachidonic acids were detected in blood plasma. Shifts in the ratio linolic/arachidonic acids towards an increase in content of arachidonic acid appear to occur as a result of adaptation to stress caused by hunger. These alterations in the fatty acid spectrum of blood plasma, observed during starvation, were normalized within two weeks of recreative dietotherapy. Deficiency in polyunsaturated fatty acids was not found in erythrocyte membranes under conditions of the relief-dietotherapy course used.

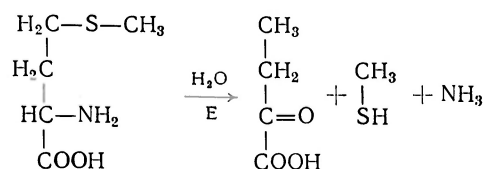
УДК 579.841.11:579.222].08

В. А. Занин, В. И. Лукина, Т. Т. Березов

ВЫДЕЛЕНИЕ, НЕКОТОРЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА L-МЕТИОНИН-Г-ЛИАЗЫ ИЗ PSEUDOMONAS TAETROLENS

Кафедра биохимии Университета дружбы народов им. Патриса Лумумбы, Москва

L-метионин-γ-лиаза (КФ 4.4.1.11) — пиридоксальфосфатсодержащий полифункциональный фермент, катализирующий реакции α, γ-элиминирования и β-замещения L-метионина и его производных, а также α, β-элиминирования и β-замещения L-цистеина и его производных [1, 4, 14]. Полифункциональность фермента была с успехом использована для синтеза оптически активных серо- и селеносодержащих аминокислот [4, 11]. В отношении L-метионина фермент осуществляет две независимые химические реакции — дезаминирование и демеркаптодеметилирование — по следующему уравнению:



L-метионин α-Кетомасляная Метан- Аммиак  
кислота тиол

Продукты реакции (α-кетобутират, метантиол и аммиак) образуются в эквимольных количествах [5, 14]. Действие фермента необратимо. Необратимость реакции распада незаменимой аминокислоты, достаточно высокая специфичность фермента дали основание для проверки противоопухолевого действия фермента.

В ряде лабораторий был продемонстрирован росттормозящий эффект очищенной L-метионин-γ-лиазы на

культуре клеток P815, карциносаркоме Уокера 256, лейкозных клетках L-8, лимфобластах линии L-5178Y и CCRF-HSB-2, показаны значительные нарушения реакции трансметилирования ДНК и РНК [6, 2, 15]. В качестве противоопухолевого препарата была использована L-метионин-γ-лиаза из Clostridium sporogenes [5, 7], Ps. putida AC-75 [8], Ps. putida IFO 3738 [7], метионин-γ-лиазной активностью обладает и ряд других микроорганизмов.

Цель работы — выделить и охарактеризовать некоторые каталитические свойства фермента из ранее охарактеризованного нами штамма — продуцента Ps. taetrolens с тем, чтобы в дальнейшем испытать его противоопухолевую активность, так как в случае практического использования необходимо иметь набор иммунологически различных белков.

Методика

Микроорганизм выращивали в течение 24 ч при 28°C на питательной среде следующего состава: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O — 0,1%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> — 0,1%, мочевины — 0,1%, глицерин — 0,6%, дрожжевой экстракт — 0,025%, пептон — 0,1%, MgSO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O — 0,01%, L-метионин — 0,25%, мясопептонный бульон — 0,02%, водопроводная вода, рН среды 7,2. Микрозные клетки, собранные после центрифугирования, дважды обрабатывали 10-кратным объемом охлажденного до -20°C ацетона, затем 3 объемами эфира и сушили при комнатной температуре до исчезновения запаха эфира. Полученный ацетоновый порошок хранили в холодильнике (8°C) в течение длительного време-

ни (больше 1 года) без значительного снижения активности.

Активность L-метионин-γ-лиазы в реакции α, γ-элиминирования определяли по приросту α-кетомасляной кислоты методом [13]. Концентрацию белка в растворах определяли методом [8].

Гомогенность полученного фермента проверяли методом вертикального электрофореза на пластинках фирмы "Pharmacia" в градиентном полиакриламидном геле (4—30 %) в 0,1 М трис-глициновом буфере pH 8,3 в течение 4 ч при напряжении 125 В и токе 60 мА. Пробы белков перед нанесением диализовали против 0,1 М трис-глицинового буфера. При окончании электрофореза гель фиксировали в 10 % трихлоруксусной кислоте в течение ночи, затем окрашивали 7 % раствором амидо черного в течение 15—30 мин и проявляли 7—10 % уксусной кислотой.

Молекулярную массу нативной L-метионин-γ-лиазы определяли электрофоретически. Условия проведения электрофореза, фиксация и окрашивание гелей аналогичны использованным при определении гомогенности фермента. Для определения молекулярной массы субъединиц электрофорез проводили в присутствии додецилсульфата натрия (ДС) [16]. Фермент и калибровочные белки подготавливали следующим образом: белки инкубировали в 0,01 М натрийфосфатном буфере pH 7,0, содержащем 1 % ДС и 1 % 2-меркаптоэтанола, в течение 5 мин при 100 °С. Электрофорез проводили в градиентном полиакриламидном геле, электродный буфер, 0,05 М натрийфосфатный pH 7,0, содержал 0,1 % ДС. Условия фиксации, окрашивания и проявления гелей аналогичны ранее описанным. Молекулярную массу находили по графику зависимости логарифма молекулярной массы от относительной подвижности белка.

Опыты по определению скорости седиментации проводили на аналитической центрифуге "Spinco" ("Blackman", США) с абсорбционной фотоэлектрической сканирующей системой. Коэффициент седиментации рассчитывали по методу [3].

Количество пиридоксальфосфата (ПФ), связанного с ферментом, определяли спектрофотометрически с 3-метил-2-бензотиазолинон-гидразонгидрохлоридом по методу [12]. Для этого препарат фермента предварительно освобождали от ПФ, не связанного с белком, на колонке с сефадексом G-25, уравновешенной дистиллированной водой, обрабатывали 0,1 н. HCl при 37 °С в течение 30 мин с последующим определением содержания ПФ при 380 нм.

Зависимость метноназной активности от pH определяли при 37 °С в диапазоне pH 4,5—10,5 при постоянной концентрации субстрата (0,05 М) и фермента (10 мкг/мл). В работе были использованы следующие буферные растворы: 0,05 М цитратный (pH 5,5—6,0), 0,05 М фосфатный (pH 6,0—8,0), 0,05 М пирофосфатный (pH 8,0—9,5), 0,05 М глицин-КОН (pH 9,5—10,5). При изучении зависимости стабильности L-метионин-γ-лиазы от pH раствор фермента (23 мкг/мл) выдерживали в течение 2 ч при 37 °С в указанных выше буферах и отбирали алликваты 60 мкл для определения активности. Температурный оптимум L-метионин-γ-лиазы устанавливали в 0,1 М К-фосфатном буфере pH 8,0 в пределах температур 25—80 °С.

## Результаты и обсуждение

**Экстракция.** 40 г ацетонового порошка клеток *Ps. taetrolens* суспендировали (1 : 30) в 0,02 М К-фосфатном буфере pH 7,2, содержащем 0,1 М KCl, 1 мМ ЭДТА, 0,02 мМ ПФ, 0,01 мМ фенолметилсульфонилфторид (ФМСФ), 0,01 % 2-меркаптоэтанола, 2 % этанола. Экстракцию проводили в течение 2—3 ч при перемешивании на магнитной мешалке. Затем экстракт центрифугировали при 18 000 об/мин, осадок отбрасывали. При экстракции фермента из ацетонового порошка не требуется предварительного разрушения клеток, использованного другими авторами при получении L-метионин-γ-лиазы, что значительно упрощает первую стадию очистки.

**Тепловая обработка.** К экстракту добавляли ПФ до конечной концентрации  $2 \cdot 10^{-4}$  М для стабилизации фермента, раствор прогревали при 60 °С в течение 10 мин, затем быстро охлаждали до 4 °С и образовавшийся осадок удаляли центрифугированием при 10 000—12 000 об/мин. Как видно из таблицы, тепловая обработка позволила отделить значительное количество балластных белков и пуклеиновых

### Очистка L-метионин-γ-лиазы из *Ps. taetrolens*

Стадия очистки	Общий белок, мг	Общая активность, Е	Удельная активность, Е/мг	Выход активности, %	Степень очистки
Исходный экстракт	7300	182	0,025	100	—
Термообработка	3271	163	0,05	90	2
Хроматография на ДЭАЭ-Тойперле 650 М	480	77	0,16	43	6,4
Гель-фильтрация на сефакиле S-300	230	69	0,3	38	12
Хроматография на ДЭАЭ-сефадексе А-50	24,5	23	1,1	13	44

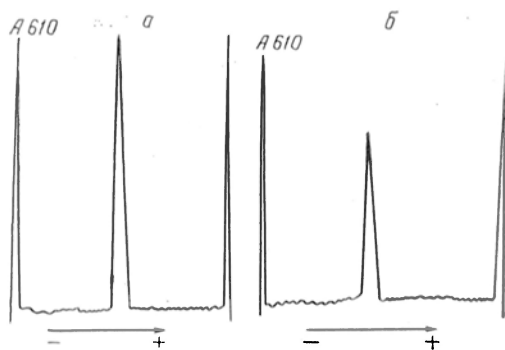


Рис. 1. Определение гомогенности L-метионин- $\gamma$ -лиазы методом электрофореза в градиентном полиакриламидном геле.

а — трис-глициновый буфер рН 8,3; б — Na-фосфатный буфер рН 7,0 в присутствии ДС.

кислот без значительной потери метиониназной активности.

**Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-Тойоперле 650М.** Полученный раствор белка наносили на колонку (4,4×20 см) с ДЭАЭ-Тойоперлом 650М, уравновешенную 0,02 М К-фосфатным буфером, содержащим 0,1 М КСl и все указанные ранее компоненты. Фермент элюировали исходным буфером со всеми добавками, используя ступенчатый градиент КСl (0,2, 0,3, 0,5 М). Основная активность фермента элюировалась 0,2 М КСl. Активные фракции объединяли и концентрировали высаливанием до 80 % насыщения сульфатом аммония. Эта стадия очистки позволила повысить удельную активность фермента в 6—7 раз.

**Гель-фильтрация на сефакилле S-300.** Осадок фермента растворяли в минимальном объеме 0,02 М пиродифосфатного буфера рН 8,3, содержащего 0,15 М КСl,  $2 \cdot 10^{-5}$  М ПФ, 0,01 мМ ЭДТА, 0,01 % 2-меркаптоэтанола, 0,1 мМ ФМСФ, 2 % этанола, и наносили на колонку (2,6×100 см) с сефакиллом S-300. Активный белок выходил из колонки пиком, который собирали и наносили на колонку с ДЭАЭ-сефадексом А-50. Стадия гель-фильтрации позволила повысить исходную удельную активность в 12—14 раз (до 0,3—0,35 ед/мг).

**Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-сефадексе А-50.** Раствор фермента после гель-фильтрации наносили на колонку (4,4×20 см) с ДЭАЭ-сефадексом А-50, предварительно уравновешенную 0,02 М пиродифосфатным

буфером рН 8,3, содержащим 0,15 М КСl и указанные ранее компоненты. После нанесения раствора фермента на колонку несорбирующийся белок элюировали исходным буфером до значения  $E_{280} = 0,060$ . Фермент элюировали ступенчатым градиентом КСl (0,25, 0,35, 0,5 М КСl). Метиониназная активность была обнаружена во фракциях, элюированных 0,35 М градиентом КСl. Фермент элюировался симметричным пиком.

Использованный метод выделения L-метионин- $\gamma$ -лиазы позволил очистить фермент в 44—45 раз и получить препарат L-метионин- $\gamma$ -лиазы, гомогенный по данным электрофореза в полиакриламидном геле (рис. 1), с удельной активностью 1,0—1,2 ед/мг при выходе 13—15 %.

Известен метод получения L-метионин- $\gamma$ -лиазы из *Ps. putida*, позволивший авторам получить гомогенный фермент в три стадии [9]. Однако использование этого метода в условиях нашей лаборатории для получения фермента из *Ps. taetrolens*, а также из *Ps. putida* во всех опытах приводило к получению препаратов, имеющих на электрофореграммах две полосы — основную, с метиониназной активностью, и минорную, в которой эта активность не обнаруживалась. Возможным объяснением этого явления может быть то, что в работе [9] использовали высокие ( $10^{-3}$  М) концентрации ингибиторов протеиназ — ФСМФ и тозилфенилаланинхлорметилкетон, которые не применялись нами при выделении ферментов. Известно, кроме того, что условия выращивания микроорганизмов, особенно состав среды, могут влиять на соотношение белков в микроорганизмах и, следовательно, на результаты выделения того или иного белка из данных клеток.

Нативная L-метионин- $\gamma$ -лиаза из *Ps. taetrolens* в 10 мМ К-фосфатном буфере, содержащем 0,1 М КСl, седиментирует с коэффициентом 8,75 S, близким к полученному для фермента из *Ps. putida* IFO 3738 — 8,5 S [14] и из *Ps. putida* ICR 3460 — 8,3 S [9].

Для определения содержания ПФ использовали гомогенный препарат L-метионин- $\gamma$ -лиазы с удельной активностью 1,1 ед/мг, не содержащий свободного ПФ. Количество ПФ равно 4 моль на 135 000 г, т. е. 4 моля ПФ связаны с 1 молем фермента в холо-



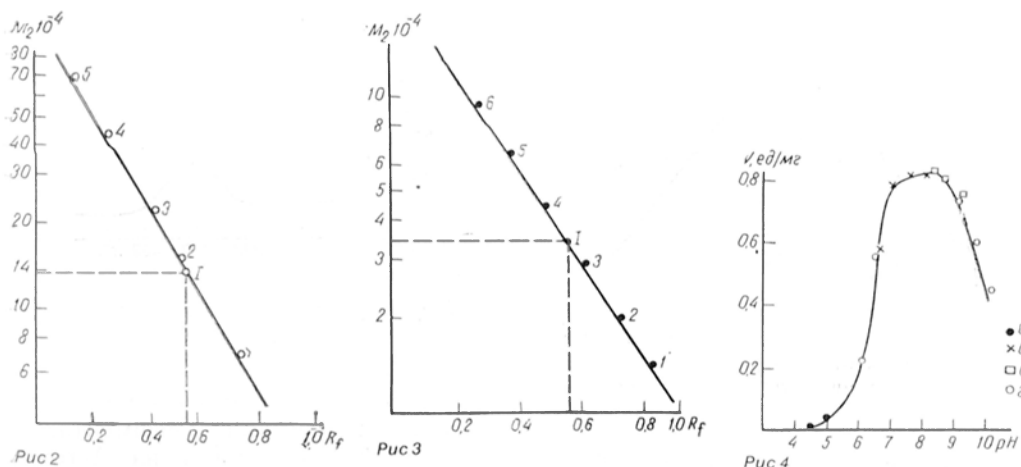


Рис. 2. Определение молекулярной массы нативной L-метионин-γ-лиазы (1) методом электрофореза в полиакриламидном геле.  
Маркеры: 1 — альбумин 67 кД; 2 — лактатдегидрогеназа 140 кД; 3 — каталаза 232 кД; 4 — ферритин 444 кД; 5 — тиреоглобулин 669 кД.

Рис. 3. Определение молекулярной массы субъединиц L-метионин-γ-лиазы (1) методом электрофореза в градиентном полиакриламидном геле в присутствии ДС.  
Маркеры: 1 — лактальбумин 14 кД; 2 — ингибитор трипсина 27 кД; 3 — карбоангидраза 30 кД; 4 — яичный альбумин 43 кД; 5 — бычий альбумин 67 кД; 6 — фосфоорилаза В 94 кД.

Рис. 4. Зависимость активности L-метионин-γ-лиазы от pH.  
а — 0,05 М цитратный буфер; б — 0,05 М фосфатный буфер; в — 0,05 М пирофосфатный буфер; г — 0,05 М глицин-КОН. Условия: [E] 10 мкг/мл, L-метионин [S] 50 мМ.

ферменте, аналогично тому, что было найдено для L-метионин-γ-лиазы из *Ps. putida* IFO 3738 [14] и *Aeromonas* sp. [10].

Молекулярная масса L-метионин-γ-лиазы из *Ps. taetrolens* по данным электрофореза в полиакриламидном геле составляет 135 кД (рис. 2), гель-фильтрация через сефадекс G-200 ( $1,6 \times 100$  см) дает значение молекулярной массы фермента 130 кД. В любом случае полученные значения заметно меньше, чем для фермента из других микроорганизмов.

Так, молекулярная масса фермента из *Clostridium* sp. составляет 150 кД [5], *Aeromonas* sp. — 159 кД [10], *Ps. putida* ICR 3460 — 165 кД [9], *Ps. putida* IFO 3738 — 180 кД [14].

При электрофорезе в полиакриламидном геле в присутствии ДС обнаружена одна полоса с молекулярной массой 34 кД (рис. 3). Полученные результаты показывают, что L-метионин-γ-лиаза из *Ps. taetrolens* в отличие от фермента из *Ps. putida* IFO 3738, состоящего из неидентичных субъединиц двух типов [14], имеет четыре идентичные субъединицы. По субъединичному составу фермент из *Ps. taetrolens* сходен с ферментом из

*Ps. putida* ICR 3460 и ферментом из *Aeromonas* sp. [9, 10], которые также состоят из четырех идентичных субъединиц.

Исследование зависимости активности L-метионин-γ-лиазы от pH показало, что в пределах pH 6,0—10,5 зависимость имеет колоколообразный характер с оптимумом pH в пределах 7,5—8,5 (рис. 4). Следовательно, по оптимуму pH и характеру зависимости активности от pH фермент из *Ps. taetrolens* не отличается от аналогичного фермента из других микроорганизмов. Кроме того, в этих экспериментах установлено, что природа буфера не оказывает существенного влияния на активность фермента. Исследование стабильности фермента при различных значениях pH показало, что после 2-часовой инкубации при 37°C, pH 7,5—8,5 активность фермента полностью сохраняется, тогда как при pH 5,0 и 10,0 активность фермента составляет соответственно 50 и 40% от первоначальной.

При исследовании влияния температуры на активность фермента отмечено, что максимальная его активность наблюдается при 70°C, а при 37°C активность L-метионин-γ-лиазы

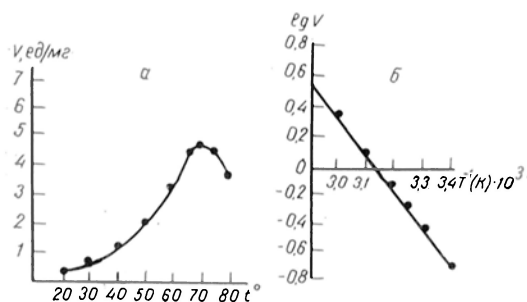


Рис. 5. Зависимость активности L-метионин-γ-лиазы от температуры.

*a* — определение температурного оптимума, *б* — энергии активации.

*Ps. taetrolens* составляет лишь 20 % от максимальной (рис. 5).

По зависимости активности от температуры фермент исследуемого микроорганизма идентичен L-метионин-γ-лиазе из *Aeromonas* sp. [10], но резко отличается от фермента из *Ps. putida* IFO 3738, активность которого заметно снижается уже при 60°C, а при 70°C фермент из этого микроорганизма инактивируется [14]. Изучение термостабильности фермента из *Ps. taetrolens* показало, что инкубация при температурах 30—50°C в течение 30 мин не влияет заметно на метиониназную активность фермента. При температуре выше 50°C наблюдается постепенное снижение активности, при 70°C сохраняется до 40—45% активности, но уже при 75°C наблюдается полная инактивация фермента (рис. 6). По термостабильности фермент из *Ps. taetrolens* отличается не только от фермента из *Clostridium* sp. [5] и из *Ps. putida* [9, 14], от которых он име-

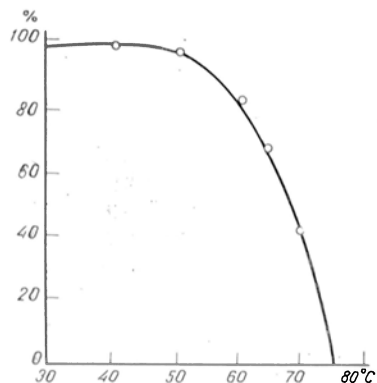


Рис. 6. Влияние температуры на стабильность фермента.

Условия: 0,1 М К-фосфатный буфер pH 8,0, инкубация 30 мин, [E] 50 мкг/мл, L-метионин [S] 50 мМ.

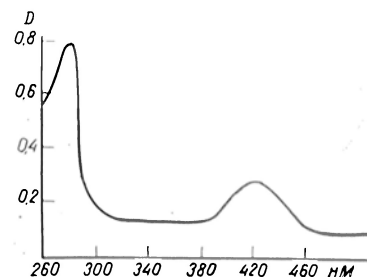


Рис. 7. Спектр поглощения нативной L-метионин-γ-лиазы.

ет отличие и по температуре, оптимальной для действия фермента, но и от L-метионин-γ-лиазы из *Aeromonas* sp. [10], с которым сходен по температурному оптимуму. Величина энергии активации составляет для L-метионин-γ-лиазы из *Ps. taetrolens* 61,4 Дж/моль для L-метионина.

При изучении спектральных свойств высокоочищенного препарата L-метионин-γ-лиазы обнаружены два максимума поглощения: при 280 и 420 нм (рис. 7).

Как известно, максимум поглощения при 420 нм характерен для ПФ-содержащих ферментов, в которых ПФ образует альдеминные комплексы с белком. Следует отметить, что спектр фермента из *Ps. taetrolens* обнаруживает полную идентичность со спектром фермента из *Ps. putida* ICR 3460 [9], но отличается от спектра фермента из *Ps. putida* IFO 3738 [14], в котором наблюдается «плечо» при 330 нм.

Таким образом, из микроорганизма *Ps. taetrolens* получен препарат L-метионин-γ-лиазы, гомогенный по данным электрофореза в полиакриламидном геле, очищенный в 44 раза. Выделенный из *Ps. taetrolens* фермент по некоторым свойствам (субъединичному строению, зависимости активности от pH, константе седиментации) сходен с аналогичным ферментом из других микроорганизмов и в то же время заметно отличается по молекулярной массе, термочувствительности, температуре, оптимальной для действия фермента.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Березов Т. Т. // Вестн. АМН СССР. — 1984. — № 8. — С. 11—24.
- Пехов А. А., Жукова О. С., Занин В. А. и др. // Бюл. exper. биол. — 1983. — № 9. — С. 83—84.

3. Черняк В. Н. // Физико-химические методы в молекулярной биологии. — М., 1978. — С. 65—95.
4. Esaki N., Tanaka H., Yamamoto T. et al. // Bull. Inst. chem. Res. (Kyoto). — 1981. — Vol. 59. — P. 321—331.
5. Kreis W., Hession K. // Cancer Res. — 1973. — Vol. 33. — P. 1862—1865.
6. Kreis W., Hession K. // Ibid. — P. 1866—1869.
7. Kreis W., Baker A., Ryan V. et al. // Ibid. — 1980. — Vol. 40. — P. 634—641.
8. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
9. Nakajama T., Esaki N., Sugie K. et al. // Analyt. Biochem. — 1984. — Vol. 138. — P. 421—424.
10. Nakajama T., Esaki N., Woonn-Joo Lee et al. // Agricult. biol. Chem. — 1984. — Vol. 48. — P. 2367—2369.
11. Soda K., Tanaka H., Esaki H. // Trends Biochem. Sci. — 1983. — Vol. 8. — P. 214.
12. Soda K., Yoriuji T., Misono H., Moriguchi M. // Biochem. J. — 1969. — Vol. 114. — P. 629—633.
13. Soda K. // Analyt. Biochem. — 1968. — Vol. 25. — P. 228—233.
14. Tanaka H., Esaki N., Soda K. // Biochemistry (Wash.). — 1977. — Vol. 16. — P. 100—106.
15. Tautt J., Letowska M., Hay M., Kozirowska J. // Biochem. Pharmacol. — 1982. — Vol. 31. — P. 2533—2555.
16. Weber K., Osborn M. // J. biol. Chem. — 1969. — Vol. 244. — P. 4406—4411.

Поступила 15.01.88

#### ISOLATION, SOME PHYSICO-CHEMICAL AND CATALYTIC PROPERTIES OF L-METHIONINE $\gamma$ -LYASE FROM *PSEUDOMONAS TAETROLENS*

V. A. Zanin, V. I. Lukina, T. T. Berezov

Chair of Biochemistry, P. Lumumba People's Friendship University, Moscow

Homogenous preparation of L-methionine  $\gamma$ -lyase was isolated from *Ps. taetrolens*. As shown by gel filtration and gradient polyacrylamide gel electrophoresis molecular mass of the native L-methionine  $\gamma$ -lyase was 130-135 kDa. Polyacrylamide gel electrophoresis in presence of 0.1% SDS showed that L-methionine  $\gamma$ -lyase proved to be a tetramer, which consisted of identical subunits with a molecular mass of 34 kDa. Pyridoxal-5'-phosphate was bound to the enzyme in the ratio of four moles of the cofactor per a mole of protein. The absorption spectrum of the enzyme exhibited maximal values at 420 nm, which is specific for a number of pyridoxal phosphate-containing enzymes. L-methionine  $\gamma$ -lyase from *Ps. taetrolens* was found to be dissimilar in its physico-chemical and catalytic properties to the same enzymes from other sources.

УДК 616.98:579.842.14]-07:616.36-008.931-092.9

М. Э. Краковский, А. Х. Аширметов, Э. И. Мусабаев, Л. Г. Алиева

### СОСТОЯНИЕ МОНООКСИГЕНАЗНОЙ ФЕРМЕНТНОЙ СИСТЕМЫ ПЕЧЕНИ ПРИ САЛЬМОНЕЛЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ У КРЫС

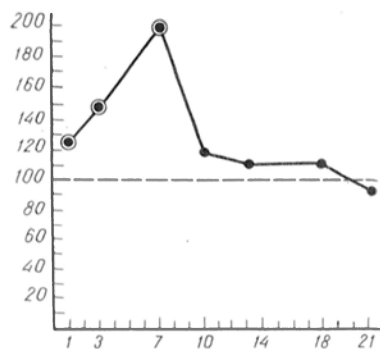
ЦНИЛ Ташкентского медицинского института

Сальмонеллезная инфекция является тяжелым заболеванием, нередко приводящим к летальному исходу. Как правило, при сальмонеллезе нарушаются функции практически всех органов и систем организма вследствие развивающейся при этом интоксикации [3, 9]. Известно, что детоксикационные потенции в основном определяются функционированием монооксигеназной ферментной системы печени. Однако в доступной литературе мы не обнаружили работ, посвященных изучению состояния этой системы при сальмонеллезе.

#### Методика

В экспериментах использовали белых крыс-самцов (72) смешанной популяции, содержащихся в виварии на стандартном лабораторном рационе. Сальмонеллезную инфекцию вызывали путем перорального введения куль-

туры *S. typhimurium* (штамм 1244) в количестве 2 млрд микробных тел в 1 мл на 1 животное. Для суждения о состоянии монооксигеназной системы (МОС) печени *in vivo* использовали гексеналовый тест [6]. Гексенал вводили внутривенно в дозе 100 мг/кг. О продолжительности сна судили по времени нахождения крыс в боковом положении. Исследования проводили через 1, 3, 7, 10, 14, 18 и 21 день после заражения животных. Для изучения активности отдельных компонентов МОС животных через 7 и 21 день после заражения сальмонеллами забивали декапитацией в холодной комнате при температуре 0—4 °С. Печень извлекали, промывали холодной средой выделения, состоящей из 0,25 М сахарозы, 0,05 М КСl, 0,05 М трис-НСl (рН 7,4). Микросомальную фракцию выделяли методом дифференциального центрифугирования на центрифуге VAC-601. Определяли содержание цитохромов P-450 и b<sub>5</sub> [18,], активность N-деметилазы амидопиррина [7], гидроксеназы анилина [2], НАДФ-Н-цитохром-с-редуктазы [17], микросомального белка [16]. Результаты экспериментов обрабатывали методом вариационной статистики на микрокалькуляторе МК-52 по программе [10].



Продолжительность гексеналового сна у крыс с сальмонеллезной инфекцией.

По оси абсцисс — срок после заражения (в днях); по оси ординат — продолжительность сна (в % к контролю). Пунктирная линия — контроль; кружки — статистически значимые различия при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что через 1 сут после заражения у крыс наблюдались жидкий стул, некоторая вялость, взъерошенность шерсти, снижение аппетита. Постепенно эти симптомы нарастали, достигая максимальной выраженности на 7-е сутки эксперимента. Смертность от сальмонеллеза составила в среднем 40 %, причем гибель животных наблюдалась в течение 14 сут от момента заражения. Продолжительность гексеналового сна существенно возрастала через 3 сут после заболевания животных сальмонеллезом и достигала максимума на 7-е сутки эксперимента, превышая уровень контроля на 99,2 % (см. рисунок). Статистически значимое увеличение времени гексеналового сна сохранялось до 7-х суток эксперимента. В последующие сроки продолжительность сна уменьшалась и к 21-му дню опыта была несколько

ниже контрольных значений. Поскольку гексеналовый тест отражает общую активность ферментов МОС печени, естественно было ожидать, что активность ее отдельных компонентов также изменится. Действительно, на 7-е сутки исследования содержание цитохромов P-450 и  $b_5$  снижалось на 50 и 52 %, а активность N-деметилазы амидопирина, гидроксилазы анилина и НАДФ·Н-цитохром-с-редуктазы уменьшалась на 36,5, 57, 31 % соответственно (см. таблицу). На 21-е сутки после возникновения сальмонеллеза у крыс содержание цитохромов и активность указанных ферментов незначительно превышали уровень контроля.

Следовательно, в период разгара сальмонеллезной инфекции наблюдается существенное угнетение активности МОС печени, наиболее выраженное к концу 1-й недели заболевания, что соответствует и максимальной смертности среди подопытных животных. Обращает на себя внимание более выраженное угнетение активности гидроксилазы анилина по сравнению с активностью N-деметилазы амидопирина. Согласно данным работы [13], активность N-деметилазы амидопирина подвержена значительным колебаниям в зависимости от физиологического состояния организма, обусловленного гормональным фоном, в то время как активность гидроксилазы анилина мало изменяется в зависимости от уровня гормонов, медиаторов и других веществ, а также при ряде патологических состояний, но резко снижается под воздействием фосфорилаз [15]. По данным ряда авторов, активация фосфорилаз в организме происходит при гипоксии, эндотоксинемии, а также при некоторых

Биохимические показатели микросом печени крыс в динамике экспериментальной сальмонеллезной инфекции (ЭСИ)

Группа	Цитохром, нмоль на 1 мг белка		N-деметилаза амидопирина, нмоль НСОН/мг/мин	Гидроксилаза анилин, нмоль-л-аминофенола/мг/мин	НАДФ·Н-цитохром-с-редуктаза, нмоль/мг/мин
	P450	$b_5$			
Контроль	$0,60 \pm 0,028$	$0,45 \pm 0,026$	$2,1 \pm 0,12$	$0,72 \pm 0,027$	$90,4 \pm 2,85$
ЭСИ, 7 сут	$0,30 \pm 0,030$	$0,22 \pm 0,018$	$1,33 \pm 0,08$	$0,31 \pm 0,062$	$62,5 \pm 2,33$
<i>p</i>	$< 0,001$	$< 0,001$	$< 0,001$	$< 0,001$	$< 0,001$
ЭСИ, 21 сут	$0,64 \pm 0,040$	$0,33 \pm 0,037$	$1,90 \pm 0,084$	$0,79 \pm 0,038$	$85,1 \pm 2,52$
<i>p</i>	$> 0,1$	$< 0,05$	$> 0,1$	$> 0,1$	$> 0,1$

инфекционных заболеваниях [1, 19]. Поскольку при сальмонеллезе в организме развивается целый комплекс патологических реакций, сопровождающихся угнетением кровотока в печени, гипоксией, нарушением процессов энергообеспечения гепатоцитов, усилением процессов перекисного окисления липидов, угнетением ЦНС [3, 5, 8, 9], аналогичный таковому при введении эндотоксинов *E. coli* и *S. typhimurium* [12, 14, 20] и обуславливающий активацию фосфорилаз, можно заключить, что эндотоксинемия служит основной причиной угнетения активности ферментов МОС в печени. По данным ряда исследователей, эндотоксины микробов, в частности *E. coli*, способны непосредственно снижать содержание цитохрома P-450, а также угнетать активность других микросомальных ферментов [11, 21]. Известно, что основным компонентом МОС является цитохром P-450, от содержания которого во многом зависит активность всей системы в целом.

Полученные нами результаты, свидетельствующие о резком снижении содержания этого гемопротейна в разгар сальмонеллезной инфекции, позволяют предположить, что патогенетические механизмы этого явления при сальмонеллезе и при воздействии на организм эндотоксинов микробного происхождения имеют общую основу. Некоторое увеличение активности ферментов в стадии реконвалесценции сальмонеллеза, вероятно, отражает процессы избыточного анаболизма, возникающие в ответ на альтерацию и обусловленные активацией генетического аппарата клеток [4].

Таким образом, при сальмонеллезной инфекции у крыс в разгар заболевания наблюдается угнетение МОС печени, в основе которого, вероятно, лежит эндотоксинемия. В фазе реконвалесценции наблюдается незначительная индукция ферментов МОС.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Алсенко А. В., Андреева Л. Б., Слесарева Л. Д., Биленко М. В. // Структура, биосинтез и превращение липидов в организме животного и человека. — Л., 1978. — С. 19.
2. Арчаков А. И., Карузина Н. И., Тверитинов В. Н. и др. // Биохимия. — 1975. — Т. 40, № 1. — С. 32—39.
3. Блогер А. Ф., Новицкий И. Н., Терехова З. Ф. Сальмонеллез. — Рига, 1975.
4. Меерсон Ф. З. Пластическое обеспечение функций организма. — М., 1967.
5. Минсберг Ц. Я. Сальмонеллез тифимурium. — Кишинев, 1984.
6. Михайлец Г. А., Лисочкин Б. Г., Крылова И. Б. и др. // Фармакологическая регуляция регенераторных процессов. — Йошкар-Ола, 1979. — С. 222—224.
7. Попов П. // Экспер. мед. и морфол. — 1973. — Т. 12, № 3. — С. 130—135.
8. Хаджиев К. Х., Чирко Ю. Г. // Кишечные, зоонозные, вирусные и другие инфекции. — Ташкент, 1987. — С. 251—252.
9. Шур И. В. Заболевания сальмонеллезной этиологии. — М., 1970.
10. Юрах Е. М., Зозуляк Е. И., Пицук Р. Л., Герзанич И. И. // Врач. дело. — 1985. — № 11. — С. 114—117.
11. Egawa K., Yoshida M., Sakaino R., Kasai N. // Microbiol. a. Immunol. — 1984. — Vol. 28. — P. 1181—1190.
12. Ivanov V., Velkov D. L., Georgiev I. A., Angelov G. A. // Докл. Болг. АН. — 1984. — Т. 37. — С. 1241—1243.
13. Kato R. // Pharmacol. Ther. — 1979. — Vol. 6. — P. 41—98.
14. Kunitomo F., Morita T., Ogawa R., Fujita T. // Circulat. Shock. — 1987. — Vol. 21. — P. 15—22.
15. Lang M., Laitinen M., Hietanen E., Vainio H. // Acta pharmacol. (Kbh). — 1976. — Vol. 39. — P. 273—288.
16. Lowry C. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
17. Mazel P. // Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition. — Baltimore, 1971. — P. 546—590.
18. Omura T., Sato R. // J. biol. Chem. — 1964. — Vol. 239. — P. 2370—2378.
19. Shakir K. M. M., O'Brian I. T., Gartner S. I. // Metabolism. — 1985. — Vol. 34. — P. 176—182.
20. Shibayama Yuro // J. Path. — 1987. — Vol. 151. — P. 315—321.
21. Williams I. F. // Immunobiology and Immunopharmacology of Bacterial Endotoxins. — Tampa — New York, 1986. — P. 159—169.

Поступила 09.02.88

#### THE STATE OF MONOOXYGENASE ENZY-MATIC SYSTEM IN RAT LIVER TISSUE IN SALMONOLLOSIS INFECTION

M. E. Krakovsky, A. Kh. Ashirmetov, E. I. Mubabaev, L. G. Alieva

Medical School, Tashkent

Content and activity of microsomal cytochromes P<sub>450</sub> and b<sub>5</sub>, amidopyrine N-demethylase, aniline hydroxylase, NADPH cytochrome c reductase were studied in liver tissue of rats with salmonellosis. Distinct inhibition of the liver monooxygenase enzymatic system was detected during the acute period of the disease; its normalization was complete within the convalescence period. Endotoxinemia appears to be mainly responsible for alterations in the microsomal enzymes activity observed.

Э. Г. Серебренникова

## РОЛЬ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ФОСФОЛИПИДОВ РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНОВ БЕЛЫХ КРЫС В ФОРМИРОВАНИИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ГЛУБОКОМУ МНОГОКРАТНОМУ ПЕРЕОХЛАЖДЕНИЮ

Кафедра биохимии Дагестанского медицинского института, Махачкала

Химический состав липидов, входящих в клеточные мембраны, играет важную, а в некоторых случаях ведущую роль в функционировании мембран. Изменение жирнокислотного состава фосфолипидов воздействует на интенсивность ряда обменных процессов. Изучению модуляции жирных кислот липидов теплокровного организма может дать возможность по-новому интерпретировать данные о воздействии низких температур на живые организмы. Белки, способные под влиянием температуры перестраиваться, не обнаружены, в то время как фазовые переходы в фосфолипидах перекрывают весь диапазон температур, совместимых с жизнью. Липиды, особенно жирные кислоты, называют молекулами адаптации.

Настоящая работа посвящена изучению изменений жирнокислотного состава фосфолипидов миокарда, скелетных мышц, легких, печени у белых крыс при одно- и многократном глубоком переохлаждении.

### Методика

Адаптацию к переохлаждению вызывали повторно (16 раз), охлаждая животных в ванне с водой при температуре 2—4 °С и снижая ректальную температуру к концу каждого охлаждения до 19—20 °С.

Охлаждение проводили без применения наркотических средств, согревание — самостоятельное при комнатной температуре. Интервалы между охлаждениями 3—4 дня. Животных декапитировали и липиды экстрагировали из органов по методу Фолча. Фосфолипиды выделяли методом тонкослойной хроматографии. Метилловые эфиры жирных кислот анализировали методом газожидкостной хроматографии на хроматографе «Цвет-5».

### Результаты и обсуждение

В фосфолипидах скелетных мышц и других органов преобладают насыщенные жирные кислоты — пальмитиновая и стеариновая. Среди ненасыщенных кислот в значительном ко-

личестве обнаружена олеиновая. Острая однократная гипотермия вызвала увеличение ненасыщенности липидов. Более чем в 18 раз увеличилось содержание линолевой, в 5 раз — арахидоновой, в 3 раза — олеиновой кислот (табл. 1). Среди насыщенных кислот значительно уменьшилось содержание пальмитиновой (с 44,3 до 12,0 %).

После многократного охлаждения жирнокислотный состав во многом оставался таким же, как и при остром однократном переохлаждении. Уровень линолевой и арахидоновой кислот был высоким (12,7 и 11,6 % соответственно), но содержание докозеновых кислот (C<sub>22:4</sub>, C<sub>22:5</sub>, C<sub>22:6</sub>) уменьшилось в 2 раза (с 11,3 до 5,5 %). Содержание пальмитиновой кислоты увеличилось почти в 3 раза (32,3 %), но оставалось меньше, чем у интактных животных. Однако у животных, перенесших многократное переохлаждение, реакция на острое охлаждение была выражена в меньшей мере, чем у интактных: у них умеренно снизился уровень пальмитиновой кислоты (до 26,4 %), по-прежнему осталось высоким содержание линолевой и арахидоновой кислот, увеличилось содержание докозагексасиновой кислоты.

Можно думать, что однократная острая гипотермия в фосфолипидах скелетных мышц вызвала стресс-реакцию, повлекшую за собой оптимальную перестройку жирнокислотного состава, которая закрепилась при последующих многократных переохлаждениях, явившись таким образом основой для формирования адаптационного механизма к переохлаждению в скелетной мускулатуре.

Иная картина наблюдалась в фосфолипидах миокарда, которые у интактных животных характеризуются высокой степенью насыщенности, что обусловлено высоким содержанием стеариновой и пальмитиновой кислот

Таблица 1

Изменение жирнокислотного состава фосфолипидов миокарда и скелетных мышц у крыс под влиянием переохлаждения (в % от общего содержания)\*

Жирная кислота	Группа животных								
	1-я	2-я	3-я	4-я	1-я	2-я	3-я	4-я	
	миокард				скелетные мышцы				
Гексадекановая	16:0	23,0	21,7	17,1	18,3	44,3	12,0	32,3	26,4
Гексадекаеновая	16:1	0,3	0,3	0,2	0,5	1,4	3,1	1,2	1,4
Гептадекановая	17:1	1,1	0,5	0,6	0,4	0,9	0,9	0,5	0,4
Гептадекаеновая	17:1	0,6	0,5	0,5	0,2	1,3	0,4	0,7	1,1
Октодекановая	18:0	46,0	57,4	33,0	30,5	22,0	21,5	22,6	18,4
Октодекаеновая	18:1	5,6	1,4	5,3	6,5	4,5	16,4	10,1	9,9
Октодекадиеновая	18:2	0,9	0,9	8,5	13,2	0,8	14,8	12,7	14,9
Эйкозановая	20:0	1,8	0,7	0,3	0,5	0,4	0,4	0,2	0,1
Нонадекановая	19:0	1,0	0,1	0,1	0,02	0,1	0,2	0,2	0,9
Эйкозаеновая	20:1	2,2	0,4	0,3	0,2	0,3	0,3	0,4	0,3
Эйкозадиеновая	20:2	0,6	0,2	0,3	0,5	1,3	0,4	0,1	0,2
Эйкозатриеновая	20:3	0,3	0,6	0,5	0,6	0,8	0,7	0,3	0,7
Эйкозатетраеновая	20:4	1,1	1,2	19,8	21,8	2,5	12,5	11,6	13,5
Докозановая	22:0	4,0	1,6	0,5	0,2	0,4	0,5	1,4	0,2
Докозаеновая	22:1	0,9	0,7	0,11	0,4	1,8	0,9	0,2	1,5
Докозатриеновая	22:3	0,5	0,9	0,4	0,09	1,2	2,6	1,1	1,3
Докозатетраеновая	22:4	4,1	6,1	1,8	0,9	2,4	1,4	1,1	0,6
Докозапентаеновая	22:5a	1,4	1,2	0,5	0,9	2,2	0,9	0,6	0,6
	22:5b	1,5	0,6	2,5	0,7	2,0	1,8	0,6	0,7
Докозагексаеновая	22:6a	—	1,0	1,7	2,0	3,5	1,7	1,4	0,9
	22:6b	—	0,7	4,4	0,5	1,4	3,7	0,7	5,3

Примечание. Здесь и в табл. 2: звездочка — приведены средние данные трех хроматограмм. Группы животных (белые крысы): 1-я — контрольные, 2-я — однократно охлажденные (забой в состоянии гипотермии); 3-я — многократно охлажденные (забой в состоянии нормотермии), 4-я — многократно охлажденные (забой в состоянии гипотермии).

(46,6 и 23,0 % соответственно). Острая однократная гипотермия вызвала еще большее увеличение насыщенности липидов (в отличие от скелетных мышц, где у этой группы животных, напротив, увеличилась ненасыщенность липидов). В липидах миокарда количество насыщенных жирных кислот достигло 82,0 %, в основном за счет стеариновой кислоты. Наблюдались и выраженные изменения полиеновых кислот: увеличилось количество арахидоновой кислоты и появилась не обнаруженная у интактных животных докозагексаеновая кислота. После многократного переохлаждения снизилась насыщенность липидов. Количество ненасыщенных жирных кислот возросло до 47,5 %. Увеличилось содержание арахидоновой (в 19 раз) линолевой (в 9 раз), докозагексаеновой (в 4 раза) кислот. Содержание насыщенных кислот, напротив, снизилось, особенно стеариновой кислоты (до 33,0 %).

У многократно охлажденных животных по сравнению с однократно охлажденными отмечены более резкое увеличение содержания линолевой (до 13,2 %) и арахидоновой (до

21,8 %) кислот и уменьшение (в 2,5 раза) количества докозагексаеновой кислоты.

Повышение уровня стеариновой кислоты (до 57,4 %) у однократно охлажденных животных и последующее его снижение после многократного переохлаждения (до 33,0—30,5 %) свидетельствуют, по-видимому, что стеариновая кислота является одним из исходных субстратных резервов, за счет которого и смог сформироваться приспособительный адаптационный механизм в миокарде, давший возможность животным выжить в столь выраженных экстремальных ситуациях.

Показано, что при перевозбуждении сердца смертность крыс значительно снижается, если в сердце содержится много арахидоновой кислоты [4]. Образующиеся из нее простагландины, как полагают, уменьшают степень захвата сердечной мышцей адреналина. Кроме того, из арахидоновой кислоты образуется простаглицлин, вызывающий расширение сосудов и предотвращающий образование тромбов [7].

В состоянии нормотермии содержание линолевой и арахидоновой кис-

лот в фосфолипидах как миокарда, так и скелетных мышц очень невелико (0,9—0,8 и 1,1—2,5 % соответственно), однако многократное переохлаждение вызвало резкое (в 10—20 раз) повышение уровня этих кислот. Столь значительное повышение содержания кислот, относящихся к группе незаменимых, объясняется, по-видимому, их перераспределением в липидных фракциях.

Показано [3], что гипотермия активизирует фосфолипазу  $A_2$ . Следовательно, перенос ненасыщенных жирных кислот в фосфолипидную фракцию обеспечивает не только переход клеточной мембраны на новый функциональный уровень, но и возможность снабжения ткани свободными жирными кислотами, участвующими в целом ряде метаболических процессов, обеспечивающих жизнедеятельность организма в длительно действующих стрессорных ситуациях [2, 4].

Повышение содержания линолевой кислоты в миокарде и скелетных мышцах в значительной степени объясняется, по-видимому, не только тем, что она является предшественником простагландинов, но и тем, что линолевая кислота, как и продукты ее перекисного окисления, разобщают окислительное фосфорилирование [1], повышая  $H^+(OH^-)$  проницаемость липидного компонента мембраны митохондрий. Это ведет к рассеиванию дополнительной энергии в виде тепла, что в значительной степени уменьшает повреждающее действие холода.

Увеличение содержания линолевой и арахидоновой кислот в фосфолипидах миокарда сопровождалось образованием довольно большого количества докозагексаеновой кислоты (6,1 %), не выявленной нами у интактных животных. Известно, что докозагексаеновая кислота блокирует переход арахидоновой кислоты в простагландины. Надо полагать, что, когда в многократно охлажденном организме, находящемся в состоянии нормотермии, для обеспечения жизнедеятельности в экстремальных условиях, ставших уже привычными, накапливается очень большое количество арахидоновой кислоты, появляется угроза наводнения клетки образующимися из нее простагландинами, что может дать отрицательный эффект. Во избежание этого клетка, по-

видимому, синтезирует докозагексаеновую кислоту, блокирующую простагландинциклооксигеназу. У многократно охлажденных животных в состоянии гипотермии, напротив, на фоне высокого содержания линолевой и арахидоновой кислот (13,2 и 21,8 % соответственно) уровень докозагексаеновой кислоты значительно снижается (2,5 %). Это, очевидно, «деблокирует» реакцию циклизации арахидоновой кислоты и позволяет миокарду свободно справиться с экстремальной ситуацией и таким путем повысить устойчивость к переохлаждению.

В фосфолипидах печени интактных (контрольных) животных пул ненасыщенных жирных кислот характеризовался высоким содержанием полиеновых кислот (31,5 %), среди которых преобладала арахидоновая (26,6 %) (табл. 2). Столь высокого содержания арахидоновой кислоты мы не наблюдали ни в одном из исследованных нами органов интактных животных, как и высокого уровня линолевой кислоты (6,0 %). Обращает на себя внимание также большое количество стеариновой кислоты (32,2 %). Острое однократное переохлаждение вызвало некоторое повышение уровня пальмитиновой кислоты (с 15,9 до 19,8 %) и уменьшение содержания стеариновой кислоты. Содержание олеиновой и докозагексаеновой кислот незначительно увеличилось, а эйкозатетраеновой кислоты резко уменьшилось (с 26,6 до 17,8 %).

Многократное переохлаждение сформировало картину жирнокислотного состава, аналогичную таковой при однократном переохлаждении, но количественные изменения были более выраженными: содержание пальмитиновой кислоты увеличилось в 2 раза (до 31,6 %), стеариновой — уменьшилось в 2 раза (до 15,4 %), олеиновой и линолевой кислот увеличилось умеренно, а докозагексаеновой — значительно (до 7,1 %) и только уровень эйкозатетраеновой (арахидоновой) кислоты снизился еще больше — до 14,7 %. Это привело к тому, что общее количество полиеновых кислот изменилось незначительно.

Однако острая гипотермия сформировала у адаптированных животных картину жирнокислотного состава, приближавшуюся к таковой у интактных животных. Исключение составила



Таблица 2

Изменение жирнокислотного состава фосфолипидов легких и печени у крыс под влиянием переохлаждения (в % от общего содержания)\*

Жирная кислота		Группа животных							
		1-я				2-я			
		1-я	2-я	3-я	4-я	1-я	2-я	3-я	4-я
		легкие				печень			
Гексадекановая (пальмитиновая)	16:0	33,3	35,3	54,0	43,4	15,9	19,8	31,6	15,0
Гексадекаеновая (пальмитолеиновая)	16:1	1,6	2,9	2,2	2,9	1,2	1,4	1,2	1,1
Гептадекановая (маргаритиновая)	17:0	0,5	0,3	0,2	0,2	0,9	0,6	0,2	0,2
Гептадекаеновая	17:1	1,1	0,1	0,56	0,3	0,7	0,2	0,4	0,2
Октадекановая (стеариновая)	18:0	18,0	18,3	7,47	15,9	32,2	30,9	15,4	25,9
Октадекаеновая (олеиновая)	18:1	18,3	17,1	7,0	10,3	7,0	7,8	10,0	8,4
Октадекадиеновая (линолевая)	18:2	4,9	3,8	4,13	4,9	6,9	8,6	8,4	11,8
Эйкозановая	20:0	0,6	0,6	0,14	0,7	0,2	0,2	0,5	0,2
Нонадекановая	19:0	0,7	0,1	0,17	0,4	0,5	0,2	0,2	0,4
Эйкозаеновая	20:1	0,4	1,2	0,33	0,3	0,1	0,4	1,5	0,3
Эйкозадиеновая	20:2	0,2	0,3	0,1	1,0	1,1	0,5	0,4	0,18
Эйкозатриеновая	20:3	0,5	0,5	0,23	0,6	1,1	0,8	0,9	1,04
Эйкозатетраеновая (арахидиновая)	20:4	7,8	7,1	10,0	7,8	26,6	17,8	14,7	26,29
Докозановая	22:0	0,8	1,9	3,87	1,3	0,3	0,7	0,5	0,5
Докозаеновая	22:1	2,1	1,11	0,1	1,4	0,5	0,6	0,8	0,3
Докозадиеновая	22:2	0,3	0,5	0,12	0,3	0,8	0,3	0,9	0,33
Докозатриеновая	22:3	2,4	2,0	2,1	1,5	0,4	2,3	0,9	0,41
Докозатетраеновая	22:4	2,4	2,8	1,7	2,4	0,1	0,4	1,1	0,43
Докозапентаеновая	22:5a	0,4	0,7	0,33	1,2	0,6	1,5	0,9	1,45
	22:5b	1,7	0,3	0,71	0,2	1,6	1,0	1,3	1,58
Докозагексаеновая	22:6a	1,0	1,5	0,4	1,5	0,7	1,0	5,0	1,13
	22:6b	0,5	0,4	1,3	0,5	0,7	1,8	2,1	4,13

линолевая кислота, содержание которой увеличилось почти в 2 раза (до 11,6 %) по сравнению с показателем интактных животных и докозагексаеновая (4,13 %, у интактных 1,0 %).

Такая ответная реакция адаптированных животных на острую гипотермию свидетельствует о переходе метаболизма печени на новый функциональный уровень, обеспечивающий возможность другим жизненно важным органам приспособиться к неблагоприятным стрессорным условиям существования. Учитывая, что почти половина (42 %) всех жирных кислот организма животного синтезируется в печени, можно предположить, что столь выраженное снижение содержания в печени у адаптированных животных стеариновой и арахидиновой кислот вызвано усилением захвата этих кислот другими органами — миокардом и скелетными мышцами.

Обращает на себя внимание значительное увеличение содержания линолевой и докозагексаеновой кислот,

что может указывать на возможность печени синтезировать эти кислоты, так как влияние на их увеличение пищевого фактора полностью исключается. Это может быть только результатом переохлаждения. Однако такое предположение требует дополнительных исследований.

Фосфолипиды ткани легких характеризовались преобладанием насыщенных жирных кислот (54,3 %), особенно, как и во всех исследованных нами органах, пальмитиновой и стеариновой (33,0 и 18,0 % соответственно). Острая однократная гипотермия вызвала незначительное изменение жирнокислотного состава — тенденцию к увеличению содержания насыщенных жирных кислот (за счет пальмитиновой). Однако многократное переохлаждение вызвало значительное увеличение содержания пальмитиновой кислоты (до 54,0 %). Среди ненасыщенных жирных кислот несколько повысился уровень арахидиновой кислоты (с 7,8 до 10,0 %), а содержание

оленовой кислоты уменьшилось более чем в 2 раза, докозапентаеновой — в 2 раза. Острая гипотермия многократно охлажденных животных сформировала картину жирнокислотного состава, имевшую выраженную тенденцию к нормализации состава жирных кислот: содержание почти всех жирных кислот приближалось к исходному, однако уровень пальмитиновой кислоты по-прежнему оставался высоким (43,4 %).

Такое изменение жирнокислотного состава фосфолипидов легочной ткани, по-видимому, является оптимальным для обеспечения нормального функционирования легких в указанных экстремальных условиях. Повышенный синтез пальмитиновой кислоты свидетельствует о перестройке сурфактантной системы легких, что даст возможность легочной ткани перейти на новый функциональный уровень. Пальмитиновая кислота, входящая в состав дипальмитилфосфатидилхолина, являющегося поверхностно-активной выстилкой легочных альвеол, способствует уменьшению теплоотдачи путем снижения трансудации жидкости через альвеолярную стенку [7].

Таким образом, проведенное нами исследование показало выраженную направленную перестройку жирнокислотного состава во всех исследованных органах теплокровного животного под влиянием глубокого многократного переохлаждения, причем эта перестройка основывается на специфике каждого органа и в полной мере отражает ее. Одно и то же воздействие вызывает разную ответную реакцию метаболизма в различных органах, т. е. каждый орган перестраивает метаболизм таким образом, чтобы обеспечить себе возможность существования в новых, необычных для него условиях. Если же перестройка не может произойти хотя бы в одной из жизненно важных систем, дальнейшее пребывание в соответствующих условиях будет несовместимым с жизнью. Так, организм теплокровных не может приспособиться к длительному существованию при низких температурах. Несмотря на то, что в миокарде, легких, печени и скелетных мышцах, спинном мозге [5] произошел переход метаболизма на новый, оптимальный

для данной ситуации уровень, организм теплокровных, охладившись до пороговой температуры (19 °C), впадает в холодовой паркоз и затем, если его не вывести из состояния охлаждения, погибает. Возможно, это объясняется тем, что не произошло приспособления метаболизма в тканях головного мозга к деятельности в условиях низких температур. Жирнокислотный состав липидов (общих и фосфолипидов) головного мозга при глубоком многократном переохлаждении изменяется незначительно [6], что свидетельствует о стабильности метаболизма в клетках головного мозга. Изменение метаболизма, естественно, должно привести к функциональному сдвигу, что совершенно недопустимо для тканей головного мозга.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов В. Ф. Липиды и ионная проницаемость мембран. — М., 1982.
2. Бароян Р. Г. Простагландины — взгляд на будущее. — М., 1983.
3. Белоус А. М., Бондаренко В. А. // Биохимия. — 1978. — Т. 43. — С. 2175—2182.
4. Крейс Е. М. Липиды клеточных мембран: Эволюция липидов мозга. Адаптационная функция липидов. — Л., 1981.
5. Серебренникова Э. Г., Векслер Я. И. // Укр. биохим. журн. — 1977. — Т. 49, № 2. — С. 16—21.
6. Серебренникова Э. Г., Векслер Я. И., Гусейнов И. Р. // Вопр. мед. химии. — 1981. — № 5. — С. 640—643.
7. Шепелев А. П. Роль липидов в патогенезе общих термических травм: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Ростов н/Д, 1979.

Поступила 01.11.88

#### ROLE OF FATTY ACIDS CONTAINING IN PHOSPHOLIPIDS OF RAT TISSUES DURING DEVELOPMENT OF RESISTANCE TO STRONG MULTIPLE SUPERCOOLING

E. G. Serebrennikova

Chair of Biochemistry, Dagestan Medical School, Makhachkala

Fatty acid composition was altered in all the rat tissues studied after strong multiple (16 times) supercooling (down to rectal temperature 19 °). Content of arachidonic and linoleic acids, which are precursors of prostaglandins, was distinctly increased in phospholipids of myocardium and skeletal muscles as a result of multiple supercooling. At the same time, a ratio of palmitic acid containing in phosphatidylcholine palmitate, was increased in lipid moiety of lung phospholipids, while concentration of arachidonic acid was elevated in liver phospholipids.

И. В. Рожинская, А. М. Поверенный, Г. М. Ротт

ОСОБЕННОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АУТОАНТИТЕЛ К МИОГЛОБИНУ  
ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

НИИ медицинской радиологии АМН СССР, Обнинск

Наличие аутоантител (аАТ) к миоглобину (МГ) в крови людей показано методом иммуноферментного анализа (ИФА) и реакцией пассивной гемагглютинации [7, 8, 11]. Этим ставится под сомнение истинность определяемых иммунохимическими методами величин концентраций МГ в крови, так как часть МГ должна находиться в составе иммунокомплексов. Ведется поиск взаимосвязи концентрации МГ и содержания аАТ при остром инфаркте миокарда [1], а также содержания аАТ, уровня свободного МГ и индекса циркулирующих иммунокомплексов, в состав которых входит МГ [4].

В упомянутых исследованиях определению аАТ проведено методом неконкурентного ИФА. Ввиду важности проблемы нам представляется целесообразным указать на ряд особенностей их определения в крови данным методом.

## Методика

*Выделение МГ человека, специфических антител (АТ) к МГ и АТ к IgG человека (анти-IgG).* Выделение и очистку МГ человека проводили, как описано ранее [2]. Выделение и очистку IgG из сыворотки крови донора проводили, как описано в [5].

Овечьи антимиоглобиновые сыворотки и антисыворотки к IgG предоставлены сотрудниками НИИ эпидемиологии и микробиологии Минздрава РСФСР (г. Горький). Специфические АТ и анти-IgG выделены из них на соответствующих иммуносорбентах. Иммунизацию лигандов на сефарозе 4В ("Pharmacia") и процедуру хроматографии проводили традиционно [6]. Концентрацию АТ устанавливали методом [10].

*Получение конъюгатов с пероксидазой (ПХ) хрена.* Конъюгирование ПХ ("Sigma", RZ-3.0) с АТ, МГ и анти-IgG проводили методом периодатного окисления [9] при следующих молярных соотношениях ингредиентов: ПХ: МГ=2:1, ПХ: АТ=3:1, ПХ: анти-IgG=1:2. Конъюгаты очищены гель-фильтрацией на сефадексе G-75 ("Pharmacia"). Их хранение осуществляли при 4°C в 0,1% водном растворе бычьего сывороточного альбумина (БСА) ("Serva") с добавлением 20 г/л тиомерсалата.

Также использованы конъюгаты ПХ — белок А ("Amersham"), ПХ — F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты АТ к иммуноглобулинам человека ("Amersham") и ПХ—анти-IgM ("Serva", ЧССР).

*Рабочие растворы, стандарты и исследуемые образцы.* Разведения конъюгатов, стандартов и исследуемых образцов проводили 0,1 М натрий-фосфатным буфером, pH 7,2, содержащим 0,15 М хлорида натрия, 0,05% трилона X-100 ("Serva") и 0,1% БСА ("Serva").

Промывающим раствором служил тот же буфер, не содержащий БСА.

В качестве субстрата использовали свежеприготовленный водный 0,05% раствор о-фенилендиамина (СССР), содержащий 0,01% перекиси водорода, 0,004 М двузамещенного фосфата натрия и 0,002 М лимонной кислоты.

Исследованы 13 образцов сыворотки крови здоровых людей и 1 образец сыворотки крови больного полимиозитом.

*Гель-хроматография.* Объединенные пробы сывороток крови здоровых людей были подвергнуты фракционированию на колонках (2,6×80 см) с сефадексом G-200 ("Pharmacia"), уравновешенных: а) 0,1 М натрий-фосфатным буфером, pH 7,2, содержащим 0,15 М хлорида натрия, б) 0,1 М ацетатным буфером, pH 4,05. Элюирование проводили теми же растворами.

Первый пик на профиле элюции содержит высокомолекулярные белки, в том числе IgM, второй пик — IgG, третий — белки с низкой молекулярной массой, в том числе МГ. Объединяли фракции, относящиеся к соответствующему пику, и концентрировали их до объема материала, наносимого на колонку.

*Прямая сорбция МГ на твердой фазе.* В лунки микротитрационной пластины (НИИ медицинской техники Минздрава СССР) вносили по 0,05 мл раствора МГ (10 мкг/мл) в 0,05 М карбонатном буфере, pH 9,6, и инкубировали 18—20 ч при комнатной температуре. Избыток МГ трижды отмывали. Оставшуюся свободной поверхность твердой фазы блокировали внесением в промытые лунки по 0,05 мл 1% раствора БСА в 0,05 М карбонатном буфере, pH 9,6, с последующей инкубацией при 37°C в течение 1 ч.

*Сорбция АТ на твердой фазе.* Посадку специфических АТ на твердую фазу проводили из 0,05 М карбонатного буфера, pH 9,6. Раствор АТ (5 мкг/мл) вносили в объеме 0,05 мл в лунки пластины и инкубировали 18—20 ч при 37°C. Оставшуюся свободной поверхность твердой фазы блокировали 1% раствором БСА.

*Опосредованная сорбция МГ на твердой фазе.* Первым слоем сорбировали специфические АТ, второй слой из молекул МГ создавали посредством взаимодействия антиген — антитело. В лунки пластины вносили с этой целью по 0,05 мл раствора МГ (100 мкг/мл) и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Несвязывавшийся МГ тщательно отмывали. Оставшуюся свободной поверхность твердой фазы блокировали раствором БСА. Эффективность непрямого присоединения МГ к твердой фазе подтверждена в ИФА конъюгатом ПХ—АТ.

Условия проведения неконкурентного ИФА на твердой фазе с иммобилизованным МГ при определении антимиоглобиновых АТ. В промытые лунки, на поверхность которых прямо или опосредованно сорбирован МГ, вносили при исследовании сыворотки крови — 0,05 мл разведенного в 50 раз образца, а в случае изучения связывания АТ с иммобилизованным антигеном — 0,05 мл раствора АТ различных концентраций (от 5 нг/мл до 600 мкг/мл). После инкубации в течение 1 ч при 37 °С лунки трижды промывали, вносили в них по 0,05 мл раствора конъюгата в его рабочем разведении и инкубировали 1 ч при 37 °С. Избыток конъюгата тщательно отмывали.

Визуализацию ИФА осуществляли следующим образом. В лунки пластины вносили по 0,05 мл раствора субстрата и инкубировали 30 мин при 37 °С. Ферментативную реакцию останавливали добавлением 0,05 мл 1 М раствора серной кислоты. Фотометрирование (при 492 нм) проводили с помощью многоканального спектрофотометра.

Условия проведения конкурентного ИФА на твердой фазе с иммобилизованным МГ при определении антимиоглобиновых АТ. В промытые лунки, на поверхности которых непосредственно иммобилизован МГ, вносили по 0,05 мл раствора исследуемого образца в смеси с конъюгатом ПХ—АТ в его рабочем разведении. Пластины выдерживали при 37 °С в течение 1 ч, трижды промывали и вносили в лунки по 0,05 мл раствора субстрата. Через 30 мин инкубации при 37 °С в лунки добавляли по 0,05 мл 1 М раствора серной кислоты и фотометрировали.

Условия проведения конкурентного ИФА на твердой фазе с иммобилизованными АТ при определении МГ и антител к нему. В промытые лунки вносили по 0,05 мл исследуемого образца в смеси с конъюгатом ПХ—МГ в его рабочем разведении. Далее — как описано выше.

## Результаты и их обсуждение

**Изменение антигенных свойств МГ, непосредственно сорбированного на твердой фазе.** На рис. 1 показаны варианты ИФА, выбранные нами для определения АТ. Во всех случаях на твердой фазе сорбирован МГ. Ни один из вариантов ИФА, в которых применяли микротитрационные пластины с

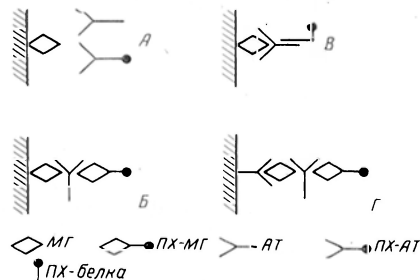


Рис. 1. Схемы твердофазного ИФА для определения специфических антимиоглобиновых АТ.

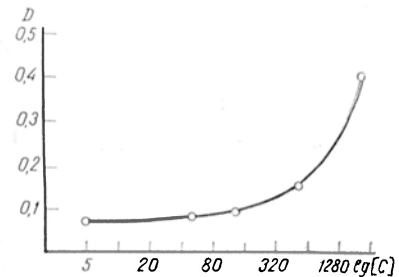


Рис. 2. Калибровочная кривая для определения специфических антимиоглобиновых АТ конкурентным ИФА с МГ, иммобилизованным опосредованно на твердой фазе.

Здесь и на рис. 4 по оси абсцисс: концентрация специфических антимиоглобиновых АТ (в нг/мл; логарифмический масштаб); по оси ординат: оптическая плотность при 492 нм.

непосредственно сорбированным на твердой фазе МГ (рис. 1, варианты А, Б и В), не обеспечивал возможности определения АТ.

Определение АТ оказалось возможным в ИФА только в том случае, когда МГ был опосредованно присоединен к твердой фазе (рис. 1, вариант Г). На рис. 2 представлена полученная данным вариантом ИФА калибровочная кривая для определения АТ. В значения приведенных на рисунке величин оптической плотности внесены поправки на величину фона, обусловленного взаимодействием адсорбированных антител с конъюгатом ПХ—МГ. Вследствие значительного фона и низкой чувствительности определения АТ данный вариант ИФА неприемлем для практического использования.

Полученные данные свидетельствуют, по-видимому, об изменении антигенных свойств МГ, сорбированного непосредственно на твердой фазе.

**Выявление иммуноглобулинов из сыворотки крови людей, реагирующих с МГ, непосредственно иммобилизованным на твердой фазе, методом неконкурентного ИФА.** Методом неконкурентного ИФА тестированы на содержание АТ 13 образцов сывороток крови здоровых доноров и 1 образец сыворотки крови больного полимиозитом. В качестве конъюгата использовали ПХ—анти-IgG в его рабочем разведении. Оптические плотности растворов субстрата после проведения ИФА в образцах здоровых людей варьировали в диапазоне 0,220—0,464, а для больного полимиозитом эта величина составила 0,716.

Таблица 1

Ингибирование экзогенным МГ (1000 нг/мл) взаимодействия в ИФА сывороточных иммуноглобулинов с МГ, иммобилизованным на твердой фазе

Объект исследования	Содержание МГ, нг/мл	% ингибирования		
		ПХ—анти-IgG	ПХ—анти-IgM	ПХ—анти-IgF (ab') <sub>2</sub>
Доноры:				
1*	21	22	—	—
2	9	8	15	25
Больной полимиозитом	265	3	7	0

\* Ингибирование МГ концентрации 600 нг/мл.

Нами проведена проверка специфичности связывания аАТ с антигеном, сорбированным непосредственно на твердой фазе, путем его ингибирования экзогенным МГ. В выбранные произвольно 2 донорские сыворотки и в сыворотку крови больного полимиозитом вносили различные количества (5—1000 нг/мл) МГ. Через 18—20 ч инкубации при комнатной температуре в подготовленных таким образом образцах исследовали содержание аАТ. Помимо конъюгата ПХ—анти-IgG, использовали конъюгаты ПХ—анти-IgM и ПХ—F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты АТ к иммуноглобулинам человека. Результаты приведены в табл. 1.

**Определение МГ и аАТ к нему в сыворотке крови методом конкурентного ИФА.** На рис. 3 показана схема конкурентного ИФА определения аАТ: последние должны конкурировать с иммобилизованными на твердой фазе

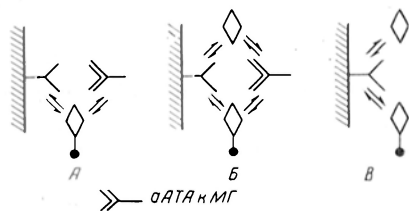


Рис. 3. Схемы взаимодействия ингредиентов в конкурентном ИФА при определении аутоантиминоглобулиновых АТ (А) и МГ (В) в их растворах и в смеси (Б).

Обозначения те же, что на рис. 1.

специфическими АТ за конъюгат ПХ—МГ. Однако определение аАТ данным вариантом ИФА принципиально неосуществимо при наличии в исследуемом образце свободного МГ. Результаты анализа будут искажены конкурентным связыванием свободного МГ с АТ, сорбированными на твердой фазе. Поскольку в сыворотке крови содержится МГ, то исследуемый нами образец объединенных сывороток крови до анализа был подвергнут гель-фильтрации для фракционирования сывороточных белков по величинам их молекулярных масс.

На рис. 4 представлены стандартные кривые для определения АТ, полученные предлагаемым вариантом ИФА при различных сроках преинкубации АТ с конъюгатом ПХ—МГ. Чувствительность выявления АТ возрастает с увеличением времени преинкубации. Так, преинкубация в течение 1 ч позволяет тестировать 5—10 нг/мл АТ, в то время как без предварительной инкубации чувствительность их определения составляет около 80 нг/мл.

В дальнейших экспериментах определение аАТ проводили путем внесения в лунки смеси исследуемого образца с конъюгатом ПХ—МГ в его рабочем разведении, выдержанной при комнатной температуре в течение 1 ч.

На рис. 3 показана схема конкурентного ИФА, используемого нами для определения МГ в исходном материале и в третьем пике после фракционирования сывороток на сефадексе G-200. В лунки с иммобилизованными на поверхности АТ вносили разведенный в 6 раз исследуемый образец в смеси с конъюгатом ПХ—МГ; смесь предварительно не инкубировали. Низ-

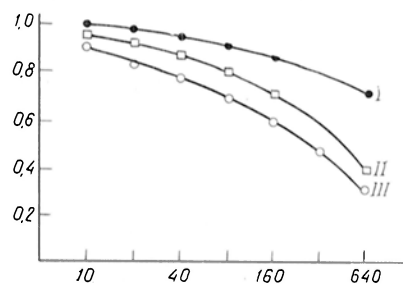


Рис. 4. Калибровочные кривые для определения специфических антиминоглобулиновых АТ конкурентным ИФА при различных сроках их преинкубации с конъюгатом ПХ—МГ.

I — 0 мин; II — 30 мин; III — 60 мин.

Таблица 2

Содержание МГ и аАТ во фракциях сывороток крови здоровых людей после фракционирования на сефадексе G-200

рН элюирования	Содержание аАТ, нг/мл		Содержание МГ, нг/мл
	1-я фракция	2-я фракция	3-я фракция
7,2	29	21	—
4,05	3200	168	1125

кая чувствительность выявления аАТ данным вариантом ИФА не препятствует точному тестированию МГ: в сыворотке крови здоровых людей концентрация МГ составила 67 нг/мл.

Конкурентным вариантом ИФА проведено определение аАТ в каждом из содержащих иммуноглобулины образцов, полученных после фракционирования сывороток крови на сефадексе G-200 при рН 7,2, а также в условиях диссоциации иммунокомплексов при рН 4,05. В исследуемый образец перед анализом вносили тритон X-100 до 0,05 % концентрации. Относительную концентрацию аАТ оценивали по калибровочной кривой, полученной с использованием специфических АТ в качестве стандартов. Результаты представлены в табл. 2.

Неконкурентный ИФА принят в настоящее время как классический метод определения АТ к антигенам, иммобилизованным на твердой фазе. Данный метод использован в ряде работ для демонстрации наличия аАТ в крови людей [1, 3, 4].

Результаты настоящей работы ставят под сомнение целесообразность определения аАТ с помощью неконкурентного ИФА.

Прямая сорбция МГ на твердой фазе не позволяет выявлять в ИФА АТ, выделенные из гипериммунной овечьей сыворотки, но эти АТ успешно определяются методом неконкурентного ИФА на твердой фазе с опосредованно присоединенным к ней МГ. Причиной этого явления могут быть процессы денатурации белка на твердой фазе (описанные, в частности, в работе [12]), приводящие к изменению его антигенных свойств.

Показано [1, 3, 4], что иммуноглобулины, по крайней мере классов G и M, из сыворотки крови больного поли-

миозитом и здоровых лиц взаимодействуют с МГ, иммобилизованным на твердой фазе без посредника. Слабое ингибирование экзогенным МГ связывания данных иммуноглобулинов с МГ на твердой фазе является основанием для утверждения, что выявляемые методом неконкурентного ИФА иммуноглобулины из сыворотки крови не являются аАТ к нативному МГ.

Возникает вопрос: какие иммуноглобулины реагируют с иммобилизованным МГ? Можно предположить, что выявляемые в ИФА сывороточные иммуноглобулины способны взаимодействовать лишь с МГ, претерпевшим изменение в результате фиксации на твердой фазе. При обсуждении проблемы следует, очевидно, принять во внимание также результаты работы [7], в которой показано, что аАТ к 9 антигенам, в том числе и МГ, присутствуют в крови здоровых людей. Изучение перекрестных реакций этих аАТ, выделенных на соответствующих иммуносорбентах, указывает на их низкую специфичность: связывание аАТ к тубулину, тиреоглобулину, коллагену и другим антигенам с МГ, сорбированным на твердой фазе, значительно и лишь в 2,5—4 раза меньше, чем связывание аАТ к самому МГ. Более того, МГ слабо ингибирует связывание аАТ с иммобилизованным МГ: 90 пМ/мл МГ (1600 нг/мл) ингибирует связывание лишь на 55 %, в то время как те же молярные количества тубулина и тиреоглобулина ингибируют связывание на 25 и 27 % соответственно.

Определенный интерес представляют данные, полученные конкурентным вариантом ИФА с иммобилизованными на твердой фазе АТ, в плане обсуждения влияния аАТ на достоверность определения самого МГ в сыворотке крови пациентов. Эффективному определению МГ данным вариантом ИФА благоприятствуют, во-первых, низкая чувствительность выявления аАТ в том случае, когда исследуемый образец не подвергался преинкубации с конъюгатом (см. рис. 2), и, во-вторых, содержание в сыворотке крови здоровых людей небольших количеств аАТ (см. табл. 2). Остается непредсказуемой ситуация с определением МГ в сыворотке крови людей, содержащей значительные количества аАТ, свободно циркулирующих в крови.

Таблица 3

Содержание свободно циркулирующих и входящих в состав иммунокомплексов антимыоглобиновых аАТ и МГ в сыворотке крови доноров

Состояние белка в сыворотке крови	Содержание аАТ к МГ, %	Содержание МГ, %
Свободно циркулирующий	1,5	5,9
В составе иммунного комплекса	98,5	94,1

Отделение МГ гель-фильтрацией позволило оценить содержание аАТ в сыворотке крови доноров (см. табл. 2). Особого внимания заслуживают результаты определения аАТ в образцах, полученных после фракционирования сывороток при рН 4,05. По сравнению с образцами, полученными после фракционирования при рН 7,2, содержание аАТ возросло примерно в 100 раз в IgM-содержащей фракции и в 8 раз в IgG-содержащей фракции. Фракционирование пула при рН 4,05 привело также к увеличению в 7,5 раз концентрации МГ в низкомолекулярной фракции элюата по сравнению с его содержанием в исходном пуле.

Наблюдаемый феномен объясняется, по-видимому, разрушением иммунокомплексов в условиях элюирования сывороток крови раствором с низким значением рН. Такая трактовка результатов позволила нам оценить содержание в сыворотке крови доноров свободно циркулирующих и входящих в состав иммунокомплексов антимыоглобиновых аАТ и самого МГ (табл. 3).

Следовательно, МГ и аАТ содержатся в сыворотке крови преимущественно в составе иммунокомплексов и только около 6 % МГ и 1,5 % аАТ циркулируют в крови в виде свободного белка. Сообщаемые в литературе данные о содержании МГ в норме и при различных заболеваниях, возможно, относятся лишь к свободно циркулирующему белку. Для реального представления о миоглобинемии следует учитывать факт присутствия в крови аАТ.

Таким образом, определение аАТ в сыворотке крови людей методами ИФА имеет ряд особенностей. Во-первых, сорбция МГ на твердой фазе приводит к потере им антигенных свойств, что делает неприемлемым применение не-

конкурентного варианта ИФА для выявления аАТ. Во-вторых, иммуноглобулины, реагирующие с иммобилизованным на твердой фазе МГ, являются скорее аАТ к другим антигенам, нежели нативному МГ. И, в-третьих, определение аАТ в сыворотке крови возможно предлагаемым вариантом конкурентного ИФА, однако непременным условием является отделение от иммуноглобулинов самого МГ.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Барон И. И., Диков М. М., Опалева-Стегинцева В. А. и др. // Тер. арх. — 1987. — № 6. — С. 97—100.
2. Домбровский В. И., Поверенный А. М. // Вопр. мед. химии. — 1981. — № 4. — С. 566—568.
3. Несвижский Ю. В., Корогодин Д. В., Лилин Е. Т. и др. // Генетика. — 1987. — № 1. — С. 180—182.
4. Осипов С. Г., Бабаян Г. В., Ермолин Г. А. и др. // Лаб. дело. — 1986. — № 9. — С. 550—553.
5. Остерман Л. А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами. — М., 1983.
6. Остерман Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. — М., 1985.
7. Avrameas S., Guilbert B., Dighiero G. // Ann. Immunol. — 1981. — Vol. 132. — P. 231—236.
8. Herrera-Esparsa R., Magana L., Moreno J. et al. // Ann. reum. Dis. — 1983. — Vol. 42. — P. 182—186.
9. Ishibawa E., Imagawa M., Hashida S. et al. // J. Immunoassay. — 1983. — Vol. 4. — P. 209—327.
10. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
11. Nishikai M., Homma M. // J.A.M.A. — 1977. — Vol. 237. — P. 1842—1844.
12. Soderquist M. E., Walton A. Q. // J. Colloid Interface Sci. — 1980. — Vol. 75. — P. 386—396.

Поступила 19.01.88

## SPECIFIC FEATURES OF IMMUNOENZYME ASSAY FOR EVALUATION OF AUTOANTIBODIES AGAINST HUMAN MYOGLOBIN

I. V. Rozhinskaya, A. M. Poverenny, M. M. Rott

Institute of Medical Radiology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Obninsk

Various procedures of immunoenzyme assay (ELISA) were studied for evaluation of autoantibodies against human myoglobin. Antigenic properties of myoglobin were lost after immobilization on solid-phase carrier, hence noncompetitive type of the assay is unsuitable for these analyses. Exogenous myoglobin did not inhibit practically the blood serum immunoglobulins, which have reacted with immobilized myoglobin. These immunoglobulins appear to be autoantibodies against other antigens cross reacting

with myoglobin. The procedure of competitive ELISA, involving solid phase immobilized specific antimyoglobin antibodies, was developed and assayed; an obligatory condition for the

procedure developed is separation of immunoglobulins from myoglobin. Myoglobin and its naturally occurring antibodies were found as immunocomplexes in circulation.

УДК 612.015.3:547.587.42].014.46:[615.917:547.262].08

Х. К. Курбанов, О. Н. Ромах

## К МЕХАНИЗМУ РЕГУЛЯЦИИ ОБМЕНА ТИРОЗИНА ПРИ ОТРАВЛЕНИИ ЭТАНОЛОМ

Туркменский медицинский институт, Ашхабад

Длительная алкогольная интоксикация организма приводит к значительным изменениям в аминокислотном обмене [5]. У алкоголиков отмечены изменения в сыворотке крови активности гамма-глутамилтрансферазы, аланин- и аспартатаминотрансферазы и аминокислотного спектра крови и мочи. Показано, что в крови у этих больных несколько повышен уровень фенилаланина и снижена концентрация тирозина [3, 8]. Увеличение концентрации тирозина в тканях вызывает своеобразное состояние стресса, в ответ на которое и происходит повышение активности тирозинаминотрансферазы [9]. Уровень тирозина в крови или тканях рассматривают как показатель адекватности реакции организма на стресс [1, 9].

Цель настоящей работы — изучение зависимости активности тирозинаминотрансферазы, фенилаланин-гидроксилазы и алкогольдегидрогеназы печени крыс в динамике при отравлении этанолом в течение 10 мес и влияния на эти показатели однократной гипертермии животных.

### М е т о д и к а

Работа выполнена на 380 белых беспородных крысах-самцах массой 160—220 г. Животные 1-й группы ( $n=180$ ) на протяжении 44 нед в качестве единственного источника жидкости получали 10 % раствор этанола. Крысы 2-й группы ( $n=188$ ), так же, как в 1-й группе, в течение 9 мес получали для питья 10 % раствор этанола, кроме того, в день исследования их подвергали солнечно-тепловому воздействию. Солнечно-тепловое воздействие в течение 20 мин проводили (июль—август) на открытой солнечной площадке в специальной клетке из бесцветного оргстекла. В таких условиях солнечно-тепловое воздействие при 44—49°C вызывало увеличение ректальной температуры тела крыс на 3—4°C. Через 2 ч после прекращения солнечно-теплого воздействия животных 2-й группы, а также интактных крыс и крыс 1-й группы декапитировали и в печени определяли актив-

ность тирозинаминотрансферазы по методу [2], фенилаланин-гидроксилазы по методу [7] и алкогольдегидрогеназы по методу [12]. Белок определяли по методу [13].

В 1-й группе за 9 мес алкоголизации погибли 47 крыс, причем 22 из них на 9-м месяце наблюдения, 15 на 7—8-м месяце и 9 в первые 6 мес наблюдения. Во 2-й группе гибель животных отмечалась значительно чаще и составляла соответственно указанным выше срокам 75, 27, 34, 14 крыс. В качестве интактных использовали 12 крыс того же поколения, что и подопытные. Активность ферментов у них исследовали на 3, 6 и 9-м месяцах наблюдения.

### Р е з у л ь т а т ы и о б с у ж д е н и е

Длительная алкоголизация животных ведет к повышению активности тирозинаминотрансферазы и снижению активности фенилаланин-гидроксилазы печени крыс (см. таблицу). На 2-м месяце алкоголизации животных наблюдалось максимальное повышение активности тирозинаминотрансферазы ( $p<0,001$ ). С 6—7-го месяца отмечалось снижение активности указанного фермента, а к 9—10-му месяцу интоксикации активность тирозинаминотрансферазы животных была ниже, чем у интактных крыс. В период наиболее высокой активности тирозинаминотрансферазы отмечена наименьшая степень снижения активности фенилаланин-гидроксилазы, и наоборот, наибольшее повышение активности тирозинаминотрансферазы сопровождалось более резким снижением активности фенилаланин-гидроксилазы. Если на 2-м месяце алкоголизации животных активность тирозинаминотрансферазы была наивысшей и составляла 145,1 % по отношению к показателю интактных животных, то активность фенилаланин-гидроксилазы в этот период равнялась 94,8 % ( $p>0,5$ ) по сравнению с контролем. К 4-му месяцу наблюдения эти изменения составили соответственно 104,9 и 41,6 % ( $p<0,001$ ).



Активность тирозинаминотрансферазы (в мкг п-оксифенилпировиноградной кислоты на 1 мг белка за 1 ч), фенилаланингидроксилазы (в мкг тирозина на 1 г ткани за 1 ч) и алкогольдегидрогеназы (в нмоль НАД·Н<sub>2</sub> на 1 г белка за 1 мин) печени крыс при алкогольной интоксикации (АИ) и солнечно-тепловом воздействии (СТВ) ( $M \pm m$ )

Фермент	Контроль	СТВ	Длительность АИ, мес							
			1		2		3		4	
			АИ	СТВ + АИ	АИ	СТВ + АИ	АИ	СТВ + АИ	АИ	СТВ + АИ
Тирозинаминотрансфераза	55,23±1,40	129,55±9,20 (234,6)***	70,80±5,72 (128,2)*	163,36±2,94 (295,8)*** [126,1]**	80,15±5,02 (145,1)***	184,32±3,88 (333,7)*** [142,3]***	62,96±4,31 (114,0)	192,92±4,49 (349,3)*** [148,9]***	57,94±1,12 (104,9)	177,45±7,28 (321,3)*** [137,0]**
н	6	4	8	6	6	6	6	6	4	6
Фенилаланингидроксилаза	764,39±51,39	594,54±11,26 (77,8)**	547,56±25,89 (71,6)**	263,16±7,00 (34,4)*** [44,3]***	724,67±27,55 (94,8)	434,83±29,52 (56,9)*** [73,1]***	560,56±33,41 (73,3)**	395,00±19,93 (51,7)*** [66,4]***	318,03±12,59 (41,6)***	558,91±18,94 (73,1)** [94,0]
н	6	6	8	6	6	5	6	5	6	6
Алкогольдегидрогеназа	6,42±0,53	10,56±3,07 (164,6)***	10,38±0,53 (161,8)***	2,55±0,06 (39,8)*** [24,2]***	8,10±0,46 (126,3)*	4,58±0,17 (71,4)** [43,5]***	4,67±0,42 (72,8)*	10,99±1,38 (171,3) [104,1]	3,47±0,20 (54,1)***	9,61±0,04 (149,8)**** [91,0]*
н	6	6	8	5	6	6	5	6	5	5

Продолжение

Фермент	Длительность АИ, мес										
	5		6		7		8		9		10
	АИ	СТВ + АИ	АИ	СТВ + АИ	АИ	СТВ + АИ	АИ	СТВ + АИ	АИ	СТВ + АИ	АИ
Тирозинаминотрансфераза	72,45±2,64 (131,2)***	149,87±1,93 (271,4)*** [115,7]	69,82±0,92 (126,4)***	103,20±3,52 (186,9)*** [79,7]*	596,87±4,50 (108,4)	118,95±1,30 (215,4)*** [91,8]*	55,96±5,62 (101,3)	142,01±0,88 (257,1)*** [109,6]*	54,19±3,00 (98,1)	87,87±1,91 (159,1)*** [67,8]**	51,29±5,25 (92,9)
н	5	6	4	6	5	6	5	6	4	6	4
Фенилаланингидроксилаза	385,75±23,84 (50,5)***	797,62±8,28 (104,4) [134,2]***	397,54±19,26 (52,0)***	923,96±7,25 (120,9)* [155,4]***	334,33±14,93 (43,8)***	609,59±9,26 (79,8)* [102,5]	334,53±24,87 (43,8)***	443,97±3,21 (58,1)*** [74,7]***	325,53±22,69 (42,6)***	410,05±18,23 (53,6)*** [69,0]***	319(53±18,90 (41,8)***
н	7	6	4	6	5	6	4	6	4	6	4
Алкогольдегидрогеназа	2,43±0,36 (41,0)***	7,77±0,26 (121,1)* [73,6]***	7,18±0,24 (111,9)	7,44±0,10 (116,0) [70,4]***	5,96±0,44 (92,8)	8,31±0,53 (129,5)* [78,7]**	3,78±0,13 (58,4)**	6,59±0,33 (102,5) [62,3]***	3,25±0,22 (50,7)***	5,87±0,68 (91,6) [55,6]***	3,07±0,35 (47,8)***
н	7	6	4	6	5	6	5	5	4	6	4

Примечание. В круглых скобках — процент по отношению к контролю (интактные крысы), в квадратных — процент по отношению к данным для крыс, подвергнутых солнечно-тепловому воздействию. Одна звездочка —  $p < 0,05$ , две —  $p < 0,01$ , три —  $p < 0,001$ , в случае отсутствия звездочек различия статистически недостоверны.

Изменения активности этих ферментов направлены, по-видимому, на стабилизацию содержания тирозина в тканях.

Активность алкогольдегидрогеназы в начальные периоды алкогольной интоксикации животных компенсаторно повышается (см. таблицу). В последующем она снижается и наиболее низкая активность фермента отмечается на 5-м месяце алкоголизации животных и составляет 41 % ( $p < 0,001$ ) по отношению к показаниям интактных животных. Однако к этому времени наблюдается и повторное повышение активности тирозинаминотрансферазы при довольно низкой активности фенилаланин-гидроксилазы. Кроме того, в этот период резко изменяется и поведение животных (резкое усиление подвижности и агрессивности, учащение случаев каннибализма, снижение аппетита и т. д.).

Вероятно, в этот период из-за низкой активности алкогольдегидрогеназы увеличивается продолжительность действия этанола на организм, что сопровождается резким усилением токсического эффекта алкоголя. В результате нарушения координации в активности тирозинаминотрансферазы и фенилаланин-гидроксилазы, обеспечивающих контроль за уровнем тирозина в тканях, на 5—6-м месяце алкогольной интоксикации наступают, по-видимому, необратимые изменения в механизме, обеспечивающем регуляцию метаболизма тирозина. Эти изменения, ведут к нарушениям симпатико-адреналовой и других систем организма, с чем, очевидно, и связаны сдвиги в поведении животных в указанный период их алкоголизации.

На 8—10-м месяце интоксикации животных снижение активности тирозинаминотрансферазы и фенилаланин-гидроксилазы, по-видимому, связано с нарушениями функции надпочечников [6, 11]. Известно, что активность тирозинаминотрансферазы индуцируется глюкокортикоидами надпочечников [4]. При длительной интоксикации этанолом в надпочечниках значительно снижается активность ферментов, участвующих в синтезе липидов и кортикостероидов [10]. В этот период в коре надпочечников развиваются дистрофические и дегенеративные изменения [11], которые, очевидно, сказываются на общем состоянии животных: крысы при этом малоподвижные, вялые, аппетит

у них снижен, волосяной покров тусклый, волосы ломкие, легко выпадают, тургор кожи снижен, у некоторых крыс на кончиках ушных раковин, вокруг глаз отмечаются мелкие кровоизлияния, возрастает смертность животных.

Высокая температура и солнечная радиация на фоне алкогольной интоксикации вызывают более резкое повышение активности тирозинаминотрансферазы при одновременном резком снижении активности фенилаланин-гидроксилазы (см. таблицу). Эти изменения сопровождаются значительным снижением активности алкогольдегидрогеназы. На 1—2-м месяце отравления крыс этанолом активность алкогольдегидрогеназы у животных, подвергнутых солнечно-тепловым воздействиям, по отношению к крысам, подвергнутым тепловому воздействию, но без алкогольной интоксикации, составила соответственно 24,2 и 43,5 % ( $p < 0,001$ ).

Резкое повышение активности тирозинаминотрансферазы в начальные периоды интоксикации животных сопровождается сравнительно небольшим снижением активности фенилаланин-гидроксилазы. Эти изменения активности указанных ферментов наблюдаются только в первые 3—4 мес алкоголизации животных. В дальнейшем отмечаются как бы «несогласованные» изменения активности этих ферментов. Возможно, значительное снижение активности тирозинаминотрансферазы на 5—6-м месяце наблюдения с продолжающимся относительным повышением активности фенилаланин-гидроксилазы создает условия для повышения концентрации тирозина в тканях.

Изменения активности ферментов, обеспечивающих регуляцию уровня тирозина в организме, и алкогольдегидрогеназы, наблюдающиеся в поздние периоды отравления крыс этанолом в условиях солнечно-теплого воздействия, мало отличаются от подобных изменений у животных, подвергнутых воздействию алкоголя такой же продолжительности.

Таким образом, алкогольная интоксикация сопровождается возрастающими изменениями в механизме регуляции метаболизма тирозина. В начальные периоды при умеренной алкоголизации организма эти изменения компенсируются и не приводят к резким и необратимым сдвигам физиологиче-

ских функций организма. Однако при длительном отравлении этанолом, начиная с 5—6-го месяца алкоголизации животных, наступают неkoordinированные изменения активности ферментов, обеспечивающих оптимальный уровень тирозина в организме, что, вероятно, и приводит к дестабилизации концентрации тирозина в тканях, сопровождающейся изменениями всего обмена тирозина.

Солнечно-тепловое воздействие на животных на фоне хронического отравления этанолом значительно отягощает течение алкогольной интоксикации.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Капланский С. Я., Ван Чжунь-Янь. // *Вопр. мед. химии.* — 1961. — № 3. — С. 227—242.
2. Левин Ф. Б. // Там же. — 1969. — № 3. — С. 315—317.
3. Мартынов В. С. // *Журн. невропатол. и психиатр.* — 1972. — № 12. — С. 1869—1875.
4. Мергачев Н. П. // *Вопр. мед. химии.* — 1981. — № 2. — С. 154—166.
5. Островский Ю. М., Сатановская В. И., Островский С. Ю. и др. // *Метаболические предпосылки и последствия потребления алкоголя.* — Минск, 1988.
6. Петров Н. С., Беляев В. Е., Новицкий В. В. // *Журн. невропатол. и психиатр.* — 1977. — № 2. — С. 226—228.
7. Покровский А. А., Усачева Н. Т., Милова Г. Н. и др. // *Бюл. exper. биол.* — 1970. — № 5. — С. 122—124.
8. Пятницкая И. И., Чернобровкина Т. В., Го-

- рюшин И. И. // *Журн. невропатол. и психиатр.* — 1985. — № 7. — С. 1051—1053.
9. Расс И. Т. // *Химия и жизнь.* — 1978. — № 2. — С. 59—61.
  10. Савенко В. А., Полякова Т. Д. // *СССР. М-во здравоохранения: Главное управление, 4-е. Науч. копф.: Материалы.* — М. 1971. — С. 21.
  11. Шишов В. И. // *Фармакол. и токсикол.* — 1974. — № 1. — С. 89—91.
  12. Bonnichen R. K., Brink N. G. // *Meth. Enzymol.* — 1955. — Vol. 1. — P. 495—501.
  13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // *J. biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.

Поступила 12.02.88

#### REGULATION OF TYROSINE METABOLISM IN CHRONIC ALCOHOLIZATION

*Kh. K. Kurbanov, O. N. Romakh*

Turkmen Medical School, Ashkhabad

Metabolism of tyrosine was impaired after chronic alcoholization of rats with 10% ethanol within 10 months. Within the first 3-4 months activation of tyrosine aminotransferase and a decrease in phenylalanine hydroxylase activity were found in liver tissue. Activity of tyrosine aminotransferase was not increased during the long-term alcohol intoxication. At the same time, activity of tyrosine aminotransferase was decreased within 5-6 months simultaneously with activation of phenylalanine hydroxylase. An increase in the alcohol dehydrogenase activity was also observed in rat liver tissue during the initial period of intoxication. The enzymatic activity was decreased beginning from the 3-4 months of the alcoholization and maintained at the low level. Hyperthermia augmented these alterations observed in chronic alcoholization of rats.

УДК 616.153.915-07

*М. Ш. Промыслов, Л. И. Левченко, М. Л. Демчук, Н. И. Габриэлян*

#### РОЛЬ ЛИПИДОВ ФРАКЦИИ СРЕДНИХ МОЛЕКУЛ В ХАРАКТЕРИСТИКЕ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

Институт нейрохирургии им. акад. Н. Н. Бурденко АМН СССР, Институт трансплантологии и искусственных органов Минздрава СССР

В последнее время для оценки степени эндогенной интоксикации исследуют средние молекулы (СМ), молекулярная масса которых колеблется в пределах 300—5000 дальтон. О содержании СМ в пробах судят по величине экстинкции при 254 нм. Установлено, что независимо от этиологии заболевания ухудшение общего состояния обычно сопровождается повышением уровня СМ в крови больного [1, 3—6]. Однако в условиях клиники при тяжелом состоянии больного не всегда отмечают высокое содержание СМ, что

зависит, в частности, от методов терапии. Поэтому мы сочли целесообразным разработать дополнительные критерии оценки тяжести состояния больного по данным исследования СМ крови.

Поскольку состав фракции СМ неоднороден как по характеру веществ, так и по их оптической плотности при традиционно используемой длине волны 254 нм, при которой проводят измерения по скрининговой методике [2], мы решили разделить фракцию СМ на две — водорастворимую и раствори-

мую в органических растворителях — и оценить вклад каждой из них в экстинкцию общей фракции СМ.

Ввиду того что ТХУ, используемая для осаждения белков в скрининговой методике определения СМ, экстрагируется органическими растворителями, что сказывается на поглощении ультрафиолетового излучения при 254 нм и может привести к ошибке в определении СМ каждой фракции, было решено заменить ТХУ хлорной кислотой, которая не поглощает при 254 нм и не экстрагируется органическими растворителями. Проведена серия опытов по сравнению осаждающей способности указанных кислот.

### Методика

Обследовано 22 нейрохирургических больных, из них 14 оперированных по поводу опухолей мозга различной локализации и 6 — с черепно-мозговой травмой. Кровь (8 мл) брали из вены утром натощак и сразу же проводили исследование. Для выяснения динамики изменения каждой фракции по мере течения заболевания обследование проводили от 2 до 5 раз. Контролем служила кровь 5 здоровых доноров. 1,5 мл сыворотки депротенизировали равным объемом 1N хлорной кислоты и центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин. Разведенный в 50 раз центрифугат спектрофотометрировали при длине волны 254 нм на спектрофотометре "Spektromom-204". 1 мл супернатанта экстрагировали двукратным объемом смеси хлороформ — метанол в соотношении 2:1 и центрифугировали 30 мин при 3000 об/мин до полного расслоения. Водную фазу, разведенную соответствующим образом, фотометрировали при 254 нм и рассчитывали процент ее поглощения по отношению к исходной экстинкции. Вклад органической фазы рассчитывали по разности между начальным поглощением и поглощением водной фазы после экстракции. Раствором сравнения служила водная фаза, полученная при экстракции в аналогичных условиях дистиллированной воды.

Методом тонкослойной хроматографии на "Silufol UV-254" в элюирующей системе петролейный эфир — диэтиловый эфир — ледяная уксусная кислота (85:15:1) и проявления хроматограмм парами йода определяли примерный состав фазы, растворимой в органических растворителях.

Параллельно с данным исследованием определяли СМ крови по традиционной скрининговой методике.

Результаты обрабатывали методом вариационной статистики [5].

### Результаты и обсуждение

Сравнение общего пула СМ крови, обнаруженного при осаждении белков сыворотки ТХУ и хлорной кислотой, приведено в таблице.

СМ сыворотки крови после осаждения белков кислотами

Характеристика (и число) обследованных	Кислоты	
	ТХУ	хлорная кислота
Доноры (5)	$0,217 \pm 0,016$	$0,207 \pm 0,018$ $p_2 > 0,5$
Нейрохирургические больные (22)	$0,380 \pm 0,016$ $p_1 < 0,001$	$0,411 \pm 0,020$ $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,5$

Примечание.  $p_1$  — достоверность различий по сравнению с группой доноров;  $p_2$  — по сравнению с данными, полученными при осаждении сыворотки ТХУ.

Как следует из представленных данных, между значениями, полученными при экстракции сыворотки крови ТХУ и хлорной кислотой в условиях как нормы, так и патологии нет статистически достоверной разницы.

Это позволяет нам всю основную часть работы проводить при осаждении сыворотки крови хлорной кислотой с последующей экстракцией центрифугата хлороформ-метанольной смесью.

При этом, по данным ТСХ, в состав органической фазы входят высшие жирные кислоты, как предельные, так и непредельные, их эфиры, холестерин, его эфиры, фосфолипиды, триглицериды и ряд других соединений. Таким образом, все указанные вещества можно условно обозначить как соединения липидного характера.

Было обнаружено, что во фракции СМ липиды, даже в крови доноров, составляют примерно 25 % всего пула. Особый интерес представляет тот факт, что при ухудшении состояния больного и повышении общего уровня СМ процент липидной фракции в них значительно возрастает. Например, содержание липидов во фракции СМ у доноров составляло  $25,2 \pm 2,2$  %, а у нейрохирургических больных —  $43,6 \pm 2,2$  % (различие статистически достоверно,  $p < 0,001$ ).

Необходимо также отметить, что в ряде случаев при тяжелом течении болезни, особенно при наличии гнойно-септических осложнений, процент липидной фракции возрастает с большей скоростью, чем уровень СМ в целом. Таким образом, высокий процент экстрагируемости липидов сыворотки крови может служить дополнительным

критерием оценки тяжести состояния больного.

Следует отметить, что у обследованных больных процент липидной фракции существенно превышает соответствующий показатель в норме. В этом плане полученные нами данные расширяют возможности использования результатов исследования СМ для характеристики состояния больного. Наши данные позволяют считать возможным и даже более удобным в ходе определения СМ в качестве осадителя белков использовать хлорную кислоту, которая не только не поглощает ультрафиолетовые лучи при 254 нм, но и позволяет вычислить в дальнейшем вклад липидной фракции в общее содержание СМ в сыворотке крови.

Полученные результаты дают основание считать название «среднемолекулярные пептиды», которое некоторые авторы используют для обозначения группы веществ с мол. массой 300—5000 дальтон [7], не вполне адекватным, так как значительную часть вклада в экстинкцию этих соединений вносят вещества липидной природы, особенно на пике проявлений клинической симптоматики.

Следует подчеркнуть, что величина липидной фракции, коррелирующая с тяжестью состояния больного, может служить показателем того, что эти вещества играют важную роль в токсичности всей фракции СМ.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Габриэлян Н. И., Левицкий Э. Р., Щербанева О. И. // Тер. арх. — 1983. — № 6. — С. 76—78.
2. Габриэлян Н. И., Дмитриев А. А., Клаков Г. П. и др. // Клин. мед. — 1981. — № 10. — С. 38—42.
3. Глинский Г. В., Николаев В. Г., Иванова А. Б. и др. // Экспер. онкол. — 1980. — № 1. — С. 68—74.
4. Мороз В. В., Ермаченков С. А., Сурнин Ю. П. и др. // Журн. укр. науч. о-ва анест. и реаниматол. — 1986. — С. 142—144.
5. Ойвин И. А. // Пат. физиол. — 1960. — № 4. — С. 76.
6. Рябов Г. А., Азизов Ю. М., Каргусова Л. П. и др. // Журн. укр. науч. о-ва анест. и реаниматол. — 1986. — С. 152—154.
7. Тушикова З. А. // Вопр. мед. химии. — 1983. — № 1. — С. 2—10.

Поступила 26.02.88

## USE OF LIPIDS CONTAINING IN THE MIDDLE MOLECULAR FRACTION FOR EVALUATION OF THE PATHOLOGICAL STATE

*M. Sh. Promyslov, I. I. Levchenko, M. L. Demchuk, N. I. Gabrielyan*

N. N. Burdenko Institute of Neurosurgery, Academy of Medical Sciences of the USSR, Institute of Transplantology and Artificial Tissues, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

About 20-66 % of lipids was found in the middle molecular fraction of blood serum from neurosurgical patients. Content of the substances extracted with organic solvents was distinctly increased as the clinical status aggravated. Precipitation of proteins using chloric acid instead of trichloroacetic acid proved to be more convenient for isolation of the middle molecular fraction from blood serum and for the subsequent studies of its composition.

УДК 616.438-089.87-089.168-07:616.36-008.931:577.152.1]-053-092.9

*А. И. Николаев, Ж. И. Мамутов, А. К. Карабанович, А. С. Комарин*

## ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ МИКРОСОМАЛЬНЫХ МОНООКСИГЕНАЗ ПЕЧЕНИ У ТИМЭКТОМИРОВАННЫХ КРЫС В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВОЗРАСТА И ЕЕ КОРРЕКЦИЯ ГУМОРАЛЬНЫМ ФАКТОРОМ ТИМУСА

Среднеазиатский медицинский педиатрический институт, Ташкент

Взаимосвязь монооксигеназной и иммунной систем организма вызывает особый интерес в плане изучения резистентности организма к воздействию различных патологических факторов эндо- и экзогенного происхождения. Взаимовлияние этих основных защитных систем организма в настоящее время интенсивно изучается [7, 9—11], однако многие вопросы не ис-

следованы. Практически не изучено состояние микросомальной монооксигеназной системы печени после тимэктомии. Установлено [4, 8, 13], что тимэктомия сопровождается не только иммунологическими сдвигами, но и нарушением липидного, белкового и других обменных процессов в организме, а применение иммуномодуляторов в определенной степени восстанавли-

вает иммунный статус и нарушенные виды обмена у животных, перенесших тимэктомию.

Целью настоящего исследования явилось изучение функционального состояния микросомальной монооксигеназной системы окисления печеночных клеток в условиях иммунного дефицита, вызванного тимэктомией, а также при коррекции иммунного ответа с применением гуморального фактора тимуса телят у крыс в возрастном аспекте.

### Методика

Опыты проводили на белых крысах-самцах смешанной популяции, находившихся на стандартном рационе вивария. Каждая опытная группа состояла из 7—10 особей. Всех животных разделили на 4 группы. В 1-ю группу вошли тимэктомированные крысы 4—5-месячного возраста, во 2-ю — тимэктомированные животные 24—26-месячного возраста, в 3-ю и 4-ю (контрольные) группы — ложноперирированные животные соответствующего возраста. Согласно общепринятой классификации [5], животных разделили на 2 группы: молодых и старых. Модель иммунного дефицита воспроизводили тимэктомией под легким эфирным наркозом. Полноту тимэктомии оценивали макроскопически в момент забоя животных, а также косвенно путем исследования лейкоцитарной формулы в динамике после операции. Ложная операция состояла из тех же этапов, что при удалении вилочковой железы, но последняя не извлекалась. Через 6 мес после тимэктомии животным обеих групп в течение 10 дней внутримышечно вводили тимозин V в дозе 0,5 мкг на 1 г массы животного. Животные контрольных групп по аналогичной схеме получали 0,85 % раствор хлорида натрия. Использовали тимозин пятой фракции, полученный из тимуса телят по методу [18, 19]. Микросомальную фракцию печени получали методом дифференциального центрифугирования

на центрифуге VAC-601 при 150 000 g в течение 60 мин. В 9000 g надосадочной фракции гепатоцитов определяли активность N-деметилазы амидопиррина [16], в микросомальной фракции — активность гидроксилазы анилина [3], НАДФ·Н-цитохром-с-редуктазы [21], содержание цитохромов P-450 и  $b_5$  [22], микросомального белка [20]. Полученные результаты обработаны методами вариационной статистики на микрокалькуляторе «Электроника МК-52».

### Результаты и обсуждение

Исследования показали, что при тимэктомии у молодых крыс наблюдалось угнетение активности основных микросомальных ферментов, участвующих в процессах биотрансформации (см. таблицу). Так, активность НАДФ·Н-цитохром-с-редуктазы и амидопирин-N-деметилазы снизилась на 53,6 и 51,7 % соответственно по сравнению с показаниями ложноперирированных животных, а уровень анилингидроксилазы — в несколько меньшей степени (на 38,8 %). Количественный уровень микросомальных гемопroteинов также изменялся неоднозначно: содержание цитохрома P-450 — главного компонента микросомальных монооксигеназ смешанной функции — уменьшалось незначительно, а другого микросомального гемопroteина — цитохрома  $b_5$  — на 58,1 % по сравнению с показаниями ложноперирированных крыс.

У старых крыс при тимэктомии содержание цитохрома P-450 и активность НАДФ·Н-цитохром-с-редуктазы снизились более значительно, чем у молодых, — на 32,5 и 57,6 %

Влияние тимэктомии и тимозина V на различные компоненты монооксигеназной системы печени у молодых и старых крыс ( $M \pm m$ )

Исследуемый показатель	Ложноперирированные крысы (контроль)	Тимэктомированные крысы	Тимэктомированные крысы + тимозин V
P-450, нмоль/мг	$0,783 \pm 0,056$ $0,650 \pm 0,032$	$0,706 \pm 0,05$ $0,439 \pm 0,027^*$	$0,322 \pm 0,0061^*$ $0,629 \pm 0,034$
$b_5$ , нмоль/мг	$0,590 \pm 0,026$ $0,576 \pm 0,029$	$0,247 \pm 0,034^*$ $0,412 \pm 0,041^*$	$0,238 \pm 0,039^*$ $0,562 \pm 0,045$
НАДФ·Н-цитохром-с-редуктаза, нмоль цитохрома с на 1 мг в минуту	$72,16 \pm 5,93$ $62,60 \pm 1,05$	$31,56 \pm 1,350^*$ $26,53 \pm 1,23^*$	$94,13 \pm 10,75$ $30,25 \pm 2,20^*$
Анилингидроксилаза, нмоль п-аминофенола на 1 мг в минуту	$0,836 \pm 0,075$ $0,880 \pm 0,064$	$0,512 \pm 0,054^*$ $0,433 \pm 0,053^*$	$0,475 \pm 0,099^*$ $0,795 \pm 0,064$
N-деметилаза амидопиррина нмоль HCOH на 1 мг в минуту	$0,600 \pm 0,041$ $0,672 \pm 0,035$	$0,290 \pm 0,019^*$ $0,871 \pm 0,052^*$	$0,307 \pm 0,060^*$ $0,912 \pm 0,071^*$

Примечание. Звездочка — статистически значимые различия при  $p < 0,05$ . В числителе — показатели молодых животных, в знаменателе — старых животных.

соответственно по сравнению с контролем. Содержание цитохрома  $b_5$  и активность анилингидроксилазы уменьшились на 28,4 и 50,8 % соответственно, т. е. менее значительно, чем у молодых крыс. Несколько неожиданным оказалось повышение на 29,6 % по сравнению с контролем активности N-деметилазы амидопирина.

Следовательно, тимэктомия неоднозначно влияет на различные звенья микросомальной монооксигеназной системы биотрансформации эндо- и экзогенных соединений печеночных клеток у молодых и старых крыс. До настоящего времени окончательно не установлены истинные механизмы снижения монооксигеназной активности в микросомах печеночных клеток при тимэктомии. Известно [8, 14], что в тимусе синтезируются гормоноподобные вещества стероидной структуры, оказывающие активное влияние прямо или посредством других эндокринных желез не только на иммунитет, но и на другие метаболические процессы. Следует, по-видимому, считать, что гормоны тимуса прямо или опосредованно влияют и на активность печеночных микросомальных монооксигеназ, функция которых заключается не только в детоксикации поступающих извне ксенобиотиков, но и в биопревращении многих жизненно важных для организма эндогенных соединений, таких как стероидные гормоны, простагландины, арахидоновая кислота и т. д. Можно предположить, что отсутствие регулирующего влияния гормонов тимуса на функциональное состояние микросомальных монооксигеназ при тимэктомии приводит к снижению активности этой ферментной системы, наблюдавшемуся в наших экспериментах.

Большая уязвимость при тимэктомии у старых животных цитохрома P-450 и НАДФ·Н-цитохром-с-редуктазы по сравнению с молодыми животными может быть связана с возрастными структурными изменениями в эндоплазматическом ретикулуме, так как известно [15, 17], что при старении функционирование НАДФ·Н-зависимой цепи транспорта электронов ослабляется. В то же время устойчивость цитохрома  $b_5$  при тимэктомии у старых крыс мо-

жет быть обусловлена тем, что в процессе старения НАДФ·Н-зависимая цепь переноса электронов в микросомах печени существенно не изменяется [12, 17]. Так как более  $\frac{2}{3}$  цитохрома  $b_5$  приходится на фракцию, включенную в цепь окисления НАДФ·Н [2], существенного уменьшения содержания цитохрома  $b_5$  не наблюдалось.

Следует отметить неадекватный ответ отдельных звеньев микросомальной цепи окисления у молодых и старых крыс на воздействие различных факторов, как индуцирующих, так и ингибирующих ферментную систему микросомальных монооксигеназ [15]. Некоторое повышение активности N-деметилазы амидопирина у тимэктомированных старых крыс по сравнению с молодыми следует, вероятно, связать с увеличением у старых крыс подфракции цитохрома P-450, ответственной за деметилазную активность.

Использование для восстановления иммунного статуса гуморального фактора тимуса телят у тимэктомированных молодых животных не приводило к полному восстановлению нарушенных функций микросомальных монооксигеназ. Было отмечено лишь повышение активности НАДФ·Н-цитохром-с-редуктазы на 30,6 % по сравнению с показаниями контрольных ложноперирированных животных, тогда как активность анилингидроксилазы, N-деметилазы амидопирина и содержание цитохрома  $b_5$  оставались сниженными соответственно на 43,2, 48,8 и 59,7 %, а содержание цитохрома P-450 — главного звена в системе микросомальных монооксигеназ смешанной функции — снижалось на 58,9 % по сравнению с контролем.

Применение данного препарата у тимэктомированных старых крыс оказывало несколько иное, чем у молодых крыс, влияние на состояние микросомальной монооксигеназной системы в печени. Содержание цитохромов P-450 и  $b_5$  увеличивалось, так же как активность анилингидроксилазы, приближаясь к контрольному уровню. В то же время активность N-деметилазы амидопирина превышала контрольные величины на 35,7 %, а активность НАДФ·Н-цитохром-с-редуктазы оставалась по-прежнему

значительно сниженной (на 51,7 %) по сравнению с показателями ложноперированных крыс.

При интерпретации эффекта, полученного у молодых крыс, следует исходить, по-видимому, из концепции о тормозящем влиянии иммуномодуляторов на процессы биотрансформации в печени. Согласно данным литературы [23, 24], ингибирующее влияние на цитохром Р-450-зависимую систему монооксигеназ со смешанной функцией оказывают иммуномодуляторы различной природы, в частности интерферон и интерферониндуцирующие агенты. По данным литературы [25], наблюдается корреляционная связь между степенью снижения содержания цитохрома Р-450 и угнетением зависимых от него монооксигеназных реакций с одновременным нарастанием титров индуцированного воздействием иммуномодуляторов интерферона типа II, активно участвующего в развитии иммуногенеза. Анализ данных, полученных нами при применении гуморального фактора тимуса телят у тимэктомированных молодых крыс, позволяет считать, что между системой микросомальных монооксигеназ и иммунной системой действуют некоторые реципрокные взаимоотношения, что соответствует концепции, выдвинутой И. Е. Ковалевым [9]. Механизм повышения активности НАДФ·Н-цитохром-с-редуктазы под влиянием фактора тимуса телят у тимэктомированных молодых крыс остается не вполне ясным. Можно, однако, предположить, что у молодых животных введение этого препарата, усиливающего иммуногенез, способствует активации НАДФ·Н-генерирующей системы в клетке, связанной с активацией НАД-зависимых реакций в пентозофосфатном цикле и цикле Кребса и направленной на поддержание фонда восстановленных пиридиннуклеотидов, необходимых не только для обеспечения иммунных процессов, но и для восстановления других нарушенных при тимэктомии внутриклеточных процессов. Поскольку при использовании гуморального фактора тимуса телят уровень иммунного ответа возрастает, по-видимому, следует ожидать и повышения активности НАДФ·Н-цитохром-с-редуктазы. Снижение активности других звеньев микросомальной моноок-

геназной системы окисления сопряжено, вероятно, с отвлечением значительной части потока электронов, образующегося в результате окисления НАДФ·Н, на иммунные и другие процессы, протекающие в клетках.

При использовании гуморального фактора тимуса телят у тимэктомированных старых крыс четкой реципрокной взаимосвязи между монооксигеназной и иммунной системой не обнаружено. По-видимому, у старых животных на фоне общего ослабления иммуногенеза влияние двух противоположных по направленности воздействий на иммунную систему, таких как тимэктомия и введение гуморального фактора тимуса телят, обуславливает преобладание преимущественно тех факторов, которые в большей степени, чем у молодых крыс, влияют на протекание других разнообразных внутриклеточных процессов. Отсутствие заметного стимулирующего влияния препарата на активность НАДФ·Н-цитохром-с-редуктазы у старых тимэктомированных животных можно объяснить снижением восстановленных ди- и трифосфопиридиннуклеотидов по сравнению с тимэктомированными молодыми крысами. Конкурентные взаимоотношения за поток электронов от НАДФ·Н на другие, немикросомальные метаболические пути (иммунные, энергетические, свободнорадикальные и т. д.), очевидно, определяют и различия в активности микросомальных монооксигеназ печеночных клеток при использовании гуморального фактора тимуса телят у тимэктомированных крыс старого и молодого возраста.

Выявленные изменения активности микросомальной монооксигеназной системы окисления в условиях иммунного дефицита, вызванного тимэктомией, и коррекции иммунного ответа под влиянием гуморального фактора тимуса телят необходимо учитывать при назначении лекарственных средств больным с иммунодефицитными состояниями.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Арион В. Я., Хромченков Ю. И., Тагирова А. К. и др. // Вопр. мед. химии. — 1987. — № 6. — С. 56—59.
2. Арчаков А. И. Микросомальное окисление. — М., 1975.



3. Арчаков А. И., Карузина Н. И., Тверитинов В. И. и др. // Биохимия. — 1975. — Т. 40, № 1. — С. 32—39.
4. Беляева И. В. // Вопр. мед. химии. — 1977. — № 4. — С. 440—443.
5. Западнюк В. И. // Геронтология и герiatrics. Ежегодник. 1969. — 1970. — Киев, 1970. — С. 433—438.
6. Караулов А. В., Хроменков Ю. И., Саприн А. И. // Регуляция иммунного гомеостаза. — Л., 1982. — С. 146—148.
7. Караулов А. В., Сильвестров В. П., Хроменков Ю. И. и др. // Иммунология. — 1984. — № 4. — С. 29—32.
8. Кемилева З. Вилочковая железа: Пер. с болг. — М., 1984.
9. Ковалев И. Е. // Хим.-фарм. журн. — 1977. — № 12. — С. 3—14.
10. Ковалев И. Е., Полевая О. Ю. Биохимические основы иммунитета к низкомолекулярным химическим соединениям. — М., 1985.
11. Хлопушкина Т. Г., Лысенкова Е. М., Ковалев И. Е. // Фармакол. и токсикол. — 1987. — № 3. — С. 55—58.
12. Лемешко В. В. // Биохимия. — 1980. — Т. 45, № 11. — С. 1964—1969.
13. Мамутов Ж. И., Халмухамедова Н. М., Султанходжаев У. Л., Мухамедов Х. С. // Мед. журн. Узбекистана. — 1987. — № 11. — С. 58—60.
14. Милку Шт., Потоп И. Фармакодинамика вырабатываемых тимусом сходно-гормональных веществ. — Бухарест, 1977.
15. Параманова Г. И. // Фармакол. и токсикол. — 1981. — № 1. — С. 98—101.
16. Попов П. // Экспер. мед. и морфол. (София). — 1973. — Т. 12, № 13. — С. 130—135.
17. Тунов Л. А. // Токсикология. — М., 1981. — Т. 12. — С. 5—64.
18. Goldstein A. L., Guha A., Zatz M. M., White A. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1972. — Vol. 69, N 7. — P. 1800—1803.
19. Hooper J. A., McDaniel M. C., Thurman G. B. et al. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1975. — Vol. 249. — P. 125—143.
20. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
21. Masters B. S. S., Williams C. H., Kamin H. // Meth. Enzymol. — 1967. — Vol. 10. — P. 565.
22. Omura T., Sato R. // J. biol. Chem. — 1964. — Vol. 230. — P. 2370—2378.
23. Renton K. W., Mannering C. J. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1976. — Vol. 73. — P. 343—348.
24. Renton K. W., Singh L. // Immunotoxicology. — Berlin, 1984. — P. 97—102.
25. Sonnenfeld L., Harned C. L., Thariyavarh S. et al. // Antimicrob. Agents. — 1980. — Vol. 17. — P. 969—972.

Поступила 01.11.88

#### ALTERATION IN ACTIVITY OF LIVER MICROSOMAL MONOOXYGENASE SYSTEM IN THYMECTOMIZED RATS, RELATED TO AGE; CORRECTION OF THE ACTIVITY BY MEANS OF THE THYMUS HUMORAL FACTOR

A. I. Nikolaev, Zh. I. Mamutov, A. K. Karabanovich, A. S. Komarin

Middle Asian Medical Pediatric Institute, Tashkent

Activity of cytochrome P-450-dependent enzymes was decreased in liver microsomes of young and old male rats of mixed population with immunity deficiency, which appears to occur due to absence of thymus regulation of their hormonal status. Partial restoration of the liver microsomal monooxygenases functions was found after correction of the immunity deficiency using calf thymus humoral factor thymosine. Age-related specificity of the immunity response in young and old rats was apparently responsible for dissimilarity in the rate of microsomal enzymes restoration caused by endo- and exogenous substances.

УДК 612.014.4-063.08

Р. И. Табукашвили, И. Б. Ушаков

### НЕКОТОРЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ КОМБИНИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ

Тбилисский медицинский институт

Хорошо известно, что экзогенная гипоксия, применяемая перед облучением, повышает устойчивость организма к этому экстремальному фактору. Подобный эффект наблюдается и при воздействии вибрации, перегрузок, электромагнитного излучения (ЭМИ) СВЧ-диапазона [1, 2, 4, 11, 14]. Радиозащитный эффект гипоксии связан в основном с уменьшением количества продуктов радиолитиза воды, образова-

ние которых зависит от концентрации кислорода в облучаемом объекте. Немаловажную роль в повышении устойчивости к облучению играют изменения, происходящие при гипоксии и связанные с подавлением митотической активности клеток, увеличением количества сульфгидрильных групп, стимулированием выработки гемопотетического фактора [5, 7]. Однако биохимические механизмы, лежащие

в основе радиозащитного действия экзогенной гипоксии и других экстремальных факторов, не изучены.

В работе была поставлена цель выявить возможность существования биохимической субстанции, образующейся под влиянием стрессоров и защищающей организм от последующего радиооблучения.

### Методика

Опыты проведены на беспородных белых крысах-самцах массой 200—220 г. Во время воздействия гипоксии животные находились в индивидуальных контейнерах из органического стекла, оборудованных системой подачи газовой смеси непосредственно к голове животного. Скорость прохождения газовой смеси составляла 20 л/мин. Газовую смесь ( $O_2 + N_2$ ) с 5 % содержанием кислорода подавали через систему ротаметров, калиброванных с помощью прибора КУ-8. Контроль за содержанием кислорода непосредственно в подаваемом на животное газовом составе осуществлялся периодически на приборе ВТИ-2 и постоянно на автоматическом газоанализаторе "Oxytest". Воздействие гипоксии продолжалось в течение 8 мин.

Облучение ЭМИ СВЧ-диапазона проводили на установке типа «Парус» (2,45 ГГц, ПМ-100 мВт/см<sup>2</sup>) в течение 8 мин. Метрологическое обеспечение — с помощью прибора ПЗ-9. Воздействие  $\gamma$ -лучами осуществляли на установке «Хизотрон» (<sup>60</sup>Co) в дозе 8,5 Гр при мощности дозы 79 сГр/мин. Во время облучения животные находились в пеналах из органического стекла.

Для определения кислой протеолитической активности готовили гомогенаты из ткани печени в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком из расчета 1 г ткани на 20 мл среды, содержащей 0,32 М сахарозы.

Гомогенаты центрифугировали в рефрижераторной центрифуге в течение 10 мин при 800 g. Полученный безъядерный гомогенат делили на две части. К одной части гомогената добавляли неионный детергент тритон X-100 в конечной концентрации 0,1 % и эту часть использовали в дальнейшем для определения общей активности фермента, другую часть гомогената повторно центрифугировали в течение 1 ч при 27 000 g. Полученный супернатант использовали для определения свободной активности кислой пептидгидролазы.

Кислую протеолитическую активность определяли по методу Anson [15]. Инкубационная смесь состояла из 1 мл 2,5 % раствора гемоглобина в 0,1 М ацетатном буфере pH 5,3 и 0,5 мл 5 % гомогената. Инкубировали в течение 1 ч при 37 °C, реакцию останавливали добавлением 2,5 мл 5 % ТХУ. Активность фермента выражали в микромолях тирозина на 1 г ткани в минуту. В работе использовали 14 экспериментальных групп животных. 1-я группа — крысы подвергались только  $\gamma$ -облучению; 2-я группа — крысы облучали сразу после воздействия гипоксии; 3-я группа — крысы подвергались облучению через 15 мин после внутрибрюшинного введения экстракта печени, приготовленного сразу после воздействия гипоксии; 4-я группа — крысы облучали че-

рез 15 мин после введения экстракта печени, приготовленного сразу после воздействия ЭМИ; 5-я группа — крысы облучали через 15 мин после введения сыворотки крови, полученной сразу после воздействия гипоксии; 6-я группа — крысам вводили ауранофин, через 24 ч подвергали действию гипоксии, из печени готовили экстракт, который вводили крысам, подвергаемым облучению; 7-я группа — крысам вводили ауранофин (25 мг/кг) и через 24 ч облучали. Следующие группы животных подвергали действию гипоксии, готовили экстракты из печени, которые осаждали 10 % ТХУ (8-я группа) и 20 % сульфосалициловой кислотой (9-я группа), собирали надосадки и после диализа против дистиллированной воды вводили крысам, которые подвергались облучению. Животным 10-й группы сразу после облучения вводили экстракты печени, полученные от животных, подвергнутых гипоксии.

В 11-й и 12-й группах использовали intactных крыс, из печени которых готовили экстракты и вводили до или после облучения животных.

Животным 13-й группы вводили ауранофин и через 24 ч определяли кислую протеолитическую активность пептидгидролазы в печени.

В 14-й группе крысы подвергались воздействию гипоксии, затем в печени определяли кислую протеолитическую активность. Статистическую обработку результатов проводили по методу Фишера [6].

### Результаты и обсуждение

Как видно из таблицы, защитный эффект от ионизирующего излучения при дыхании газовой смесью (2-я группа) и при введении экстракта печени, приготовленного после дыхания газовой смесью (3-я группа), приблизительно одинаков. Это позволяет предположить, что при действии гипоксии в тканях образуются биологически активные вещества, дающие радиозащитный эффект. Последний был также обнаружен и в 4-й группе. В 5-й группе к 13-му дню все животные погибли, защитного эффекта не выявлено. Таким образом, радиозащитный эффект был отмечен только при введении экстрактов печени.

Возникает вопрос о природе и механизме действия биологически активных веществ, содержащихся во вводимых животным экстрактах.

Как известно, в печени содержится набор ингибиторов и стимуляторов полипептидного происхождения синтеза нуклеиновых кислот и белка [3]. Хорошо известно также, что при гипоксии в тканях развиваются деструктивные изменения за счет усиления аутофагоцитоза [10]. Повышается активность кислых гидролаз, в том числе кислых пептидгидролаз [12, 13],

**Выживаемость животных (в %) после  $\psi$ -облучения при предварительном введении экстрактов печени и сыворотки крови крыс, подвергнутых воздействию газовой смеси и электромагнитного излучения СВЧ-диапазона**

Группа животных	Сутки после облучения											
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	21	29	30
1-я	85	80	80	75	45	30	0					
2-я	100	91	82	82	82*	73*	64*	64*	36*	36*	27*	27*
3-я	80	80	80	80	70*	70*	70*	30*	30*	30*	30*	30*
4-я	90	90	90	90	90*	80*	70*	30*	20*	20*	20*	20*
5-я	100	100	100	100*	80*	70*	40*	0				
6-я	90	80	80	50*	50	30	20	0				
7-я	25*	20*	15*	5*	5*	5	0					
8-я	80	60	50*	50*	30	10	10	0				
9-я	90	70	70	60	40	10	10	0				
10-я	80	80	80	80	80	40	30	30*	0			
11-я	90	90	50*	40*	30	30	10	10	0			
12-я	60	60	50*	50*	30	0*						

Примечание. Звездочка — результаты статистически достоверны.

участвующих в ограниченном протеолизе. С реакцией ограниченного протеолиза связаны образование ферментов, гормонов, ряда биологически активных пептидов и их активация и инактивация [9].

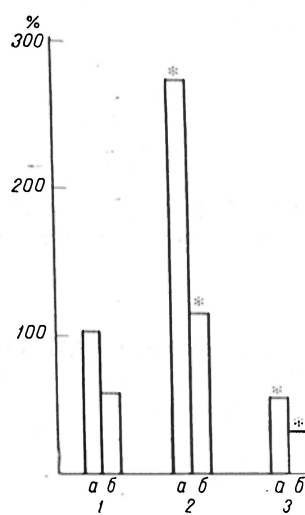
Для того чтобы выяснить роль лизосомального аппарата в образовании биологически активных веществ при гипоксии, животным за 15 мин до облучения вводили экстракт печени, приготовленный после введения ауранофина за 24 ч до воздействия гипоксии (6-я группа). Животные этой группы погибали в те же сроки, что и контрольные. Следует также отметить, что введение животным ауранофина вызывало достоверное снижение кислой протеолитической активности (см. рисунок) и снижало продолжительность жизни облученных животных (7-я группа).

Таким образом, можно сделать заключение, что на фоне уменьшения активности пептидгидролаз и перегрузок лизосомального аппарата печени коллоидным золотом до воздействия гипоксии защитный эффект экстракта пропал.

Для выяснения природы биологически активных веществ готовили экстракты печени животных, подвергнутых гипоксии, и проводили в них осаждение белков и пептидов ТХУ и сульфосалициловой кислотой, собирали надосадки и после диализа вводили крысам соответствующих групп. В этих группах защитного эффекта не обнаружено. Следовательно, фактор защиты, по-видимому, относится к белковой или олигопептидной фракции.

Полученные результаты дают основание сделать заключение, что при действии гипоксии в клетках повышается активность пептидгидролаз, а это в свою очередь приводит к образованию биологически активных веществ пептидной или белковой природы, дающих радиозащитный эффект.

Известно, что роль полипептидных факторов в регуляторном действии на компетентные клетки, по-видимому, сводится к запуску сложной системы взаимодействия центральных звеньев, которой являются специфические ре-



Кислая протеолитическая активность в печени крыс при воздействии гипоксической гипоксии и ауранофина.

По оси абсцисс: 1 — контроль; 2 — сразу после действия гипоксической гипоксии с 5% содержанием кислорода; 3 — через 24 ч после внутрибрюшинного введения ауранофина в дозе 25 мг/кг; а — общая активность; б — свободная активность. По оси ординат: активность (в % контроля). Звездочка —  $p < 0,05$  относительно контроля.

цепторы этих факторов. Все это может приводить к координированному изменению клеточного обмена веществ [8].

Таким образом, на основании собственных исследований и данных литературы можно предположить, что при действии первого экстремального фактора (гипоксия, ЭМИ) в клетках образуются биохимически активные вещества полипептидной природы, которые через систему клеточных рецепторов оказывают влияние на различные этапы метаболизма, увеличивая защитную реакцию организма на ионизирующее излучение.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Антипов В. В., Давыдов Б. И., Тихончук В. С. Биологическое действие электромагнитных излучений микроволнового диапазона. — М., 1980.
2. Антипов В. В., Давыдов Б. И., Вериге В. В., Свирижев Ю. М. // Основы космической биологии и медицины. — М., 1975. — Т. 2. кн. 2. — С. 243—267.
3. Балаж А., Блажек И. Эндогенные ингибиторы клеточной пролиферации: Пер. с англ. — М., 1982.
4. Барбашова З. И. // Акклиматизация к гипоксии и ее физиологические механизмы. — М.; Л., 1960.
5. Горизонтов Н. Д., Рогозкин В. Д. // Вопросы патогенеза, экспериментальной терапии и профилактики лучевой болезни. — М., 1960. — С. 324.
6. Гублер Е. В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. — Л., 1978.

7. Когг Дж. Биологические эффекты радиации. — М., 1986.
8. Кусень С. И., Стойка Р. С. Молекулярные механизмы в действии полипептидных факторов роста. — М., 1985.
9. Локина Л. А. // Молекул. биол. — 1979. — Т. 13, № 6. — С. 1205—1229.
10. Покровский А. А., Тютельян В. А. Лизосомы. — М., 1976.
11. Стрелков Р. Б., Брянцева А. А., Зия А. В. // Радиобиология. — 1974. — Т. 14, № 2. — С. 297—301.
12. Табукашвили Р. И., Антипов В. В., Ушаков И. Б., Кутателадзе Е. А. // Структура и функции лизосом. — М., 1986. — С. 297.
13. Табукашвили Р. И. Влияние ускорения на активность некоторых ферментов в разных отделах головного мозга у неполовозрелых и взрослых животных: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Тбилиси, 1980.
14. Ярмоненко С. П., Вайнсон А. А., Магдон Э. Кислородный эффект и лучевая терапия опухолей. — М., 1980.
15. Anson M. L. // J. gen. Physiol. — 1938. — Vol. 22, N 1. — P. 79—89.

Поступила 24.05.88

#### SOME BIOCHEMICAL MECHANISMS OF SIMULTANEOUS EFFECTS OF EXTREMAL FACTORS

R. I. Tabukashvili, I. B. Ushakov

Medical School, Tbilisi

Biologically active substances exhibiting the radioprotective effect were formed in liver tissue after treatment with hypoxia and with electromagnetic irradiation of ultrahigh frequency. The protective factor was found to be among protein or peptide fractions. Possible mechanisms of formation and action of the biologically active substance are discussed.

УДК 612.82.015.1:577.162.143].014.4.08

Н. К. Попова, Н. Н. Войтенко, Л. Н. Маслова

#### ВЛИЯНИЕ ЭМОЦИОНАЛЬНОГО СТРЕССА И КОРТИКОСТЕРОНА НА АКТИВНОСТЬ МОНОАМИНОКСИДАЗ МОЗГА КРЫС

Институт цитологии и генетики Сибирского отделения АН СССР, Новосибирск

Моноаминоксидаза [(МАО), амин: кислород-оксидоредуктаза (дезаминирующая) (флавиносодержащая), КФ 1.4.3.4.] является ключевым ферментом в метаболизме ряда биогенных аминов — нейромедиаторов мозга. Четко установлено существование двух форм МАО — А и Б, различающихся субстратной специфичностью и чувствительностью к ацетиленовым ингибиторам [22, 29] и протеазам [27], структурой [14], способностью трансформироваться при определенных условиях [3], хотя функциональ-

ная роль в организме этих форм МАО остается неизвестной. Показано, что активность МАО изменяется под влиянием различных видов стресса — при раздражении электрическим током [1, 8], действии холода [4], гипероксии [6], иммобилизации [12]. Однако влияние стресса на разные типы МАО остается невыясненным, так как данные часто неоднозначны. До сих пор не существует четкого представления и о роли кортикостероидов в регуляции А- и Б-типов МАО, хотя показано активирование

ее после адrenaлэктомии и введения ингибитора синтеза кортикостероидов метопирона [16, 20, 23, 24].

Цель настоящего исследования заключалась в изучении действия эмоционального стресса на активность MAO А и Б мозга крыс, влияния кортикостерона на обе формы MAO и роли генома в регуляции активности MAO.

### Методика

Эксперименты проведены на самцах крыс линии Вистар массой 250 г в возрасте 4 мес. Всех животных в течение 48 ч до эксперимента содержали в индивидуальных клетках. Эмоциональный стресс вызывали содержанием крыс в тесных проволочных клетках в течение 1 и 5 ч [17]. Последствия действия стресса на MAO изучали через 4 ч после прекращения действия 1-часового стресса. Контролем служили интактные крысы. Контрольных и подопытных крыс в каждой серии опытов декапитировали в одно и то же время суток [15]. Кортикостерон («Calbiochem», США) из расчета 5 мг на 100 г массы тела в 2,5 мл 2% твина-80 («Ferak», ФРГ) вводили внутривентриально, через 60 мин животных декапитировали. Контролем к этой серии экспериментов служили интактные крысы и крысы, которым за 60 мин до декапитации вводили 2,5 мл 2% твина. Для выявления генетического эффекта за 60 мин до стресса или введения кортикостерона вводили внутривентриально из расчета 10 мкг на 100 г массы тела актиномицин D («Fluka», ФРГ), ингибитор ДНК-зависимой РНК-полимеразы [19]. Контрольным животным вводили актиномицин D без последующего стресса или введения кортикостерона. Была изучена зависимость скорости дезаминирования 1 мМ серотонина MAO А и 1 мМ бензиламина MAO Б мозга крыс от концентрации кортикостерона в инкубационной среде у интактных животных и у крыс, которым за

60 мин до декапитации вводили внутривентриально актиномицин D из расчета 10 мкг на 100 г массы тела.

У контрольных и подопытных крыс после декапитации смешанную кровь собирали в гепаринизированные пробирки, центрифугировали, плазму хранили при  $-40^{\circ}\text{C}$  до определения в ней кортикостерона. Концентрацию кортикостерона измеряли безэкстракционным методом конкурентного белкового связывания [10].

Активность MAO определяли в митохондриях целого мозга (без мозжечка), а также в стволе и полушариях мозга крыс. Ткань гомогенизировали в 0,32 М растворе сахарозы. Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования [21] и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$  до определения в них активности MAO. Содержащие MAO препараты митондрией инкубировали в течение 30 мин в 0,1 М Na, К-фосфатном буфере рН 7,4, при  $37^{\circ}\text{C}$  и свободном доступе воздуха [2]. Субстратом MAO А служил серотонин, субстратом MAO Б — бензиламин в концентрации 1 мМ. Активность MAO выражали в наномолях аммиака на 1 мг белка·мин. Содержание аммиака в инкубатах определяли методом изотермической отгонки в модификации [9] с применением реактива Несслера и последующим измерением оптической плотности при 410 нм на СФ-26. Белок определяли по Лоури.

### Результаты и обсуждение

Примененное в качестве экспериментальной модели эмоционального стресса ограничение подвижности крыс вызывало отчетливое повышение уровня кортикостерона в периферической крови. Через 1 ч ограничения подвижности концентрация кортикостерона возрастала более чем в 3 раза (от исходного уровня  $6,3 \pm 0,77$  до  $21,7 \pm 2,68$  мкг на 100 мл,  $p < 0,05$ ).

Таблица 1

Влияние актиномицина D на активность MAO А и Б (в нмолях аммиака на 1 мг белка в 1 мин) в мозге крыс, подвергавшихся эмоциональному стрессу

Серия опытов	Время декапитации крыс, ч	Всего крыс	Активность MAO	
			А	Б
Контроль (интактные)	11	6	$0,75 \pm 0,03$	$3,35 \pm 0,13$
Стресс 60 мин	11	6	$1,31 \pm 0,10^{**}$	$2,49 \pm 0,06^{**}$
Актиномицин D	11	6	$1,86 \pm 0,10$	$1,67 \pm 0,09$
Актиномицин D + стресс 60 мин	11	6	$1,98 \pm 0,10$	$1,86 \pm 0,19$
Контроль (интактные)	16	5	$1,97 \pm 0,10$	$2,67 \pm 0,13$
Стресс 5 ч	16	5	$2,94 \pm 0,25^{**}$	$1,80 \pm 0,09^{**}$
Актиномицин D	16	5	$2,14 \pm 0,18$	$1,95 \pm 0,03$
Актиномицин D + стресс 5 ч	16	5	$2,94 \pm 0,28^{*}$	$1,17 \pm 0,04^{**}$

Примечание. Достоверность различий по сравнению с соответствующим контролем: одна звездочка —  $p < 0,05$ , две —  $p < 0,001$ .

Ограничение подвижности крыс в течение 60 мин вызывало повышение активности МАО А в головном мозге крыс (табл. 1). Было установлено, что это повышение кратковременное — через 4 ч после прекращения действия 60-минутного стресса активность МАО А оказалась сниженной на 20 % в стволе мозга и на 29 % в полушариях мозга. Повышение активности МАО А было обнаружено и после длительного, в течение 5 ч, эмоционального стресса. По-иному реагировала на стресс МАО Б. Ограничение подвижности в течение 60 мин привело к понижению активности МАО Б в целом мозге (см. табл. 1), которое сохранялось долго: через 4 ч после прекращения действия стрессора активность МАО Б оставалась пониженной на 36 % в стволе и на 60 % в полушариях головного мозга. Понижение активности МАО Б было отмечено и после 5-часового ограничения подвижности крыс (см. табл. 1).

В специальной серии опытов была определена активность МАО А и МАО Б в стволе и полушариях головного мозга, содержащих соответственно перикарионы моноаминергических нейронов и нервные окончания этих нейронов, а на основании полученных данных рассчитано отношение активности МАО А к активности МАО Б. Было установлено, что под влиянием ограничения подвижности крыс в стволе головного мозга и полушариях происходили аналогичные изменения: повышение активности МАО А и понижение активности МАО Б, вследствие чего отношение МАО А и МАО Б возрастало и это возрастание увеличивалось пропорционально длительности стресса (табл. 2). Причем в стволе головного мозга по сравнению с полушариями это увеличение было более выражено. Через 4 ч после прекращения 1-часового ограничения подвижности отношение МАО А к МАО Б возвращалось к исходному уровню также быстрее в стволе головного мозга.

Предварительное введение актиномицина D, ингибирующего ДНК-зависимый синтез РНК, полностью предотвратило изменения активности МАО А и Б в головном мозге, вызванные 1-часовым ограничением подвижности (см. табл. 1): в отличие от контрольных крыс на фоне действия

Таблица 2

Изменения отношения активности МАОА/МАО Б в стволе и полушариях головного мозга крыс под влиянием эмоционального стресса

Время опыта, ч	Серия опытов	МАО А/МАО Б	
		ствол	полушария
10	Контроль (интактные) Ограничение подвижности 60 мин	1,08	0,79
10		2,22	1,43
14	Контроль (интактные) Ограничение подвижности 5 ч	1,24	0,86
14		5,24	1,39
16	Контроль (интактные) Ограничение подвижности 60 мин + 4 ч в домашних клетках	0,55	1,42
		0,70	2,61

актиномицина D эмоциональный стресс не вызывал ни повышения активности МАО А, ни понижения активности МАО Б. В то же время актиномицин D не предотвращал изменений активности МАО при более продолжительном действии эмоционального стресса: на фоне актиномицина D после ограничения подвижности животных в течение 5 ч было отмечено значительное понижение активности МАО Б и существенное повышение активности МАО А.

Внутрибрюшинное введение кортикостерона (5 мг на 100 г массы) крысам показало, что наряду с резким возрастанием уровня кортикостерона в плазме крови снижается активность МАО Б в стволе на 29 %, в полушариях головного мозга — на 28 %. Активность МАО А при этом остается неизменной. Актиномицин D не снимал угнетающего действия кортикостерона на МАО Б ни в стволе, ни в больших полушариях головного мозга (рис. 1).

При изучении зависимости скорости дезаминирования серотонина и бензиламина от концентрации в инкубационной среде кортикостерона были использованы концентрации кортикостерона, близкие к таковым в крови у интактных животных, у крыс, подвергнутых 60-минутному эмоциональ-

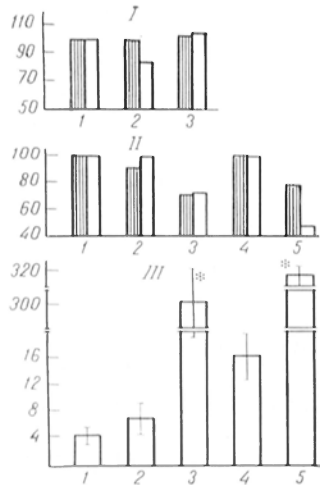


Рис. 1. Уровень кортикостерона в плазме периферической крови (в мкг на 100 мл) и активность MAO типа А и В в мозге крыс (в нмоль аммиака на 1 мг белка в 1 мин) после его внутрибрюшинного введения.

По осям абсцисс: 1 — контроль, интактные крысы; 2 — внутрибрюшинно введен кортикостерон в твинс-80; 3 — внутрибрюшинно введен кортикостерон в твинс-80; 4 — контроль, актиномицин D внутрибрюшинно за 120 мин до деканитации; 5 — актиномицин D за 120 мин и кортикостерон — за 60 мин до деканитации; по осям ординат: I — изменение активности MAO А (в % от контрольного уровня); II — изменение активности MAO Б (в % от контрольного уровня); белые столбики — полушария головного мозга; заштрихованные столбики — ствол; III — содержание кортикостерона (в мкг на 100 мл) в плазме периферической крови,  $n=6-7$ .

ному стрессу, а также у крыс, которым предварительно внутрибрюшинно вводили кортикостерон из расчета

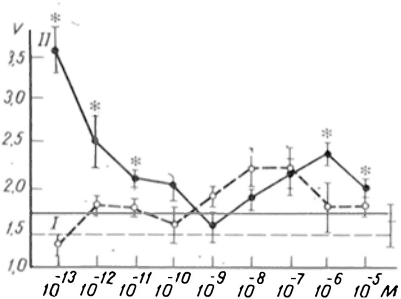


Рис. 2. Зависимость скорости дезаминирования 1 мМ серотонина MAO А мозга от концентрации кортикостерона в инкубационной среде у крыс, получавших актиномицин D (I), и у интактных крыс в контроле (II).

Горизонтальная пунктирная линия — активность MAO А у крыс, получавших актиномицин D, в отсутствие кортикостерона в инкубационной среде; горизонтальная сплошная линия — активность MAO А у контрольных интактных крыс в отсутствие кортикостерона в инкубационной среде. Каждая точка — среднее 8 определений в гомогенате мозга 18 крыс. Звездочка  $p < 0,001$  по сравнению с активностью MAO А в отсутствие кортикостерона в инкубационной среде. Здесь и на рис. 3 по оси абсцисс — концентрация кортикостерона, по оси ординат — дезаминирование, нмоль/мг белка, мин.

5 мг на 100 г массы ( $10^{-7}$ — $10^{-5}$  М). Эти кривые зависимости скорости дезаминирования серотонина (рис. 2) и бензиламина (рис. 3) от концентрации кортикостерона сложные. Дезаминирование серотонина MAO А под влиянием низких ( $10^{-11}$ — $10^{-13}$  М) и высоких ( $10^{-5}$ — $10^{-6}$  М) концентраций кортикостерона активировалось, а в области средних концентраций кортикостерона существенно не отличалось от контроля (см. рис. 2). Дезаминирование бензиламина MAO Б кортикостероном в высокой ( $10^{-5}$  М) концентрации ингибировалось (см. рис. 3). Предварительное внутрибрюшинное введение актиномицина D крысам существенно усиливало дезаминирующую активность MAO Б по сравнению с крысами, не получавшими актиномицин D, не заметно не сказывалось на фоне кривой зависимости скорости дезаминирования бензиламина от концентрации кортикостерона в инкубационной среде (см. рис. 3).

В то же время актиномицин D блокировал активирующее действие на MAO А кортикостерона в низких концентрациях ( $10^{-11}$ — $10^{-13}$  М) — см. рис. 2.

Полученные данные свидетельствуют о том, что при эмоциональном стрессе, вызванном ограничением подвижности, происходят разнонаправленные изменения активности двух типов MAO — повышение активности MAO А и понижение активно-

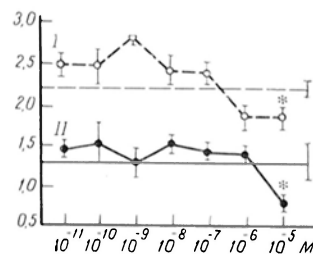


Рис. 3. Зависимость скорости дезаминирования 1 мМ бензиламина MAO Б мозга от концентрации кортикостерона в инкубационной среде у крыс, получавших актиномицин D (I) и у интактных крыс в контроле (II).

Горизонтальная пунктирная линия — активность MAO Б у крыс, получавших актиномицин D, в отсутствие кортикостерона в инкубационной среде; горизонтальная сплошная линия — активность MAO Б у контрольных интактных крыс в отсутствие кортикостерона в инкубационной среде. Каждая точка — среднее 8 определений в гомогенате мозга 18 крыс. Звездочка —  $p < 0,05$  по сравнению с отсутствием кортикостерона в инкубационной среде у интактных крыс в контроле и у крыс, получавших актиномицин D.

сти МАО Б. Вероятно, эти изменения активности МАО А и Б являются одним из механизмов регуляции уровня участвующих в стрессорной реакции медиаторов мозга, таких, как серотонин и норадреналин (субстраты МАО А), роль которых в механизмах стресса хорошо установлена [7, 11, 25], и, возможно, дофамин, который в мозге крыс [26], обезьян [18], человека [28] дезаминируется при участии преимущественно МАО Б.

Реакция на эмоциональный стресс стволочной части мозга характеризовалась большим повышением отношения активности МАО А к МАО Б при длительном воздействии и более быстрым возвращением этого отношения к исходному значению после прекращения действия ограничения подвижности. Это связано, вероятно, с относительно медленным транспортом по аксону МАО обоих типов из перикарионов в терминали [13].

В регуляции активности МАО, по всей видимости, определенную роль играет кортикостерон, выделяемый корой надпочечников при стрессе. Его способность активировать МАО А и в высоких концентрациях ингибировать МАО Б, т. е. вызывать такие же изменения, которые наблюдаются при стрессе, показана в опытах *in vitro*. Более того, понижение активности МАО Б было обнаружено и после внутрибрюшинного введения кортикостерона.

Полученные данные показали, что актиномицин D, подавляющий ДНК-зависимый синтез РНК, устраняет действие кратковременного 60-минутного стресса на МАО А и Б. Это позволяет заключить, что действие этого вида эмоционального стресса на обе формы МАО осуществляется на геномном уровне. В попытках установить, что контролирует при кратковременном действии эмоционального стресса экспрессию генов, ответственных за синтез самих МАО или пептидов, регулирующих активность МАО на посттранскрипционном уровне, естественное внимание привлечено кортикостерон, один из регуляторов экспрессии генов [5]. Однако проведенное исследование дает основание исключить его из числа факторов, ответственных за генетически регулируемое понижение активности МАО Б при стрессе, поскольку актиномицин

D не влиял на ингибирующий эффект кортикостерона в опытах как *in vitro*, так и *in vivo*. Это свидетельствует о внесномном, посттранскрипционном действии кортикостерона на МАО Б.

Более сложен вопрос о роли кортикостерона как индуктора МАО А или пептидов, регулирующих активность МАО А. *In vitro* актиномицин D блокировал активирующее действие малых концентраций кортикостерона, не оказывая существенного действия на активирующий эффект высоких концентраций ( $10^{-5}$ — $10^{-6}$  М). Таким образом, активирующий эффект малых концентраций кортикостерона, вероятно, реализуется путем индукции генов, контролирующих синтез самих МАО или пептидов, участвующих в посттранскрипционной регуляции активности МАО А. Активирующее действие больших концентраций кортикостерона осуществляется преимущественно без вовлечения генома, вероятно, путем изменения конформации МАО [3]. Можно предположить, что именно таким образом кортикостерон вносит свой вклад в регуляцию активности МАО мозга при длительном действии стресса.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Горбунова А. В., Каштанов С. И. // Бюл. эксп. биол. — 1983. — № 10. — С. 111—113.
2. Горкин В. З., Вережкина И. В., Гриднева Л. И. // Современные методы в биохимии. — М., 1968. — Т. 2. — С. 155—172.
3. Горкин В. З. Аминоксидазы и их значение в медицине. — М., 1981.
4. Горошинская И. А., Федоренко Г. М., Ходакова А. А. // Нейрохимия. — 1985. — Т. 4, № 2. — С. 134—140.
5. Комиссаренко В. П., Тронько П. Д., Минченко А. Г., Бездробный Ю. В. // Физиол. журн. — 1984. — Т. 30, № 3. — С. 302—307.
6. Кричевская А. А., Горошинская И. А., Федоренко Г. М. // Нейрохимия. — 1986. — Т. 5, № 1. — С. 37—44.
7. Науменко Е. В., Попова И. К. Серотонин и мелатонин в регуляции эндокринной системы. — Новосибирск, 1975.
8. Сафразбекян Р. Р., Арзануц Э. М., Сукасян Р. С. // Биол. журн. Армении. — 1982. — Т. 35, № 1. — С. 13—17.
9. Силакова А. И., Труш Г. П., Являкова А. // Вопр. мед. химии. — 1962. — № 2. — С. 538—545.
10. Гинников А. А., Бажан Н. М. // Лаб. дело. — 1984. — № 12. — С. 709—713.
11. Axelrod J. // Stress: The Role of Catecholamines and Other Neurotransmitters. — New York, 1983. — Vol. 1. — P. 3—17.
12. Bialowas J., Jurkowski M., Stachowiac M., Dytowska A. // Acta neurol. exp. — 1978. — Vol. 38. — P. 283—288.



13. Boegman R. J., Wood P. L. // J. Neurochem. — 1976. — Vol. 26. — P. 737—740.
14. Cawton R. M., Breacefield X. O. // Nature. — 1979. — Vol. 281. — P. 692—694.
15. Chevillard C., Barden N., Saavedra J. // Brain Res. — 1981. — Vol. 223. — P. 205—209.
16. Clarke D. E., Sampath S. S. // Experientia (Basel). — 1975. — Vol. 31. — P. 1098—1100.
17. Curson G., Green A. R. // Brit. J. Pharmacol. — 1969. — Vol. 37. — P. 689—697.
18. Egashira T., Yamamoto T., Yamana Y. // Jap. J. Pharmacol. — 1984. — Vol. 34. — P. 327—334.
19. Gandghi B. S., Kanungo M. S. // Indian. J. Biochem. Biophys. — 1974. — Vol. 11. — P. 102—104.
20. Giulio A. M., Groppetti A., Parenti M. et al. // Pharmacol. Res. Commun. — 1978. — Vol. 10. — P. 161—171.
21. Gray E. G., Whittaker V. P. // J. Anat. (Lond.). — 1962. — Vol. 96. — P. 79—87.
22. Johnston J. P. // Biochem. Pharmacol. — 1968. — Vol. 17. — P. 1285—1297.
23. Parves H., Parves S. // Acta endocr. (Kbh.). — 1973. — Vol. 73. — P. 509—517.
24. Parves H., Parves S. // J. Neurochem. — 1973. — Vol. 20. — P. 1011—1020.
25. Popova N. K., Naumenko E. V., Lobacheva I. I., Maslova L. N. // Neuroendocrinology of Hormone-Transmitter Interaction. — Utrecht, 1985. — P. 235—260.
26. Schoepp D. D., Azzaro A. // J. Neurochem. — 1983. — Vol. 40. — P. 1340—1348.
27. Smith D., Filipowicz Ch., McCauley R. // Biochim. biophys. Acta. — 1985. — Vol. 831. — P. 1—7.
28. White H. L., Glassman A. T. // J. Neurochem. — 1974. — Vol. 29. — P. 987—999.
29. Yang H. Y. T., Neff N. H. // J. Pharmacol. exp. Ther. — 1973. — Vol. 187. — P. 365—371.

Поступила 02.03.88

## EFFECT OF EMOTIONAL STRESS AND CORTICOSTERONE ON RAT BRAIN MONOAMINE OXIDASE

N. K. Popova, N. N. Voitenko, L. N. Maslova

Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk

Dissimilar effect of emotional stress on activity of the A and B forms of brain monoamine oxidase (MAO) was found in motionless rats within 1 and 5 hrs: increase in the rate of serotonin deamination catalyzed by MAO A and decrease in the rate of catalyzed by MAO B benzylamine deamination. Preadministration of actinomycin D prevented completely these alterations in activity of MAO A and B developed after 1 hr immobilization; this suggests the regulating effect of genome on MAO activity during stress. Both low  $10^{-11}$ - $10^{-13}$  M and high  $10^{-5}$ - $10^{-6}$  M concentrations of corticosterone stimulated the MAO A deamination of serotonin, while the steroid high concentrations inhibited the MAO B deamination of benzylamine either *in vitro* and *in vivo* (after intraperitoneal administration of 5 mg/kg). Actinomycin D blocked the stimulating effect of corticosterone at low concentrations on the MAO A activity, whereas the drug did not affect both the alterations in the MAO A and B activities observed after 5 hrs stress and the inhibition of MAO B by high concentrations of corticosterone. The data obtained suggest that corticosterone is not involved in genetic regulation of the MAO A and B activities under conditions of stress, however, the hormone may be of importance in regulation of the enzymatic activity affecting the MAO conformation during the long-term stress.

УДК 612.35.014.1:576.315.42].014.46:615.917].08

Ю. И. Губский, Е. Л. Левицкий, Н. Б. Гольдштейн, Т. Г. Мозжухина,  
А. Я. Литошенко, С. Н. Новикова

## ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ФРАКЦИОНИРОВАННОГО ХРОМАТИНА ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ОДНОКРАТНОМ ВВЕДЕНИИ ТЕТРАХЛОРМЕТАНА

Институт фармакологии и токсикологии Минздрава УССР: Институт геронтологии АМН СССР, Киев

Ранее нами было показано, что химическое повреждение печени тетрахлорметаном, активирующим перекисное окисление мембранных фосфолипидов (ПОЛ), вызывает глубокие нарушения процессов транскрипции и трансляции в гепатоцитах [4, 6]. С другой стороны, имеются данные [14], что интоксикация этим ксенобиотиком сопровождается подъемом общей митотической активности печеночных клеток, что может быть связано как с прямым действием тетра-

хлорметана на генетический аппарат, так и с изменениями в системах биохимической регуляции функционирования хроматина.

Известно, что структурно-функциональной формой организации ядерного генома является белково-нуклеиново-липидный комплекс — хроматин, который можно разделить на активно транскрибируемую и репрессированную фракции, различающиеся по ряду характеристик, в том числе по липидному составу [12]. Полагают, что од-

ним из механизмов регуляции активности генома может являться перекисное окисление входящих в состав хроматина клеточного ядра липидов [1]. Поскольку  $^{14}\text{C}$ -метаболиты из меченого тетрахлорметана способны к ковалентному связыванию с ДНК и ядерными белками печени крыс и мышей [17], не исключено предположение о действии этого ксеноботики на функциональную активность хроматина, не связанном с изменениями мембранных структур клетки и метаболизмом внутриклеточных регуляторов.

В настоящей работе исследовали интенсивность процессов ПОЛ и некоторые структурно-функциональные характеристики (электрофоретический белковый спектр, эндогенные ДНК- и РНК-полимеразные активности, доля активного и репрессированного хроматина, отношение белок/ДНК) фракций хроматина печени крыс после однократного введения тетрахлорметана. Параллельно в ядрах определяли концентрацию ионов магния, являющихся кофакторами ДНК- и РНК-полимераз, изменение концентрации которых может, таким образом, оказывать влияние на функционирование генома.

### Методика

В опытах использовали 3-месячных крыс-самок линии Вистар (150—200 г). Тетрахлорметан вводили внутривентриально в дозе 2,07 ммоль (200 мкл) на 100 г массы [5]. Исследования проводили через 1, 2 и 24 ч после введения. Животных декапитуировали под легким эфирным наркозом в утренние часы, печень извлекали и из нее выделяли фракции активного и репрессированного хроматина [11]. Эндогенные ДНК- и РНК-полимеразные активности во фракциях определяли в соответствии с методами, изложенными в [9, 10]. Препараты фракций хроматина (40 мкл) служили в качестве матрицы и фермента в полимеразных реакциях. Разделение активностей ДНК-полимераз  $\alpha$  и  $\beta$  проводили на основании дифференциальной чувствительности к N-этилмалемиду, а РНК-полимераз I и II — к  $\alpha$ -аманитину. Определяли также спектрофотометрически процентное соотношение между фракциями активного и репрессированного хроматина и отношение белок/ДНК в этих фракциях [11]. Для анализа электрофоретического спектра белков хроматина препараты хроматина получали добавляя 1 мМ фенилметилсульфонилфторид на всех этапах выделения с целью предотвращения протеолиза. Аликвоты низкоактивной и активной фракций хроматина доводили доцеллюльфатом натрия и меркаптоэтанолом в трис-НСI-буфере (рН 6,8) до конечных концентраций, соответствующих прописи [18]. При нанесении пробы уплотняли глицерином. Электрофорез проводили в блоке

градиентного (5—30 %) полиакриламидного геля размером  $17 \times 13 \times 0,1$  см. Гели окрашивали 0,1 % раствором кумаси R-250, отмывали 7 % уксусной кислотой. Денситометрию гелей проводили на регистрирующем фотометре ИФО-401. Липиды из фракций хроматина экстрагировали хлороформ-метанольной смесью [8]. В экстракте определяли суммарное содержание фосфолипидов [19]. Об интенсивности ПОЛ фракций хроматина судили по накоплению малонового диальдегида (МДА) и его производных [3]. При определении интенсивности НАДФ-Н-зависимого ПОЛ определяли ферментативную составляющую процесса путем подсчета разности между суммарной величиной и остаточным значением ПОЛ после денатурации проб хроматина (7 мин при  $100^\circ\text{C}$ ). Концентрацию ионов магния в ядрах определяли методом атомно-адсорбционной спектрофотометрии [16]. Статистическую обработку полученных данных проводили по методу Вилкоксона — Манна — Уитни [2]. Поскольку непараметрические критерии не требуют среднеквадратических отклонений и ошибок средних ( $m$ ), в таблицах эти показатели отсутствуют.

### Результаты и их обсуждение

Уже через 1 ч после однократного введения тетрахлорметана наблюдаются изменения в функциональной активности хроматина. На фоне снижения его активно транскрибируемой фракции (15,5 % по сравнению с 23,0 % в контроле;  $p \leq 0,01$ ) наблюдается тенденция повышения активностей ДНК- и РНК-полимераз. Достоверные изменения активности ферментов вначале обнаруживаются в активно транскрибируемой фракции: возрастание активности РНК-полимеразы I (111 286 распадов/мин на 1 мг ДНК по сравнению с 60 755 в контроле;  $p \leq 0,01$ ) приводит к повышению и тотальной РНК-полимеразной активности в этой фракции хроматина (284 817 распадов/мин на 1 мг ДНК по сравнению с 181 519 в контроле;  $p \leq 0,05$ ).

Через 2 ч после введения тетрахлорметана (табл. 1) наблюдается пик изменений полимеразных активностей во фракциях хроматина и их структурного состояния. Еще больше снижается доля активного хроматина и соответственно повышается доля репрессированного. Обнаруживается достоверная стимуляция тотальной ДНК-полимеразной активности в активном хроматине. Этот рост в основном обусловлен увеличением активности репликативной ДНК-полимеразы  $\alpha$ . Известно, что тетрахлорметан стимулирует клеточное деление в пе-

Таблица 1

## Структурно-функциональные характеристики фракций хроматина

Репрессированный хроматин			Активный хроматин		
контроль	тетрахлорметан		контроль	тетрахлорметан	
	2 ч	24 ч		2 ч	24 ч
Процент					
80,7	90,4**	81,7	19,3	9,6**	18,3
Белок/ДНК					
1,8	1,7	1,6	4,0	5,7*	3,5
Тотальная ДНК-полимеразная активность					
549 491	711 206	682 825	358 656	874 750**	501 906
Активность ДНК-полимеразы $\alpha$					
428 751	590 425	498 158	273 241	795 130**	399 239*
Активность ДНК-полимеразы $\beta$					
103 937	118 858	219 063**	81 709	65 700	88 654
Тотальная РНК-полимеразная активность					
220 212	277 756	383 781**	483 865	1 471 888**	1 463 400**
Активность РНК-полимеразы I					
197 025	139 063	182 421	345 525	626 217	864 271
Активность РНК-полимеразы II					
18 008	171 100*	228 286**	129 850	910 383*	818 029**

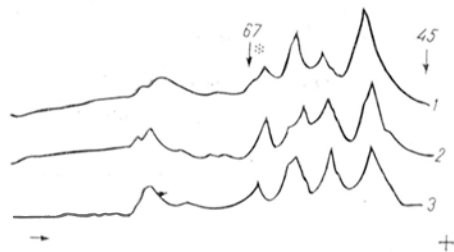
Примечание. Одна звездочка —  $p \leq 0,05$ ; две —  $p \leq 0,01$  (по сравнению с контролем); активность ферментов выражена в распадах в 1 мин на 1 мг ДНК, число опытов 6—21.

чени [14]. Видимо, возрастание активности репликативной ДНК-полимеразы через 2 ч после интоксикации является подготовительным этапом этой стимуляции. Наблюдается еще больший рост тотальной РНК-полимеразной активности. Теперь уже он обусловлен резким повышением активности РНК-полимеразы II, ответственной за синтез матричной РНК. Резкое повышение активностей ДНК- и РНК-полимераз через 2 ч после интоксикации во фракции активного хроматина согласуется с достоверным ростом количества белка в этой фракции хроматина. Этот рост может быть обусловлен увеличением количества ДНК- и РНК-полимераз в активном хроматине.

Через 24 ч после интоксикации многие показатели функциональной активности хроматина начинают возвращаться и возвращаются к норме (доля активного и репрессированного хроматина, соотношение белка к ДНК в активном хроматине, активности ДНК-полимераз в активном хроматине). Более медленно возвращаются к исходному уровню активности РНК-полимераз. Однако через 24 ч после

введения тетрахлорметана возрастает активность ДНК-полимеразы  $\beta$  в репрессированном хроматине. Возможно, что по мере накопления повреждений в ДНК под влиянием тетрахлорметана или индуцируемых им продуктов перекисной природы растет активность репаративной ДНК-полимеразы  $\beta$ .

Результаты исследования электрофоретического спектра белков низкоактивной и активной фракций хроматина согласуются с изменением функциональной активности хроматина под влияние однократного введения тетрахлорметана (см. рисунок). Электрофоретические спектры белков фракций хроматина в 3 исследованных группах животных (контроль, 2 и 24 ч после интоксикации) не различаются в гистоновой части электрофореграммы. При анализе негистоновой части спектра наблюдается некоторое количественное перераспределение белков в зоне от 45 до 67 кД (в зависимости от длительности действия тетрахлорметана) во фракции активного хроматина. На рисунке представлены электрофоретические профили негистоновых белков этой фракции хроматина



Электрофоретический спектр негистоновых белков фракции активно транскрибируемого хроматина печени крыс: контрольных (1), подвергнутых интоксикации тетрахлорметаном в течение 2 ч (2) и 24 ч (3).

Направление движения слева направо. В качестве маркерных белков (стрелки) использованы овальбумин (45 кД) и бычий сывороточный альбумин (67 кД) («Serva», ФРГ). Звездочкой отмечена фракция белков, количество которых повышается через 2 ч после интоксикации.

печени контрольных крыс, а также подопытных крыс через 2 и 24 ч после введения тетрахлорметана. Содержание белковой фракции, соответствующей 65 кД (на рисунке отмечена звездочкой), заметно возрастает через 2 ч после интоксикации и возвращается к исходному уровню через 24 ч. Обнаруженные изменения негистоновых белков активной фракции хроматина представляют интерес с точки зрения исследования механизма перестройки работы ядерного генома под влиянием тетрахлорметана. Имеющиеся в литературе сведения указывают, что негистоновые белки могут играть существенную роль в процессах конденсации — деконденсации хроматина, что обеспечивает возможность избирательной транскрипции тех или иных групп генов в условиях, изменяющих функциональное состояние клетки [13], в связи с чем уместно напомнить о повышении активности РНК-полимеразы II в активном хроматине через 2 ч после интоксикации.

Таким образом, однократное введение животным тетрахлорметана приводит к резкому изменению функциональной активности генома, выражающемуся в основном в стимуляции эндогенного синтеза ДНК и РНК в активно транскрибируемой его части на фоне структурного угнетения транскрипции. Ранее было показано снижение величины синтеза *in vivo* под влиянием однократного введения тетрахлорметана [4, 6]. Можно предполагать, что повышение ДНК- и РНК-полимеразных активностей в хроматине на фоне снижения доли ак-

тивно транскрибируемой его части может приводить к компенсации резкого угнетения транскрипции под влиянием этого вещества. Эти данные согласуются с полученными ранее результатами значительного повышения содержания сАМР и активности аденилатциклазы в печени в первые 2 ч после однократного введения тетрахлорметана [5]. Интересно, что в такой же степени возрастают ДНК- и РНК-полимеразные активности в хроматине. Известно, что рост сАМР стимулирует фосфорилирование РНК-полимераз, что приводит к повышению их активности, а также вызывает повышение клеточной пролиферации в печени [15]. Вероятно, обусловленное тетрахлорметаном повреждение биомембран, приводящее к росту содержания сАМР и активности аденилатциклазы, через сАМР-зависимый механизм фосфорилирования белков хроматина [20] вызывает обнаруженные нами изменения его структурно-функциональных характеристик.

Описанные изменения свойств фракций хроматина, развивающиеся после однократного введения тетрахлорметана, не могут быть связаны с изменением концентрации ионов кальция и магния в ядерной фракции, так как концентрация первых увеличивается только к 24 ч интоксикации [7], а вторых — вообще не изменяется во все исследованные сроки после введения тетрахлорметана: 23,4 ммоль на 1 мг белка в контроле ( $n=6-12$ ); 25 и 19,2 ммоль на 1 мг белка через 2 и 24 ч после введения  $CCl_4$  соответственно.

Липиды, входящие в состав фракций активного и репрессированного хроматина, могут подвергаться перекисному окислению (табл. 2). У контрольных животных липиды активной фракции подвергаются более выраженному перекисному окислению в НАДФ-Н- и аскорбатзависимых системах по сравнению с функцией репрессированного хроматина, что согласуется с большим содержанием фосфолипидов во фракции активно транскрибируемого хроматина (68,0 мкмоль на 1 мг белка по сравнению с 28,0 мкмоль на 1 мг белка в репрессированном хроматине;  $p \leq 0,01$ ). В хроматине печени подопытных животных, в его низкоактивной фракции, через 24 ч после введе-

Таблица 2  
Накопление МДА (в нмоль на 1 мг белка) и его производных во фракциях хроматина печени крыс при 37°C за 2 ч

Характер ПОЛ	Контроль		Тетрахлорметан, 24 ч	
	репрессированный хроматин	активный хроматин	репрессированный хроматин	активный хроматин
НЗП	1243,0	2017,0	1269,0	1609,0
НЗП, Δ	171,9	896,4	506,6*	639,4
АЗП	280,5	1400,0	1061,8*	1115,4

Примечание. Звездочка —  $p \leq 0,05$  (по сравнению с контролем); НЗП — НАДФ·Н-зависимое ПОЛ; НЗП, Δ — его ферментативный компонент; АЗП — аскорбатзависимое ПОЛ; число опытов 8.

ния тетрахлорметана резко повышена величина ферментативной составляющей НАДФ·Н-зависимой системы ПОЛ и аскорбатзависимое ПОЛ. Если учесть, что изменения полимеразных активностей и структурных свойств хроматина, вызванные введением тетрахлорметана, наблюдались в большей степени в активной фракции, то следует предположить, что ПОЛ липидов хроматина не является процессом, определяющим эти изменения, хотя и нельзя исключить возможность того, что процесс ПОЛ в низкоактивной фракции хроматина каким-то образом вызывает изменения свойств его активной фракции. Эти вопросы требуют дальнейшего исследования.

Можно предполагать, что повреждение структуры и функции биомембраны клеток печени, развивающиеся при однократном введении животным тетрахлорметана [4, 6], могут являться механизмом, обуславливающим обнаруженное нами резкое изменение функциональной активности ядерного генома, действующим через сАМР-зависимое фосфорилирование белков хроматина. Необходимо также учитывать непосредственное влияние тетрахлорметана и его производных на компоненты хроматина [17].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Алесенко А. В. // Биохимия липидов и их роль в обмене веществ. — М., 1981. — С. 3—16.
2. Ашмарин И. П., Васильев И. И., Амбросов В. А. Быстрые методы статистической об-

- работки и планирование экспериментов. — Л., 1979.
3. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М., 1972.
4. Губский Ю. И., Смалько П. Я. // Вопр. мед. химии. — 1983. — № 6. — С. 54—60.
5. Губский Ю. И. // Укр. биохим. журн. — 1983. — Т. 55, № 4. — С. 431—436.
6. Губский Ю. И., Радзинский В. Е. // Фарм. журн. — 1986. — № 4. — С. 72—73.
7. Губский Ю. И., Задорина О. В., Ткачук В. В., Игрунов Л. П. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 4. — С. 80—85.
8. Кейтс М. Техника липидологии: Пер. с англ. — М., 1975.
9. Костюченко Д. А., Костюченко В. И., Коломийцева Г. Я. // Биохимия. — 1982. — Т. 47, № 9. — С. 1540—1546.
10. Левицкий Е. Л. // Укр. биохим. журн. — 1986. — Т. 58, № 3. — С. 72—74.
11. Мозжухина Т. Г., Хилобок И. Ю., Гольдштейн Н. Б. // Там же. — 1982. — Т. 54, № 1. — С. 72—76.
12. Никитин В. Н., Бабенко Н. А., Попова Л. Я. // Системы биосинтеза белка и механизмы регуляции функций в онтогенезе. — Киев, 1985. — С. 3—10.
13. Прокофьева-Бельговская А. А. // Молекул. биол. — 1982. — Т. 16, № 4. — С. 771—781.
14. Сидорова В. Ф., Рябинина Э. А., Лейкина Е. М. Регенерация печени у млекопитающих. — Л., 1966.
15. Федоров Н. А. Биологическое и клиническое значение циклических нуклеотидов. — М., 1979.
16. Bhattacharya S. K. // VRA. — 1981. — Vol. 15, N 2. — P. 79.
17. Gomez M., Castro J. A. // Toxicol. appl. Pharmacol. — 1980. — Vol. 56, N 2. — P. 199—206.
18. Laemmli H. K. // Nature. — 1970. — Vol. 227, N 8. — P. 680—685.
19. Svanborg A., Svenerholm L. // Acta med. scand. — 1961. — Vol. 169, N 1. — P. 43—45.
20. Whitfield J. F., Boynton A. L., MacManus A. et al. // Molec. Cell. Biochem. — 1979. — Vol. 27, N 3. — P. 155—179.

Поступила 09.03.88

#### FUNCTIONAL ACTIVITY OF RAT LIVER CHROMATIN FRACTIONS AFTER A SINGLE ADMINISTRATION OF TETRACHLOROMETHANE

*Yu. I. Gubsky, E. L. Levitsky, N. B. Goldshtein, T. G. Mozhukhina, A. Ya. Litoshenko, S. N. Novikova*

Institute of Pharmacology and Toxicology, Ministry of Public Health of the Ukrainian SSR, Institute of Gerontology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Kiev

Functions of rat liver cell genome were distinctly altered after a single administration of tetrachloromethane into animals. Maximal alterations in the structure-functional properties of chromatin were detected within 2 hrs after intoxication. The phenomenon was accompanied by the following shifts in the chromatin active fractions: activation of DNA- and RNA polymerases, decrease in content of this fraction, in-

crease in the ratio protein/DNA due to elevation in the protein component with molecular mass 65 kDa detected in the nonhistone fraction of electrophoregramm. Alterations in the repressed chromatin fraction were less distinct. Many parameters of the chromatin fractions were normalized within 24 hrs after the intoxication. Peroxidation of lipids contained in chromatin occurred via NADPH- and ascorbate-dependent reactions, the rate of which was distinctly higher in the repressed chromatin fraction of liver cells from the animals intoxicated

within 24 hrs. These alterations in the structure-functional properties of liver chromatin fractions, developed after a single administration of tetrachloromethane into animals, were related neither to the rate of lipid peroxidation in chromatin, stimulated by tetrachloromethane, nor to alterations in  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  content in nuclear fraction. cAMP-dependent phosphorylation of chromatin proteins appears to be rather responsible for chemical impairments of hepatocyte membranes stimulated by tetrachloromethane.

УДК 616.13-004.6-092:616.132-008.931:577.152.344

*А. В. Васильев, Ли Хва Рен, А. Н. Орехов, В. В. Тертов, Ким Хан Джон, В. А. Тутьельян*

## ПРОТЕИНАЗЫ ЛИЗОСОМ ИНТИМЫ АОРТЫ ЧЕЛОВЕКА И АТЕРОГЕНЕЗ

Институт питания АМН СССР, Москва

Имеются многочисленные свидетельства участия лизосомального аппарата гладкомышечных клеток артериальной сосудистой стенки в процессе атерогенеза, что позволило ряду авторов сформулировать «лизосомную» теорию атеросклероза [15, 16, 18], основанную на концепции энзимопатий, обуславливающих врожденные «болезни накопления». Вместе с тем в настоящее время нет оснований считать, что роль лизосомального аппарата клеток интимы в атерогенезе генетически детерминирована. Напротив, в ряде исследований показано, что развитие атеросклероза сопровождается активацией ферментных систем лизосом в сосудистой стенке. Так, обнаружено увеличение активности лизосомальных дипептидилпептидаз I и II, а также катепсина В в атеросклеротической аорте кролика, лабораторных свиней и человека [6, 11]. В совокупности с данными об увеличении аккумуляции холестерина фибробластами кожи человека и перитонеальными макрофагами при ингибировании внутрилизосомального протеолиза хлорокином, пепстатином, иодацетамидом и хлористым аммонием [8, 13] полученные результаты позволяют считать, что важная роль в развитии атеросклеротического процесса принадлежит протеолитической системе лизосом. Однако сведения о роли индивидуальных протеиназ лизосом в атерогенезе практически отсутствуют.

### Методика

Участки ткани аорты человека, выделенные из области атеросклеротической бляшки, липидной полосы и непораженной зоны, измельчали, замораживали в жидком азоте, растирали в фарфоровой ступке и затем гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера — Эльвейма (стекло — стекло) в 0,25 М сахарозе, содержащей 1 мМ ЭДТА (рН 7,4).

Атеросклеротические и непораженные участки интимы аорты мужчин, взятой асептически через 1—3 ч после внезапной смерти от инфаркта миокарда, подвергали ферментативному диспергированию коллагеназой в течение 4 ч. Выделенные клетки сажали в культуру с плотностью  $2 \cdot 10^4$  клеток на  $1 \text{ см}^2$ . Клетки, культивированные из атеросклеротически пораженного участка аорты человека, отличаются от клеток, полученных из непораженной интимы, более высокой пролиферативной активностью и значительно большим содержанием липидов, в первую очередь свободного холестерина и эфиров холестерина [14]. 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  $\text{CO}_2$  — воздух (5:95), насыщенной водой. Среду меняли каждые 3 дня. На 7-й день культивирования к клеткам добавляли в объемных соотношениях 9:1 среду 199 и указанные препараты, а также  $^3\text{H}$ -тимидин (1 мкКи/мл). После 24 ч инкубации культуры клеток 5 раз промывали изотоническим фосфатным буфером (PBS), после чего клеточные липиды экстрагировали смесью гексан — изопропанол в соотношении 3:2 (объем/объем). В полученном материале определяли содержание внутриклеточного холестерина, степень включения  $^3\text{H}$ -тимидина в ДНК. Техника эксперимента и методы статического анализа подробно описаны ранее [4, 5, 7, 14].

Липосомы получали из яичного лецитина и стерилана (молярное соотношение 9:1) методом обращения фаз в растворе, содержащем 0,15 М NaCl, 5 мМ трис-HCl (рН 7,4), 0,1 М

Таблица 1

## Общая активность лизосомальных протеиназ в гомогенате клеток интимы аорты человека

Участок аорты	Катепсин					Белок, мг на 1 г клеток
	A	B	L	C	D	
Норма	3,01±0,21	0,27±0,01	0,61±0,03	1,18±0,03	10,61±1,05	51,8±6,0
Липидная {по- лоша	5,65±0,30*	0,59±0,02*	0,98±0,02*	2,95±0,12*	19,85±1,08*	65,3±3,5
Бляшка	1,67±0,11*	0,18±0,01*	0,45±0,02	0,76±0,02*	11,12±0,98	73,6±4,0

Примечание. Здесь и в табл. 2—5 представлены средние  $(M \pm m)$  данные 5—8 опытов. Звездочка —  $p < 0,05$ .

непстатин или 0,05 М леупептин. Концентрация липидов составляла 10 мг/мл. Липосомы добавляли в культуру клеток в концентрации 100 мкг липидов на 1 мл культуральной среды [17].

В гомогенате аорты, культивированных клеток интимы и нестимулированных перитонеальных макрофагах мышей [9] спектрофлуориметрически определяли активность 5 лизосомальных протеиназ: катепсинов А (КФ 3.4.12.A.1), В (КФ 3.4.22.1), С (КФ 3.4.14.1), D (КФ 3.4.23.5) и L (КФ 3.4.22.15), используя в качестве субстратов соответственно КБЗ-глу-тир, КБЗ-арг-арг-метокси-β-нафталин, гли-фен-β-нафталин, гемоглобин и КБЗ-фен-арг-7-амидо-4-метилкумарин [1, 10]. Белок определяли по методу Лоури [12].

## Результаты и обсуждение

Полученные данные свидетельствуют о значительных различиях в функциональной активности лизосомальных протеиназ при развитии процесса атерогенеза. Так, если в области липидной полосы в гомогенате аорты обнаружено увеличение активности практически всех ферментов на 60—150 % по сравнению с непораженным участком, то в зоне атеросклеротической бляшки, напротив, активность большинства лизосомальных протеи-

наз была в среднем на 26—44 % ниже (табл. 1). Эти данные находятся в определенном соответствии с результатами, полученными на культуре непораженных клеток аорты с включением в среду культивирования атерогенной сыворотки. Как видно из табл. 2, по мере увеличения времени культивирования в период до 24—48 ч параллельно степени включения холестерина увеличивалась активность катепсинов А, В, D на 23—49 %. Однако при увеличении времени культивирования до 72 ч активность лизосомальных протеиназ снижалась. Подобная динамика изменения активности протеиназ в определенной степени отражает распределение активности ферментов в нормальном участке аорты, липидной полосе и бляшке, поскольку в случае энзимологического анализа в клетках интимы через 72 ч после культивирования с атерогенной сывороткой мы имели модель типичной атеросклеротической клетки.

Представляют интерес результаты, полученные при включении в среду культивирования непстатина, специфического ингибитора катепсина D,

Таблица 2

## Влияние сывороток крови больных ишемической болезнью сердца (ИБС) на атеросклеротические параметры и активность лизосомальных протеиназ субэндотелиальных клеток из непораженной интимы аорты человека

Время культивирования, ч	Содержание холестерина, мкг на 1 мг белка	Включение <sup>3</sup> H-тимидина, имп на 1 мкг белка	Активность катепсинов, мкмоль/мин на 1 г белка				
			A	B	L	C	D
0	61,0±5,5	55,1±7,0	5,51±0,09	0,33±0,05	1,0±0,1	1,66±0,07	12,80±1,10
24	133,5±11,3*	105,6±9,7*	6,77±0,54*	0,39±0,02	1,1±0,1	1,69±0,48	14,01±2,21
48	168,2±11,0*	117,6±8,8*	6,01±0,77	0,49±0,03*	1,3±0,04	1,55±0,05	16,99±1,06*
72	192,7±10,5*	124,5±14,6*	4,04±0,12*	0,25±0,03*	1,1±0,2	1,20±0,04	11,67±2,38

Примечание. Интимальные клетки с 1-го по 5-й день культивировали со стандартной средой, содержащей 10 % фетальную телячью сыворотку; с 6-го по 8-й день (в течение 72 ч) — с атерогенной сывороткой.

Таблица 3

Влияние пепстатина и леупептина на активность лизосомальных протеиназ, накопление холестерина и пролиферацию клеток интимы аорты человека

Условия эксперимента	Активность катепсинов, мкмоль/мин на 1 г белка			Содержание холестерина, мкг на 1 мг белка	Включение <sup>3</sup> H-тимидина, имп на 1 мкг белка
	B	L	D		
Делипидированная сыворотка	0,18±0,02	0,71±0,05	9,96±1,03	60,1±5,9	59,6±5,0
Атерогенная сыворотка	0,20±0,06	0,84±0,02	11,55±2,54	140,8±10,6	120,6±7,9
Пепстатин (10 <sup>-5</sup> М)	0,22±0,04	0,64±0,03	4,9±0,28*	212,6±23,3*	154,5±18,7
Пепстатин в составе липосом	0,23±0,05	0,76±0,04	0,0	266,7±42,1*	178,2±22,4*
Леупептин (5·10 <sup>-5</sup> М)	0,04±0,005*	0,42±0,02*	10,60±1,11	196,5±18,7*	146,6±15,5
Леупептин в составе липосом	0,0	0,20±0,03*	9,15±0,82	210,5±16,7*	170,0±17,8*

Таблица 4

Влияние пепстатина и леупептина на активность лизосомальных протеиназ и накопление холестерина в перитонеальных макрофагах мышей

Условия эксперимента	Активность катепсинов, мкмоль/мин на 1 г белка			Содержание холестерина, мкг на 1 мг белка
	B	L	D	
Делипидированная сыворотка	1,44±0,09	6,00±0,70	53,7±7,7	44,6±6,0
Атерогенная сыворотка	1,70±0,06	6,20±0,80	66,9±8,0*	110,4±12,7
Пепстатин (5·10 <sup>-6</sup> М)	1,51±0,07	5,82±0,61	21,6±1,7*	139,6±18,8
Леупептин (10 <sup>-6</sup> М)	0,28±0,03*	1,72±0,31	60,0±5,5	144,7±11,0

Примечание. Время культивирования 12 ч.

или леупептина, ингибитора тиоловых протеиназ — катепсинов В и L (табл. 3 и 4). Включение указанных ингибиторов в среду культивирования как клеток интимы аорты, так и перитонеальных макрофагов приводило к снижению активности соответствующих эндопептидаз с параллельным увеличением степени аккумуляции холестерина и пролиферирующей активности клеток интимы. Введение ингибиторов в среду культивирования в составе липосом вызывало полное ин-

гибирование активности катепсина D в случае пепстатина и практически 80—100 % ингибирование активности исследованных тиоловых протеиназ при введении леупептина. Следует подчеркнуть, что и степень аккумуляции холестерина в клетках, равно как и интенсивность включения <sup>3</sup>H-тимидина, в данных экспериментальных условиях была значительно выше. Результаты исследования позволяют считать, что во внутриклеточном катаболизме атерогенных липопротеидов

Таблица 5

Влияние дитиотрептола и метионина на активность протеиназ, накопление холестерина и пролиферацию в атеросклеротических клетках интимы аорты человека

Условия эксперимента	Содержание холестерина, мкг на 1 мг белка	Включение <sup>3</sup> H-тимидина, имп на 1 мкг белка	Активность катепсинов, мкмоль/мин на 1 г белка	
			B	L
Контроль	265,6±27,8	145,5±12,7	0,20±0,03	0,55±0,02
Дитиотрептол (10 <sup>-5</sup> М)	159,4±18,8*	95,7±8,8*	0,35±0,02*	0,76±0,05*
Метионин (10 <sup>-4</sup> М)	198,9±21,6	122,6±18,7	0,29±0,03*	0,60±0,03



низкой плотности (ЛПНП) принимает участие не только катепсин D, о чем свидетельствуют данные модельных экспериментов [2, 3, 13], но и комплекс кислых тиоловых эндопептидаз. Подобное заключение подтверждают и результаты, представленные в табл. 5. Введение в среду культивирования дитиотреитола вызывало закономерную активацию катепсинов В и L с одновременным снижением уровня внутриклеточного холестерина и пролиферирующей активности атеросклеротических клеток интимы аорты человека соответственно на 40 и 34%. Введение метионина, являющегося предшественником цистеина, вызывало сходный, но менее выраженный характер изменения активности ферментов и показателей развития атеросклеротического процесса в клетках интимы. Исходя из полученных результатов, можно считать, что протеолитическая система лизосом клеток интимы является важным функциональным звеном в регуляции катаболизма ЛПНП, а суммарная активность кислых эндопептидаз различных групп в большой мере определяет интенсивность процесса атерогенеза в сосудистой стенке.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Васильев А. В., Капелевич Т. А., Тугельян В. А. // *Вопр. мед. химии.* — 1983. — № 3. — С. 127—130.
2. Карманский И. М., Ковалева Г. Г., Викторова Л. И., Шпикитер В. О. // *Бюл. экпер. биол.* — 1986. — № 8. — С. 148—150.
3. Карманский И. М., Пичугин А. Л., Шпикитер В. О. // *Вопр. мед. химии.* — 1979. — № 6. — С. 738—741.
4. Ли Хва Рен, Васильев А. В., Орехов А. Н. и др. // *Хим.-фармац. журн.* — 1988. — № 10. — С. 1234—1239.
5. Ли Хва Рен, Васильев А. В., Орехов А. Н. и др. // *Вопр. питания.* — 1989. — № 1. — С. 9—12.
6. Berberian P. A., Fowler S. // *Exp. mol. Pathol.* — 1979. — Vol. 30. — P. 27—40.
7. Chazov E. I., Orekhov A. N., Perova N. V. et al. // *Lancet.* — 1986. — N 8507. — P. 595—597.
8. Goldstein J. I., Brunschede G. Y., Brown M. S. // *J. biol. Chem.* — 1975. — Vol. 250. — P. 7854—7863.
9. Goldstein J. L., Ho Y. K., Brown M. S. // *Ibid.* — 1979. — Vol. 255. — P. 1839—1848.
10. Kirschke H. // *Proteinases in Mammalian Tissues and Cells.* — Halle-Wittenberg, 1982. — P. 125—128.
11. Lojda Z., Ruzickova M., Havrankova E., Synkova V. // *Histochem. J.* — 1984. — Vol. 16. — P. 399—405.
12. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. et al. // *J. biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
13. Nakai T., Otto P. S., Whayne T. F. // *Biochem. biophys. Acta.* — 1976. — Vol. 422. — P. 380—389.
14. Orekhov, A. N., Tertov V. V., Kydryashov S. A. et al. // *Atherosclerosis.* — 1986. — Vol. 60. — P. 749—754.
15. Petters T. J. // *Lysosomes in Biology and Pathology.* — Amsterdam, 1975. — Vol. 4. — P. 47—74.
16. Petters T. J., Muller M., De Duve C. // *J. exp. Med.* — 1972. — Vol. 136. — P. 1117—1128.
17. Szoka M. // *J. biol. Chem.* — 1978. — Vol. 254. — P. 746—755.
18. Wolinsky H. // *Circ. Res.* — 1980. — Vol. 47. — P. 301—309.

Поступила 02.03.89

#### LYSOSOMAL PROTEINASES FROM HUMAN AORTA INTIMA AND ATHEROGENESIS

A. V. Vasil'ev, Li Khva Ren, A. N. Orekhov, B. B. Tertov, Kim Han Zon, V. A. Tutel'yan

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

Activity of lysosomal proteinases cathepsins A, B, C, D and L was studied in cultivated cells of human aorta intima, isolated from intact zone of aorta, from lipid stria and atherosclerotic patch. The highest enzymatic activity was detected in the lipid stria cells and the lowest activity — in atherosclerotic patch. Atherogenous blood serum, added simultaneously with pepstatin or leupeptine into the cell culture of intact aorta, caused a distinct increase in the proliferating activity of these cells and in the level of cholesterol accumulation, while activities of cathepsin D or B and L were inhibited by 80-100%, respectively. The data obtained suggest that lysosomal proteolytic system plays an important role in development of atheromatous impairment of vascular wall.

Б. А. Кудряшов, А. М. Ульянов, Ю. А. Тарасов

УСИЛЕНИЕ ПРОТАМИНА СУЛЬФАТОМ ДИАБЕТОГЕННОГО  
ДЕЙСТВИЯ АЛЛОКСАНА

Биологический факультет университета, Москва

Профилактическое введение гепарина препятствует возникновению у крыс аллоксанового диабета [6]. Наряду с этим длительное введение гепарина (не позже чем через 48 ч после начала действия аллоксана) животным с развивающимся аллоксановым диабетом способствует их выздоровлению, сопровождающемуся восстановлением инсулярного аппарата и нормализацией уровня сахара в крови [5, 6].

Установлено также, что нейтрализация эндогенного гепарина вызывает резистентность организма к гипогликемическому действию инсулина [9—11]. Снижение уровня эндогенного гепарина путем введения в организм достаточного количества протамина сульфата способствует более выраженному проявлению активности диабетогенного фактора (ДГФ) [1, 4] в отношении инсулярной системы, характеризующемуся, в частности, более эффективным его гипергликемизирующим действием при введении в здоровый организм животных-реципиентов [7].

Задачей работы явилось изучение диабетогенного действия аллоксана на фоне предварительного связывания эндогенного гепарина протамином сульфатом.

## Методика

Работу проводили на беспородных крысах-самцах массой 180—250 г. Животных содержали на обычном лабораторном рационе. Для развития экспериментального диабета крысам через 18—24 ч голодания внутривенно вводили аллоксан («Спофа», ЧССР) в дозе 35—40 мг/кг, в виде раствора в 0,85 % NaCl. Внутривенные введения и взятия крови осуществляли через *v. jugularis*. Кровь отбирали с 3,8 % раствором цитрата натрия (в соотношении 9:1). Концентрацию сахара в крови определяли по методу [2], концентрацию иммунореактивного инсулина в сыворотке крови — с помощью наборов «Insulin RIA KIT» (Венгрия), активность ДГФ в крови — согласно методу, предложенному в работах [1, 4], а также по методу [7].

В работе использовали протамин сульфат для инъекций (СССР) и гепарин («Gedeon Richter», Венгрия).

Результаты опытов обрабатывали статистически по методу Фишера — Стьюдента.

## Результаты и обсуждение

В части экспериментов изучали стимулирующее действие протамина сульфата на развитие аллоксанового диабета у крыс. Как видно из табл. 1, предварительное внутривенное введение протамина сульфата (за 5 мин до введения подпороговой дозы аллоксана — 35 мг/кг) с последующим ежедневным двукратным внутривенным его введением в течение 5—7 дней приводит к проявлению диабетогенного действия аллоксана, что выражается в сильной гипергликемии и гипoinsулинемии уже к 3-му дню опыта. Эти изменения сохранялись в течение всего времени наблюдения. Введение аллоксана в той же дозе на фоне инъекций физиологического раствора (контроль) не приводит к развитию высокой и устойчивой гипергликемии при сохранении нормальной концентрации инсулина в крови. В этой, контрольной, группе животных, как видно из табл. 1, с 3-х по 11-е сутки после введения аллоксана содержание сахара в крови достоверно возрастает по сравнению с исходным уровнем, но остается в 2 раза ниже, чем в группе, в которой был введен протамин сульфат. Начиная с 14—15 дней наблюдения концентрация сахара нормализовалась.

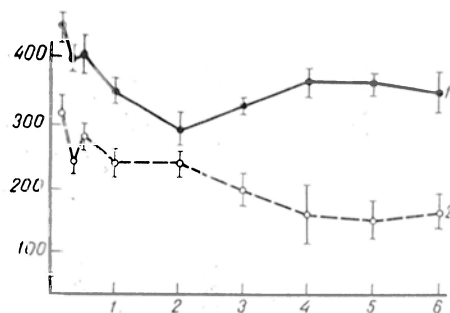
Инъекции на фоне протамина сульфата пороговой дозы аллоксана — 40 мг/кг (см. рисунок) вызывали более резкое повышение уровня сахара в крови исследуемых животных. Так, одно предварительное введение протамина сульфата приводит к повышению концентрации сахара в крови к 5-м суткам опыта до 440,5 мг%, что в 1,4 раза выше уровня сахара в группе крыс, получивших внутривенное введение аллоксана, но без протамина сульфата. В том случае, если, кроме предварительного введения протамина сульфата, проводили еще и ежедневное двукратное внутривенное его введение в течение 5—7 дней, развивающаяся гипергликемия

Таблица 1

## Усиление протамином сульфатом диабетогенного действия аллоксана (35 мг/кг)

Исследуемый показатель	Исходный	Период после введения аллоксана, дни					
		3	7	11—12	14—15	24	35
<i>Опыт — протамина сульфат (0,5 мл 0,2 % раствора на 200 г массы тела внутривенно)</i>							
Сахар, мг%	85,9±7,3	297,9±25,5	291,5±20,7	231,8±19,2	201,5±17,4	358,7±20,1	289,2±24,3
<i>n</i>	14	10	9	8	8	7	7
<i>p</i>		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Инсулин, мкМЕ/мл	32,7±2,8	11,8±2,4	7,2±2,1	4,1±1,5	3,0±1,2	1,7±0,3	0,8±0,2
<i>n</i>	8	6	7	7	7	6	5
<i>p</i>		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>Контроль — 0,85 % NaCl</i>							
Сахар, мг%	81,7±6,8	143,2±17,3	151,5±15,0	138,8±12,3	92,5±9,1	102,0±12,3	97,1±11,5
<i>n</i>	12	12	11	10	9	8	8
<i>p</i>		<0,001	<0,001	<0,001	>0,2	>0,1	>0,2
Инсулин, мкМЕ/мл	29,7±3,5	31,7±4,2	27,5±4,2	26,9±3,1	30,5±5,6	26,1±2,4	27,3±5,8
<i>n</i>	7	6	7	6	6	6	5
<i>p</i>		>0,5	>0,5	>0,5	>0,5	>0,2	>0,5

Примечание. Показатели достоверности *p* рассчитан по отношению к исходному уровню.



Влияние протамина сульфата на развитие аллоксанового диабета у крыс.

По оси абсцисс — время (в мес); по оси ординат — сахар крови (в мг%). 1 — протамина сульфат (0,5 мл 0,2 % раствора на 200 г массы тела внутривенно) + аллоксан (40 мг/кг); 2 — 0,85 % раствор NaCl + аллоксан (40 мг/кг).

была еще более выраженной (до  $646,9 \pm 79,2$  мг%).

Длительное, в течение 6 мес, на-

блюдение (см. рисунок) показало, что в течение всего этого времени степень гипергликемии в группе крыс, которым вводили протамина сульфат перед введением аллоксана, значительно превышает таковую в контрольной группе.

Серия опытов была проведена с целью определения содержания ДГФ в плазме крови подопытных крыс. Известно, что ДГФ, появляющийся в организме человека и животных при развитии инсулинзависимого сахарного диабета [1, 4] и представляющий собой белок альбумин с мол. массой 60 000 дальтон [3], ответствен за дезорганизацию функции инсулярной системы организма [8]. Известно, что гепарин блокирует не только диабетогенное действие аллоксана [6], но и специфическую активность ДГФ [1, 3, 4].

Таблица 2

Активность ДГФ в плазме крови, полученной от крыс с аллоксановым диабетом, вызванным внутривенным введением аллоксана (35 мг/кг) на фоне инъекций протамина сульфата (0,5 мл 0,2 % раствора на 200 г массы тела внутривенно)

Группа животных-доноров	Концентрация сахара в крови здоровых крыс-реципиентов (в мг %), после введения им плазмы крови, взятой от крыс-доноров			
	через 7 дней после введения аллоксана		через 15 дней после введения аллоксана	
	1	2	1	2
1. Протамина сульфат 5 мин аллоксан + протамина сульфат (5—7 дней) <i>n</i> <i>p</i>	87,5 ± 4,5 6	171,5 ± 9,1 6 <0,001	86,3 ± 3,9 7	169,7 ± 8,4 6 <0,001
2. Та же группа животных, но за 5 мин до введения крысам-реципиентам плазмы крови этой группы им внутривенно вводили гепарин (50 МЕ/200 г) <i>n</i> <i>p</i>	79,7 ± 4,8 6	80,4 ± 5,7 6 >0,5	84,5 ± 4,4 6	78,6 ± 5,1 6 >0,5
3. 0,85 % раствор NaCl, через 5 мин аллоксан, а затем 5—7 дней 0,85 % раствор NaCl (контроль) <i>n</i> <i>p</i>	90,6 ± 6,7 6	140,8 ± 8,2 6 <0,001	91,2 ± 6,6 6	98,5 ± 8,8 6 >0,5
Та же группа животных, но за 5 мин до введения крысам-реципиентам исследуемой плазмы им внутривенно вводили гепарин (50 МЕ/200 г) <i>n</i> <i>p</i>	92,7 ± 7,3 7	93,4 ± 8,1 6 >0,5	90,4 ± 7,1 6	91,8 ± 6,8 6 >0,5

Примечание. Статистические показатели рассчитаны по отношению к исходному уровню; 1 — исходная концентрация сахара в крови; 2 — концентрация сахара в крови через 7 дней после введения исследуемой плазмы крови крыс-доноров, которым вводили аллоксан.

В табл. 2 приведены результаты определения активности ДГФ в крови животных с развивающимся аллоксановым диабетом. Можно видеть, что введение плазмы крови, полученной от крыс, которым аллоксан вводили на фоне протамина сульфата, вызывает у здоровых крыс-реципиентов значительную гипергликемию ( $171,5 \pm 9,1$  мг%) через 7 дней после введения. Изучение активности этого вещества в контрольной группе крыс (3-й), которым аллоксан вводили на фоне физиологического раствора, также выявляет наличие активности ДГФ в их крови, но в меньшей степени ( $140,8 \pm 8,2$  мг%) по сравнению с группой 1-й ( $p < 0,05$ ). ДГФ, чья активность обнаруживается в обеих группах животных, которым вводили аллоксан (1-й и 3-й), идентичен по своей природе, так как его активность ингибируется гепарином. Действительно, предварительное (за 5 мин до введения крысам-реципиентам исследуемой плазмы крови от крыс с аллоксановым диабетом) введение гепарина полностью блокирует проявление активности этого белка (2-я и 4-я группы). Активность ДГФ в опытной группе животных сохраняется в течение всего времени наблюдения. Так, через 15 дней уровень гликемии в крови крыс-реципиентов составляет  $169,7 \pm 8,4$  мг% ( $p < 0,001$ ). Однако в контрольной группе через 15 дней после введения аллоксана активности ДГФ в крови уже не наблюдается —  $98,5 \pm 6,8$  мг% ( $p > 0,5$ ) (см. табл. 2).

Наши данные показывают, что снижение содержания реактивного гепарина в кровотоке способствует развитию явлений дисфункции инсулярной системы при введении в организм аллоксана. Очевидно, блокада эндогенного гепарина протамином сульфатом не только способствует эффективному действию аллоксана в первые минуты после введения его в кровоток, но и вызывает обострение эксперименталь-

ного диабета уже при участии образующегося ДГФ, активность которого проявляется резче на фоне искусственно создаваемого дефицита гепарина [7].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Баскакова Г. М., Кудряшов Б. А., Пытель Ю. А. // Пробл. эндокринологии. — 1981. — № 4. — С. 42—45.
2. Канторович Л. С. Способ определения сахара в крови и других биологических жидкостях: А. с. 158399 СССР.
3. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А., Ульянов А. М. // Пробл. эндокринологии. — 1985. — № 6. — С. 51—54.
4. Кудряшов Б. А., Понасенкова Г. В., Пытель Ю. А. // Там же. — 1982. — № 5. — С. 61—64.
5. Кудряшов Б. А., Пытель Ю. А., Баскакова Г. М., Ляпина Л. А. // Вопр. мед. химии. — 1978. — № 4. — С. 520—523.
6. Кудряшов Б. А., Пытель Ю. А., Баскакова Г. М. и др. // Пат. физиол. — 1982. — № 2. — С. 67—70.
7. Кудряшов Б. А., Пытель Ю. А., Ульянов А. М., Тарасов Ю. А. // Бюл. exper. биол. — 1986. — № 7. — С. 16—18.
8. Кудряшов Б. А., Ульянов А. М., Ляпина Л. А. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 5. — С. 57—59.
9. Кудряшов Б. А., Ульянов А. М., Шапиро Ф. Б. и др. // Бюл. exper. биол. — 1984. — № 5. — С. 516—518.
10. Кудряшов Б. А., Шапиро Ф. Б., Ульянов А. М., Пытель Ю. А. // Пробл. эндокринологии. — 1984. — № 1. — С. 51—56.
11. Kudrjashov B. A., Shapiro F. B., Ulyanov A. M. // Acta physiol. hung. — 1987. — Vol. 69, N 2. — P. 197—202.

Поступила 18.03.88

#### THE AMPLIFYING EFFECT OF PROTAMINE SULFATE ON DIABETOGENIC PROPERTIES OF ALLOXAN

B. A. Kudrjashov, A. M. Ul'janov, Yu. A. Tarasov

Biological Faculty, M. V. Lomonosov State University, Moscow

Administration of protamine sulfate into circulation was shown to increase the diabetogenic effect of alloxan. Protamine sulfate bound endogenous heparin, as a result of which the diabetogenic factor caused more severe forms of experimental diabetes. At the same time, the diabetogenic factor exhibited distinctly higher activity during the heparin deficiency developed.

# МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 616-008.931:577.152.1]-074

М. А. Модель

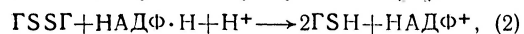
## К ОПРЕДЕЛЕНИЮ АКТИВНОСТИ ГЛУТАТИОНПЕРОКСИДАЗЫ

ВНИИ экспериментальной медицины, Ленинград

При некоторых заболеваниях человека происходит активация свободнорадикальных процессов [6]. В этих случаях представляет интерес изучение активности антиокислительных ферментов. Одним из таких ферментов является глутатионпероксидаза (КФ 1.11.1.9), катализирующая разложение перекиси водорода и органических гидроперексидей с одновременным окислением глутатиона:



где ROOH — перекись, GSH и GSSG — соответственно восстановленная и окисленная формы глутатиона. Активность глутатионпероксидазы определяют спектрофотометрически либо по количеству непрореагировавшего восстановленного глутатиона, либо по скорости образования окисленного. В первом случае реакцию останавливают добавлением трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и после отделения осадка вносят реактив на тиоловые группы [1, 2], во втором — используют сопряженную реакцию с НАДФ·Н-зависимым ферментом глутатионредуктазой [3]:



регистрируя изменение оптической плотности при 340 нм за счет окисления НАДФ·Н. При одновременном протекании реакций (1) и (2) количество вводимой в кювету глутатионредуктазы выбирают таким образом, чтобы обеспечить постоянную концентрацию восстановленного глутатиона. Этот метод более точный, так как определяется вещество, отсутствующее до реакции, кроме того, он позволяет обойтись без ТХУ, которая может окислять глутатион [7]. Однако его использованию препятствуют высокие требования к чувствительности спектрофотометра, а также необходимость в глутатионредуктазе, не выходящей

отечественной промышленностью. Мы предлагаем видоизменение метода, заключающееся в том, что реакции (1) и (2) проводятся отдельно: при этом упрощается регистрация изменения оптической плотности и расходуетея приблизительно в 20 раз меньше глутатионредуктазы.

### Методика

*Получение глутатионредуктазы.* При обработке метода исходили из работы [5]. Пекарские дрожжи подвергали аутолизу в присутствии толуола [8]. К 1 кг дрожжей добавляли 60 мл толуола и инкубировали при 37 °С в течение 1,5 ч при периодическом перемешивании. Затем добавляли 600 мл 15 мМ ЭДТА (рН 7,0) и оставляли на ночь при медленном перемешивании на мешалке. Суспензию центрифугировали при 1500 g 20 мин, надосадочную жидкость подщелачивали до рН 6,5. Дальнейшие операции проводили при 4 °С. К раствору добавляли кристаллический сульфат аммония до 70 % насыщения и центрифугировали при 15 000 g 20 мин. Осадок растворяли в 30 мМ трис-НСl (рН 8,0) с 1 мМ ЭДТА и диализовали против того же буфера 12 ч. Диализованный раствор вносили в делительную воронку с 350 см<sup>3</sup> ДЭАЭ-целлюлозы («Reanal», ВНР), уравновешенной 30 мМ трис-НСl (рН 8,0) с 1 мМ ЭДТА, и промывали ионообменник 1,5 л того же буфера. Адсорбированный фермент снимали 30 мМ трис-НСl (рН 8,0) с 1 мМ ЭДТА и 0,3 м NaCl. Фракции с активностью фермента концентрировали сульфатом аммония (80 % насыщения) и, разделив на три порции, подвергали гель-фильтрации на колонке 2×40 см с сефадексом G-75 («Pharmacia», Швеция). Элюцию вели в 29 мМ фосфатном буфере (рН 7,4) с 1 мМ ЭДТА. Фермент концентрировали сульфатом аммония и хранили при —25 °С. Из 1 кг дрожжей было получено 450 ед. глутатионредуктазы [за 1 ед. принимали количество фермента, окисляющее 1 мкмоль НАДФ·Н за 1 мин в 0,05 М фосфатном буфере (рН 7,2) с 1 мМ ЭДТА, 1 мМ GSSG и 40 мкМ НАДФ·H при комнатной температуре].

*Определение активности глутатионпероксидазы.* Активность глутатионпероксидазы определяли в эритроцитах, лейкоцитах, клетках нейробластомы и некоторых других типах клеток. Для реакции использовали гомогенат,

### Определение активности глутатионпероксидазы в эритроцитах человека

Проба	$\Delta D_{340}$ , мин <sup>-1</sup>	ГССГ, мкм	ГССГ, моль		Содержание гемоглобина, мг	Активность фермента, ед/мг
			всего	с участием фермента		
Контроль	0,011	2,8	22	—	—	—
	0,011	2,8	22	—	—	—
Образец	0,037	11,2	90	68	0,082	166
	0,072	22,4	179	157	0,190	165

Примечание. Концентрацию ГССГ вычисляли на основании зависимости:  $\Delta D_{340} \cdot 10^3 = 3 + 3,1 \text{ ГССГ}$ .

содержащий в зависимости от типа клеток от 0,5 до 20 мг белка в 1 мл.

Используемые реактивы: 1) раствор А: 0,1 М К-фосфатный буфер (рН 7,9) с 2 мМ ЭДТА и 10 мМ GSH («Reanal»); 2) раствор Б: 0,5 М трис-HCl (рН 7,7) с 1 мМ ЭДТА; 3) 40 мМ гидроперекись трет-бутила («Мегск», США); 4) ГССГ («Reanal»); 5) 3,5 мМ НАДФ·Н («Reanal»); 6) глутатионредуктаза. Концентрацию гидроперекиси трет-бутила определяли согласно [4]. Растворы глутатиона, гидроперекиси трет-бутила и НАДФ·Н готовили в день использования.

Для проведения реакции (1) в пробирку вносили 75 мкл раствора А и 75 мкл клеточного гомогената. После нескольких минут инкубации при  $25 \pm 0,1^\circ \text{C}$  вносили 10 мкл 40 мМ гидроперекиси трет-бутила. Спустя 5 мин в реакционную смесь добавляли 3,84 мл раствора Б. При этом скорость реакции резко уменьшалась за счет разбавления глутатиона. Сразу после этого проводили реакцию (2). В кювету вносили 2 мл полученного раствора, 30 мкл 3,5 мМ НАДФ·Н и 0,055—0,06 ед глутатионредуктазы, быстро перемешивали и определяли изменение оптической плотности при 340 нм в течение 1 мин, причем первое измерение производили через 15 с после начала реакции. При проведении калибровочных измерений глутатионредуктазу вносили в кювету с 2 мл раствора Б, содержащего известное количество (0—25 мкм) окисленного глутатиона и 30 мкл 3,5 мМ НАДФ·Н. При указанных условиях калибровочная зависимость представляла собой прямую. Количество глутатиона, подвергшегося ферментативному окислению в условиях опыта, было пропорционально концентрации белка в пробе, что позволило принять эту величину за меру активности фермента. Таким образом, 1 ед глутатионпероксидазы определяли как количество фермента, окисляющее 1 мкмоль глутатиона в пересчете на 1 мин реакции. Активность фермента относили к количеству белка (для эритроцитов — гемоглобина), присутствующего в реакционной среде. В контрольной реакции гомогенат заменяли равным объемом воды или буфера. Окисление глутатиона, не связанное с пероксидазой, во всех исследованных образцах давало вклад в общую реакцию, не превышающий 5 %, поэтому второй контроль — без перекиси — обычно не ставился (см. таблицу).

#### Результаты и обсуждение

Нами было проведено определение активности глутатионпероксидазы у 30

практически здоровых людей в возрасте 20—40 лет. Кровь с 5 мМ ЭДТА в качестве антикоагулянта дважды промывали холодным раствором 0,150 М NaCl с последующим центрифугированием при 700 g 10 мин. Эритроциты лизировали 5—10 объемами воды, затем вносили тритон Т-100 до конечной концентрации 0,1 % и перед измерением доводили разбавление исходного объема эритроцитов до 150 раз. Обработка детергентов давала максимальную величину активности, которая в измеренных образцах составила  $180 \pm 29$  ед на 1 г гемоглобина.

Описанные измерения легко выполняемы на отечественных спектрофотометрах (мы использовали прибор СФ-46). Такая возможность обеспечивается тем, что изменения оптической плотности регистрируются на фоне общего поглощения около 0,4, что в 3 раза меньше, чем в известной методике [3]. Метод хорошо воспроизводим: при одном и том же разбавлении пробы разброс  $\Delta D_{340}$  не превышал 0,001—0,002. По нашим данным, метод позволяет определять фермент в клеточных экстрактах с активностью на два порядка меньшей, чем в эритроцитах человека.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гаврилова А. Р., Хмара И. Ф. // Лаб. дело. — 1986. — № 12. — С. 721—724.
2. Моин В. М. // Там же. — С. 724—727.
3. Beutler E. Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods. — New York, 1975.
4. Kokatnur V. R., Jellung M. // J. Amer. chem. Soc. — 1941. — Vol. 63, N 5. — P. 1432—1433.
5. Mavis R. D., Stellwagen E. // J. biol. Chem. — 1968. — Vol. 243. — P. 809—814.
6. Pryor W. A. // Ann. Rev. Physiol. — 1986. — Vol. 48. — P. 657—667.
7. Srivastava S. K., Beutler E. // Analyt. Biochem. — 1968. — Vol. 25. — P. 70—76.
8. Yun S. L., Aust A. E., Suelter C. H. // J. biol. Chem. — 1976. — Vol. 251. — P. 124—128.

Поступила 14.01.88

# ESTIMATION OF GLUTATHIONE PEROXIDASE ACTIVITY

M. A. Model

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

A simplified procedure is developed for estimation of glutathione peroxidase activity involving glutathione reductase in the conjugated reaction. The procedure developed enabled to use commonly employed spectrophotometers and to decrease distinctly the glutathione reductase consumption. Isolation of glutathione reductase from yeast is described.

УДК 615.381.36.012.6

В. Ю. Тоцаков, М. А. Данилов, Н. К. Шестакова, Т. И. Козловская, Е. Ю. Куликова

## ПОЛУЧЕНИЕ СУСПЕНЗИИ ИЗОЛИРОВАННЫХ ГЕПАТОЦИТОВ С ПОМОЩЬЮ ОТЕЧЕСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА КОЛЛАЛИТИНА

НИИ трансплантологии и искусственных органов Минздрава СССР, Москва

В настоящее время для лечения больных с печеночной недостаточностью различной этиологии все шире применяют суспензии изолированных гепатоцитов [1]. Изолированные клетки печени используют также для изучения разнообразных биохимических и биофизических процессов, происходящих в живой ткани [2].

Основным способом получения изолированных гепатоцитов служит ферментативное разрушение стромы органа. В качестве диспергирующего агента наиболее часто используют трипсин или коллагеназу [2]. Применение трипсина ограничивается его выраженным неспецифическим протеазным действием, вследствие чего повреждаются белки плазматической мембраны гепатоцитов. При использовании большой концентрации и длительной экспозиции в растворе трипсина существует опасность значительного повреждения клеток, ведущего к потере их жизне-

способности. Зарубежный препарат коллагеназы не имеет указанных выше недостатков, однако высокая стоимость этого препарата ограничивает его применение, особенно в клинической практике, где требуются большие количества клеток.

В связи с изложенным мы считали необходимым модифицировать метод ферментативного выделения клеток печени, используя отечественный препарат коллалитин, и провести сравнение его диспергирующих свойств, а также трипсина и коммерческого препарата коллагеназы.

### Методика

Эксперименты выполнены на беспородных белых крысах массой 160—250 г. В каждой группе проведено 4—6 экспериментов.

В работе использовали сукцинат, бычий сывороточный альбумин (фракция V), этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА) и гидроксипиперазинэтансульфониевую кислоту (ГЕПЕС), коллагеназу («Serva», ФРГ). Ос-

Таблица 1

Составы сред, использованных для выделения гепатоцитов

Ингредиент	Среда перфузии 1	Среда перфузии 2*	Среда отмывки	Среда инкубации
NaCl, ммоль	150	150	140	140
KHCO <sub>3</sub> , ммоль	5	5	5	5
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2 H <sub>2</sub> O, ммоль	1	1	5	5
CaCl <sub>2</sub> , ммоль	—	1	1	1
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O, ммоль	—	1	3	3
ЭДТА Na <sub>2</sub> , ммоль	2	—	—	—
Альбумин, ‰	—	—	0,1	0,1
Нерес, ммоль	—	—	—	10
Глюкоза, ммоль	—	—	—	15
pH	7,5	7,5	7,5	7,5

\* Перед использованием указанного состава в него добавляли один из исследуемых ферментативных препаратов (концентрации указаны в тексте).



Сравнение эффективности коллалитина и других ферментов при получении гепатоцитов

Применяемый фермент и его концентрация, %	Процент гепатоцитов, не окрашенных трипановым синим	Потребление кислорода, мкмоль/мин·г	Коэффициент стимуляции дыхания сукцинатом	Концентрация АТФ**, мкмоль/г	Выход гепатоцитов, %
Трипсин: 0,25	0	0,3±0,1	10,0	0,3±0,1	31±4
Коллагеназа: 0,05	93±8	2,1±0,4	1,0	2,2±0,2	38±3
Коллалитин: 0,12	93±6	2,0±0,3	1,0	2,1±0,3	6±2
0,12*	70±14	1,8±0,3	1,4±0,7	1,9±0,5	12±3
0,2	85±12	1,6±0,4	1,7±0,9	1,7±0,3	18±4
0,3	65±32	1,1±0,3	2,9±1,5	1,0±0,4	19±4
0,16	89±16	1,9±0,4	1,6±0,7	2,1±0,3	8±3

\* Вариант с дополнительным инкубированием кусочков печени в 0,12 % растворе коллалитина на магнитной мешалке после обычной перфузии ферментом.

\*\* Содержание АТФ, приведенное в таблице, определяли после 1 ч инкубации изолированных гепатоцитов в среде инкубации в условиях пассирования карбогена над поверхностью суспензии.

тальные реактивы были отечественного производства марок х. ч. и ч. д. а. Коллалитин был выделен сотрудниками Всесоюзного НИИ мясной промышленности Госагропрома СССР из поджелудочных желез свиней. Использовали препарат с активностью 1,1 мЕД/мг.

Выделение гепатоцитов проводили по методу [3] в незначительной модификации. Схема выделения предусматривает 4 этапа: нересциркуляторную перфузию печени ЭДТА-содержащим раствором (среда перфузии 1; табл. 1); ресциркуляторную перфузию печени фермент-содержащим раствором (среда перфузии 2; см. табл. 1); диспергирование печени; отмывание гепатоцитов центрифугированием (последние два этапа проводили в среде отмывки; см. табл. 1). Растворы, используемые для перфузии, термостатировали (37 °С) и непрерывно барботировали 4% карбогеном.

Перфузию печени проводили через канюлю, введенную в воротную вену печени. Надпеченочный сегмент нижней полой вены перевязывали, подпеченочный — канюлировали. Через эту канюлю собирали перфузат на втором этапе выделения клеток при осуществлении замкнутого цикла перфузии. Время первой перфузии 10—15 мин. За это время печень полностью отмывалась от крови. Второй этап перфузии продолжался 10—20 мин. Скорость протока перфузата 30—40 мл/мин. Концентрация трипсина равнялась 0,25%, коллагеназы — 0,05%, коллалитин использовали в концентрациях от 0,06 до 0,3%.

В работе опробованы 4 способа механического диспергирования печени: 1) измельчение ножницами и продавливание через мелкое нейлоновое сито; 2) диспергирование на вибраторе. Измельченную ножницами ткань печени помещали в пластмассовые пробирки с внутренним диаметром 2 см. Диспергирование осуществляли за счет вибрации в вертикальной плоскости металлического пестика с манжетой диаметром 15 мм. Частота перемещения пестика 70 Гц, амплитуда 1 см; 3) диспергирование при помощи скарификации и измельчения пинцетами в чашке Петри; 4) диспергирование на магнитной мешалке.

По окончании диспергирования гепатоциты

фильтровали через мелкое нейлоновое сито. Отмывку гепатоцитов проводили 3-кратным центрифугированием при 100 g на холоду со сменной надосадочной жидкостью. Первый раз клетки осаждали 90 с, второй и третий — по 45 с. Инкубацию гепатоцитов проводили на роторном шейкере в термостатированных условиях при 37 °С. Среда инкубации постоянно насыщали 4% карбогеном, пассируя газ над поверхностью суспензии. Клетки инкубировали в разведении 5—15 мг/мл. Влажную массу определяли способом, описанным в работе [5].

Жизнеспособность клеток оценивали по их окрашиванию раствором трипанового синего (0,2%), интенсивности дыхания и содержанию АТФ. Определение содержания АТФ в депротеинизированном экстракте гепатоцитов проводили стандартным энзиматическим методом по восстановлению НАДФ в присутствии гексокиназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [4] с помощью набора реактивов «Boehringer» (ФРГ). Дыхание определяли полярографически при 37 °С.

Полученные данные обработаны статистически и представлены с указанием средней величины и дисперсии.

### Результаты и обсуждение

В двух контрольных группах опытов в качестве основного диспергирующего агента использовали трипсин и коллагеназу. При проведении второго этапа выделения гепатоцитов 0,25 % раствором трипсина нам не удалось получить жизнеспособных клеток. Все гепатоциты были прокрашены трипановым синим, эндогенное дыхание клеток не превышало 0,4 мкмоль/мин·г. Выход клеток составил 25—30 % от исходной массы печени (табл. 2). Использование 0,05 % раствора коллагеназы позволяло получить 93±8 % жизнеспособных

клеток. Эндогенное дыхание не стимулировалось сукцинатом и равнялось  $2,13 \pm 0,45$  мкмоль/мин·г. Выход клеток равнялся в среднем 38 %.

Использование на втором этапе выделения коллалитина в концентрации 0,06 % показало, что степень размягчения печени недостаточна для диспергирования скарификацией. При применении более жесткого метода диспергирования — продавливания через сетку — выход клеток достиг 50—60 % от массы печени. Однако при проверке жизнеспособности клеток установлено, что полученные клетки были значительно повреждены. Количество клеток, не окрашенных трипановым синим, составляло в среднем 32 %. При применении вибрации выход клеток несколько увеличивался, но при этом увеличивалась и степень повреждения гепатоцитов. В поле зрения встречались лишь отдельные неокрашенные клетки. При обоих последних методах диспергирования в исходной суспензии (до отмыывания центрифугированием) наблюдалась большая примесь ядер, которую не удавалось полностью удалить при последующем центрифугировании.

При перфузии печени на втором этапе выделения гепатоцитов 0,12 % раствором коллалитина печень к концу перфузии значительно размягчалась. Однако мягким измельчением при помощи скарификации не удавалось полностью диспергировать ткань печени. После фильтрации и центрифугирования суммарная влажная масса выделенных клеток составляла менее 10 % от массы органа. Однако  $93 \pm 6$  % клеток, полученных этим способом, не окрашивались трипановым синим. Скорость потребления кислорода гепатоцитами составляла  $2,01 \pm 0,32$  мкмоль/мин·г. Добавление сукцината не увеличивало потребления кислорода такими клетками. Содержание АТФ после 1 ч инкубации клеток при  $37^\circ\text{C}$  составляло  $2,12 \pm 0,32$  мкмоль/г. Таким образом, у полученных с помощью коллалитина клеток важнейшие метаболические показатели не были изменены, однако при таком способе выделения клеток выход гепатоцитов был значительно меньше, чем при использовании коллагеназы.

С целью увеличения выхода клеток мы предприняли попытку дополнительного инкубирования измельченных кусочков печени в 0,12 % растворе колла-

литина на магнитной мешалке после второго этапа перфузии. Через 20 мин инкубации в условиях пассирования 4 % карбогена над поверхностью среды выход клеток увеличился в 1,5—2 раза, но количество жизнеспособных клеток несколько уменьшилось и составило в среднем  $70 \pm 14$  % от общего числа клеток.

При использовании на втором этапе перфузии 0,2 % раствора коллалитина выход клеток увеличивался без дополнительного инкубирования. Суммарный влажный вес выделенных клеток составлял в среднем  $19 \pm 4$  %, количество жизнеспособных клеток — в среднем  $85 \pm 12$  %, скорость дыхания в среде с 15 мМ глюкозы —  $1,59 \pm 0,39$  мкмоль/мин·г. Концентрация АТФ через 1 ч инкубации клеток равнялась  $1,65 \pm 0,34$  мкмоль/г.

При дальнейшем увеличении концентрации коллалитина до 0,3 % печень к концу второго этапа значительно размягчалась. После измельчения пинцетом и центрифугирования выход клеток составлял 4—5 мл густого осадка. Однако, как показывает микроскопическое исследование, в полученной суспензии появлялась большая примесь ядер, а также снижалась жизнеспособность клеток, оцениваемая по витальному окрашиванию: она составляла  $65 \pm 32$  % от общего числа клеток. Скорость дыхания клеток, полученных таким образом, снижалась до  $1,07 \pm 0,29$  мкмоль/мин·г. Дыхание клеток в суспензии стимулировалось добавлением 10 мМ сукцината в среднем в 2,8 раза. Следовательно, увеличение концентрации коллалитина выше 0,2 % нецелесообразно. При некотором увеличении выхода клеток качество суспензии было значительно хуже, чем при использовании концентрации коллалитина 0,2 %. Существенно ухудшились также дыхательные показатели. Следует отметить и более быструю гибель клеток, полученных в случае использования высокой концентрации коллалитина, при продолжительной инкубации их на роторном шейкере.

Таким образом, использование коллалитина обеспечивает значительно более высокую степень сохранности изолированных гепатоцитов по сравнению с трипсином. Однако диспергирующие свойства коллалитина несколько ниже, чем коммерческого препарата коллагеназы. Тем не менее по-

лученные результаты позволяют рекомендовать использование коллалитина в концентрации 0,15—0,2 % для выделения гепатоцитов в клинических целях.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Корухов Н. Ю., Полоцкий М. А., Писаревский А. А. // Трансплантация и искусственные органы. — М., 1986. — С. 193.
2. Гепатоцит. Функционально-метаболические свойства / Под ред. Л. Г. Лукьяновой. — М., 1985.
3. Berry M. N., Friend D. S. // J. Cell. Biol. — 1969. — Vol. 43. — P. 506—520.
4. Lamprecht W., Trautschold J. // Methods of Enzymatic Analysis / Ed. H. U. Bergmeyer. — New York, 1974. — Vol. 4. — P. 2101—2110.
5. Seglen O. // Meth. cell. Biol. — 1976. — Vol. 13. — P. 29—83.

Поступила 09.09.88

#### ISOLATION OF INDIVIDUAL HEPATOCYTES SUSPENSION BY MEANS OF COLLAGENASE PREPARATION

V. Yu. Toschakov, M. A. Danilov, N. K. Shestakova, T. I. Kozlovskaya, E. Yu. Kulikova

Institute of Transplantology and Artificial Organs, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

Isolation of individual hepatocytes suspension from rats was carried out using trypsin, collagenase and collalytine; maximal yield of the viable hepatocytes was obtained when 0.05 % solution of collagenase was used. Trypsin was ineffective in production of viable cells, while collalytine from pig pancreas exhibited the satisfactory results at concentration of 0.15-0.20 %.

## ХРОНИКА

УДК 612.67+613.98+616-053.9]:061.3(47+57)•1988»

### V ВСЕСОЮЗНЫЙ СЪЕЗД ГЕРОНТОЛОГОВ И ГЕРИАТРОВ

В работе съезда, который проходил 22—25 ноября 1988 г. в Тбилиси, приняли участие ученые АН СССР и академий союзных республик, специалисты вузов, работники научно-исследовательских учреждений медицинского профиля, а также практические врачи. Всего в работе съезда участвовало 438 человек, в том числе 26 гостей из 8 социалистических стран: НРБ, ВНР, СРВ, ГДР, КНДР, ПНР, СРР и ЧССР.

В материалах съезда опубликовано 1516 работ, авторами которых являются 3507 специалистов из разных районов нашей страны. Учеными АН СССР и академий союзных республик было подготовлено 107 работ, посвященных в основном изучению фундаментальных механизмов старения.

Участники съезда пришли к выводу, что проблема выяснения механизмов старения и разработки средств значительного увеличения продолжительности активной жизни превратилась сейчас в реально выполнимый научный проект. Более того, по мнению участников съезда, этот проект можно было бы реализовать уже при жизни нынешнего поколения, если бы было принято выдвинутое ранее предложение известного американского геронтолога Юхаса Бьеркетена о взаимном сокращении военных расходов на 50% с тем, чтобы освободившиеся средства использовать в прямом противоположном направлении — на разработку средств увеличения продолжительности активной жизни.

Участники съезда приняли обращение в адрес широкой общественности всех стран мира, а также руководства СССР и США с призы-

вом поддержать мирную инициативу под девизом «Средства продления жизни человека вместо средств уничтожения» всеми возможными и доступными способами.

Из организационных решений съезда заслуживает внимания решение «обратиться в АН СССР и Совет Министров СССР с предложением о создании Института биологии старения АН СССР в Москве». Действительно, судя по материалам съезда, в Москве ведутся обширные геронтологические исследования, результаты которых представлены в виде 204 публикаций от множества организаций, включая учреждения АН СССР: Институт химической физики АН СССР (В. Б. Мамаев, Т. Л. Наджарян и др.), Институт биологии развития АН СССР (И. Б. Погожев, А. Л. Асаченков, Н. Д. Озернюк, В. И. Демин и др.), отдел вычислительной математики АН СССР и др.), а также лечебно-санитарное управление АН СССР (А. В. Караулов, В. Н. Захаров и др.), которое могло бы служить базой для клинических испытаний разработанных в АН СССР средств продления жизни. Таким образом, в Москве имеется достаточное количество высококвалифицированных кадров, которые могут составить ядро нового института.

С учетом принятых съездом решений представляется целесообразным провести под руководством АН СССР совместную советско-американскую научно-политическую конференцию «Средства от старения вместо средств уничтожения», на которой были бы обсуждены конкретные научные проекты борьбы со старением и продления жизни в виде позитив-

ных альтернатив гонке вооружений. Лучшие из этих проектов и составили бы программу нового Института биологии старения АН СССР.

Канд. биол. наук Л. А. Гаврилов

### ОБРАЩЕНИЕ

делегатов V Всесоюзного съезда геронтологов и гериатров

(Тбилиси, ноябрь 1988 г.)

Мы, делегаты съезда и его зарубежные гости, геронтологи, отмечаем, что материалы научных исследований, представленные на съезде, позволяют надеяться, что выяснение механизмов старения и разработка средств увеличения продолжительности активной жизни являются сейчас реально выполнимым проектом, в реализации которого заинтересовано все человечество. Актуальность этой проблемы очевидна, если учесть значительное постарение населения, наблюдающееся во всех развитых странах мира, и заинтересованность каждого человека в долгой и полноценной жизни.

Участники съезда считают своим долгом до-

вести до сведения широкой общественности всех стран мира, что разработка путей увеличения продолжительности активной жизни должна стать ведущим направлением современной науки. Для этого необходимо, чтобы уровень финансирования научных исследований в данной области стал, наконец, соответствовать масштабу поставленной задачи.

Участники съезда отмечают, что тех средств, которые в настоящее время идут на военные расходы и гонку вооружений во всем мире, вполне достаточно для достижения прямо противоположной цели — продления жизни человека, причем в этом случае достижениями геронтологии сможет воспользоваться уже нынешнее поколение.

Участники съезда считают целесообразным поддержать лозунг «Средства продления жизни человека вместо средств уничтожения», выдвинутый участниками международного симпозиума «Механизмы старения и долголетия» (Сухуми, 1986 г.), и обращаются к широкой общественности всех стран мира с призывом поддержать выдвинутую инициативу всеми возможными доступными способами. Это позволит не только спасти человечество от угрозы самоуничтожения, но и открыть перед ним захватывающую перспективу контроля над старением, увеличения продолжительности жизни.

## РЕЦЕНЗИЯ

УДК 616-006-092-07:616-008.934.155(049.32)

Н. К. Бердинских, С. П. Залеток.  
Полиамины и опухолевый рост. — Киев: Наукова думка, 1987. — 140 с.

Начало исследованиям полиаминов в онкологии было положено в 1971 г., когда американский биохимик Диана Рассел впервые сообщила, что онкологические опухоли выделяют с мочой полиаминов существенно больше, чем здоровые люди и опухоли с неонкологическими заболеваниями. Интерес к этому классу соединений со стороны ученых и врачей, работающих во многих областях биологии и медицины, в частности в онкологии, с годами не ослабевает. В результате интенсивных исследований было установлено, что любой вид нормального или патологически измененного процесса клеточной пролиферации сопровождается резким усилением синтеза и аккумулярованием полиаминов в клетке. Показана уникальная и многофункциональная роль этих соединений в процессах синтеза нуклеиновых кислот и белков, в регуляции интенсивности клеточной репарации и важнейших метаболических реакций.

В настоящее время это перспективное направление интенсивно разрабатывается учеными и научными центрами США, Италии, Финляндии, Канады, Франции, Японии и ряда других стран. К сожалению, в нашей стране Институт проблем онкологии им. Р. Е. Кавецкого АН УССР является единственным научным учреждением, где с 1972 г. в отделе биохимии под руководством Н. К. Бердин-

ских проводят работы по изучению возможности использования полиаминов как «маркеров рака». Такое положение, вероятно, сложилось из-за отсутствия в отечественной научной литературе необходимого уровня пропаганды и популяризации этого направления. Между тем в США результаты исследований полиаминов обобщают в виде периодически издаваемых специальных сборников, в Италии каждые 2 года проводят международные симпозиумы по полиаминовой тематике.

В отечественной научной литературе рецензируемая монография, обобщающая результаты исследований изменений обмена полиаминов в опухоли (и в организме животных, и человека), первая и пока единственная публикация. В этой связи следует особо подчеркнуть ее роль в пропаганде одного из важнейших направлений исследований в медицине, результаты которых имеют особое практическое значение для клинической онкологии. Ценность данной монографии заключается в том, что она, правда частично, компенсирует пробел наших знаний по безусловно актуальной проблеме медицины «полиамины и рак», освещая ее экспериментальные и клинические аспекты.

В рецензируемой книге достаточно полно рассмотрены основные показатели обмена полиаминов и факторы его регуляции в норме и при злокачественных новообразованиях. Приведены данные о взаимосвязи двух ключевых компонентов белоксинтезирующего аппарата — рибосом и полиаминов — при росте перерывных и индуцированных опухолей у животных.

Представлены результаты изучения экскреции полиаминов у практически здоровых людей, у больных с неопухольевыми заболеваниями желудка, пневмонией, с доброкачественными опухолями молочной железы и у больных раком желудка, легкого, молочной железы, яичников, гортани, других локализаций, а также у больных злокачественными лимфомами. Монография хорошо иллюстрирована — она содержит 28 рисунков и 46 таблиц.

Особого внимания заслуживает вывод о возможности и целесообразности использования полиаминового показателя в сочетании с уровнем нуклеозидов в качестве надежного маркера злокачественных новообразований с коэффициентом корреляции  $r=0,843$ .

В основе анализа проблемы в целом лежит удачное сочетание результатов собственных экспериментальных и клинических исследований авторов (около 1200 больных) и данных литературы. Поскольку в работе исследовали широкий спектр патологических состояний организма животных и человека, не связанных с опухолевым ростом, а также многочисленные и разнообразные по этиологии, локализации и биологическим свойствам опухоли, авторам удалось с высокой степенью достоверности установить специфические особенности и общие закономерности в обмене полиаминов, их роль

в регуляции биосинтетических процессов в клетке и связь с незлокачественным и злокачественным ростом. Сформулированные в монографии новые положения о возможности использования полиаминового теста в диагностике опухолевых заболеваний и для контроля эффективности лечения онкологических больных основаны на обширном цифровом материале, обработанном современными методами математической статистики с использованием приемов дисперсного и дискриминантного анализа. Это позволило выделить такие показатели обмена полиаминов, как отношение спермидин/спермин, активность орнитиндекарбоксилазы, содержание путресцина и спермидина в качестве характеристик пролиферативной активности опухоли и рекомендовать определение «полиаминового статуса» у больных при первичном обращении, во время лечения и в дальнейшем для прогноза заболевания.

Рецензируемая монография, безусловно, вызовет интерес у широкого круга специалистов, работающих в области клинической, экспериментальной и теоретической онкологии, биохимии, молекулярной фармакологии и биологии.

Акад. АМН СССР проф. Т. Т. Березов,  
С. П. Сяткин

## ЮБИЛЕЙНАЯ ДАТА

УДК 616-092:92 Варази

### В. ВАРАЗИ — ЖИЗНЬ. ОТДАННАЯ НАУКЕ (К 100-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ)



В 1988 г. исполнилось 100 лет со дня рождения известного грузинского патофизиолога и биохимика, доктора медицинских наук про-

фессора Василия Сафоновича Варази (Варазшвили), человека с оригинальным научным мышлением и большой эрудицией, отличавшегося большим трудолюбием и работоспособностью, воспитавшим не одно поколение грузинских врачей.

В. С. Варази родился 01.01. (по старому стилю) 1888 г. в Тбилиси. В 1911 г. он поступил на медицинский факультет Харьковского университета. Однако начавшаяся в 1914 г. первая мировая война прерывает его занятия в университете. Он призывается в действующую армию, где пробыл до 1917 г. Вернувшись к учебе в Харьковском университете, молодой врач Василий Варази начинает проявлять большой интерес к патологической физиологии. В то время кафедрой патофизиологии руководил приглашенный из Лейпцига профессор Роберт Кримберг. Совместная научная деятельность сблизила немецкого профессора и грузинского студента. В 1918 г., когда у Р. Кримберга кончалось 5-летнее соглашение, он перед возвращением в Германию предложил В. Варази, уже окончившему университет, вместе с семьей переехать на жительство в Германию и сотрудничать с ним в Лейпцигском университете. Однако молодой специалист возвратился на Родину — в Грузию и начал работать прозектором в Первой городской больнице Тбилиси, продолжая при этом интересоваться патофизиологией.

В 1918 г. осуществилась мечта передовой интеллигенции Грузии — в Тбилиси был открыт университет с медицинским факультетом. В 1920 г. была основана кафедра общей патологии, и уже в 1921 г. Научный совет факультета избрал В. Варази старшим ассистентом этой кафедры. В апреле 1925 г. В. Варази успешно защитил докторскую диссертацию, посвященную вопросам патологии белкового обмена в печени, а уже через год ему было присвоено звание приват-доцента и доверено вести частный курс по патофизиологии на тему «Патология обмена азотистых веществ». После сдачи экзаменов на звание доктора В. Варази была предоставлена возможность руководить научной работой аспирантов на медицинском факультете. В 1930 г. Научный совет Тбилисского университета присваивает ему ученое звание профессора. В том же году на базе медицинского факультета университета был создан Тбилисский медицинский институт, и в 1931 г. профессор В. Варази был назначен заведующим кафедрой медицинской химии (биохимии), которой он руководил до самой смерти (9 сентября 1969 г.). В эти годы В. Варази успешно совмещал научно-педагогическую работу в университете, а затем и в медицинском институте с работой в Институте тропических заболеваний, где он заведовал отделом биохимии, а впоследствии патофизиологическим отделом.

В 1944 г. за плодотворную научно-исследовательскую и педагогическую деятельность профессору В. Варази было присвоено почетное звание заслуженного деятеля науки. В. Варази — автор 85 научных работ, посвященных различным аспектам теоретической и клинической медицины; результаты этих работ способствовали раскрытию многих узловых вопросов медицины. Диапазон этих исследований весьма широк: это вопросы обмена углеводов и азотистых веществ, роль метаболитов в обмене веществ и роль микроэлементов в патологии цитовидной железы, вопросы возрастной биохимии. Под его руководством выполнено 35 кандидатских и 14 докторских диссертаций. Однако среди всех работ наиболее значительные исследования, проведенные им в конце 20-х — начале 30-х годов, выделяющиеся оригинальностью постановки вопроса и методов исследований, а также работы, посвященные изучению некоторых вопросов тропической медицины — особенно малярии. Все эти работы систематически публиковались в отечественной и зарубежной периодической печати, в частности в авторитетных для того времени немецких медицинских журналах.

В изучении малярии большой заслугой В. Варази является исследование биологической особенности малярийного паразита. Им был сконструирован специальный аппарат и предложен оригинальный метод получения культуры малярийного паразита, при помощи которой за 24 ч удалось получить полное развитие шизонтов, свободно плавающих или фагоцитированных мерозонтов, инфицирование новых эритроцитов. Проведенные на такой культуре экспериментальные исследования позволили В. Варази сделать вывод о том, что мерозонт при вторжении в эритроцит увлекает за собой эритроцитарную мембрану и таким образом изолируется от непосредственного контакта с гемоглобином и влияния «иммунобиологических сил» плазмы крови, а об-

разующийся при этом в паразите пигмент не является продуктом их взаимодействия. При этом он подчеркнул, что малярийный паразит является аэробом. Путем выделения малярийного пигмента адсорбционным методом из селезенки больного малярией В. Варази доказал, что данный пигмент по своим физико-химическим свойствам и составу является аутохтонным пигментом — меланином, а не гематином, как считалось ранее, и является результатом обмена белковых веществ самого паразита.

На основании клинического анализа В. Варази предложил эмпирическую формулу пигмента, которая является настолько очевидной, что известный швейцарский дерматолог, исследователь пигмента меланина В. переносит эту формулу в свое руководство без комментариев.

Кроме того, В. Варази изучал причины возникновения малярийной лихорадки. Исходя из данных Bohm (1919) о том, что большинство мерозонтов в крови погибает, он предполагает, что малярийная лихорадка обусловлена белком протоплазмы самого паразита, а не действием его пигмента, как отмечали ряд исследователей. В своей работе «О малярийной лихорадке» В. Варази в экспериментах по привитой малярии и оригинальными расчетами вычисляет количество протоплазматического белка, поступающего в кровь при гибели паразита, а затем доказывает, что вычисленное количество белка действительно как чужеродный белок вызывает лихорадку при повторном его введении в кровь животных. В. Варази изучал и патологические изменения костного мозга при малярии. Для изучения и оценки кемотерапевтических средств лечения малярии с целью исследования их «движения в живом организме» он изыскивает методы, позволяющие определить их количество в различных биологических жидкостях и тканях, предлагает новый, более чувствительный метод (сфелометрический и колориметрический) определения акридиновых препаратов. По сути дела В. Варази касается вопросов фармакокинетики и фармакодинамики лекарственных средств.

Проводимые В. Варази исследования не могли не вызвать интереса в научном медицинском мире, о чем можно судить по одному весьма любопытному факту. После смерти ученого в его личном архиве был найден документ на немецком и шведском языках, датированный 01.09.38 и подписанный членами Нобелевского комитета по физиологии и медицине во главе с Гуннаром Холмгреном. Он гласил: «Многоуважаемый профессор В. Варазишвили! По поручению Королевского Королинского института мы, нижеподписавшиеся члены Комитета, приглашаем Вас прислать Вашу работу, выдвигаемую на соискание Нобелевской премии в области физиологии и медицины 1939 года...».

По истечении 50 лет после получения этого письма, о существовании которого при жизни профессора В. Варази никто не знал, трудно что-либо предположить о мотивах, которыми руководствовался В. Варази, не послав никаких документов и работ в адрес Комитета. Отчасти это можно объяснить отмеченной его современниками большой природной скромностью, самокритичностью к себе и к своей работе и, может быть, тогдашним временем. Однако сам факт приглашения В. Варази на соискание Нобелевской премии свидетельству-

ет о большом научном и практическом значении проведенных им исследований, о большой его победе как ученого. И независимо от того, стал бы он лауреатом или нет, имя его всегда останется в памяти учеников как обра-

рец служения науке, как пример для воспитания молодого поколения будущих ученых-медиков.

С. И. Табагари (Тбилиси)

## НЕКРОЛОГ

УДК 577.112+612.155 (Белицер)

### ВЛАДИМИР АЛЕКСАНДРОВИЧ БЕЛИЦЕР (1906—1988)



4 марта 1988 г. скончался выдающийся ученый-биохимик, заслуженный деятель науки УССР, лауреат Государственной премии УССР, академик АН УССР Владимир Александрович Белицер.

В. А. Белицер внес большой вклад во многие области биохимии. Он является одним из выдающихся биохимиков нашей страны. С 1944 г. до конца своих дней В. А. Белицер работал в Институте биохимии им. А. В. Палладина АН УССР, возглавляя отдел структуры и функции белка, с 1964 г. был заместителем директора по научной работе, затем на протяжении ряда лет — директором этого института. В. А. Белицер — ученый с мировым именем. Он был редактором международного журнала по исследованию тромбозов «Thrombosis Research», членом редколлегии ряда отечественных журналов: «Успехи современной биологии», Украинский биохимический журнал, «Доклады академии наук Украинской ССР», членом редакционного совета журнала «Вопросы медицинской химии» со дня его основания.

В. А. Белицер родился в 1906 г. в Рязани. После окончания в 1930 г. биологического фа-

культета Московского университета работал ассистентом кафедры общей биологии II Московского медицинского института. Первую научную работу, посвященную вопросам коллоидной химии белков, он выполнил еще в студенческие годы.

С 1931 г. в Институте биохимии им. А. Н. Баха Владимир Александрович занялся изучением внутриклеточного дыхания и гликолиза. Продолжая эти исследования во Всесоюзном институте экспериментальной медицины, он сосредоточил внимание на важнейшей проблеме биохимии — энергетическом обмене в мышечной ткани. В этот период им сделано фундаментальное открытие в области окислительных процессов в клетке — установлено существование сопряжения между процессами переноса электронов в цепи окислительно-восстановительных реакций и синтезом богатых энергией веществ, дана количественная оценка связи между дыханием и фосфорилированием. Эти исследования были обобщены в докторской диссертации и оригинальной, богатой плодотворными идеями монографии «Химические превращения в мышце» (1940 г.).

Раскрытие механизма окислительно-восстановительных реакций клеточного дыхания — выдающийся вклад в биохимию. Приоритет В. А. Белицера в этой области признан мировой наукой, его работы по окислительному фосфорилированию считаются классическими.

Находясь в эвакуации (1941—1943 гг.), В. А. Белицер на базе крупного военного госпиталя разрабатывал вопросы консервирования крови и приготовления искусственных кровезаменителей. После возвращения в Москву в 1944 г. он был приглашен акад. А. В. Палладиным в Институт биохимии АН УССР, где возглавил лабораторию ферментов. В начальный период его усилия были направлены на изучение природы и кинетики ферментативных реакций. Им было развито представление о том, что каталитическая активность и специфичность фермента в основном определяются ферментным белком, его уникальной структурой. Впоследствии такое представление стало общепринятым. В конце 40-х и в 50-е годы главное внимание было уделено изучению структуры и специфических свойств белков, особенно их денатурационному превращению. Эти исследования способствовали развитию представления о конформационных переходах белковых молекул. Они легли в основу создания нового белкового кровезаменителя БК-8.

В 1945 г. В. А. Белицер избран членом-корреспондентом, в 1957 г. — академиком АН УССР.

В 60-е годы Владимир Александрович с присущим ему огромным увлечением углубился в исследование белков системы свертывания крови. Им и его учениками экспериментально опровергнута денатурационная теория свертывания фибриногена и разработана кинетическая теория, охватывающая фазы как ферментативного превращения фибриногена, так и спонтанной полимеризации мономерного фибрина. Показано, что этот процесс состоит из двух последовательных этапов, на каждом из которых возникают активные центры, осуществляющие сборку фибрина.

В исследованиях отдела «Структура и функция белка» под руководством и при непосредственном участии В. А. Белицера выяснены промежуточные этапы сборки упорядоченных белковых волокон фибрина, представляющей собой пример спонтанного формирования биологических структур. Эти работы имеют важное значение для медицины, поскольку фибринообразование лежит в основе свертывания крови.

Основываясь на экспериментальных данных и используя математический метод кинетического анализа, В. А. Белицер предложил количественную модель реакций, происходящих при полимеризации мономерного фибрина в присутствии специфических ингибиторов — фибриногена и его активных ферментов. В работах последних лет рассмотрены вопросы доменной структуры фибриногена. Показано, что СООН-концевые участки цепи  $\text{A}\alpha$  в фибрино-

гене и фибрине играют самостоятельную роль, их целесообразно считать  $\alpha\text{C}$ -доменами.

Много внимания Владимир Александрович уделял практической медицине. Под его руководством выполнены оригинальные работы по изучению протеолитических ферментов как лекарственных средств, а также сывороточных ингибиторов протеолиза, которые участвуют в регуляции свертывания крови, фибринолиза, кининообразования. При его непосредственном участии разработаны методы количественного определения фибриногена, растворимого фибрина, активных фрагментов фибрина/фибриногена, антитромбина III в плазме крови, которые нашли широкое применение в клинике.

Характерными чертами В. А. Белицера как ученого были творческое мышление, состояние ежедневного поиска, неутомимый интерес к исследованиям. Тщательный, всесторонний, критический анализ получаемых результатов присущ его научному стилю. Он был талантливым высококомпетентным ученым. Свыше 200 научных работ отражают широту его научных интересов. В. А. Белицером подготовлено 5 докторов и 25 кандидатов наук.

Научная деятельность В. А. Белицера отмечена высокими правительственными наградами — орденами Ленина, Октябрьской революции, Трудового Красного Знамени, Дружбы народов и многими медалями.

Владимир Александрович был скромным, доброжелательным, интеллигентным человеком. Его творческая жизнь является примером беззаветного служения науке. Он навсегда останется в памяти всех, кто имел счастье знать его и работать с ним.

## СОДЕРЖАНИЕ

- Чулкова Т. М. Роль процессов тромбообразования в атеросклерозе (Обзор)
- Свешников А. А., Офицерова Н. В., Ральникова С. В., Кузнецов А. П. Роль циклических нуклеотидов в репаративном костеобразовании
- Карагезян К. Г., Карапетян Э. Т., Сафарян М. Д. Динамика изменений перекисного окисления липидов и активности супероксиддисмутазы в эритроцитах у больных туберкулезом
- Мелконян М. М. Процессы перекисного окисления липидов и динамика сдвигов в уровне холестерина в плазме и мембранах эритроцитов в условиях воздействия низкочастотных акустических колебаний
- Нужный В. П., Тезиков Е. Б., Забирова И. Г., Угрюмов А. И. Повреждение миокарда и симпатико-адреналовая система при синдроме отмены этанола у крыс
- Шараев П. Н., Иванов В. Г., Кутявин Л. И. Изучение обмена гликозаминогликанов при воздействии на организм стрессогенными факторами
- Гаскина Т. К., Курилович С. А., Горчаков В. Н. Изменение скорости лисцитинхолестеролацилтрансферазной реакции и ли-

## CONTENTS

- 2 Chulkova, T. M. Role of thrombogenesis processes in atherosclerosis (Review).
- 9 Sveshnikov, A. A., Ofitserova, N. V., Ral'nikova, S. V., Kuznetsov, A. P. Role of cyclic nucleotides in reparative osteogenesis during treatment of crus fractures by G. A. Ilizarov method
- 11 Karagezyan, K. G., Karapetyan, E. T., Safaryan, M. D. Dynamics of lipid peroxidation and the superoxide dismutase activity in erythrocytes of patients with tuberculosis
- 12 Melkonyan, M. M. Alterations of lipid peroxidation and cholesterol content in rat blood plasma and erythrocyte membranes under conditions of low-frequency acoustic oscillations
- 16 Nuzhny, V. P., Tezikov, E. B., Zaborova, I. G., Ugryumov, A. I. Impairment of myocardium and functions of the sympathoadrenal system in rats with abstinent syndrome
- 20 Sharaev, P. N., Ivanov, V. G., Kut'yavin, L. I. Metabolism of glycosaminoglycans under stress conditions
- Gaskina, T. K., Kurilovich, S. A., Gorchakov, V. N. Alterations in the rate of LCAT-catalyzed reaction and in lipid spectrum



- пидных показателей сыворотки крови под влиянием катергена в условиях острого экспериментального повреждения печени
- 24 *Агаджанов М. И., Симонян М. А., Казарян Ш. А.* Влияние препарата супероксиддисмутазы и перекисное окисление липидов при термических ожогах
- Калинский М. И., Губский Ю. И., Рудницкая Н. Д., Курский М. Д.* АТФ-зависимый транспорт кальция в саркоплазматическом ретикулуме миокарда при адаптации к мышечной деятельности
- 28 *Хасина М. А., Зуев Ю. Ф.* Исследование связи резистентности легкого к развитию патологических процессов с его жирнокислотным составом
- 31 *Короткова М. Н., Санина И. В., Арион В. Я.* Анализ иммунорегуляторных пептидов тимуса методом высокоэффективной жидкостной хроматографии
- 35 *Кожевникова К. А., Петрова-Маслакова Л. Г., Парфенова Н. С., Белова Е. В., Трюфанов В. Ф., Носкин В. А., Ваврин Р. З.* Акцепция холестерина липопротеинами высокой плотности у лиц с дис- $\alpha$ -липопротеинемией и возможная роль в этом процессе апопротеина Е
- 38 *Меерсон Ф. З., Явич М. П., Рожицкая И. И., Твердохлиб В. П.* Подавление репликации и активация репаративного синтеза ДНК при стрессе и предупреждение этих явлений предварительной адаптацией
- 43 *Джафаров А. И., Магомедов Н. М., Бабаев Х. Ф., Ахмедова Г. Ш., Бехбудова З. А.* Перекисное окисление липидов и активность АТФаз в синапсомальных и митохондриальных фракциях мозга при гипоксии
- 47 *Стапуленис Р. Р., Иванов Л. Л., Лукошьявичюс Л. Ю., Даукантайте И. С., Кондратас Д. З., Прашкьявичюс А. К.* Изучение свойств лейцил-tРНК-синтетазы из миокарда свиньи в норме и при экспериментальной ишемии
- 48 *Мирошниченко В. П., Бусыгина О. Г., Северина И. С.* Аналогия и различие в свойствах растворимых форм гуанилатциклазы сердца и тромбоцитов крови крысы
- 51 *Алексеева А. Е., Гребенщикова О. Г., Потапкина Т. А., Прозоровский В. Н.* Антигенная активность N-концевого пептида лактатдегидрогеназы мышцы свиньи, полученного при бромциановом расщеплении
- 55 *Кухаренко В. И., Хохлова Ю. В.* Уровень цАМФ и цГМФ в клетках спонтанных абортусов с трисомным и триплоидным карнотипом
- 56 *Лютлова Л. В., Андреевко Г. В., Карабасова М. А., Рыбакина Е. Г., Козинец И. А., Ашмарин И. П.* Интерлейкин-1 и фибринолиз. Исследования в условиях *in vivo*
- 60 *Прокопенко Н. П., Тигранян Р. А., Муратова Г. Л., Плохой В. И., Хавинсон В. Х.* Характеристика кислотного экстракта эпифиза и его фракций
- 66 *Корф И. И., Цацкян Т. А., Мещерякова В. А., Левачев М. М., Арутюнова М. Б.* Изменение состава жирных кислот плазмы крови и эритроцитов при остеохондрозе
- 73 *Занин В. А., Лукина В. И., Березов Т. Т.* Выделение, некоторые физико-химические
- of blood serum after treatment with cathergene under conditions of acute experimental liver tissue impairment
- Agadzhanov, M. I., Simonyan, M. A., Kazaryan, Sh. A.* Effect of exogenous superoxide dismutase on content of the endogenous enzyme and lipid peroxidation in thermic burns
- Kalinsky, M. I., Gubsky, Yu. I., Rudnitskaya, N. D., Kursky, M. D.* ATP-dependent transport of  $Ca^{2+}$  in myocardial sarcoplasmic reticulum during adaptation to muscular activity
- Khasina, M. A., Zuev, Yu. F.* Fatty acid composition dependent resistance of lungs to some pathological states
- Korotkova, M. N., Sanina, I. V., Arion, V. Ya.* Analysis of thymus immunoregulating peptides by means of high performance liquid chromatography
- Kozhevnikova, K. A., Petrova-Maslakova, L. G., Parfenova, N. S., Belova, E. V., Tryufanov, V. F., Noskin, V. A., Vavrin, R. Z.* Acception of cholesterol by high density lipoproteins in patients with dis- $\alpha$ -lipoproteinemia and possible role of apoprotein E in the reaction
- Meerson, F. Z., Yavitch, M. P., Rojitskaya, I. I., Tverdochlib, V. P.* Stress-induced suppression of replication and activation of DNA reparative synthesis; prevention of these phenomena by preliminary adaptation
- Dzhafarov, A. I., Magomedov, N. M., Babaeov, Kh. F., Akhmedova, G. Sh., Bekhbudova, Z. A.* Lipid peroxidation and ATPase activity in synaptosomal and mitochondrial brain fractions in hypoxia
- Stapulenis, R. R., Ivanov, L. I., Lukoshyavichus, L. Yu., Daukantayte, I. S., Kondratas, D. Z., Prashkyavichus, A. K.* Properties of leucyl-tRNA-synthetase from pig myocardium under normal and ischemic conditions
- Miroshnichenko, V. M., Busygina, O. G., Severina, I. S.* Similarity and variations in properties of the guanylate cyclase soluble forms from rat heart and thrombocytes
- Alexeeva, A. E., Grebenshikova, O. G., Potapkina, T. A., Prozorovsky, V. N.* Antigen activity of N-terminal peptide from pig muscle lactate dehydrogenase obtained after BrCN hydrolysis
- Kukharevko, V. I., Khokhlova, Yu. V.* Level of cAMP and cGMP in cells of spontaneous abortuses with trisomic and triploid karyotype
- Ljutova, L. V., Andreenko, G. V., Karabasova, M. A., Rybakina, E. G., Kozinets, I. A., Ashmarin, I. P.* Interleukin-1 and fibrinolysis. *In vivo* studies
- Prokopenko, N. P., Tigranyan, R. A., Muratova, G. L., Plokhoy, V. I., Khavinson, V. Kh.* Properties of the acid extract fractions from epiphysis
- Korf, I. I., Tsagikyan, T. A., Mescheryakova, V. A., Levachev, M. M., Arutyunova, M. B.* Alteration of fatty acid composition in blood plasma and erythrocytes of patients with osteochondrosis
- 81 *Zanin, V. A., Lukina, V. I., Berezov, T. T.* Isolation, some physico-chemical and cata-

- и каталитические свойства L-метионин-γ-лиазы из *Pseudomonas taetrolens*  
**Жраковский М. Э., Аширметов А. Х., Мусабаяев Э. И., Алиева Л. Г.** Состояние монооксигеназной ферментной системы печени при сальмонеллезной инфекции у крыс
- 84  
*lytic properties of L-methionine γ-lyase from Pseudomonas taetrolens*  
*Krakovsky, M. E., Ashirmetov, A. Kh., Musabayev, E. I., Alieva, L. G.* The state of monoxygenase enzymatic system in rat liver tissue in salmonellosis infection
- Серебренникова Э. Г.** Роль жирных кислот фосфолипидов различных органов белых крыс в формировании резистентности к глубокому многократному переохлаждению
- 89  
*Serebrennikova, E. G.* Role of fatty acids containing in phospholipids of rat tissues during development of resistance to strong multiple supercooling
- 92  
**Рожинская И. В., Поверенный А. М., Ротт Г. М.** Особенности определения аутоантител к глобулину человека методом иммуноферментного анализа
- Курбанов Х. К., Ромах О. Н.** К механизму регуляции обмена тирозина при отравлении этанолом
- 97  
*Rozhinskaya, I. V., Poverenny, A. M., Rott, G. M.* Specific features of immunoenzyme assay for evaluation of autoantibodies against human myoglobin
- Промыслов М. Ш., Левченко Л. И., Демчук М. Л., Габриэлян Н. И.** Роль липидов фракции средних молекул в характеристике патологического процесса
- 102  
*Kurbanov, Kh. K., Romakh, O. N.* Regulation of tyrosine metabolism in chronic alcoholization
- 105  
*Promyslov, M. Sh., Levchenko, L. I., Demchuk, M. L., Gabrielyan, N. I.* Use of lipids containing in the middle molecular fraction for evaluation of the pathological state
- Николаев А. И., Мамутов Ж. И., Карбанович А. К., Комарин А. С.** Изменение активности микросомальных монооксигеназ печени у тимэктомированных крыс в зависимости от возраста и ее коррекция гуморальным фактором тимуса
- 107  
*Nikolaev, A. I., Mamutov, Zh. I., Karbanovich, A. K., Komarin, A. S.* Alteration in activity of liver microsomal monoxygenase system in thymectomized rats, related to age: correction of the activity by means of the thymus humoral factor
- Табукашвили Р. И., Ушаков И. Б.** Некоторые биохимические механизмы комбинированного действия экстремальных факторов
- 111  
*Tabukashvili, R. I., Ushakov, I. B.* Some biochemical mechanisms of simultaneous effects of extremal factors
- Попова Н. К., Войтенко Н. Н., Маслова Л. Н.** Влияние эмоционального стресса и кортикостерона на активность моноаминоксидаз мозга крыс
- 114  
*Popova, N. K., Voitenko, N. N., Maslova, L. N.* Effect of emotional stress and corticosterone on rat brain monoamine oxidase
- Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Гольдштейн Н. Б., Мозжухина Т. Г., Литошенко А. Я., Новикова С. Н.** Функциональная активность фракционированного хроматина печени крыс при однократном введении тетрахлолорметана
- 119  
*Gubsky, Yu. I., Levitsky, E. L., Goldshtein, N. B., Mozhukhina, T. G., Litoshenko, A. Ya., Novikova, S. N.* Functional activity of rat liver chromatin fractions after a single administration of tetrachloromethane
- Васильев А. В., Ли Хва Рен, Орехов А. Н., Тертов В. В., Ким Хан Джон, Тутельян В. А.** Лизосомальные протеиназы аорты человека и атерогенез
- 124  
*Vasil'ev, A. V., Li Khva Ren, Orekhov, A. N., Tertov, V. B., Kim Han Zon, Tutel'yan, V. A.* Lysosomal proteinases from human aorta intima and atherogenesis
- Жудряшов Б. А., Ульянов А. М., Тарасов Ю. А.** Усиление протаминна сульфатом диабетогенного действия аллоксана
- 128  
*Kudrjashov, B. A., Uu'janov, A. M., Tarasov, Yu. A.* The amplifying effect of protamine sulfate on diabetogenic properties of alloxan

#### Методы биохимических исследований

Хроника

Рецензия

Юбилейная дата

Некролог

#### Methods of Biochemical Investigations

Current Events

Book Reviews

Jubilee

Obituary

Редактор *К. И. Кочкарёва.*

Художественный редактор *Р. Р. Катеева.*

Технический редактор *Н. К. Евстигнеева.*

Корректор *А. И. Сорокина.*

Сдано в набор 22.05.89. Подписано в печать 24.06.89. Формат 70×108<sup>1/8</sup>. Печать высокая. Усл. печ. л. 12,78. Усл. кр.-огт. 13,30. Уч.-изд. л. 15,11. Тираж 1537. Заказ 1276. Цена 1 р. 30 к.

Ордена Трудового Красного Знамени  
 Издательство «Медицина» Москва 101000. Петроверигский пер. 6/8  
 Ордена Трудового Красного Знамени  
 Чеховский полиграфический комбинат  
 Государственного комитета СССР  
 по делам издательств, полиграфии и книжной торговли  
 142300, г. Чехов Московской области