

ТОМ 35

ВЫПУСК 6

НОЯБРЬ — ДЕКАБРЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

# ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



МОСКВА · МЕДИЦИНА · 1989



## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

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

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

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)  
ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)  
ЯСАГИТИС А. А. (Вильнюс)

12/89

С. С. Шишкин

## ПРОБЛЕМА ПОСТРОЕНИЯ КАТАЛОГА МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Институт медицинской генетики АМН СССР, Москва

В последние годы существенно расширились знания о свойствах мембранных белков эритроцитов человека (МБЭЧ). Особенно подробно изучены 23 главных МБЭЧ, среди которых имеются белки, определяющие важнейшие функции мембраны. Наряду с этим с помощью высокоразрешающего двухмерного электрофореза и ряда других методов в составе мембран обнаружено более 100 минорных белков. Прогресс в методах изучения белков и кодирующих их генов открывает возможность построения каталога МБЭЧ, что представляется важным этапом в исследованиях по молекулярной биологии мембран.

Мембрана эритроцита традиционно рассматривается как модель плазматических мембран эукариотических клеток, пригодная для изучения общих закономерностей строения и функционирования мембранных структур. Около 50 % сухой массы эритроцитарной мембраны составляют различные белки [3, 25]. Они выполняют множество важных функций, формируют мембранный скелет и определяют форму клетки, обеспечивают транспорт ионов и других веществ через мембрану, образуют рецепторы и антигенные детерминанты (в том числе детерминанты многих групп крови), взаимодействуют с компонентами цитозоля и плазмы, а также между собой и мембранными липидами. Соответственно изучение молекулярных основ многих функций плазматических мембран и, в частности, выяснение роли конкретных белков в обеспечении конкретных функций представляется актуальной проблемой современной молекулярной биологии. Известен ряд наследственно обусловленных повреждений мембранных белков, приводящих к возникно-

вению анемий [53, 57]. Дефект мембранных белков предполагается при различных миопатиях [49] и хорее Гентингтона [15]. Существует гипотеза о важном патогенетическом значении повреждения плазматических (в частности, эритроцитарных) мембран при первичной гипертонии [7]. Таким образом, изучение мембранных белков эритроцитов не только вызывает общетеоретический интерес, но и решает важные медицинские задачи.

Прогресс в разработке методов изучения белков, в том числе появление высокоразрешающего двухмерного электрофореза по О'Фарреллу и комплекса сопутствующих технологий, позволил подойти к систематическому анализу белкового состава некоторых биологических объектов [19, 62]. На рубеже 70-х и 80-х годов была разработана даже стратегия систематического анализа белков человека [11, 12]. Одним из элементов этой стратегии представляется составление каталогов белков, входящих в состав отдельных видов субклеточных структур и целых клеток.

Целью данного обзора явилось рассмотрение путей построения такого каталога на примере МБЭЧ с учетом результатов, полученных с помощью традиционных подходов.

### *Главные и некоторые другие белки эритроцитарной мембраны*

Фактическим началом систематического изучения МБЭЧ стала опубликованная в 1971 г. работа [28]. Результаты раннего этапа исследований обобщены в обзоре [70]. Используя для фракционирования суммарного экстракта МБЭЧ наиболее эффективную для того времени методику — одномер-



№ п/п	Классификация Стека и соавт.	Специальные названия	Число копий на клетку ( $\cdot 10^3$ )	Молекулярная масса, кД	Функция
1	1	Спектрин	2,2	240	Формирование мембранного скелета; участие в образовании формы клеток
2	2	»	2,2	220	То же
3	2,1	Анкирин	1,1	210	Соединения мембранного скелета с интегральной частью мембраны
4	2,2	»	1,1	183	
5	2,3	»	1,1	165	
6	3	—	12,0	95	Транспорт неорганических анионов
7	4.1a	—	2,3	80	Соединения мембранного скелета с собственной мембраной. Участие в образовании формы клеток
8	4.1b	—	2,3	78	
9	4,2	—	2,3	72	Неизвестна. Связывает цитоплазматический домен белка 3.
10	4.5/1	—	1,3	59	Компонент с мол. массой 55 кД осуществляет транспорт моносахаридов и нуклеотидов
11	4.5/2	—	1,4	—	
12	4.5/3	—	0,7	—	
13	4.5/4	—	1,0	—	
14	4.5/5	—	1,3	—	
15	4.5/6	—	1,3	52	
16	4.9	—	1	48	Возможно, формирует мембранный скелет, связывает актин
17	5	Актин	5,1	43	Формирует мембранный скелет
18	6	Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	4,1	35	Фермент гликолиза
19	7	Субъединицы немышечного тропомидина	—	30	Предполагается участие в мембранном скелете
20	8	Глутатион-S-трансферазы	—	23	Неясна
21	PAS-1	Гликофорин А	4,2	Полипептидная цепь 131 ам. к	Полиморфные варианты определяют принадлежность к группе М или N
22	PAS-3	Гликофорин В	0,7	Полипептидная цепь 71 ам. к	Полиморфные варианты определяют принадлежность к группе S или s
23	PAS-2	Гликофорин С	0,35	Полипептидная цепь 128 а. к.	Полиморфные варианты определяют принадлежность к группе Gerbich

ный электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН), авторы создали первую классификацию МБЭЧ. В ее основу были положены различия в молекулярных массах получаемых фракций. Она включила 10 главных белков, окрашивающихся традиционными красителями, и еще 3 белка (сиалопротеида), выявляющиеся только при окраске на полисахариды. В последующем данная классификация стала общепри-

нятой, хотя она дополнялась и уточнялась [42, 48].

К настоящему времени большинство главных МБЭЧ выделено в высокоочищенном состоянии. Для некоторых из них построены пептидные карты, доменные модели строения и даже полностью расшифрованы первичные структуры. Многие главные белки получили специальные названия, которые широко используются наряду с цифровыми обозначениями, принятыми в

классификации Фербенкса — Стека. Некоторые сведения о 23 главных МБЭЧ с учетом сделанных дополнений суммированы в таблице.

По ранним оценкам главные МБЭЧ составляют около 90 % всей массы белковой компоненты мембраны [28, 70]. Это обстоятельство, а также сопоставление результатов фракционирования МБЭЧ с помощью одномерного электрофореза и данных о свойствах отдельных препаративно полученных белков позволяют считать, что многие фракции на одномерных электрофореграммах образованы индивидуальными полипептидными цепями [46].

Наряду с главными МБЭЧ в составе мембран эритроцитов обнаружены другие белки, представленность которых значительно меньше. Например, для  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы она оценивается величиной в несколько сотен молекул на клетку [3]. В заметно больших количествах присутствует в эритроцитарных мембранах  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ -АТФаза [41, 77]. Ее содержание оценивают величиной в несколько десятых процента от общего количества белка. Этот фермент был получен в высокоочищенном виде. Он состоит из полипептидных цепей с мол. массой 138 кД и выполняет роль кальциевого насоса, активность которого регулируется кальмодулином. Появилось сообщение о другой Са-АТФазе с низкой аффинностью [45]. Она образована двумя видами полипептидных цепей с мол. массами 21 и 23 кД, рI — соответственно 4,9 и 3,9. Показано, что, кроме  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ -АТФазы, еще 4 неидентифицированных мембранных белка обладают способностью к  $\text{Ca}^{+2}$ -зависимому связыванию кальмодулина (мол. массы 205, 91, 72 и 42 кД), а 2 других — к  $\text{Ca}^{+2}$ -независимому связыванию кальмодулина (мол. массы 76 и 24 кД) [74]. Один из мембранных кальмодулинсвязывающих белков был получен в высокоочищенном состоянии [36]. Он оказался гетеродимером, состоящим из субъединиц с мол. массами 103 и 97 кД. Кальмодулинсвязывающая способность принадлежит меньшей субъединице. Общее количество этого белка на эритроцит достигает  $0,3 \cdot 10^5$  молекул. Выделен также белок, регулирующий циклазную активность [20]. Этот гетеродимер образован субъединицами с мол. массами 42 и 35 кД.

До последнего времени считалось, что в мембранах эритроцитов человека отсутствует миозин, а имеющийся актин находится во взаимодействии со спектрином. Однако в 1985 г. две группы авторов обнаружили и охарактеризовали миозин в препаратах МБЭЧ [33, 76]. Молекулярная масса тяжелых цепей этого миозина оценена в 200 кД, а для 2 легких цепей — 25—26 и 19,5 кД. По физико-химическим и иммунохимическим свойствам эритроцитарный миозин оказался близок к тромбоцитарному. Он также обладает  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ -АТФазной активностью [33]. Содержание миозина на эритроцит составляет  $0,06 \cdot 10^5$  молекул на клетку.

Значительное число публикаций посвящено изучению эритроцитарного рецептора инсулина. Этот рецептор удалось частично очистить. Считается, что он представляет собой гетеродимер с мол. массой около 300 кД, состоящий из субъединиц с мол. массами 135 кД ( $\alpha$ ) и 95 кД ( $\beta$ ), которые связаны между собой дисульфидными связями [73]. Место для связывания инсулина формирует  $\alpha$ -цепь, а  $\beta$ -цепь обладает протеинкиназной активностью.

Из мембран эритроцитов человека удалось солиubilизировать активный рецептор комплемента [72]. Указанный рецептор является мембранным гликопротеидом с мол. массой 175 кД.

На протяжении ряда лет идет поиск эритроцитарных белков, имеющих антигенные детерминанты, которые определяют различные группы крови [34, 64]. Как показано в таблице, в качестве носителей детерминант групп MN, Ss и Gerbich идентифицированы 3 главных сialogпротеида — гликофорины А, В, С [16]. Новые генетические варианты этих сialogпротеидов найдены у лиц с некоторыми редкими группами крови [17]. Обнаружено взаимодействие трансмембранного гликопротеида с мол. массой 30 кД с антителами против RhD [64]. Антигены группы KeII несут мембранный белок с мол. массой 93 кД [63]. Сравнение пептидных карт показало, что этот белок отличается от главного белка полосы 3. Антитела против антигенов группы LW выявили диффузную белковую зону в диапазоне мол. масс от 47 до 37 кД [56]. Считают, что LW-антигены содержат существенные для проявления этого свойства олигосаха-

ридные цепи, так как обработка эндогликозидазой F приводит к прекращению связывания антител.

В препаратах мембран эритроцитов обнаружены различные ферментные активности, среди которых выявлена активность протейкиназы C [3, 29, 42, 75]. Вопрос об их происхождении (истинные, интегральные компоненты мембраны или ассоциированные с мембраной цитозольные белки), как правило, нуждается в специальных исследованиях.

На основании данных, полученных с помощью традиционных подходов, можно заключить, что белковый компонент эритроцитарной мембраны представлен большим набором полипептидных цепей, значительно различающихся по физико-химическим свойствам и количественному содержанию в мембране. Это обстоятельство сильно затрудняло создание достаточно подробного каталога МБЭЧ при технологии анализа белков, ориентированной на последовательное выделение и изучение одного за другим белков из сложной многокомпонентной системы. Как отмечалось выше, разработка проблемы в целом стала возможной с появлением иного подхода, который обеспечивает параллельное изучение множества белков, составляющих мембрану.

#### *Двухмерный электрофорез по О'Фарреллу и его использование для построения каталогов белков*

Поскольку детальное описание технологии и различных модификаций двухмерного фракционирования белков по О'Фарреллу имеется в ряде обзоров и монографий [6, 8, 9, 18], представляется целесообразным отметить здесь только основные особенности этого метода, делающие его пригодным для систематического анализа многокомпонентных белковых смесей. Прежде всего данная технология предполагает переселение всех белков (а точнее, полипептидных цепей), имеющих в изучаемом объекте, в растворенное состояние. Эта цель обычно достигается созданием раствора с предельно высокой концентрацией мочевины, содержащего также неионный детергент. Иногда применяют комбинированное воздействие ионного и неионного детергентов, обработку ульт-

развуком и некоторыми гидролитическими ферментами. В то же время предпринимаются всевозможные меры для предотвращения модификационных изменений анализируемых полипептидных цепей в ходе их солиubilизации и последующего фракционирования [6, 9, 18].

Приготовленный таким образом препарат подвергают изоэлектрофокусированию в тонкой колонке полиакриламидного геля. Этот гель также содержит мочевины и неионный детергент. Во время изоэлектрофокусирования (фракционирования в первом направлении) полипептидные цепи разделяются в соответствии с различиями своих изоэлектрических точек ( $pI$ ). Затем колонку геля укладывают на торец заранее приготовленной гелевой пластины и используют в качестве стартовой зоны при фракционировании во втором направлении, которое представляет собой электрофорез в присутствии ДСН. Оно обеспечивает разделение полипептидных цепей по молекулярным массам. В конечном счете результирующая электрофореграмма представляет собой прямоугольную пластину со множеством пятен-фракций. На такой пластине положение каждого пятна можно описать в системе прямоугольных координат, где по одной оси будут отложены величины, производные от значений  $pI$ , а по второй — молекулярная масса. Таким образом, координаты каждой фракции являются важнейшими характеристиками в описании полипептидных цепей. Именно на этой основе появляется возможность проводить систематический анализ всех (или большинства) белков, составляющих изучаемый объект. Еще одна существенная черта технологии О'Фаррелла — необычайно высокая разрешающая способность фракционирования, которая обеспечивает возможность работы на уровне индивидуальных белковых продуктов генной экспрессии. Это в свою очередь является методологическим условием, позволяющим довести систематический анализ белков изучаемого объекта до составления белкового каталога [11, 12, 62].

Первым шагом к созданию белкового каталога на основе технологии О'Фаррелла считают построение двухмерной белковой карты — стандартизированной схемы распределения фракций на электрофореграммах, получа-



емых для выбранного объекта [13, 21]. Естественно, что построение такой карты возможно лишь при условии высокой воспроизводимости картин фракционирования и при накоплении определенного минимума электрофореграмм. В наших работах минимум определялся 30 электрофореграммами [1, 5], поскольку основные закономерности распределения белковых фракций в системе прямоугольных координат удается определить уже на этой стадии. Затем построенная карта может и должна уточняться по мере накопления результатов анализа [4]. К настоящему времени пока не создано универсальной системы обозначения фракций на двухмерных электрофореграммах. Используемые системы во многом зависят от количества детектируемых белковых фракций в ходе анализа. С нашей точки зрения, при работе с 200—300 фракциями (обычно получаемыми при окрашивании гелей кумасси R-250) достаточно удобной является система, предложенная для построения двухмерной карты белков мозга [21]. Она включает предварительное условное разделение всей электрофореграммы на прямоугольные фрагменты с обозначением каждого фрагмента латинскими буквами. Внутри фрагмента все пятна-фракции нумеруются арабскими цифрами, например: номер 1 получает фракция с наибольшей молекулярной массой, а последующие номера присваиваются фракциям в порядке убывания молекулярной массы; из фракций с одинаковыми молекулярными массами меньший порядковый номер получает фракция с меньшим значением  $pI$ . Эта система позволяет проводить сравнение разных электрофореграмм одного объекта по фрагментам, что существенно облегчает анализ при отсутствии специального сканирующего и компьютерного оборудования.

Вместе с тем уже разработан и описан ряд комплексов оборудования и необходимые программы для автоматического анализа распределения белковых фракций на двухмерных электрофореграммах [37, 50]. Наряду с весьма дорогими и сложными системами предлагаются сравнительно простые и дешевые, но с существенно меньшей эффективностью анализа. Отдельные задачи можно решать с помощью разработанного в нашей стране комплекса обработки видеoinформации СВИТ

[1, 10]. В целом компьютерный анализ качественно повышает точность построения карты и оказывается особенно важным при решении задач по ее детализации, среди которых первостепенное значение имеет идентификация известных белков с отдельными фракциями. Это существенно повышает информационную ценность карты и открывает следующий этап исследований, направленных на создание каталога. В настоящее время разработано несколько десятков способов идентификации, большинство из которых рассмотрены в обзоре [12]. Естественно, что идентификация начинается со сравнения молекулярных масс и  $pI$  известных белков с координатами фракций на карте. Определенное значение имеет соответствие сведений о количественной представленности изучаемого белка в анализируемом образце и интенсивности окраски пятна — кандидата в идентифицированные фракции. Все более широкое применение в идентификации получает метод иммуноблоттинга [12, 14, 51]. Совпадение 3 независимых характеристик (молекулярная масса,  $pI$  и антигенные свойства) обычно считается достаточным для идентификации фракции на электрофореграмме.

Имеется еще один важный аспект проблемы идентификации. По оценкам авторов работы [12, 14], к настоящему времени из 50 000 полипептидных цепей, закодированных в геноме человека, лишь около 3 % охарактеризовано в большей или меньшей степени. Следовательно, систематический анализ белков на основе технологии О'Фаррелла должен приводить к обнаружению большого количества белков, ранее не описанных. Изучение свойств этих белков рассматривается как следующий шаг в составлении каталога. Фактически началом его реализации становится определение молекулярной массы и  $pI$  (т. е. координат на карте) каждого выявленного белкового пятна. Дальнейшая детализация химических свойств может проводиться различными методами. В частности, уже разработаны методы обнаружения небелковых групп в составе выявленных фракций и изучения особенностей первичной структуры, вплоть до полной ее расшифровки [12, 30]. Иногда удается выявить функциональные свойства белка, локализованного на двухмерной электрофореграмме путем постановки



ферментных тестов [68] или определения его способности связывать какой-либо лиганд [40]. Однако установление функции каждого белка, обнаруживаемого при систематическом анализе, — одна из наиболее сложных проблем в реализации стратегии построения белкового каталога.

Таким образом, создание белкового каталога рассматривается как естественное продолжение исследований по построению карты с подключением все новых методов и подходов для получения разносторонней информации о каждом обнаруженном виде полипептидных цепей. Соответственно качество формируемого каталога во многом будет определяться адекватностью построенной двухмерной карты. Объем сбора информации по каждому виду полипептидных цепей, включенных в каталог, может быть в принципе весьма различным. Например, как считают авторы работы [12], в него следует включать максимум данных, в том числе и характеристики генов соответствующих полипептидных цепей, и список основных публикаций. Такой вариант каталога превращает его по существу в энциклопедию белков человека. Созданные к настоящему времени и опубликованные каталоги клеток HeLa [19], фибробластов [30], клеток пигментного эпителия [43] содержат существенно меньшую информацию о каждом виде полипептидных цепей. Возможно, в перспективе эти каталоги будут расширены и детализированы.

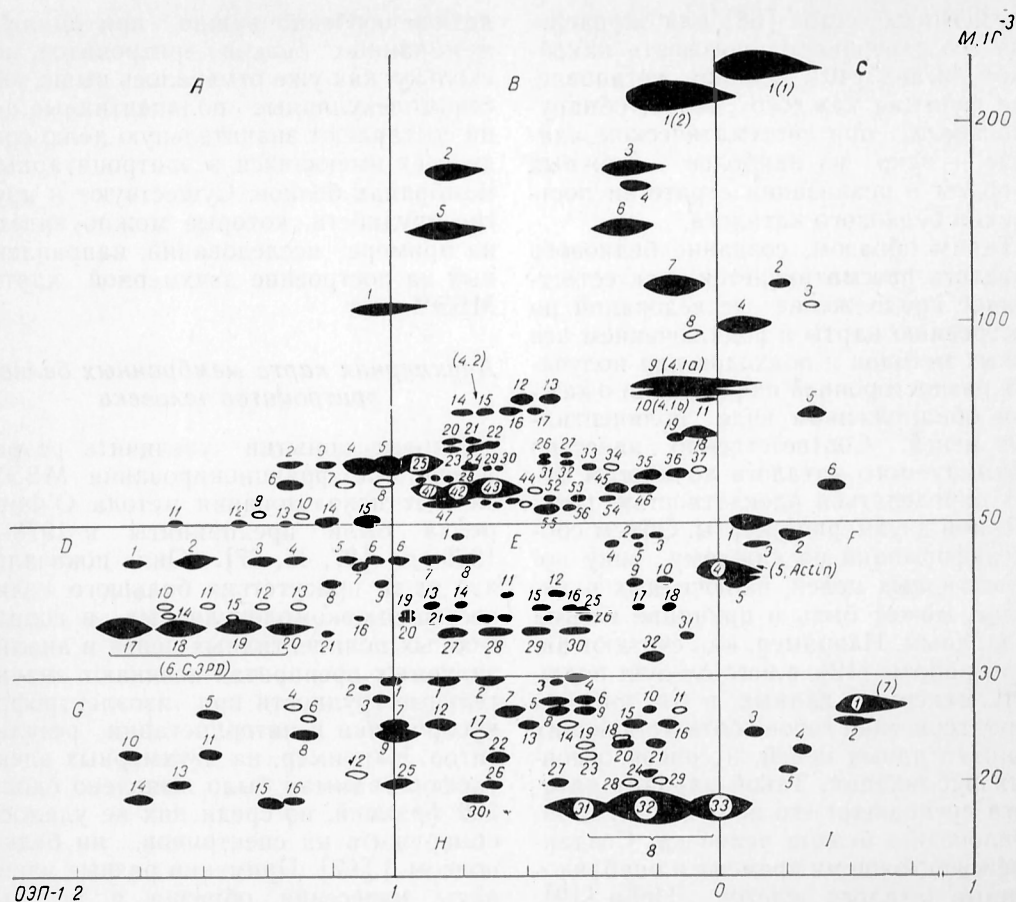
Метод О'Фаррелла имеет ряд ограничений, которые затрудняют его использование как универсального и приводят практически к исключению белков с определенными физико-химическими свойствами из систематического анализа, основывающегося только на этом методе. Указанные ограничения связаны в первую очередь со стадией изоэлектрофокусирования. Однако некоторые авторы считают, что введение иммобилинов позволит существенно расширить возможности анализа [8, 38]. При применении традиционных амфолинов и их аналогов требуются специальные приемы, чтобы добиться хорошего разделения полипептидных цепей с щелочными pI [6, 18]. Плохо поддаются изоэлектрофокусированию в геле, используемом в оригинальной системе О'Фаррелла, полипептидные цепи с мол. массой выше 150 кД [6, 18]. Пос-

леднее особенно важно при анализе мембранных белков эритроцитов, поскольку, как уже отмечалось выше, высокомолекулярные полипептидные цепи составляют значительную долю среди всех имеющихся в эритроцитарных мембранах белков. Существуют и другие трудности, которые можно видеть на примере исследований, направленных на построение двухмерной карты МБЭЧ.

### *Двухмерная карта мембранных белков эритроцитов человека*

Первые попытки увеличить разрешение при фракционировании МБЭЧ за счет использования метода О'Фаррелла были предприняты в 1978—1979 гг. [27, 45, 67]. Они показали, что из-за присутствия большого количества высокомолекулярных и гидрофобных полипептидных цепей в анализируемых препаратах возникают значительные трудности при изоэлектрофокусировании и интерпретации результатов. Например, на двухмерных электрофореграммах было выявлено около 200 фракций, но среди них не удалось обнаружить ни спектринов, ни белка полосы 3 [67]. Применяв разные варианты нанесения образца и используя особые некоммерческие амфолины, удалось получить электрофореграммы, содержащие пятна  $\beta$ -спектрина, анкирина и белка полосы 3 [45]. Общее количество наблюдаемых пятен превышало 100. Сходные данные были опубликованы в работе [27]. Опираясь в основном на положение пятен на электрофореграммах и их количественную представленность, авторы выделили пятна актина, белка 6 и некоторые другие. С помощью высокочувствительной детекции методом серебрения на двухмерных электрофореграммах МБЭЧ наблюдали до 600 пятен-фракций [65]. Спектрины и другие высокомолекулярные полипептидные цепи не выявлялись. Практически во всех отмеченных выше работах не определялись возможные загрязнения препаратов МБЭЧ цитозольными или другими белками и не оценивалась вероятность протеолитической деградации МБЭЧ в ходе выделения и фракционирования.

Более детальный анализ результатов фракционирования был проведен в работе [22]. Эти исследователи исполь-



Двухмерная карта МБЭЧ, построенная на основе результатов фракционирования белков модифицированным методом О'Фаррелла [1].

По оси абсцисс — значения относительной электрофоретической подвижности в первом направлении фракционирования (ОЭП-1); по оси ординат — значения Мг. Латинские буквы — фрагменты электрофореграмм, выделенные по методу Камингса, арабские цифры — нумерация пятен внутри фрагментов, обозначения в скобках — названия отдельных фракций по номенклатуре Стека и соавт. и другие частные названия [1].

зовали 3 различные модификации разделения, которые касались стадии изоэлектрического фокусирования и солиubilизации мембранных белков. Одна из них заключалась в использовании (наряду с тритоном X-100) ДСН для приготовления образцов и применении равновесного изоэлектрофокусирования при фракционировании в первом направлении. Данная модификация обеспечивала присутствие на электрофореграммах белка полосы 3, но некоторые другие белки не выявлялись. Была отмечена определенная вариабельность результатов фракционирования. Более воспроизводимые результаты обеспечивали две другие модификации. В этих случаях не применяли ДСН. МБЭЧ солибуилизовали в высококонцентрированных растворах мочевины, содержащих тритон X-100. Модифика-

ция, использующая на первой стадии равновесное изоэлектрофокусирование, давала меньшее количество фракций на результирующей электрофореграмме по сравнению с модификацией, использующей неравновесный электрофорез в градиенте pH. Последняя, отмеченная авторами как наиболее удачная методика, позволяла разделить МБЭЧ на 250 фракций. Правда, этот вариант приводил к отсутствию белка полосы 3 и неполной представленности белка 4,2. В целом, по мнению авторов, они представили адекватные данные о МБЭЧ. Вместе с тем в работе не была построена усредненная схематическая картина распределения мембранных белков на электрофореграммах — двухмерная карта. В работе [52] было получено сходное распределение фракций с мол. массой менее 45 кД. Оpub-

ликованы сообщения о поисках модификаций двухмерного электрофоретического анализа МБЭЧ [26, 66].

С 1985 г. в Институте медицинской генетики АМН СССР начаты исследования МБЭЧ с применением двухмерного электрофореза. Проводилась работа по совершенствованию метода выделения эритроцитов и получения препаратов мембран с тем, чтобы снизить до минимума присутствие в препаратах экзогенных протенназ и как следствие — протсолитическую деградацию белков. Разрабатывались оптимальные режимы изoeлектрофокусирования и модифицировались способы приготовления образцов. За основу была принята работа [22], в которой использовали неравновесный электрофорез в градиенте pH. Включение в методику очистки эритроцитов стадии осаждения в 3% растворе декстрана Т-500 и хроматографии через колонку с микрокристаллической целлюлозой позволило получать препараты мембран, не проявляющие признаков деградации даже более чем через 1 сут хранения при комнатной температуре [2]. Изучение влияния различных детергентов, применяемых для солюбилизации МБЭЧ, показало, что замена традиционно используемого тритона X-100 на другой неионный детергент с более длинной гидрофобной частью молекулы — тритон X-305 — наиболее существенна для наших целей. Это завершило создание новой модификации двухмерного анализа МБЭЧ [1]. Последующий анализ около 50 препаратов МБЭЧ, полученных от соответствующего числа людей, показал высокую разрешающую способность, воспроизводимость и присутствие главных мембранных белков. Результаты фракционирования оказались весьма схожими с данными работы [22]. Основываясь на этом, по 30 типичным электрофореграммам была построена двухмерная карта — усредненное схематическое распределение фракций на пластинах геля.

Для анализа результатов фракционирования применяли модифицированный метод [21]. Каждую электрофореграмму условно разбивали на 9 прямоугольных участков [1], которые обозначали латинскими буквами. Для каждого пятна определяли координаты, одной из которых служили величины молекулярных масс, а другой — величины относительной электрофоретической

подвижности в первом направлении (ОЭП-1). Сравнение электрофореграмм по одноименным прямоугольным участкам и пятнам, имеющимся на них (с учетом ОЭП-1 и молекулярной массы), позволило выявить постоянно встречающиеся пятна. Такими считали пятна, обнаруживающиеся более чем на  $\frac{3}{4}$  проанализированных электрофореграмм. Общее их число составило 189, и они были включены в карту (см. рисунок).

Исходя из данных литературы о молекулярной массе, рI и количественной представленности МБЭЧ, а также из сравнения с результатами двухмерного анализа, полученными другими авторами, мы определили предположительно локализацию ряда известных белков на карте [1]. С помощью коэлектрофореза белок G7 был идентифицирован как карбоангидраза. Сравнение электрофореграмм цитозольных белков эритроцитов с построенной картой МБЭЧ позволило выделить несколько белков, имеющих двойную локализацию [1]. По-видимому, данная карта МБЭЧ может стать основой для последующих исследований, направленных на построение каталога белков человека.

#### *Вариант организации каталога МБЭЧ*

В публикации [12] сформулированы общие принципы организации каталога белков человека и предложен широкий перечень характеристик, по которым должен быть описан включенный в него белок. Однако последовательность рубрик достаточно произвольна, следствием чего могут быть определенные затруднения и в планировании исследований, направленных на создание каталога, и в использовании последнего на разных стадиях составления. В настоящее время имеющаяся информация о МБЭЧ не позволяет заполнить все рубрики перечня, представленного в работе [12], ни для одного из белков. Полное завершение каталога для какого-либо вида клеток или субклеточных структур в данном варианте потребует значительного времени. Вместе с тем даже незавершенный каталог может быть использован и в изучении генетики человека.

Исходя из указанных соображений и учитывая современный уровень знаний о МБЭЧ, описание каждого вида



полипептидных цепей в каталоге, вероятно, следует строить по не многим крупным рубрикам, внутри которых постепенно будет расширяться число различных характеристик (подразделов). В качестве таких рубрик можно предложить следующие: А) паспортная часть; Б) особенности структуры данного вида полипептидных цепей; В) характеристики гена (генов); Г) место и функции в клетках; Д) прикладные аспекты; Е) основные публикации. Далее каждая рубрика каталога представляется в виде набора специфических взаимосвязанных подразделов, которые во многом будут соответствовать перечню, опубликованному в работе [12]. По мере накопления информации и параллельно с заполнением имеющихся подразделов система рубрик позволит образовывать при необходимости новые подразделы так, чтобы сохранялось внутреннее единство каталога.

Изменения, приводящие к патологии, вероятно, удобнее не выделять в отдельную рубрику или подраздел, а лишь специально отмечать в соответствующих подразделах рубрик Б, В, Г. Построенное по такому принципу описание каждого вида полипептидных цепей станет как бы структурной единицей, на основании чего будет формироваться банк данных — каталог белков, составляющих изучаемый объект.

В качестве примера формирования структурной единицы в предлагаемом каталоге приводится анализ имеющихся данных по белку, обозначенному на карте как С-1 и предположительно идентифицированному как  $\alpha$ -спектрин.

#### *А. Паспортная часть*

1. Номер по карте — С-1.
2. Мол. масса — 240 кД.
3. ОЭП — 0,11.
4. рI — 5,5.
5. Другие наименования — белок полосы I,  $\alpha$ -спектрин.

#### *Б. Особенности структуры полипептидных цепей*

1. Аминокислотный состав — таблица [46].
2. Аминокислотная последовательность. Из всей полипептидной цепи, предположительно состоящей из 2100 аминокислотных остатков, расшифро-

ваны фрагменты, включающие 1080 остатков, в том числе 595-членный N-концевой фрагмент. Компьютерный анализ показал, что расшифрованные последовательности состоят из гомологических повторов длиной в 106 аминокислотных остатков. Исключение представляют первые с N-конца 17 аминокислотных остатков. Повторы рассматриваются как основы для формирования уникальной вторичной структуры, которая в свою очередь обеспечивает образование доменов [69].

3. Доменная организация — выделено 5 доменов, представляющих собой протяженные участки с  $\alpha$ -спиральной структурой, резистентные к протеолизу трипсином ( $\alpha$ 1T80 и т. д.). Они соединены неспирализованными участками, по которым идет разрушение трипсином [59].

4. Небелковые группы (не обнаружены).

5. Полиморфные варианты — обнаружены нормальные варианты (у негров), выражающиеся в изменениях доменной организации, затрагивающие домены II и III [54]; обнаружены варианты домена I, связанные с наследственным эллиптоцитозом [57] и пиропойкилоцитозом [55].

#### *В. Характеристики гена (генов)*

1. Хромосомное картирование — локализован в Iq 22—Iq 25 [47].
2. Количество копий на гаплоидный геном — предположительно один ген [23].
3. Секвенированная кДНК — секвенирован фрагмент у COOH-конца [23].
4. Секвенированный ген — секвенирован фрагмент гена [55], имеются данные об экзон-интронной структуре.
5. Полиморфизм генов и фланкирующих последовательностей.

#### *Г. Место и функции в клетках*

1. Виды клеток, в которых обнаружен белок или его мРНК — эритроциты, клетки эритроидного ряда и другие клетки крови [24, 58, 60], миобласты и другие мышечные клетки [58], нейроны и другие клетки нервной ткани [39], эпителий [39].
2. Внутриклеточная локализация: периферический белок плазматической мембраны.



3. Количество копий на клетку (для эритроцитов) —  $2,2 \cdot 10^5$ .

4. Взаимодействие с другими макромолекулами: образует У-образный гетеродимер, взаимодействуя с белком В1 (β-спектрин, белок полосы 2). Эти гетеродимеры вместе с белком F4 (актин, белок полосы 5) формируют молекулярную сетку, выполняющую роль мембранного скелета.

5. Функция: структурный компонент мембранного скелета, обеспечивает поддержание характерной формы клеток.

Патологические варианты теряют способность поддерживать правильные межмолекулярные взаимодействия, результатом чего становится появление клеток аномальной формы (эллиптоцитоз и др.). Такие клетки подвергаются ускоренной деструкции, что ведет к развитию анемии.

#### Д. Прикладные аспекты

1. На уровне анализа физико-химических свойств полипептидных цепей предложены методы диагностики наследственного эллиптоцитоза на основе выявления аномалий первичной структуры пептидным картированием и другими способами [35, 57].

2. На уровне определения функциональных свойств.

3. На уровне анализа гена (генов) и фланкирующих последовательностей.

#### Е. Основные публикации

1.

2.

3.

и т. д.

Исходя из сложности структурных единиц, необходимых для формирования каталога МБЭЧ, и предварительной оценки их числа (около 200), можно думать, что для размещения итогового каталога потребуется достаточно мощная ЭВМ. Практическое формирование подобного банка данных, очевидно, нуждается в целенаправленных исследованиях биохимиков, молекулярных генетиков, молекулярных биологов, а также и в работе медиков, и специалистов по программированию. Вместе с тем есть основания полагать, что уже на первых этапах составления каталога собранная информация позволит выявить незаполненные подраз-

делы, а следовательно, ориентирует исследователей на решение соответствующих актуальных вопросов.

#### Заключение

Проблема построения каталога МБЭЧ в целом представляется весьма сложной, требующей координированных усилий исследователей разных специальностей. Ее решение сулит значительный прогресс в понимании особенностей строения и функционирования плазматических мембран клеток человека. При этом будет охарактеризована большая группа белковых продуктов генной экспрессии человека (и соответствующих генов), в которую их объединяет общая роль, связанная с формированием мембранных структур. Каталог МБЭЧ не только будет иметь чисто научное значение, он может стать важным инструментом в изучении различных форм патологии, проявляющихся повреждениями плазматических мембран, что в свою очередь будет способствовать расшифровке молекулярных основ патогенеза этих заболеваний и разработке новых методов диагностики. Созданная в последние годы методическая база и конкретные результаты изучения МБЭЧ позволяют надеяться, что работы, направленные на построение каталога МБЭЧ, будут расширяться и выведут на качественно новый уровень наши знания о МБЭЧ.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Громов П. С., Захаров С. Ф., Шишкин С. С., Ильинский Р. В. // Биохимия. — 1988. — Т. 53, № 8. — С. 1316—1326.
2. Захаров С. Ф., Громов П. С., Шишкин С. С. // Вопр. мед. химии. — 1988. — № 3. — С. 139—142.
3. Зенгбуш П. Молекулярная и клеточная биология: Пер. с нем. М., 1982. — Т. 2. — С. 26—30.
4. Ковалев Л. И., Шишкин С. С. // Биохимия. — 1987. — Т. 52, № 3. — С. 423—429.
5. Ковалев Л. И., Шишкин С. С., Иволгина Г. Л. и др. // Там же. — 1986. — № 6. — С. 896—908.
6. Остерман Л. А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами. — М., 1983. — С. 45—60.
7. Постнов Ю. В. // Кардиология. — 1987. — № 11. — С. 98—102.
8. Ригетти П. Изoeлектрическое фокусирование: Теория, методы и применение: Пер. с англ. — 1986. — С. 258—267; 363—368.
9. Шишкин С. С. // Вопр. мед. химии. — 1983. — № 1. — С. 10—17.
10. Шишкин С. С., Ильинский Р. В., Кова-

- лев Л. Н. и др. // Там же. — 1988. — № 2. — С. 131—135.
11. Anderson N. G., Anderson N. L. // Behring. Inst. Mitt. — 1979. — Bd 63. — S. 169—210.
12. Anderson N. G., Anderson N. L. // Clin. Chem. — 1982. — Vol. 28. — P. 739—748.
13. Anderson N. L., Anderson N. G. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1977. — Vol. 74. — P. 5421—5425.
14. Anderson N. L., Anderson N. G. // Clin. Chem. — 1984. — Vol. 30. — P. 1898—1905.
15. Beverstock G. C. // Hum. Genet. — 1984. — Vol. 66. — P. 115—131.
16. Blanchard D., Dahr W., Hummel M. et al. // J. biol. Chem. — 1987. — Vol. 262. — P. 5880—5811.
17. Blumenfeld O. O., Smith A. J., Moulds J. J. // Ibid. — P. 11864—11870.
18. Bravo R. // Two-Dimensional Gel Electrophoresis of Proteins: Methods and Applications / Eds J. E. Celis, R. Bravo. — New York, 1984. — P. 4—37.
19. Bravo R., Celis J. E. // Ibid. — P. 445—476.
20. Codina J., Hildebaumer L., Sekura R. D. et al. // J. biol. Chem. — 1984. — Vol. 259. — P. 5871—5886.
21. Comings D. F. // Clin. Chem. — 1982. — Vol. 28. — P. 782—789.
22. Copeland B. R., Todd S. A., Furlong C. E. // Amer. J. hum. Genet. — 1982. — Vol. 34. — P. 15—31.
23. Curtis P. J., Palumbo A. P., Ming J. et al. // Gene. — 1985. — Vol. 36. — P. 357—362.
24. Davies G. E., Cohen C. M. // Blood. — 1985. — Vol. 65. — P. 52—59.
25. Dodge J. T., Mitchell G., Hanahan D. J. // Arch. Biochem. — 1963. — Vol. 100. — P. 119—130.
26. Dockham P. A., Steinfeld R. C., Stryker C. J. et al. // Analyt. Biochem. — 1986. — Vol. 153. — P. 102—115.
27. Edwards J. J., Hahn H. J., Anderson N. G. // Electrophoresis 79. — Berlin, 1980. — P. 383—393.
28. Fairbanks G., Steck T. L., Wallach D. F. H. // Biochemistry (Wash.). — 1971. — Vol. 10. — P. 2606—2617.
29. Faquin W. C., Chahwala S. B., Cantley L. C., Branton D. // Biochim. biophys. Acta. — 1986. — Vol. 887. — P. 142—149.
30. Fey S. J., Bravo R., Larsen P. M., Celis J. E. // Two-Dimensional Gel Electrophoresis of Proteins: Methods and Applications / Eds J. E. Celis, R. Bravo. — New York, 1984. — P. 169—189.
31. Fowler V. M., Bennett V. // J. Cell. Biochem. — 1985. — Vol. 9-B, Suppl. — P. 32.
32. Fowler V. M., Bennett V. // J. biol. Chem. — 1984. — Vol. 259. — P. 5978—5988.
33. Fowler V. M., Davis J. Q., Bennett V. // J. Cell. Biol. — 1985. — Vol. 100. — P. 47—55.
34. Futhmayr H. // J. Supramol. Struct. — 1978. — Vol. 9. — P. 79—95.
35. Garbarz M., Lecomte M. C., Dheremy D. et al. // Blood. — 1986. — Vol. 67. — P. 1661—1667.
36. Garder K., Vann B. // J. biol. Chem. — 1986. — Vol. 261. — P. 1339—1348.
37. Garrels J. I., Farrar J. T., Burwell C. B. // Two-Dimensional Gel Electrophoresis of Proteins: Methods and Application / Eds J. E. Celis, R. Bravo. — New York, 1984. — P. 37—91.
38. Gianazza E., Osio L., Grazioli G. // Clin. Chem. — 1987. — Vol. 33. — P. 2011—2019.
39. Glenney J. R., Glenney P., Weber K. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1982. — Vol. 79. — P. 4002—4005.
40. Glenney J. R., Tack B., Powell M. A. // J. Cell. Biol. — 1987. — Vol. 104. — P. 503—511.
41. Graf E., Verma A. K., Gorski J. P. et al. // Biochemistry (Wash.). — 1982. — Vol. 21. — P. 4511—4516.
42. Haest C. W. M. // Biochim. biophys. Acta. — 1982. — Vol. 694. — P. 331—352.
43. Haley J. E., Gouras P. // Clin. Chem. — 1984. — Vol. 30. — P. 1906—1913.
44. Harell D., Morrison M. // Arch. Biochem. — 1979. — Vol. 193. — P. 158—168.
45. Hjerten S., Pan H. // Biochim. biophys. Acta. — 1983. — Vol. 728. — P. 281—288.
46. Hsu C. J., Lemay A., Eshdat Y., Marchesi V. T. // J. Supramol. Struct. — 1979. — Vol. 10. — P. 227—239.
47. Huebner K., Palumbo A. P., Isobe M. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1985. — Vol. 82. — P. 3790—3793.
48. Johes M. N., Nicholson J. K. // Biochim. biophys. Acta. — 1981. — Vol. 650. — P. 1—20.
49. Jones G. E., Witkowski A. // J. Neurol. Sci. — 1983. — Vol. 58. — P. 159—174.
50. Kuick R., Boerwinkle E., Hanash S. M., Sing C. F. // Comput. Biomed. Res. — 1986. — Vol. 19. — P. 90—102.
51. Kvedar J. C., Kubilus J., Baden H. P. // Biochim. biophys. Acta. — 1986. — Vol. 884. — P. 462—473.
52. Lande W. M., Thiemann P., Mentzer W. C. // J. clin. Invest. — 1982. — Vol. 70. — P. 1273—1280.
53. Lawler J., Palek J., Lin S. C. et al. // Blood. — 1983. — Vol. 62. — P. 1182—1189.
54. Lecomte M. C., Gautero M. C., Picat C., Boivin P. // J. Genet. hum. — 1986. — Vol. 34. — P. 189.
55. Linnebach A., Speicher D. W., Marchesi V. T., Forget B. G. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1986. — Vol. 83. — P. 2397—2401.
56. Mallinson G., Martin P. G., Anstee D. J. et al. // Biochem. J. — 1986. — Vol. 234. — P. 649—652.
57. Marchesi S. L., Knowles W. J., Morrow J. S. et al. // Blood. — 1986. — Vol. 67. — P. 141—151.
58. Moon R. T., Ngai J., Wold B. J., Lazarides E. // J. Cell. Biol. — 1985. — Vol. 100. — P. 152—160.
59. Morrow J. S., Speicher D. W., Knowles W. J. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1980. — Vol. 77. — P. 6592—6596.
60. Nelson W. J., Colaco C., Lazarides E. // Ibid. — 1983. — Vol. 80. — P. 1626—1630.
61. Niggli V., Penniston J. T., Carafoli E. // J. biol. Chem. — 1979. — Vol. 254. — P. 9955—9958.
62. O'Farrell P. H. // Ibid. — 1975. — Vol. 250 — P. 4007—4021.
63. Redman C. M., Avellino G., Pfeiffer S. R. et al. // Ibid. — 1986. — Vol. 261. — P. 9521—9525.
64. Ridgwell K., Tanner M. J. A., Anstee D. J. // FEBS Lett. — 1984. — Vol. 174. — P. 7—10.
65. Rosenblum B. B., Hanash S., Yew N.,

- Nell J. V. // Clin. Chem. — 1982. — Vol. 28. — P. 925—931.
66. Rouyer-Fessard Ph., Lecomte M. C., Boivin P., Beuzard Y. // Electrophoresis. — 1987. — Vol. 8. — P. 476—481.
67. Rubin R. W., Milikowski C. M. // Biochim. biophys. Acta. — 1978. — Vol. 509. — P. 100—110.
68. Schele G., Bartell D., Biegar W. // Gastroenterology. — 1981. — Vol. 80. — P. 461—473.
69. Speicher D. W., Marchesi V. T. // Nature. — 1984. — Vol. 311. — P. 117—180.
70. Steck T. L. // J. Cell. Biol. — 1974. — Vol. 62. — P. 1—19.
71. Steck T. L. // J. Supramol. Struct. — 1978. — Vol. 8. — P. 311—324.
72. Sugita Y., Nakano Y., Tomita M. // // J. Biochem. (Tokyo). — 1986. — Vol. 100. — P. 1193—1200.
73. Ward G. M., Harrison L. C. // Diabetes. — 1986. — Vol. 35. — P. 101—105.
74. Welzker R., Klinger R., Frunder H. et al. // Biochem. int. — 1986. — Vol. 12. — P. 751—758.
75. White P. H., Plishker G. A. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1983. — Vol. 114. — P. 488—492.
76. Wong A., Kiehart D. P., Pollard T. D. // // J. biol. Chem. — 1985. — Vol. 260. — P. 46—49.
77. Zurini M., Krebs J., Penniston J. T., Carafoli E. // Ibid. — 1984. — Vol. 259. — P. 618—627.

Поступила 27.01.89

## PROBLEMS IN COMPILING OF THE CATALOGUE FOR HUMAN ERYTHROCYTE MEMBRANE PROTEINS

S. S. Shishkin

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

Properties of human erythrocyte membrane proteins are widely studied recently. Comprehensive data were obtained on two main membrane proteins responsible for essential membrane functions. Besides, high performance two-dimensional electrophoresis and a number of other procedures enabled to detect more than 100 minor proteins in the biomembranes. The latest advances in studies of proteins and their coding genes allowed to compile a catalogue for erythrocyte membrane proteins, which is of importance for investigations in the field of membrane molecular biology. Structural organization of the catalogue for human erythrocyte membrane proteins is discussed.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1989

УДК 612.128.577.152.34].088.1+616.153.1:577.152.34]-074

В. Л. Доценко, Г. А. Яровая, Т. С. Пасхина

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАЛЛИКРЕИНА И ПРЕКАЛЛИКРЕИНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА (ОБЗОР)

Центральный институт усовершенствования врачей Минздрава СССР, Москва

Калликреин (КФ 3.4.21.8) плазмы крови занимает особое место среди протеолитических ферментов, отличающихся широким спектром биорегулирующих функций. Он является основной кининогеназой плазмы крови и выполняет роль ключевого фермента в регуляции активности гемокоагулирующего каскада, фибринолиза, компонента и ангиотензин-рениновой системы [17, 32, 43]. Кроме того, в последние годы установлено, что калликреин плазмы крови катализирует образование атриапептида [62], энкефалина [35], участвует в модификации липопротенов низкой плотности [48], регулирует освобождение эластазы из гранулоцитов [44], активирует латентную коллагеназу нейтрофилов [61].

Калликреин в плазме крови находится в основном в виде неактивного предшественника — прекалликреина. Активация последнего осуществляет-

ся активными формами фактора Хагемана или под действием некоторых клеточных протеиназ [6, 46]. Образовавшийся калликреин быстро инактивируется, взаимодействуя с содержащимися в плазме крови ингибиторами: С1 — инактиватором,  $\alpha_2$ -макроглобулином и антитромбином III [51, 52]. Поэтому в плазме крови здорового человека активность калликреина чрезвычайно низка. Однако она может значительно возрастать под влиянием множества факторов, в том числе тех, которые вызывают контактную активацию фактора Хагемана и прекалликреина: поврежденная ткань, кристаллы уратов, комплекс антиген — антигено, анионы биополимеров, некоторые структурные компоненты микроорганизмов и др. [46]. Кроме того, протеиназы клеток крови и других тканей, поступающие в кровь при некротических процессах, фагоцитозе, иммуноло-



гических и бактериальных атаках, могут явиться причиной активации прекалликреина [6, 46].

Несмотря на сложность изучения активности калликреин-кининовой системы и трудности толкования получаемых при оценке ее состояния результатов, в настоящее время можно считать, что повышение скорости активации прекалликреина вносит определенный вклад в патогенез травм, шока, воспаления, сердечно-сосудистых нарушений и ряда других патологических состояний. В связи с этим оценка активности калликреина и содержания прекалликреина является важной для характеристики патологического процесса и выработки тактики лечения. Интерес к определению уровня активирования системы прекалликреин — калликреин (ПК—К) плазмы крови особенно велик в клинике и эксперименте при появлении признаков нарушения гемодинамики и увеличения проницаемости капилляров, связанных с наличием в организме очагов острого или хронического воспаления, развитием шока [26, 37, 38, 41, 42].

Высокая активность калликреина при значительном снижении содержания прекалликреина обычно расценивается как показатель активирования системы, что при определенном комплексе клинических симптомов дает основание для использования соответствующих лекарственных средств, в частности ингибиторов протеиназ типа трасилола, с целью коррекции активности фермента, снижения активации прекалликреина и нормализации гемодинамических нарушений [25, 32, 47].

Активность калликреина, как и других сериновых протеиназ, определяют либо по специфическому протеолитическому действию, в данном случае кининогеназному, либо по скорости гидролиза синтетических эфиров N-замещенных аминокислот, в данном случае N-ацил-L-аргининэстеразной активности.

В последние годы для оценки активности калликреина разработаны методы с использованием специфических хромогенных пептидных субстратов [29, 30]. Появились единичные работы по иммунохимическим методам суммарного определения прекалликреина и калликреина [31, 55].

Однако до сих пор не существует ни стандартных методов определения калликреина, ни стандартных единиц для выражения его активности. Это объясняется рядом причин и, прежде всего, относительным сходством физико-химических и энзиматических свойств калликреина и других сериновых протеиназ трипсинового типа, что ограничивает использование синтетических субстратов для определения активности калликреина непосредственно в плазме крови, содержащей протеиназы с близкой к калликреину субстратной специфичностью (ферменты свертывания крови, фибринолиза, некоторые тканевые протеиназы). Кроме того, быстрое связывание калликреина ингибиторами не позволяет корректно оценивать содержание прекалликреина по активности калликреина после активирования предшественника непосредственно в плазме крови, содержащей ингибиторы калликреина. И наконец, степень трудоемкости анализа, доступность и стоимость реактивов могут быть причиной выбора удобных для клинических лабораторий, но неадекватных методов определения калликреина.

Настоящая работа посвящена анализу существующих в настоящее время методов оценки активности системы ПК—К по основным критериям: специфичности, надежности и трудоемкости, а также обоснованности выводов о состоянии системы и рекомендаций для ее медикаментозной коррекции. Особое внимание уделено критике методов, в основу которых положены неправильные теоретические предпосылки и при разработке которых допущены грубые методические ошибки.

Хронологически первыми были описаны в литературе биологические методы определения активности калликреина, основанные на его свойстве освобождать из кининогена кинины, которые могут быть количественно измерены по гипотензивному действию, способности вызывать сокращение изолированных гладкомышечных препаратов или увеличивать проницаемость капилляров экспериментальных животных [28, 34, 54, 58].

Эти методы достаточно широко используются и в настоящее время, поскольку они, как любые биологические методы, высокоспецифичны, однако трудоемки и плохо воспроизводимы.



Значительная вариабельность результатов, получаемых при измерении уровня калликреина, определяется различной чувствительностью животных, отсутствием стандартов калликреина и субстрата. При подобном определении источником субстрата обычно служит прогретая при 60—61 °C в течение 1—2 ч плазма крови, в которой инаktivированы прекалликреин, калликреин, фактор Хагемана, кининазы и ингибиторы калликреина. Однако присутствие в прогретой плазме крови других протеиназ (например, плазмина) не может быть полностью исключено [59]. Использование очищенных препаратов кининогена ограничено из-за сложности его получения. Кроме того, следует учитывать, что биологическими методами измеряется активность калликреина не прямо, а через активность кининов. И наконец, длительное и трудоемкое тестирование на гладкомышечных препаратах освобождающегося брадикинина по нескольким точкам линейного участка кривой кининогеназной реакции, как того требуют правила ферментативной кинетики, сдерживают широкое применение метода.

Методом, получившим широкое распространение в клинике, стал метод Colman и соавт. [40] для определения калликреина, прекалликреина и ингибиторов калликреина в одной порции плазмы крови. Активность калликреина оценивали по скорости гидролиза тозил-L-аргининметилового эфира (ТАМЭ). По мнению авторов, спонтанная ТАМЭ-эстеразная активность плазмы крови соответствует активности свободного калликреина, ТАМЭ-эстеразная активность, измеренная через 1 мин после контакта плазмы с каолином, — уровню прекалликреина. Снижение ТАМЭ-эстеразной активности в последующие 5 мин соответствует уровню ингибиторов калликреина в плазме крови.

Быстрый и легкий в исполнении, что являлось его несомненным достоинством, метод Colman и соавт., однако, содержал существенные недостатки, обусловленные применением субстрата, гидролизующего другими протеиназами плазмы крови, а также тем, что активирование прекалликреина каолином проводилось в присутствии ингибиторов этого фермента. Последнее обстоятельство приводило к заниже-

нию показателя уровня предшественника, а следовательно, и к неверному расчету ингибиторного потенциала, оцениваемого по разности активностей калликреина сразу после активирования и через 5 мин после добавления активатора.

Имеются данные, свидетельствующие о присутствии других, отличных от калликреина, аргининэстераз в активированной контактом плазме крови [49, 60]. Отмечено несовпадение по времени пиков кининогеназной и аргининэстеразной активности при контактной активации каолином [53, 56].

В плазме крови, кроме калликреина, к известным ферментам, проявляющим аргининэстеразную активность, относятся тромбин, плазмин, C1a компонент комплемента и фактора свертывания IXa, Xa, XIa и XIIa [36, 45].

Таким образом, определенный вклад в эстеразную активность плазмы крови после контактного активирования могут вносить, помимо калликреина, целый ряд других протеиназ, а также их комплексы с  $\alpha_2$ -макроглобулином. Все это позволяет рассматривать эстеразную активность плазмы крови после активирования каолином как сумму аргининэстераз, активируемых контактом и их комплексов с  $\alpha_2$ -макроглобулином [50].

Модификации О. А. Гомазкова и соавт. [4] и К. Н. Веремеенко и соавт. [1] не устранили указанных недостатков метода, поскольку ограничились лишь применением других субстратов, столь же неспецифичных, как и ТАМЭ.

Попытки повысить специфичность метода путем проведения контактной активации в отсутствие ингибитора активного фактора XII [55] или замедлить процесс ингибирования калликреина путем проведения активации каолином при 0 °C не привели к желаемым результатам [57]. Достаточно эффективного устранения действия ингибиторов удалось добиться в плазме крови, обработанной ацетоном, снижающим антикалликреиновый потенциал [27].

Исследователи, использующие метод Colman и соавт., правильно отмечая тенденции изменения активности калликреина, не могли претендовать на знание точных величин активности фермента и его предшественника. Необходимо отметить, что использование данного метода иногда могло приво-

доть и к прямым ошибкам в трактовке полученных результатов. Так, оценка количества прекалликреина по высоте пика эстеразной активности после действия каолина может показать более высокий его уровень в том случае, если такое измерение проводилось на фоне сниженного антикалликреинового потенциала [11].

Увеличение специфичности определения калликреина по аргининэстеразной активности было получено введением в метод процедуры отделения прекалликреина и калликреина от других протеиназ плазмы крови с близкой субстратной специфичностью. Такие методы были предложены группой исследователей, возглавляемой Т. С. Пасхиной [13, 15, 16]. Методы включают предварительную очистку фермента и получение фракции белков, содержащей калликреин и его предшественник, но свободной от всех других протеиназ с близкой субстратной специфичностью и ингибиторов калликреина. Предварительное фильтрование 1 мл сыворотки крови при нейтральном рН через анионообменник (ДЭАЭ-сефадекс А-50) позволило в одной и той же неадсорбированной фракции белков оценить как активность калликреина, так и количество его предшественника, выраженное в единицах БАЭЭ-эстеразной активности фракции, но после ее обработки трипсином и подавлении активности последнего овомукоидом. Простота и точность определения фермента и его предшественника в полученной неадсорбированной на ДЭАЭ-сефадексе фракции белков сыворотки крови осложнялись в этом методе требующей времени хроматографической процедурой, что уменьшало популярность метода в условиях клиники. Однако использование этого метода в его небольшой модификации [16], значительно упрощающей и ускоряющей хроматографический этап, позволило с высокой степенью точности оценить уровень активности системы ПК—К у человека в норме (13,8 мЕ/мл калликреина и 334 мЕ/мл прекалликреина) и при многих патологических состояниях [12, 14, 18, 24]. Оценка активности системы у экспериментальных животных потребовала дополнительных исследований, в связи с видовыми различиями в физико-химических свойствах фермента и его предшественника [5].

В последние 10 лет в отечественных клинических лабораториях получил распространение биологический метод определения ряда компонентов калликреин-кининовой системы, в том числе калликреина, предложенный М. С. Суровикиной [20, 21]. Метод основан на измерении скорости специфической для калликреина кининогеназной реакции. Однако при разработке данного метода автором был допущен ряд грубейших ошибок, связанных с пренебрежением основными правилами ферментативной кинетики, бездоказательными утверждениями, неправильными теоретическими предпосылками и вытекающими из них ошибочными выводами, что полностью обесценивает результаты, получаемые авторами, использующими данный метод [2, 3, 8].

М. Д. Суровикина предлагает взять за основу оценки активности калликреина эндогенную кининогеназную реакцию, т. е. реакцию отщепления брадикинина калликреином исследуемого образца плазмы крови от кининогена, присутствующего в том же образце.

Определение трех форм калликреина (свободной, суммарной и прекалликреина) по данному методу начинается с подготовки образца плазмы крови, которая состоит в длительном (в течение 3 ч) прогревании при 56 °С и низком рН или прогревании более короткий промежуток времени (15—30 мин) при 61 °С. При такой обработке, как утверждает автор, происходит инаktivирование ингибиторов калликреина и ферментов, разрушающих брадикинин, но полностью сохраняются кининоген, прекалликреин и калликреин [20]. Однако какие-либо доказательства этим утверждениям в публикациях автора полностью отсутствуют. Между тем на практике многих лабораторий мира в качестве субстрата (кининогена) часто используется прогретая в течение 2—3 ч при 56—60 °С плазма крови человека или лабораторных животных для изучения кининогеназной реакции калликреина [15, 39, 54]. При этом приводятся доказательства, что обработанная таким образом плазма крови не содержит или почти не содержит активных кининогеназ и их активаторов и именно поэтому может использоваться в качестве субстрата. Таким образом, уже на первых этапах «метода эндогенного кининогенеза» возника-

ют сомнения в правильности оценки автором наличия и состояния компонентов калликреин-кининовой системы в прогретой плазме крови.

Далее, определяя активность калликреина до и после обработки плазмы крови каолином, автор оценивает уровень кининогена по количеству брадикинина, освобождаемому из эндогенного кининогена как свободным калликреином, так и калликреином, образовавшимся из предшественника при контактной активации. При этом «сниженный» кининогенез, по терминологии М. С. Суровикиной, обусловлен низкой активностью калликреина и низким уровнем прекалликреина, а «повышенный» кининогенез, связан с высокой активностью фермента [10, 20, 21].

Между тем «сниженный» характер кининогеназной реакции в условиях эндогенного кининогенеза может быть обусловлен совершенно другими причинами. Если допустить, что при тепловой инактивации плазмы крови часть калликреина и прекалликреина все-таки сохраняется, то, проводя кининогеназную реакцию на эндогенном субстрате, нельзя быть уверенным в том, что реакция идет при насыщении фермента субстратом. В таких условиях «сниженный» кининогенез может быть результатом не низкой активности фермента, а сниженной концентрации кининогена. Более того, «сниженный» кининогенез может оказаться результатом именно высокой активности калликреина, быстро истощающего субстрат еще в организме. Это положение подтверждает и сам автор опытами с добавлением в реакционную смесь препарата высокомолекулярного кининогена (200 мкг на 1 мл пробы) [21]. При этом количество освобождаемого брадикинина резко возрастает: на 70, 110, 135 и 260 % в тех образцах плазмы, где до этого уровень кининогенеза был снижен соответственно на 10, 25, 44 и 66 %. Эти данные полностью дискредитируют метод, так как свидетельствуют о том, что измерение скорости кининогеназной реакции ведется в отсутствие насыщения субстратом фермента, т. е. в условиях, не отвечающих основному правилу корректной ферментативной кинетики. Реакция освобождения брадикинина следует кинетике не нулевого, а первого порядка, а следовательно, для оценки активности

фермента требуется расчет концентрации субстрата. Измерение активности фермента в условиях, предлагаемых М. С. Суровикиной, недопустимо и ошибочно. Таким образом, терминология («сниженный» или «ослабленный», «повышенный» или «усиленный» кининогенез) в данном случае бессмысленна, поскольку автор использует неадекватный метод и неверно трактует его результаты. Глубоко ошибочные выводы, к которым приходит автор, дезориентируют не только исследователей, но и практических врачей, поскольку автор метода рекомендует «терапевтическую коррекцию всех фаз нарушения кининогенеза», а именно: назначение ингибиторов калликреина при «усиленном» кининогенезе и препаратов тканевого калликреина при «ослабленном» [10, 19, 22, 23]. Такие рекомендации, могущие принести прямой вред больному, являются непосредственным следствием необъективного метода исследования и неграмотной трактовки результатов его применения.

Кроме того, в публикациях М. С. Суровикиной часто встречаются ошибочные утверждения о неидентичности активных центров калликреина, катализирующих образование брадикинина из кининогена и аргининэстеразную реакцию [19]. Такое представление полностью противоречит известным данным мировой литературы о структуре активного центра и механизме действия калликреина и других сериновых протеиназ.

В последнее время исследования активности системы ПК—К непосредственно в плазме крови обогатились серией новых методов, использующих в качестве субстрата трипептидный хромогенный паранитроанилид (N-Pro-Phe-Arg-pNA или Bz-Pro-Phe-Arg-pNA), имитирующий в последовательности аминокислот структуру участка кининогена, непосредственно примыкающего к расщепляемой калликреином связи [29, 30, 57]. В этом случае специфичность определения активности калликреина и его предшественника после соответствующего активирующего воздействия, несомненно, выше, чем при использовании любого другого синтетического субстрата, хотя и здесь отсутствует абсолютная субстратная специфичность [7]. Во избежание ингибирования калликреина в процессе



активирования его из предшественника предлагается проводить активирование прекалликреина в присутствии инактиваторов ингибиторных систем плазмы крови [7, 9, 27]. Возможный дефицит компонентов контактной фазы активации (кининогена, фактора Хагемана), не позволяющий проводить прямое активирование прекалликреина такими активаторами, как каолин, эллаговая кислота или сульфат декстрана, некоторые авторы советуют восполнять с помощью добавления в инкубационную среду экзогенной активной формы фактора Хагемана [7, 27]. Последнее обстоятельство несколько осложняет метод, однако делает его результаты более точными и строгими в интерпретации.

Имеются работы, рекомендуемые для повышения специфичности метода с применением хромогенного субстрата и удаления ингибитора калликреина использовать предварительную стадию ионообменной хроматографии плазмы крови [33], как это было предложено ранее при определении активности калликреина по аргининэстеразному действию [13, 15].

Есть основание утверждать, что методы с использованием пептидных субстратов будут широко применяться не только в научно-исследовательских, но и в клинических лабораториях, так как являются в настоящее время наименее трудоемкими при достаточно высокой специфичности и воспроизводимости. Основным фактором, сдерживающим применение этих методов, можно считать высокую стоимость субстратов и отсутствие отечественных аналогов.

Итак, большой интерес к системе ПК—К со стороны исследователей и клиницистов, обусловленный ее чрезвычайно важной ролью в регуляции гемокоагуляции и проницаемости сосудов, привел к появлению большого количества методов исследования. Однако в основе предлагаемых методов не всегда находятся четко сформулированные экспериментально подтвержденные предпосылки, согласующиеся с теоретическими основами биохимии, в частности ферментативной кинетики. Отсутствие критического анализа при выборе метода исследования привело к появлению огромного числа работ с несопоставимыми, а часто и с неверными результатами, на основании кото-

рых авторы приходят к ошибочным выводам и опасным рекомендациям.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Веремеенко К. Н., Волохонская Л. И., Кизим А. И., Мегедь Н. Ф. // Лаб. дело. — 1975. — № 1. — С. 9—12.
2. Гаврилова Р. Л., Юдина Т. М. // Клини. мед. — 1974. — № 12. — С. 75—79.
3. Гончарова В. А. // Там же. — 1982. — № 11. — С. 49—52.
4. Гомазков О. А., Комиссарова Л. В., Болшакова Л. В. и др. // Кардиология. — 1972. — № 6. — С. 25—30.
5. Доценко В. Л., Саяпин В. И., Нешкова Е. А., Яровая Г. А. // Бюл. экспер. биол. — 1982. — № 8. — С. 117—120.
6. Доценко В. Л., Серова Н. Б., Лозунов А. И. и др. // Вопр. мед. химии. — 1987. — № 4. — С. 104—109.
7. Доценко В. Л., Яровая Г. А., Нешкова Е. А. // Там же. — 1989. — № 2. — С. 128—133.
8. Кац Г. Л., Тарнопольская Л. В., Мальцева Н. В. // Тер. арх. — 1983. — № 13. — С. 81—84.
9. Кузнецов В. А. // Лаб. дело. — 1985. — № 7. — С. 400—402.
10. Лапина И. М., Суrowикина М. С., Мальцева Л. М. и др. // Сов. мед. — 1984. — № 11. — С. 16—21.
11. Малютина И. В. // Пробл. туб. — 1985. — № 7. — С. 13—18.
12. Ненашева Н. М., Доценко В. Л., Горячкина Л. А., Яровая Г. А. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 5. — С. 106—111.
13. Пасхина Т. С., Яровая Г. А. // Биохимия. — 1970. — Т. 35. — С. 1055—1058.
14. Пасхина Т. С., Шрайбер М. И., Яровая Г. А. и др. // Вопр. мед. химии. — 1972. — № 2. — С. 137—145.
15. Пасхина Т. С., Доценко В. Л., Блинникова Е. И. // Биохимия. — 1973. — Т. 38. — С. 420—423.
16. Пасхина Т. С., Кринская А. В. // Вопр. мед. химии. — 1974. — № 6. — С. 660—663.
17. Пасхина Т. С. // Биохимия. — 1976. — Т. 41. — С. 1347—1352.
18. Пасхина Т. С., Нартикова В. Ф., Доценко В. Л. и др. // Вопр. мед. химии. — 1976. — № 5. — С. 696—706.
19. Суrowикина М. С., Фомина Е. Е. // Бюл. экспер. биол. — 1981. — № 5. — С. 623—626.
20. Суrowикина М. С. // Лаб. дело. — 1975. — № 1. — С. 6—9.
21. Суrowикина М. С., Лапина И. М., Масликова Г. В. и др. // Бюл. экспер. биол. — 1983. — № 5. — С. 115—117.
22. Суrowикина М. С., Лапина И. М., Семенова Л. В. и др. // Пат. физиол. — 1985. — № 5. — С. 62—65.
23. Суrowикина М. С., Линькова М. И., Янковская М. О. и др. // Кардиология. — 1986. — № 2. — С. 19—25.
24. Яровая Г. А., Доценко В. Л., Кожевникова Л. Т. // Тер. арх. — 1975. — № 12. — С. 62—65.
25. Яровая Г. А., Доценко В. Л., Лепова Э. И. и др. // Вопр. мед. химии. — 1980. — № 6. — С. 837—842.
26. Aasen A. O., Smith-Erichsen N., Amund-



- sen E. // Arch. Surg. — 1983. — Vol. 118. — P. 343—346.
27. Alving B. M., Tankersley D. L., Mason B. L. // J. Lab. clin. Med. — 1983. — Vol. 101. — P. 226—241.
  28. Amundsen E., Nustad K., Waaler B. // Brit. J. Pharmacol. — 1963. — Vol. 21. — P. 500.
  29. Amundsen E., Svendsen L., Vennerød A. M., Laake K. // Chemistry and Biology of the Kallikrein-Kinin System in Health and Disease. — Washington, 1976. — P. 215—220.
  30. Amundsen E., Gallimore M. J., Aasen A. O. et al. // Thrombos. Res. — 1978. — Vol. 13. — P. 625—636.
  31. Bagdasarian A., Lahiri B., Talamo R. L. et al. // J. clin. Invest. — 1974. — Vol. 54. — P. 1444—1454.
  32. Bock P. E., Shore J. D., Tans G., Griffin J. H. // J. biol. Chem. — 1985. — Vol. 260. — P. 12434—12443.
  33. Bönner G., Horn J., Buchsler U., Kapp C. // Kinin'84. — New York, 1986. — P. 87—98.
  34. Briseid K., Dyrud O. K., Arntzen F. C. // Acta pharmacol. (Kbh.). — 1968. — Vol. 26. — P. 395.
  35. Cardin A. D., Jackson R. L., Chao J. et al. // Kinin'84. — New York, 1984. — P. 25.
  36. Christensen U. // Biochim. biophys. Acta. — 1975. — Vol. 397. — P. 459—467.
  37. Cochrane C. G., Revak S. D. // J. exp. Med. — 1980. — Vol. 152. — P. 608—620.
  38. Cochrane C. G. // Handbook of Inflammation. — Amsterdam, 1983. — Vol. 4. — P. 361.
  39. Colman R. W., Mattler L., Sherry S. // J. clin. Invest. — 1969. — Vol. 48. — P. 11—22.
  40. Colman R. W., Mason J. W., Sherry S. // Ann. intern. Med. — 1969. — Vol. 71. — P. 763—773.
  41. Colman R. W., Wong P. Y. // Thrombos. Haemost. — 1977. — Vol. 38. — P. 751—755.
  42. Colman R. W. // Ann. clin. Lab. Sci. — 1980. — Vol. 10. — P. 220—226.
  43. Colman R. W., Schapira M., Scott V. F. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1981. — Vol. 370. — P. 261—270.
  44. Colman R. W. // Kinin'84. — New York, 1986. — P. 1—11.
  45. Davie E. W., Fujikawa K., Kurachi K., Kisiel W. // Advanc. Enzymol. — 1978. — Vol. 48. — P. 277—318.
  46. Deutsch E., Dragosics B., Kopsa H. et al. // Thrombos. Res. — 1983. — Vol. 31. — P. 351—364.
  47. Fritz H., Wunderer G. // Arzneimittel — Forsch. — 1983. — Bd 33. — S. 479—495.
  48. Gardin A. D., Jackson R. L., Donaldson V. H. et al. // Kinin'84. — New York, 1986. — P. 195—202.
  49. Griffin J. H., Cochrane C. G. // Meth. Enzymol. — 1976. — Vol. 45-B. — P. 56—63.
  50. Harpel P. C., Mosesson M. W., Cooper N. R. // Proteases and Biological Control. — New York, 1975. — P. 387—404.
  51. Harpel P. C. // Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. — Philadelphia, 1982. — P. 738—747.
  52. Harpel P. C., Lewin M. F., Kaplan A. P. // J. biol. Chem. — 1985. — Vol. 260. — P. 4257—4263.
  53. Henriques G. B., Allan L. // Biochem. Pharmacol. — 1972. — Vol. 21. — P. 3163—3169.
  54. Horton E. W. // J. Physiol. (Lond.). — 1959. — Vol. 148. — P. 267.
  55. Imanari T., Kaizu T., Yoshida H. et al. // Fogarty int. Center. Proc. — 1976. — B N 27. — P. 205—213.
  56. Jahrreiss R., Haberman E. // Naunyn-Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol. — 1971. — Bd 269. — S. 85—100.
  57. Klüft C. // J. Lab. clin. Med. — 1978. — Vol. 91. — P. 83—95.
  58. Moriwaki C., Hojima G., Moriya H. // Chem. pharm. Bull. — 1974. — Vol. 22. — P. 975—983.
  59. Movat H. L. // Handbook of Experimental Pharmacology. — Berlin, 1979. — Vol. 255. — P. 2—89.
  60. Oh-Ishi S., Webster M. // Biochem. Pharmacol. — 1975. — Vol. 24. — P. 591—598.
  61. Rybak M., Stancikova M., Simonianova E., Trnavsky K. // Kinin'84. — New York. — 1984. — P. 117.
  62. Seidah N. G., Paquim J., Hamelin J. et al. // Biochimie. — 1988. — Vol. 70. — P. 33—46.

Поступила 02.02.89

# COMPARATIVE ANALYSIS OF ASSAYS FOR ESTIMATION OF KALLIKREIN AND PRE-KALLIKREIN IN HUMAN BLOOD PLASMA

V. L. Dotsenko, G. A. Yarovaya, T. S. Pashkina

Central Institute for Postgraduate Training of Physicians, Moscow

Main procedures developed for estimation of kallikrein activity and of content of its precursor are reviewed; critical comparative analysis of their principles is presented. Specificity, advantages and limitations of these procedures are discussed. General rules of enzymatic kinetics are considered in connection with development and application of these procedures. Some cautions are discussed considering wrong conclusions and recommendations, based on the data obtained by means of the inadequate methods.

*Л. А. Муравьева, Е. Ю. Волков*

## НЕКОТОРЫЕ ФАКТОРЫ СЛИЗИСТОЙ ЗАЩИТЫ ГАСТРОДУОДЕНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ В РАЗЛИЧНЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ УШИВАНИЯ ПРОБОДНЫХ ЯЗВ

Кафедра госпитальной хирургии (зав. — проф. Ю. Н. Белокуров) Ярославского медицинского института

Этиология и патогенез гастродуоденальных язв до настоящего времени точно не известны, однако можно считать бесспорной связь развития язвенной болезни с нарушениями протеолитической активности желудочного сока и содержимого двенадцатиперстной кишки и резистентности слизистой оболочки этих органов.

Агрессивность желудочного секрета в основном зависит от активности протеолитической системы соляная кислота — пепсин. Резистентность тканей обеспечивается барьером, состоящим из 3 компонентов. Первые 2 компонента — слой слизи и покровный эпителий — выделил Hollander в 1962 г., третий компонент — строму желудка и двенадцатиперстной кишки — обнаружил в 1967 г. П. Д. Рабинович. Защитную функцию в основном выполняет слизь покровного эпителия, которая образует на внутренней поверхности желудка сплошной слой, тесно связанный с секретирующими клетками пиями, погруженными в их цитоплазму.

Слизистая защита двенадцатиперстной кишки менее совершенна, так как слизь здесь вырабатывается только специализированными клетками. Основную защитную роль слизи играют находящиеся в ней углеводсодержащие биополимеры, особенно фукогликопротеиды, способные связывать соляную кислоту, образовывать вязкие пленки и обладающие антипептической активностью [1—13].

В литературе нам не встретилось исследований слизистой защиты у больных, оперированных по поводу прободных гастродуоденальных язв, в разные сроки после операции, а это может пролить свет на причину рецидивов и наметить пути профилактики последних.

Целью работы явилось изучение защитных факторов гастродуоденальной системы в ближайшем послеоперационном периоде и в отдаленные сроки

после ушивания прободных язв на основании изучения баланса углеводсодержащих биополимеров.

### Методика

Для изучения баланса углеводсодержащих биополимеров исследовали кровь, что позволило судить о состоянии общего обмена гликопротеидов, и мочу, гликопептиды которой представляют собой всосавшиеся в кровь и выделенные почками продукты распада фукогликопротеидов желудочно-кишечной слизи. Общее содержание этих биополимеров оценивали по концентрации гексоз, связанных с белками, количество фукогликопротеидов — по концентрации фукозы, а сialogликопротеиды — по содержанию сиаловых кислот.

Концентрацию гексоз определяли антроновым методом: 1 мл мочи разводили 9 мл 0,1 н. NaOH, 0,5 мл из раствора насливали на 5 мл холодного антрона, концентрация которого 200 мг %, кипятили 5 мин, затем охлаждали. К 1 мл сыворотки крови добавляли 4 мл 96 % этилового спирта, дважды центрифугировали по 15 мин при 3500 об/мин (центрифуга ОПН-3), осадок разводили 3,9 мл физиологического раствора, из полученного раствора 0,5 мл насливали на 5 мл холодного антрона, кипятили 5 мин, затем охлаждали. Концентрацию общей фукозы определяли цистеиновым методом: 1 мл мочи разводили 9 мл 0,1 н. NaOH, по 1 мл раствора помещали в 2 пробирки, которые ставили в морозильную камеру на 20—30 мин, после чего добавляли 4,5 мл х.ч. серной кислоты, кипятили 3 мин, после охлаждения в 1 пробирку добавляли 0,1 мл 3 % раствора цистеина. К 0,4 мл сыворотки крови добавляли 5 мл 96 % этилового спирта, центрифугировали 15 мин при 1500 об/мин, к полученному осадку вновь добавляли 5 мл спирта и снова центрифугировали, осадок растворяли в 5 мл 0,1 н. NaOH. По 5 мл раствора помещали в 2 пробирки и добавляли по 0,5 мл 0,1 п. NaOH, по 1 мл раствора помещали в 2 пробирки, которые ставили в морозильную камеру на 20—30 мин, после чего добавляли 4,5 мл серной кислоты, кипятили 3 мин, после охлаждения в 1 пробирку добавляли 0,1 мл 3 % раствора цистеина. Фукоза с добавлением цистеина зреет 1,5 ч. Показатели сиаловых кислот определяли следующим образом: к 2 мл мочи добавляли 15 мл 96 % этилового спирта, центрифугировали 15 мин при 3500 об/мин, осадок разводили 1 мл дистиллированной воды и добавляли 1 мл раствора Бяля (100 мг орцина растворяют в 40 мл концентрированной HCl, добавляют 2 мл 1 % раствора FeCl<sub>3</sub>,

Таблица 1

Показатели концентрации гексоз (в ммоль/л), связанных с белком, фукозы и сиаловых кислот в послеоперационном периоде в сыворотке крови больных, перенесших ушивание прободных язв ( $M \pm m$ )

Показатель	Контроль	Послеоперационный период		
		1—2 сут	5—7 сут	10—11 сут
Гексозы	601,73 $\pm$ 9,04	530,82 $\pm$ 7,44*	532,46 $\pm$ 7,34*	533,88 $\pm$ 8,17*
Сиаловые кислоты	209,98 $\pm$ 7,96	216,31 $\pm$ 4,27**	220,25 $\pm$ 6,91**	223,45 $\pm$ 7,56*
Фукоза	86,69 $\pm$ 6,75	81,89 $\pm$ 6,51**	82,34 $\pm$ 4,78**	83,24 $\pm$ 6,62**

Примечание. Достоверность вычисляли по отношению к норме: одна звездочка —  $p < 0,001$ , две —  $p < 0,05$ .

дистиллированную воду до 50 мл), кипятили 5 мин, охлаждали, добавляли 5 мл амилового спирта и центрифугировали до разделения фракций. 0,5 мл сыворотки крови разводили 1 мл дистиллированной воды, добавляли 1 мл 20 % трихлоруксусной кислоты, центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин, к полученному осадку добавляли 1 мл дистиллированной воды и 1 мл раствора Биала, кипятили 15 мин, после охлаждения добавляли 5 мл амилового спирта и центрифугировали до разделения фракций. Сиаловые кислоты определяются в верхнем слое.

Показатели концентрации углеводсодержащих биополимеров определяли на спектрофотометре фирмы «Carl Zeiss» (ГДР). Гексозы, связанные с белками, определяли при длине волны 580 нм, сиаловые кислоты — при 590 нм, а фукозу — при 396 и 430 нм. Кровь брали утром натощак из локтевой вены. Для исследования мочи собирали ночную двенадцатичасовую порцию с 21 до 9 ч. Полученные цифровые данные обрабатывали методом вариационной статистики, достоверность результатов определяли по таблице Стьюдента.

## Результаты и обсуждение

Показатели углеводсодержащих биополимеров изучены у 67 человек (64 мужчин и 3 женщины). Возраст пациентов на момент обследования составил 18—62 года. У 56 больных язва локализовалась в пилорoduоденальной зоне и у 12 — в желудке. Для контроля обследованы 15 здоровых лиц.

В раннем послеоперационном периоде обследованы 26 больных, в 1—2, 5—7 и 10—11-е сутки после ушивания прободных язв у них определяли концентрацию гликопротеидов в сыворотке крови (табл. 1).

При прободении гастродуоденальных язв защитные свойства слизистой оболочки желудка резко нарушены — в раннем послеоперационном периоде снижена концентрация гексоз, значительно снижена концентрация фукозы, а содержание сиаловых кислот увеличено. По-видимому, столь резкое

нарушение механизмов слизистого барьера привело к быстрому прогрессированию язвенного дефекта и перфорации. К 10—11-м суткам послеоперационного периода, т. е. к моменту выписки больных из хирургического стационара, происходило постепенное увеличение в сыворотке крови углеводовсодержащих биополимеров, однако это увеличение было незначительным и концентрация гликопротеидов оставалась нарушенной по сравнению с контрольными показателями (разница статистически достоверна —  $p < 0,005$ ). Это необходимо учитывать при дальнейшем лечении больных, которые из хирургического стационара должны переводиться в гастроэнтерологические отделения для проведения курса противоязвенной терапии.

У 41 пациента гликопротеиды в сыворотке крови и в моче изучены через 1—12 лет после операции. У больных (19), перенесших ушивание прободной язвы и считающих себя здоровыми (жалоб они не предъявляли, диету не соблюдали, рецидива заболевания не выявлено), концентрация гликопептидов в сыворотке крови и в моче была в пределах нормы. Это свидетельствует о том, что у них полностью восстановилась защитная функция слизистый оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки, а перфорация явилась следствием действия неблагоприятных факторов (стресс, физическое перенапряжение, прием салицилатов, гормонов), отрицательно влияющих на слизистый барьер гастродуоденальной системы [1, 8, 11].

При рецидиве заболевания после ушивания прободной язвы у 22 человек (рецидив язвы подтвержден фиброгастроскопией) концентрация гликопротеидов в сыворотке крови и в моче изменялась в соответствии с перио-



Таблица 2

Показатели концентрации (ммоль/л) гексоз, связанных с белками, фукозы и сиаловых кислот у больных в отдаленные сроки после ушивания прободных гастродуоденальных язв ( $M \pm m$ )

Показатель	Контроль		Без рецидива язвы и жалоб		Обострение язвенной болезни		Улучшение состояния	
	кровь	моча	кровь	моча	кровь	моча	кровь	моча
Гексозы	601,73 $\pm$ 9,04	882,86 $\pm$ 8,77	602,11 $\pm$ 10,96	883,17 $\pm$ 8,48	546,82 $\pm$ 8,44*	886,17 $\pm$ 9,33**	575,84 $\pm$ 9,68***	943,87 $\pm$ 11,89*
Сиаловые кислоты	209,98 $\pm$ 6,96	288,47 $\pm$ 8,09	210,81 $\pm$ 8,66	289,06 $\pm$ 10,23	228,24 $\pm$ 7,55**	286,65 $\pm$ 5,66**	242,94 $\pm$ 10,43**	311,22 $\pm$ 8,72***
Фукоза	86,69 $\pm$ 6,75	303,80 $\pm$ 4,78	88,42 $\pm$ 5,72	304,42 $\pm$ 8,13	84,55 $\pm$ 2,15**	175,45 $\pm$ 5,33*	118,67 $\pm$ 3,47**	359,26 $\pm$ 9,73***

Примечание. Достоверность вычисляли по отношению к норме: одна звездочка —  $p < 0,001$ , две —  $p < 0,05$ , три —  $p < 0,005$ , в остальных случаях различия не достоверны.

дами течения язвенной болезни (табл. 2) [2—7, 9, 12, 13].

В отдаленные сроки после ушивания прободных язв у больных с рецидивом заболевания при обострении язвенной болезни отмечалось снижение концентрации фукозы в моче, а при улучшении состояния больных в процессе лечения количество фукозы возрастало. Концентрация фукозы в сыворотке крови при обострении заболевания оставалась близкой к норме, а при улучшении состояния больных увеличивалась. Показатели гексоз и сиаловых кислот в период обострения язвенной болезни в моче были близки к нормальным значениям, а при улучшении состояния пациентов незначительно увеличивались. В крови при обострении язвенной болезни показатели гексоз снижались, а сиаловые кислоты незначительно увеличивались, при стихании процесса оба показателя повышались.

У больных с рецидивом язвенной болезни слизистый барьер после перфорации язвы не восстановился, что привело к рецидиву заболевания или незаращению ушитой язвы, поэтому изучение углеводсодержащих биополимеров в раннем послеоперационном периоде и в отдаленные сроки после ушивания прободных гастродуоденальных язв позволяет судить об эффективности хирургического лечения и ставить показания для повторных операций.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Борисенко Н. А. О влиянии длительного применения некоторых антиревматических средств на функциональное состояние и структуру слизистой оболочки желудка у больных ревматизмом: Дис. ... канд. мед. наук. — Красноярск, 1973.
2. Вайстух С. И., Рабинович П. Д. // Тер. арх. — 1969. — № 7. — С. 107—110.
3. Домрачева Н. И. Гениалогический, популяционный и биохимический анализ наследственной отягощенности при язвенной болезни: Дис. ... канд. мед. наук. — Чита, 1976.
4. Рабинович П. Д. Анализ значения переваривающей силы желудочного сока и некоторых защитных механизмов гастродуоденальной системы в развитии язвенной болезни: Дис. ... д-ра мед. наук. — Чита, 1967.
5. Рабинович П. Д., Вайстух С. И., Лоншакова Н. М. и др. // Вопр. мед. химии. — 1972. — № 1. — С. 52—58.
6. Рабинович П. Д., Домрачева Н. И. // Там же. — 1977. — № 4. — С. 478—482.

- 7 Складов Е. Я. // Врач. дело. — 1984. — № 5. — С. 26—28.
- 8 Cooke A. R. // Amer. J. dig. Dis. — 1976. — Vol. 21, N 2. — P. 155—164.
- 9 Donaldson J. D., Macrae K. D., Parks T. G. // Scand. J. Gastroent. — 1981. — Vol. 16, N 2. — P. 235—239.
- 10 Hollander F. // Gastroenterology. — 1962. — Vol. 43, N 3. — P. 304—312.
- 11 Iveis K. J. // Ferologica. — 1973. — Vol. 20, N 6. — P. 517—524.
- 12 Kühn D. // Fortschr. Med. — 1974. — Bd 92, N 2. — S. 55—57.
- 13 Sakosiek J., Badurski J., Zwiers K. et al. // Pol. Hyg. lek. — 1974. — Vol. 29, N 49. — P. 2116—2119.

Поступила 09.09.88

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1989

УДК 616.13-004.6-07:616.153.963'915

В. В. Фролькис, Л. Н. Богацкая, С. Н. Новикова

## ИНГИБИТОРЫ БИОСИНТЕЗА БЕЛКА И РАЗВИТИЕ ДИСЛИПОПРОТЕИДЕМИЙ У КРОЛИКОВ

Лаборатория биохимии Института геронтологии АМН СССР, Киев

Среди большого числа факторов, определяющих развитие атеросклероза, особое место занимают дислипидемии (ДЛП), характеризующиеся изменениями в содержании, составе и соотношении отдельных липидов и липопротеидов (ЛП) крови [5]. В связи с этим многочисленные попытки лечения атеросклероза в клинике и эксперименте основывались на использовании средств, снижающих уровень липидов крови.

Вместе с тем установлено, что в возникновении нарушений метаболизма липидов и ЛП, приводящих к развитию атеросклероза, важную роль играет избыточная продукция печенью и кишечником апо-белков, особенно апо-В-белков — основного структурного компонента ЛП низкой плотности (ЛПНП) [6]. Это обуславливает попытки влиять на развитие дислипидемий и атеросклероза путем направленного снижения концентрации апо-В-белков. Одним из подходов к решению этой задачи может быть использование ингибиторов биосинтеза белка. Последние, как было показано ранее, влияя на обмен белков и липидов, существенно увеличивают

## SOME PROTECTIVE FACTORS OF GASTRO-DUODENAL MUCOSAL MEMBRANE WITHIN VARIOUS PERIODS AFTER PERFORATING ULCER SURGICAL TREATMENT

L. A. Muravyova, Ye. Yu. Volkov

Medical School, Yaroslavl

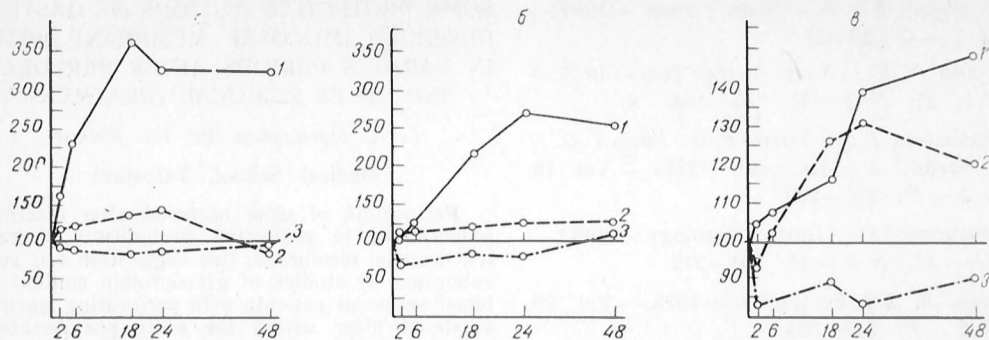
Perforation of ulcer occurred after distinct impairments in protective mechanisms of gastric mucosal membrane; this suggestion was corroborated by studies of glycoprotein content in blood serum of patients with perforating gastroduodenal ulcer within the early postoperation period. Studies of the glycoprotein in blood serum and urine within the later periods after the operation showed that the mucosal protective barrier was completely restored in some patients, thus protecting against the ulcer exacerbation, while recurrence of the disease was observed in the patients with deteriorated protective mechanisms in gastric mucosal membrane.

продолжительность жизни экспериментальных животных [7].

Все изложенное выше определило задачу настоящего исследования — изучить влияние оливомицина, ингибирующего биосинтез белка на этапе транскрипции, и стрептомицина, блокирующего этап трансляции [1], на развитие экспериментально вызванных ДЛП.

### Методика

Опыты проведены на 47 молодых половозрелых кроликах-самцах массой 2—3 кг. Использованы 2 модели: 1-я — разовая нагрузка холестерином (ХС) для развития острой алиментарной ДЛП и 2-я — длительная нагрузка ХС для развития экспериментального атеросклероза. ХС вводили с помощью зонда в 10 % растворе подсолнечного масла из расчета 0,25 г на 1 кг массы. В I серии опытов животные были разделены на 3 группы: кролики 1-й группы (8) получали нагрузку ХС, животным 2-й группы (6) в течение 3 дней до нагрузки ХС перорально вводили стрептомицин, разведенный молоком, из расчета 0,5 на 1 кг массы, кролики 3-й группы (10) в течение 3 дней до нагрузки ХС получали стрептомицин внутримышечно из расчета 0,057 г на 1 кг массы 3 раза в день. Кровь брали из краевой вены уха непосредственно до введения ХС и спустя 2, 6, 18, 24 и 48 ч после нагрузки ХС.



Влияние стрептомицина на развитие алиментарной гиперхолестеринемии у кроликов в условиях разовой нагрузки холестерином.

По оси ординат — изменение содержания вещества по отношению к исходному уровню (в %); по оси абсцисс — время (в ч). А — апо-В-содержащие ЛП; Б — общий ХС; В — ХС ЛПВП: 1 — нагрузка ХС; 2 — нагрузка ХС на фоне перорального введения стрептомицина; 3 — нагрузка ХС на фоне внутримышечного введения стрептомицина.

Во II серии опытов животные 1-й группы (10) в течение 4 мес получали ХС, кроликам 2-й группы (8) на фоне длительной нагрузки ХС парентерально вводили оливомицин из расчета 50 мкг на 1 кг массы, животные 3-й группы (5) получали только оливомицин. Кровь брали из красной вены уха каждые 4 нед. Животных забивали под нембуталовым наркозом (0,15 мг на 1 кг массы), осуществляя морфологический контроль.

В плазме крови определяли общий ХС и ХС различных классов ЛП — ЛП очень низкой плотности (ЛПОНП), ЛП высокой плотности (ЛПВП), — выделенных методом двойной преципитации [3], триглицериды [8], незэтерифицированные жирные кислоты (НЭЖК) [9], апо-В-содержащие ЛП [4], процентное содержание фракций ЛП методом электрофореза в агарозном геле с последующей денситометрией [2]. В тканях определяли содержание ХС, триглицеридов, НЭЖК и ЛП методами, указанными выше, после предварительной экстракции липидов по методу [10].

## Результаты и обсуждение

Однократная нагрузка ХС, как видно на рисунке, приводит к выраженной гиперлиппротеидемии и гиперхолестеринемии. Так, уже через 2 ч после введения ХС концентрация апо-В-содержащих ЛП возрастает на 58 % по сравнению с исходным уровнем. Через 18 ч она достигает максимума (270 % от исходного уровня), затем несколько снижается, оставаясь достаточно высокой и через 48 ч после нагрузки (на 255 % выше исходного уровня). В то же время концентрация ХС достигает максимальных значений через 24 ч, сохраняясь на достаточно высоком уровне и через 48 ч. Параллельно с увеличением концентрации общего ХС парастает и уровень ХС ЛПВП. Максимальное увеличение его

(на 39 %) отмечается через 24 ч после нагрузки.

Пероральное введение стрептомицина предотвращает острое развитие острой алиментарной гиперлиппротеидемии и гиперхолестеринемии. Из рисунка видно, что максимум повышения апо-В ЛП приходится уже не на 18-й, а на 24-й час, а их уровень возрастает только на 48 %. В значительно меньшей степени повышается и концентрация общего ХС, наиболее высокий уровень которого обнаруживается также через 24 ч, но превышает исходный только на 33 %. Исходя из механизма действия стрептомицина [1], можно предположить, что полученный эффект связан с блокированием в кишечнике синтеза апо-белков, участвующих в формировании липопротеидных частиц.

Влияние стрептомицина на уровень ЛП и ХС особенно четко проявилось при его внутримышечном введении. Стрептомицин не только полностью предотвратил развитие острой алиментарной гиперхолестеринемии, но и привел к снижению исходного уровня апо-В ЛП и общего ХС в среднем на 20—25 %. Полученный эффект в данном случае, по-видимому, связан с влиянием ингибитора не только на кишечник, но и на печень. Исследование ткани печени через 24 ч после нагрузки ХС показало, что у животных, получавших стрептомицин, по сравнению с животными, которым вводили только ХС, существенно снижено как содержание ХС (с  $2,8 \pm 0,3$  до  $1,7 \pm 0,2$  мг на 1 г ткани, т. е. на 39 %), так и апо-В ЛП (с  $0,65 \pm 0,06$  до  $0,38 \pm$



$\pm 0,04$  мг на 1 г ткани, т. е. на 42 %). Этому соответствует и максимальный прирост концентрации ХС в крови через 24 ч после разовой нагрузки.

Таким образом, введение ингибитора биосинтеза белка стрептомицина препятствует развитию гиперхолестеринемии и гиперлипопротеидемии, вызываемой однократной холестериновой нагрузкой.

При длительном введении ХС (в течение 4 мес) в качестве ингибитора биосинтеза белка был использован оливомицин. Из данных, представленных в табл. 1, видно, что у кроликов в процессе длительной нагрузки развивается выраженная гиперхолестеринемия, гипертриглицеридемия, гиперлипопротеидемия, т. е. признаки, характеризующие атерогенную ДЛП. Так, в 1-й группе животных через 4 нед после начала эксперимента содержание общего ХС крови повышается на 221 %, через 12 нед — на 351 %, оставаясь на таком же высоком уровне до конца эксперимента. Значительно возрастает концентрация ХС ЛПНП: через 12 нед после начала нагрузки их уровень составляет  $250,1 \pm 11,4$  мг/дл, что на 320 % выше исходного показателя. Концентрация ХС ЛПОНП максимально (в 6 раз) увеличивается через 16 нед. Следует отметить некоторое увеличение содержания ХС ЛПВП, которое достигает максимальных значений через 8 нед после начала эксперимента. Однако на 12-й неделе его уровень начинает снижаться и к 16-й неделе возвращается к исходному. Неравномерное распределение ХС между фракциями ЛП приводит к значительному нарастанию коэффициента атерогенности, характеризующего атерогенную ситуацию в организме [5]. В процессе нагрузки ХС происходит диссоциация в изменении фракций ЛП: снижение процентного содержания ЛПВП и повышение уровня ЛПНП. Выраженность изменений достигает максимальных значений через 16 нед. Абсолютное содержание апо-В ЛП к этому сроку увеличивается почти в 5 раз по сравнению с исходным уровнем. Нагрузка ХС приводит к увеличению содержания триглицеридов и НЭЖК, являющихся источником их синтеза. Так, если исходный уровень триглицеридов и НЭЖК в плазме крови составлял соответственно  $35,78 \pm 2,82$

Таблица 1

Содержание ХС и ЛП в сыворотке крови кроликов в условиях нагрузки ХС и оливомицином ( $M \pm m$ )

Условия эксперимента	Общий ХС	ХС ЛПНП	ХС ЛПОНП	ХС ЛПВП	Коэффициент атерогенности	Апо-В — ЛП, г/л	Относительная концентрация, %	
							ЛПНП	ЛПВП
Нагрузка ХС								
исходный показатель	99,5 ± 3,2	48,3 ± 2,4	32,6 ± 1,5	17,5 ± 1,1	4,4 ± 0,2	1,3 ± 0,2	26,7 ± 1,7	32,4 ± 1,9
через 4 нед	318,5 ± 9,8*	82,2 ± 7,1*	65,1 ± 4,2*	24,3 ± 1,9	12,1 ± 0,9*	4,1 ± 0,3*	30,1 ± 2,2	16,7 ± 1,5*
через 8 нед	354,7 ± 8,5*	102,4 ± 8,7*	78,9 ± 5,4*	54,3 ± 5,2*	5,5 ± 0,7*	4,7 ± 0,4*	35,7 ± 1,9	11,2 ± 1,4*
через 12 нед	450,1 ± 9,9*	250,4 ± 11,4*	105,4 ± 8,3*	49,8 ± 3,4*	8,0 ± 0,5*	5,6 ± 0,4*	41,5 ± 3,2*	13,4 ± 1,8*
через 16 нед	478,2 ± 9,8*	271,8 ± 14,5*	199,1 ± 9,6*	15,4 ± 1,2	30,0 ± 1,1*	7,1 ± 0,6*	48,5 ± 2,7*	4,8 ± 1,0*
Нагрузка ХС и оливомицином:								
исходный показатель	106,3 ± 9,2	61,2 ± 6,9	23,8 ± 2,5	20,7 ± 1,8	4,4 ± 0,2	0,97 ± 0,06	35,4 ± 1,5	41,0 ± 3,2
через 4 нед	218,1 ± 7,8*	88,4 ± 7,5	79,7 ± 6,3*	41,2 ± 3,1*	4,3 ± 0,3	2,5 ± 0,1*	41,2 ± 1,9	32,4 ± 2,1*
через 8 нед	215,4 ± 9,3*	85,3 ± 6,4	76,5 ± 5,8*	48,9 ± 2,1	3,4 ± 0,1	2,1 ± 0,1*	40,4 ± 2,4	29,6 ± 1,9
через 12 нед	180,8 ± 8,5*	79,7 ± 6,5	60,4 ± 4,7	45,2 ± 1,9	3,0 ± 0,1	1,9 ± 0,2*	39,4 ± 2,9	30,2 ± 2,1
через 16 нед	135,2 ± 9,8	70,4 ± 6,1	45,8 ± 3,1	23,5 ± 1,6	4,7 ± 0,2	1,3 ± 0,2*	36,9 ± 2,8	32,2 ± 2,0
Нагрузка оливомицином:								
исходный показатель	101,5 ± 8,4	48,9 ± 3,2	26,8 ± 1,1	21,3 ± 1,4	3,7 ± 0,1	1,1 ± 0,1	33,2 ± 1,5	40,1 ± 2,3
через 4 нед	98,9 ± 8,7	51,2 ± 6,4	26,5 ± 1,3	18,6 ± 0,9	4,3 ± 0,2	1,1 ± 0,2	29,8 ± 1,3	38,4 ± 1,7
через 8 нед	113,5 ± 7,9	56,2 ± 4,8	29,7 ± 1,3	26,4 ± 1,8*	3,3 ± 0,2	0,98 ± 0,07	31,2 ± 1,3	36,1 ± 1,5
через 16 нед	95,1 ± 7,6	46,4 ± 3,2	22,4 ± 1,2*	20,5 ± 1,2	3,5 ± 0,2	1,0 ± 0,09	27,1 ± 1,2	40,0 ± 2,3

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

Т а б л и ц а 2

Содержание липидов (в мг/г) в различных тканях у кроликов в условиях нагрузки ХС и оливомицином ( $M \pm m$ )

Исследуемые вещества	Контроль (n=5)	Нагрузка ХС (n=10)	Нагрузка ХС и оливомицином (n=8)	Нагрузка оливомицином (n=5)
Холестерин (общий):				
печени	3,0±0,2	12,7±0,9*	5,4±0,6	3,1±0,2
сердца	3,1±0,3	8,0±0,7*	4,3±0,3	3,0±0,4
мозга	5,9±0,3	10,5±1,2*	5,7±0,4	5,6±0,7
аорты	2,9±0,1	5,2±0,6*	3,4±0,2	3,1±0,3
Триглицериды:				
печени	2,8±0,1	2,9±0,3	2,6±0,1	2,7±0,3
сердца	2,5±0,2	2,4±0,3	2,5±0,3	2,4±0,4
мозга	2,8±0,3	3,1±0,5	2,9±0,4	2,7±0,4
аорты	3,3±0,3	3,2±0,4	3,1±0,2	3,0±0,2
ЛПНП и ЛПОНП (суммарно):				
печени	0,9±0,1	1,2±0,3	0,8±0,09	0,7±0,09
сердца	0,78±0,08	0,89±0,09*	0,59±0,08	0,58±0,08
мозга	0,57±0,7	0,97±0,06*	0,61±0,07	0,60±0,07
аорты	0,67±0,08	0,86±0,07*	0,53±0,07	0,39±0,05**
НЭЖК:				
печени	6,0±0,9	6,4±0,7	5,4±0,6	6,4±0,7
сердца	3,6±0,8	5,4±0,6*	4,5±0,5	3,8±0,5
мозга	7,2±0,9	7,1±0,8	6,3±0,7	7,1±0,9
аорты	5,7±0,6	5,8±0,7	5,6±0,6	5,3±0,6

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

мг/дл и  $336,85 \pm 18,6$  мэкв/л, то после 4-месячной нагрузки ХС эти показатели достигали  $70,83 \pm 6,5$  мг/дл и  $686,7 \pm 20,6$  мэкв/л соответственно.

В то же время во 2-й группе кроликов (получавших оливомицин на фоне длительной нагрузки ХС) абсолютный уровень общего холестерина значительно и достоверно ниже по сравнению с 1-й группой. Одновременно с этим обнаружено достоверное снижение концентрации ЛПНП и содержащегося в них ХС через 16 нед после введения антибиотика. Существенно, что коэффициент атерогенности в этих условиях не только не возрастал, но даже снижался по сравнению с исходным уровнем.

Таким образом, введение ингибитора биосинтеза белка на фоне длительной нагрузки ХС предотвращает развитие атерогенной ДЛП.

Развитие экспериментального атеросклероза сопровождается изменениями липидного состава не только крови, но и различных тканей, в том числе сосудов, что является основным патогенетическим звеном развития атеросклероза. Из данных, представленных в табл. 2, видно, что введение ХС на фоне нагрузки оливомицином препятствует процессу накопления липидов в тканях. Если в 1-й группе концентрация ХС в печени увеличена в

4 раза, в мозге и аорте — в 2,5 раза по сравнению с контрольной группой, то у кроликов, получавших оливомицин, достоверных изменений не обнаружено. Такая же закономерность выявлена и при изучении концентрации апо-В ЛП и НЭЖК. Содержание триглицеридов не изменяется во всех группах животных.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что использованные в работе ингибиторы биосинтеза белка независимо от точки приложения их действия предотвращают развитие ДЛП и атеросклероза у экспериментальных животных. Как известно, решающую роль в синтезе и катаболизме ЛП играют печень и кишечник. Можно предположить, что полученные нами результаты связаны с ингибированием синтеза апо-В-белков в этих органах. Подтверждением этого положения является тот факт, что под влиянием используемых нами антибиотиков достоверно снижается содержание апо-В ЛП в печени. Вместе с тем имеют значение и нарушения адсорбции ХС в кишечнике, изменения функции специфических рецепторов и других возможных механизмов действия стрептомицина и оливомицина. Это подтверждается данными, свидетельствующими о существенном снижении уровня ХС крови под влиянием

ем антибиотика неомидина [11]. Полученные результаты дают основания для поиска средств, задерживающих развитие атеросклеротического процесса, среди веществ, избирательно блокирующих синтез апо-В-белков в печени и кишечнике.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ашмарин И. П., Ключарев Л. А. Ингибиторы синтеза белка. — Л., 1975.
2. Киряков А., Тинтерова З., Стоянова С. // Сввр. мед. — 1977. — Т. 28, № 4. — С. 29—35.
3. Киряков А., Тинтерова З. // Лаб. дело. — 1979. — № 7. — С. 398—402.
4. Климов А. Н., Ловягина Т. Н., Баныковская З. Б. // Там же. — 1966. — № 5. — С. 276—280.
5. Климов А. Н., Никульчева Н. Г. Липопротеиды, дислипидемии и атеросклероз. — Л., 1984.
6. Репин В. С. // Бюл. Всесоюз. кардиол. науч. центра. — 1986. — № 1. — С. 116—118.
7. Фролик В. В., Богацкая Л. Н., Ступина А. С. и др. // Продление жизни: прогнозы, механизмы, контроль. — Киев. 1979. — С. 148—164.
8. Carlson L. A. // J. Atheroscler. Res. — 1963. — Vol. 3, N 4. — P. 334—336.

9. Duncombe W. G. // Clin. chim. Acta. — 1964. — Vol. 8, N 2. — P. 122—125.
10. Folch G., Lees M., Sloane S. G. // J. biol. Chem. — 1957. — Vol. 226, N 1. — P. 497—509.
11. Samuel P., Steiner A. // Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.). — 1959. — Vol. 100, N 1. — P. 193—195.

Поступила 08.02.89

#### INHIBITORS OF PROTEIN BIOSYNTHESIS AND DISLIPOPROTEINEMIAS IN RABBITS

V. V. Frol'kis, L. N. Bogatskaya, S. N. Novikova

Institute of Gerontology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Kiev

Acute alimentary hypercholesterolemia, developing after a single load with cholesterol, and experimental atherosclerosis, caused by long-term loading with cholesterol, were studied in young rabbits. Olivomycin, administered simultaneously with long-term cholesterol loading, and streptomycin, injected within 3 days before cholesterol loading, were used as inhibitors. These antibiotics prevented hypercholesterolemia, hyperlipoproteinemia and atherosclerosis development. The data obtained suggest that the drugs used inhibited development of atherosclerosis via selective blockade of apoB proteins synthesis in liver and intestinal tissues of the experimental animals.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1989

УДК 616-008.931:577.152.28]-008.64-055.5/7-07

Т. В. Миренбург, Т. В. Лебедева, К. Д. Краснопольская, О. Б. Барцева,  
В. М. Козлова, В. А. Бахарев

#### БИОХИМИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА МУКОСУЛЬФАТИДОЗА

Институт медицинской генетики АМН СССР, Центр охраны здоровья матери и ребенка  
Минздрава СССР, Москва

Мукосульфатидоз (МС) — редкое аутосомно-рецессивное заболевание, характеризующееся множественной недостаточностью сульфатаз (арилсульфатаз А, В, и С, идуронатсульфатазы, гепаран-Н-сульфатазы, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатсульфатазы) [9]. Заболевание характеризуется выраженным клиническим и биохимическим полиморфизмом, что, по-видимому, является следствием генетической гетерогенности МС, при котором первичный биохимический дефект остается нерасшифрованным [8]. Из имеющихся в литературе описаний можно выделить по крайней мере две клинические формы, различающиеся по сроку манифестации заболевания — позднюю инфантильную и неонатальную [6, 8, 9, 16]. Клинический фенотип включает тяжелую неврологическую симптоматику, поражение скелета и

изменение внешности больного по типу гаргоилизма, ихтиоз, т. е. суммирует симптомы, индуцированные недостаточностью сульфатаз, участвующих в деградации гликофинголипидов, гликозаминогликанов и стероидов. Наличие гено- и фенотипов и выраженный клинический полиморфизм делают практически невозможной клиническую диагностику МС, который достоверно диагностируется только методами современной биохимии. В мировой литературе описано немногим более 20 случаев МС, что не соответствует истинной частоте заболевания, которое часто ошибочно диагностируется как недостаточность одной из сульфатаз либо вообще не диагностируется [9]. В настоящей работе представлены результаты биохимической диагностики МС, осуществляемой как постнатально (у пробанда), так и



пренатально (у плода) при повторной беременности в отягощенной семье.

## Методика

Материалом для исследования являлись биологические жидкости — моча, сыворотка, амниотическая жидкость, полученная путем амниоцентеза на 21-й неделе беременности, и клетки — лейкоциты, культуры кожных и эмбриональных фибробластов, а также культура клеток амниотической жидкости. Выделение лейкоцитов и культивирование фибробластов осуществляли описанными ранее методами [2, 6]. Клетки амниотической жидкости культивировали по методу [13] с длительностью инкубации 21—28 дней. ТСХ олигосахаридов мочи проводили на пластинках со слоем силикагеля («Мегк», ФРГ). Количественное содержание и спектр экскретируемых гликозаминогликанов (ГАГ) определяли, как описано ранее [5]. Электрофоретическое фракционирование ГАГ осуществляли на ацетатцеллюлозных пленках (целлогель, «Serva», ФРГ). В работе использовали стандарты ГАГ («Seikagaku Kogyo», Япония) стандарт гепарансульфата получали, как описано ранее [4]. Двухмерный электрофорез ГАГ в моче и амниотической жидкости осуществляли после преципитации ГАГ из биологических жидкостей 5 % цетилапиридинийхлоридом (ЦПХ) или 0,05 % алыциановым синим в 0,05 М натрий-ацетатном буфере (рН 5,8), содержащем 50 мМ хлористого магния в системе пиридин — уксусная кислота — вода (10:1:89 по объему) рН 6,0 (I направление) и 0,1М уксуснокислый барий (II направление). Преципитацию ГАГ алыциановым синим из амниотической жидкости про-

водили без переваривания белков. Преципитированные ГАГ перерастворили в дистиллированной воде и в объеме 1—3 мкл наносили в левый нижний угол пленки на расстоянии 2,0 см от обоих краев; перед разделением по II направлению на 1,0 см правее точки нанесения в объеме 1,5 мкл наносили смесь стандартов ГАГ (по 0,5 мкг каждого). Условия электрофореза: градиент потенциала 7,5 В/см. время разгонки 45 и 90 мин соответственно для I и II направления. Окраску и денситометрию электрофореграмм проводили по методу [11]. Флюориметрическое титрование ГАГ амниотической жидкости проводили, как описано ранее [1], после преципитации и перерастворения в бидистиллированной воде (рН 5,6) и в 0,1 н. серной кислоте (рН 2,0).

Внутриклеточное накопление ГАГ определяли радиоизотопным методом и выражали в виде коэффициента накопления ( $K_n$ ), т. е. в виде отношения количества  $^{35}\text{S}$ -ГАГ в исследуемых клетках к их количеству в нормальных клетках на 4-й день культивирования с меткой [3].

Активность арилсульфатаз А и В определяли с помощью хромогенного субстрата, п-нитрокатехолсульфата фирмы «Koch-Light» (Англия). Концентрацию освобожденного п-нитрокатехола измеряли стандартным методом [10]. Активность  $\beta$ -D-гексозаминидаз и  $\beta$ -D-галактозидазы определяли с помощью производных 4-метилумбеллиферона (4МУФ) («Koch-Light») по методу [9, 14]. Концентрацию освобожденного 4МУФ измеряли на спектрофлуориметре «Hitachi-850» (Япония) при  $\lambda_{\text{возб}}=360$  нм,  $\lambda_{\text{фл}}=450$  нм. Активность ферментов выражали в наномолях продуктов реакции на 1 мг белка за 1 ч инкубации. Активность гепаран-N-сульфатазы определяли,

Таблица 1

Активность лизосомных ферментов в клеточном гомогенате пробанда и его родителей

Гомогенат и обследованный	Арилсульфатаза А		Арилсульфатаза В		Гепаран-N-сульфатаза	
	нмоль/ч на 1 мг белка	% от нормы	нмоль/ч на 1 мг белка	% от нормы	% освобожденного сульфата на 100 мг белка	% от нормы
Лейкоциты:						
пробанд А.	4,7 (114)	4,1	1,8 (53,3)	3,9	—	—
новорожденная М.	71,0 (334)	21,0	79,7 (92,3)	82,0	—	—
отец	28,5 (114)	25,0	47,0 (53,3)	86,0	—	—
мать	53,6 (114)	47,0	41,2 (53,3)	78,0	—	—
Данные литературы [6]	24,8 (70—270)	15,0	0 (39—191)	0	—	—
	1,8 (32—106)	3,0	5,4 (48—468)	—	—	—
Кожные фибробласты:						
пробанд А.	82,3 (578,8)	14,0	29,0 (80,1)	36,0	0,7 (5,6)	12,5
новорожденная М.	107,3 (507,5)	21,0	95,7 (141,8)	67,0	—	—
Данные литературы [6]	40,0 (325—2000)	3,4	0 (94—443)	0	—	—
	0 (90—516)	0	5,4 (114—456)	до 50,0	—	—
Клетки амниотической жидкости М.	95,0 (328)	29,0	37,0 (79,2)	47,0	3,8 (5,8)	66,9

Примечание. В скобках приведена величина активности в норме, полученная в этом же эксперименте.

используя  $^{35}\text{S}$ -гепарин («Amersham», Англия) в качестве субстрата, как описано ранее [10]. Концентрацию белка измеряли по методу [7].

## Результаты и обсуждение

В «отягощенной» семье А. имелось двое больных детей, один из которых (мальчик) умер до обследования в возрасте 4 лет 5 мес. Пробанд — девочка в возрасте 4 лет 9 мес. Росла и развивалась в пределах возрастной нормы до 2,5 года, когда у нее появились судорожные подергивания конечностей. Далее ребенок стал терять приобретенные навыки, нарастало отставание в психомоторном и речевом развитии, появились сухость кожи и ихтиоз. В момент обследования интеллект снижен до стадии идиотии, спастический тетрапарез, эписиндром, ихтиоз, изменения скелета (протрузия грудины, эквино-варусная деформация стоп), гепатоспленомегалия. Старший брат имел аналогичное заболевание и умер во время эпилептического приступа.

При обследовании пробанда А. А. биохимическими методами с целью исключения наследственных форм лейкодистрофий в моче не выявлено гиперэкскреции олигосахаридов и гиперэкскреции ГАГ — 210 ед. ЦПХ на 1 г креатинина (при возрастной норме до 213 ед. ЦПХ на 1 г креатинина). Исследование спектра экскретируемых ГАГ с помощью одно- и двухмерного электрофореза (рис. 1, см. вклейку) выявило гиперэкскрецию гепарансульфата ( $\text{ГС/ХС} \approx 1,0$ , в норме  $\text{ГС/ХС} \leq 0,1$ ). Определение активности лизосомных ферментов в лейкоцитах и фибробластах выявило недостаточность арилсульфатазы А (соответственно 4,1 и 14 % от нормы), арилсульфатазы В (3,9 и 36 %), в фибробластах — снижение активности гепаран-N-сульфатазы (12,5 % от нормы), тогда как величины активности гексозаминидазы и  $\beta$ -D-галактозидазы оказались в пределах нормального ряда. В табл. 1 представлены результаты определения активности лизосомных ферментов в гомогенате лейкоцитов родителей пробанда, эти данные свидетельствуют о наличии гетерозиготных проявлений дефекта на ферментном уровне. Результаты биохимического обследования наряду с клинической картиной заболевания позволили диагностировать МС у пробан-

да. Исследование внутриклеточного накопления  $^{35}\text{S}$ -ГАГ выявило отклонение от нормы:  $K_n$  составил 1,8.

В момент обследования мать пробанда была беременна, и семье предложили дородовую диагностику. На 21-й неделе беременности произведен трансабдоминальный амниоцентез, получен образец амниотической жидкости и выращена культура ее клеток. При исследовании спектра гликозаминогликанов амниотической жидкости выявлена гиперэкскреция кератансульфата и гепарансульфата, которые в норме не содержатся (рис. 2, см. вклейку). В культуре клеток амниотической жидкости активность арилсульфатаз А и В была снижена, но аномалий в уровне внутриклеточного накопления  $^{35}\text{S}$ -ГАГ практически не выявлено ( $K_n = 1,1$ ). Таким образом, данные биохимических исследований не позволяли однозначно интерпретировать генотип плода как гомо- или гетерозиготного носителя МС. Ситуация усугублялась поздним сроком беременности у матери пробанда к моменту обследования (невозможность динамического наблюдения) и отсутствием данных литературы о дородовой диагностике МС. Семье было рекомендовано прервать беременность в связи с низкой остаточной активностью арилсульфатазы А в культуре клеток амниотической жидкости и измененным спектром ГАГ в амниотической жидкости. Женщина не явилась в указанный срок для прерывания беременности, а на 31-й неделе беременности в результате преждевременных родов у нее родилась девочка с массой тела 1 кг 800 г, у которой в течение 4 мес постепенно был получен и исследован разнообразный биохимический материал. При исследовании образцов мочи в 2-недельном и 4-месячном возрасте гиперэкскреции ГАГ не выявлено.

В спектре экскретируемых ГАГ у новорожденной М. произошли некоторые изменения. В возрасте 2 нед на электрофореграмме выявлялся гепарансульфат (см. рис. 1), тогда как в 4-месячном возрасте этот ГАГ на электрофореграмме отсутствовал. На 1,5-м месяце жизни у М. была взята биопсия кожи и выведена культура кожных фибробластов, в которой определена активность лизосомных фермен-

Характеристика гомо- и гетерозиготного фенотипа МС

Генотип	ЦПХ-тест, ед. ЦПХ-глицерината	$K_{H^{35}S-GAG}$	Активность лизосомных ферментов, в % от нормы				
			арилсульфатаза А		арилсульфатаза В		гепаран-N-сульфатаза
			лейкоциты	кожные фибробласты	лейкоциты	кожные фибробласты	кожные фибробласты
Гомозигота	210	1,8	4,1	14,0	3,9	36,0	12,5
Гетерозигота	213	1,1	21,0	21,0	82,0	67,0	67,0
			25,0		86,0		
			47,0		78,0		

тов (см. табл. 1) и исследовано внутриклеточное накопление  $^{35}S$ -ГАГ, оказавшееся нормальным. Наконец, в 4-месячном возрасте был получен образец крови, выделены лейкоциты, в гомогенате которых определена активность лизосомных ферментов (см. табл. 1). Выявлено практическое тождество уровня активности сульфатаз в лейкоцитах М. и ее родителей. Это позволило окончательно интерпретировать М. как гетерозиготную носительницу МС.

Диагноз МС у пробанда А. А. базировался на обнаружении недостаточности 3 сульфатаз, аномального внутриклеточного накопления  $^{35}S$ -ГАГ в фибробластах и изменении спектра экскретируемых ГАГ. Клиническая картина заболевания не противоречила диагнозу [6]. Особенностью биохимического фенотипа данной формы МС являлось наличие **выраженных** признаков дефекта у гетерозигот по активности арилсульфатазы А в лейкоцитах. Формы МС со столь низкими уровнями остаточной активности арилсульфатазы А в лейкоцитах гетерозигот в литературе не описано [6, 8, 16]. Родители пробанда по национальности азербайджанцы, происходят из одного села. Хотя родство между ними при сборе родословной не установлено, эндогамность брака наряду с ярко выраженной тенденцией мусульманского населения Азербайджана к заключению кровно-родственных браков позволяют с высокой долей вероятности предполагать, что оба родителя являются гетерозиготными носителями одной и той же мутации. Различия в уровне активности арилсульфатазы А в лейкоцитах (почти двукратные) матери и отца пробанда могут быть связаны с беременностью, кото-

рая влияет на активность лизосомных ферментов [12, 17].

Сложность интерпретации генотипа плода по данным биохимического обследования в описываемом случае определялась различием в уровнях активности арилсульфатаз А и В в разном биологическом материале — лейкоцитах и фибробластах. У облигатных гетерозигот мы исследовали только лейкоциты. Когда выяснились различия в уровнях остаточной активности арилсульфатаз между лейкоцитами и фибробластами у пробанда, для выведения клеточной культуры гетерозигот (с целью интерпретации результатов дородовой диагностики) уже не оставалось времени. Не располагая данными о гетерозиготных уровнях активности арилсульфатаз в фибробластах, мы сочли остаточную активность арилсульфатазы А в культивируемых клетках амниотической жидкости слишком низкой, исходя из данных литературы, для фибробластов, и рекомендовали аборттировать плод. Данные о спектре ГАГ в амниотической жидкости и внутриклеточном накоплении  $^{35}S$ -ГАГ были противоречивыми и не могли быть использованы в дородовой диагностике. Практически мы не смогли однозначно верифицировать генотип М. по гену МС до тех пор, пока не исследовали активность лейкоцитарных арилсульфатаз, которая оказалась тождественной таковой в лейкоцитах отца. Биохимические характеристики гомо- и гетерозиготного фенотипов выявленной нами формы МС сведены в табл. 2.

Полученные результаты следует учитывать при медико-генетическом консультировании семей,отягощенных МС. Практические рекомендации, вытекающие из этого опыта, можно



сформулировать как необходимость исследования биохимического фенотипа в культурах кожных фибробластов не только у гомозигот, но и у гетерозигот, прежде чем идти на дородовую диагностику МС.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Горняк Л. Л., Краснопольская К. Д., Одиноква О. Н. и др. // *Вопр. мед. химии.* — 1986. — № 5. — С. 48—52.
2. Кухаренко В. Н., Кулиев А. М., Гринберг К. Н., Терских В. В. // *Цитология.* — 1974. — № 10. — С. 1228—1232.
3. Лебедева Т. В., Краснопольская К. Д., Фрейдин М. И. // *Молекул. генет.* — 1984. — № 7. — С. 32—36.
4. Лебедева Т. В., Одиноква О. Н., Краснопольская К. Д., Фрейдин М. И. // *Вопр. мед. химии.* — 1988. — № 2. — С. 117—119.
5. Одиноква О. Н., Бялик М. А., Краснопольская К. Д., Яковлев С. А. // *Там же.* — 1986. — № 1. — С. 87—92.
6. Burch M., Fensom A. H., Jackson M. et al. // *Clin. Genet.* — 1986. — Vol. 30. — P. 409—415.
7. Bradford M. M. // *Analyt. Biochem.* — 1976. — Vol. 72. — P. 248—254.
8. Tlo Y., Tahara T., Tokoro T., Maekawa K. // *Pediat. Res.* — 1983. — Vol. 17. — P. 97—100.
9. Galjaard H. *Genetic Metabolic Diseases: Early Diagnosis and Prenatal Analysis.* — Amsterdam, 1980.
10. Hall C. W., Liebaers Y., Di Natale P., Neufeld E. P. // *Meth. Enzymol.* — 1978. — Vol. 50. — P. 439—456.
11. Hronovsky L., Anastasiades T. F. // *Analyt. Biochem.* — 1979. — Vol. 93. — P. 60—72.
12. Lowden J. A. // *Clin. chim. Acta.* — 1979. — Vol. 93. — P. 409—417.
13. Nelson M. M., Hmory A. E. M. // *Brit. med. J.* — 1970. — Vol. 1. — P. 523—528.

14. O'Brien J. S., Okada Sh., Chen A. et al. // *New Engl. J. Med.* — 1970. — Vol. 283. — P. 15—20.
15. Rao G. J., Yang K. // *Amer. J. hum. Genet.* — 1983. — Vol. 35, N 6. — P. 51-A.
16. Vamos E., Liebaers I., Bousard N. et al. // *J. Inher. Metab. Dis.* — 1981. — Vol. 4. — P. 103—104.
17. Zlotogora J., Baca C. // *New Engl. J. Med.* — 1984. — Vol. 311. — P. 331—332.

Поступила 12.02.88.

#### BIOCHEMICAL DIAGNOSIS OF MUCOSULFATIDOSIS

T. V. Mirenberg, T. V. Lebedeva, K. D. Krasnopol'skaya, O. B. Bartseva, V. M. Kozlova, V. A. Bakharev

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

Biochemical anomalies in proband involved alterations in the spectrum of glycosaminoglycans (GAG) excreted with urine as well as a decrease in activity of lysosomal sulfatases (arylsulfatases A and B, heparan-N-sulfatase) in homogenates of leukocytes and cultivated fibroblasts. In healthy parents of the proband activity of the sulfatases was lower than in control donors but higher as compared with the proband. Antenatal diagnostics of mucosulfatidosis was carried out in fetus during the repeated pregnancy. The following biochemical anomalies were noted: alteration in the GAG spectrum in amniotic fluid, decrease in activity of lysosomal sulfatases in cultivated cells of the amniotic fluid. The pregnancy lead to a premature birth at 31<sup>st</sup> week of a girl. No alterations were observed in the spectrum of GAG's excreted with urine and in intracellular accumulation of <sup>35</sup>S-GAG in the newborn child. Measurement of sulfatases activity in leukocytes enabled to identify conclusively that the child was a heterozygotic bearer mucosulfatidosis.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1989

УДК 615.355:577.152.311].015.4:612.17].07

С. М. Красовская, Л. В. Платонова, С. Л. Дземешкевич

#### ИЗУЧЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ БИОПРОТЕЗОВ КЛАПАНОВ СЕРДЦА К ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ КОЛЛАГЕНАЗЫ И ЭЛАСТАЗЫ

Всесоюзный научный центр хирургии АМН СССР, Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Биопротезы клапанов сердца, созданные на основе свиного аортального клапана, завоевали прочное положение в кардиохирургии наряду с другими заменителями, как искусственными, так и биологическими [5, 9]. Успех хирургического вмешательства во многом зависит от долговечности функционирования биопротеза, а долговечность в свою очередь определя-

ется свойствами используемых биоматериалов и качеством их обработки перед имплантацией. В связи с этим мы изучали устойчивость ткани аортального клапана свиньи на различных этапах подготовки к имплантации в отношении протеолитического воздействия специфических ферментов — коллагеназы и эластазы — с учетом того факта, что основными составля-

ющими биологической части протеза клапана сердца являются коллаген и эластин [18].

### Методика

В работе использовали панкреатическую эластазу свиньи (Ferak, ГДР), бактериальную коллагеназу (Fluka, Швеция). Степень загрязнения препарата эластазы трипсином оценивали, используя этиловый эфир N-бензонил-L-аргинина (Koch-Light, Англия) [7]; присутствия трипсина в препарате панкреатической эластазы не выявлено. Удельная активность панкреатической эластазы по гидролизу нитрофенилового эфира N-бутилоксикарбонил-L-аланина (Reanal, ВНР) составляла 840 имоль на 1 мг препарата [23]. Очистку бактериальной коллагеназы от белковых примесей, выявленных в препарате при диск-электрофорезе, проводили гель-фильтрацией на сефадексе G-100. Активность коллагеназы, которую определяли, используя меченый коллаген [1], после хроматографической очистки составляла 40 000 имп/мин на 1 мг препарата.

Материалом для исследования служили ацетоновые порошки, полученные из следующих тканей: нативной ткани аортального клапана свиньи (Н-ткань); ткани аортального клапана, обработанного террилитином (Т-ткань); ткани клапана, обработанного террилитином и глутаровым альдегидом (ТГА-ткань; собственно биологическая часть протеза) по методике [4]. Кроме того, в работе использовали ацетоновые порошки нативного эластина из шейной связки крупного рогатого скота, полученного по методу [14]; эластина, обработанного глутаровым альдегидом, а также измельченные пленки нативного коллагена из кожи теленка [3] и коллагена, обработанного глутаровым альдегидом. Ацетоновые порошки ткани клапана и эластина получали таким образом: измельченную ткань последовательно заливали 3 объемами (по массе) этанола и ацетона на 1 ч, высушивали при 37°C и измельчали на шаровой мельнице.

Изучали кинетику взаимодействия различных количеств Н-, Т- и ТГА-тканей аортального клапана свиньи, коллагена и эластина с коллагеназой и эластазой в возрастающих концентрациях соответственно путем определения количества белка методом [17] и аминокислотного азота методом [12] в гидролизатах, полученных при следующих условиях: 10—300 мг ацетонового порошка из ткани клапана, 5—20 мг эластина или 5—20 мг коллагена суспендировали в 2 мл 0,05 М боратного буфера (рН 8,5). Добавляли ферменты в количестве 10—300 мкг эластазы и 5—10 мкг коллагеназы; пробы инкубировали при 37°C 5—120 мин, центрифугировали при 6—7 тыс. об/мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость исследовали сразу после центрифугирования, а также после обработки 5% ТХУ с повторным центрифугированием при 9—10 тыс. об/мин в течение 20 мин и последующей нейтрализацией 0,5 М NaOH (ТХУ-фильтрат).

### Результаты и обсуждение

Длительное функционирование биопротеза клапана сердца требует высо-

кой биохимической стабильности и биомеханической прочности коллагеновых и эластиновых волокон. Такие факторы, как возраст и тип коллагена, степень его гидратации, связь с протеогликанами, вносят определенный вклад в процесс ферментативной деградации волокон [8]. Клеточные структуры, водорастворимые белки и протеогликаны усиливают иммунный ответ на имплантацию биопротеза, что составляет основу для разрушения клапана, клинически проявляющегося дисфункцией протеза [15, 21]. Поэтому разрушение и удаление клеточных структур и водорастворимых белков из ткани биопротеза клапана сердца является вполне обоснованным этапом подготовки биоткани к имплантации. Наиболее приемлемый способ достижения этой цели — обработка ткани ферментами, разрушающими клеточные структуры, с последующей экстракцией продуктов протеолиза [2, 11]. В то же время ферментативное разрушение протеогликанового цементирующего матрикса вокруг волокон приводит к усилению деградации коллагеновых и эластиновых волокон [10]. Исходя из этого, были предложены такие условия ферментативно-химической обработки свиных аортальных клапанов ферментным препаратом террилитином, при которых клеточные структуры разрушались и удалялись, а коллагеновые и эластиновые волокна, окруженные протеогликановым матриксом, оставались сохраненными [6]. Затем биопротезы структурировали в растворах глутарового альдегида с целью повышения их биохимической стабильности и биомеханической прочности [4].

Нами изучен протеолитический гидролиз панкреатической эластазой и бактериальной коллагеназой ткани аортального клапана свиньи на 3 этапах его подготовки к имплантации (Н-, Т- и ТГА-ткани) с учетом того, что содержание коллагена и эластина во время ферментативно-химической обработки ткани клапана не изменяется. Показано, что под действием обеих протенназ из Н-ткани выделялись значительно большие количества белка, чем из Т- и ТГА-тканей (рис. 1). Так, через 10 мин инкубации Т-ткани как с эластазой, так и с коллагеназой в гидролизатах определялось соответственно в 1,7—3 раза меньше белка

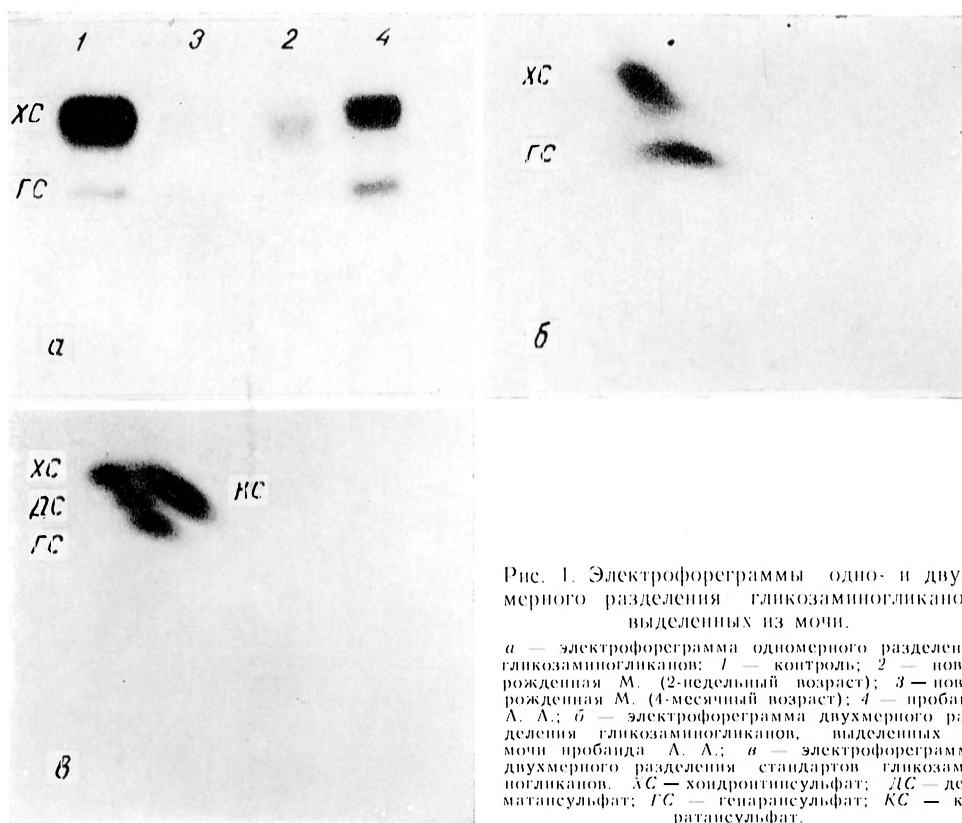


Рис. 1. Электрофореграммы одно- и двух- мерного разделения гликозаминогликанов, выделенных из мочи.

*a* — электрофореграмма одномерного разделения гликозаминогликанов: 1 — контроль; 2 — новорожденная М. (2-недельный возраст); 3 — новорожденная М. (4-месячный возраст); 4 — пробаид А. А.; *б* — электрофореграмма двухмерного разделения гликозаминогликанов, выделенных из мочи пробаид А. А.; *а* — электрофореграмма двухмерного разделения стандартов гликозаминогликанов. ХС — хондритинсульфат; ДС — дерматансульфат; ГС — гепарансульфат; КС — кератансульфат.

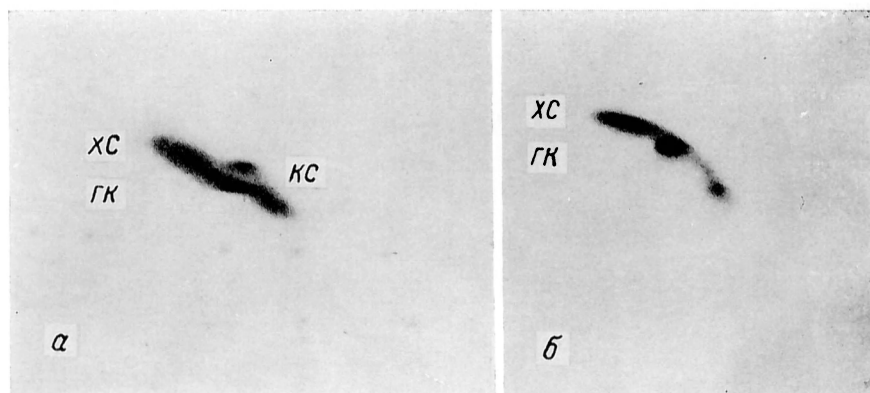


Рис. 2. Электрофореграммы двухмерного разделения гликозаминогликанов, выделенных из амниотической жидкости.

*a* — плод М. (21 нед беременности); *б* — контроль (19 нед беременности). ГК — гиалуроновая кислота. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.



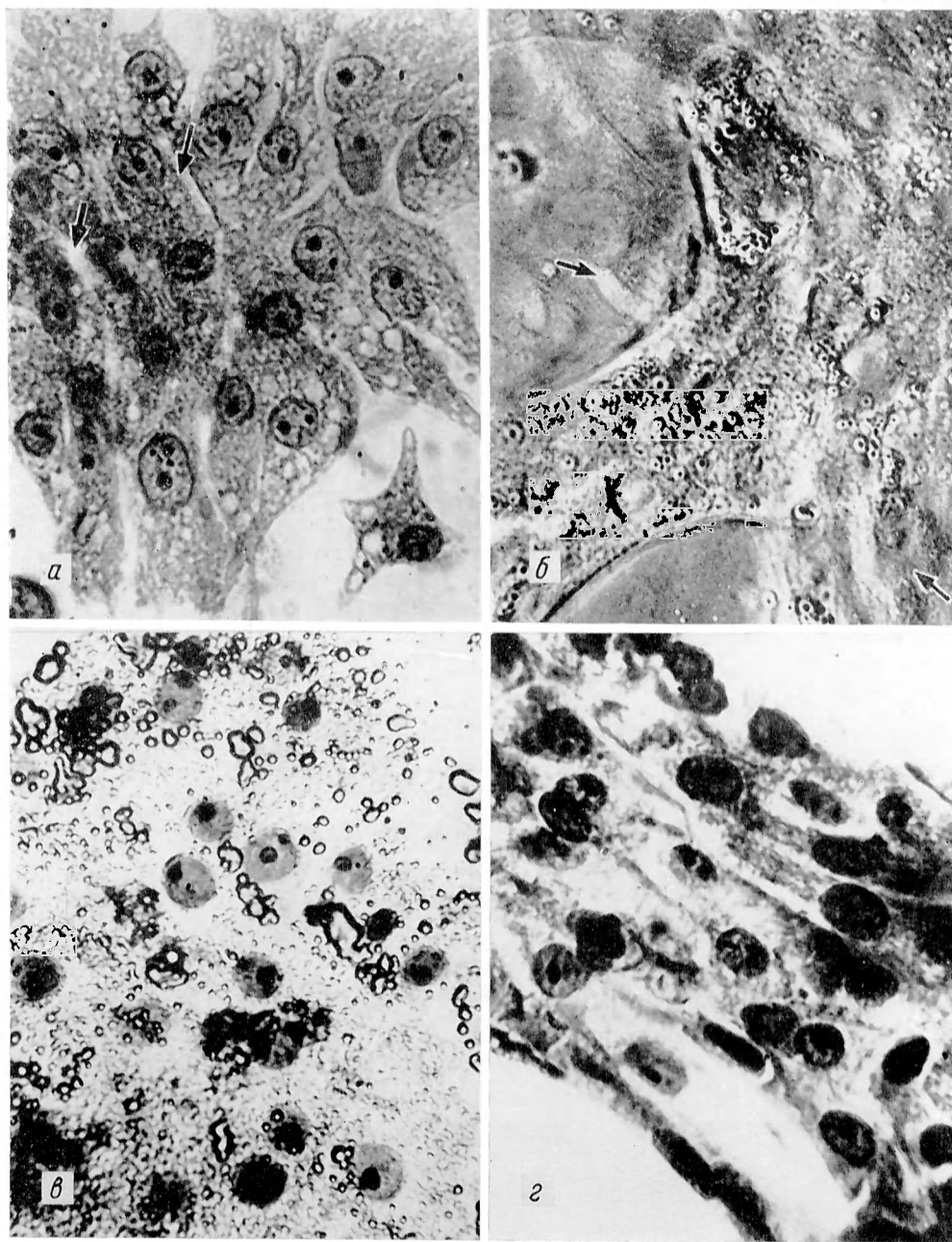


Рис. 1. Первичная культура гепатоцитов новорожденных крыс (об. 40, ок. 10).  
 а — колония гепатоцитов, окрашенных гематоксилином по Бемеу; стрелками указаны желчные каналы; б — фазово-контрастная микроскопия; стрелками указаны непаренхимные клетки; в — включения нейтрального жира, выявляемые при окрашивании суданом черным; г — формирование печеночной балки в первичной культуре гепатоцитов.

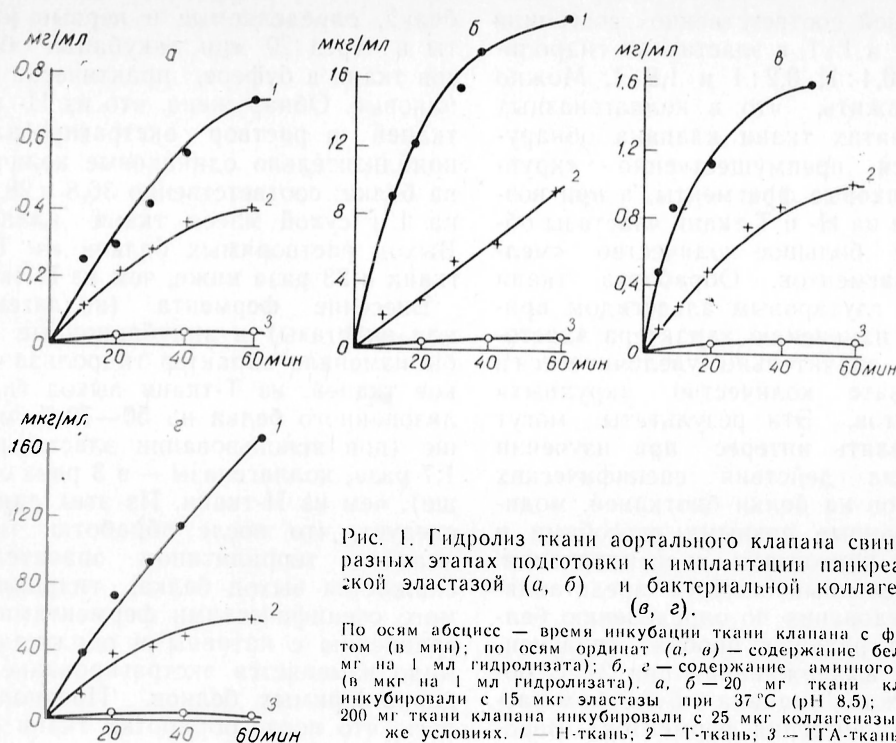


Рис. 1. Гидролиз ткани аортального клапана свиньи на разных этапах подготовки к имплантации панкреатической эластазой (а, б) и бактериальной коллагеназой (в, г).

По осям абсцисс — время инкубации ткани клапана с ферментом (в мин); по осям ординат (а, в) — содержание белка (в мг на 1 мл гидролизата); б, г — содержание аминокислот (в мкг на 1 мл гидролизата). а, б — 20 мг ткани клапана инкубировали с 15 мкг эластазы при 37°C (рН 8,5); в, г — 200 мг ткани клапана инкубировали с 25 мкг коллагеназы в тех же условиях. 1 — Н-ткань; 2 — Т-ткань; 3 — ТГА-ткань.

и в 2—5 раз меньше аминокислот по сравнению с Н-тканью (см. таблицу). ТГА-ткань еще более слабо подвергалась гидролизу: в эластазных гидролизатах определено в 10 раз меньше белка и в 22 раза меньше аминокислот по сравнению с Н-тканью; в коллагеназных гидролизатах ТГА-ткань определено белка в 42 раза, а аминокислот — в 17 раз меньше по сравнению с гидролизатами Н-ткань.

Таким образом, полученные данные позволяют сделать вывод о значительной устойчивости ТГА-ткань (биологического протеза аортального клапана) к эластолизу и коллагено-

лизису по сравнению с нативной тканью аортального клапана и тканью, обработанной трилитинном.

Обработка ферментных гидролизатов тканей ТХУ и определение в ТХУ-фильтратах содержания белка позволили выявить долю «мелких» фрагментов белков, образующихся в процессе их гидролиза, катализируемого протеиназами. Соотношения количеств «крупных» (определенных как разница между содержанием белка в гидролизатах тканей, не обработанных ТХУ, и в ТХУ-фильтратах) и «мелких» (содержание белка в ТХУ-фильтратах; см. таблицу) фрагментов в коллагеназных гидролизатах Н-, Т- и

Содержание белка и аминокислот в гидролизатах ткани (в мг на 1 г сухой ткани) аортального клапана свиньи, инкубированного с панкреатической эластазой или бактериальной коллагеназой

Исследуемый материал	Эластаза		Коллагеназа			
	белок		аминовый азот	белок		аминовый азот
	без обработки ТХУ	с ТХУ		без обработки ТХУ	с ТХУ	
Н-ткань	22,5	15,8	0,90	8,4	2,6	0,34
Т-ткань	13,2	10,6	0,18	2,4	1,1	0,18
ТГА-ткань	2,2	0,8	0,04	0,2	0,1	0,02

Примечание. Условия инкубации: 10 мин; 37°C, рН 8,5; объем 2 мл. Пробы содержали 20 мг ткани клапана и 15 мкг эластазы или 200 мг ткани клапана и 25 мкг коллагеназы. Приведенные средние арифметические величины содержания белка или аминокислот (за вычетом контроля) по данным 6 параллельных измерений.

ТГА-тканей соответственно составили 2:1, 1:1 и 1:1, в эластазных гидролизатах — 0,4:1; 0,2:1 и 1,8:1. Можно предположить, что в коллагеназных гидролизатах ткани клапана обнаруживаются преимущественно «крупные» белковые фрагменты, а при воздействии на Н- и Т-ткани эластазы образуется большое количество «мелких» фрагментов. Обработка ткани клапана глутаровым альдегидом приводит к изменению характера эластолитизиса — значительно увеличивается в гидролизате количество «крупных» фрагментов. Эти результаты могут представлять интерес при изучении механизма действия специфических ферментов на белки биотканей, модифицированные разными способами в процессе подготовки к имплантации.

Определенный интерес представляют исследования по определению белка в контрольных пробах (полученных при выдерживании при 37°C образцов ткани клапана в буферном растворе без внесения ферментов). Вероятно, при инкубации образцов ткани в этих условиях в буферный раствор экстрагируются водорастворимые белки и пептиды. Установлено, что эти белки переходят в раствор очень быстро — в процессе суспендирования порошка ткани в буфере. Количество

белка, определяемые в первые минуты и через 20 мин инкубации образцов ткани в буфере, практически одинаковые. Обнаружено, что из Н- и Т-тканей в раствор экстрагировались приблизительно одинаковые количества белка: соответственно 36,8 и 28,5 мг на 1 г сухой массы ткани клапана. Выход растворимых белков из ТГА-ткани в 23 раза ниже, чем из Н-ткани.

Внесение фермента (коллагеназы или эластазы) в инкубационные пробы изменяло характер гидролиза белков тканей: из Т-ткани выход гидролизованного белка на 50—70 % меньше (при использовании эластазы — в 1,7 раза, коллагеназы — в 3 раза меньше), чем из Н-ткани. Из этих данных следует, что после обработки ткани клапана террилитинном значительно снижается выход белка, гидролизуемого специфическими ферментами, по сравнению с нативными образцами и мало изменяется экстрагирование водорастворимых белков. Предполагалось, что после обработки ткани аортального клапана свиньи террилитинном и отмывки его растворами солей и в проточной воде, приводящих к значительному разрушению клеточных структур и удалению продуктов протеолиза и водорастворимых белков, коллагеновые и эластиновые волокна становятся более уязвимыми к действию специфических протеиназ, в результате чего степень гидролиза ферментами такой ткани по сравнению с нативным материалом должна возрастать. Таким образом, причины снижения степени гидролиза Т-ткани по сравнению с Н-тканью, выявленные нами, остаются неясными и требуют дальнейшего изучения.

В литературе имеются непомогочисленные сведения о неполноценности дублирования эластина растворами глутарового альдегида [20]. Наши данные по изучению степени деградации образцов ТГА-ткани под действием коллагеназы и эластазы этого не подтвердили. Вероятно, процесс дублирования фибриллярных белков тканей клапана диальдегидами отличается от такового очищенных препаратов эластина и коллагена в силу того, что сохранившийся в тканях протеогликановый матрикс также связывается с глутаровым альдегидом, что может затруднять пропускание специфических ферментов к местам их взаимодействия с во-

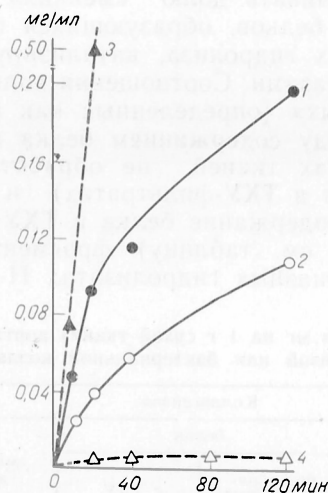


Рис. 2. Гидролиз эластина панкреатической эластазой (1, 2) и коллагена бактериальной коллагеназой (3, 4).

По оси абсцисс — время инкубации эластина или коллагена с ферментом (в мин); по оси ординат — содержание белка (в мг на 1 мл гидролизата). 1, 2 — 10 мг эластина (соответственно нативного и обработанного глутаровым альдегидом) инкубировали с 15 мкг эластазы при 37°C (рН 8,5); 3, 4 — 20 мг коллагена (нативного и обработанного альдегидом) инкубировали с 5 мкг коллагеназы в тех же условиях.



локнами. Кроме того, искусственно формируемые глутаровым альдегидом поперечные связи с белками, как и разрушение ткани террилитином, освобождающее новые реакционно способные группы, способные взаимодействовать между собой и с альдегидом, могут быть причиной конформационных изменений в молекуле субстрата, которое снижает чувствительность фермента в отношении модифицированного субстрата, что иногда расценивается как повышение устойчивости последнего к протеолизу [13].

Для уточнения вопроса о качестве дублирования эластина глутаровым альдегидом мы предприняли изучение устойчивости эластина (нативного и структурированного в глутаровом альдегиде) к воздействию эластазы в сравнительном аспекте со степенью протеолиза коллагена коллагеназой (рис. 2). При протеолитическом расщеплении эластина (гидролизаты изучали на содержании белка методом Лоури) через 20 мин инкубации с эластазой образцов нативного эластина в гидролизатах определялось всего в 2,9 раза больше белка, чем в пробах, содержащих эластин, обработанный глутаровым альдегидом. Для сравнения приводим данные исследования, выполненного с коллагеном. Коллаген, обработанный диальдегидом, оказался в 250 раз устойчивее к протеолизу коллагеназой по сравнению с нативным коллагеном (см. рис. 2). Наши исследования, выполненные на очищенных препаратах эластина, подтвердили данные литературы о слабом воздействии глутарового альдегида на эластин, что указывает на необходимость дополнительного воздействия на эластин ткани клапана с целью повышения его структурной стабильности.

Мы использовали высокие концентрации ферментов — 0,125 мг бактериальной коллагеназы и 0,75 мг панкреатической эластазы на 1 г сухой ткани, при которых ткани биопротезов проявляли довольно высокую устойчивость к протеолизу. Однако *in vivo* могут присоединяться множественные повреждающие факторы — инфекция, плазменные и тканевые протеиназы, механические нагрузки и др. [19, 22]. В исследованиях *in vitro* показана патогенетическая роль многих обладающих эластолити-

ческой и коллагенолитической активностями ферментов из разных источников — макрофагов, нейтрофилов, тромбоцитов, микроорганизмов (*Ps. aeruginosa*, *actinomyces* и др.) [16, 24]. Хотя результаты исследований *in vitro* довольно сложно экстраполировать на поведение биопротеза в организме, все же изучение устойчивости тканей клапанов после различной обработки позволяет в некоторой степени прогнозировать их долговечность.

Таким образом, результаты проведенного исследования явились биохимическим подтверждением достижения определенной структурной стабильности биопротеза клапана сердца в процессе ферментации террилитином с последующей обработкой растворами глутарового альдегида. Такая обработка ткани клапана в значительной мере снижает выход водорастворимых белков и стабилизирует волоконистые структуры клапана, особенно коллагена, по сравнению с нативной тканью. Все это позволяет надеяться на уменьшение риска иммунного ответа и, следовательно, на уменьшение частоты развития дисфункции протеза.

Выявленный недостаточный структурирующий эффект глутарового альдегида в отношении эластина диктует необходимость поиска дополнительных эффективных в этом отношении агентов.

Определение белка методом Лоури в гидролизатах образцов биоткани с различной обработкой при взаимодействии со специфическими протеиназами является достаточно информативным тестом, позволяющим судить о структурной стабильности материала при той или иной обработке перед имплантацией.

Авторы благодарят Т. И. Балаевскую за определение активности бактериальной коллагеназы и Т. Г. Руденко за предоставление препаратов очищенного коллагена, полученных в отделе ЦНИЛ по изучению и применению коллагена в медицине I ММИ им. И. М. Сеченова.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Берман А. Е., Бычкова В. В., Морозевич Г. Е., Мазуров В. И. // *Вопр. мед. химии*. — 1984. — № 1. — С. 108—112.

2. Дронов А. Ф., Истратов Л. П., Дземешкевич С. Л. и др. Способ изготовления коллаген-эластических тубов для пластики сосудов. А. с. 559701 СССР.
3. Коллагенопластика в медицине / Под ред. В. В. Коваиова, И. А. Сыченикова. — М., 1978.
4. Красовская С. М. Экспериментальное обоснование применения клапанных ксенобиопротезов нового типа: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 1981.
5. Малиновский Н. Н., Дземешкевич С. Л. // Хирургия. — 1981. — № 9. — С. 114—124.
6. Малиновский Н. Н., Константинов Б. А., Дземешкевич С. А. и др. // Там же. — 1982. — № 8. — С. 84—88.
7. Нартикова В. Ф., Пасхина Т. С. // Биохимия. — 1970. — Т. 35. — № 1. С. 185—195.
8. Boren C., Roon A., Moore W. // Surgery. — 1972. — Vol. 83. — P. 382—391.
9. Carpentier A., Lemaigre G., Roberts L. et al. // J. thorac. cardiovasc. Surg. — 1969. — Vol. 58. — P. 467—477.
10. Dingle J. T. // Ann. rheum. Dis. — 1979. — Vol. 38. — P. 201—214.
11. Jacolson J., Haimon M. // Recent Trends in Cardiovascular and Thoracic Surgery / Ed. J. B. Borman. — New York, 1979. — P. 207—213.
12. Jemm B. W., Cocking E. C. // Analyst. — 1955. — Vol. 80. — P. 209—214.
13. Kagan H. M., Jordan R. E., Lerch R. M. et al. // Advanc. exp. Med. Biol. — 1977. — Vol. 79. — P. 189—207.
14. Lansing A. J., Dempsey E. W., Rosental T. B., Olex M. // Anat. Rec. — 1952. — Vol. 114. — P. 555—567.
15. Levy R., Schoen E. L. // Amer. J. Path. — 1983. — Vol. 113. — P. 143—155.
16. Lonky S., Wohe H. // Biochemistry (Wash.). — 1983. — Vol. 22. — P. 3714—3720.
17. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
18. Neuman R. E., Logan M. A. // Ibid. — 1950. — Vol. 186. — P. 549—556.
19. Rabago C., Martinell J., De Vega H. et al. // Long-Term Results of the Hancock's Valve. — San-Francisco, 1979. — P. 94—99.
20. Rucker R. B., Murray J. // Amer. J. clin. Nutr. — 1978. — Vol. 31. — P. 1221—1236.
21. Schoen E., Levy R. // Cardiol. Clin. — 1984. — Vol. 2. — P. 717—739.
22. Silver M., Pollock J., Silver M. P. et al. // Amer. J. Cardiol. — 1980. — Vol. 45. — P. 685—689.
23. Visser L., Blout E. // Biochim. biophys. Acta. — 1972. — Vol. 268. — P. 257—260.
24. Werb Z., Banda M. J., Mc Kerrow J. H., Sandhaus R. A. // J. invest. Derm. — 1982. — Vol. 79, Suppl. 1. — P. 154S—159S.

Поступила 02.11.88

# RESISTANCE OF HEART VALVE BIOPROSTHESIS TO PROTEOLYTIC HYDROLYSIS CATALYZED BY COLLAGENASE AND ELASTASE

S. M. Krasovskaya, L. V. Platonova, S. L. Dzemeshkevich

All-Union Research Centre of Surgery; Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Proteolytic destruction of pig aortal valves was studied at various steps of their preparation to implantation (native tissue, the tissue treated with terrylytine as well as with terrylytine and glutaric aldehyde) using pig pancreatic elastase and bacterial collagenase. The rate of the tissue destruction was estimated by means of monitoring an increase in content of protein and amino nitrogen in the hydrolysates. The tissue treated with terrylytine and glutaric aldehyde was 10-40-fold more resistant to proteolysis as compared with native heart valve tissue. Inadequate stabilizing effect of glutaric aldehyde on elastin, as compared with that on collagen, was found, when proteolysis of native and modified with glutaric aldehyde elastin from bovine cervical ligament and of calf skin collagen was studied using elastase and collagenase, respectively.

© А. А. ЛИНЧЕВСКАЯ, Л. А. КОНДРАТЬЕВА, 1989

УДК 616.155.1:576.314]-02:615.832.9]-092.9-07

А. А. Линчевская, Л. А. Кондратьева

## ВЛИЯНИЕ ГИПОТЕРМИИ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ БЕЛЫХ КРЫС

Таджикский медицинский институт, НИИ эпидемиологии и гигиены, Душанбе

Гипотермия, используемая на фоне общего наркоза, широкоприменяется в хирургии. Однако данные литературы не позволяют получить полное представление о характере повреждений органов и тканей в условиях гипотермии, последствия которой в виде нарушения как общей, так и местной гемодинамики описаны рядом исследователей [10—12]. Лишь сравнительно

недавно была предпринята попытка выяснить роль эритроцитов в генезе нарушений гемодинамики, особенно на уровне микроциркуляции [3, 22].

В настоящей работе проведено исследование нарушений в мембранах эритроцитов белых крыс в условиях гипотермии и изучена связь этих нарушений с функциональными свойствами мембран эритроцитов.

Влияние гипотермии на компоненты мембран эритроцитов (в мг на  $10^{10}$  клеток) белых крыс и их фосфолипидный состав (в % от общих фосфолипидов;  $M \pm m$ ;  $n=8$ )

Показатель	Нормотермия	Гипотермия	$p$
Белок	$8,7 \pm 0,4$	$9,0 \pm 0,18$	$<0,5$
Холестерин	$2,5 \pm 0,3$	$2,0 \pm 0,1$	$<0,01$
ФЛ	$4,2 \pm 0,18$	$3,8 \pm 0,2$	$<0,02$
ФХ	$47,5 \pm 2,1$	$36,4 \pm 3,5$	$<0,05$
ЛФХ	$3,0 \pm 0,8$	$8,4 \pm 0,3$	$<0,001$
ФЭА	$19,4 \pm 1,5$	$14,2 \pm 1,3$	$<0,02$
Сфингомиелин	$15,2 \pm 1,7$	$18,4 \pm 1,0$	$<0,1$
Фосфатидилинозит	$3,5 \pm 0,7$	$8,8 \pm 0,5$	$<0,001$
ФС	$6,3 \pm 0,6$	$4,8 \pm 0,2$	$<0,05$
Фосфоглицериды	$5,1 \pm 1,6$	$9,0 \pm 1,1$	$<0,05$

Опыты выполнены на белых беспородных крысах-самцах массой 160—200 г, которых содержали на рационе вивария. Для моделирования охлаждения животных помещали в холодильную камеру ( $-7^\circ\text{C}$ ) в изолированных клетках при ограничении подвижности сроком на 1 ч. У подошвенных и интактных крыс после декантации собирали цитратную кровь в мерные центрифужные пробирки и определяли упругую деформацию эритроцитов (УДЭ) [15]. Выделение эритроцитов из крови и получение их мембран осуществляли по методу [11]. Белок определяли по Лоури [19], липиды из мембран экстрагировали хлороформ-метанольной смесью по Фольчу [16]. Для определения холестерина (ХС) [13], фосфолипидов (ФЛ) [6], пезестерифицированных жирных кислот (НЭЖК) [14] и анализа фосфолипидного состава использовали метод тонкослойной хроматографии на силикагеле. ФЛ проявляли с помощью кристаллического йода, пятна соскребали в пробирки с 0,7 мл смеси концентрированной серной и хлорной кислот в соотношении 1:1, сжигали на песчаной бане до обесцвечивания и определяли количество фосфора в образцах. О степени и интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) в мембранах эритроцитов крыс судили по образованию ТБК-активного соединения (ТБК — 2-тиобарбитуровая кислота) — спонтанного и индуцированного [7] и по количеству диеновых конъюгатов (ДК) — первичных продуктов ПОЛ [20]. Перекисную резистентность эритроцитов (ПРЭ) определяли по методу [17]. Полученные данные обработаны статистически с использованием критерия  $t$  Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

При гипотермии содержание белка в мембранах эритроцитов не изменялось (табл. 1). Вместе с тем имело место достоверное уменьшение содержания липидных компонентов — ХС и ФЛ. Изучение отдельных ФЛ в мембранах эритроцитов показало, что под влиянием гипотермии происходят существенные изменения количества почти всех индивидуальных ФЛ. Так, содержание одного из основных ФЛ — фосфатидилхолина (ФХ) под влиянием гипотермии достоверно снижалось. В то же время выявлено существенное повышение уровня другого ФЛ — лизофосфатидилхолина (ЛФХ), который тесно взаимосвязан с ФХ. По-видимому, это является следствием активации фосфолипазы  $A_2$ , активность которой повышается при любой стрессовой ситуации [9, 18]. Подтверждением активации фосфолипазы  $A_2$  является и нарастание уровня НЭЖК в мембранах эритроцитов в нашем эксперименте (табл. 2).

Остальные фракции ФЛ мембран эритроцитов претерпевали также значительные изменения после воздействия гипотермии. Через 1 ч после холодного воздействия наблюдалось достоверное снижение содержания фосфатидилэтаноламина (ФЭА), фосфатидилсерина (ФС), уровень же сфингомиелина достоверно повышался. Аналогичные результаты по изменению содержания названных фракций ФЛ в мембранах гепатоцитов получены при стрессе, вызванном введением адреналина [4].

Изучение активности ПОЛ в мембранах эритроцитов показало (см. табл. 2), что на первых стадиях перекисного окисления, в частности полиеновых жирных кислот (НЖК), происходят делокализация двойных связей и образование ДК. Система сопряженных двойных связей является чувствительным показателем интенсивности процессов ПОЛ [2]. По нашим данным, концентрация ДК в мембранах эритроцитов при гипотермии повышается в среднем на 27 %, что свидетельствует, по-видимому, о возникновении стрессовой ситуации при охлаждении. Активация процессов ПОЛ является неотъемлемой частью метаболических изменений в организме при стресс-реакции [8].

Что касается конечного продукта ПОЛ — малонового диальдегида (МДА), то интенсивность его накопления в мембранах эритроцитов, как спонтанного, так и индуцированного  $\text{Fe}^{2+}$ , носит более выраженный харак-



Влияние гипотермии на ПОЛ, содержание НЭЖК в мембранах эритроцитов, перекисную резистентность и упругую деформируемость эритроцитов белых крыс ( $M \pm m$ ;  $n=8$ )

Показатель	Нормотермия	Гипотермия	<i>p</i>
ДК, мкмоль на 1 мг белка	0,55±0,09	0,70±0,03	<0,1
МДА, нмоль на 1 мг белка:			
спонтанный	1,83±0,07	2,27±0,01	<0,001
индуцированный Fe <sup>2+</sup>	2,46±0,04	3,61±0,03	<0,001
НЭЖК, мкмоль на 1 мг белка	6,35±0,21	10,98±0,68	<0,001
ПРЭ, % гемолиза УДЭ, мл	6,92±0,65	13,5±0,51	<0,001
	2,42±0,09	2,81±0,1	<0,01

тер (уровень МДА превысил контрольные цифры соответственно на 35 и 47 %).

Показатели интенсификации ПОЛ в мембранах эритроцитов четко коррелируют с ПРЭ. У животных, подвергнутых воздействию гипотермии, отмечается достоверное увеличение гемолиза эритроцитов почти в 2 раза по сравнению с этим показателем у интактных крыс. Такое снижение стойкости эритроцитов при гипотермии, очевидно, обусловлено изменением липидного состава их мембран.

При воздействии холода содержание НЭЖК в мембранах эритроцитов возрастало на 73 %, что, как и повышение уровня ЛФХ, косвенно свидетельствует об активации фосфолипазы А<sub>2</sub>. Наблюдаемое увеличение содержания НЭЖК позволяет предположить, что их уровень отражает общую стресс-реакцию, вызванную «выбросом» адреналина, сдвигом в аденилатциклазной системе с последующей активацией липолиза. В условиях гипотермии повышение теплопродукции, по-видимому, может более эффективно обеспечиваться за счет окисления НЭЖК. Таким образом, компенсаторная интенсификация окисления НЭЖК (как правило, это окисление неферментативное, свободнорадикальное) направлена, очевидно, на сохранение температурного гомеостаза. Наши данные согласуются с результатами других авторов [5], исследовавших кровь больных и собак при охлаждении до 25 °С. Кроме того, по-видимому, под влиянием НЭЖК в мембранах эритроцитов возникают нарушения гидрофобных взаимодействий, приводящие к активации фосфолипаз и сдвигам ПОЛ, что в свою очередь усугубляет изменения в структуре мембраны и находит отра-

жение в снижении деформируемости эритроцитов.

Для определения УДЭ использовали гравитационный метод [15], сущность которого состоит в центрифугировании исследуемого образца крови в мерных центрифужных пробирках. В качестве критерия оценки деформируемости служит слой эритроцитов (в миллилитрах) после центрифугирования. При этом чем больше деформируемость эритроцитов, тем плотнее будет их упаковка после центрифугирования. Так, слой эритроцитов опытных образцов крови составляет 2,81 мл, что на 22 % больше, чем в контроле.

Столь выраженная рыхлость упаковки эритроцитов у охлажденных животных свидетельствует об изменении жидкостно-эластических свойств мембран, потере последними такого определяющего свойства, как текучесть, и нарастании ригидности, низкой деформируемости эритроцитов. Такие эритроциты могут быть основной причиной высокого сопротивления при прохождении ими капилляров, внутренний диаметр большинства которых у различных животных меньше наружного диаметра эритроцитов [21]. Таким образом, проведенные исследования позволяют предположить, что структурные и функциональные изменения мембран эритроцитов тесно взаимосвязаны и что в генезе нарушений гемодинамики существенное значение следует придавать пусковым механизмам алтерации клеточной мембраны.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ануховская Я. Н., Иванкевич С. П., Вендт В. П. // *Вопр. мед. химии*. — 1979. — № 5. — С. 548—553.
2. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М., 1972.

3. Захарова И. Б., Пучиньян Д. М. // Пат. физиол. — 1987. — № 5. — С. 38—41.
4. Карагезян К. Г. Фосфолипиды и их роль в жизнедеятельности организма. — Ереван, 1972.
5. Лацис А. Т., Залцмане В. К., Терентьева Л. А., Волколаков Я. В. // Изв. АН ЛатвССР. — 1975. — № 3. — С. 117—126.
6. Леменовская А. Ф., Коен Я. М., Перевощикова К. Д. // Биохимия. 1976. — Т. 41. — С. 161—164.
7. Майоре А. Я., Берман Э. С. // Гастроэнтерология. — Рига, 1972. — С. 163—165.
8. Меерсон Ф. З. Адаптация, стресс и профилактика. — М., 1981. — С. 162—166.
9. Панин Л. Е. // Медико-биологические аспекты процессов адаптации. — Новосибирск, 1975. — С. 34—45.
10. Сандомирский Б. П., Василевский В. Ю. // Кримиология и кримиология. — Кисв. 1981. — Вып. 9. — С. 96—98.
11. Селезнев С. А., Назаренко Г. И., Зайцев В. С. // Клинические аспекты микроциркуляции. — Л., 1982.
12. Штыко Ю. М., Василевский В. Ю., Сандомирский Б. П. и др. // Пат. физиол. — 1983. — № 3. — С. 81—84.
13. Энгельгард В. А., Смирнова Л. Г. // Пушкина Н. Н. Биохимические методы исследования. — М., 1963. — С. 114—118.
14. Эпштейн Я. А. // Биохимия. — 1940. — № 5. — С. 161—164.
15. Charm S. A., Kurland G. S. Blood Flow and Microcirculation. — New York, 1974.
16. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. // J. biol. Chem. — 1957. — Vol. 226. N 1. — P. 497—509.
17. Jager F. // Nutr. Dieta. — 1968. — Vol. 10. — P. 215—223.
18. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
19. Kissebach A. H. // Proc. roy. Soc. Med. — 1974. — Vol. 67. — P. 665—667.
20. Plazer Z., Guzela L. // Acta biol. med. germ. — 1968. — Bd. 21. — S. 121—124.
21. Smith J. E., Monandas N., Shohet J. B. // Amer. J. Physiol. — 1979. — Vol. 236. — P. 4725—4730.
22. Stoltz J. F. // Clin. Hemorheol. — 1982. — Vol. 2. — P. 163—279.

Поступила 31.01.89

## STRUCTURE-FUNCTIONAL PROPERTIES OF RAT ERYTHROCYTE MEMBRANE IN HYPOTHERMIA

A. A. Linchevskaya, A. A. Kondrat'eva

Tadzhik Medical School, Institute of Epidemiology and Hygiene, Dushanbe

Under conditions of hypothermia intensification of lipid peroxidation, activation of phospholipase  $A_2$  and distinct alteration in lipid metabolism were found in rat erythrocyte membranes. Alterations in membrane composition correlated with a decrease in erythrocyte resistance and their stability to deformation. Erythrocytes with altered structure-functional properties might be responsible for hemodynamic impairments of tissues.

© А. В. ТКАЧЕНКО, 1989

УДК 616.153.937:547.962.3]-07

А. В. Ткаченко

## ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В СИНАПТОСОМАЛЬНОЙ МЕМБРАНЕ ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С БИЛИРУБИНОМ И СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ IN VITRO

Институт биологической физики АН СССР, г. Пущино

Взаимодействие билирубина (БР) с некоторыми клеточными мембранами in vitro сопровождается изменениями активности мембранных ферментов [16, 21]. Такие изменения, особенно заметные при облучении содержащих БР мембранных частиц видимым светом [16], имеют важное значение в патофизиологии встречающегося в педиатрической практике синдрома билирубиновой энцефалопатии и комплекса тех осложнений, которые возникают при проведении фототерапии по поводу данного неотложного состояния [5, 7]. Ранее было установлено, что при взаимодействии синапсомембранной мембраны (СМ) с БР in vitro константа ассоциации составляет

$0,8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$  (рН 7,2, 20 °C). Оптимальный для такого взаимодействия водородный показатель среды составляет 6,8—7,2 [10]. Изменения этого показателя в пределах 7,0—7,6 сопровождаются обратимыми переходами БР соответственно из связанного с СМ в связанное с сывороточным альбумином состояние, если молярное соотношение сывороточного белка и связанного мембранными частицами билидиена не превышает 1:30. Задача данной работы заключалась в дальнейшем изучении взаимодействия СМ с БР и сывороточным альбумином in vitro, выявления функциональных изменений в СМ при таком взаимодействии и активности мембранных Na, K-АТФазы и аце-

тилхолинэстеразы (АХЭ), а также в изучении влияния видимого света ( $\lambda_{\text{max}}$  450—460 нм) на активность этих ферментов в СМ, содержащих БР.

### Методика

В опытах использовали крыс-самцов Вистар массой 180—200 г. Фракцию СМ из гомогената головного мозга и суспензию содержащих БР мембранных частиц получали, как описано ранее [10]. Активность мембранной АТФазы определяли колориметрическим методом [16]. Инкубационная среда (2 мл) при определении АТФазной активности включала 133 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 3,0 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 3,0 мМ АТФ на 0,05 М трис-НСl-буфере  $\text{pH}_{10}^{\circ}$  7,4. В эту среду вводили 60—80 мкл суспензии частиц СМ (120—160 мкг мембранных белков), после чего смесь инкубировали в течение 1 ч при 40 °С. По завершении инкубации в смесь добавляли 0,5 мл 25 % ТХУ и центрифугировали при 100 000 g 30 мин при 0 °С с последующим количественным определением неорганического фосфора в надосадочной жидкости молибдатным методом [1]. Для избирательного подавления активности Na, K-АТФазы в смесь до начала инкубации добавляли уабаин («Serva», ФРГ) до конечной концентрации его  $5 \cdot 10^{-4}$  М. Удельную активность фермента выражали в микромолях неорганического фосфора, накапливавшегося в течение 1 мин инкубации мембранного препарата в указанной смеси в расчете на 1 мг мембранных белков.

Активность АХЭ или холинэстеразы (ХЭ) в препаратах СМ определяли по гидролизу ацетилхолина, ацетил- $\beta$ -метилхолина (мехолина) или бутирилхолина при инкубации мембранных частиц в растворах перечисленных соединений. Инкубационная среда (3 мл) при определении активности АХЭ или ХЭ включала  $(1-3) \cdot 10^{-3}$  М йодида ацетилхолина, йодида мехолина или йодида бутирилхолина («Serva», ФРГ) в 0,05 М трис-НСl-буфере  $\text{pH}_{10}^{\circ}$  7,2. В эту среду вводили 300—400 мкл суспензии частиц СМ (600—800 мкг мембранных белков), после чего смесь инкубировали в течение 30 мин при 37 °С. По завершении инкубации в смесь добавляли 1 мл 25 % ТХУ и центрифугировали при 100 000 g 30 мин при 0 °С с последующим количественным определением ацетилхолина, мехолина или бутирилхолина в надосадочной жидкости колориметрическим методом [17]. Как правило, активность ХЭ, специфическим субстратом которой в данном случае служил бутирилхолин, в препаратах СМ практически отсутствовала. Препараты СМ, в которых активность ХЭ оказывалась значимой, подвергали предварительной инкубации в 0,1 мМ диизопропилфторфосфате («Serva», ФРГ) в течение 5—10 мин, что достаточно для полного избирательного подавления активности этого фермента [29]. Удельную активность АХЭ выражали в микромолях ацетилхолина или мехолина, гидролизованых в течение 1 мин инкубации в расчете на 1 мг мембранных белков. Общее количество мембранных белков в препаратах СМ определяли колориметрически [13].

В стеклянную термостатированную при  $10 \pm 2$  °С ячейку диаметром 40 мм и объемом

5 мл отмеривали 3 мл суспензии СМ (общая концентрация мембранных белков 2,8—3,0 мг/мл) в 0,9 % растворе NaCl на 0,1 М трис-НСl-буфере  $\text{pH}_{10}^{\circ}$  7,2. Высота столба суспензии в ячейке составляла 3—4 мм. В ячейку через закрываемое отверстие в крышке диаметром 2 мм добавляли 1 мл  $10^{-4}$  М БР в 0,9 % растворе NaCl на 0,1 М трис-НСl-буфере  $\text{pH}_{10}^{\circ}$  7,2. Через 30 мин преникубации постоянно перемешиваемой суспензии в темноте при 10 °С (для выравнивания температуры и связывания БР мембранными частицами) ячейку, плотно закрытую крышкой, устанавливали на покрытую алюминиевой фольгой рабочую поверхность магнитной мешалки. Через упомянутое отверстие в крышке отбирали порцию суспензии для определения активности мембранных ферментов, после чего приступали к облучению постоянно перемешиваемой суспензии в ячейке. Для облучения использовали люминесцентную лампу ЛГ-40 с максимумом излучения в области 450—460 нм. Облучаемую ячейку располагали на расстоянии 10—15 см от источника света в постоянном потоке воздуха от вентилятора. Общая продолжительность облучения составляла 1,5—2 ч. Через каждые 15 мин облучения из ячейки отбирали по 60—80 мкл суспензии для определения активности АТФазы или по 300—400 мкл для определения активности АХЭ или ХЭ, смешивая отобранные порции с соответствующими инкубационными средами.

В другой серии опытов изучали эффекты, связанные с присутствием в суспензии СМ, содержащих БР, сывороточного альбумина человека (САЧ), служащего *in vivo* основным транспортером БР в системе циркуляции. В работе использовали САЧ, полученный в Центральном институте гематологии и переливания крови Минздрава СССР (Москва). Концентрацию альбумина и БР определяли спектрофотометрически [10]. Альбумин очищали от связанных им высших жирных кислот и прочих органогидрофобных примесей экстракционным методом [12]. Нужную для работы фракцию мономерного САЧ, очищенного от примесей или неподвергнутого такой очистке, получали либо химическим путем [9], либо электрофорезом в полиакриламидном геле, используя разработанную в Институте биофизики АН СССР конструкцию вертикальной электрофоретической камеры для препаративного фореза. Степень очистки САЧ от органогидрофобных лигандов контролировали колориметрическим методом [28] и ТСХ [22] на пластинках Silufol («Cavalier», ЧССР) с обработкой хроматограмм 0,25 % спиртовым раствором роданина 6 G. Количество высших жирных кислот в исходном препарате САЧ составляло (в расчете на массу белка) 3,6—3,8 моль/моль. После указанной очистки оно не превышало 0,002 моль/моль. В этой серии опытов после 30-минутной преникубации суспензии СМ в присутствии БР непосредственно перед началом облучения в нее добавляли раствор очищенного или неочищенного мономерного САЧ в 0,9 % растворе NaCl на 0,1 М трис-НСl-буфере  $\text{pH}_{10}^{\circ}$  7,2 до его конечной концентрации  $10^{-5}$  М. В контрольных опытах активность АТФазы и АХЭ в мембранных частицах определяли после 30-минутной темновой преникубации и при последующей 2-часовой инкубации в темноте при 10 °С без добавления БР, после добавления БР, после добавления САЧ



к интактным СМ или к СМ, содержащим БР. Кроме того, в контрольных опытах определяли активность ферментов при облучении (после 30-минутной темновой преинкубации) СМ без добавления БР или после добавления САЧ (без БР). Активность ферментов определяли также в суспензии СМ, содержащих БР, после барботирования ее аргоном в течение 2 ч в темноте. В основной серии опытов водородный показатель суспензий в ячейке во время облучения составлял 7,2 при 10 °С. В дополнительных сериях опытов содержимое ячейки перед началом облучения подкисляли до  $\text{pH}_{10}^{\circ}$  6,8 или, напротив, подщелачивали до  $\text{pH}_{10}^{\circ}$  7,8. Результаты экспериментов обрабатывали статистически, оценивая разницу средних арифметических величин с помощью *t*-критерия [6].

## Результаты и обсуждение

Общая АТФазная активность в свежих интактных СМ составляла  $4,5 \pm 0,10$  мкмоль/мин на 1 мг белка, удельная активность Na, К-АТФазы —  $3,6 \pm 0,07$  мкмоль/мин на 1 мг белка, а удельная активность АХЭ —  $10,1 \pm 0,30$  и  $2,8 \pm 0,10$  мкмоль/мин на 1 мг белка по ацетилхолину или по мехолину соответственно. После инкубации мембранных частиц в течение 2 ч в темноте ( $\text{pH}_{10}^{\circ}$  7,2) общая АТФазная активность, активность Na, К-АТФазы и активность АХЭ составляли соответственно  $4,3 \pm 0,18$ ,  $3,4 \pm 0,02$ ,  $9,7 \pm 0,40$  и  $2,9 \pm 0,11$  мкмоль/мин на 1 мг белка. Сходные величины были получены при облучении суспензии интактных СМ без каких-либо добавок или в присутствии САЧ ( $3 \cdot 10^{-5}$  М) в течение 2 ч после 30-минутной темновой преинкубации.

После 30 мин преинкубации в темноте ( $\text{pH}_{10}^{\circ}$  7,2) СМ, содержащих БР ( $3 \cdot 10^{-5}$  М) без САЧ, или СМ, содержащих БР в присутствии САЧ ( $3 \times 10^{-5}$  М), общая АТФазная активность и активность Na, К-АТФазы оказывались пониженными в среднем на 15 % ( $p < 0,01$ ) в сравнении с активностью, определяемой в свежих интактных СМ. Активность АХЭ при этом оставалась без изменений. Последующая инкубация таких проб в темноте в течение 2 ч сопровождалась снижением общей АТФазной активности и активности Na, К-АТФазы в среднем соответственно на 30 и 25 % ( $p < 0,01$ ), а активность АХЭ при этом снижалась в среднем на 6—8 % ( $p < 0,05$ ). При подщелачивании среды до  $\text{pH}$  7,8 до начала 2-часовой инкубации в темноте активность Na, К-АТФазы и АХЭ снижалась в среднем

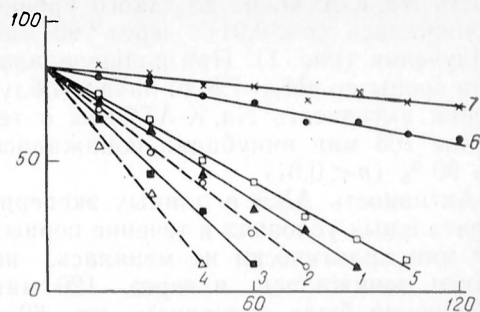


Рис. 1. Общая АТФазная активность и активность Na, К-АТФазы в синантосомальных мембранах, содержащих БР, при облучении их синим светом.

Здесь и на рис. 2: по оси абсцисс — время облучения (в мин), по оси ординат — остаточная ферментативная активность (в %); 1 — активность Na, К-АТФазы ( $\text{pH}$  7,2); 2 — общая АТФазная активность ( $\text{pH}$  7,2); 3 — активность Na, К-АТФазы в присутствии мономерного неочищенного сывороточного альбумина ( $\text{pH}$  7,2); 4 — общая АТФазная активность в присутствии мономерного неочищенного сывороточного альбумина ( $\text{pH}$  7,2); 5 — активность Na, К-АТФазы ( $\text{pH}$  7,8); 6 — активность Na, К-АТФазы в присутствии мономерного неочищенного сывороточного альбумина ( $\text{pH}$  7,8); 7 — активность Na, К-АТФазы в присутствии мономерного сывороточного альбумина, лишенного органических лигандов ( $\text{pH}$  7,8). Каждая точка на графике представляет собой среднюю арифметическую величину из 4 опытов. За 100 % принята ферментативная активность в свежей интактной синантосомальной мембране.

соответственно на 18 и 4 % ( $p < 0,01$ ) в сравнении с ферментативной активностью в свежих интактных СМ. При облучении суспензии СМ, содержащих БР ( $\text{pH}_{10}^{\circ}$  7,2), общая АТФазная активность и активность Na, К-АТФазы уже через первые 15 мин снижались в среднем соответственно на 28 и 30 % ( $p < 0,01$ ). Через 75 мин облучения общая АТФазная активность снижалась в среднем на 90 % ( $p < 0,01$ ), а актив-

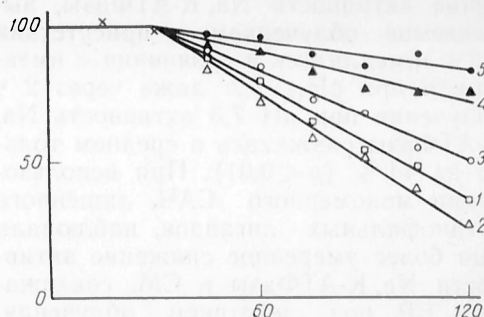


Рис. 2. Активность ацетилхолинэстеразы в синантосомальных мембранах, содержащих БР, при облучении их синим светом.

1 — облучение без добавления сывороточного альбумина ( $\text{pH}$  7,2); 2 — облучение в присутствии мономерного неочищенного сывороточного альбумина ( $\text{pH}$  7,2); 3 — облучение без добавления сывороточного альбумина ( $\text{pH}$  7,8); 4 — облучение в присутствии мономерного неочищенного сывороточного альбумина ( $\text{pH}$  7,8); 5 — облучение в присутствии мономерного сывороточного альбумина, лишенного органических лигандов ( $\text{pH}$  7,8). Каждая точка на графике представляет собой среднюю арифметическую величину из 5—6 опытов. За 100 % принята ферментативная активность в свежей интактной синантосомальной мембране.

ность Na, К-АТФазы до такого уровня понижалась ( $p < 0,01$ ) через 90 мин облучения (рис. 1). При подщелачивании среды до  $pH_{10} \approx 7,8$  до начала облучения активность Na, К-АТФазы в течение 105 мин инкубации понижалась на 90 % ( $p < 0,01$ ).

Активность АХЭ в данных экспериментальных условиях в течение первых 30 мин практически не менялась, но затем понижалась и через 120 мин облучения была в среднем на 60—68 % ( $p < 0,01$ ) ниже активности в свежих интактных СМ (рис. 2). При предварительном подщелачивании среды до  $pH_{10} \approx 7,8$  характер изменения активности АХЭ был практически аналогичным. Активность Na, К-АТФазы и АХЭ в СМ, содержащих БР, в течение 2-часового облучения после барботирования суспензии мембранных частиц ( $pH_{10} \approx 7,2$ ) аргоном практически не отличалась от активности этих ферментов, определяемой после 30-минутной темновой преинкубации суспензии в присутствии БР без барботирования и без последующего облучения.

На рис. 1 видно, что падение общей АТФазной активности и активности Na, К-АТФазы на 90 % при облучении суспензии СМ, содержащих БР, в присутствии мономерного неочищенного САЧ ( $pH_{10} \approx 7,2$ ) происходило быстрее (соответственно за 45 и 60 мин), чем при облучении такой же суспензии без добавления сывороточного белка. После защелачивания суспензии СМ, содержащих БР, до  $pH_{10} \approx 7,8$  падение активности Na, К-АТФазы, вызываемое облучением, в присутствии САЧ замедлялось в сравнении с имевшимся при  $pH_{10} \approx 7,2$ : даже через 2 ч облучения при  $pH_{10} \approx 7,8$  активность Na, К-АТФазы снижалась в среднем только на 44 % ( $p < 0,01$ ). При использовании мономерного САЧ, лишенного органофильных лигандов, наблюдали еще более умеренное снижение активности Na, К-АТФазы в СМ, содержащих БР, под действием облучения. Наиболее отчетливый эффект мономерного очищенного САЧ проявлялся после защелачивания среды до  $pH_{10} \approx 7,8$ .

На рис. 2 видно, что падение активности АХЭ, вызываемое облучением СМ, содержащих БР, при  $pH_{10} \approx 7,2$ , в присутствии мономерного неочищенного САЧ происходило быстрее, чем при облучении без добавления сывороточ-

ного белка. После защелачивания суспензии СМ, содержащих БР, до  $pH_{10} \approx 7,8$  снижение активности АХЭ в присутствии САЧ, напротив, существенно замедлялось в сравнении с происходившим при  $pH_{10} \approx 7,2$ ; через 2 ч облучения при  $pH_{10} \approx 7,8$  удельная активность АХЭ оказывалась пониженной в среднем на 25—30 % ( $p < 0,01$ ).

При использовании мономерного очищенного САЧ характер изменения активности АХЭ при  $pH_{10} \approx 7,2$  и  $7,8$  был сходен с изменением активности Na, К-АТФазы. Наиболее быстрое уменьшение активности Na, К-АТФазы и АХЭ в СМ, содержащих БР, вызываемое облучением их синим светом, наблюдали после закисления среды до  $pH_{10} \approx 6,8$ . В этих же условиях обнаружено наиболее выраженное потенцирующее влияние мономерного неочищенного САЧ на активность исследованных ферментов СМ.

Понижение активности мембранной Na, К-АТФазы при темновой инкубации суспензии СМ в присутствии БР обусловлено, возможно, перестройкой гидрофобного окружения фермента [2] в результате предполагаемого внедрения в мембраны липофильных молекул желчного пигмента [10] и (или) способностью БР прочно связывать щелочноземельные металлы, в частности ионы магния [23], необходимые для активности Na, К-АТФазы [3]. Меньшая выраженность падения активности мембранной АХЭ при этом соответствует данным, согласно которым гидрофобное окружение фермента в составе мембраны имеет вид изолированных вкраплений на его каталитической поверхности [8] и играет сравнительно небольшую роль в его активности [4]. Умеренное снижение активности АХЭ в данных условиях объясняется, возможно, сравнительно медленным процессом димеризации и агрегации молекул БР в гидрофобных вкраплениях с соответствующей медленной перестройкой микросреды, окружающей фермент в мембране.

Отсутствие нормализующего действия САЧ на активность мембранных ферментов СМ, содержащих БР, несмотря на очень высокое сродство этого белка к желчному пигменту, описанное для гомогенных водных сред, обусловлено, возможно, обнаруженным ранее весьма медленным взаимодействием САЧ с БР в гетерогенной систе-

ме [10]. Не исключено, что здесь имеет значение иммобилизация добавляемого САЧ в результате взаимодействия его с мембранными ганглиозидами [27], а также способность САЧ вызывать некоторое понижение активности мембранных ферментов, в частности Na, K-АТФазы [21].

Обнаруженное значительное и сравнительно быстрое уменьшение общей АТФазной активности, активности Na, K-АТФазы и АХЭ, вызываемое облучением суспензии СМ, содержащих БР, синим светом, соответствует данным о существенной фотодинамической активности БР, включенного в состав клеточных мембран [7]. Эта активность сопряжена с перекисным окислением ненасыщенных мембранных липидов, с образованием и накоплением альдегидов, способных оказывать повреждающее действие на клеточную мембрану [15, 24, 26]. Дефицит кислорода, создаваемый барботированием суспензии БР-содержащих СМ аргонном, противодействовал такому перекисидированию в результате торможения фотодинамической активности БР, т.е. его фотоокисления, представляющего собой самовозбуждающийся процесс, для осуществления которого необходимо присутствие синглетного кислорода [18]. Не исключено, что здесь имеет значение то обстоятельство, что в условиях дефицита кислорода БР может функционировать в качестве антиоксиданта [25]. Менее интенсивное снижение активности Na, K-АТФазы и АХЭ при pH 7,8 (в сравнении с уменьшением, происходившим при pH 7,2) вызвано, вероятно, высвобождением желчного пигмента из СМ при защелачивании среды и утратой им фотодинамической активности [7, 10]. Более сильное замедление уменьшения активности мембранных ферментов при добавлении в суспензию СМ, содержащих БР (pH 7,8), мономерного, лишенного органофильных лигандов САЧ или (в меньшей мере) мономерного неочищенного САЧ было обусловлено, возможно, комбинацией связанного с защелачиванием среды высвобождения БР из мембран, стимуляции его высвобождения в результате связывания сывороточным белком и энергичного связывания последним альдегидов, накапливающихся при перекисидировании мембранных липидов. Связыванию альдегидов альбумином могла

бы способствовать достигаемая при pH 7,8 достаточная степень депротонирования  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-групп некоторых свободных от лигандов остатков лизина [19, 20]. Недостаточная степень депротонирования таких групп при pH 7,2 и тем более при pH 6,8 служила, по-видимому, причиной ослабления обнаруженного при pH 7,8 противодействующего эффекта добавления мономерного, лишенного лигандов САЧ. Добавление мономерного неочищенного САЧ при pH 7,2 или 6,8, напротив, потенцировало подавляющее активность мембранных ферментов действие облучения. Не исключено, что это было обусловлено дополнительным к перекисидированию мембранных липидов перекисидированием ненасыщенных жирных кислот в составе сывороточного белка [26] в результате фотодинамической активности БР в составе СМ и сывороточного белка [7] с более интенсивным суммарным накоплением продуктов перекисидирования, повреждающих клеточную мембрану [14, 24, 26].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бабко А. К., Пилипенко А. Т. Фотометрический анализ. — М., 1968.
2. Болдырев А. А., Мельгунов В. И. // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. — М., 1985. — Т. 17.
3. Болдырев А. А., Твердислов В. А. // Молекулярная организация и механизм функционирования Na-насоса. — М., 1978.
4. Голиков С. Н., Розенгарт В. И. Холинэстеразы и антихолинэстеразные вещества. — Л., 1964. — С. 37—38.
5. Далецкий С. Я., Гаврюшов В. В., Матвеев М. П. и др. // Диагностика и лечение неотложных состояний у детей. — М., 1977. — С. 350.
6. Мостковский М. И. Практикум по вариационно-статистической обработке клинического материала. — Ашхабад, 1954. — С. 18—22.
7. Мышкин А. Е., Сахаров В. Н. // Успехи химии. — 1982. — Т. 51, № 1. — С. 72—91.
8. Садыков А. С., Розенгарт Е. В., Абдувахов А. А., Асламов Х. А. Холинэстеразы: Активный центр и механизм действия. — Ташкент, 1976. — С. 146—147.
9. Ткаченко А. В. Способ получения мономерного альбумина плазмы крови: А. с. 1250301 СССР.
10. Ткаченко А. В. // Вопр. мед. химии. — 1987. — № 6. — С. 74—78.
11. Ткаченко А. В., Горин В. П. Экстрактор: А. с. 1281280 СССР.
12. Ткаченко А. В., Емельяненко В. И. Способ очистки альбумина плазмы крови: А. с. 1312947 СССР.
13. Bradford M. M. // Analyt. Biochem. — 1976. — Vol. 72, N 1—2. — P. 248—255.



14. Capaldi R. A. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1973. — Vol. 50, N 3. — P. 656—661.
15. Girotti A. W. // Biochemistry (Wash.). — 1975. — Vol. 14, N 15. — P. 3377—3383.
16. Girotti A. W. // Photochem. Photobiol. — 1976. — Vol. 24, N 6. — P. 532.
17. Hestrin Sh. // J. biol. Chem. — 1949. — Vol. 180, N 1. — P. 249—261.
18. McDonagh A. F. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1971. — Vol. 44, N 6. — P. 1306—1311.
19. Lundblad R. L., Noyes C. M. // Chemical Reagents for Protein Modification. — Boca Raton, 1984. — P. 56, 127.
20. Means G. E., Feeney R. E. // Chemical Modification of Proteins. — San Francisco, 1971. — P. 125, 128.
21. Menken M., Waggoner J., Berlin N. J. // J. Neurochem. — 1966. — Vol. 13, N 11. — P. 1241—1248.
22. Moreau R. A., Huang A. H. C. // Arch. Biochem. — 1979. — Vol. 194, N 2. — P. 422—430.
23. Rutkowski R. B. // Clin. chim. Acta. — 1967. — Vol. 17, N 1. — P. 31—40.
24. Steck Th. L. // J. molec. Biol. — 1972. — Vol. 66, N 2. — P. 295—305.
25. Stocker R., Yamamoto Y., McDonagh A. F. et al. // Science. — 1987. — Vol. 235. — P. 1043—1046.
26. Tappel A. L. // Fed. Proc. — 1973. — Vol. 32, N 8. — P. 1870—1874.
27. Tomasi M., Roda G., Auziello C. et al. // Europ. J. Biochem. — 1980. — Vol. 111, N 2. — P. 315—324.
28. Weigel W. // Pharmazie. — 1956. — Bd 11. — S. 786—791.
29. Wilson B. W., Walker C. R. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1974. — Vol. 71, N 8. — P. 3194—3198.

Поступила 15.04.88

# FUNCTIONAL ALTERATIONS IN SYNAPTOSOMAL MEMBRANE AFTER INTERACTION WITH BILIRUBIN AND BLOOD SERUM ALBUMIN *IN VITRO*

A. V. Tkachenko

Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the USSR, Puschino

A decrease in total activity of ATPase and in specific activity of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase as well as less rapid and distinct decrease in specific activity of acetylcholinesterase were observed in synaptosomal membrane after binding of bilirubin *in vitro*. Irradiation with blue light of the bilirubin-containing membrane particles caused a more distinct decrease in activity of these enzymes. Blood serum albumin, added to the suspension of bilirubin-containing particles of synaptosomal membrane, affected significantly the alterations in activity of membrane-bound enzymes caused by the irradiation. Character of the effect depended on pH of the medium and presence of organophilic ligands in blood serum albumin molecule.

© В. В. ИВАЩЕНКО, 1989

УДК 616.137.3-007.272-036.11-07:616.153.1:577.152.34

В. В. Иващенко

## СОСТОЯНИЕ ПРЕКАЛЛИКРЕИН-КАЛЛИКРЕИНОВОЙ СИСТЕМЫ КРОВИ У БОЛЬНЫХ С ОСТРОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ НЕПРОХОДИМОСТЬЮ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

Донецкий медицинский институт им. М. Горького

Работы по изучению калликреин-кининовой системы (ККС) крови при острой артериальной непроходимости (ОАН) немногочисленны. Известны исследования Л. Д. Чирковой, И. И. Затевахиной, И. Я. Усватовой и соавт. [5, 9, 11], впервые показавших значительную роль ККС в генезе ишемических и постишемических нарушений у больных с острой эмболической артериальной непроходимостью конечностей. Местные и общие проявления острой окклюзии сосудов — раздражение болевых рецепторов, нарушение микроциркуляции, гемодинамические расстройства, увеличение проницаемости сосудистой стенки и как следствие отек — свидетельствуют об активации ККС у больных с ишемией

конечностей [1, 6], возрастающей с увеличением степени последней [10, 12, 13]. Поэтому определение активности ККС у пациентов с ОАН конечностей чрезвычайно важно. В то же время в структуре этиологических факторов ОАН имеется ряд заболеваний, которые сами по себе вызывают изменения в активности ККС, что приходится учитывать при возникновении у них острой артериальной окклюзии.

Задачей настоящего исследования явилось изучение состояния прекалликреин-калликреиновой системы (ПККС) крови у больных с ОАН конечностей в зависимости от характера основного заболевания, вызвавшего тромбоз или эмболию, а также от степени ишемии конечности.

Активность ПККС крови у больных без тромбоэмболических осложнений

Нозологическая единица	Число больных	Прекалли- креин	БРИК	МРИК	ИПАП	ОПАК, ммоль на 1 л азота
		мкмоль аргинина за 1 мин				
Инфаркт миокарда	12	8,0±0,1	1,9±0,05	0,18±0,05*	5,2±0,1	21,4±2,8*
Кардиосклероз	14	8,5±2,0*	1,7±0,05*	0,17±0,02*	5,0±1,0*	34,0±3,3
Облитерирующий атеро- склероз конечностей	15	9,0±1,0*	1,8±0,2*	0,15±0,1*	4,0±1,0*	26,0±4,0*
Ревматизм:						
без признаков актив- ности	15	10,0±1,0*	1,7±0,05*	0,15±0,02*	4,2±0,2*	23,0±3,0*
с активным процессом	45	5,8±1,0	0,5±0,03	0,08±0,04*	9,0±1,0	28,0±0,5
Здоровые доноры	30	9,0±0,2	1,7±0,05	0,17±0,05	4,0±0,1	22,1±2,1

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3 звездочка — отличия от нормы недостоверны ( $p > 0,05$ ).

### Методика

До и после восстановительных операций (1-е сутки послеоперационного периода) обследован 121 пациент с эмболиями магистральных артерий конечностей и 41 больной с острыми тромбозами атеросклеротической этиологии. У 61 больного причиной эмболии был активный ревматический процесс, у 45 — постинфарктный и атеросклеротический кардиосклероз, у 15 — острый инфаркт миокарда.

Эмболия бифуркации отмечена у 20 больных, подвздошной артерии — у 54, бедренной — у 42, подколенной — у 5. Острый тромбоз бифуркации аорты диагностирован у 6 пациентов, подвздошной артерии — у 15, бедренной — у 18, подколенной — у 2.

Среди больных с эмболиями ишемия напряжения, Ia, Ib, IIa степени отмечена у 31 пациента, IIb—IIIa степени — у 57, IIIb степени — у 33. Среди больных с острыми тромбозами ишемия напряжения, Ia, Ib степени отмечена у 14 больных, IIb—IIIa степени — у 19, IIIb степени — у 8. Использовали клиническую классификацию ишемии конечностей, предложенную В. С. Савельевым и соавт. [7] для острой эмболической артериальной непроходимости.

В лечебное учреждение в сроки до 3 ч от момента остро наступившей окклюзии сосуда поступили 10 пациентов, в сроки от 4 до 8 ч — 28, от 9 до 24 ч — 55, в сроки более 24 ч — 69.

Для сравнительной оценки обследовано 30 практически здоровых лиц контрольной группы в возрасте от 20 до 50 лет. Необходимо отметить, что эмболии, как правило, возникают у больных с тяжелыми заболеваниями сердца, у которых имеются выраженные нарушения метаболизма. Для более правильной оценки нарушенного метаболизма кининов у больных с ОАН конечностей мы изучили показатели ПККС крови у 60 пациентов с ревматическим процессом (15 больных без признаков активности, 45 с активным процессом), у 14 больных атеросклеротическим кардиосклерозом с явлениями мерцательной аритмии, у 12 больных острым инфарктом миокарда (без признаков кардиогенного шока и острой сердечной недостаточности) и у 15 больных облитерирующим атеросклерозом нижних конечностей без тромбоэмболических осложнений.

Использованы биохимические методы, предложенные К. Н. Веремсенко [2], позволяющие

охарактеризовать активность калликреинов и ингибиторов калликреинов. Определяли исходную протаминрасщепляющую активность плазмы (ИПАП), характеризующую общий протеолиз крови, содержание прекалликреина, отражающее потенциальную активность плазменного калликреина, а также активность ингибиторов калликреинов — быстро реагирующего и медленно реагирующего (соответственно БРИК и МРИК). Для характеристики протеолиза в качестве дополнительного критерия определяли общую протеолитическую активность крови (ОПАК) методом А. Н. Соринова и В. А. Филова [8].

### Результаты и обсуждение

Для адекватной оценки динамики ПККС крови в процессе лечения больных с ОАН конечностей целесообразным представляется определение ее исходного состояния при заболеваниях, которые могут осложниться ОАН. У больных атеросклеротическим кардиосклерозом и облитерирующим атеросклерозом нижних конечностей существенных изменений показателей, отражающих активность ПККС крови, выявлено не было (табл. 1). В то же время у больных с острым инфарктом миокарда при исследовании в 1-е сутки от начала заболевания (5 пациентов) отмечалась активация ПККС крови, однако при исследовании этих же показателей на 2—3-и сутки они были близки к нормальным. Наряду с активацией калликреина отмечена незначительная тенденция к активации его ингибиторов. В результате гипоксии в некротической зоне миокарда активируются ферментные системы протеолиза, обуславливающие активацию кининовой системы [4]. Снижение кровотока замедляет удаление кининов из пораженного участка. В результате деструкции клеточных мем-

Активность ПКС крови у больных с ОАН

Нозологическая единица	Число больных	Прекал- ликреин	БРИК	МРИК	ИПАП	ОПАК, ммоль на 1 л азота
			мкмоль аргинина за 1 мин			
Инфаркт миокарда	15	6,6±1,0	2,2±0,1	0,44±0,1	7,0±0,1	30,0±0,7
Кардиосклероз	45	7,1±1,1*	2,1±0,1	0,45±0,1	6,6±0,8	29,0±1,5
Ревматизм	61	5,0±1,0	1,8±0,02*	0,18±0,02*	10,0±1,0	26,5±1,5*
Облитерирующий атеро- склероз конечностей	41	8,0±1,0*	2,0±0,03	0,38±0,03	6,0±1,0	26,0±2,0*
Здоровые доноры	30	9,0±0,2	1,7±0,05	0,17±0,05	4,0±0,1	22,1±2,1

бран кининогеназы из участка некроза поступают в общий кровоток, что приводит к генерализованному образованию кининов. В случае чрезмерной активации кининообразующих ферментов освобождается повышенное количество кининов, что приводит к гипотензии и шоку [3]. Нарастание активности ингибиторов калликреинов мы рассматриваем как компенсаторную реакцию, направленную на снижение кининообразующих ферментов при острой ишемии сердечной мышцы. Общая протеолитическая активность сыворотки не изменяется при различных стадиях заболевания.

У больных с отсутствием признаков активности ревматического процесса признаков активации ПКС крови мы не выявили, в то же время у больных с активным ревматическим процессом отмечалась явная активация ПКС крови с угнетением активности ингибиторов калликреина. Обнаруженные изменения мы связываем с особой ролью кининов в развитии воспалительных реакций: гиперемии, повышения сосудистой проницаемости, что так характерно для ревматического процесса.

Возникновение ОАН вызывает активацию калликреина и его ингибиторов у больных всех групп. Наиболее вы-

раженная активность ПКС наблюдалась у больных ревматизмом, что обусловлено, по-видимому, довольно значительной ее исходной величиной у пациентов с активным ревматическим процессом. Если для больных ревматизмом без тромбоэмболических осложнений наряду с активацией калликреина была характерна депрессия его ингибиторов, то присоединение ОАН вызывало дальнейшую активацию калликреина и значительное повышение активности его ингибиторов по сравнению с исходными показателями. Довольно выраженная активация ПКС наблюдалась у больных острым инфарктом миокарда, менее выраженная — у больных кардиосклерозом, а также у больных с острыми тромбозами атеросклеротической этиологии. У всех больных присоединение ОАН конечностей вызывало активацию ОПАК крови (табл. 2).

С увеличением степени ишемии конечности растет активность ПКС крови (табл. 3). В то же время с ростом ишемического поражения конечности появляется тенденция к некоторому угнетению ингибиторов калликреина. После восстановления кровотока в конечности эта направленность особенно четко прослеживается у больных с эмболиями, нарастает актив-

Таблица 3

Активность ПКС крови у больных с эмболиями магистральных артерий в зависимости от степени ишемии конечностей

Степень ишемии напряжения	Число больных	Прекал- ликреин	БРИК	МРИК	ИПАП	ОПАК, ммоль на 1 л азота
		мкмоль аргинина за 1 мин				
Ia, Ib, IIa	31	7,0±0,1	2,0±0,01	0,39±0,01	6,0±0,2	24,3±1,0*
IIb—IIIa	57	6,0±1,0	1,7±0,08*	0,21±0,01*	7,0±0,1	22,0±1,5*
IIIb	33	5,0±0,5	1,4±0,05	0,13±0,01*	8,0±0,1	30,0±1,5
Здоровые доноры	30	9,0±0,2	1,7±0,05	0,17±0,05	4,0±0,1	22,1±2,1

ность ПККС крови, причем это нарастание находится в прямой зависимости от исходной степени ишемии тканей. Вместе с тем с увеличением степени ишемии конечности и ростом активности калликреина прослеживается тенденция к угнетению функции ингибиторов калликреина (табл. 4). У ряда пациентов с высокими окклюзиями и тяжелой ишемией конечности (IIa—IIb степень) наряду с выраженной активацией прекалликреина (2—3 мкмоль аргинина за 1 мин), резким повышением ИПАП (до 15—17 мкмоль аргинина за 1 мин) нами отмечено значительное снижение активности ингибиторов калликреина. Анализ исходов операций у этих больных показал, что в прогностическом отношении эти изменения с точки зрения возможности восстановления жизнеспособности конечности неблагоприятны, несмотря на появление четкой пульсации на артериях стопы. В дальнейшем, как правило, наступает ретромбоз с развитием гангрены или тяжелейший синдром реваскуляризации. Отсутствие компенсаторной активации ингибиторов калликреина при выраженной его активности свидетельствует о крайне тяжелых и, весьма вероятно, необратимых изменениях в конечности. Реваскуляризация в подобных ситуациях может привести к летальному исходу (6 больных).

Определенной зависимости активности ПККС крови от времени, прошедшего с момента остро наступившей окклюзии сосуда, мы не отметили. Сдвиги показателей носили различный характер.

Таким образом, сдвиги в ПККС крови зависят от тяжести ишемического поражения конечности и характера основного заболевания. Поэтому определение активности ПККС крови у больных с ОАН конечностей может служить большим подспорьем при исходной оценке тяжести ишемического повреждения конечности, свидетельствовать о напряженности протеолитических процессов в тканях, что позволяет использовать динамику этих показателей для прогнозирования исхода восстановительных операций.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Буков В. А., Мысловатый В. С., Королев В. В. и др. // Вестн. АМН СССР. — 1975. — № 7. — С. 35—39.

Таблица 4

Активность ПККС крови у больных с эмболиями в зависимости от степени ишемии конечностей до и после восстановительных операций (1-е сутки)

Показатель	Степень ишемии напряжения					
	Ia, Ib (n=31)		IIb—IIla (n=57)		IIIb (n=33)	
	до операции	после операции	до операции	после операции	до операции	после операции
ИПАП	4,0±0,1	8,0±0,1	7,0±0,1	12,0±1,0	8,0±0,1	15,0±0,1
Прекалликреин	9,0±0,2	8,0±0,5	6,0±0,1	5,0±0,1	5,0±0,5	3,0±0,2
БРИК	1,7±0,05	1,3±0,02	1,7±0,08	1,0±0,05	1,4±0,05	0,9±0,001
МРИК	0,17±0,05	0,12±0,01	0,21±0,01	0,14±0,01	0,13±0,01	0,1±0,002
ОПАК, ммоль на 1 л азота	22,1±2,1	24,0±2,0*	22,0±1,5	26,0±2,3*	30,0±1,5	40,0±1,0

Примечание. Звездочка — сравнимые показатели недостоверны ( $p>0,05$ ), n — число обследованных.



2. Веремеенко К. Н. Кининовая система. — Киев, 1977.
3. Гомазков О. А., Комиссарова Н. В., Большакова Л. В. и др. // Кардиология. — 1972. — № 6. — С. 25—31.
4. Гомазков О. А., Большакова Л. В., Шимкович М. В. и др. // Там же. — № 4. — С. 22—28.
5. Затевахин И. И. Хирургия острой эмболизованной артериальной непроходимости: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1975.
6. Сабурова Л. М., Оксман Т. М. // Вестн. АМН СССР. — 1975. — № 7. — С. 5—11.
7. Савельев В. С., Затевахин И. И., Степанов Н. В., Кошкин В. М. // Вестн. хир. — 1974. — № 11. — С. 7—13.
8. Соринов А. Н., Филов В. А. // Лаб. дело. — 1967. — № 5. — С. 304.
9. Усватова И. Я., Затевахин И. И., Чиркова Л. Д. // Клини. мед. — 1975. — № 7. — С. 78—84.
10. Усватова И. Я., Сергеева Н. А., Макарова Л. Д. и др. // Грудная хир. — 1979. — № 6. — С. 10—16.
11. Чиркова Л. Д. Калликреин-кининовая система плазмы крови у больных с острой артериальной непроходимостью магистральных сосудов конечностей: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 1975.
12. Чиркова Л. Д., Исаев М. Р. // Вестн. хир. — 1981. — № 10. — С. 138—141.
13. Чиркова Л. Д., Исаев М. Р. // Хирургия. — 1982. — № 8. — С. 41—45.

Поступила 28.03.88

## THE STATE OF THE BLOOD PREKALLIKREIN-KALLIKREIN SYSTEM IN PATIENTS WITH ACUTE ARTERIAL OBSTRUCTION OF LEGS

V. V. Ivaschenko

Medical School, Donetsk

Distinct activation of the blood prekallikrein-kallikrein system was detected in patients with acute thromboses and embolism of aorta bifurcation and of leg magistral arteries. The rate of activation depended on the form of main disease responsible for acute arterial obstruction as well as on severity of legs ischemic impairments. Measurement of the blood prekallikrein-kallikrein system parameters enabled to evaluate more efficiently the severity of initial steps of legs ischemic impairments in patients with acute arterial occlusions as well as to predict the restorative operations success.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1989

УДК 616.83-07:616.832.9-008.939.624

Т. Г. Васильева, Л. Н. Доброгорская, Л. Н. Краева, В. П. Гончарова

## $\alpha_2$ -МАКРОГЛОБУЛИН В СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ НЕЙРОХИРУРГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Нейрохирургический институт им. А. Л. Поленова, Ленинградский университет

Среди природных ингибиторов протеиназ одно из ведущих мест занимает высокомолекулярный ингибитор протеиназ  $\alpha_2$ -макроглобулин ( $\alpha_2$ -МГ), обладающий широкой субстратной специфичностью и ингибирующий трипсин, химотрипсин, плазмин, калликреин плазмы, тромбин и другие эндопептидазы [4, 9].

Методы количественного определения  $\alpha_2$ -МГ основаны на измерении активности комплекса фермент — ингибитор по отношению к синтетическим субстратам [4, 9].

Известно, что  $\alpha_2$ -МГ легко комплексировается с пептидными гормонами и некоторыми биологически активными пептидными факторами [3, 10]. Взаимодействие макромолекулярных комплексов  $\alpha_2$ -МГ с рецепторным аппаратом клеточной поверхности приводит к изменению функциональной активности клеток, что в свою очередь вместе с взаимодействием с растворимыми клеточными факторами, в том числе с

лимфокинами, способствует модуляции иммунного ответа [5, 7, 12].

Хорошо изучен  $\alpha_2$ -МГ сыворотки крови [2, 8], но данные по  $\alpha_2$ -МГ спинномозговой жидкости (СМЖ) человека немногочисленны [8, 10]. Показано, что  $\alpha_2$ -МГ, несмотря на значительные молекулярные параметры (молекулярная масса 798 000 и гидродинамический радиус 9,35 нм) [6], является «нормальным» компонентом СМЖ человека, что заставляет думать о биологической целесообразности содержания этого белка в ликворе и предполагать его значимость при патологии центральной нервной системы.

Целью настоящего исследования является определение содержания  $\alpha_2$ -МГ в СМЖ при основных нейрохирургических заболеваниях: черепно-мозговой травме различной степени тяжести, внутричерепных опухолях различной гистоструктуры и медикаментозно-резистентных формах эпилепсии, подлежащих хирургическому лечению.

## Методика

Содержание  $\alpha_2$ -МГ в СМЖ определяли, измеряя активность комплекса ингибитора с трипсином по отношению к синтетическому субстрату БАПНА (N-бензоил-аргинин-пара-нитроанилид) по методу [1]. К 0,8 мл СМЖ прибавляли 0,05 мл раствора трипсина, содержащего 60 мкг фермента, и 0,05 мл раствора сывого ингибитора, содержащего 100 мкг последнего. Полученную при диагностической люмбальной пункции СМЖ предварительно центрифугировали для удаления клеточных элементов в течение 30 мин при 3000 об/мин.

## Результаты и обсуждение

Содержание в СМЖ  $\alpha_2$ -МГ было минимальным при наиболее легкой форме черепно-мозговой травмы — сотрясении головного мозга (см. таблицу). Эту группу больных рассматривали в качестве контроля при изучении других нейрохирургических заболеваний.

При ушибе мозга средней степени, морфологически характеризующемся гибелью поврежденных участков мозга и клинически проявляющемся при соединении выраженной очаговой неврологической симптоматики (гемипарез, гемиплегия, афазия), содержание  $\alpha_2$ -МГ в СМЖ было более высоким, чем при сотрясении мозга, хотя наблюдаемая разница и не была статистически достоверной.

Наиболее высокое содержание  $\alpha_2$ -МГ, превышающее в 5 раз средние значения контрольной группы, наблюдалось у больных при тяжелой черепно-мозговой травме, характеризующейся ушибом мозга тяжелой степени и, как правило, сдавлением мозга внутричерепными гематомами, отломками поврежденных костей черепа, быстро развивающимся отеком мозга. Большинство больных этой группы были оперированы в первые часы после госпитализации с целью устранения сдавления мозга (декомпрессивная трепанация черепа, удаление гематом и очагов разможжения). Динамика содержания  $\alpha_2$ -МГ в СМЖ больных этой категории четко отражает целесообразность хирургического вмешательства и его результативность: несмотря на травматичность самой операции, содержание ингибитора уже на 3-и сутки после операции уменьшалось в 2 раза. При наблюдении за уровнем ингибитора в динамике следует отметить, что при тяжелой черепно-мозговой травме даже к 20-м сут-

Содержание  $\alpha_2$ -МГ в СМЖ при нейрохирургических заболеваниях

Условия наблюдения и исследуемый показатель	Черепно-мозговая травма				Внутричерепные опухоли		Эпилепсия
	сотрясение мозга	ушиб средней степени	ушиб тяжелой степени	ушиб тяжелой степени со сдавлением	до операции	после операции	
Сроки исследования, сут	1—2	1—2	1—2	3—5	6—10	11—20	—
Число больных	22	10	17	10	9	8	12
$\alpha_2$ -МГ, г/л ( $M \pm m$ )	0,011 $\pm 0,001$	0,016 $\pm 0,003$	0,056 $\pm 0,007^*$	0,028 $\pm 0,003^{**}$	0,028 $\pm 0,005^{**}$	0,014 $\pm 0,004$	0,035 $\pm 0,004^*$
						0,035 $\pm 0,004^*$	0,025 $\pm 0,001^{**}$
						0,035 $\pm 0,004^*$	0,025 $\pm 0,001^{**}$

Примечание. Достоверность различий по отношению к группе сопоставления: одна звездочка —  $p < 0,01$ , две звездочки —  $p < 0,05$ .

кам после травмы содержание  $\alpha_2$ -МГ в СМЖ не нормализовалось.

При нейроонкологических заболеваниях содержания  $\alpha_2$ -МГ в СМЖ в 2,5 раза превышало соответствующие значения в контроле. Наши наблюдения касаются группы больных с внутрочерепными опухолями различной гистоструктуры, имеющими в основном доброкачественную природу (невриномы, аденомы гипофиза, менингиомы). Хирургическое вмешательство в этих случаях приводило к незначительному увеличению содержания  $\alpha_2$ -МГ с  $0,028 \pm 0,004$  до  $0,035 \pm 0,004$  г/л, что свидетельствует о незначительной травматичности самой операции. В послеоперационном периоде содержание ингибитора в СМЖ оставалось повышенным, составляя в среднем  $0,035 \pm 0,005$  г/л за счет увеличения количества ингибитора у отдельных больных. Значительное повышение уровня  $\alpha_2$ -МГ у некоторых больных этой группы было характерно для случаев продолженного роста опухоли, присоединения воспалительных осложнений или терминальной стадии заболевания. В то же время даже при наличии опухоли с признаками злокачественности при успешном проведении курсов химиотерапии и благоприятном течении заболевания наблюдалось снижение уровня ингибитора в СМЖ.

Повышение содержания  $\alpha_2$ -МГ наблюдалось и в группе больных медикаментозно-резистентными формами эпилепсии — в среднем до  $0,025 \pm 0,004$  г/л по сравнению с  $0,011 \pm 0,001$  г/л в контрольной группе. Подобное повышение уровня ингибитора в СМЖ свидетельствует о наличии деструктивных изменений в мозговой ткани и может служить полезным тестом при отборе больных, резистентных к лекарственной терапии, для последующего хирургического лечения.

При сопоставлении трех рассмотренных нозологических форм нейрохирургических заболеваний следует отметить, что общее клиническое состояние больных в момент обследования при внутрочерепных опухолях и эпилепсии было значительно более легким, чем при черепно-мозговой травме с ушибом мозга тяжелой степени, что соответствовало распределению содержания  $\alpha_2$ -МГ.

Таким образом, можно констатировать, что повышение количества  $\alpha_2$ -МГ в СМЖ у нейрохирургических больных четко коррелирует с тяжестью повреждения мозговой ткани. Определение содержания этого ингибитора в СМЖ может быть объективным критерием тяжести состояния больного, служить полезным тестом при контроле за выбором метода и ходом лечения.

Принято считать, что повышение уровня  $\alpha_2$ -МГ в сыворотке крови, наблюдаемое при различных патологических состояниях, представляет собой компенсаторный механизм ответа на активацию протеолиза. По-видимому, наблюдаемое нами повышение содержания этого ингибитора в СМЖ при нейрохирургических заболеваниях не представляет исключения и отражает активацию протеолиза в мозговой ткани независимо от природы факторов его инициирования. Кроме того, не следует упускать из виду и другие регуляторные механизмы, в которых участвует  $\alpha_2$ -МГ, — комплексирование с биологически активными белково-пептидными факторами и активация функциональной активности некоторых представителей клеточных популяций.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Веремеенко К. Н. Кининовая система. — Киев, 1977.
2. Веремеенко К. Н., Кузим А. И. // Вopr. мед. химии. — 1975. — № 1. — С. 5—13.
3. Adham N. F., Chamakjian Z. H., Mehl J. W., Bethune J. E. // Arch. Biochem. — 1969. — Vol. 132. — P. 175—183.
4. Barret A. J. // Meth. Enzymol. — 1981. — Vol. 80. — P. 737—754.
5. Debanne M. T., Bell R., Dolovich J. // Biochim. biophys. Acta. — 1975. — Vol. 411. — P. 295—301.
6. Felgenhauer K. // Klin. Wschr. — 1974. — Bd. 52. — S. 1158—1164.
7. James K. // Trends biol. Sci. — 1980. — Vol. 5, N 2. — P. 43—47.
8. Laurell C. B. A., Jeppson J. O. // The Plasma Proteins, Structure, Function and Genetic Control / Ed. F. W. Putman. — New York, 1975. — Vol. 1. — P. 229—264.
9. Roberts R. C. // J. Med. — 1985. — Vol. 16. — P. 129—219.
10. Ronne H., Anundi H., Peterson P. A. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1979. — Vol. 87. — P. 330—336.
11. Schliep G., Felgenhauer K. // J. Neurol. — 1974. — Vol. 207. — P. 171—181.
12. Teoderescu M., Chang J. L., Skoscy J. L. // Int. Arch. Allergy. — 1981. — Vol. 66. — P. 1—12.

Поступила 22.04.88

## $\alpha_2$ MACROGLOBULIN FROM CEREBROSPINAL FLUID IN NEUROSURGICAL IMPAIRMENTS

T. G. Vasil'eva, L. N. Dobrogorskaya, L. N. Kraeva, V. P. Goncharova

Institute of Neurosurgery, State University, Leningrad

Content of  $\alpha_2$ -macroglobulin ( $\alpha_2$ -MG) was estimated in cerebrospinal fluid (CSF) of patients with neurosurgical impairments. Minimal content of the globulin was found in patients

with brain concussion ( $0.011 \pm 0.001$  g/L, control group), maximal concentration — in severe craniocerebral trauma with brain contraction ( $0.056 \pm 0.007$  g/L) and moderately increased content of  $\alpha_2$ -MG was detected in intracranial tumors and drug-resistant epilepsy,  $0.028 \pm 0.004$  g/L and  $0.025 \pm 0.004$  g/L, respectively. Alteration in content of  $\alpha_2$ -MG during postoperative period corresponded to clinical state of patients. Estimation of  $\alpha_2$ -MG in CSF might be used as a criterion of brain impairment severity as well as for monitoring the treatment course.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1989

УДК 616.36-018.1-005.4-092.4-07

Т. М. Гончаренко, С. Е. Никулина, О. Ю. Крылова, Н. С. Стволинская, Э. Д. Полякова, Б. Ф. Коровкин

## ПЕРВИЧНАЯ КУЛЬТУРА ГЕПАТОЦИТОВ НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС КАК СИСТЕМА ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ АИОКСИИ И МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ

НИИ медицинской энзимологии АМН СССР, Москва

Первичные культуры гепатоцитов новорожденных крыс представляют собой удобную систему для изучения метаболизма печеночных клеток в контролируемых условиях. Преимуществами использования культуры в качестве модельной системы по сравнению с целым органом являются относительное удобство эксперимента, возможность получения более прямой информации и исключение влияния таких факторов, как гормоны, неконтролируемые субстраты и др. Культивируемые клетки представляют собой однородную популяцию, находятся в одинаковых условиях в отличие от целого органа, а расположение клеток в виде монослоя обуславливает единовременный доступ метаболитов к клеткам.

Гепатоциты новорожденных крыс по сравнению с клетками половозрелых животных обладают рядом преимуществ. Им свойственна большая активность репликации при минимальной комбинации ростовых факторов [5], они отличаются диплоидностью по сравнению с гепатоцитами взрослых животных, имеющими различную ploidy, им свойственна более высокая жизнеспособность и сохранность морфологических характеристик при различных экспериментальных воздействиях [13]. В то же время известно,

что гепатоциты взрослых животных, изначально имеющие биохимические характеристики, свойственные печени взрослых животных, по мере культивирования и адаптации приобретают свойства фетальных [11, 17].

Целью настоящего исследования являлась разработка экспериментальной модели — первичной культуры гепатоцитов новорожденных крыс, пригодной для изучения лизосомного аппарата клетки, исследования молекулярных механизмов участия циклических нуклеотидов в инициации реакции ответа лизосом на экстремальные воздействия.

### Методика

Для получения монослойной культуры гепатоцитов новорожденных крыс декапитировали, в асептических условиях извлекали печень, измельчали ее и инкубировали в течение 1 ч при 37 °C в растворе коллагеназы (0,5 мг/мл, «Sigma»), приготовленном на среде 199, забуференной 10 мМ HEPES с добавлением пенициллина (200 ед/мл) и 5 мМ пирувата натрия. Материал диспергировали и обогащали паренхиматозными клетками, давая отстояться клеточной суспензии в конических пробирках в течение 3 мин [4]. Осадки объединяли и засеивали на стеклянную поверхность, покрытую 0,01 % раствором желатина [1], на покровные стекла или в чашки Петри. Конечное разведение суспензии 1 — 1,5 млн клеток в 1 мл. Среду меняли ежедневно. В опыте использовали культуры на 4-е сутки культивирования. Росточная среда: среда 199, забуференная 10 мМ



HEPES с добавлением 200 ед/мл пенициллина, 5 % эмбриональной телячьей сыворотки и 2 мМ глутамина.

Апоксию моделировали в газопротоchnой термостатированной камере, через которую пропускали азот под постоянным давлением. В камеру помещали чашки без крышек. Контрольные культуры инкубировали в нормальной атмосфере с 5 % содержанием  $\text{CO}_2$ .

Морфологическое состояние гепатоцитов оценивали с помощью световой микроскопии препаратов, окрашенных гематоксилином по Бемеру. Для оценки доли тех или иных клеток на каждом препарате просчитывали не менее 1000 клеток при увеличении об. 40, ок. 10. Среднее находили для 4—5 препаратов, взятых из разных опытов.

Окрашивание флуоресцентными красителями акридиновым оранжевым (5 мг/мл) и родамином 123 (10 мкг/мл) проводили прижизненно в растворе Хенкса, препараты отмывали от красителя и просматривали в люминесцентном микроскопе MJ-2.

Для определения активности кислой фосфатазы культуру клеток отмывали последовательно охлажденным раствором Хенкса и 0,25M раствором сахарозы, содержащим 1 мМ ЭДТА pH 7,4, и собирали полихлорвиниловым скребком. Гомогенат подвергали дифференциальному центрифугированию. Осадок лизосом получали центрифугированием при 100 000 g в течение 30 мин, так как в гепатоцитах новорожденных крыс преобладают мелкие первичные лизосомы [10, 14]. Осадок лизосом обрабатывали тритоном X-100 в конечной концентрации 0,1 %, после чего определяли так называемую связанную активность фермента. В надосадочной жидкости, оставшейся после осаждения лизосом, измеряли свободную активность кислой фосфатазы. Определение активности проводили спектрофотометрически (в качестве субстрата использовали 4-нитрофенилфосфат [31]) и выражали ее в микромолях продукта, образованного при гидролизе субстрата за 1 мин на 1 мг ДНК. ДНК определяли по [7] в ядерных осадках, полученных при дифференциальном центрифугировании гомогената гепатоцитов.

## Результаты и обсуждение

В первичных культурах гепатоциты прикреплялись к поверхности стекла в течение 1—3 ч. Клетки полностью распластывались и изменяли свою форму от округлой к полигональной в течение 18—20 ч. На 2-е сутки культивирования в культуре наблюдались фигуры митоза. Обычно гепатоциты в

культуре группировались в колонии, содержащие 10—500 клеток, или кластеры (рис. 1, см. вклейку). По периферии колоний располагались синусоидальные клетки, отличающиеся гомогенностью цитоплазмы. Гепатоциты в первичных культурах имели полигональную форму, округлое ядро, 1—2 четко структурированных ядрышка и несколько микроядрышек. Между гепатоцитами сохранялись желчные канальцы. Цитоплазма гепатоцитов при фазово-контрастной микроскопии выглядела более плотной по сравнению с непаренхимными клетками, гранулированной и содержала многочисленные включения нейтрального жира.

В культуре находились также колонии, состоящие из светлых эпителиоподобных клеток с тонкодисперсным хроматином в ядре. Не исключено, что морфологические различия между колониями, наблюдаемые в культуре, связаны с известным явлением зональных различий между перипортальными и перивенозными гепатоцитами, метаболизм которых различен [6, 16]. К 4-м суткам культивирования морфологические различия между двумя видами гепатоцитов сглаживаются.

Непаренхимные клетки печени также гетерогенны в культуре. Они представлены фибробластоподобными клетками с овальными ядрами и отростками, вытянутыми вдоль длинной оси клеточного тела, эндотелиальными клетками с сеткой фенестрации, группирующимися в культуре в виде кластеров, липиднакапливающими клетками, снабженными длинными и короткими отростками, анастомозирующими между собой, и клетками Купфера, обычно располагающимися одиночно и отличающимися значительными размерами, гетероморфным ядром и гофрированной поверхностью.

В культуре имеется более или менее однородная популяция клеток, поскольку в результате «обогащения» при выделении гепатоцитов из ткани их содержание по сравнению с интактной печенью повышается до 80 % и более. Количество непаренхимных клеток в культуре колеблется от 11,7 до 16,8 % (табл. 1). Мы не пытались получить «чистую популяцию» печеночных клеток, поскольку известно, что в отсутствие синусоидальных клеток гепатоциты претерпевают существенные морфологические и функциональные

Т а б л и ц а 1

Морфологическая характеристика первичных культур гепатоцитов новорожденных крыс

Время, сут	Митозы, %	Непаренхимные клетки, %
2	0,7±0,18	11,7±5,8
3	2,0±0,34	16,8±4,1
4	2,5±0,48	14,2±2,9

изменения, в частности теряют способность синтезировать альбумин [11].

В наших экспериментах гепатоциты уже на 4-е сутки культивирования образуют характерные для печеночной паренхимы мозаичные структуры, приобретая органотипическое строение в виде трабекул (см. рис. 1). Таким образом, формирования типичного для эпителиальных клеток монослоя не происходило.

Известно, что после прикрепления и распластывания в гепатоцитах значительно активируются процессы гликолиза и глюконеогенеза [12] и только через 1 сут после имплантации гепатоциты вступают в S-фазу и митоз [13]. Мы также наблюдали появление митотических фигур не раньше чем через 24 ч после имплантации, активный рост в течение 2-х и 3-х суток (см. табл. 1).

Исследование чувствительности культур к гормонам показало, что на 4-е сутки культивирования она сохраняется. Так, добавление 20 мкМ изопротеренола приводило к увеличению внутриклеточной концентрации цАМФ через 3 мин в 1,5 раза.

Исходя из этого мы использовали в своих экспериментах первичные культуры гепатоцитов на 4-е сутки культивирования, полагая, что к этому времени культура становится метаболически относительно стабильной.

Поскольку печень — это орган, в котором осуществляются многие метаболические реакции, а гепатоцит секретирует больше белковых молекул, чем любая другая клетка, гепатоциты оказываются достаточно чувствительными к изменению концентрации кислорода [6]. Это подтвердили опыты с прижизненной окраской культивируемых гепатоцитов флуоресцентным красителем — родамином 123, интенсивность свечения которого при возбуждении ультрафиолетовым светом пропорциональна величине мембранного потенциала митохондрий [9]. В окрашенных гепатоцитах ярко светились многочисленные округлые митохондрии, но уже 15-минутная аноксия приводила к значительному уменьшению числа светящихся клеток (до 70 %), а количество светящихся митохондрий при этом в некоторых клетках уменьшалось до 3—10 на клетку, тогда как в норме в гепатоците их отмечается более тысячи. Таким образом, первич-

Таблица 2

Исключение трипанового синего гепатоцитами новорожденных крыс в первичных культурах при моделировании аноксии, метаболической ишемии и реабилитации

Условия при аноксии (1 ч в растворе Хенкса), pH	Исключение красителя, %
Контроль (без аноксии)	98,75±0,13
7,4	94,34±1,46
6,9	95,10±0,32
6,9 (затем реабилитация 1 ч)	95,54±2,96

ная культура гепатоцитов новорожденных крыс оказалась удобной для моделирования экстремальных состояний — аноксии и метаболической ишемии.

Мы моделировали состояние аноксии, помещая открытые чашки Петри с культурами гепатоцитов в солевом растворе Хенкса pH 7,2—7,4 в термостатированную камеру, через которую пропускали азот. Поскольку известно, что ишемия *in vivo* сопровождается ацидозом, в ряде случаев мы заменяли ростовую среду на бессубстратный раствор Хенкса при pH 6,9, т. е. в любом случае имитировали состояние аноксии на фоне субстратного голодания. Реабилитацию после экстремальных воздействий моделировали, заменяя раствор Хенкса на среду 199 с добавлением 5 % эмбриональной телячьей сыворотки и инкубируя клетки в течение 1 ч при 37°C в нормальной атмосфере с 5 % содержанием CO<sub>2</sub>. При этом необходимо было подобрать такую продолжительность воздействия, при которой патологиче-

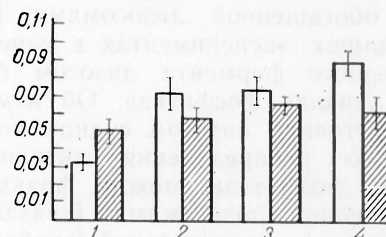


Рис. 2. Изменение активности кислой фосфатазы в первичных культурах гепатоцитов новорожденных крыс при моделировании аноксии и метаболической ишемии.

1 — исходная культура; 2 — 20 мин при нормальной оксигенации в растворе Хенкса (pH 7,2—7,4); 3 — 20 мин аноксии в растворе Хенкса (pH 7,2—7,4); 4 — 60 мин аноксии в растворе Хенкса (pH 6,9). Незаштрихованные столбики — свободная активность кислой фосфатазы, заштрихованные — связанная активность кислой фосфатазы. По оси ординат — активность кислой фосфатазы (в мкмоль за 1 мин на 1 мг ДНК).

ские изменения в клетках носили бы обратимый характер. Поэтому, используя известное свойство живых клеток при утрате жизнеспособности необратимо прокрашиваться трипановым синим в области ядра [8], мы оценивали жизнеспособность культивируемых гепатоцитов по их способности выводить трипановый синий (0,6 %) при различной продолжительности аноксии на фоне субстратного голодания. Время воздействия от 15 до 60 мин. Через 60 мин аноксии гепатоцитов в растворе Хенкса необратимо прокрашивались трипановым синим 5—6 % клеток, при меньшем времени воздействия доля окрашенных клеток практически не отличалась от таковой в контроле (табл. 2). Время, равное 1 ч, было выбрано в качестве критического и использовалось для моделирования экстремальных состояний, приближенных к метаболической ишемии. Принято считать, что в механизме ишемических повреждений важнейшую роль играют лизосомные ферменты. При окрашивании гепатоцитов акридиновым оранжевым лизосомы выявляются в виде округлых структур различных размеров, расположенных зонально, преимущественно с одной стороны ядра. Моделирование аноксии не изменяет характер окрашивания. Из данных литературы известно, что при разнообразных патологических состояниях происходит изменение лизосомного аппарата. В частности, повышается свободная активность лизосомных ферментов в гомогенатах ткани при одновременном снижении активности кислых гидролаз во фракции, обогащенной лизосомами [12].

В наших экспериментах в качестве маркерного фермента лизосом была взята кислая фосфатаза. Об изменении состояния лизосом судили по изменению распределения активности кислой фосфатазы между фракцией, обогащенной лизосомами (связанная активность), и цитозольной (свободная активность). Результаты экспериментов представлены на рис. 2. Ранее упоминалось, что аноксия гепатоцитов в течение 20 мин не оказывает заметного влияния на способность клеток выводить 0,6 % трипановый синий, а следовательно, не сказывается на их жизнеспособности. Анализ распределения кислой фосфатазы между обогащенной лизосомами и свободной

фракцией показал заметные изменения в состоянии лизосомного аппарата. Замена ростовой среды на раствор Хенкса и инкубация клеток в этом растворе в течение 20 мин даже при нормальной аэрации приводят к значительному возрастанию (примерно в 2 раза) свободной (цитозольной) активности кислой фосфатазы при небольшом увеличении связанной активности фермента. 20-минутная аноксия в том же бессубстратном растворе дает практически такие же результаты. Таким образом, незначительное по времени субстратное голодание гепатоцитов само по себе вызывает резкое изменение состояния лизосомного аппарата. Удлинение срока аноксии до 1 ч, когда около 5 % клеток теряют свою жизнеспособность, приводит к еще большему возрастанию свободной активности кислой фосфатазы на фоне незначительных изменений связанной активности фермента. Резкое повышение свободной активности кислой фосфатазы при моделировании субстратного голодания и аноксии на культуре гепатоцитов, вероятно, отражает процесс дестабилизации мембран лизосом [2].

Таким образом, первичная культура гепатоцитов новорожденных крыс является удобной системой для моделирования аноксии, метаболической ишемии и реабилитации, предоставляет экспериментатору широкие возможности для варьирования отдельными звеньями компенсаторной реакции клеток на внешнее воздействие, позволяет оценить функциональные способности клеток в экстремальных условиях.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков. — Пер. с англ. — М., 1983. — С. 23.
2. Коровкин Б. Ф. // Вестн. АМН СССР. — 1982. — № 8. — С. 69—74.
3. Покровский А. А., Арчаков А. И. // Современные методы в биохимии. — М., 1968. — Ч. 2. — С. 44.
4. Уголев А. Т., Лукьянова Л. Д., Дудченко А. М. // Гепатоцит: Функционально-метаболические свойства. — М., 1985. — С. 24.
5. Baribault H., Leroux-Nicollet J., Marceau N. // J. Cell Physiol. — 1985. — Vol. 122. — P. 105—112.
6. Bonventre J. V., Cheung J. Y. // Amer. J. Physiol. — 1985. — Vol. 249. — P. 149—159.
7. Burton K. // Biochem. J. — 1956. — Vol. 62. — P. 315.

- 8 Cheung J. Y., Thompson I. G., Bonventre J. V. // Amer. J. Physiol. — 1982. — Vol. 243. — P. 184—190.
- 9 Johnson L. V., Walsch M. L., Bockus B., Chen L. B. // J. Cell Biol. — 1981 — Vol. 88. — P. 526—535.
- 10 Yost-Vu E., Hamilton R. L., Hornick C. A. et al. // Histochemistry. — 1986. — Vol. 85. — P. 457—466.
- 11 Leffert H. L., Morau T., Skelley S. H., Mueller K. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1978. — Vol. 75. — P. 1834—1838.
- 12 Lopez M. P., Castell J. J., Gomer M. J. // In Vitro. — 1987. — Vol. 23. — P. 36A.
- 13 Marceau N., Noël M., Deschees J. // Ibid. — 1982. — Vol. 18. — P. 1—11.
- 14 Miyairi M., Watanabe S., Phillips M. J. // Pediat. Res. — 1985. — Vol. 19. — P. 1225—1229.
- 15 Morin D., Normand C. // J. Cell Physiol. — 1986. — Vol. 129. — P. 103—110.
- 16 Quisfort B. // Biochem. J. — 1985. — Vol. 229. — P. 221—226.
- 17 Sirica A. E., Richards W., Tsukada Y. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1979. — Vol. 76. — P. 283—287.

Поступила 22.04.88

# A PRIMARY CULTURE OF HEPATOCYTES FROM NEW BORN RATS IS A SUITABLE SYSTEM FOR SIMULATION OF ANOXIA AND "METABOLIC ISCHEMY"

T. M. Goncharenko, S. E. Nikulina, O. Yu. Krylova, N. S. Stvolinskaya, E. D. Polyakova, B. F. Korovkin

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

A primary culture of hepatocytes from new born rats was used as an experimental model suitable for studies of the cell lysosomal apparatus and of molecular mechanisms involving cyclic nucleotides for initiation of lysosomal response to extremal conditions. Substrate deficiency and anoxia of the cultivated hepatocytes were found to cause distinct alterations in the state of lysosomal apparatus accompanied by an increase in free activity of acid phosphatase.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1989

УДК 615.357:577.175.859].015.4.07

В. Н. Гончарова, М. С. Морозова, Л. Г. Разина, Т. М. Астахова,  
И. А. Мануилова

## ВЛИЯНИЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО АНАЛОГА ПРОСТАГЛАНДИНА E<sub>2</sub> СУЛЬПРОСТОНА НА АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНУЮ СИСТЕМУ В ДЕЦИДУАЛЬНОЙ ТКАНИ ЖЕНЩИН

Институт экспериментальной эндокринологии и химии гормонов АМН СССР, Всесоюзный научно-исследовательский центр охраны здоровья матери и ребенка Минздрава СССР, Москва

Простагландины (ПГ) — биологически активные вещества, обладающие широким спектром действия. Предполагается, что они участвуют в развитии ряда патофизиологических состояний и лечебный эффект многих фармакологических препаратов связан с изменением их биосинтеза. К настоящему времени достигнуты большие успехи в изучении химического строения ПГ, а также путей и регуляции их биосинтеза, но до сих пор остается неизвестным биохимический механизм их действия. Для большинства тканей показано, что биологический эффект ПГ группы E (ПГЕ) связан с их влиянием на аденилатциклатную систему, однако механизм взаимодействия ПГ с этой системой пока неясен. В последнее время появились данные, свидетельствующие о том, что ПГ вызывают гетерологическую десенситизацию аденилатциклазы, что, по мнению ряда исследователей [11, 13,

16, 21], является отражением механизма модулирующего действия ПГ на активность аденилатциклазы. Десенситизация аденилатциклазы под действием ПГ показана для ряда тканей в условиях *in vitro* [13, 16, 21], но только в одном случае она исследовалась в условиях *in vivo* [11].

В настоящей работе изучали влияние синтетического аналога ПГЕ<sub>2</sub> сульпростона на активность аденилатциклазы в децидуальной ткани женщин при введении его для прерывания беременности. Такое исследование позволяло, с одной стороны, изучить возможность гетерологической десенситизации аденилатциклазы под действием ПГ в условиях *in vivo*, а с другой — подойти к пониманию механизма abortивного действия ПГ.

Работа проводилась по заданию и при финансовой поддержке ВОЗ.



## Методика

Децидуальную ткань получали у женщин при прерывании беременности при сроке 4—5 нед хирургическим путем или с помощью синтетического аналога ПГЕ<sub>2</sub> сульпростона (16-фенокси-17,18,19,20-тетранор-простагландин Е<sub>2</sub>-сульфаниламид). Сульпростон вводили внутримышечно в дозе 0,5 мг 3 раза с интервалом 3 ч. Децидуальную ткань забирали немедленно после изгнания плодного яйца. Извлеченную децидуальную ткань быстро отмывали в физиологическом растворе и подсушивали на фильтровальной бумаге. Часть ткани немедленно замораживали в жидком азоте и определяли в ней содержание цАМФ [12]. Другую часть ткани помещали в охлажденный физиологический раствор и использовали для определения активности аденилатциклазы и фосфодиэстеразы.

Содержание в ткани цАМФ определяли с использованием наборов фирмы «Amersham» (Англия).

Активность аденилатциклазы измеряли во фракции грубых мембран, полученных путем последовательного центрифугирования при 3000 и 10 000 об/мин [20]. Осадок мембран ресуспендировали в буфере (рН 7,5), содержащем 50 мМ трис-НСl, 5 мМ MgSO<sub>4</sub> и 0,5 мМ 1-метил-3-изобутилметилксантина. Реакцию начинали добавлением 10 мкл суспензии мембран (20—30 мкг белка) к 110 мкл буфера указанного выше состава с добавлением 1 мМ дитиотрейтола, 1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина и 4 мМ АТФ (динатриевая соль). Форсколин (60 мМ) и NaF (10 мМ) растворяли в буфере и добавляли в пробы непосредственно перед началом инкубации. Инкубацию проводили при 37°C в течение 10 мин. Реакцию останавливали добавлением в пробы 100 мкл 0,2 н. HCl. В контрольные пробы HCl добавляли перед началом инкубации. По окончании инкубации все пробы кипятили на водяной бане в течение 10 мин для гидролиза избытка АТФ и освобождения от HCl. После упаривания проб под вакуумом в сухих остатках определяли содержание цАМФ [12]. Активность аденилатциклазы выражали в пикомолях за 1 мин на 1 мг белка.

Активность фосфодиэстеразы [2] определяли в гомогенате ткани, приготовленном в буфере (рН 8,0), содержащем 40 мМ трис-НСl и 4 мМ дитиотрейтола. Реакцию начинали добавлением 10 мкл гомогената (10—15 мкг белка) к 30 мкл среды, содержащей 40 мМ трис-НСl, 20 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1 мкКи <sup>3</sup>H-цАМФ и 1 мМ аденозина (для подавления активности 5'-нуклеотидазы). Для выявления активности фосфодиэстеразы как низкого, так и высокого сродства добавляли соответственно высокую (40 мМ) и низкую (0,4 мМ) концентрацию цАМФ. Инкубацию проводили при 30°C в течение 5 мин. В контрольных пробах инкубировали предварительно прокипяченную ткань. По окончании инкубации пробы немедленно замораживали в жидком азоте, а затем кипятили в течение 3 мин. Аликвоты инкубационной среды хроматографировали на силуфоловых пластинках УФ-254 в системе изо-пропанол — аммиак — вода (7 : 1 : 2). Предварительно на пластинки наносили смесь 5'-АМФ и аденозина, положение которых на хроматограмме выявляли затем под УФ-светом. Пятна 5'-АМФ и аденозина объединяли, элюировали водой, добавляли к элюату жидкость

Брея и просчитывали радиоактивность на сцинтилляционном счетчике «Mark-II» (США). По количеству суммарной радиоактивности, включенной в 5'-АМФ и аденозин, рассчитывали процент сывороточного альбумина и 4 мМ АТФ (динатриевая соль). Форсколин (60 мМ) и NaF (10 мМ) растворяли в буфере и добавляли в пробы непосредственно перед началом инкубации. Инкубацию проводили при 37°C в течение 10 мин. Реакцию останавливали добавлением в пробы 100 мкл 0,2 н. HCl. В контрольные пробы HCl добавляли перед началом инкубации. По окончании инкубации все пробы кипятили на водяной бане в течение 10 мин для гидролиза избытка АТФ и освобождения от HCl. После упаривания проб под вакуумом в сухих остатках определяли содержание цАМФ [12]. Активность аденилатциклазы выражали в пикомолях за 1 мин на 1 мг белка.

Активность фосфодиэстеразы [2] определяли в гомогенате ткани, приготовленном в буфере (рН 8,0), содержащем 40 мМ трис-НСl и 4 мМ дитиотрейтола. Реакцию начинали добавлением 10 мкл гомогената (10—15 мкг белка) к 30 мкл среды, содержащей 40 мМ трис-НСl, 20 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1 мкКи <sup>3</sup>H-цАМФ и 1 мМ аденозина (для подавления активности 5'-нуклеотидазы). Для выявления активности фосфодиэстеразы как низкого, так и высокого сродства добавляли соответственно высокую (40 мМ) и низкую (0,4 мМ) концентрацию цАМФ. Инкубацию проводили при 30°C в течение 5 мин. В контрольных пробах инкубировали предварительно прокипяченную ткань. По окончании инкубации пробы немедленно замораживали в жидком азоте, а затем кипятили в течение 3 мин. Аликвоты инкубационной среды хроматографировали на силуфоловых пластинках УФ-254 в системе изо-пропанол — аммиак — вода (7 : 1 : 2). Предварительно на пластинки наносили смесь 5'-АМФ и аденозина, положение которых на хроматограмме выявляли затем под УФ-светом. Пятна 5'-АМФ и аденозина объединяли, элюировали водой, добавляли к элюату жидкость Брея и просчитывали радиоактивность на сцинтилляционном счетчике «Mark II» (США). По количеству суммарной радиоактивности, включенной в 5'-АМФ и аденозин, рассчитывали процент превращения <sup>3</sup>H-цАМФ. Активность фосфодиэстеразы выражали в пикомолях цАМФ за 1 мин на 1 мг белка.

Белок определяли методом Бредфорд [5] с помощью наборов фирмы «Bio-Rad» (ФРГ). В работе использовали следующие реактивы: сульпростон («Shering», ФРГ); трис-НСl, дитиотрейтол, АТФ, бычий сывороточный альбумин (все — фирмы «Sigma», США); 1-метил-3-изобутилметилксантин и форсколин («Calbichem-Behring», Швейцария); 5'-АМФ, аденозин («Reanal», ВНР). Все остальные реактивы — отечественного производства классификации ос. ч. или ч. д. а.

## Результаты и обсуждение

Как видно из таблицы, после введения сульпростона содержание цАМФ в децидуальной ткани женщин снижалось почти в 4 раза, однако активность фосфодиэстеразы при этом не

Влияние введения сульпростона на содержание цАМФ, активность аденилатциклазы и фосфодиэстеразы в децидуальной ткани женщин ( $M \pm m$ )

Условия определения	цАМФ, пмоль на 1 мг белка	Аденилатциклаза	Фосфодиэстераза
		пмоль/мин на 1 мг белка	
Контроль	$377,7 \pm 55,9$ ( $n=12$ )	$143,7 \pm 22,7$ ( $n=12$ )	$176,9 \pm 15,4$ ( $n=12$ )
Сульпростон	$95,8 \pm 18,3$ ( $n=13$ )	$53,7 \pm 7,7$ ( $n=13$ )	$189,2 \pm 23,0$ ( $n=12$ )
$P$	$<0,001$	$<0,001$	$>0,05$

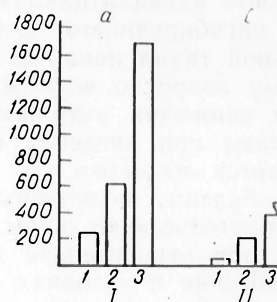
Примечание. В скобках — число определений.

изменялась. Следует отметить, что в таблице приведены данные, полученные при высокой концентрации цАМФ (40 мМ), но и при низкой концентрации субстрата (0,4 мМ) мы не обнаружили изменения активности фосфодиэстеразы (результаты не приводятся). Эти данные позволяют считать, что снижение содержания цАМФ при введении сульпростона нельзя отнести за счет повышенного распада цАМФ. В то же время активность аденилатциклазы при введении сульпростона снижалась в 3 раза, и это снижение наряду с данными по фосфодиэстеразе позволяет предположить, что падение уровня цАМФ при введении сульпростона связано с уменьшением его синтеза.

Известно, что аденилатциклаза состоит из двух компонентов: G-белка и каталитической субъединицы. Чтобы выяснить, с каким компонентом связано изменение активности аденилатциклазы при введении сульпростона, мы исследовали ее максимальный ответ на стимуляторы — NaF и форсколин, первый из которых действует непосредственно на G-белок [4, 18], а второй — непосредственно на каталитическую субъединицу [6]. Как видно на рисунке, после введения сульпростона ответ аденилатциклазы на NaF был снижен в 3 раза, что указывает на уменьшение количества или активности G-белка. Максимальный ответ аденилатциклазы на форсколин также был резко снижен (в 4,5 раза). На первый взгляд снижение ответа на форсколин может говорить об уменьшении количества или активности каталитической субъединицы аденилатциклазы. Но, поскольку известно, что для проявления максимальной активности форсколина необходимо присутствие G-белка [3, 7, 9], найденное

нами уменьшение ответа на форсколин может быть связано с изменением активности или количества одного G-белка или G-белка и каталитической субъединицы.

Известно, что в большинстве тканей, в том числе в децидуальной [11, 12], при кратковременном воздействии в условиях *in vitro* ПГ группы E вызывают не снижение, а повышение активности аденилатциклазы. Следовательно, обнаруженное нами снижение активности аденилатциклазы связано с каким-то изменением фермента, которое возникает в результате относительно продолжительного воздействия сульпростона и сохраняется после выделения мембран. Наиболее вероятным объяснением обнаруженного изменения является, на наш взгляд, развитие гетерологической десенситизации аденилатциклазы под действием сульпростона. Наши данные имеют много общего с результатами, полученными в аналогичных условиях на гепатоцитах крыс [11]. После подкожного введения крысам синтетического



Активность аденилатциклазы децидуальной ткани при действии NaF и форсколина при хирургическом аборте (а) и аборте, вызванном сульпростоном (б).

1 — контроль, 2 — NaF; 3 — форсколин. По оси ординат: активность аденилатциклазы (в пмоль/мин на 1 мг белка).

аналога ПГЕ<sub>2</sub> 16,16-диметил-простагландин Е<sub>2</sub> (3 раза с 3-часовыми интервалами) в мембранах печени были снижены базальная активность аденилатциклазы и ее ответ на NaF, гуанил-5'-ил-имидодифосфат и форсколин. Более того, экстракты из мембран гепатоцитов обладали пониженной способностью активировать каталитическую субъединицу в мембранах мутантных сус-клеток лимфомы S49, лишенных G-белка. Эти данные указывали на уменьшение активности или количества G-белка в мембранах печени, об этом же свидетельствовало уменьшение степени АДФ-рибозилирования мембран в присутствии холерного токсина. Аналогичные результаты были получены на культуре фибробластов [16]. Эти данные свидетельствуют о том, что десенситизация, вызываемая ПГ группы Е, если не полностью, то в значительной степени, связана с изменением активности или количества G-белка. Что происходит при этом с G-белком, пока неизвестно. В последнее время появляются сведения о том, что G-белки могут подвергаться фосфорилированию, в результате чего изменяется их активность [8, 17]. Возможно, именно этот процесс приводит к изменению активности G-белка в децидуальной ткани при введении сульпростона.

Следует рассмотреть еще один возможный механизм снижения активности аденилатциклазы — активацию ингибирующего G-белка. Ингибирующий G-белок обнаружен наряду со стимулирующим G-белком во многих тканях, в связи с чем высказывается предположение [15], что он модулирует активность аденилатциклазы. Присутствие ингибирующего G-белка в децидуальной ткани пока не показано, поэтому вопрос о возможном его участии в снижении активности аденилатциклазы при введении сульпростона остается открытым.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что ПГ группы Е при относительно длительном воздействии в условиях *in vivo* вызывают десенситизацию аденилатциклазы в децидуальной ткани, что приводит к снижению уровня цАМФ. Поскольку цАМФ является мощным регулятором внутриклеточных процессов, можно предположить, что это действие ПГ лежит в основе многих

их фармакологических эффектов, в том числе в основе их abortивного действия. По-видимому, этот эффект является отражением механизма действия эндогенных ПГ. На такую возможность указывают данные, свидетельствующие о том, что при спонтанном abortе в децидуальной ткани резко снижается содержание цАМФ [1]. В то же время имеются сведения [14], показывающие, что при спонтанном abortе в децидуальной ткани резко повышается содержание ПГ. Можно предположить, что снижение уровня цАМФ в децидуальной ткани при спонтанном abortе происходит под действием эндогенных ПГ и этот эффект связан с десенситизацией аденилатциклазы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гончарова В. Н., Морозова М. С., Разина Л. Г. и др. // Циклические нуклеотиды и система регуляции ферментативных реакций. — Рязань, 1985. — С. 140.
2. Ткачук В. А., Лазаревич В. Г., Меньшиков М. Ю., Северин С. Е. // Биохимия. — 1978. — Т. 43, № 9. — С. 1622—1629.
3. Bender J. L., Wolf L. G., Neer E. J. // *Advanc. Cycl. Nucl. Res.* — 1983. — Vol. 17. — P. 101—109.
4. Birnbaumer L., Codina J., Maller A. R. et al. // *Rec. Progr. Horm. Res.* — 1985. — Vol. 41. — P. 41—94.
5. Bredford M. // *Analyt. Biochem.* — 1976. — Vol. 72. — P. 248—254.
6. Daly J. W. // *Advanc. Cycl. Nucl. Res.* — 1983. — Vol. 17. — P. 81—89.
7. Darfjer F. J., Mahan L. C., Koachman A. M., Insel P. A. // *J. biol. Chem.* — 1982. — Vol. 257. — P. 11901—11907.
8. Enyedi J., Farago A., Sarkadi B. et al. // *FEBS Lett.* — 1983. — Vol. 161. — P. 158—162.
9. Farndale R. W., Wong S. K. F., Martin B. R. // *Biochem. J.* — 1987. — Vol. 242. — P. 637—643.
10. Fortier M. A., Boulanger M., Boulet A. P., Lambert R. D. // *Biol. Reprod.* — 1987. — Vol. 36. — P. 1025—1035.
11. Garrity M. J., Andreassen T. J., Storm D. R., Robertson P. P. // *J. biol. Chem.* — 1983. — Vol. 258. — P. 8692—8697.
12. Gilman A. G. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.* — 1970. — Vol. 67. — P. 305—312.
13. Hsia J., Hewlett E. L., Moss J. // *J. biol. Chem.* — 1985. — Vol. 260. — P. 4922—4926.
14. Jaschewatzky O., Shalt A., Grunstein S. et al. // *Brit. J. Obstet. Gynec.* — 1983. — Vol. 90. — P. 958—960.
15. Jacobs K. H., Actories K., Minuth M., Schults G. // *Advanc. Cycl. Nucl. Res.* — 1985. — Vol. 19. — P. 137—146.
16. Kassiss S., Fishman T. M. // *J. biol. Chem.* — 1983. — Vol. 258. — P. 8692—8697.
17. Katada T., Gilman A. G., Watanabe Y. et al. // *J. Biochem. (Tokyo).* — 1985. — Vol. 151. — P. 431—437.
18. Ross E. M., Gilman A. G. // *J. biol.*

- Chem. — 1977. — Vol. 252. — P. 6966—6970.
19. Seamon K. B., Padgett W., Daly J. W. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1981. — Vol. 78. — P. 3363—3367.
  20. Shultz G. // Meth. Enzymol. — 1974. — Vol. 28. — P. 115—125.
  21. Simard J., Labrie F. // Molec. Cell. Endocr. — 1986. — Vol. 46. — P. 79—89.
  22. Whitsett J. A., Johnson C. L. // Amer. J. Obstet. Gynec. — 1979. — Vol. 133. — P. 479—483.

Поступила 13.10.88

# EFFECT OF SYNTHETIC ANALOGUE OF PROSTAGLANDIN E<sub>2</sub> ON THE ADENYLATE CYCLASE SYSTEM OF DECIDUAL TISSUE OF WOMEN

V. N. Goncharova, M. S. Morozova, L. G. Razina, T. M. Astakhova, I. A. Manuilova

Institute of Experimental Endocrinology and Hormone Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, All-Union Centre for Protection of Motherhood and Childhood Health,

Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

Activities of adenylate cyclase and phosphodiesterase were studied in decidual tissue of women, pregnancy of which was interrupted within the first term by means of synthetic analogue of prostaglandin E<sub>2</sub> sulprostone; decidual tissue obtained after surgical abortion served as a control. Content of cAMP in decidual tissue was decreased 4-fold after administration of sulprostone. At the same time, activity of adenylate cyclase was decreased 2-3-fold, while activity of phosphodiesterase was unaltered. These data suggest that the decrease in cAMP concentration occurred as a result of inhibition of its synthesis. After administration of sulprostone the adenylate cyclase activity was decreased 3- and 4.5-fold in response to specific stimulators NaF and forskoline, respectively, thus indicating that content and activity of G protein, and apparently of catalytic subunits, were decreased. Long-term effect of prostaglandins on decidual tissue appears to cause a heterologous desensitization of adenylate cyclase and this phenomenon is responsible for pharmacologic action of prostaglandins.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ. 1989

УДК 616.517-07:616.155.1-008.6:546.41]-092-07

В. В. Петруняк, М. С. Гончаренко, А. К. Кондакова, И. И. Мавров

## ИЗУЧЕНИЕ ПРОНИЦАЕМОСТИ ДЛЯ <sup>45</sup>Са И АКТИВНОСТИ Са-АТФазы МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ

Институт биологической физики АН СССР, г. Пущино, НИИ дерматологии и венерологии Минздрава УССР, Харьков

Как известно, ионы Са<sup>2+</sup> являются универсальными внутриклеточными посредниками-регуляторами [26, 27]. Регуляторная функция этих ионов обеспечивается согласованным взаимодействием систем мембранного транспорта Са<sup>2+</sup> — кальциевых помп и управляемых рецептороперируемых и потенциалзависимых кальциевых каналов [26, 27]. Накопленные экспериментальные данные показывают, что любое нарушение мембранного транспорта Са<sup>2+</sup> вызывает искажение регуляторной функции этих ионов с множественными патологическими последствиями [10]. Эти последствия включают изменения пролиферации, дифференцировки, функциональной активности зрелых клеток, их автолитической гибели [10, 21, 30]. Они обусловлены широким участием ионов Са<sup>2+</sup> в регуляции основных жизненных этапов клеток [21, 26, 27]. Эти данные привели к заключению, что в основе патогенеза многих заболеваний человека лежат нарушения механизмов мембранного транспорта Са<sup>2+</sup>. Такое предположение уже

нашло ряд подтверждений для некоторых случаев экспериментальной и клинической патологии, в частности для гипертонии [13], атеросклероза [32], астмы [28], нефрокальциноза [17] и других моделируемых или встречаемых у животных заболеваний. Усиленная пролиферация, искаженная дифференцировка и преждевременная гибель клеток при псориазе [7] позволяют полагать также, что в основе патогенеза этого заболевания может лежать нарушение мембранного транспорта и регуляторной функции ионов Са<sup>2+</sup> в клетках эпидермиса. Это предположение согласуется с экспериментальными данными о действии кальция на дифференцировку и пролиферацию клеток эпидермиса в условиях культуры тканей [17, 25]. Повышенное содержание кальция в коже при псориазе известно давно [8], но недавно нами было показано, что при этом заболевании изменяются показатели кальциевого обмена целого организма [9]. Наблюдаемые при этом изменения в составе плазмы крови и в метаболизме



эритроцитов, включая энергетический обмен, транспорт одновалентных ионов через мембраны, химический состав мембран [1—4, 6], свидетельствуют о системном характере патологии и косвенно указывают на возможность нарушения регуляторной функции ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в качестве общей причины этих разнообразных изменений. Показанный нами лечебный эффект блокатора кальциевых каналов — верапамила [5], который, как известно, в той или иной степени подавляет вход кальция в клетки разных тканей [10, 29], подтверждал, что в основе патогенеза псориаза может лежать такое нарушение мембранного транспорта  $\text{Ca}^{2+}$ , при котором базальная концентрация этих ионов в цитозоле разных типов клеток повышена. Повышение базальной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле в свою очередь может быть обусловлено либо повышением проницаемости плазматических мембран для кальция, либо снижением активности кальциевых помп [10]. С целью оценки обоснованного данного предположения мы провели сравнительное исследование активности Са-транспортирующей АТФазы и проницаемости для  $\text{Ca}^{2+}$  мембран эритроцитов, полученных из крови практически здоровых людей и больных псориазом.

### Методика

Эритроциты получали из венозной гепаринизированной крови, взятой утром натощак для клинико-биохимического исследования. Обследуемые группы состояли из 45 больных псориазом в прогрессирующей стадии заболевания и 70 практически здоровых людей одной возрастной категории.

Активность Са-АТФазы определяли в неотмытых от эндогенных регуляторов мембран эритроцитов [11, 12]. Для этой цели 0,5 мл крови смешивали с 2 мл среды А и осаждали эритроциты центрифугированием при 2000 г

в течение 10 мин. Осадок ресуспендировали в 3 мл той же среды и дважды отмывали от элементов белой крови переосаждением. Среда А содержала 130 мМ KCl, 0,25 мМ  $\text{MgCl}_2$  и 10 мМ трис-HCl-буфера pH 7,4. Отмытые эритроциты разводили до 10 % гематокрита в среде Б, содержащей 130 мМ KCl, 5 мМ цитрата и 1,65 мМ  $\text{MgCl}_2$  или 10 мМ цитрата и 2,95 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 20 мМ трис-HCl pH 7,4 при 37 °С. К суспензии эритроцитов добавляли 0,04 % сапонина, запускали реакцию добавлением равного объема среды инкубации, содержащей АТФ, и помещали в термостат водной с качалкой на 10—20 мин. Инкубацию проводили при 37 °С и останавливали реакцию добавлением равного объема холодного 10 % раствора ТХУ. После осаждения белка в надосадке определяли концентрацию неорганического фосфата [23]. Активность Са-АТФазы определяли вычитанием из общей АТФазной активности Са-независимой активности, определяемой в среде без кальция с 1 мМ ЭГТА.

Среды инкубации готовили на основе среды Б, к которой добавляли с учетом конечного разведения АТФ, кальций и/или ЭГТА. Для получения кривых зависимости активности Са-АТФазы от концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  использовали конечную концентрацию АТФ 1 мМ, ЭГТА — 1 мМ, цитрата — 5 мМ,  $\text{MgCl}_2$  — 1,65 мМ и соответствующие концентрации  $\text{CaCl}_2$  (табл. 1). Цитрат использовали в качестве Са—Mg-буфера, позволяющего задавать концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  с достаточной точностью в области 1—60 мкМ, где ЭГТА уже не обладает буферной емкостью при pH 7,4. Заданные концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  для каждой точки кривой получали смешиванием в соответствующих пропорциях 2 сред: среды с 1 мМ ЭГТА и среды с 1 мМ ЭГТА и 2032 мкМ  $\text{CaCl}_2$  (60 мкМ  $\text{Ca}^{2+}$ ) после доведения pH в каждой из смешиваемых сред при 37 °С. Для определения максимальной активности Са-АТФазы концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  задавали только цитратом и среда содержала 10 мМ цитрата, 2,9 мМ  $\text{MgCl}_2$  и 181 мкМ  $\text{CaCl}_2$  (4 мкМ  $\text{Ca}^{2+}$ ). Во всех средах концентрация ионов  $\text{Mg}^{2+}$  составляла около 50 мкМ и Mg-АТФ — 350 мкМ. Оптимальная концентрация  $\text{Mg}^{2+}$  была определена эмпирически в предварительных экспериментах. При составлении сред учитывали концентрацию магния в эритроцитах [9]. Соотношения общих концентраций  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ , АТФ и цитрата при заданных концентрациях ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , значениях pH и температуры рассчитывали на персональном компьютере «Искра» по программе, со-

Т а б л и ц а 1

Содержание общего и ионизированного кальция в средах инкубации, использованных при измерении активности Са-АТФазы

Буфер	Содержание ионизированного кальция ( $\text{Ca}^{2+}$ ) и общего кальция ( $\text{Ca}_0$ ), мкмоль									
5 мМ цитрат, 1 мМ ЭГТА:										
$\text{Ca}^{2+}$	0,1	0,3	0,7	1	2	3	4	5	7	10
$\text{Ca}_0$	632	843	939	968	1020	1053	1081	1108	1158	1230
10 мМ цитрат:										
$\text{Ca}_0$				45	91	136	181	225	313	442
										1800

П р и м е ч а н и е. Каждая среда содержала 50 мкМ  $\text{Mg}^{2+}$  ионизированного; при 5 мМ цитрата добавляли 1,65 мМ  $\text{MgCl}_2$ , а при 10 мМ цитрата — 2,95 мМ  $\text{MgCl}_2$ .

ставленной на основе [15], с введенными константами диссоциации цитрата и его солей [14] и коэффициента температурной зависимости констант стабильности  $\text{Ca}$  — ЭГТА комплексов [16].

Накопление кальция в эритроцитах определяли в условиях ингибирования  $\text{Ca}$ -АТФазы ванадатом натрия [19, 20, 31]. Эритроциты осаждали из 0,5 мл крови, смешанной с 3 мл среды В, и дважды промывали переосаждением в той же среде. Среда В содержала 140 мМ  $\text{NaCl}$ , 5 мМ  $\text{KCl}$ , 0,05 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 1,2 мМ  $\text{CaCl}_2$  и 10 мМ трис- $\text{HCl}$  pH 7,4 при 37°C. 75 мкл плотноупакованных эритроцитов переносили в 200 мкл среды В с 0,5 мМ ванадатом натрия и инкубировали при 37°C 20—25 мин (за это время происходило полное ингибирование  $\text{Ca}$ -АТФазы). Затем к суспензии добавляли 40 мкл среды В с  $^{45}\text{Ca}$ . Конечная концентрация метки составляла 10 мкКи/мл. В этой среде эритроциты инкубировали в водяном термостате с вибратором при 37°C 60 мин [19, 20, 31]. После инкубации эритроциты заливали 300 мкл холодной среды без метки и осаждали центрифугированием 1 мин при 15 000 об/мин на центрифуге «HSC Type 310» (ПНР). Затем эритроциты ресуспендировали и промывали переосаждением в 900 мкл той же среды и 1 раз в среде с добавлением 200 мкМ  $\text{LaCl}_3$ . Осадок эритроцитов растворяли в 125 мкл 0,25 % раствора тритона X-100 и переносили на бумажные фильтры. Фильтры высушивали при 75°C, помещали во флаконы с толуольным сцинтиллятором и просчитывали их радиоактивность на сцинтилляционном счетчике SL-4000 (Франция). Удельную активность рассчитывали с учетом снижения эффективности счета в присутствии растворенных эритроцитов (в 1,7 раза) и потери клеток при промывках (в 1,2 раза).

Статистическую обработку проводили по Стьюденту.

В работе использовали соли марки о.с.ч., трис, ЭГТА фирмы «Serva» (ФРГ), АТФ фирмы «Реанал» (Венгрия) и «Sigma» (США), сапонин фирмы «Хемапол» (ЧССР),  $\text{HCl}$  и  $\text{H}_2\text{SO}_4$  — х.ч., малахитовый зеленый и поливиниловый спирт — ч.д.а. Растворы готовили на дистиллированной воде, содержащей около 10 мкМ  $\text{Ca}$ .

## Результаты и обсуждение

Определение зависимости активности  $\text{Ca}$ -АТФазы мембран эритроцитов от концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в присутствии эндогенных регуляторов показало, что максимальная активация фермента наблюдается в узкой области концентраций  $\text{Ca}^{2+}$  — 2—7 мкМ (рис. 1). Форма кривых этой зависимости у здоровых и больных не различалась, хотя значения активностей варьировали в широких пределах (рис. 1, 2). Измерение максимальной активности  $\text{Ca}$ -АТФазы при 3—5 мкМ  $\text{Ca}^{2+}$  в группе здоровых людей в возрасте 22—50 лет (54 человека) и в группе больных псориазом в возрасте 16—54 лет (34

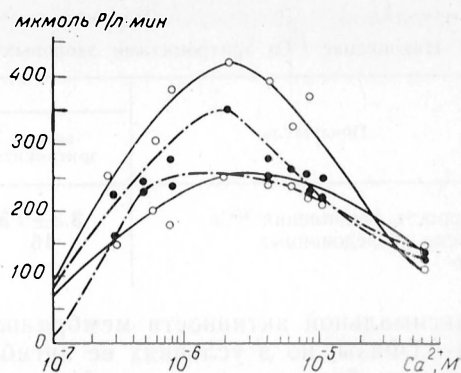


Рис. 1. Кривые зависимости активности  $\text{Ca}$ -АТФазы мембран эритроцитов человека от концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$ .

Сплошная линия — норма, пунктир — псориаз.

человека) обоего пола показало, что при отсутствии половых и возрастных различий вариабельность индивидуальной активности мало различается у здоровых и больных. Лишь примерно у 18 % больных активность была больше встречавшейся в норме.

Измерение скорости пассивного входа  $^{45}\text{Ca}$  в эритроциты при ингибировании  $\text{Ca}$ -АТФазы показало, что у больных псориазом эта скорость достоверно ( $p < 0,01$ ) выше на 61 %, чем у здоровых (табл. 2). После хранения образцов крови в течение 1 сут при 4°C скорость входа  $^{45}\text{Ca}$  увеличивалась на 66—69 % как у больных, так и у здоровых, однако достоверные ( $p < 0,05$ ) различия при этом сохранялись.

Полученные данные прежде всего свидетельствуют о том, что эритроциты больных псориазом не имеют существенных отклонений от нормы по

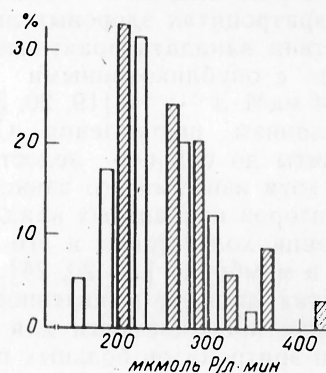


Рис. 2. Гистограммы индивидуального разброса максимальной активности  $\text{Ca}$ -АТФазы мембран эритроцитов человека.

Светлые столбики — норма, заштрихованные — псориаз. По оси ординат — количество обследованных.

Накопление  $^{45}\text{Ca}$  эритроцитами здоровых доноров и больных псориазом ( $\text{мкМ} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$ )

Показатель	Норма		Псориаз	
	свежие эритроциты	через 24 ч хранения	свежие эритроциты	через 24 ч хранения
Скорость накопления $^{45}\text{Ca}$	$3,3 \pm 0,57$	$5,52 \pm 2,14$	$5,23 \pm 2,7$	$8,7 \pm 4,0$
Число обследованных	16	12	11	9
$p$	—	—	$<0,01$	$<0,05$

максимальной активности мембранной Са-АТФазы, но в условиях ее ингибирования обладают повышенной способностью накапливать кальций.

Значение максимальной активности Са-АТФазы, измеренной нами в гемолизированных сапонином эритроцитах в присутствии эндогенных регуляторов, близко к величине, полученной для целых эритроцитов на эндогенном АТФ в присутствии Са-ионофора А23187 [22], что свидетельствует об адекватности использованного нами метода. Наблюдавшийся широкий разброс индивидуальных значений максимальной активности Са-АТФазы как у здоровых, так и у больных людей без видимой связи с полом и возрастом, по-видимому, указывает на многофакторную регуляцию этого фермента при заданных концентрациях  $\text{Ca}^{2+}$ . Учитывая, что такая концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  более чем в 10 раз выше имеющейся в интактных эритроцитах [12], можно полагать, что измерение максимальной активности фермента при столь широком индивидуальном разбросе не позволяет однозначно решать вопрос о нарушениях в работе и регуляции Са-АТФазы при патологии.

Полученные скорости накопления  $^{45}\text{Ca}$  в эритроцитах здоровых людей в присутствии ванадата практически совпадают с опубликованными ранее (около  $4 \text{ мкМ} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$ ) [19, 20, 24, 31]. Сам механизм поступления  $\text{Ca}^{2+}$  в эритроциты до сих пор недостаточно изучен, хотя известна его зависимость от блокаторов кальциевых каналов, от содержания холестерина и его производных в мембране [19, 20, 24]. Исходя из этих данных, выявленное нами увеличение проницаемости для  $\text{Ca}^{2+}$  мембран эритроцитов больных псориазом может быть обусловлено повышенным содержанием холестерина, характерным для эритроцитов таких больных [3, 6]. Однако последнее неоднозначно, так как высокий уровень хо-

лестерина в мембранах или интенсивность его синтеза в клетках может являться следствием повышенного входа кальция в клетки.

Повышенная проницаемость мембран эритроцитов  $\text{Ca}^{2+}$  у больных псориазом не может быть обусловлена в большинстве случаев увеличением доли ретикулоцитов, так как не наблюдалось параллельного повышения активности Са-АТФазы, характерного для таких образцов эритроцитов [33]. В соответствии с данными рис. 2 среди больных псориазом лишь у небольшой группы пациентов с увеличенной активностью Са-АТФазы может быть повышена доля ретикулоцитов в крови. Более вероятным является предположение о том, что изначально повышенная проницаемость для  $\text{Ca}^{2+}$  мембран клеток-предшественников искажает дифференцировку эритроидных клеток.

Выявленное повышение проницаемости мембран для  $\text{Ca}^{2+}$  у больных псориазом наряду с ранее показанными изменениями кальциевого обмена при данной патологии [7, 9] и лечебным действием блокаторов кальциевых каналов [5] позволяют полагать, что в основе патогенеза псориаза может быть системное нарушение мембранного транспорта кальция. По-видимому, таким нарушением является повышение проницаемости при  $\text{Ca}^{2+}$  плазматических мембран разных типов клеток. Выяснение природы этой проницаемости и причин ее повышения требуют дальнейших исследований не только мембран эритроцитов, но и других типов клеток.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гончаренко М. С. // Вестн. дерматол. — 1983. — № 6. — С. 7—11.
2. Гончаренко М. С. // Там же. — 1986. — № 7. — С. 27—29.
3. Гончаренко М. С. // Всесоюзный съезд дерматовенерологов, 8-й: Тезисы докладов. — М., 1985. — С. 18.

4. Гончаренко М. С., Мавров И. И., Бродская О. М. // Врач. дело. — 1983. — № 7. — С. 34—37.
5. Гончаренко М. С., Мавров И. И., Кондакова А. К. и др. Решение о выдаче авторского свидетельства по заявке № 4072552/28—14 от 14.08.87 г.
6. Гончаренко М. С., Катков И. Н. // Биофизика. — 1985. — Т. 30, № 3. — С. 441—445.
7. Задорожный Б. А. Псориаз. — Киев, 1983.
8. Капланский С. Я. Биохимия кожи. — М., 1931.
9. Кондакова А. К., Зовский В. И., Зосимов А. И., Петруняк В. В. // Дерматология и венерология. — Киев, 1985. — Вып. 20. — С. 12—16.
10. Петруняк В. В. // Украинский съезд дерматовенерологов, 5-й: Тезисы докладов. — Харьков, 1986. — С. 93.
11. Петруняк В. В., Безлепкина Т. А., Северина Е. П. // Всесоюзное совещание по транспортным АТФазам, 12-е: Тезисы. — М., 1987. — С. 29—30.
12. Покудин Н. И., Петруняк В. В., Орлов С. Н. // Биохимия. — 1988. — Т. 53, № 5. — С. 753—757.
13. Постнов Ю. В., Орлов С. Н. Первичная гипертензия как патология клеточных мембран. — М., 1987.
14. Durham A. C. II. // Cell Calcium. — 1983. — Vol. 4. — P. 33—34.
15. Fabiato A., Fabiato F. // J. Physiol. (Paris). — 1979. — Vol. 75. — P. 463—508.
16. Fillian M. B., MacKinney J. S., Fabiato A. et al. // J. biol. Chem. — 1983. — Vol. 258. — P. 15336—15345.
17. Goligorsky M. S., Chaimovitz C., Rapoport J. et al. // Kidney int. — 1985. — Vol. 27. — P. 774—779.
18. Hennings H., Holbrook K. // Ions, Cell Proliferation and Cancer. / Eds. A. L. Boynton et al. — New York, 1982. — P. 499—516.
19. Locher R., Neyses L., Stimpel M. et al. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1984. — Vol. 124. — P. 822—828.
20. McNamara M. K., Wiley Y. S. // Brit. J. Haemat. — 1987. — Vol. 66. — P. 401—403.
21. Metcalfe J. C., Moore J. P., Smith G. A., Hesketh T. R. // Brit. med. Bull. — 1986. — Vol. 42. — P. 405—412.
22. Muallem Sh., Karlish St. J. K. // Biochim. biophys. Acta. — 1982. — Vol. 687. — P. 329—332.
23. Muszbek L., Szabo T., Fesus L. // Analyt. Biochem. — 1977. — Vol. 77. — P. 286—288.
24. Neyses L., Locher R., Stimpel M. et al. // Biochem. J. — 1985. — Vol. 227. — P. 105—112.
25. Praeger F. C., Stanulis-Praeger B. M., Gilcrest B. A. // J. Cell. Physiol. — 1987. — Vol. 132. — P. 81—89.
26. Rasmussen H., Barrett P. Q. // Physiol. Rev. — 1984. — Vol. 64. — P. 938—984.
27. Rega A. F., Garrahan P. J. The  $\text{Ca}^{2+}$  Pump of Plasma Membranes. — Boca Raton, Fla., 1986.
28. So S. Y., Ip M., Lam W. K. // Lung. — 1986. — Bd 164. — S. 1—16.
29. Triggle D. J., Swamy V. S. // Circulat. Res. — 1983. — Vol. 52, Suppl. 1. — P. 17—28.
30. Trump B. F., Berezesky I. K., Laiho K. U. et al. // Scann. Electron. Microsc. — 1980. — Vol. 2, Pt 2. — P. 437—459.
31. Varechka L., Carafoli E. // J. biol. Chem. — 1982. — Vol. 257. — P. 7414—7421.
32. Weinstein D. B., Heider J. G. // Amer. J. Cardiol. — 1987. — Vol. 59. — P. 163-B—172-B.
33. Wiley Y. S., Shaller S. C. // J. clin. Invest. — 1977. — Vol. 59. — P. 1113—1119.

Поступила 15.06.88

# PERMEABILITY FOR $^{45}\text{Ca}$ AND ACTIVITY OF $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase IN ERYTHROCYTE MEMBRANES OF PATIENTS WITH PSORIASIS

V. V. Petrunya, M. S. Goncharenko, A. K. Kondakova, I. I. Mavrov

Institute of Biological Physics, Academy of Sciences of the USSR, Puschino, Institute of Dermatology and Venerology, Ministry of Public Health of the Ukrainian SSR, Kharkov

Accumulation of  $^{45}\text{Ca}$  in erythrocytes was 1.6-fold higher in presence of vanadate in patients with psoriasis as compared with healthy persons. This difference was maintained within 24 hrs of the heparinized blood storage, although penetration of  $\text{Ca}^{2+}$  through erythrocyte membranes was increased by about 67 % both in patients and in healthy persons. Maximal activity of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in erythrocyte membranes, measured in presence of endogenous regulators, was near normal values in the majority of the patients (15-300  $\mu\text{M}$  P/L er. min) and above normal values—in 18 % of the patients (320-420  $\mu\text{M}$  P/L er. min). The data obtained suggest that systemic impairments of membrane transport of  $\text{Ca}^{2+}$  are of importance for pathogenesis of psoriasis.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1989

УДК 616.379-008.64-07

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

## ПОЛУЧЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ДИАБЕТОГЕННОГО ФАКТОРА КРОВИ БОЛЬНЫХ ДИАБЕТОМ

Московский университет им. М. В. Ломоносова

В предшествующих исследованиях было показано [1, 6], что в крови больных диабетом людей и животных (крыс) присутствует белок альбумино-

вой природы с молекулярной массой 60 кДа, названный диабетогенным фактором (ДФФ) [4]. Он вызывает депрессию инсулярного аппарата [7],



а также функционального состояния противосвертывающей системы [5, 8].

Внутривенное введение ДГФ здоровым крысам обуславливало возникновение гипергликемии, сопровождающейся гиперкоагуляцией крови, о чем свидетельствовало снижение уровня эндогенного гепарина, а также отсутствие полноценной защитной реакции противосвертывающей системы против провокации тромбоза у крыс [5]. У реципиентов препарата ДГФ резко снижается концентрация иммунореактивного инсулина в плазме крови и повышается резистентность организма к инсулину [9].

С другой стороны, обнаружено, что предварительная инъекция гепарина здоровым животным устраняет гипергликемический эффект введенного ДГФ. *In vitro* показано блокирующее действие гепарина на активность ДГФ. Механизм защитного действия гепарина обусловлен его комплексообразованием с ДГФ [7].

Определен аминокислотный состав белка ДГФ. Содержание аминокислотных остатков с гидрофобными боковыми группами в молекуле ДГФ составляет 35 %. Следует отметить преобладание кислых аминокислот (25 %) [10].

Ранее ДГФ из крови больных выделяли, используя традиционные биохимические методы фракционирования с применением ультрацентрифугирования. В настоящей работе предпринята попытка выделения ДГФ из крови методами фракционирования и аффинной хроматографии на гепарин-сефарозе.

#### Методика

Для выделения ДГФ использовали кровь больных инсулинозависимым диабетом. Кровь получали из больницы № 67 при III Московском медицинском стоматологическом институте.

ДГФ выделяли общепринятым методом фракционирования до стадии получения альбуминовой фракции. Далее проводили аффинную хроматографию на колонке (1×16 см) с гепарин-сефарозой 4В (фирма «Farmacia»), уравновешенной 0,05 М трис-НСl-буфером при pH 7,6. Хроматографию по родству на гепарин-сефарозе выполняли в градиенте концентраций NaCl (0,15; 0,3; 0,7; 1 и 1,5 М) [14]. Диск-электрофорез в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия проводили по методу [13]. Измеряли гомогенность препарата и его молекулярную массу. Концентрацию белка в элюируемых фракциях с колонки определяли спектрофотометрическим методом по поглощению белка при длине волны 280 и 260 нм [2].

В выделенных фракциях измеряли ингибиторную активность по отношению к неферментному фибринолизу на нестабилизированных фибриновых пластинах по методу [3]. Активность выражали в условных единицах — одна условная единица активности соответствует уменьшению степени лизиса на нестабилизированном фибрине на 10 % и повышению уровня сахара в крови на 100 мг % [8].

#### Результаты

ДГФ, присутствующий в крови больных инсулинозависимым диабетом (I тип), удалось выделить и идентифицировать как индивидуальное соединение, отличное от других специфических диабетогенных метаболитов — глюкогона с молекулярной массой 3485 Да [15], соматотропного гормона с молекулярной массой не более 27 кДа [12] и других низкомолекулярных диабетогенных метаболитов [11].

Для изучения свойств и функций ДГФ была проведена очистка этого белка с помощью традиционных методов фракционирования и аффинной хроматографии на гепарин-сефарозе. Количественная характеристика этапов очистки ДГФ представлена в таблице.

Хроматографический анализ белков альбуминовой фракции с колонки гепарин-сефарозы в градиенте концентрации NaCl (0,15—1,5 М) показал, что свыше 70 % этой фракции плазмы крови больных не связывается с гепарин-сефарозой, практически не обнаружен белок в градиенте концентраций 0,3; 0,7 и 1 М NaCl, но установлено присутствие 23,9 % белка, элюируемого в градиенте концентрации 1,5 М NaCl.

При электрофоретическом анализе препарата белка, элюируемого при 1,5 М NaCl, было установлено, что этот белок гомогенен и имеет молекулярную массу  $60 \pm 2$  кДа.

В последующем исследовали биологическую активность полученных белковых фракций. Методом нестабилизированных фибриновых пластин было установлено, что белок, элюируемый с колонки в градиенте концентраций 1,5 М NaCl, обладает высокой ингибирующей активностью по отношению к неферментному фибринолизу. Так, зоны лизиса на нестабилизированном фибрине, полученные после действия плазмы крови в присутствии фракций белка при 1,5 М NaCl, снижались на 70—75 % по сравнению с теми же по-

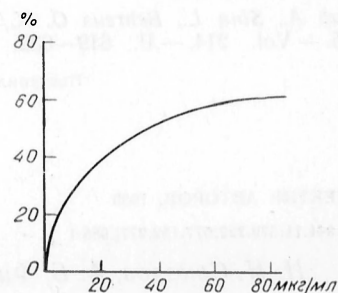
# Очистка ДГФ плазмы крови людей, больных инсулинозависимым диабетом

Стадия очистки	Объем фракций, мл	Общий белок, мг	Общая ингибиторная активность, ед.	Удельная активность, ед. на 1 мг белка	Выход, %	Степень очистки
1. Плазма	10	600	3,3	0,005	100	1
2. Осаждение сернокислым аммонием	8	300	3,3	0,01	100	2
3. Ультрацентрифугирование в градиенте плотности сахарозы	3,4	2,3	1,0	0,43	33	86
4. Аффинная хроматография с гепарин — сефарозой 4В	2,0	0,3	1,0	3,3	33	660

казателями, полученными с контрольной плазмой, проинкубированной с соответствующим контрольным буферным раствором (без препарата белка). Показано, что в процессе очистки препарата ДГФ повышается его удельная активность с 0,005 до 3,3 ед.

Было установлено, что биологическая активность выделенного из крови больных диабетом людей препарата ДГФ зависела от используемой концентрации. Как видно на рисунке, максимальное ингибирование активности неферментного фибринолиза (на 60 %) наблюдалось при использовании ДГФ в концентрации 70 мкг/мл. Минимально действующая концентрация ДГФ составляла 10 мкг/мл и снижала уровень неферментного фибринолиза на 30 %. Снижение концентрации препарата ДГФ ниже 5 мкг/мл обуславливало отсутствие выраженного биологического эффекта. Следовательно, выделенный нами препарат ДГФ способен проявлять биологическую активность даже при таких минимальных концентрациях, как 10—70 мкг/мл. Поскольку нами проведено сопоставление величин биологической активности препарата в отношении ингибирования неферментного фибринолиза и повышения уровня сахара в крови, по-видимому, даже малые дозы препарата ДГФ (10—70 мкг/мл) способны вызвать увеличение уровня глюкозы в крови.

Обобщая приведенные данные, можно отметить, что при аффинной очистке ДГФ, проведенной путем выделения белка по родству к гепарину, получен препарат, очищенный в 660 раз. Методом электрофореза в ПААГ не выявлено диссоциации молекулы ДГФ на субъединицы. Молекула этого белка содержит только одну полипептидную цепь с молекулярной массой порядка 60 кДа. Следовательно, нет ос-



Зависимость ингибиторной активности ДГФ по отношению к неферментному фибринолизу от концентрации препарата.

По оси абсцисс — концентрация ДГФ, мкг/мл; по оси ординат — ингибиторная активность, %.

нований предполагать, что ДГФ альбумин является носителем какого-то иного активного вещества.

## ЛИТЕРАТУРА

- Баскакова Г. М., Кудряшов Б. А., Пытель Ю. А. // Пробл. эндокринолог. — 1981. — № 4. — С. 42—45.
- Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. — М., 1980. — С. 226—228.
- Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А., Баскова И. П. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. биол. — 1974. — № 5. — С. 41—45.
- Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А., Ульянов А. М. // Пробл. эндокринолог. — 1985. — № 6. — С. 51—53.
- Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А., Ульянов А. М. // Физiol. журн. СССР. — 1986. — Т. 72, № 3. — С. 373—376.
- Кудряшов Б. А., Понасенкова Г. В., Пытель Ю. А. // Пробл. эндокринолог. — 1982. — № 5. — С. 61—64.
- Кудряшов Б. А., Пытель Ю. А., Баскакова Г. М. и др. // Пат. физиол. — 1982. — № 2. — С. 67—70.
- Кудряшов Б. А., Ульянов А. М., Ляпина Л. А. // Там же. — 1986. — № 4. — С. 44—47.

9. Кудряшов Б. А., Ульянов А. М., Ляпина Л. А. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 5. — С. 57—59.
10. Ляпина Л. А., Кудряшов Б. А., Баратова Л. А. // Там же. — 1987. — № 6. — С. 69—71.
11. Софроний А. В., Бочкарев М. В. // Здравоохранение (Кишинев). — 1982. — № 3. — С. 31—35.
12. Юдаев Н. А. // Тер. арх. — 1977. — № 5. — С. 6—11.
13. Fairbanks G., Steck T. L., Wallach D. F. H. // Biochemistry (Wash.). — 1971. — Vol. 10. — P. 2606—2616.
14. Koide T. J. // J. biol. Chem. — 1979. — Vol. 86. — P. 1841—1850.
15. Staub A., Sinn L., Behreus O. K. // Ibid. — 1955. — Vol. 214. — P. 619—632.

Поступила 27.06.88

## ISOLATION AND SOME PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF THE DIABETOGENIC FACTOR FROM BLOOD OF PATIENTS WITH DIABETES

B. A. Kudryashov, L. A. Lyapina, L. D. Azieva

M. V. Lomonosov State University, Moscow

A preparation of diabetogenic factor was purified 660-fold using affinity chromatography on heparin-Sepharose. Homogeneity of the preparation and its molecular mass (about 60 kDa) were evaluated in polyacrylamide gel electrophoresis. The fraction with high affinity to heparin exhibited the highest biological activity and was eluted by a solution with high ionic strength (1.5 M NaCl). Biological activity of the diabetogenic factor preparation correlated with its concentration in blood plasma *in vitro*.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1989

УДК 579.841.11:579.222:577.152.277.088.1

Н. Н. Соколов, А. Б. Фицнер, Н. В. Аникейчева, Н. А. Коваленко

## РОЛЬ ДВУХВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ В РЕАКЦИИ ЭНДОНУКЛЕОЛИЗА ДНК РЕСТРИКТАЗАМИ

НИИ медицинской энзимологии АМН СССР, Москва

Рестрикционные эндонуклеазы II класса (КФ 3.1.23.X), обладающие высокой специфичностью в отношении узнаваемой и расщепляемой ими последовательности нуклеотидов ДНК, представляют собой удобную модель для изучения белково-нуклеиновых взаимодействий. В связи с этим представляет интерес исследование механизма действия, каталитических свойств, строения рестриктаз, роли функциональных групп ферментов, кофакторов в катализируемой ими реакции гидролиза ДНК.

Ранее мы сообщали [6] о выделении и идентификации новых сайтспецифических эндонуклеаз PaeI и PaeII, продуцируемых *Pseudomonas aeruginosa* и оказавшихся истинными изошизомерами соответственно рестриктаз SphI и SmaI. Изучение потребности в кофакторах эндонуклеазы рестрикции PaeII выявило абсолютную зависимость этого фермента от моновалентных катионов [7]. Кроме того, рестриктаза PaeII катализирует расщепление ДНК фага  $\lambda$  в отсутствие экзогенного  $Mg^{2+}$ . Все это является нетипичным для рестриктаз II класса. Напротив, для проявления активности эндонуклеазы рестрикции PaeI требуются

двухвалентные катионы, в частности ионы  $Mg^{2+}$ ; активность фермента не зависит от моновалентных катионов.

Целью настоящей работы являлось изучение роли двухвалентных катионов в реакции эндонуклеолиза ДНК под действием рестриктазы PaeI.

## Методика

Рестриктазу PaeI выделяли с помощью разработанного нами метода [7]. При определении активности фермента в качестве субстрата использовали ДНК фага  $\lambda$  C1857, полученную, как описано ранее [4].

Тестирование рестриктазной активности проводили в буферном растворе со средней ионной силой [3]. После инкубации в пробы добавляли  $1/10$  объема смеси, содержащей 0,2 % бромфенолового синего, 0,2 М  $Na_2$ -ЭДТА (рН 8,0), 1 % додецилсульфата натрия и 50 % глицерина. Перед нанесением на гель пробы прогревали при 65 °С в течение 5 мин и быстро охлаждали в ледяной бане с целью диссоциации «липких концов» ДНК фага  $\lambda$ .

Разделение фрагментов ДНК осуществляли методом электрофореза в вертикальных пластинах 0,8 % агарозного геля в буфере, содержащем 40 мМ трис-ацетат (рН 8,3), 20 мМ ацетата натрия и 2 мМ  $Na_2$ -ЭДТА при 2—3 В/см ширины геля в течение 3—4 ч. Гель окрашивали в растворе бромистого этидия (1 мкг/мл, 15—20 мин) и фрагменты ДНК выявляли по флуоресценции в ультрафиолете при 254 нм. Гель фотографировали при ультрафиолетовом освещении.

трафиолетовом освещении через красный светофильтр.

За единицу активности рестриктазы PaeI принимали минимальное количество фермента (в мкл), которое необходимо для полного расщепления 1 мкг ДНК фага  $\lambda$  при 37°C за 60 мин инкубации в стандартных условиях инкубации.

При изучении влияния о-фенантролина на активность рестриктазы PaeI преинкубацию комплексона с ферментом проводили в отсутствие 2-меркаптоэтанолла, от которого освобождались с помощью гель-фильтрации на колонне с сефадексом G-50. Это было связано с тем, что в присутствии восстанавливающих соединений ионы  $Cu^{+2}$  и молекулярный кислород образуют  $Cu(I)$ -комплекс, продуцирующий гидроксильные радикалы, что приводит к деградации ДНК [14].

## Результаты и обсуждение

Имеющиеся в литературе данные о роли двухвалентных катионов в катализируемой рестриктазами II класса реакции эндонуклеолиза ДНК носят противоречивый характер. С одной стороны, показано, что в отсутствие ионов  $Mg^{2+}$  (в условиях, когда не происходит расщепления ДНК) рестриктаза EcoRI образует термодинамически и кинетически стабильный сайт-специфический комплекс с ДНК, задерживающийся на нитроцеллюлозных фильтрах [10, 13]. С другой стороны, на основании данных о взаимодействии рестриктазы EcoRI с синтетическими олигонуклеотидами полагают [9], что специфическое связывание фермента с участками узнавания на молекуле ДНК зависит от ионов  $Mg^{2+}$ . Роль  $Mg^{2+}$  в реакции эндонуклеолиза ДНК под действием рестриктаз может заключаться в координировании остатков фосфата в ДНК-расщепляющем комплексе [11]. В этом случае можно предположить образование тройного комплекса типа фермент — металл — субстрат. Одним из доказательств того, что металл выполняет роль мостика, соединяющего фермент и субстрат, является продолжительность латентного периода инициации реакции каждым из компонентов тройного комплекса [2]. Для выяснения этого вопроса был выполнен ряд экспериментов.

Рестриктазу PaeI инкубировали (5 мин, 10°C) с ДНК фага  $\lambda$  и затем добавляли ионы  $Mg^{2+}$  в оптимальной концентрации, либо сначала преинкубировали ДНК с  $Mg^{2+}$  и затем вносили фермент, либо последний выдерживали с  $MgCl_2$ , после чего добавляли рестриктазу PaeI. После внесения тре-

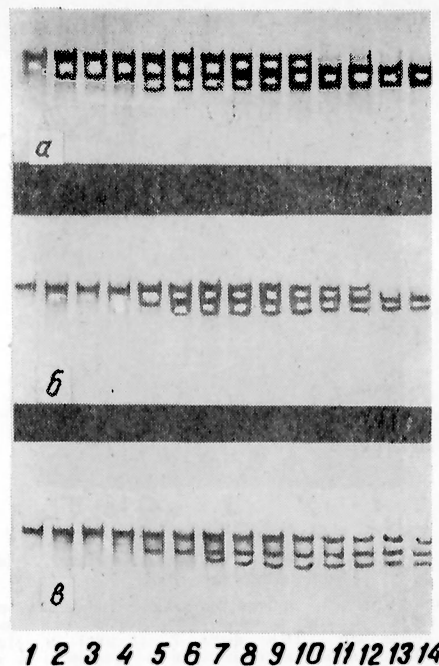


Рис. 1. Динамика расщепления ДНК фага  $\lambda$  рестриктазой PaeI.

Преинкубировали (5 мин, 10°C): а — фермент (2 ед.) и ДНК фага  $\lambda$  (1 мкг); б — фермент и  $MgCl_2$  (10 мМ); в — ДНК и  $MgCl_2$ . Далее в пробы добавляли  $MgCl_2$  (а), ДНК (б) или фермент (в). Объем смеси — 280 мкл. Активность рестриктазы PaeI определяли в течение 15, 30, 45, 60 с, 1, 5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10 мин инкубации при 10°C (соответственно дорожки 1—14), отбирая аликвоты объемом 20 мкл.

тьего компонента инкубационной смеси в течение 10 мин через различные промежутки времени отбирали аликвоты и останавливали реакцию.

Проведение инкубации при 10°C объясняется тем, что в условиях оптимальной для действия фермента температуры (37°C) невозможно уловить различия в интенсивности (глубине расщепления) гидролиза ДНК.

Установлено, что в случае преинкубации эндонуклеазы PaeI с ДНК фага  $\lambda$  и последующего добавления  $MgCl_2$  реакция гидролиза ДНК наступает практически мгновенно, через 15—30 с, о чем можно судить по появлению фрагментов ДНК и убыли интактной ДНК (рис. 1). В то же время при инкубации рестриктазы PaeI или ДНК с  $MgCl_2$  и последующем добавлении недостающего компонента инкубационной смеси проходит латентный период в 45—60 с, прежде чем можно наблюдать накопление фрагментов ДНК.

Такой результат указывает, во-первых, на то, что ионы  $Mg^{2+}$ , вероятно, не требуются для образования фер-



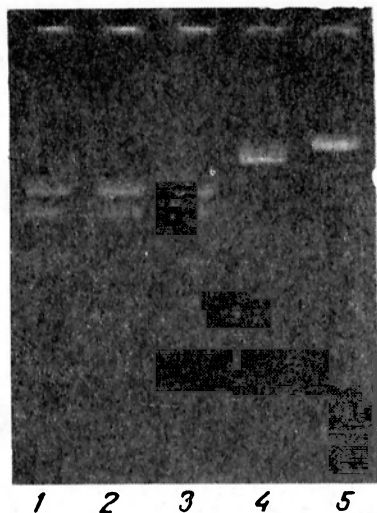


Рис. 2. Влияние о-фенантролина на активность рестриктазы PaeI.

Фермент (1 ед.) преинкубировали с о-фенантролином (37°C, 20 мин) в пробе объемом 60 мкл, после чего добавляли ДНК фага  $\lambda$  (1 мкг) и  $MgCl_2$  (10 мМ). Инкубацию проводили в течение 1 ч при 37°C. Концентрация комплексона в пробах 1, 2, 3, 4, и 5 составляла соответственно 1, 2, 2,5, 3 и 4 мМ.

мент-субстратного комплекса, а связывание рестриктазы PaeI с ДНК фага  $\lambda$  осуществляется в отсутствие катионов  $Mg^{2+}$ , что согласуется с данными других исследователей [10, 13]. Об этом свидетельствует и защитный эффект ДНК-субстрата, но не ионов  $Mg^{2+}$  в отношении тепловой инактивации фермента. Как было показано нами ранее [5], важную роль в связывании ДНК рестриктазой PaeI могут иметь сульфгидрильные группы. Вторых, быстрое иницирование реакции гидролиза ДНК ионами  $Mg^{2+}$  предполагает дестабилизацию фермент-субстратного комплекса. Последнее согласуется с результатами, полученными ранее при исследовании связывания рестриктазы EcoRII с синтетическими ДНК-дуплексами конкатамерного типа различной длины, которые содержали повторяющиеся через 9 нуклеотидов EcoRII-сайты. Было установлено [11], что при образовании комплекса фермента с синтетическими субстратами в отсутствие  $Mg^{2+}$  значение  $K'$  (характеризует термодинамическую стабильность комплекса) в 5 раз выше, чем в среде, содержащей  $MgCl_2$  (50 мМ).

При изучении неспецифического взаимодействия эндонуклеазы EcoRI с ДНК также было показано [15], что ионы  $Mg^{2+}$  необходимы скорее для ги-

дролита фосфодиэфирных связей ДНК, чем для связывания ДНК-субстрата.

Оптимальная концентрация ионов  $Mg^{2+}$  для рестриктазы PaeI составляет 5—10 мМ. Фермент проявляет активность в случае замены  $Mg^{2+}$  на  $Mn^{2+}$  или  $Ca^{2+}$ , но не гидролизует ДНК фага  $\lambda$  при замене  $Mg^{2+}$  на  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  или  $Ni^{2+}$ . Рестриктаза PaeI использует в качестве кофактора ионы  $Zn^{2+}$  и  $Co^{2+}$  в крайне низких концентрациях (соответственно 0,0001—0,05 и 0,005—0,05 мМ). В концентрации выше 0,1 мМ ионы  $Zn^{2+}$  и  $Co^{2+}$  полностью подавляют активность фермента.

С целью изучения роли ионов  $Zn^{2+}$  в реакции эндонуклеолиза ДНК рестриктазой PaeI фермент инкубировали с о-фенантролином, связывающим катионы  $Zn^{2+}$ . В случае предварительной инкубации рестриктазы PaeI с о-фенантролином при температуре 37°C полная инактивация фермента происходила при концентрации комплексона, равной 2,0 мМ (рис. 2).

Проведение преинкубации при температуре 20°C привело к необходимости повышения концентрации о-фенантролина для полного подавления активности рестриктазы PaeI до 3 мМ.

Таким образом, для функционирования рестриктазы PaeI важное значение, вероятно, имеют ионы  $Zn^{2+}$ , прочно встроенные в структуру фермента. То, что для угнетения активности рестриктазы PaeI при температуре преинкубации 37°C требуются более низкие концентрации о-фенантролина, может быть связано с изменением нативной конформации белковой молекулы в этих условиях, в результате чего ионы  $Zn^{2+}$  становятся более доступными для связывания с ингибитором. Угнетение о-фенантролином активности рестриктазы PaeI не обусловлено хелатированием ионов  $Mg^{2+}$ , поскольку ингибирующая концентрация комплексона в инкубационной смеси была значительно ниже таковой  $Mg^{2+}$  (соответственно 2 и 10 мМ). Что касается подавления активности фермента высокими концентрациями ионов  $Zn^{2+}$ , то это может быть связано с взаимодействием ионов металла с тиоловыми группами белковой молекулы, что описано для целого ряда ферментов [2].

Известно, что в структуре рестриктазы EcoRI, ДНК-полимераз животных, вирусов, бактерий, обратной транскриптазы, РНК-полимеразы

вирусов, дрожжей, грибов, *Bacillus subtilis* присутствуют ионы  $Zn^{2+}$ , выполняющие каталитическую функцию [8, 12]. Тот факт, что ионы  $Zn^{2+}$  необходимы для функционирования многих ферментов, использующих в качестве субстрата или матрицы полинуклеотиды, в том числе и рестриктаз, свидетельствует о возможной роли этого металла в белково-нуклеиновом узнавании, образовании комплекса ДНК—белок.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Виноградова М. Н., Громова Е. С., Пурмаль А. А. и др. // Молекул. биол. — 1986. — Т. 20. — С. 1329—1336.
2. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты: Пер. с англ. — М., 1982.
3. Маннати Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. — М., 1984. — С. 115.
4. Соколов Н. Н., Вотрин И. И., Фицнер А. Б., Аникейчева Н. В. // Биохимия. — 1978. — Т. 43. — С. 865—871.
5. Соколов Н. Н., Фицнер А. Б., Аникейчева Н. В. и др. // Бюл. экспер. биол. — 1986. — № 12. — С. 695—697.
6. Соколов Н. Н., Колоша В. О., Фицнер А. Б. и др. // Молекул. генет. — 1986. — № 5. — С. 24—26.
7. Соколов Н. Н., Фицнер А. Б., Аникейчева Н. В. и др. // Биотехнология. — 1987. — Т. 3. — С. 578—584.
8. Barton J. K., Basile L. A., Paranawithana S. R. // J. biol. Chem. — 1982. — Vol. 257. — P. 7911—7914.
9. Goppelt M., Pingoud A., Maas G. et al. // Europ. J. Biochem. — 1980. — Vol. 104. — P. 101—107.

10. Halford S. E., Johnson N. P. // Biochem. J. — 1980. — Vol. 191. — P. 593—605.
11. Lu A.-L., Jack W. E., Modrich P. // J. biol. Chem. — 1981. — Vol. 256. — P. 13200—13206.
12. Mildvan A. S., Loeb L. A. // CRC Crit. Rev. Biochem. — 1979. — Vol. 6. — P. 219—244.
13. Modrich P. // Quart. Rev. Biophys. — 1979. — Vol. 12. — P. 315—369.
14. Que B. G., Downey K. M., So A. G. // Biochemistry (Wash.). — 1980. — Vol. 19. — P. 5987—5991.
15. Woodhead J. L., Malcolm A. D. B. // Nucl. Acids Res. — 1980. — Vol. 8. — P. 389—402.

Поступила 01.07.88

#### ROLE OF TWO-VALENT CATIONS IN ENDONUCLEOLYSIS OF DNA CATALYZED BY RESTRICTASES

N. N. Sokolov, A. B. Fitzner, N. V. Anikeycheva, N. A. Kovalenko

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

Electrophoretic analysis of products obtained after hydrolysis of phage  $\lambda$  DNA by means of restrictase Pae I was carried out after preincubation of DNA or the enzyme with  $Mg^{2+}$  as well as after preincubation of DNA simultaneously with the enzyme and the subsequent addition of the required components into the experimental samples. The analysis showed that  $Mg^{2+}$  were apparently not required for the enzyme-substrate complex formation and caused destabilization of the complex. Restrictase Pae I was in active form when  $Mg^{2+}$  was substituted by  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  but not by  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  or  $Ni^{2+}$ . Experiments with o-phenanthroline showed that  $Zn^{2+}$  cations are of importance in catalytic activity of restrictase Pae I. Possible functions of  $Zn^{2+}$  in protein-nucleic acids recognition are discussed.

© В. К. МАЗО, Н. Ф. САМЕНКОВА, 1989

УДК 616.153.96-073.916

В. К. Мазо, Н. Ф. Саменкова

#### СВЯЗЫВАНИЕ $^3H$ -АЛАНИНА И $^{125}I$ -ДИИОДИТИРОЗИНА БЕЛКАМИ СЫВОРОТКИ КРОВИ В ОПЫТАХ IN VITRO И IN VIVO

Институт питания АМН СССР, Москва

Вопрос о возможном связывании свободных аминокислот и коротких пептидов с белками сыворотки крови представляет особый интерес в связи с проблемой количественной оценки всасывания нерасщепленных белков и их крупных фрагментов из желудочно-кишечного тракта животных и человека [6, 19]. Аномально высокие значения всасывания экзогенных изотопно-меченых высокомолекулярных соединений, полученные в ряде работ [7, 8, 16, 17], объясняются, по-видимому, комплекси-

рованием свободных аминокислот и олигопептидов, несущих изотопную метку, с сывороточными белками крови [19]. Тезис о комплексировании свободных аминокислот с белками сыворотки крови находится, однако, в определенном противоречии с представлениями о том, что такое взаимодействие в условиях, близких к физиологическим, не имеет места [2, 14]. Исключение составляют триптофан, 75 % молекул которого связаны в плазме кро-

ви с сывороточным альбумином [14], а также цистин и цистеин [10, 11].

В данной работе предпринята попытка количественно оценить связывание  $^3\text{H}$ -аланина,  $^{125}\text{I}$ -дийодтирозина с белками сыворотки крови экспериментальных животных (крыс, морских свинок) в опытах *in vitro* и *in vivo*.

### Методика

В работе использованы следующие препараты: бычий сывороточный альбумин (БСА), выпускаемый предприятием по производству бактериальных препаратов Белорусского НИИ эпидемиологии и микробиологии. Препарат не содержит обнаруживаемых электрофоретически посторонних примесей, состоит из мономера БСА с минорной примесью димера;  $^{125}\text{I}$ -дийодтирозин, полученный путем введения  $^{125}\text{I}$  в дийодтирозин («Serva», ФРГ) [12];  $^3\text{H}$ -аланин (ЛМО «Изотоп») — 50 % водно-этаноловый раствор, общая радиоактивность 40 мБк.

Связывание  $^{125}\text{I}$ -дийодтирозина и  $^3\text{H}$ -аланина с БСА определяли в опытах *in vitro*. К 0,9 мл растворов немеченых дийодтирозина (интервал концентраций  $10^{-4}$ — $10^{-3}\text{M}$ ) и аланина ( $10^{-3}$ — $10^{-1}\text{M}$ ) приливали соответственно 10 мкл раствора  $^{125}\text{I}$ -дийодтирозина (0,57 мкКи) и 20 мкл раствора  $^3\text{H}$ -аланина (1,57 мкКи). Полученные таким образом растворы меченых аминокислот инкубировали в течение 60 мин при  $30^\circ\text{C}$  с растворами БСА (при объемном соотношении 1:1). Концентрация раствора БСА при инкубации с раствором  $^{125}\text{I}$ -дийодтирозина составляла  $10^{-4}\text{M}$ , а при инкубации с раствором  $^3\text{H}$ -аланина —  $10^{-3}\text{M}$ . Связывание меченых аминокислот БСА определяли методом гель-фильтрации, используя собственную модификацию методики, предложенной в работе [18]. Для этого микроколонку (1 мл) заполняли гелем сефадекса G-25 («Fine») в физиологическом растворе, затем помещали колонку в центрифужный стакан и, центрифугируя в течение 60 с при 1500 об/мин на центрифуге ОПН-3, удаляли из геля жидкость, заполнявшую свободный объем колонки. Затем на поверхность геля наносили 50 мкл инкубата и 50 мкл физиологического раствора. В контрольном эксперименте на колонку наносили раствор меченой аминокислоты, не содержащей БСА. Концы микроколонок опускали в специальные пробирки, помещали в центрифужные стаканы и центрифугировали 60 с при 1500 об/мин. Определяли радиоактивности растворов в пробирках в опытном ( $A_1$ ) и контрольном ( $A_2$ ) экспериментах. По величине разности  $A_1 - A_2$ , соответствующей радиоактивности, выходящей в свободном объеме колонки, определяли связывание  $^3\text{H}$ -аланина и  $^{125}\text{I}$ -дийодтирозина с БСА.

Связывание указанных изотопно-меченых аминокислот белками сыворотки крови исследовали также в экспериментах *in vivo*. Крысам-самцам линии Вистар массой 300—350 г, предварительно голодавшим в течение 20 ч, внутривенно вводили 0,4—0,5 мл  $2,5 \cdot 10^{-3}\text{M}$  раствора  $^{125}\text{I}$ -дийодтирозина (14,9 мкКи) или  $3,3 \cdot 10^{-2}\text{M}$   $^3\text{H}$ -аланина (30,8 мкКи). Через 10 мин после введения аминокислоты кровь

собирали из нижней полой вены. Беспородным морским свинкам-самцам массой 270—340 г внутрисердечно вводили 0,6 мл  $2 \cdot 10^{-3}\text{M}$  раствора  $^3\text{H}$ -аланина (6,1 мкКи). Через 10, 20 и 30 мин забирали кровь из сердца.

Для доказательства обратимости связывания  $^3\text{H}$ -аланина и  $^{125}\text{I}$ -дийодтирозина с белками сыворотки крови экспериментальных животных эти сыворотки инкубировали с раствором мочевины, концентрация которой в инкубате составляла 8 М. Для этого к 1 объему сыворотки добавляли 2 объема 12 М мочевины и оставляли на 12—16 ч при  $37^\circ\text{C}$  [6]. На следующий день инкубат подвергали гель-фильтрации на микроколонках с сефадексом G-25, как описано выше.

### Результаты и обсуждение

На первом этапе работы были проведены эксперименты *in vitro* по оценке возможного связывания  $^3\text{H}$ -аланина и  $^{125}\text{I}$ -дийодтирозина БСА, являющимся, как известно, универсальным транспортным белком [3, 5]. Как видно из табл. 1, по мере увеличения концентрации аминокислоты в инкубируемой смеси при постоянной концентрации БСА имеет место уменьшение связывания аминокислоты по отношению к ее исходной концентрации. Одновременно по отношению к БСА связывание возрастает, оставаясь, однако, по абсолютной величине весьма незначительным. Так, например, при 75-кратном молярном избытке  $^3\text{H}$ -аланина по сравнению с БСА соотношение  $^3\text{H}$ -аланин<sub>связ</sub>/БСА все еще меньше 1. Приближенный расчет константы ассоциации аминокислоты и белка ( $K_{асс}$ ) может быть сделан по формуле [3]:

$$K_{асс} = \frac{C_b}{C_f(N \cdot P \cdot C_b)},$$

где  $C_b$  — концентрация аминокислоты в связанной форме;  $C_f$  — концентрация аминокислоты в свободной форме;  $N$  — число молекул аминокислоты в связанной форме (на 1 молекулу белка);  $P$  — концентрация белка.

Рассчитанные таким образом величины  $K_{асс}$  для  $^3\text{H}$ -аланина и  $^{125}\text{I}$ -дийодтирозина составляют  $10^3 \text{ M}^{-1}$ , что свидетельствует о слабом сродстве этих аминокислот к альбумину [3]. Полученные данные в определенной степени объясняют результаты ранее проведенных исследований, в которых методом равновесного диализа не удавалось получить достоверных доказательств связывания свободных аминокислот с белками плазмы крови (за исключением триптофана) [9, 13].

Таблица 1

Связывание  $^3\text{H}$ -аланина и  $^{125}\text{I}$ -дийодтирозина БСА в опытах *in vitro*

Исходные соотношения БСА — $^{125}\text{I}$ -дийодтирозин (моль/моль)	Число опытов	Связывание $^{125}\text{I}$ -дийодтирозина		Исходные соотношения БСА — $^3\text{H}$ -аланин (моль/моль)	Число опытов	Связывание $^3\text{H}$ -аланина	
		1	2			1	2
1:1	7	$0,92 \pm 0,11$	0,01	1:1	8	$2,75 \pm 0,55$	0,03
1:5	8	$0,93 \pm 0,15$	0,05	1:10	8	$2,17 \pm 0,37$	0,22
1:15	8	$0,67 \pm 0,14$	0,10	1:20	7	$1,62 \pm 0,30$	0,32
1:20	8	$0,68 \pm 0,11$	0,14	1:25	8	$1,24 \pm 0,20$	0,31
1:25	8	$0,52 \pm 0,07$	0,13	1:50	7	$1,17 \pm 0,09$	0,58
1:30	8	$0,59 \pm 0,05$	0,18	1:75	7	$1,11 \pm 0,23$	0,83

Примечание. 1 — радиоактивность, выходящая в свободном объеме микроколоники (в % от радиоактивности инкубата, наносимого на микроколонику); 2 — отношение концентрации связанной с БСА аминокислоты к концентрации БСА в инкубате (моль/моль).

Так, например, слишком большой разброс экспериментальных данных, полученных в работе [13], не позволил, по-видимому, обнаружить связывание белком аминокислот, обладающих к нему невысоким сродством. Однако вывод об отсутствии комплексообразования аминокислот с сывороточными белками в системе *in vitro* не может быть автоматически перенесен на систему *in vivo*. Об этом свидетельствуют результаты исследований по связыванию белками крови  $^3\text{H}$ -аланина и  $^{125}\text{I}$ -дийодтирозина при введении этих аминокислот морским свинкам и крысам. Как видно на рисунке, в течение первых 10 мин имеет место быстрая элиминация  $^3\text{H}$ -аланина из кровотока морских свинок. В последующие 20 мин этот процесс существенно замедляется.

В табл. 2 представлены данные о связывании *in vivo* белками крови меченых аминокислот и о влиянии на образующиеся комплексы 8 М мочевины. Согласно этим данным, степень связы-

вания  $^{125}\text{I}$ -дийодтирозина белками сыворотки крови выше, чем  $^3\text{H}$ -аланина.

Под действием 8 М мочевины имеет место диссоциация значительной части комплексов белки крови — меченая аминокислота, как это было показано ранее [6]. В то же время диссоциация комплексов 8 М мочевиной не является полной, о чем свидетельствуют данные табл. 2, отражающие «необратимое» связывание метки сывороточными белками. При введении животному  $^3\text{H}$ -аланина нельзя исключить возможности включения меченой аминокислоты в макромолекулы сывороточных белков *de novo*, на что в какой-то мере может указывать относительно высокий процент метки (около 30 %), не диссоциирующей при инкубации сыворотки с 8 М мочевиной. Как видно из табл. 2, соответствующая величина для  $^{125}\text{I}$ -дийодтирозина не превышает 4 %. Существенно более полная диссоциация комплексов сывороточные белки —  $^{125}\text{I}$ -дийодтирозин соответствует имею-

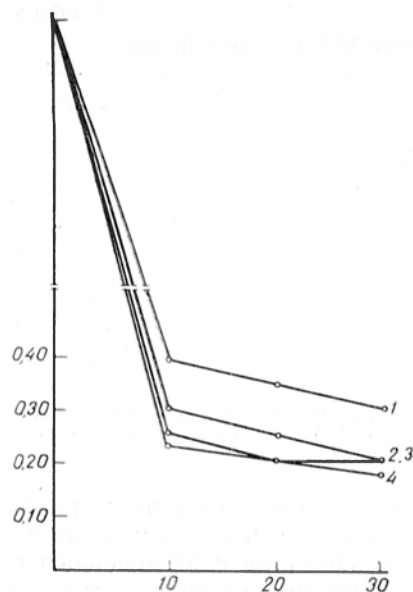
Таблица 2

Связывание  $^3\text{H}$ -аланина и  $^{125}\text{I}$ -дийодтирозина белками сыворотки крови экспериментальных животных и диссоциация образующихся комплексов под действием 8 М мочевины

Вид животного	Число животных	Аминокислота	Связывание аминокислот через различное время после внутривенного введения, мин					
			10		20		30	
			1	2	1	2	1	2
Морские свинки	4	$^3\text{H}$ -аланин	$3,3 \pm 0,7$	$1,1 \pm 0,3$	$3,1 \pm 0,4$	$1,1 \pm 0,3$	$2,5 \pm 0,4$	$0,8 \pm 0,2$
Крысы	3	$^{125}\text{I}$ -дийодтирозин	$14,6 \pm 2,1$	$0,5 \pm 0,1$	—	—	—	—

Примечание. 1 — радиоактивность, связываемая сывороточными белками крови (в % от общей радиоактивности, обнаруживаемой в сыворотке крови); 2 — радиоактивность, связываемая сывороточными белками крови после инкубации сыворотки с 8 М мочевиной (в % от общей радиоактивности, обнаруживаемой в сыворотке крови).





Элиминация  $^3\text{H}$ -аланина из кровотока морских свинок после его внутрисердечного введения. По оси абсцисс — время после введения (в мин); по оси ординат — радиоактивность в сыворотке крови (в % от введенной дозы). 1—4 — кривые, соответствующие опытам на отдельных животных.

щимся представлением о том, что  $^{125}\text{I}$ -дийодитирозин не способен включаться в процессы белкового биосинтеза [12].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что основной причиной появления «высокомолекулярной» метки в сыворотке крови экспериментальных животных при внутривенном введении  $^3\text{H}$ -аланина и  $^{125}\text{I}$ -дийодитирозина является обратимое связывание этих аминокислот белками крови.

Количественные оценки связывания указанных меченых аминокислот сывороточными белками, полученные в данной работе методом гель-фильтрации, по-видимому, несколько занижены. Это связано с тем, что белки сыворотки постепенно освобождаются от связанных аминокислот вследствие диссоциации обратимых комплексов при перемещении инкубата по колонке, т. е. по мере того, как уходят в поры гранул сефадекса не связанные с белком аминокислоты [3]. Максимальное снижение диссоциации комплексов в процессе их прохождения через колонку достигалось использованием микроколонок, в которых объем геля был минимальным и в то же время достаточным для полного разделения комплек-

сов и низкомолекулярных лигандов (свободных аминокислот). Представленные в работе доказательства связывания свободных аминокислот сывороточными белками в определенной мере дополняют данные литературы о комплексовании с белками крови гормонов пептидной природы [1, 15]. Это позволяет предполагать, что олигопептиды (как продукты неполного расщепления пищевого белка) могут в составе потока гормонов и других физиологически активных веществ поступать в кровь из желудочно-кишечного тракта [4] и взаимодействовать с сывороточными белками крови.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Климов П. К., Полосатов М. В. // Физиол. журн. СССР. — 1977. — Т. 63, № 2. — С. 313—319.
2. Коньшев В. А. // Вопр. мед. химии. — 1973. — № 4. — С. 339—350.
3. Луйк А. И., Лукьянчук В. Д. Сывороточный альбумин и биотранспорт ядов. — М., 1984.
4. Уголев А. М. Эволюция пищеварения и принципы эволюции функций. — Л., 1985.
5. Чегер С. И. Транспортная функция сывороточного альбумина. — Бухарест, 1975.
6. Шатерников В. А., Мазо В. К. // Физиол. журн. СССР. — Т. 72, № 4. — С. 453—457.
7. Hemmings C., Hemmings W. A., Paley A. L., Wood C. // Proc. roy. Soc. (Lond.). — 1977. — Vol. 198. — P. 439—453.
8. Hemmings W. A., Williams E. W. // Gut. — 1978. — Vol. 19, N B. — P. 715—723.
9. Hunter M. J., Commerford B. L. // J. Amer. Chem. Soc. — 1955. — Vol. 77, N 18. — P. 4857—4859.
10. Eagle H., Oyama V. I., Piez K. A. // J. biol. Chem. — 1960. — Vol. 235, N 6. — P. 1719—1726.
11. Esles T. E., Jocelyn P. G. // Biochem. J. — 1963. — Vol. 88. — P. 84—88.
12. Jones R. E. // Proc. roy. Soc. (Lond.). — 1977. — Vol. 199-B. — P. 279—290.
13. Menamy M. R. H., Lund C. S., Oncley J. L. // J. clin. Invest. — 1957. — Vol. 36, N 12. — P. 1672—1679.
14. Peters T. // Advances in Clinical Chemistry / Eds O. Bodansky, C. P. Stewart. — New York, 1970. — Vol. 13. — P. 37—111.
15. Possenti R., De Marco V., Cherubini O., Roda J. G. // Neurochem. Res. — 1983. — Vol. 8. — P. 423—432.
16. Rothman D., Latham M. C., Walker W. A. // Nutr. Res. — 1982. — Vol. 2, N 4. — P. 71—77.
17. Seifert J., Ganzer R., Brendel W. // Z. Gastroent. — 1979. — Bd 17, N 1. — S. 1—8.
18. Tuszyński G. P., Knight L. C., Piperino J. R. // J. Labelled Compounds Radiopharm. — 1981. — Vol. 18, N 1—2. — P. 206—208.
19. Udall J. N., Bloch K. J., Fritz L., Walker W. A. // Immunology. — 1981. — Vol. 42, N 2. — P. 251—257.

Поступила 14.07.88

V. K. Mazo, N. F. Samenkova

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

© В. Ф. НАГОРНАЯ, 1989

УДК 618.11-006.03-092:618.11-008.931:577.152.344

В. Ф. Нагорная

## ЭЛАСТАЗА И ЕЕ ИНГИБИТОРЫ В ПАТОГЕНЕЗЕ ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ ЯИЧНИКОВ

Одесский медицинский институт им. Н. И. Пирогова

Известно, что некоторые протеазы необходимы для осуществления механизмов овуляции [6, 7]. Эта группа ферментов в равной степени может выполнять как регуляторную [2], так и деструктивную функцию [8]. Высокая биологическая активность, универсальность действия позволяют протеазам принимать участие в защитных реакциях, делении и росте клеток, злокачественной трансформации, процессах метастазирования [1—5, 9].

Целью настоящего исследования явилось изучение роли в патогенезе доброкачественных опухолей яичников эластазы и ее ингибиторов:  $\alpha_2$ -макроглобулина,  $\alpha_1$ -антихимотрипсина, ингибитора трипсина. Известно, что ткань яичника, в особенности мозговое вещество, богата эластическими волокнами. Последние содержат эластин, расщепляющийся под воздействием эластазы.

### Методика

Обследовано 114 больных с доброкачественными опухолями яичников без признаков осложнений (перекрут ножки, разрыв капсулы, нагноение) и 30 практически здоровых женщин, составивших контрольную группу. Группы были однородными по возрасту (20—40 лет).

У всех больных проведено общеклиническое и специальное гинекологическое исследование: тесты функциональной диагностики (кольпцитологическое исследование, базальная температура, шеечные тесты), у подавляющего большинства — диагностическое выскабливание слизистой матки во второй половине цикла. У всех больных определяли половые гормоны. Из обследованных у 46 женщин, по данным тестов функциональной диагностики и содержания половых гормонов во

Considerable amount of complexes, formed after binding of  $^3\text{H}$ -alanine and  $^{125}\text{I}$ -diiodotyrosine with blood serum proteins *in vivo* and *in vitro* was found to dissociate as a result of gel filtration on microcolumns of Sephadex G-25 in presence of 8 M urea. The phenomenon observed may be considered among possible reasons responsible for overestimation of the adsorption rate of food proteins antigens in gastrointestinal tract of experimental animals.

II фазе цикла, установлен двуфазный менструальный цикл, у 68 — ановуляторный цикл. При анализе полученных данных дни менструального цикла синхронизировались соответственно данным ректальной температуры. День подъема температуры считался 0-м днем (у подавляющего большинства больных — 14-й день менструального цикла), дни I фазы цикла считались от 0-го со знаком —, дни II фазы отсчитывались от 0-го дня со знаком + (рис. 1 и 2). Клиническая картина заболевания характеризовалась полиморфностью проявлений: болевой синдром, нарушение менструального цикла, снижение детородной функции. Период с момента обнаружения опухоли, совпадающий с появлением первых клинических признаков заболевания, до операции у всех больных не превышал полугода. По гистологическому характеру опухоли исследуемая группа распределилась следующим образом: серозные опухоли — у 65 (у 58 — гладкостенные, у 7 — папиллярные), муцинозные — у 12. Среди обследованных были группа женщин (37) со зрелыми тератомами. Кровь брали у 102 больных на 5—7—9, 13—15, 19—23-й дни и ежедневно у 12 человек. В сыворотке крови определяли активность эластазы и двух ее ингибиторов — ингибитора трипсина и  $\alpha_2$ -макроглобулина. В тканях яичников определяли эластазу, ингибитор химотрипсина, ингибитор трипсина. Ткани для исследования брали во время операции из двух точек — капсулы опухоли и сохранившейся яичниковой ткани (как правило, у ворот яичника). Для исследований также использовали ткани 10 яичников молодых (до 25 лет) здоровых женщин, погибших в автокатастрофе или в результате суицида. Материал поступал из отделения консервации тканей при отделении областной судебной экспертизы не позже 4 ч после гибели женщины. Предварительно в эксперименте на крысах было показано, что активность протеолитических ферментов в яичниках не изменяется в ближайшие 6 ч после гибели животного. В контрольной группе ткань для исследования брали тоже из двух точек: поверхность иссекали участок яичника, состоящий преимущественно из белочной оболочки, и участок из толщи яичника, представляющий собой мозговое вещество. Преследова-

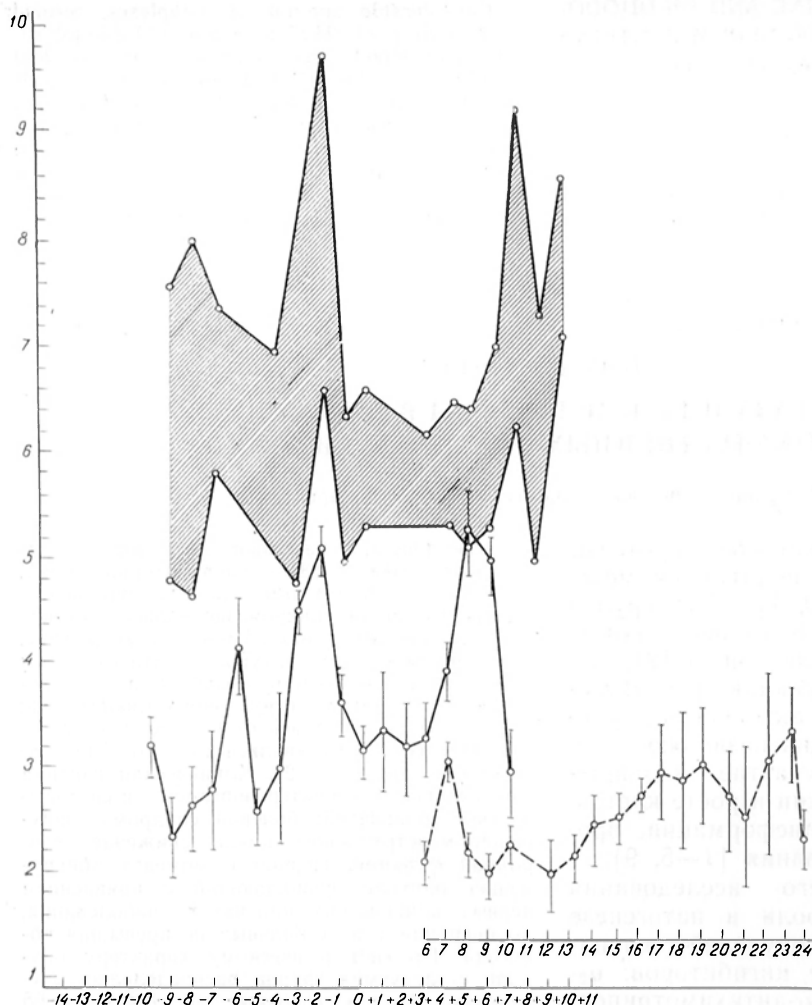


Рис. 1. Активность эластазы в сыворотке крови у здоровых женщин и у больных с доброкачественными опухолями яичников в динамике менструального цикла.

Здесь и на рис. 2: заштрихованная часть — доверительный интервал средней арифметической в контрольной группе (предел надежности 95 %); сплошная линия — больные с овуляторным циклом; пунктирная линия — больные с ановуляторным циклом. По оси ординат — активность эластазы (в мкат/л); по оси абсцисс — дни цикла.

лась цель сравнить активность ферментов в преимущественно однородных тканях: капсуле опухоли и белочной (преимущественно) оболочке здорового яичника и мозгового вещества пораженного и здорового яичника.

Для определения активности эластазы (в мкат/л) использована методика Hall (1966),  $\alpha_2$ -макроглобулина (в мкат/л) — методика Т. А. Кримштейн и В. В. Хвостова,  $\alpha_1$ -анти трипсина (в гТР/л) — методика А. П. Левинского (1973).

### Результаты и обсуждение

Активность эластазы в сыворотке крови в норме колебалась в пределах 1 дня у разных женщин незначительно, однако отмечены четкие различия между отдельными днями, определяющими фазы менструального цикла. Так, для 5, 6, 7, 8, 9-го дня цикла средние показатели колебались от  $6,05 \pm 0,7$  (на —6-й день) до  $6,35 \pm 0,78$  (на —8-й день) мкат/л. В перiovуляторный период значения средних величин повышаются до  $8,28 \pm$

$\pm 1,32$  мкат/л на 0-й день цикла. Во второй половине цикла отмечается постепенное повышение активности фермента, достигающее максимума на 23-й и 25-й дни цикла, —  $7,75 \pm 0,325$  и  $8,05 \pm 0,36$  мкат/л (см. рис. 1). Таким образом, эластаза обнаруживала два максимальных значения (подъема активности), соответствующие овуляции и 23—25-му дню цикла (периоду расцвета желтого тела или второго подъема уровня эстрогенов). У больных с доброкачественными опухолями яичников констатируется выраженное угнетение активности эластазы в течение всего менструального цикла с сохранением закономерности распределения активности по фазам цикла, характерной для здоровых женщин. Особенно значительное снижение активности эластазы в течение всего цикла отмечено у больных с доброкачествен-

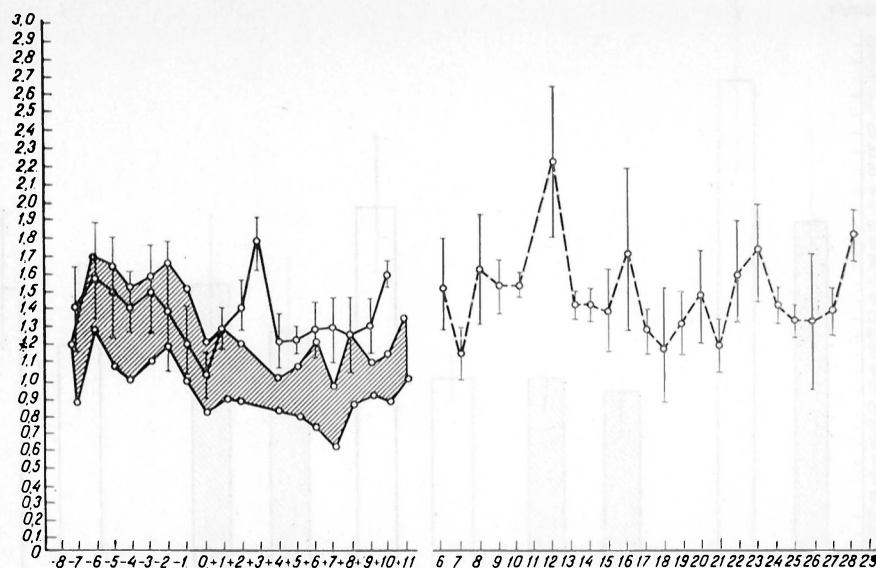


Рис. 2. Активность  $\alpha_2$ -макроглобулина в сыворотке крови у здоровых женщин и у женщин, больных доброкачественными опухолями яичников в динамике менструального цикла.

ными опухолями яичников с ановуляторным циклом.

Изменения уровня ингибитора эластазы —  $\alpha_2$ -макроглобулина в динамике овуляторного цикла были противоположны изменениям активности эластазы: наиболее высоким показателем эластазы соответствовали самые низкие значения ее ингибитора (см. рис. 2).

У больных с доброкачественными опухолями яичников с двуфазным менструальным циклом отмечена тенденция к повышению уровня  $\alpha_2$ -макроглобулина в I фазе и умеренное его повышение во II фазе цикла по сравнению с контрольной группой. У больных с ановуляторным менструальным циклом уровень ингибитора выше, чем в контрольной группе. Характерным для этой группы больных является чередование подъемов и спадов уровня ингибитора в течение всего цикла. Обращает на себя внимание, что у здоровых и больных с доброкачественными опухолями яичников с овуляторным и ановуляторным циклом во второй половине цикла имеет место «плато», т. е. снижение уровня  $\alpha_2$ -макроглобулина, приходящееся у здоровых на 22—25-й день, у больных с овуляторным циклом — на 18—23-й день и у больных с ановуляторным циклом — на 24—27-й день. Этим дням (у здоровых — 23—25-й день, у больных с

овуляторным циклом — 21—23-й день) соответствует повышение уровня эластазы. У больных с ановуляторным циклом период наибольшей активности эластазы (24—27-й день) не совпадает с периодом самого низкого уровня ингибитора (22—23-й день). Снижение уровня  $\alpha_2$ -макроглобулина у здоровых и у больных с доброкачественными опухолями яичников с овуляторным циклом начинается за день до подъема активности эластазы. У больных с ановуляторным циклом снижение уровня ингибитора наступает позже подъема активности эластазы и не носит столь выраженный характер, как у здоровых или больных с двуфазным менструальным циклом.

Динамика уровня второго ингибитора эластазы — ингибитора трипсина у здоровых лиц характеризуется достоверным по сравнению с предыдущими днями снижением его уровня на —1-й день с последующим повышением на 0-й день ( $0,86 \pm 0,08$ ), отмечается тенденция к более высокому уровню ингибитора в I фазе цикла (—6-й день —  $0,93 \pm 0,12$ ), чем во II (+6-й день —  $0,88 \pm 0,25$ ). Для ингибитора трипсина не характерны изменения его уровня во второй половине цикла, отмеченные для  $\alpha_2$ -макроглобулина. У больных с доброкачественными опухолями яичников с двуфазным циклом констатируется более высокий уровень инги-



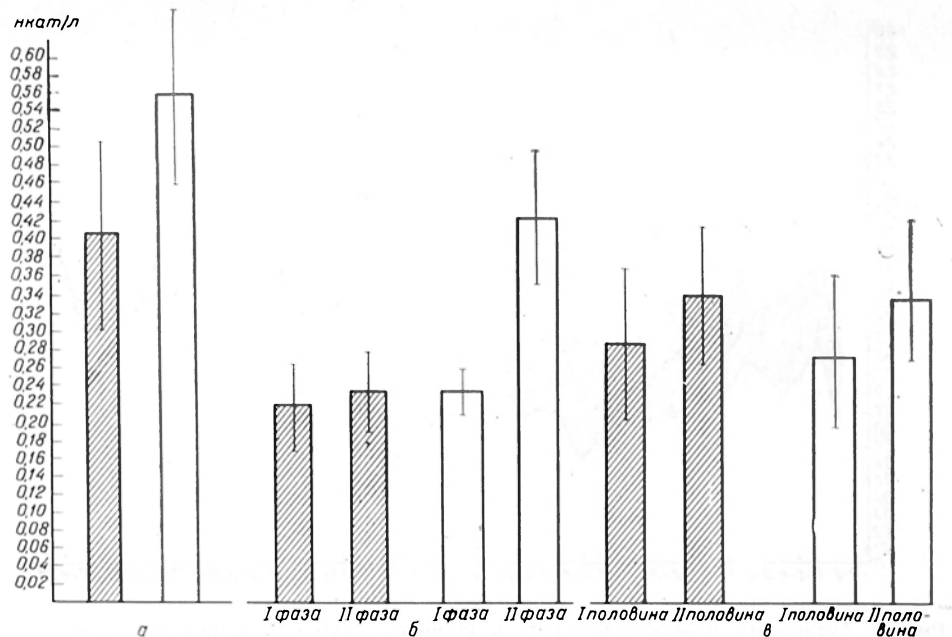


Рис. 3. Активность эластазы в тканях яичников больных с доброкачественными опухолями яичников

а — контрольная группа; б — овуляторный цикл; в — ановуляторный цикл. Темные столбики — преимущественно белочная оболочка яичника у здоровых и капсула опухоли у больных; светлые — вещество яичника у здоровых и сохранившаяся ткань яичника, пораженного доброкачественной опухолью.

битора трипсина в динамике менструального цикла, чем у женщин контрольной группы. Так же, как у здоровых, в перiovуляторный период отмечено снижение по сравнению с I фазой цикла уровня ингибитора трипсина до  $0,78 \pm 0,08$  (на 0-й день), что запаздывает на 1 день по сравнению со здоровыми. Во II фазе цикла уровень ингибитора выше, чем в I фазе, особенно на +8-й и +9-й дни (соответственно  $1,57 \pm 0,08$  и  $1,34 \pm 0,18$ ). У больных с ановуляторным менструальным циклом нарушены закономерности распределения активности ингибитора, характерные для здоровых и больных с овуляторным менструальным циклом: уровень ингибитора в первой половине цикла ниже, чем во второй, отсутствуют изменения активности в середине цикла.

Изучение активности эластазы в тканях яичников (рис. 3) показало, что величина ее в поверхностно взятой для исследования ткани яичника контрольных тканей (преимущественно белочной оболочки) составляет  $0,413 \pm 0,02$  нкат/кг, а в мозговой части —  $0,604 \pm 0,09$  нкат/г. У больных с овуляторным менструальным циклом в капсуле опухоли активность фер-

мента в I и II фазах менструального цикла одинакова и составляет соответственно  $0,22 \pm 0,04$  и  $0,24 \pm 0,04$  нкат/кг. В ткани мозгового вещества сохранившейся части яичника активность фермента во II фазе цикла выше, чем в I фазе, и составляет соответственно  $0,246 \pm 0,02$  и  $0,416 \pm 0,027$  нкат/кг. При сравнении полученных результатов в зависимости от морфологической структуры опухоли обнаружено, что в группе больных с овуляторным циклом самая низкая активность фермента отмечена у больных с папиллярными опухолями ( $0,104 \pm 0,03$ ) по сравнению с муцинозными ( $0,516 \pm 0,02$ ) в мозговом веществе во II фазе цикла. Активность фермента у больных с ановуляторным циклом в тканях папиллярных ( $0,318 \pm 0,06$ ) и муцинозных ( $0,32 \pm 0,15$ ) опухолей достоверно ниже ( $p < 0,001$ ), чем в тканях серозных гладкостенных опухолей ( $0,43 \pm 0,09$ ). У больных со зрелыми тератомами активность эластазы снижена незначительно ( $0,505 \pm 0,12$ ) по сравнению с контрольными тканями. В других тканях (капсула и мозговое вещество при овуляторном цикле и капсула при ановуляторном цикле) не отличаются от контрольных тканей.

Ингибитор трипсина у подавляющего числа больных в тканях яичников не определяется, в то время как в контрольных тканях он определяется в пределах  $3,34 \pm 0,17$  в мозговом веществе и  $5,71 \pm 0,28$  в белочной оболочке.

Сравнение активности эластазы в тканях и сыворотке больных с доброкачественными опухолями яичников свидетельствует об односторонности изменений активности фермента в сыворотке крови и в тканях яичников.

Таким образом, эластаза, очевидно, играет определенную роль в обеспечении нормального менструального цикла, на что указывает повышение ее активности во время перiovуляторного периода и на 24—25-й день (период расцвета желтого тела или период второго подъема уровня эстрогенов). У больных с доброкачественными опухолями яичников отмечено выраженное угнетение активности эластазы. Снижение уровня  $\alpha_2$ -макроглобулина отмечено в дни подъема активности эластазы. В тканях яичника отмечено по сравнению с контрольными тканями выраженное угнетение активности эластазы в белочной оболочке (капсуле опухоли) и в мозговом веществе (у больных с овuляторным и ановuляторным циклом). Возможно, подъем активности эластазы в день предполагаемой овuляции с уменьшением уровня ее ингибиторов связан с непосредственным участием фермента в механизме овuляции; в перiovуляторный период и во II фазе цикла у здоровых лиц эти явления совпадают с максимальным подъемом уровня эстрогенов. Можно предположить, что сосудорасширяющий эффект эстрогенов может быть осуществлен путем активации эластазы, которая, расщепляя эластин сосудистой стенки, делает ее более проницаемой для эстрогенов, продуцируемых яичниковой тканью. Снижение уровня эластазы у больных в сыворотке крови и в тканях яичников препятствует своевременному всасыванию эстрогенов в общий кровоток и более длительному местному их действию на ткань яичника. Гистологическое исследование препаратов доброкачественных опухолей яичников, при котором отмечают сужение сосудов, гиалиноз их стенки, подтверждает высказанное

предположение о роли эластазы. У больных с ановuляторным циклом в тканях серозных папиллярных и муцинозных опухолей и в тканях серозных папиллярных опухолей у больных с овuляторным циклом активность эластазы ниже, чем у больных с гладкокостенными серозными опухолями, а активность трипсина вообще не определяется.

Исходя из высказанных предположений о роли эластазы, можно думать, что возможность развития пролиферативных процессов в тканях этих опухолей более вероятна, чем в серозных гладкокостенных, это подтверждается клиническими наблюдениями.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Веремеенко К. Т. // Биохимия животных и человека. — Киев, 1983. — Вып. 7. — С. 37—46.
2. Локишина Л. А. // Молекул. биол. — 1979. — Т. 13, № 6. — С. 1205—1229.
3. Орехович В. Н., Локишина Л. А., Елисеева Ю. Е., Павлихина Л. В. // Вестн. АМН СССР. — 1984. — № 8. — С. 3—11.
4. Пасхина Т. С. // Там же. — 1982. — № 9. — С. 50—56.
5. Gasic G. J. // Cancer Metast. Rev. — 1984. — Vol. 3, N 2. — P. 99—114.
6. Espey L. L. // Biol. Reprod. — 1978. — Vol. 19, N 3. — P. 540—551.
7. Imoedemhe L., Shaw R. W. // Brit. J. Obstet. Gynec. — 1986. — Vol. 93, N 8. — P. 863—868.
8. Koo P. H. // Chemistry and Biology of  $\alpha_2$ -Macroglobulin. — New York, 1983. — P. 388—390.
9. Sloane B. F., Honn K. V. // Cancer Metast. Rev. — 1984. — Vol. 3, N 3. — P. 249—263.

Поступила 12.04.89

#### ELASTASE AND ITS INHIBITORS IN PATHOGENESIS OF OVARY BENIGN TUMORS

V. F. Nagornaya

Medical School, Odessa

Activities of elastase and its inhibitors were studied in blood serum and tissues of patients with ovary benign tumors. Two peaks of the enzyme activation were detected during the menstrual cycle: at periovulatory period and at the second step of the cycle. In blood serum and tissues of the patients a decrease in the elastase activity was found, which was most distinct in papillary and mucinosis tumors. These alterations in the elastase activity appears to be responsible for impairments in the blood vessel wall structure, which may limit in penetration of estrogens into circulation and cause prolongation of effects of steroids on ovary tissue.

*С. В. Гунько, В. Н. Запорожан, В. А. Гунько, Н. Н. Низова*  
**ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СТАТУСА СЕЛЕНА  
У БЕРЕМЕННЫХ В ГРУППЕ РИСКА ПО РАЗВИТИЮ  
ПОЗДНИХ ТОКСИКОЗОВ**

Одесский медицинский институт

Значительная роль в патогенезе позднего токсикоза беременных принадлежит нарушению систем антирадикальной защиты [1, 2], микроциркуляции и нарастанию содержания нитрата в тканях [2, 4]. Снижение активности Na, К-АТФазы (КФ 3.6.17.3) ниже  $12,87 \pm 0,66$  мкмоль/ч на 1 г гемоглобина в гемолизате эритроцитов беременных является основанием для наблюдения этих беременных в группе риска в отношении развития поздних токсикозов [3]. В связи с тем что Na, К-АТФаза является мембранно-связанным ферментом, изменение активности этого фермента в эритроцитах может быть обусловлено наряду с другими факторами и структурными изменениями эритроцитных мембран вследствие активации процессов свободнорадикального окисления на доклиническом этапе позднего токсикоза.

Исходя из вышеизложенного, нами была предпринята попытка определить активность важного антиоксидантного фермента глутатионпероксидазы (КФ 1.11.1.9) и содержание селена, являющегося компонентом активного центра этого фермента, в крови беременных в группе риска в отношении развития поздних токсикозов.

#### Методика

Скрининг проводили у 540 беременных, жительниц Одесской области, с неотягощенным акушерским анамнезом, без экстрагениальной патологии, при сроке беременности 26—28 нед. Критерием выделения беременных в группу риска при скрининге являлось снижение активности Na, К-АТФазы ниже  $12,87 \pm 0,66$  мкмоль/ч на 1 г гемоглобина. Выделенная группа риска составила 88 беременных. Активность Na, К-АТФазы в гемолизате эритроцитов определяли по методу [6], осмотическую резистентность эритроцитов — по методу [7].

Активность глутатионпероксидазы определяли спектрофотометрическим методом [5]. Принцип метода заключается в определении скорости образования в процессе глутатионпероксидазной реакции окисленного глутатио-

на с помощью глутатионредуктазной системы, в которой убыль восстановленного никотинамидадениндинуклеотидфосфата, определяемая оптическим тестом Варбурга (длина волны 340 нм), пропорциональна количеству окисляемого глутатиона.

Содержание селена определяли флюориметрическим методом [8]. Принцип метода заключается в измерении интенсивности флюоресценции окрашенного комплекса селена с 2,3-диаминонафталином, возникающей под действием УФ-излучения с длиной волны 366 нм.

Активность Na, К-АТФазы и глутатионпероксидазы определяли в гемолизате эритроцитов, содержание селена — в цельной крови. Кровь брали из локтевой вены по общепринятой методике.

#### Результаты и обсуждение

Данные, полученные нами, представлены в таблице. В пределах группы риска развития позднего токсикоза беременных нами были выделены две клинические группы. У беременных 1-й группы активность обоих исследуемых ферментов и содержание селена в крови были резко снижены по сравнению с таковыми в крови беременных с физиологически протекающей беременностью. У беременных 2-й группы при тенденции к снижению активности Na, К-АТФазы, не достигающей, однако, уровня статистической достоверности, активность глутатионпероксидазы и содержание селена существенно не изменялись по сравнению с таковыми в крови беременных с физиологической беременностью. Статистически достоверных изменений осмотической резистентности эритроцитов в крови беременных, выделенных в группу риска, выявить не удалось.

При дальнейшем клиническом наблюдении за беременными группы риска развитие позднего токсикоза было выявлено у 68 беременных 1-й группы и 6 беременных 2-й группы.

Полученные результаты дают возможность предполагать, что изменение активности Na, К-АТФазы эритро-

Содержание селена и активность глутатионпероксидазы в крови беременных группы риска в отношении развития позднего токсикоза

Группа риска	Активность Na, K-АТФазы, мкмоль/ч на 1 г гемоглобина	Активность глутатионпероксидазы, нкат на 1 мл крови	Содержание селена, нг на 1 мл крови
1-я	8,43±0,78** (70)	96±4** (78)	54±0,8*** (70)
2-я	11,63±1,66 (18)	126±8* (10)	96±1,2** (18)
Беременные с физиологически протекающей беременностью (контроль)	12,87±0,66 (95)	132±6 (95)	120±0,8 (95)

Примечание. В скобках — число обследованных. Статистическая достоверность различий по сравнению с контролем. Одна звездочка —  $p < 0,05$ , две —  $p < 0,01$ , три —  $p < 0,001$ .

роцитов беременных на доклиническом этапе развития позднего токсикоза беременных в значительной степени обусловлено активацией процессов свободнорадикального окисления. Отсутствием компенсаторной активации глутатионпероксидазной реакции, вероятно, в значительной мере обусловлено дальнейшее формирование метаболических нарушений и развития «порочных кругов» позднего токсикоза. В то же время необходимо отметить, что при уровне селена в крови беременных группы риска  $96 \pm 1,2$  нг/мл обеспечивается довольно высокая глутатионпероксидазная активность [коэффициент корреляции между содержанием селена и активностью глутатионпероксидазы составил для 1-й группы 0,8 ( $p < 0,01$ ), для 2-й группы 0,7 ( $p < 0,05$ )]. Можно предположить, что снижение активности глутатионпероксидазы в крови беременных группы риска обусловлено не только ингибированием фермента вследствие избыточного накопления гидроперекисей, в том числе и липидных, на доклиническом этапе развития позднего токсикоза, но и алиментарной или, возможно, метаболической недостаточностью селена.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Абрамченко В. В., Баскако В. П., Соколовский В. В. и др. // Акуш. и гин. — 1988. — № 6. — С. 67—71.
2. Грищенко В. И., Иванов И. П., Воронин К. В., Маневич Л. Е. Родовспоможение при позднем токсикозе беременных. — Киев, 1986. — С. 9—21.

3. Гунько С. В., Низова Н. Н. // Актуальные вопросы клинической медицины. — Одесса, 1987. — С. 15.
4. Леуш С. С., Тимошенко Л. В. // Акуш. и гин. — 1988. — № 9. — С. 71.
5. Ланкин В. З., Гуревич С. М. // Докл. АН СССР. — 1976. — Т. 226, № 3. — С. 705—710.
6. Якушева И. А., Орлова Л. И. // Лаб. дело. — 1970. — № 8. — С. 497—501.
7. Mino M., Nishida Y., Murata K. et al. // J. Nutr. Sci. Vitaminol. — 1978. — Vol. 24. — P. 383—395.
8. Watkinson J. H. // Analyt. Chem. — 1966. — Vol. 38. — P. 92—96.

Поступила 15.03.89

#### METABOLIC STATUS OF SELENIUM IN THE GROUP OF PREGNANT WOMEN WITH RISC OR LATE TOXICOSES DEVELOPMENT

S. V. Gun'ko, V. N. Zaporozhan, A. V. Gun'ko, N. N. Nizova

Medical School, Odessa

A decrease in activity of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, estimated in erythrocytes of women at the second half of pregnancy, served as a criterion in screening of the risc group tended to development of late toxicoses. In the risc group of women with pregnancy activity of glutathione peroxidase and content of selenium were studied in blood, simultaneously with estimation of osmotic resistancy of erythrocytes. A decrease in activity of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase was shown to be a reliable prognostic criterion in pregnant women with tendency to late toxicoses. At the same time, a decrease in glutathione peroxidase activity should be used as a distinct prognostic pattern only if content of selenium was as low as 95 ng/ml in blood of women with pregnancy. Alimentary and metabolic deficiency of selenium appears to be responsible for limitation of the glutathione peroxidase activity at the preclinical step of late toxicosis development.



Б. А. Кудряшов, А. М. Ульянов, Ю. А. Тарасов

## ЗНАЧЕНИЕ ЭНДОГЕННОГО ГЕПАРИНА В ЗАЩИТЕ ОРГАНИЗМА ОТ ДЕЙСТВИЯ ФАКТОРОВ РИСКА, ВЫЗЫВАЮЩИХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ДИАБЕТ

Биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

В плазме крови крыс при аллоксановом диабете [2] и в плазме крови людей, страдающих инсулинозависимым диабетом [12], присутствует диабетогенный фактор (ДФФ) — альбумин с молекулярной массой 60 000 дальтон [11]. При внутривенном введении очищенного препарата ДФФ интактным животным у них наблюдается резкое уменьшение содержания в крови инсулина, развитие устойчивой гипергликемии и падение концентрации в крови гепарина [15]. Последнее обстоятельство приводит к дисфункции противосвертывающей системы (ПСС), что влечет развитие предтромботического состояния, при некоторых условиях переходящего в тромбоз [10].

Гепаринотерапия полностью нейтрализует активность ДФФ в организме животных [2, 11, 12] и человека [4, 7, 8] при инсулинозависимом диабете.

Перечисленные данные получены путем использования экзогенного гепарина, в связи с чем возникает вопрос о значении повышения содержания естественного, эндогенного гепарина в обеспечении защиты организма от действия факторов риска (аллоксан, ДФФ), вызывающих у животных развитие симптомов, характерных для инсулинозависимого диабета. Мы попытались выяснить этот вопрос, наблюдая за изменением концентрации сахара в крови у животных после введения им аллоксана или ДФФ, на фоне повышения концентрации эндогенного гепарина, вызываемого активацией ПСС.

### Методика

Эксперименты проведены на белых беспородных крысах-самцах (масса тела 200—220 г).

Экспериментальный сахарный диабет вызвали у крыс однократным внутривенным введением аллоксана в дозе 37,5 мг/кг, после предварительного голодания в течение 24 ч. Гипергликемическое состояние у здоровых животных, развившееся от действия ДФФ, получали путем 3-кратного внутривенного введения в течение 3 дней плазмы кро-

ви (1 мл), полученной от крыс с устойчивым аллоксановым диабетом.

Возбуждение ПСС, повышающее содержание эндогенного гепарина в кровотоке, вызвали внутривенным введением раствора тромбопластина (ТП): 1,5 мл, активность — 25—30 с, полученного из мозга крыс за 10 мин до инъекций аллоксана или плазмы крови, содержащей ДФФ. В контрольных группах крысам вводили раствор инаktivированного (нагреванием при 75°C в течение 25 мин) ТП (при изучении ПСС) или 0,85% раствора NaCl (при изучении гликемии).

Функциональное состояние ПСС оценивали по суммарной фибринолитической активности (СФА) и уровню неферментативного фибринолиза (НФ), определяемым по методу [9]. Концентрацию эндогенного гепарина определяли по методу Pierrea, фибриноген — по методу [17] в модификации [1]. Сахар в крови находили модифицированным методом Хагедорна — Йенсена [5].

В работе использовали аллоксан («Spofa», СССР), протамина сульфат для инъекций, фибриноген и тромбин Каунасского предприятия бакпрепаратов, гепарин фирмы «Richter» (Венгрия).

Введение препаратов и взятие крови осуществляли через яремную вену. Кровь для анализа отбирали с 3,8% раствором цитрата натрия в соотношении 9:1.

Результаты опытов обработаны статистически по методу Фишера — Стьюдента.

### Результаты и их обсуждение

Известно, что однократное внутривенное введение крысам соответствующих доз ТП вызывает кратковременное повышение свертывания крови, сменяющееся через несколько минут хорошо выраженной гипокоагуляцией, обусловленной активацией ПСС, сопровождающейся повышением концентрации эндогенного гепарина в крови [6].

По нашим данным (табл. 1), не менее чем через 10 мин после инъекции ТП у крыс возрастает концентрация гепарина в среднем на 40% по сравнению с исходной, что сопровождается активацией СФА на 54% и НФ на 88% при одновременном снижении концентрации фибриногена на 35%. Характер изменения изученных показателей мобилизации активности ПСС

Т а б л и ц а 1

## Показатели ПСС у здоровых крыс после внутривенного введения ТП

Показатель	Опытная группа			Контрольная группа		
	исходные данные	через 10 мин	через 60 мин	исходные данные	через 10 мин	через 60 мин
Гепарин, ЕД/мл	7,4	10,2	9,4	7,6	7,8	7,4
СФА, мм <sup>2</sup>	46,8±4,2	72,3±5,3	67,3±4,2	50,1±4,3	44,5±5,2	39,8±2,7
<i>p</i>	—	<0,01	<0,01	—	>0,2	>0,05
НФ, мм <sup>2</sup>	22,9±1,8	43,1±3,8	37,2±6,0	24,5±2,1	20,1±3,1	18,1±1,5
<i>p</i>	—	<0,001	<0,05	—	>0,2	<0,05
Фибриноген, мг%	292,5±15,6	215,2±12,1*	238,5±18,1	288,7±16,1	300,5±28,5	298,7±20,1
<i>p</i>	—	<0,01	<0,05	—	>0,5	>0,5

П р и м е ч а н и е. *p* — по отношению к исходному уровню. Звездочка — при *n*=5; в остальных случаях *n*=6.

сохраняется и через 60 мин после инъекции ТП. Повышение содержания гепарина составило 24 %, СФА — 44 %, НФ — 62 % при снижении содержания фибриногена на 22,6 %.

Предварительное (за 10 мин) внутривенное введение ТП здоровым крысам защищает их от развития гипергликемии после инъекции аллоксана, в то время как в контроле гипергликемия и диабет имели устойчивый характер (табл. 2).

При испытании действия препарата ДГФ получены аналогичные результаты. Предварительное введение здоровым крысам ТП (не менее чем за 10 мин до инъекции ДГФ) не привело к развитию устойчивой гипергликемии в отличие от контрольных животных, которым был предварительно введен инактивированный нагреванием ТП за 10 мин перед внутривенным вливанием плазмы крови, содержащей ДГФ.

Таким образом, возбуждение ПСС после введения ТП у здоровых животных, повышающее содержание в крови эндогенного гепарина, создает ес-

тественный защитный барьер против диабетогенного действия факторов риска — аллоксана и ДГФ.

Важно отметить, что при иных условиях опыта ТП оказывает диаметрально противоположное влияние на организм. Так, введение ТП крысам через 7 дней после инъекций им препарата ДГФ обусловило гибель 89 % животных от внутрисосудистого свертывания крови, в то время как в контроле осталось в живых 88 % крыс [10]. Очевидно, защитная реакция против тромбоза у большинства контрольных животных, не получавших ДГФ, была полноценной, в то время как после предварительного введения крысам ДГФ функция ПСС у них оказалась заблокированной.

Известно, что появление в крови ДГФ у животных может быть связано не только с введением аллоксана. Показано [14], что у крыс на поздних стадиях экспериментального атеросклероза в крови появляется ДГФ. У таких животных почти полностью отсутствует в крови гепарин в связи с депрессией функции ПСС. Система-

Т а б л и ц а 2

## Влияние предварительного внутривенного введения ТП на проявление диабетогенного действия аллоксана (37,5 мг/кг)

Группа	Концентрация сахара в крови, мг %		
	исходная	через 1 сут	через 7 сут
Опытная	93,5±3,9 ( <i>n</i> =13)	116,5±9,9 ( <i>n</i> =13)	102,2±9,5 ( <i>n</i> =9)
<i>p</i>	—	<0,001	<0,02
Контрольная	95,2±2,5 ( <i>n</i> =13)	229,6±23,5 ( <i>n</i> =12)	241,7±51,6 ( <i>n</i> =6)

П р и м е ч а н и е. *p* — по отношению к контролю (введение инактивированного ТП).

тическая гепаринотерапия полностью устраняла активность ДГФ в крови животных, находящихся на атерогенной диете, восстанавливая продукцию эндогенного гепарина и функцию ПСС [16]. Таким образом, в развитии у таких животных предиабета фактором риска был атеросклероз.

Установлена прямая зависимость между содержанием сахара в крови и возрастом людей [18] или животных [3]. Показано [13], что ДГФ отсутствует в плазме крови крыс молодого и зрелого возраста, но присутствует в небольшой концентрации в крови старых животных, у которых наблюдается депрессия ПСС. Однако это явление было выражено в значительно меньшей степени, чем у животных, длительно находящихся на атерогенной диете. Введение экзогенного гепарина и в этом опыте способствовало устранению активности ДГФ и относительной нормализации ПСС у старых крыс.

Принимая во внимание полученные в эксперименте данные, следует учесть и клинические наблюдения в этой области. При изучении инсулинзависимого диабета у детей [4, 7] и у взрослых больных [8] было установлено присутствие у них ДГФ в крови, что сочеталось с низким содержанием гепарина на почве дисфункции ПСС. По-видимому, недостаток гепарина является фактором, способствующим накоплению в крови больных токсичного ДГФ. Об этом свидетельствует полная нейтрализация гепарином ДГФ в крови больных [4, 7, 8].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Андреев Г. В. // Пробл. гематол. — 1962. — № 9. — С. 31—34.
2. Баскакова Г. М., Кудряшов Б. А., Пытель Ю. А. // Пробл. эндокринологии. — 1981. — № 4. — С. 42—46.
3. Гацко Г. Г. Старение и инсулин. — Минск, 1975.
4. Жуковский М. А., Кудряшов Б. А., Ульянов А. М. и др. // Педиатрия. — 1985. — № 2. — С. 7—9.

5. Кинторович А. С. А. с. 158399, СССР.
6. Кудряшов Б. А. Биологические проблемы регуляции жидкого состояния крови и ее свертывания. — М., 1975. — С. 271—273.
7. Кудряшов Б. А., Жуковский М. А., Щербачева Л. И. и др. // Педиатрия. — 1985. — № 8. — С. 46—47.
8. Кудряшов Б. А., Левитская З. И., Ляпина Л. А., Ульянов А. М. // Современные проблемы экспериментальной и клинической эндокринологии. — Киев, 1987. — С. 209.
9. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А., Баскова И. П. // Вестн. Моск. ун-та, сер. биол. — 1974. — № 5. — С. 46—53.
10. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А., Ульянов А. М. // Физиол. журн. СССР. — 1986. — № 3. — С. 373—376.
11. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А., Ульянов А. М. // Пробл. эндокринологии. — 1986. — № 6. — С. 51—54.
12. Кудряшов Б. А., Понасенкова Г. В., Пытель Ю. А. // Там же. — 1982. — № 5. — С. 61—64.
13. Кудряшов Б. А., Ульянов А. М., Базильян Г. Г., Пытель Ю. А. // Там же. — 1984. — № 2. — С. 65—70.
14. Кудряшов Б. А., Ульянов А. М., Базильян Г. Г. // Науч. докл. высш. школы: Биол. науки. — 1986. — № 2. — С. 50—53.
15. Кудряшов Б. А., Ульянов А. М., Ляпина Л. А. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 5. — С. 57—59.
16. Кудряшов Б. А., Ульянов А. М., Пытель Ю. А. и др. // Вестн. Моск. ун-та, сер. биол. — 1986. — № 1. — С. 51—54.
17. Bidwell E. // Biochem. J. — 1953. — Vol. 55. — P. 497—506.
18. Zimmet P. // Whitehouse S. // Diabetes. — 1979. — Vol. 28. — P. 617—623.

Поступила 06.10.88

#### ROLE OF ENDOGENOUS HEPARIN IN PROTECTION AGAINST RISK FACTORS RESPONSIBLE FOR EXPERIMENTAL DIABETES

B. A. Kudrjashov, A. M. Uljanov, Yu. A. Tarasov

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

Activity of risk factors responsible for experimental diabetes (alloxan and natural diabetogenic factor which is an albumin-like protein) was neutralized in healthy rats simultaneously with an increase of heparin concentration in circulation, which was observed 10 min after the anticoagulation system activation caused by thromboplastin.

*И. Д. Гроздова, Н. П. Климов, Е. Г. Мамаева, Б. В. Крехнов,  
Е. В. Свешникова, В. Т. Ивашкин, В. Ю. Васильев, Е. С. Северин*

## **АКТИВНОСТЬ ПРОТЕИНКИНАЗ И СОДЕРЖАНИЕ сАМР В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ЖЕЛУДКА ПРИ НЕОПУХОЛЕВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ**

Институт прикладной молекулярной биологии Минздрава СССР и 3-й Центральный клинический военный госпиталь им. А. А. Вишневского, Москва, НИИ физиологии Ленинградского университета

Ряд неопухолевых заболеваний желудка повышают риск злокачественного перерождения слизистой оболочки, к ним относят хронические раздражения слизистой оболочки желудка (СОЖ), хронические гастриты, полипы, язвы и др. [2]. Необходим дальнейший поиск критериев, в том числе биохимических, позволяющих выявлять лиц «группы повышенного риска». Для метаболизма злокачественных тканей характерно изменение активности многих ферментов [11], в частности протеинкиназ (АТФ-протеин-фосфотрансферазы, КФ 2.7.1.37), участвующих в регуляции пролиферации клеток [6]. Изучение процессов фосфорилирования белков в опухолях человека показало, что активность сАМР-независимых протеинкиназ повышена при злокачественной трансформации кожи [5], слизистой оболочки толстой кишки [1, 3], желудка [9], в лимфоцитах при острой лимфобластной лейкемии [12], причем относительное усиление сАМР-независимого фосфорилирования было обнаружено не только при опухолях, но и при заболеваниях толстой кишки, рассматриваемых клиницистами как облигатный предрак этого органа [1].

В настоящей работе предпринята попытка выяснить, происходят ли аналогичные изменения при заболеваниях желудка, повышающих риск возникновения опухоли. С этой целью определяли активность сАМР-зависимых и сАМР-независимых протеинкиназ, а также эндогенное содержание сАМР в СОЖ при хронических гастритах, эрозивно-язвенных поражениях, в доброкачественных полипах и язвах желудка, леченных местным облучением гелий-неонового лазера.

### **Методика**

Исследование проведено на биопсионном материале, полученном от 75 больных в возрасте от 48 до 80 лет, находившихся в стационаре. Диагноз устанавливали визуально при эндоскопическом обследовании и в каждом случае обязательно подтверждали морфологическим анализом образцов ткани, которые получали под визуальным контролем через фиброэндоскоп типа GIF(Q) («Olympus») биопсионными щипцами. Образцы ткани брали из СОЖ большой кривизны антрального отдела, из верхушки полипов, краев язв и эрозий, локализованных в нижней трети желудка, преимущественно в антральном отделе. У всех лиц проведен также анализ биопсийного материала, взятого с малой кривизны субкардиального отдела желудка.

Для облучения язв желудка использовали отечественный гелий-неоновый лазер ЛГ-75-1 с длиной волны 0,633 мкм. Для подачи лазерного излучения к объекту воздействия применяли гибкий световод, проведенный по рабочему каналу фиброэндоскопа. Мощность лазерного облучения на конце световода, установленного на расстоянии 15 мм от язвы, составляла 1,5—2 мВт/см<sup>2</sup>. Время облучения 3—8 мин.

Биоптаты хранили в жидком азоте, куда их помещали через 5—10 мин после взятия. Активность протеинкиназ определяли по способности экстрактов ткани фосфорилировать гистон H1 в присутствии 2,5 мкМ сАМР или казеин в отсутствие сАМР [5]. Активность определяли при pH 8,5—9,0. Количество сАМР анализировали с помощью наборов фирмы «Amersham» [1].

Результаты, полученные в каждой группе, обработаны статистически стандартными методами по критерию Стьюдента для достоверной вероятности 95%.

### **Результаты и их обсуждение**

Биохимический анализ биоптатов проводили синхронно в следующих группах: 1-я, контрольная, группа — здоровые люди с явлениями поверхностного и субатрофического гастрита, 2-я — лица с аденоматозными полипами, 3-я — с мелкими поверхностными



Активность протеинкиназ и содержание сАМР в СОЖ в норме и при патологии ( $M \pm m$ )

Условия исследования	Число биоптатов	Активность, пмоль/мин на 1 мг белка		сАМР, пмоль на 1 мг белка	КК/ГК/сАМР
		КК	ГК		
Антральный отдел:					
контроль	27	166 $\pm$ 16	580 $\pm$ 35	6,5 $\pm$ 0,4	0,048 $\pm$ 0,006
аденоматозные полипы	8	169 $\pm$ 31	506 $\pm$ 67	5,7 $\pm$ 0,9	0,067 $\pm$ 0,012
эрозии	10	314 $\pm$ 75	505 $\pm$ 53	10 $\pm$ 1*	0,063 $\pm$ 0,009
язвы	11	356 $\pm$ 40*	690 $\pm$ 62	5,5 $\pm$ 0,7	0,106 $\pm$ 0,015*
язвы, облученные лазером	9	517 $\pm$ 65*	653 $\pm$ 75	9,4 $\pm$ 0,75*	0,084 $\pm$ 0,01
ДГР	4	520 $\pm$ 142*	715 $\pm$ 92	8,1 $\pm$ 1,9	0,106 $\pm$ 0,02*
Субкардиальный отдел:					
контроль	27	252 $\pm$ 29	613 $\pm$ 40	5,3 $\pm$ 0,3	0,086 $\pm$ 0,012
аденоматозные полипы	8	184 $\pm$ 39	366 $\pm$ 42	4,3 $\pm$ 0,8	0,127 $\pm$ 0,011
эрозии	10	399 $\pm$ 76*	563 $\pm$ 89	6,4 $\pm$ 1	0,134 $\pm$ 0,027
язвы	11	388 $\pm$ 48*	613 $\pm$ 46	5,8 $\pm$ 1,6	0,154 $\pm$ 0,028*
язвы, облученные лазером	9	368 $\pm$ 59*	555 $\pm$ 55	6,1 $\pm$ 0,9	0,148 $\pm$ 0,024*
ДГР	4	533 $\pm$ 78*	839 $\pm$ 131	6,3 $\pm$ 0,75	0,11 $\pm$ 0,02

\* Статистически достоверное отличие от показателей, полученных для соответствующего отдела желудка в контрольной группе.

ными изъязвлениями слизистой оболочки (эрозии), 4-я — с язвами, 5-я — с язвами, облученными лазером. В каждой группе анализировали пораженный участок слизистой оболочки в антральном отделе желудка и максимально удаленную от места поражения гистологически нормальную ткань субкардиальной области. В экстрактах тканей определяли активность сАМР-зависимых гистонкиназ (ГК), сАМР-независимых казеинкиназ (КК) и эндогенное содержание сАМР. На основании этих данных рассчитывали отношение активности КК к активности ГК и количеству сАМР в образце. Это отношение отражает интенсивность сАМР-независимого фосфорилирования белков в ткани по сравнению с сАМР-зависимым. Средние значения полученных величин в каждой группе биоптатов представлены в таблице.

Предварительное сравнение биоптатов контрольной группы по всем параметрам показало, что при поверхностном и субатрофическом гастрите активность ферментов одинакова. Небольшое снижение уровня сАМР и отношения КК/ГК/сАМР на 20 % при субатрофическом гастрите по сравнению с поверхностным было статистически недостоверным, поэтому мы сочли возможным объединить лиц с поверхностным и субатрофическим гастритом в одну контрольную группу.

По данным работы [9], и у здоровых людей активность ГК и КК в слизистой оболочке антрального отдела и тела желудка одинаковая. В субкардиальном же отделе, по нашим данным, слизистая оболочка отличается от антральной в 1,5 раза более активной КК и в 1,8 раза более высоким отношением КК/ГК/сАМР. Поэтому констатация изменений в фосфорилировании белков справедлива в сравнении с нормальной тканью только того же отдела желудка. В дальнейшем мы исследовали полипы и изъязвления, локализованные только в нижней трети желудка, преимущественно в антральном его отделе.

Интерес к аденоматозным полипам желудка вызван тем, что ранее были получены данные о повышении активности КК и изменении отношения КК и ГК в большинстве доброкачественных полипов толстой кишки до значений, близких к таковым в злокачественных опухолях [1]. Однако в отличие от полипов кишечника в аденоматозных полипах желудка активность ГК, КК и содержание сАМР были близки к норме (см. таблицу). Эти результаты согласуются с крайне низкой частотой (0,5 %) злокачественного перерождения аденоматозных полипов желудка [13, 14], тогда как крупные доброкачественные полипы кишечника рассматриваются клиницистами как предрак [10].

Изменения в системе фосфорилирования были обнаружены при эрозиях и язвах желудка. Прежде всего в месте поражения статистически достоверно возрастала активность КК (см. таблицу). Ее активность не может служить диагностическим критерием изъязвления слизистой оболочки, так как увеличение среднего значения было обусловлено не повышением активности КК у всех больных, а резким ее увеличением у некоторых лиц данной группы (рис. 1). С увеличением глубины поражения повышается вероятность активации КК: активность КК была выше нормы только у 4 из 10 человек с эрозиями и у 8 из 11 больных с язвами.

Активность ГК в эрозиях и язвах была практически одинаковой. Эти группы различались по содержанию сАМР и коэффициенту КК/ГК/сАМР. При эрозиях уровень сАМР статистически достоверно превышал норму, причем увеличение содержания сАМР наблюдалось в тех биоптатах, где была повышена активность КК (см. рис. 1). Благодаря этому величина отношения КК/ГК/сАМР оставалась в пределах нормы (рис. 2). В язвах количество сАМР было таким же, как в норме, или меньше, поэтому в половине язв отношение КК/ГК/сАМР было больше 0,09 — максимального значения, наблюдавшегося в норме (см. рис. 2). В опухолях желудка также отмечалось повышение активности КК [9] и отношения КК/ГК/сАМР до 0,24—0,26. Таким образом, при язвах желудка, которые могут подвергаться малигнизации в 7,9—12,9 % случаев [2, 8], отмечена тенденция к таким же изменениям в системе фосфорилирования белков, как при опухолях.

В субкардиальной области на расстоянии от язв и эрозий состояние слизистой оболочки при гистологическом исследовании соответствовало поверхностному или субатрофическому гастриту. Однако в ней также наблюдались изменения системы фосфорилирования, причем они носили такой же характер, как в пораженном участке антрального отдела, хотя и были менее выраженными (см. таблицу).

Установлено, что 4 больных, страдавших периодическим забросом содержимого двенадцатиперстной кишки в желудок (дуоденогастральный рефлюкс — ДГР) и по клиническим и

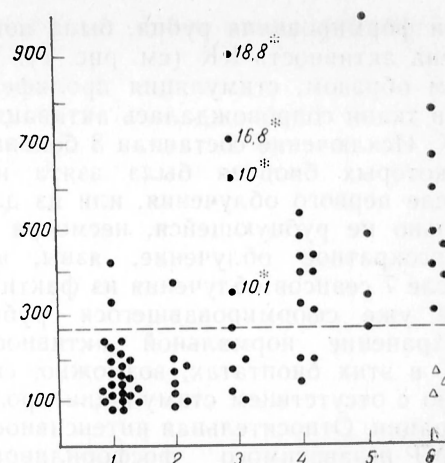


Рис. 1. Индивидуальные значения активности сАМР-независимых протеникиназ в биоптатах обследованных различных групп.

По оси ординат — активность КК (в  $\mu\text{моль/мин}$  на 1 мг белка). Цифры со звездочкой — содержание сАМР (в  $\mu\text{моль}$  на 1 мг белка) в биоптате. Штриховая линия — верхняя граница значений активности КК в норме. 1 — норма; 2 — полипы; 3 — эрозии; 4 — язвы, 5 — ДГР; 6 — язвы, облученные лазером.

морфологическим признакам отнесенных первоначально в контрольную группу, имели такие же биохимические характеристики СОЖ антрального отдела, как больные с язвами (см. таблицу). Наибольшая активность КК наблюдалась у больного с тяжелым ДГР (см. рис. 1).

Облучение лазерным лучом стимулирует пролиферацию в тканях и ускоряет заживление язв [4, 7]. У всех больных с язвами после 3 сеансов облучения в биоптатах, взятых на ста-

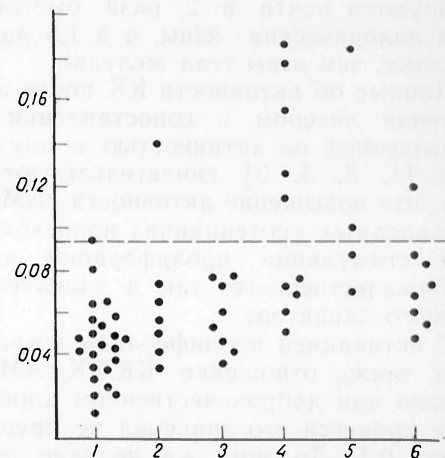


Рис. 2. Соотношение сАМР-независимого и сАМР-зависимого фосфорилирования в отдельных биоптатах.

По оси ординат — отношение КК/ГК/сАМР. Штриховая линия — верхняя граница значений КК/ГК/сАМР в норме. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

дии формирования рубца, была повышена активность КК (см. рис. 1). Таким образом, стимуляция пролиферации ткани сопровождалась активацией КК. Исключение составили 3 больных, у которых биопсия была взята или после первого облучения, или из длительно не рубцующейся, несмотря на многократное облучение, язвы, или после 7 сеансов облучения из фактически уже сформировавшегося рубца. Сохранение нормальной активности КК в этих биоптатах, возможно, связано с отсутствием стимуляции пролиферации. Относительная интенсивность сАМР-независимого фосфорилирования (КК/ГК/сАМР) при стимуляции лазером доброкачественной пролиферации не только не повышалась, но даже несколько снижалась по сравнению с необлученными язвами (см. таблицу). На расстоянии от места облучения в субкардиальной области лазерная терапия не вызывала изменений по сравнению с соответствующей тканью необлучавшихся язв (см. таблицу).

Повышение активности КК при усилении пролиферации в ткани позволяет предположить, что наблюдавшаяся в субкардиальном отделе желудка более высокая активность КК, чем в антральном отделе, указывает на более интенсивное протекание пролиферативных процессов в субкардии. Это не противоречит данным о клиническом течении язв субкардиального отдела желудка. По данным [2], эти язвы рубцуются почти в 2 раза быстрее, чем пилорические язвы, и в 1,5 раза быстрее, чем язвы тела желудка.

Данные об активности КК после облучения лазером в сопоставлении с повышенной ее активностью в опухолях [1, 3, 5, 9] свидетельствуют о том, что повышение активности сАМР-независимых протеинкиназ происходит при стимуляции пролиферации как доброкачественного, так и злокачественного характера.

С активацией пролиферации возрастает также отношение КК/ГК/сАМР, однако при доброкачественном характере процесса его значения не превышают 0,1. До этих же величин оно снижается при стимуляции пролиферации лазерным облучением. Значения этого показателя больше 0,18 получены только в опухолях. Возможно, значения отношения КК/ГК/сАМР в

диапазоне 0,1—0,18 у некоторых больных с язвами и атрофическим гастритом (неопубликованные данные) указывают на предрасположенность ткани к переходу на метаболизм злокачественных клеток. Для проверки справедливости этого предположения необходимо длительное наблюдение за такими больными.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Александров В. Б., Левитан М. Х., Гроздова И. Д. и др. // *Вопр. онкол.* — 1986. — № 8. — С. 45—53.
2. Василенко В. Х., Гребенев А. Л., Шенгулин А. А. Язвенная болезнь: Современные представления о патогенезе, диагностике, лечении. — М., 1987.
3. Васильев В. Ю., Дорофеев Г. И., Ивашкин В. Т. и др. // *Бюл. экспер. биол.* — 1984. — № 6. — С. 717—719.
4. Войтенко М. К., Лобаков В. В., Довгалев Ю. С. // *Здравоохр. Белоруссии.* — 1980. — № 11. — С. 60—62.
5. Гроздова И. Д., Михайловский А. В., Северин Е. С. и др. // *Вопр. мед. химии.* — 1986. — № 3. — С. 104—108.
6. Ивашкин В. Т., Васильев В. Ю., Северин Е. С. Уровни регуляции функциональной активности органов и тканей. — Л., 1987.
7. Лазер в лечении ран / Под ред. В. Н. Кочелова. — Саратов, 1980.
8. Парихоняк В. И., Соловьев В. А. // *Хирургия.* — 1982. — № 12. — С. 68—71.
9. Султанов В. К., Дорофеев Г. И., Ивашкин В. Т. и др. // *Клин. мед.* — 1985. — № 4. — С. 65—68.
10. Эндоскопия при заболеваниях прямой и ободочной кишки / Под ред. В. Д. Федорова. — М., 1978.
11. Ming-Chu T. *Biochemical Markers of Cancer.* — New York, 1982.
12. Pena J. M., Harle E., Domingo A., Cusso R. // *Cancer Res.* — 1983. — Vol. 43. — P. 1172—1175.
13. Sakamoto K. // *Fukuoka Acta med.* — 1980. — Vol. 71, N 10. — P. 547—573.
14. Seifert E., Gail K., Weismuller J. // *Endoscopy.* — 1983. — Vol. 15, N 1. — P. 8—11.

Поступила 11.10.88

#### ACTIVITY OF PROTEIN KINASES AND CONTENT OF CAMP IN GASTRIC MUCOSAL MEMBRANE UNDER CONDITIONS OF NON-MALIGNANT DISEASES

I. D. Grozdova, V. T. Ivashkin, N. P. Klimov, B. V. Krekhnov, E. G. Mamaeva, E. V. Sveshnikova, E. S. Severin, V. Yu. Vasil'ev

Institute of Applied Molecular Biology, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

Activity of cAMP-dependent and -independent protein kinases as well as content of cAMP were studied in biopsy preparations of gastric mucosal membranes obtained from patients with superficial gastritis, erosion, ulcer, adenomatous polypus and ulcer after treatment with laser irradiation. All the patterns studied

were similar in preparations of adenomatous polypus and normal mucosal membrane. Activity of cAMP-independent protein kinases was increased under conditions of erosion, ulcer, gastroduodenal reflux and, especially, in ulcer tissue treated with laser. However, the ratio between cAMP-independent and -dependent

phosphorylation was increased only in 50 % of ulcerous diseases and in gastroduodenal reflux. The equilibrium of cAMP-dependent and -independent phosphorylation was not altered in the other impairments studied even though benign proliferation was stimulated using laser irradiation.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1989

УДК 615.225.2.015.4:[612.015.31:547.17-31].06:[547.269.1+546.72

*И. С. Курбанов, П. И. Мордвинцев, Д. И. Алиев, А. Ф. Ванин*

## ВЛИЯНИЕ ТИОЛОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ И ЖЕЛЕЗА НА ПРОДУКЦИЮ ОКСИДА АЗОТА ИЗ НИТРОПРУССИДА И НИТРОГЛИЦЕРИНА

Институт химической физики АН СССР, Москва

Нитроглицерин (НГ) и нитропруссид (НП) — известные сосудорасширяющие средства, широко используемые в медицине [9, 17]. Их вазодилаторное действие обусловлено способностью продуцировать оксид азота, активирующую растворимую форму гемосодержащего регуляторного фермента — гуанилатциклазы (ГЦ) в стенках кровеносных сосудов и тем самым вызывающую их расслабление [7, 11, 14—16]. В настоящее время способность НГ и НП продуцировать оксид азота широко изучается [1—8, 10, 12, 13, 16]. Некоторые исследователи судят об этой способности по количеству оксида азота, выделяющейся из растворов НП и НГ в свободной, газовой форме [12, 13, 16]. Между тем оксид азота, продуцирующийся из НП и НГ в растворе, может включаться в другие комплексы и соединения, не покидая раствор. Такая ситуация, очевидно, реализуется в биологических средах, в которых оксид азота вряд ли существует в свободной форме. В результате ее переход на гемовую группу ГЦ, вызывающий активацию последней, определяется конкурентными соотношениями между этой группой и другими акцепторами оксида азота.

В настоящей работе такая ситуация проиллюстрирована для растворов НП и НГ после введения в них агентов, способных связывать оксид азота.

### Методика

В экспериментах использовали НП-Na («Чемарол», СССР), цистеин-HCl («Реахим», СССР), восстановленный глутатин (GSH) («Reanal», ВНР), НГ — 1 % раствор в спирте (Минмедпром, Ленинградское производствен-

ное химико-фармацевтическое объединение), дитионит натрия (ч. д. а.), диэтилдитиокарбомат (ДЭТК) натрия (ч. д. а., перекристаллизованный), тиосульфат натрия (ч. д. а., перекристаллизованный),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (ч. д. а.), диметилсульфоксид (ДМСО; ч. д. а.). Улавливание оксида азота, выделяющейся из растворов НП и НГ, проводили на установке, показанной на рис. 1. В сосуд 1 (сосуд-донор) помещали 20 мл 5 мМ раствора НП или 10 мл 3 мМ раствора НГ в 0,05 М фосфатном буфере (рН 7), в сосуд 2 (сосуд-ловушка) — комплекс  $\text{Fe}^{2+}$  — ДЭТК в 2 мл ДМСО. Перед растворением ДЭТК и  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  в ДМСО из растворителя удаляли  $\text{O}_2$  откачиванием до  $10^{-2}$  мм рт. ст., затем в него в вакууме вводили ДЭТК и  $\text{FeSO}_4$ , так что их конечная концентрация составила соответственно 0,5 и 5 мМ. Раствор образующихся при этом бесцветных комплексов  $\text{Fe}^{2+}$  — ДЭТК замораживали в жидком азоте и в замороженном состоянии помещали в сосуд-ловушку, после чего его откачивали до  $10^{-2}$  мм рт. ст. и перекрывали. Раствор НП и НГ в сосудах-донорах замораживали жидким азотом, откачивали до  $10^{-2}$  мм рт. ст. и перекрывали. После перекрытия крана 3 при закрытых кранах 1 и 2 сосуда-донор помещали в водяную баню при 45—50 °С на 10 мин. Затем этот сосуд охлаждали до осаждения паров воды с тем, чтобы они не попали в дальнейший в сосуд-ловушку, что приводило бы к осаждению комплексов  $\text{Fe}^{2+}$  — ДЭТК в ДМСО. Далее сосуд-ловушку опускали в жидкий азот и открывали краны 1 и 2 до начала таяния раствора в сосудах-донорах. В результате оксид азота, выделяющаяся из растворов НП и НГ, конденсировалась в сосуде-ловушке и после размораживания раствора комплекса  $\text{Fe}^{2+}$  — ДЭТК при закрытом кране 3 начинала связываться с ним с образованием парамагнитных мононитрозильных комплексов железа (МНКЖ) с ДЭТК, регистрируемых методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) при 77 К на радиоспектрометре ЭПР-«Рубин». В ряде опытов в сосуд-донор к замороженному раствору НП или НГ добавляли замороженные нейтрализованные до рН 7,2—7,4 растворы цистеина, GSH, тиосульфата натрия, дитионита натрия или  $\text{FeSO}_4$  в 1 мл, так что их конечная концентрация в сосудах-донорах составля-



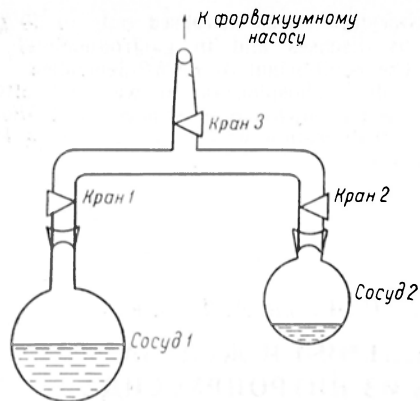


Рис. 1. Схема установки для производства и улавливания окиси азота.

ла соответственно 15—25, 15—25; 30—50, 30—50 и 70 мМ. Затем этот сосуд откачивали до  $10^{-2}$  мм рт. ст., растворы размораживали; в результате добавленные вещества реагировали с НП или НГ при 45—50°C в течение 10 мин. Дальнейшее улавливание окиси азота, выделяющейся из раствора, проводили описанным выше способом. При контакте НП с дитионитом после размораживания раствора начиналось бурное выделение пузырьков с HCN. Для удаления накопившегося над раствором HCN сосуд-донор откачивали в течение 5—7 с. В ряде опытов HCN не откачивали. В контрольных опытах вместо растворов НП и НГ использовали 0,05 М фосфатный буфер (рН 7,4), прогревавшийся 10 мин при 45—50°C. Измерения показали, что и в этом случае в сосуде-ловушке возникали МНКЖ с ДЭТК в фоновой концентрации  $2 \pm 1$  мкМ. Появление этих комплексов мы связываем с наличием окиси азота в реагентах и в воде, поступающей в них из воздуха. Выдерживание раствора  $Fe^{2+}$  — ДЭТК на воздухе приводило к нарастанию в нем содержания МНКЖ с ДЭТК. При использованной нами концентрации НП и НГ в растворе скорость продукции окиси азота в их растворах более чем на порядок превышала аналогичную величину в контрольных опытах: в последних она составляла в течение 10 мин при нагреве буфера до 45—50°C  $1-1,5 \cdot 10^{-2}$  мкМ окиси азота в 1 мин в пересчете на 1 л буфера.

### Результаты и обсуждение

В соответствии с данными других авторов [12, 13, 16] мы наблюдали самопроизвольное выделение окиси азота в свободной форме из раствора НП с последующим ее включением в комплексы с  $Fe^{2+}$  — ДЭТК. Форма сигнала ЭПР образующихся при этом МНКЖ с ДЭТК приведена на рис. 2. Судя по его интенсивности, определяемой путем сравнения с сигналом ЭПР эталонного образца — раствора МНКЖ с известной концентрацией, в условиях дневного комнатного освещения

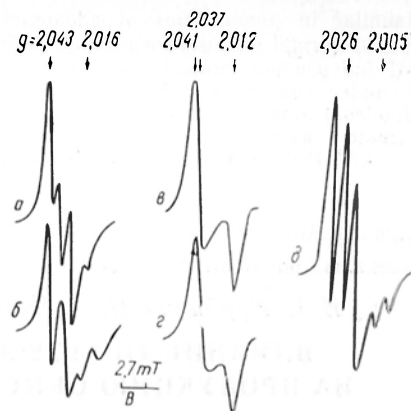


Рис. 2. Сигналы ЭПР МНКЖ с ДЭТК, содержащих  $N^{14}O$  (а) или  $N^{15}O$  (б), ДНКЖ с тиосульфатом (в) или цистеином (г), восстановленного НП (д). Запись при 77 К.

при 45—50°C выход окиси азота из НП в течение 10 мин составлял  $0,2 \pm 0,1$  мкМ/мин в пересчете на 1 л 1 мМ раствора НП, что близко к величине, полученной в работе [13]. В процентном выражении это соответствует распаду 0,02 % НП в 1 мин.

Как было показано ранее [3], при одноэлектронном восстановлении НП в водном растворе он дестабилизируется: начинается высвобождение  $CN^-$ , улетучивающегося из раствора в форме синильной кислоты (HCN); далее в присутствии различных лигандов (тиосульфата, цистеина и др.) возникают парамагнитные динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) с этими лигандами, включающие железо и окись азота, входившие исходно в НП. В наших опытах мы наблюдали аналогичный эффект. Введение в раствор НП восстановителя — дитионита в конечной концентрации 50 мМ — вызвало синее окрашивание раствора и усиление выхода окиси азота: образование МНКЖ с ДЭТК в сосуде-ловушке возрастало в 2—3 раза. Кроме того, в самом растворе НП возникали ДНКЖ с тиосульфатом, образующимся при распаде дитионита [3]. Форма сигнала ЭПР этих комплексов приведена на рис. 2. Их концентрация достигала 0,05 мМ, т. е. в них включалось до 1 % железа, исходно имевшегося в НП. Если же вместе с дитионитом в раствор НП вводили еще и тиосульфат или цистеин в конечной концентрации 50 мМ (рН 7,4), концентрация образующихся ДНКЖ с этими лигандами достигала уровня,

соответствующего включению в них 10—20 % железа, входившего в состав НП. Выброс окиси азота в газообразной форме при этом также усиливался, хотя сами по себе ДНКЖ с тиосульфатом или цистеином, судя по результатам специально поставленных опытов, окись азота практически не высвобождали. Очевидно, выход окиси азота из раствора НП при добавлении дитионита, тиосульфата или цистеина был вызван распадом НП, в ходе которого железо и окись азота связывались с введенными в раствор лигандами с образованием соответствующих ДНКЖ.

Следует отметить, что МНКЖ с ДЭТК возникали в сосуде-ловушке не всегда, а только после того, как в течение 5—7 с из сосуда-донора, содержащего раствор НП с дитионитом, откачивали HCN, а затем уже этот сосуд открывали на сосуд-ловушку. Без такой откачки в последнем возникали не МНКЖ с ДЭТК, а восстановленные комплексы НП, сигнал ЭПР которых приведен на рис. 2. Очевидно, в этом случае вместе с окисью азота в сосуд-ловушку поступала и синильная кислота, включаясь вместе с окисью азота и имевшимся там  $\text{Fe}^{2+}$  в образование НП.

Выход окиси азота из раствора НП можно было выявить и другим способом. В сосуд-ловушку вводили МНКЖ с ДЭТК, содержащий  $\text{N}^{15}\text{O}$ , в растворе ДМСО в концентрации  $10^{-4}$  М, т. е. близкой к той, в которой МНКЖ с ДЭТК возникали в сосуде-ловушке при поступлении в него окиси азота из раствора НП. Сигнал ЭПР МНКЖ с ДЭТК с  $\text{N}^{15}\text{O}$  характеризуется дублетной сверхтонкой структурой (СТС) при  $g_1$ , обусловленной взаимодействием неспаренного электрона с ядром  $\text{N}^{15}$  (ядерный спин  $I=1/2$ ; см. рис. 2). После поступления на такой комплекс  $\text{N}^{14}\text{O}$  из раствора НП дублетный сигнал превращался в «обычный» сигнал МНКЖ с ДЭТК с триплетной СТС, обусловленной взаимодействием неспаренного электрона с ядром  $\text{N}^{14}$ . Очевидно, это изменение было обусловлено замещением  $\text{N}^{15}\text{O}$  в МНКЖ с ДЭТК на  $\text{N}^{14}\text{O}$ , поступавшей из НП.

ДНКЖ с тиосульфатом или цистеином возникали в растворе НП и без добавления в него дитионита. Очевидно, в роли восстановителей могли выступать оба лиганда. Высвобождение

окиси азота из НП с последующим ее включением в ДНКЖ с тиоловыми группами белков — в так называемые комплексы 2,03 [5] наблюдались и на биологических препаратах — гомогенате печени и почек. Последние получали гомогенизацией свежее извлеченной ткани печени или почек мышей в 0,05 М фосфатном буфере (1:1). Комплексы 2,03 возникали в гомогенате после добавления в них НП в конечной концентрации 10 мМ.

НГ в фосфатном буфере сам по себе практически не продуцировал окись азота: если МНКЖ с ДЭТК в результате этого и возникали, их концентрация была не выше фоновой. Окись азота начинала выходить из раствора НГ после введения в него цистеина (15 мМ), GSH (15 мМ) или дитионита (30 мМ) со скоростью  $0,6 \pm 0,2$  мкМ/мин в пересчете на 1 л 1 мМ раствора НГ (измерение в течение 10 мин при прогреве раствора при 45—50 °C). Эта величина близка к полученной в работе [13] для раствора НГ после введения в него цистеина. Отметим, что в той же работе не наблюдалось выделения окиси азота из раствора НГ после добавления GSH. Другое отличие состоит в том, что после добавления в раствор НГ вместе с цистеином, GSH или дитионитом соли железа —  $\text{FeSO}_4$  (правда, в существенно большей концентрации — 70 мкМ против 20 мкМ в работе [13]) мы обнаружили усиление выхода окиси азота из раствора НГ в 2—3 раза. Кроме того, было зарегистрировано образование в растворе НГ ДНКЖ с цистеином, GSH или тиосульфатом, возникающим из дитионита. Концентрация этих ДНКЖ составляла 10—15 % от исходной концентрации НГ. Введение НГ в гомогенат печени или почек вызывало образование в основном нитрозильных комплексов гемопротеинов.

Полученные нами данные согласуются с имеющимися в литературе сведениями о способности растворов НП самопроизвольно продуцировать окись азота, а также выделять это вещество под влиянием различных восстановителей [3, 12, 13, 16]. Вместе с тем в противоположность этим авторам [12, 13] мы отметили усиление выхода окиси азота из раствора НП в присутствии цистеина GSH, а также дитионита, действие которого на НП не

было ими изучено. Мы считаем возможным инициирующее действие негемового железа (ионов  $\text{Fe}^{2+}$ ) на выход окиси азота из растворов НГ и обращаем основное внимание на включение окиси азота, высвобождаемой из растворов НП и НГ, в ДНКЖ, образующиеся в тех же растворах. Образование ДНКЖ в растворах НП и НГ обеспечивается дестабилизацией этих соединений, вызываемой их восстановлением. В результате железо и окись азота, входившие в состав НП, легко связываются с тиолсодержащими лигандами с образованием соответствующих ДНКЖ. В присутствии дитиолов, например диэтилдитиокарбамата, могут возникать и соответствующие мононитрозильные комплексы железа (МНКЖ) [6]. В эти МНКЖ и ДНКЖ включается до 20 % окиси азота, входившей в состав НП, что на 2—3 порядка выше количества окиси азота, выделяемой в свободном виде из раствора НП. Что касается НГ, то при действии на него восстановителей вначале, по-видимому, происходит гидролиз эфирной связи с высвобождением аниона  $\text{NO}_2^-$ , который затем в ходе восстановительных процессов продуцирует окись азота. В отсутствие лигандов и  $\text{Fe}^{2+}$  она выделяется из раствора; в присутствии  $\text{F}^{2+}$ , цистеина, GSH или тиосульфата начинается синтез ДНКЖ, что усиливает продукцию окиси азота из НГ. В результате ее количество, включившееся в ДНКЖ, более чем на 2 порядка превышает количество окиси азота, выделившейся в свободном виде из раствора.

Итак, наши данные показывают, что тиоловые соединения и химические восстановители существенно влияют на продукцию окиси азота из НП, а также НГ, причем для последнего этот процесс усиливается в присутствии ионов  $\text{F}^{2+}$ . Продуцирующаяся из НП и НГ окись азота в основном остается в растворе в связанном состоянии, включаясь в соответствующие ДНКЖ. Такая же ситуация наблюдается и при введении НП и НГ в биологические среды [1, 2, 5—8, 10]. Введение НП в гомогенат печени и почек вызывает образование комплексов 2,03; окись азота, выделяющаяся в гомогенате тканей из НГ, в основном связывается с гемопротейнами. Образование комплексов 2,03 в печени мы-

шей *in vivo* после введения в их организм НП, а также комплексов гемоглобин — окись азота после введения им НГ зарегистрировано в работах [6—8, 10]. Таким образом, в организме высвобождающаяся из НП и НГ окись азота оказывается связанной с различными соединениями. Этот факт следует учитывать при анализе активирующего влияния данного вещества на ГЦ в тканях животных при воздействии на них продуцентов окиси азота — НП и НГ.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Алиев Д. И., Ванин А. Ф. // Журн. физ. химии. — 1982. — Т. 56. — С. 2362.
2. Алиев Д. И., Ванин А. Ф. // Там же. — С. 2365.
3. Бурбаев Д. Ш. Исследование методом ЭПР соединений, моделирующих комплексы негемового железа в биологических объектах: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 1971.
4. Ванин А. Ф., Бурбаев Д. Ш., Сарна Т., Марданян С. С. // Биофизика. — 1972. — Т. 27. — С. 179.
5. Ванин А. Ф. Нитрозильные комплексы негемового железа в тканях животных и микроорганизмах: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — М., 1979.
6. Ванин А. Ф., Мордвинцев П. И., Клещев А. Л. // *Studia biophys.* 1984. — Bd 102. — S. 135.
7. Клещев А. Л., Мордвинцев П. И., Ванин А. Ф. // *Ibid.* — 1985. — Bd 105. — S. 93.
8. Клещев А. Л., Мордвинцев П. И., Шабарчина М. М., Ванин А. Ф. // Журн. физ. химии. — 1985. — Т. 59. — С. 462.
9. Лецинский П. М., Мареев В. Ю. // Тер. арх. — 1982. — № 5. — С. 148.
10. Пастушенко З. В., Пастушенко О. П., Куроптева З. В. // Докл. АН СССР. — 1985. — Т. 281. — С. 185.
11. Arnold W. F., Murad F., Mittal C. K., Katsuki S. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.* — 1977. — Vol. 74. — P. 3203.
12. Feelisch M., Noack E. A. // *Europ. J. Pharmacol.* — 1987. — Vol. 139. — P. 19.
13. Feelisch M., Noack E. A. // *Ibid.* — Vol. 142. — P. 465.
14. Ignarro L. J., Gruetter C. A. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1980. — Vol. 631. — P. 221.
15. Murad F., Mittal C. K., Arnold W. P. et al. // *Advanc. Cyclic Nucl. Res.* — 1978. — Vol. 9. — P. 145.
16. Ohlstein E. H., Barry B. K., Gruetter D. V., Ignarro L. J. // *FEBS Lett.* — 1979. — Vol. 102. — P. 346.
17. Shlevin H. H. // *Life Sci.* — 1982. — Vol. 30. — P. 1235.

Поступила 25.10.88

# EFFECTS OF THIOL-CONTAINING PREPARATIONS AND IRON ON FORMATION OF NITRIC OXIDE FROM NITROPRUSSIDE AND NITROGLYCEROL

I. S. Kurbanov, P. I. Mordvinov, D. I. Aliev, A. F. Vanin

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

Some thiol-containing substances 5-Na-thiosulfate, cysteine, reduced glutathione and reducing agent Na-dethionite were shown to elevate formation of nitric oxide from both Na-

nitroprusside and nitroglycerol in water solutions, especially if  $\text{Fe}^{2+}$  was added into solution of nitroglycerol. Nitric oxide developed was maintained in solutions in the complexes containing water soluble dinitrosyl iron and thiol derivatives. Release of nitric oxide from nitroprusside and nitroglycerol in animals was caused by similar reactions. At the same time, nitric oxide, derived from nitroprusside, was involved in complexes containing dinitrosyl iron and a protein with double thiol group, whereas nitric oxide, obtained from nitroglycerol, was bound with hemoglobin, producing Hb-nitrosyl complexes.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1989

ДК 616.712-007.24-07: [616.5+616.71-018.3]-008.939.629-074

Б. П. Соколов, Б. М. Шер, Е. А. Козлов, Т. А. Цветкова, С. С. Рудаков, А. А. Дельвиц, В. Н. Калинин

## НАРУШЕНИЕ СТРУКТУРЫ КОЛЛАГЕНА I ТИПА И НАЛИЧИЕ СШИВОК МЕЖДУ ЦЕПЯМИ КОЛЛАГЕНОВ I И III ТИПОВ У БОЛЬНОГО С ИЗОЛИРОВАННОЙ ФОРМОЙ КИЛЕВИДОЙ ДЕФОРМАЦИИ ГРУДНОЙ КЛЕТКИ

Институт медицинской генетики АМН СССР, Институт медицинской энзимологии АМН СССР, Москва

Коллагены — белки человека и высших животных, составляющие 20—25 % от общего количества белковой массы в организме [4, 10]. Коллагены входят в состав всех видов соединительной ткани, формируют строю паренхиматозных органов, присутствуют в стенках кровеносных сосудов, кишечника и в базальных мембранах. Наиболее широко в организме представлены коллагены I, II и III типов. Коллагены I и III типов составляют белковую основу кожи и костей, II типа — основу хряща. Молекулы коллагенов II и III типов представляют собой тримеры цепей соответственно  $\alpha 1$  (II) и  $\alpha 1$  (III), молекулы коллагена I типа состоят из двух цепей  $\alpha 1$  (I) и одной цепи  $\alpha 2$  (I), формирующих устойчивую трехспиральную структуру, не чувствительную к действию протеаз (за исключением специфических коллагеназ) при физиологических температурах. В результате самосборки молекулы коллагенов образуются в фибриллы. Фибриллы дополнительно стабилизируются внутри- и межмолекулярными ковалентными сшивками между  $\alpha$ -цепями, которые образуются между модифицированными остатками некоторых аминокислот. В отличие от молекул коллагенов I и II типов в молекулах

коллагена III типа цепи связаны дополнительно дисульфидными мостиками [11].

Коллагены играют важную роль в эмбриогенезе, существенно влияют на дифференцировку клеток соединительной ткани, а также эпителиальных и мышечных клеток, активно участвуют в формировании микро- и макроархитектоники тканей [4, 8, 11]. С изменениями коллагенов связаны различные физиологические процессы, в том числе патологические. Известен ряд наследственных и врожденных болезней соединительной ткани, обусловленных нарушениями структуры и метаболизма коллагенов. Изучение коллагенов больных с патологией соединительной ткани может дать уникальную возможность для получения новых сведений о их роли в жизнедеятельности организма человека в норме, о функциональной значимости различных участков молекул и разных этапов их процессинга для функционирования.

В настоящей работе мы провели изучение коллагенов, выделенных из кожи и реберного хряща больного с изолированной формой врожденной килевидной деформации грудной клетки (КДГК) и 10 детей, не имевших признаков патологии соединительной





Рис. 1. Электрофорез коллагенов, экстрагированных из кожи больного К. (1) и ребенка из контрольной группы (2).

ткани. В результате выявлены существенные изменения структуры коллагенов больного с КДГК и получены данные, свидетельствующие об образовании в коже больного сшивок между цепями коллагенов I и III типов.

#### Методика

Образцы кожи больного получали при биопсии, образцы реберного хряща — при хи-

Таблица 1

Влияние различных условий дополнительной обработки коллагенов кожи больного К. и детей из контрольной группы пепсином на соотношение  $\alpha 1(I)^P/\alpha 1(I) + \alpha 1(I)^P$

Температура, °C	Гро-дол-ж-ть-ость обра-ботки	$\alpha 1(I)^P$		
		$\alpha 1(I) + \alpha 1(I)^P$		
		боль-ной К.	норма	
			№ 1	№ 2
4	0	0,39	0,09	0,26
	120 ч	0,61	0,12	н. о.
18	5 мин	0,62	н. о.	н. о.
	10 мин	0,70	н. о.	н. о.
	20 мин	0,68	н. о.	н. о.
	1 ч	0,56	0,11	0,20
	3 ч	0,44	0,12	0,22
	5 ч	0,21	0,12	0,21
	8 ч	0,30	0,12	0,23
	72 ч	0,40	0,12	0,18

Примечание. н. о. — не определяли.

рургической коррекции КДГК. В качестве контроля использовали аутопсийный материал. Образцы тканей хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Все операции по выделению коллагенов проводили при  $4^{\circ}\text{C}$ .

Коллагены кожи выделяли по методу [13]. Образцы кожи очищали от жира, мелко измельчали, инкубировали в 100 объемах 0,5 М уксусной кислоты в течение суток, гомогенизировали в гомогенизаторе «Virtis», добавляли еще 100 объемов 0,5 М уксусной кислоты и экстрагировали в течение суток. К экстракту добавляли пепсин до конечной концентрации 100 мкг/мл, инкубировали в течение 16 ч и центрифугировали 1 ч при 5000 об/мин. Для осаждения коллагенов к надосадочной жидкости добавляли NaCl до конечной концентрации 2 М, осадок отделяли центрифугированием при 30 000 g в течение 1 ч, растворяли в небольшом объеме 0,5 М уксусной кислоты и диализовали против 0,5 М уксусной кислоты до полного удаления NaCl, после чего лиофилизировали.

Выделение коллагена II типа из реберного хряща проводили по методу [5] с небольшими изменениями. Хрящ очищали от надхрящницы, гомогенизировали в гомогенизаторе «Virtis» и промывали 4 М раствором гуанидинхлорида. Гомогенат хряща экстрагировали раствором пепсина (100 мкг/мл) в 0,5 М уксусной кислоте в течение суток. Экстракт центрифугировали (5000 об/мин, 30 мин), к надосадочной жидкости добавляли NaCl до конечной концентрации 2 М для осаждения коллагенов с последующим центрифугированием (30 000 g, 30 мин). Осадок растворяли в небольшом количестве 0,5 М уксусной кислоты и диализовали против 0,5 М уксусной кислоты до полного удаления NaCl, после чего лиофилизировали.

Электрофорез коллагеновых белков проводили в градиентном (5—15%) полиакриламидном геле (ПААГ) [9]. После электрофореза гели окрашивали кумаси R-250.

Пептидное картирование коллагенов проводили по методу [12] с небольшими изменениями. Препараты коллагеновых белков (1 мг) растворяли в 200 мкл раствора бромциана (0,1 мг/мл) в 70% муравьиной кислоты, выдерживали 3 ч при  $37^{\circ}\text{C}$ , высушивали и подвергали электрофорезу в ПААГ (10—25%). Пептидное картирование индивидуальных коллагеновых полипептидов проводили, как описано ранее [3].

Сканирование гелей осуществляли при длине волны 570 нм, соотношение площадей пиков на электрофореграммах определяли с помощью системы анализа изображений IBAS-1 («Opton», ФРГ).

Тотальное соотношение коллагенов III и I типов в экстрактах кожи определяли по формуле, аналогичной предложенной в работе [6]: количество коллагена III типа =

$$= \frac{A(\alpha 1(III) CB5)}{A(\alpha 1(I) CB8) \cdot 1,5 \cdot 0,848 + A(\alpha 1(III) CB5)} \times 100\%,$$

где А — площадь пика соответствующего пептида на денситограмме.

Соотношение интактных молекул коллагенов III и I типов, не имеющих сшивок, определяли по формуле:



Рис. 2. Электрофорез пептидов, полученных после обработки бромцианом коллагенов кожи больного К. (2) и ребенка из контрольной группы (1).  
а — восстанавливающие условия; б — невосстанавливающие условия.

количество коллагена II типа =  $\frac{X - Y}{X + Y} \cdot 100 \%$ ,

где  $X = \frac{A(\alpha 1(I) + \alpha 1(II))}{A(\alpha 2(I))}$  — восстанавливающие условия электрофореза,

$Y = \frac{A(\alpha 1(I))}{A(\alpha 2(I))}$  невосстанавливающие условия электрофореза.

Для определения чувствительности к пепсину образцы коллагенов (100 мкг) растворяли на холоду в 100 мкл 0,5 М уксусной кислоты, добавляли 5 мкл раствора пепсина (5 мг/мл) и помещали в водяную баню с соответствующей температурой. Через 1 ч после начала инкубации пробирки с образцами помещали в жидкий азот и после замораживания лиофилизировали. Лиофилизированные образцы подвергали электрофорезу в ПААГ.

Общую чувствительность коллагена II типа к пепсину при 37 °С оценивали по соотношению площадей пиков цепи  $\alpha_1(II)$  до и после обработки препаратов коллагенов пепсином.

Содержание фракции молекул коллагенов I и II типов, способных к протеолитическому отщеплению N-концевых участков, оценивали по соотношению площадей пиков полноразмерных цепей  $\alpha 1(I)$ ,  $\alpha 2(I)$ ,  $\alpha 1(II)$  и соответствующих цепей  $\alpha 1(I)^p$ ,  $\alpha 1,2(I)^p$ ,  $\alpha 1(II)^p$ , не содержащих N-концевых участков.

## Результаты и обсуждение

На рис. 1 приведены результаты электрофореза в градиентном (5—15 %) ПААГ коллагенов, экстрагированных из кожи больного К. и ребенка из контрольной группы. Электрофорграмма коллагенов кожи больного К. существенно отличается от нормы. Во-первых, кроме цепей  $\alpha 1(I)$  и  $\alpha 2(II)$ , димеров  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{12}$  и  $\gamma$ -компонентов, четко виден дополнительный полипептид, расположенный между  $\alpha 1(I)$  и  $\alpha 2(I)$  [обозначен как  $\alpha 1(I)^p$ ], а также набор полипептидов, расположенных ниже цепи  $\alpha 2(I)$ . В пепсиновых экстрактах кожи детей контрольной группы полипептид с подвижностью, аналогичной подвижности полипептида  $\alpha 1(I)^p$ , либо не обнаруживается, либо выявляется в значительно меньшем количестве (см. рис. 1, табл. 1). Во-вторых, резко снижено количество димера  $\beta_{12}$  и цепи  $\alpha 2(I)$ . Кроме того, видны полосы, образованные полипеп-

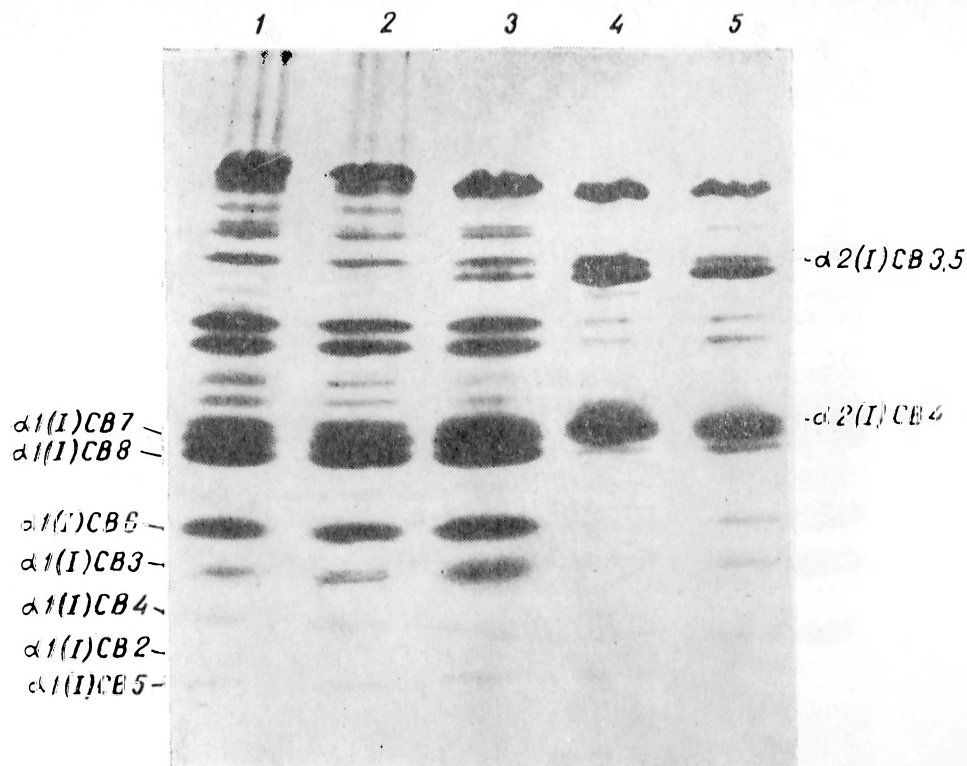


Рис. 3. Пептидные карты полипептида  $\alpha 1(I)^P$  больного К. и цепей  $\alpha 1(I)$  и  $\alpha 2(I)$  больного К. и ребенка из контрольной группы.  
1, 4 — пептиды цепей  $\alpha 1(I)$  и  $\alpha 2(I)$  больного К.; 2 — пептиды цепи  $\alpha 1(I)^P$  больного К.; 3, 5 — пептиды цепей  $\alpha 1(I)$  и  $\alpha 2(I)$  ребенка из контрольной группы.

тидами с мол. массой более 120 000 Д, представляющие собой, по-видимому, цепи коллагена V типа, практически не выявляемые в норме. На рис. 2 представлены результаты электрофореза пептидов, полученных после расщепления коллагенов кожи бромцианом по остаткам метионина. На электрофореграммах видны все высокомолекулярные CNBr-пептиды цепей коллагенов I и III типов. Кроме того, у больного К. присутствует дополнительный пептид  $X^{CNBr}$ , мигрирующий несколько быстрее, чем пептид  $\alpha 1(I)$  CB 8. В норме этот пептид практически не обнаруживается. Относительная интенсивность пептида  $\alpha 2(I)$  CB 3,5 у больного К. снижена по сравнению с нормой, что коррелирует со сниженным количеством цепи  $\alpha 2(I)$ , выявленным у данного больного (см. рис. 1). Цепи  $\alpha 1(III)$  в коллагене III типа связаны дисульфидными мостиками, в которых участвуют остатки цистеина, располагающиеся в пептиде  $\alpha 1(III)$  CB 9. Поэтому в норме пептид  $\alpha 1(III)$  CB 9 выявляется только при электрофорезе

в восстанавливающих условиях (см. рис. 2, а) и не обнаруживается в невосстанавливающих условиях (см. рис. 2, б). В противоположность этому у больного К. пептид  $\alpha 1(III)$  CB 9 выявляется и в восстанавливающих, и в невосстанавливающих условиях, хотя во втором случае его относительная интенсивность снижается (см. рис. 2, а, б). Это позволяет предположить, что либо в гидролизате коллагенов кожи больного К. имеется CNBr-пептид коллагена иного типа, чем I или III, мигрирующий вместе с пептидом  $\alpha 1(III)$  CB 9 коллагена III типа, либо в коже этого больного присутствуют короткие фрагменты коллагеновых молекул, содержащие последовательности пептида  $\alpha 1(III)$  CB 9 и не имеющие дисульфидных мостиков.

Для выяснения природы полипептида  $\alpha 1(I)^P$  было проведено пептидное картирование индивидуальных цепей коллагенов, фракционированных электрофорезом в ПААГ. На рис. 3 видно, что полипептид  $\alpha 1(I)^P$  содержит все высокомолекулярные CNBr-пептиды

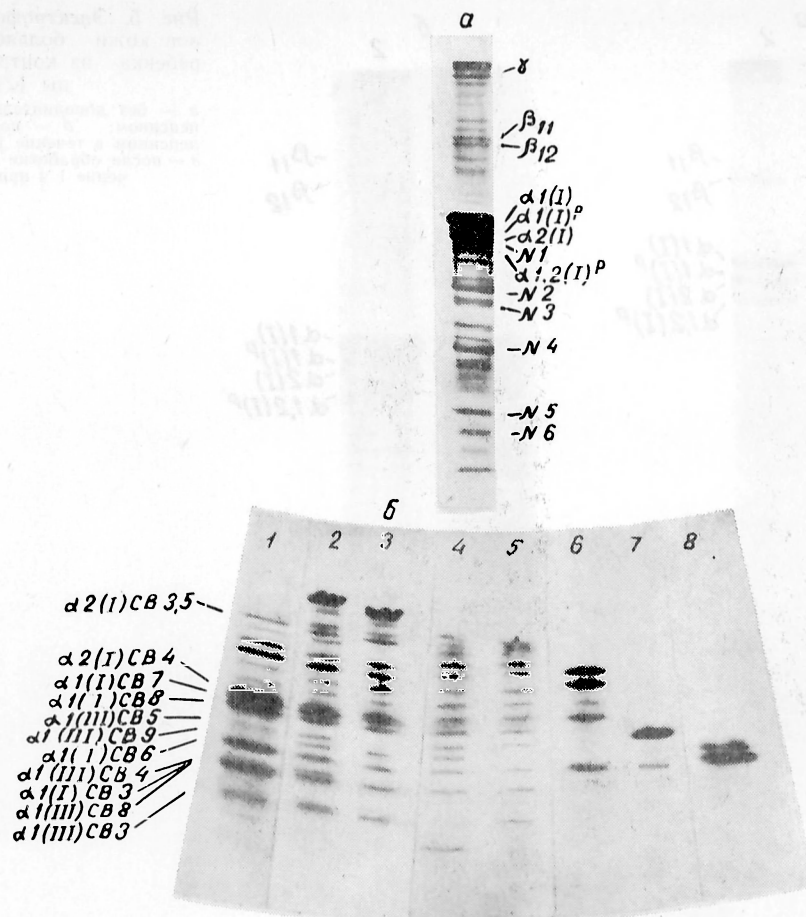


Рис. 4. Пептидные карты дополнительных полипептидов, выявляемых в пепсиновых экстрактах коллагенов кожи больного К.

а — электрофореграмма коллагенов кожи больного К.; б: 1 — пептиды нефракционированных на индивидуальные цепи коллагенов кожи больного К.; 2—8 — пептиды полипептидов соответственно № 1, α 1,2 (I)<sup>P</sup>, № 2, 3, 4, 5 и 6.

цепи α 1 (I) и подвижности их не изменены. В то же время на пептидной карте полипептида α 1 (I)<sup>P</sup> отсутствуют 2 полосы, имеющиеся на карте α 1 (I) и представляющие собой, по-видимому, низкомолекулярные пептиды α 1 (I) CB 2 и α 1 (I) CB 4, расположенные в N-концевой области цепи α 1 (I). Таким образом, результаты CNBr-пептидного картирования свидетельствуют о том, что полипептид α 1 (I)<sup>P</sup> представляет собой укороченную цепь α 1 (I), у которой в результате либо делеции, либо ограниченного протеолиза отсутствует часть N-концевой последовательности.

CNBr-пептидный анализ полипептидов, мигрирующих быстрее цепи α 2 (I), показал, что они представляют собой в основном продукты частичного расщепления цепей коллагенов I и III типов, поскольку содержат CNBr-пеп-

тиды, характерные для цепей α 1 (I), α 2 (I) и α 1 (III) (рис. 4). В частности, в зоне, обозначенной α 1, 2 (I)<sup>P</sup> и выявляемой после обработки пепсином и в норме (см. рис. 4), содержатся укороченные цепи α 1 (I) и α 2 (I) с последовательностями всех высокомолекулярных CNBr-пептидов, но без N-концевых участков. Эти полипептиды были подробно описаны нами в другой работе [1]. Полипептиды в зоне № 1, хорошо видной у больного К. и слабо заметной в норме (см. рис. 1), также содержат укороченные цепи α 1 (I) и α 2 (I), но больших размеров, чем в зоне α 1, 2 (I)<sup>P</sup>. Полипептиды, расположенные ниже зоны α 1, 2 (I)<sup>P</sup>, содержат лишь некоторые из высокомолекулярных CNBr-пептидов цепей коллагенов I и III типов и являются, по-видимому, более короткими фраг-



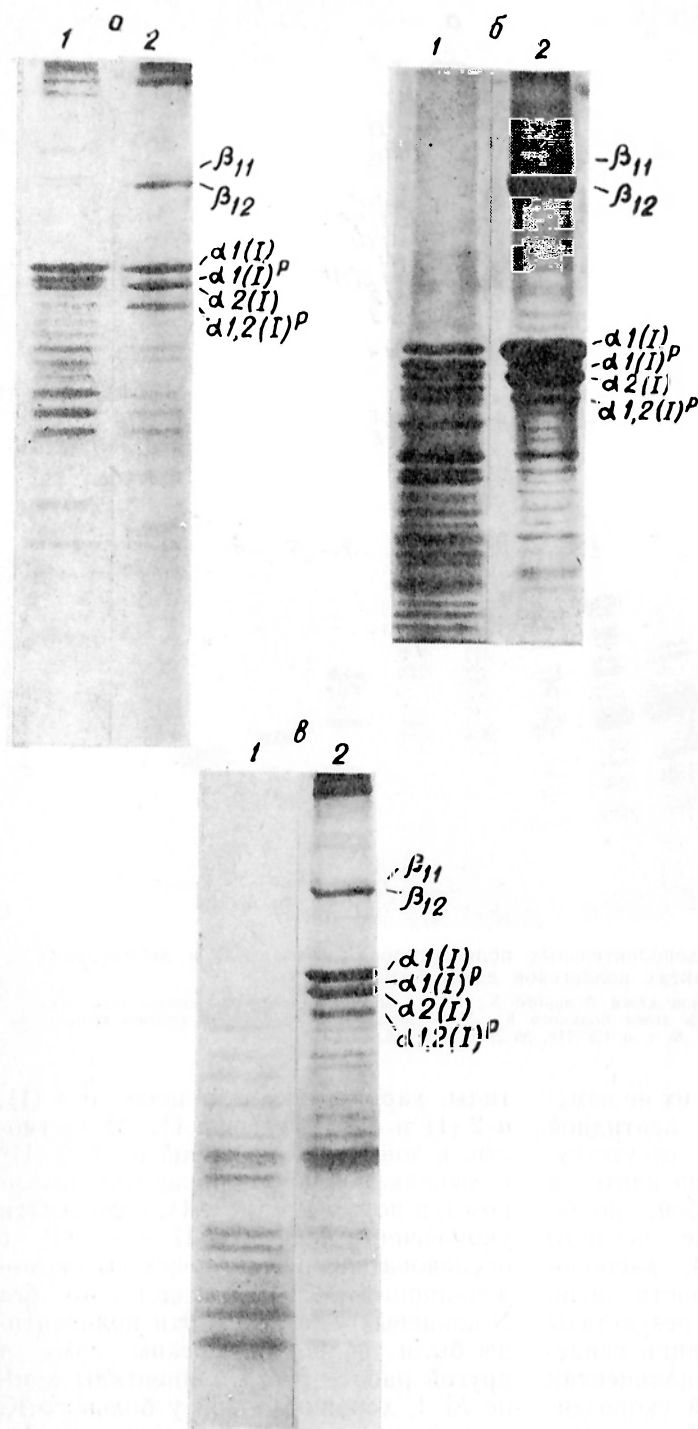


Рис. 5. Электрофорез коллагенов кожи больного К. (1) и ребенка из контрольной группы (2).

а — без дополнительной обработки пепсином; б — после обработки пепсином в течение 120 ч при 4 °С; в — после обработки пепсином в течение 1 ч при 18 °С.

ментами цепей  $\alpha 1(I)$ ,  $\alpha 2(I)$  и  $\alpha 1(III)$ .

Исключение составляет полипептид № 5. После обработки бромцианом его подвижность не изменяется (см. рис. 4) и соответствует подвижности пептида  $X^{CNBr}$ , выделяемого в значительном количестве в  $CNBr$ -гидроли-

зате коллагенов кожи больного К. Вероятно, полипептид № 5 представляет собой цепь или фрагмент цепи коллагена иного типа, чем I и III, представленного в большем количестве у больного К., чем в норме.

На рис. 5 приведены результаты обработки коллагенов кожи больного К.

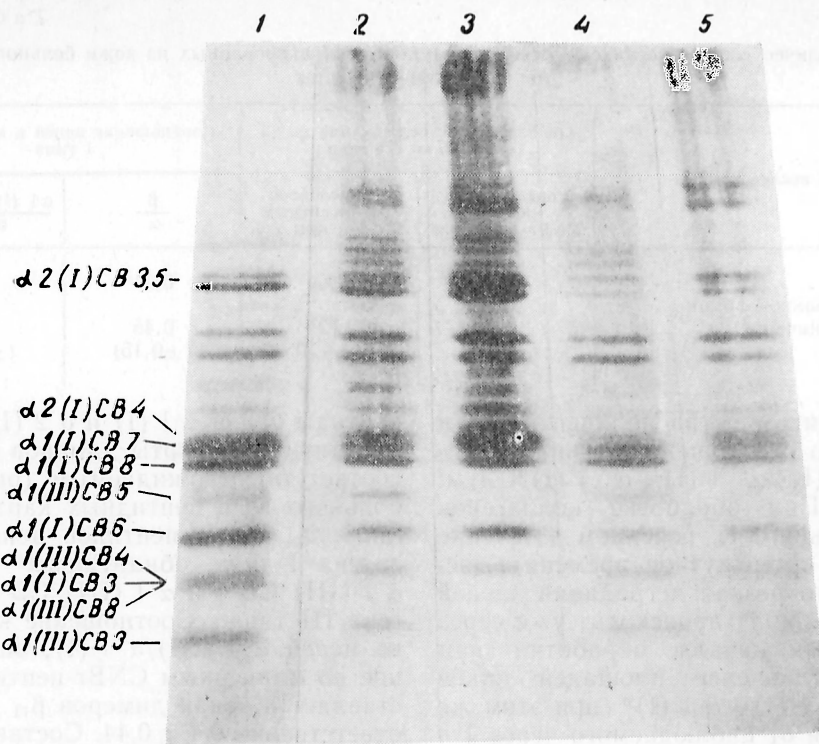


Рис. 6. Пептидное картирование полипептидов, мигрирующих в зонах димеров  $\beta_{11}$  и  $\beta_{12}$  больного К. и ребенка из контрольной группы.

1 — пептиды нефракционированных на цепи коллагенов кожи ребенка из контрольной группы; 2 — пептиды димера  $\beta_{11}$  больного К.; 3 — пептиды димера  $\beta_{12}$  ребенка из контрольной группы; 4 — пептиды димера  $\beta_{11}$  больного К.; 5 — пептиды димера  $\beta_{11}$  ребенка из контрольной группы.

пепсином в различных условиях. Длительная обработка (120 ч) пепсином при 4 °С приводит к существенному снижению интенсивности полосы  $\alpha 1(I)$  и одновременному повышению интенсивности полосы  $\alpha 1(I)^P$ . Соотношение площадей пиков  $\alpha 1(I)^P/\alpha 1(I) + \alpha 1(I)^P$  повышается от 0,39 до начала обработки пепсином до 0,61 после ее окончания (см. табл. 1). Эти результаты подтверждают, что полипептид  $\alpha 1(I)^P$  образуется в результате протекстического отщепления части N-концевой последовательности цепи  $\alpha 1(I)$ . Полипептид  $\alpha 1(I)^P$  после обработки пепсином удается выявить во всех образцах коллагенов кожи детей контрольной группы, однако в значительно меньшем количестве (см. рис. 5 и табл. 1). У больного К. после обработки пепсином в зоне цепи  $\alpha 2(I)$  выявляется дуплет из двух близлежащих полос с общей интенсивностью, меньшей, чем первоначальная интенсивность цепи  $\alpha 2(I)$ , резко увеличивается относительная интенсивность полосы № 1. Димеры  $\beta_{11}$  и  $\beta_{12}$  при этом полностью деградируют, в то время как

в норме их количество после обработки пепсином не снижается (см. рис. 5).

При обработке коллагенов кожи больного К. пепсином в течение 1 ч при более высокой температуре (18 °С) происходит практически полная деградация цепей  $\alpha 1(I)$ ,  $\alpha 2(I)$  и полипептида  $\alpha 1(I)^P$  (см. рис. 5). Соотношение площадей пиков  $\alpha 1(I)^P/\alpha 1(I) + \alpha 1(I)^P$  увеличивается с 0,39 до начала дополнительной обработки пепсином до 0,56. При увеличении срока обработки пепсином до 8 ч существенного снижения интенсивности полос  $\alpha 1(I)$  и  $\alpha 2(I)$  не наблюдается, соотношение площадей пиков  $\alpha 1(I)^P/\alpha 1(I) + \alpha 1(I)^P$  несколько снижается (см. табл. 1). В норме после обработки пепсином в течение 1 ч при 18 °С, как и после обработки при 4 °С в течение 72 ч, существенного протеолиза цепей  $\alpha 1(I)$  и  $\alpha 2(I)$  не происходит, однако полипептиды  $\alpha 1(I)^P$  и  $\alpha 1, 2(I)^P$  выявляются более четко. Соотношение площадей пиков  $\alpha 1(I)^P/\alpha 1(I) + \alpha 1(I)^P$  составляет 0,1—0,2. Дальнейшее увеличение длительности обработки пепсином до 72 ч не приводит

Основные количественные характеристики коллагенов, экстрагированных из кожи больного К. и детей контрольной группы

Группа исследованных	Относительное содержание (в %) коллагена III типа		Соотношение цепей в коллагене I типа	
	определенное по маркерным CNBr-пептидам	определенное по интактным $\alpha$ -цепям	$\frac{\beta}{\alpha}$	$\frac{\alpha 1(I) + \alpha 1(I)^p}{\alpha 2(I)}$
Больной Дети контрольной группы (среднее значение)	16	46	0,11	3,7
	22 ( $\pm 4,3$ )	12 ( $\pm 6,5$ )	0,45 ( $\pm 0,15$ )	2,3 ( $\pm 0,21$ )

к изменению спектра полипептидов и изменению соотношения площадей пиков  $\alpha 1(I)^p/\alpha 1(I) + \alpha 1(I)^p$  (см. табл. 1). При обработке коллагенов кожи больного К. пепсином в течение коротких промежутков времени выяснилось, что резкая деградация цепей  $\alpha 1(I)$  и  $\alpha 2(I)$  происходит уже через 5 мин после начала обработки при 18°C. Соотношение площадей пиков  $\alpha 1(I)^p/\alpha 1(I) + \alpha 1(I)^p$  при этом же отличается от наблюдаемого через 1 ч (см. табл. 1).

Эти данные позволяют предположить, что деградация коллагена I типа, выделяемого из кожи больного К., имеет двухфазный характер. В первую фазу, которая длится менее 5 мин, происходит быстрая деградация основной массы цепей, причем  $\alpha 2(I)$  расщепляется практически полностью,  $\alpha 1(I)$  — несколько в меньшей степени. Цепь  $\alpha 1(I)$ , по-видимому, частично превращается в полипептид  $\alpha 1(I)^p$ , поскольку соотношение пиков  $\alpha 1(I)^p/\alpha 1(I) + \alpha 1(I)^p$  возрастает. Во вторую фазу (после 5 мин) деградация цепей идет очень медленно и наблюдается снижение соотношения  $\alpha 1(I)^p/\alpha 1(I) + \alpha 1(I)^p$ , т. е. происходит преимущественная по сравнению с  $\alpha 1(I)$  деградация  $\alpha 1(I)^p$ .

Поскольку содержание димеров у больного К. резко снижено и они полностью расщепляются при обработке пепсином, было проведено пептидное картирование димеров  $\beta_{11}$  и  $\beta_{12}$  с целью изучения их состава. Результаты оказались неожиданными. По данным литературы, димер  $\beta_{11}$  представляет собой 2 ковалентно связанные цепи  $\alpha 1(I)$ , димер  $\beta_{12}$  — ковалентно связанные цепи  $\alpha 1(I)$  и  $\alpha 2(I)$ . В соответствии с этим пептидные карты  $\beta_{11}$  должны содержать только пептиды, характерные для цепи  $\alpha 1(I)$ , а  $\beta_{12}$  —

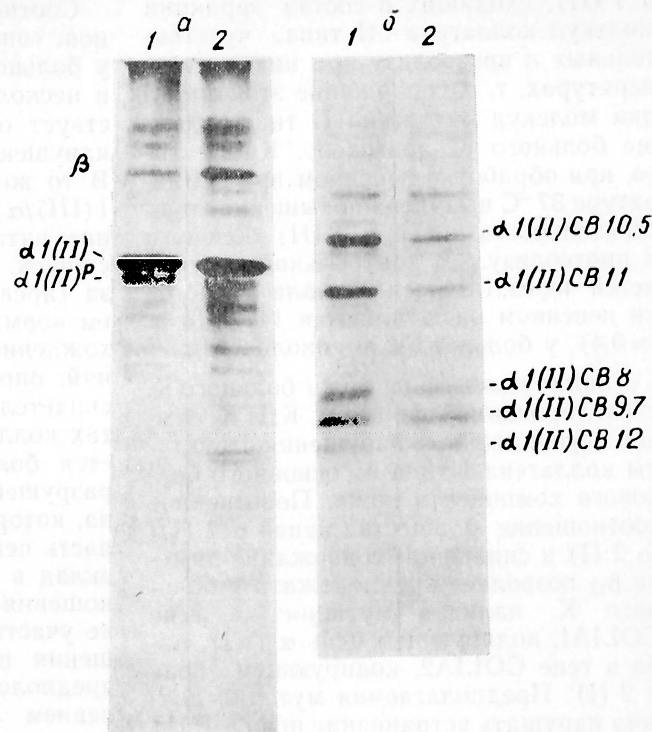
пептиды цепей  $\alpha 1(I)$  и  $\alpha 2(I)$ . В норме пептидные карты димеров  $\beta_{11}$  и  $\beta_{12}$  соответствуют ожидаемому (рис. 6). У больного К. в пептидных картах зоны димеров, кроме пептидов цепей коллагена I типа, обнаружены пептиды  $\alpha 1(III)$  CB 5 и  $\alpha 1(III)$  CB 3 коллагена III типа. Соотношение количества цепей  $\alpha 1(III)/\alpha 1(I)$ , определенное по маркерным CNBr-пептидам, составляет в зонах димеров  $\beta_{11}$  и  $\beta_{12}$  соответственно 0,4 и 0,44. Состав  $\gamma$ -компонент больного К. и соотношение цепей  $\alpha 1(III)/\alpha 1(I)$  в них не отличаются от нормы (данные не приведены).

Было проведено определение количественных характеристик состава коллагенов кожи больного К. и детей контрольной группы. Как видно из табл. 2, соотношение цепей  $\alpha 1(I) + \alpha 1(I)^p/\alpha 2(I)$  в коллагене I типа у больного К. существенно повышено и составляет 3,7, в то время как в норме оно равно 2,3 ( $\sigma = 0,21$ ).

Среднее отношение количества димеров  $\beta_{11} + \beta_{12}$  к количеству мономерных цепей  $\alpha 1(I)$  и  $\alpha 2(I)$ , которое отражает уровень внутримолекулярных межцепочечных сшивок в молекулах коллагена I типа, в коже детей контрольной группы составляет 0,45 ( $\sigma = 0,15$ ). У больного К. относительное содержание димеров снижено и составляет 0,11. Следует отметить, что снижение суммарного содержания димеров у больного К. происходит в основном за счет снижения содержания димера  $\beta_{12}$  [соотношение димеров  $\beta_{12}/\beta_{11}$  в контроле равно 3,6 ( $\sigma = 1,0$ ), у больного К. оно составляет 1,2]. Определение соотношения коллагенов III и I типов по маркерным CNBr-пептидам  $\alpha 1(III)$  CB 5 и  $\alpha 1(I)$  CB 8, позволяющее оценить тотальное соотношение коллагенов III и I типов, включая и связанные межцепочечными сшив-

Рис. 7. Электрофорез коллагенов, экстрагированных из реберного хряща больного К. и ребенка из контрольной группы (а), и пептидов, полученных обработкой бромцианом коллагенов реберного хряща больного К. и ребенка из контрольной группы (б).

1 — больной К.; 2 — ребенок из контрольной группы.



ками и частично разрушенные молекулы с неповрежденными маркерными пептидами, не выявило у больного К. существенного отличия от нормы. Доля коллагена III типа составляет у него 16 %, в норме среднее значение равно 22 % ( $\sigma=4,3$ ). Соотношение интактных молекул коллагенов III и I типов, не имеющих межцепочечных сшивок, определяемое по соотношению цепей  $\alpha 1(III)/\alpha 1(I)$ , у больного К. существенно повышено. В норме доля коллагена III типа среди интактных молекул коллагенов кожи, не имеющих сшивок, составляет 12 % ( $\sigma=6,5$ ), в то время как у больного К. она равна 46 %.

Электрофоретический анализ коллагенов реберного хряща больного К. не выявил изменений в подвижности цепи  $\alpha 1(II)$  по сравнению с нормой или наличия дополнительных полипептидов. При CNBr-пептидном анализе изменений также не выявлено (рис. 7). Содержание  $\beta$ -компонент в коллагене II типа больного не отличается от нормы (табл. 3). Отмечается повышенное содержание полипептида  $\alpha 1(II)^P$ , особенно после обработки препарата коллагена пепсином при 30 °С. Полипептид  $\alpha 1(II)^P$ , как нами было показано ранее [1], представляет собой продукт отщепления концевых участков цепей

Таблица 3

Основные количественные характеристики коллагена II типа, экстрагированного из реберных хрящей больного К. и детей контрольной группы

Группа обследованных	Относительное содержание (в %) цепи $\alpha 1(II)^P$ в пепсиновом экстракте коллагенов реберного хряща		Процент цепей $\alpha 1(II)$ , деградировавших при обработке пепсином при 37 °С в течение 1 ч	Соотношение цепей $\beta/\alpha$ в коллагене II типа
	не обработанном дополнительно пепсином	обработанном пепсином при 30 °С в течение 1 ч		
Больной К.	22	33	34	0,15
Дети контрольной группы (среднее значение)	16 ( $\pm 1,5$ )	17 ( $\pm 1,6$ )	14 ( $\pm 4$ )	0,11 ( $\pm 0,03$ )



$\alpha 1$  (II), входящих в состав фракции молекул коллагена II типа, чувствительных к протеолизу при низких температурах, т. е. содержание этой фракции молекул коллагена II типа в хряще больного К. повышено. Кроме того, при обработке пепсином при температуре 37 °С выявлена повышенная чувствительность цепей  $\alpha 1$  (II) больного к протеолизу. В контрольной группе детей через 1 ч после начала обработки пепсином расщепляются 14 % ( $\sigma = 0,4$ ), у больного К. — около 34 %.

Анализ коллагенов кожи больного К. с изолированной формой КДГК выявил существенные нарушения структуры коллагена I типа — основного белкового компонента кожи. Повышенное соотношение количества цепей  $\alpha 1$  (I)/ $\alpha 2$  (I) и сниженное содержание димера  $\beta_{12}$  позволяет предположить у больного К. наличие мутации в гене COL1A1, кодирующем цепь  $\alpha 1$  (I), либо в гене COL1A2, кодирующем цепь  $\alpha 2$  (I). Предполагая мутацию, должна нарушать встраивание цепи  $\alpha 2$  (I) в молекулу коллагена I типа, приводить к резкому снижению стабильности образующихся молекул и, кроме того, нарушать формирование сшивок между цепями  $\alpha 1$  (I) и  $\alpha 2$  (I), не нарушая (либо нарушая в меньшей степени) образование сшивок между цепями  $\alpha 1$  (I). В случае гетерозиготности по мутации в гене цепи  $\alpha 2$  (I) только половина образующихся молекул коллагена I типа будет иметь нарушенную структуру. Однако результаты изучения чувствительности к действию пепсина свидетельствуют о том, что значительно больше чем 50 % молекул коллагена I типа, эстрагированных из кожи больного К., имеют сниженную стабильность. Таким образом, предположение о мутации в гене, кодирующем цепь  $\alpha 2$  (I), возможно только в случае гомозиготности по данной мутации либо при полностью нефункционирующем втором гене COL1A2, что маловероятно.

Более вероятным нам представляется предположение о мутации в гене цепи  $\alpha 1$  (I), нарушающей ее взаимодействие с  $\alpha 2$  (I) и образование сшивок между ними. В случае гетерозиготности по такой мутации  $3/4$  образующихся молекул будут дефектными, что лучше согласуется с полученными нами результатами.

Соотношение коллагенов III и I типов, определенное по CNBr-пептидам, у больного К. в пределах нормы, хотя и несколько понижено. Это свидетельствует об отсутствии количественного нарушения синтеза коллагена I типа. В то же время соотношение цепей  $\alpha 1$  (III)/ $\alpha 1$  (I), отражающее соотношение интактных молекул, не имеющих сшивок, у больного повышено в 4 раза (превышение над средним значением нормы более  $4\sigma$ ; см. табл. 2). Расхождение количественных соотношений, определенных двумя методами, свидетельствует о том, что в экстрактах коллагенов кожи больного К. имеется большое количество частично разрушенных молекул коллагена I типа, которые, имея неповрежденную область пептида  $\alpha 1$  (I) СВ 8, вносят свой вклад в определение тотального соотношения коллагенов III и I типов, но не участвуют при определении соотношения по интактным  $\alpha$ -цепям. Это предположение подтверждается выявлением при электрофорезе коллагенов кожи больного К. большого числа продуктов частичной деградации цепей  $\alpha 1$  (I) и  $\alpha 2$  (I) (см. рис. 1 и 4), а также высокой чувствительностью коллагена I типа к обработке пепсином.

Выявление в бромциановых гидролизатах коллагенов кожи больного К. пептида  $\alpha 1$  (III) СВ 9 при электрофорезе в невозстанавливающих условиях, а также выявление полипептида № 6, дающего после обработки бромцианом пептид  $\alpha 1$  (III) СВ 9, свидетельствуют о наличии в коже этого больного коротких молекул коллагена, содержащих фрагмент цепи  $\alpha 1$  (III) размером, несколько превышающим размер пептида  $\alpha 1$  (III) СВ 9.

Чрезвычайно интересным представляется нам факт обнаружения в пептидных картах димеров  $\beta_{11}$  и  $\beta_{12}$  больного К. CNBr-пептидов цепи  $\alpha 1$  (III). Наличие этих пептидов трудно объяснить примесью димеров коллагена III типа. Во-первых, при картировании цепей  $\alpha 1$  (I), полученных при электрофорезе в невозстанавливающих условиях, наличия примесей пептидов коллагена III типа не выявлено. В связи с этим предположение о контаминации дополнительно требует предположения о том, что дисульфидные связи нарушены либо дестабилизированы в молекулах коллагена III типа, цепи которых участвуют в обра-

зовании  $\beta$ -компонент состава  $\alpha 1(III)$ — $\alpha 1(III)$  и не нарушены в других молекулах. Во-вторых, димеры коллагена III типа и димеры  $\beta_{12}$  коллагена I типа имеют существенно различающиеся электрофоретические подвижности, обусловленные значительными различиями в подвижностях цепей  $\alpha 1(III)$  и  $\alpha 2(I)$ . Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о наличии в коже больного К. сшивок между цепями коллагенов I и III типов, а именно — сшивок между цепями  $\alpha 1(II)$  и  $\alpha 1(I)$  и между  $\alpha 1(III)$  и  $\alpha 2(I)$ . Ранее было описано существование сшивок только между цепями  $\alpha 1(III)$  и  $\alpha 1(I)$ , причем выявлены они были в нерастворимой фракции коллагенов аорты быка и лейомиомы человека [7]. Наши данные показывают, что сшивки между коллагенами I и III типов, по крайней мере в патологических случаях, могут существовать и в коже человека, причем возможны сшивки не только между цепями  $\alpha 1(III)$  и  $\alpha 1(I)$ , но и между цепями  $\alpha 1(III)$  и  $\alpha 2(I)$ . Выявление сшивки между цепями  $\alpha 1(I)$  и  $\alpha 1(III)$  интерпретировали [7] как указание на образование смешанных фибрилл, состоящих из молекул коллагенов I и III типов. Наши данные допускают такое предположение, однако трудно поддается объяснению тот факт, что  $\beta$ -компоненты, в состав которых входят цепи  $\alpha 1(III)$ , не связаны дисульфидными связями с другими цепями  $\alpha 1(III)$ , входящими в состав молекулы коллагена III типа. Дисульфидные связи в молекулах коллагена III типа образуются внутриклеточно, т. е. до формирования фибрилл и поперечных сшивок. Поэтому с учетом наших данных гипотеза об образовании смешанных фибрилл требует предположения о том, что возникновение сшивок между цепями  $\alpha 1(III)$  и цепями коллагена I типа разрушает или дестабилизирует дисульфидные мостики в коллагене III типа. В настоящее время нет данных о том, что цепи коллагенов I и III типов могут образовывать смешанные молекулы. Однако имеется большое сходство в строении цепей  $\alpha 1(I)$  и  $\alpha 1(III)$  и распределении сшивок в коллагенах I и III типов. Полученные при изучении больного К. результаты, свидетельствующие о наличии у него цепей коллагена III типа, сшитых с цепями кол-

лагена I типа и не имеющих дисульфидных связей, в принципе позволяют допустить возможность образования смешанных молекул, состоящих из цепей коллагенов I и III типов. Смешанные молекулы, содержащие не более одной цепи  $\alpha 1(III)$ , не будут иметь дисульфидных связей.

Результаты, полученные нами при изучении больного К., свидетельствуют о взаимосвязи синтеза и метаболизма разных типов коллагенов в коже. Свойства одного типа коллагенов существенно влияют на синтез и созревание других типов коллагенов. У больного К. имеется, по-видимому, первичное изменение коллагена I типа. Однако эти изменения сказываются и на других типах коллагенов. В частности, у больного К. наблюдается увеличение содержания коллагена V типа (см. рис. 1), появляются ковалентные сшивки между цепями коллагенов I и III типов, которые в норме в коже либо отсутствуют, либо имеются в очень небольшом количестве. Кроме того, снижается в некоторой степени и стабильность коллагена III типа, о чем свидетельствует выявление значительных количеств продуктов деградации цепей  $\alpha 1(III)$  в экстракте коллагенов кожи больного К. (см. рис. 1). Следовательно, метаболическим превращениям молекулы коллагенов подвергаются как взаимосвязанные и взаимозависимые компоненты экстракционного матрикса.

Ранее мы показали [1], что в коже и хряще здоровых индивидуумов среди молекул коллагенов I и II типов всегда присутствуют 2 фракции молекул. Первая фракция состоит из молекул, устойчивых к пепсину при температуре ниже  $33^\circ\text{C}$ , вторая фракция (до 20 % всех молекул) состоит из молекул с дестабилизированной структурой (особенно в области N-концевого участка), чувствительных к действию пепсина при температурах ниже  $33^\circ\text{C}$ . При действии протсаз при температуре ниже  $33^\circ\text{C}$  происходит отщепление N-концевых участков, чувствительных к пепсину молекул, с образованием полипептидов  $\alpha 1(I)^p$ ,  $\alpha 1,2(I)^p$  и  $\alpha 1(II)^p$ . При температуре  $33^\circ\text{C}$  молекулы чувствительной к пепсину фракции полностью расщепляются в отличие от нечувствительной фракции. Мы предположили [1], что образование фракции молекул с дестабилизирован-

ной структурой является закономерным процессом созревания и функционирования коллагенов, необходимым для их обмена в тканях. У больного К. практически весь коллаген I типа представлен фракцией чувствительных к пепсину молекул. Однако в отличие от фракции чувствительных молекул, имеющих в норме и не расщепляемых (за исключением N-концевых участков) пепсином при температуре ниже 33°C, молекулы коллагена I типа больного К. в силу структурных нарушений деградируют уже при 18°C. Не исключено, что практически полная представленность коллагена I типа больного К. фракцией молекул с дестабилизированной структурой необходима как компенсаторный механизм, стимулирующий процесс обмена дефектных молекул.

При изучении коллагена II типа, выделенного из реберного хряща больного К., также выявлено некоторое снижение общей стабильности коллагена II типа и повышенное содержание фракции молекул с повышенной чувствительностью концевых участков к пепсину. Аналогичные изменения мы выявили у больных с синдромом Элерса — Данло II типа, с синдромами Марфана и Видемана — Беквита, имеющих врожденные деформации грудной клетки, а также у больных с изолированными формами воронкообразных деформаций грудной клетки [2]. Является ли это первичным звеном, вызывающим развитие деформаций грудной клетки, или же это механизм, компенсирующий болезнь и стимулирующий обмен коллагенов в патологически развивающемся хряще, остается невыясненным.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Соколов Б. П., Шер Б. М., Козлов Е. А. и др. // Биохимия. — 1988. — Т. 53, № 11. — С. 1828—1836.
2. Соколов Б. П., Шер Б. М., Козлов Е. А. и др. // Вопр. мед. химии. — 1989.
3. Шер Б. М., Соколов Б. П. // Вопр. мед. химии. — 1988. — № 1. — С. 133—138.
4. Bornstein P., Sage H. // Ann. Rev. Biochem. — 1980. — Vol. 49. — P. 957—1004.
5. Burgeson R. E., Hollister D. W. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1979. — Vol. 87. — P. 1124—1131.

6. Hanson A. N., Benleg S. P. // Analyt. Biochem. — 1983. — Vol. 130. — P. 32—40.
7. Henkel W., Glanville R. W. // Europ. J. Biochem. — 1982. — Vol. 122. — P. 205—213.
8. Hollister D. W., Byers P. H., Holbrook K. A. // Advanc. hum. Genet. — 1982. — Vol. 12. — P. 1—87.
9. Laemmli U. K. // Nature. — 1970. — Vol. 227. — P. 680—685.
10. Prockop D. J., Kivirikko K. I. // New Engl. J. Med. — 1984. — Vol. 311. — P. 376—386.
11. Prockop D. J., Kivirikko K. I., Tuderman L., Guzman N. A. // Ibid. — 1979. — Vol. 301. — P. 13—23; 77—84.
12. Sage H., Bornstein P. // Meth. Enzymol. — 1982. — Vol. 82. — P. 96—127.
13. Sykes B., Francis M. J. O., Smith R. // New Engl. J. Med. — 1977. — Vol. 296. — P. 1200—1203.

Поступила 05.11.88

#### IMPAIRMENT IN STRUCTURE OF COLLAGEN I AND PRESENCE OF CROSS-LINKS BETWEEN PEPTIDE CHAINS OF COLLAGENS I AND III IN THE PATIENT WITH ISOLATED FORM OF PIGEON CHEST

B. P. Sokolov, B. M. Sher, E. A. Kozlov, T. A. Tsvetkova, S. S. Rudakov, A. A. Del'vig, V. N. Kalinin

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

Skin and rib cartilage collagens were studied in patient I.I.K. with isolated form of pigeon chest as well as in a group of children without any impairments of connective tissue. Distinct decrease in stability of collagen I, an increase in the ration of  $\alpha_1(I)/\alpha_2(I)$  chains and impairment in formation of  $\beta_1$  dimers were detected in the patient with pigeon chest. In the patient skin total ratio between collagens I and III, calculated from a content of BrCN-peptides, was similar to normal level, whereas the proportion was markedly increased between intact molecules of collagens III and I free of cross-links, which was calculated from the ratio of  $\alpha_1(III)/\alpha_2(I)$  chains. Presence of cross-links between  $\alpha_1(III)$  and  $\alpha_1(I)$  chains as well as between  $\alpha_1(III)$  and  $\alpha_2(I)$  chains was detected after peptide mapping of polypeptides arranged in the region of  $\beta_{11}$  and  $\beta_{12}$  dimers. All the collagen I preparation, extracted from skin of the patient I.I.K., contained molecules with unstabilized N-terminal sites. These results suggest that mutation occurred in the N-terminal region of  $\alpha_1(I)$  chain. Analysis of collagen from the patient I.I.K. rib cartilage demonstrated a slight decrease in total stability of collagen II as well as elevated concentration of collagen II molecules containing unstabilized N-terminals. Mechanisms responsible for formation of cross-links between polypeptide chains of collagens I and III detected in human skin are discussed.

А. Н. Чубукина, А. Д. Златопольский, М. А. Зайденберг, В. В. Бычкова

## ВЫДЕЛЕНИЕ РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО РАЗМЕРАМ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПЕПТИДНЫХ ФРАГМЕНТОВ ФИБРОНЕКТИНА С ПОМОЩЬЮ АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ НА ИММОБИЛИЗОВАННОМ ПЛАЗМИНЕ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

В данной работе при исследовании способности фрагментов фибронектина стимулировать пролиферацию фибробластов использовали ограниченный протеолиз фибронектина иммобилизованным плазмином [1]. При действии плазмина фибронектин расщепляется только в наиболее чувствительных к протеолизу участках [6]. При этом отщепляется фрагмент, содержащий междометные дисульфидные связи, следующие за ним два домена на том же С-конце молекулы фибронектина, а также N-концевой и соседний с ним домены фибронектина. Ограниченный протеолиз фибронектина плазмином позволяет, следовательно, получить фрагменты центральной части молекулы, содержащие клетку-связывающий домен и набор доменов, расположенных в концевых участках нативной молекулы, не содержащий клетку-связывающего домена. Мы обнаружили, что фрагменты центральной части фибронектина, содержащие клетку-связывающий домен, обладают сродством к иммобилизованному плазмину. Используя это свойство, мы отделили N- и С-концевые домены фибронектина и соседние с ними от центрального фрагмента, содержащего клетку-связывающий домен.

### Методика

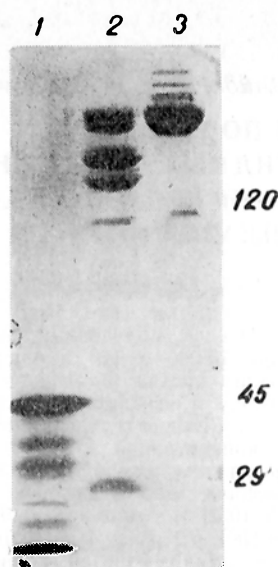
Фибронектин крови человека получали из сыворотки или из цитратной плазмы описанным ранее методом [2], но без добавления фенолметилсульфонилфторида (ФМСФ). Сыворотку, из которой получали фибронектин, дважды центрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 мин, смешивали с желатин-сефарозой 4В, предварительно отмытой раствором 1 (0,01 М трис-НСl, 0,001 М ЭДТА рН 7,4) и инкубировали во вращающейся колбе 2 ч при 20 °С или в течение ночи при 3 °С. Сефарозу отделяли на стеклянном фильтре или центрифугировали при 4000 об/мин (1 мин), отмывали раствором 1 и фибронектин элюировали раствором 2 (1 М NaBr, 0,02 М Na-ацетатный буфер рН 5,0) и осаждали сульфатом аммония (22 % от насыщения) при 3 °С в те-

чение ночи. Осадок, полученный центрифугированием при 10 000 g (10 мин), растворяли и диализовали против раствора 1. Плазмин (фибринолизин; «Koch-Light», Англия) иммобилизовали на CNBr-активированной сефарозе в конечной концентрации 1 мг/мл и расщепление фибронектина иммобилизованным плазмином проводили либо в растворе 1, либо в растворе 3 (0,01 % твин-80, 0,35 М NaCl, 0,05 М трис-НСl рН 7,4). Инкубацию фибронектина с плазмин-сефарозой проводили при соотношении 3—5 мг фибронектина на 1 мл геля 6—18 ч при 20 °С в рециркулированной колонке. Фрагменты, не связавшиеся с плазмин-сефарозой, осаждали сульфатом аммония (50 % от насыщения), осадок растворяли в растворе 1 и диализовали против 1. Связавшиеся с плазмин-сефарозой фрагменты элюировали раствором 2. Электрофорез образцов проводили по методу [5] в 5—15 % полиакриламидном геле. Действие фибронектина и его фрагментов на пролиферативную активность клеток оценивали, как описано ранее [4], с незначительными изменениями. Эмбриональные фибробласты человека (штаммы получены в Институте медицинской генетики АМН СССР) выращивали в среде Игла с 0,1 % капамином, 1 % глутамином и 5 % эмбриональной сывороткой на пластиковых чашках и по достижении клетками субконфлюентной плотности (на 3—4-е сутки) среду заменяли на содержащую 0,5 % эмбриональной сыворотки. Через 24 ч в культуру добавляли фибронектин или его фрагменты в растворе 1 (100 мкл на 2 мл среды), а еще через 18—20 ч вводили <sup>3</sup>H-тимидин (2 мкКи на пластиковую чашку, 900 ТБК/моль, СССР) на 1—2 ч. Меченую среду собирали, клетки ополаскивали холодной средой Игла и заливали 2 мл холодной 5 % трихлоруксусной кислотой (ТХУ). Через 2 ч ТХУ удаляли, чашки ополаскивали 2 раза 5 % ТХУ и 2 раза 96 % этанолом, после удаления следов которого клетки растворяли в 0,3 М КОН, измеряли оптическую плотность в УФ-свете при 260 нм и брали аликвоты для определения радиоактивности.

### Результаты и обсуждение

Для исследования влияния фрагментов на пролиферативную активность фибробластов важно исключить как возможные побочные цитотоксические эффекты, которые могут возникать при действии примесей ФМСФ, азидов натрия и других веществ, так и возможное митогенное действие, которое





Электрофоретический анализ по молекулярной массе фрагментов протеолиза фибронектина иммобилизованным плазмином.

1 — не связавшиеся с плазмин-сефарозой фрагменты; 2 — связавшиеся фрагменты; 3 — нативный фибронектин. Цифрами обозначены молекулярные массы (в кД).

может быть обусловлено, например, примесью протеиназ, детергента и др. Поэтому препараты фибронектина и его фрагментов получали без использования ФМСФ; отсутствие плазмينا обеспечивали, используя иммобилизованный плазмин, а контроль за отсутствием протеолитической активности в препаратах фрагментов проводили, анализируя свойство препаратов фраг-

Действие фрагментов фибронектина на синтез ДНК в культуре эмбриональных фибробластов человека

Фрагменты	Белок, мкг	Включение <sup>3</sup> H-тимидина на 10 <sup>4</sup> клеток ( $\cdot 10^{-4}$ )
Не связываемые плазмин-сефарозой	1,2	2,0
	2,4	2,5
	3,6	6,5
	4,8	9,8
	6,0	10,8
	9,6	14,6
	12,5	15,8
	1,2	1,2
Связываемые плазмин-сефарозой	2,4	1,3
	3,6	1,5
	4,8	1,2
	6,0	2,1
	9,6	2,1
	19,0	1,8

ментов расщеплять нативный фибронектин [1]. Чтобы оценить значение возможной примеси детергента в препаратах фрагментов, исследовали расщепление фибронектина плазмином в присутствии твина-80 и без твина-80. Оказалось, что если протеолиз иммобилизованным плазмином проводить при низкой ионной силе и в отсутствие детергента, то лишь небольшая часть от внесенного белка остается вне связи с плазмин-сефарозой. Остальной белок может быть элюирован с плазмин-сефарозы введением детергента и повышением ионной силы.

На рисунке представлены результаты электрофоретического разделения фрагментов фибронектина, полученных при действии иммобилизованного плазмينا. Фрагменты, не связывающиеся с плазмин-сефарозой (трек 1) отличаются (по молекулярной массе) от связавшихся (трек 2). Среди несвязавшихся нет «тяжелых» фрагментов (фрагмент с наибольшей молекулярной массой 45 кД), а связавшиеся, напротив, представлены почти исключительно (кроме 29 кД) «тяжелыми» фрагментами ( $\geq 120$  кД). Поскольку наименьший из «тяжелых» фрагментов имеет молекулярную массу 120 кД, то это означает, что клетку связывающий домен (расположенный в центральной части) находится в составе «тяжелых» фрагментов. Следовательно, в условиях нашего эксперимента удалось отделить фрагменты, содержащие клетку связывающий домен, от концевых и соседних с ними, не содержащих клетку связывающего домена.

Нашей задачей, выходящей за рамки настоящего исследования, являлась идентификация фрагмента фибронектина, стимулирующего пролиферацию фибробластов. Поскольку стимулирующее пролиферацию действие фрагмента, по-видимому, должно быть опосредовано рецептором, представляло интерес выяснить, оказывают ли стимулирующее пролиферацию действие фрагменты, содержащие клетку связывающий домен, к которому, как известно, есть рецептор на поверхности фибробластов [6]. Как свидетельствуют результаты соответствующих экспериментов (см. таблицу), ни фибронектин, ни «тяжелые» фрагменты такого действия не оказывают. Зато «легкие» фрагменты в несколько раз стимулируют включение

<sup>3</sup>H-тимидина в ДНК. Следовательно, стимулирующее пролиферацию действие легких фрагментов, не обусловленное клеткусвязывающим доменом, опосредовано, очевидно, не рецептором к этому домену, а рецептором к другому участку фибронектина. Точная идентификация фрагмента, стимулирующего пролиферацию фибробластов, является предметом другого исследования.

В недавно опубликованной работе [3] показано, что препараты фибронектина часто содержат в качестве примеси трансформирующий фактор роста ( $\beta$ -TGF), который, как известно, при определенных условиях является митогенным фактором или, напротив, ингибирует митогенную активность. Можно было бы считать, что наличие стимулирующей пролиферацию фибробластов активности в полученных нами фрагментах обусловлено примесью  $\beta$ -TGF. Однако скорее всего это не так, поскольку препараты фрагментов, стимулирующие в наших опытах пролиферацию фибробластов, сохраняли эту активность после удаления желатинсвязывающих фрагментов [1]. Известно [3], что  $\beta$ -TGF обладает сродством к желатину и, следовательно, должен быть удален вместе с желатинсвязывающими фрагментами. Таким образом, в настоящей работе предложен метод, позволяющий отделить набор концевых фрагментов, характеризующийся наличием стимулирующей пролиферацию активности, от набора фрагментов, содержащих центральную часть молекулы, в том числе клеткусвязывающий домен, не обладающий стимулирующей пролиферацию активностью.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Златопольский А. Д., Чубукина А. Н., Зайденберг М. А. // Биохимия. — 1989. — Т. 54, № 1. — С. 74—79.
2. Зыкова Т. А., Златопольский А. Д., Мазуров В. И. // Вопр. мед. химии. — 1983. — № 5. — С. 114—117.
3. Fava R. A., McCluice D. B. // J. Cell. Physiol. — 1987. — Vol. 131. — P. 183—187.
4. Humphries M. J., Ayad S. R. // Nature. — 1983. — Vol. 305. — P. 811—813.
5. Laemli U. K. // Ibid. — 1970. — Vol. 227. — P. 680—685.
6. Yamada K. M. // Ann. Rev. Biochem. — 1983. — Vol. 52. — P. 761—799.

Поступила 05.11.88

## ISOLATION OF FIBRONECTIN PEPTIDE FRAGMENTS, DISSIMILAR IN THEIR SIZE AND BIOLOGICAL ACTIVITY, BY MEANS OF AFFINITY CHROMATOGRAPHY ON A COLUMN WITH IMMOBILIZED PLASMIN

A. N. Chubukina, A. D. Zlatopolsky, M. A. Zaidenberg

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

Plasmin, immobilized on Sepharose, was used for isolation of human blood plasma fibronectin fragments obtained after proteolysis. Under definite conditions the major part of the fibronectin fragments, liberated during proteolysis, remained to be bound to plasmin-Sepharose. As shown by electrophoretic analysis, the fraction of fragments bound to plasmin-Sepharose constituted mainly "heavy" ( $\geq 120$  kD) peptides and one "light" (29 kD) peptide, while only "light" fragments ( $\leq 45$  kD) were detected in the free unbound fraction. These unbound to plasmin-Sepharose fibronectin fragments were found to stimulate proliferation of human embryonal fibroblasts in cell culture, whereas the plasmin-Sepharose bound peptides did not exhibit any effects on proliferation.

© Г. А. ГРИБАНОВ, М. А. ГОРШКОВА, 1989

УДК 612.123:612.115].08

Г. А. Грибанов, М. А. Горшкова

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ МИКРОАНАЛИЗ ЛИПИДОВ НЕКОТОРЫХ КОМПОНЕНТОВ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА

Калининский университет

К настоящему времени достаточно подробно изучены и охарактеризованы основные белковые компоненты системы свертывания крови [3, 5, 6, 8, 9]. Установлено важное значение липидных компонентов, в частности фосфо-

липидов, в процессах гемостаза [1, 4—6, 9]. Вместе с тем подробного анализа липидного состава основного продукта гемостаза — сгустка, насколько это известно из данных литературы, практически не проводилось.

Липидный состав плазмы, сыворотки и сгустка крови здоровых людей (n=10)

Содержание липидов	ОЛ, мг %	ФЛ	ХС	СЖК	ТГ	ЭХС
Цитратная плазма: % от суммы ОЛ	—	28,9±0,5	13,0±0,5	10,8±0,3	23,7±0,3**	23,6±0,7
абсолютное содержание, мг %	593,2±12,5**	171,4±2,7**	77,1±2,7	64,1±1,6**	140,6±1,6**	140,0±3,9**
Сыворотка крови: % от суммы ОЛ	—	26,8±0,4	14,5±0,3	11,4±0,3	25,8±0,6*	21,5±1,0
абсолютное содержание, мг %	490,0±13,2*	131,3±2,1*	71,0±1,5	55,9±1,5*	126,4±3,0*	105,4±5,1*
Сгусток без форменных элементов (15,6±0,4 мг): % от суммы ОЛ	—	26,8±0,7*	15,4±0,6*	23,1±0,4**	18,1±0,7**	16,6±0,7**
абсолютное содержание, мг %	100,1±3,9**	26,83±0,9**	15,42±0,7**	23,12±0,5**	18,12±0,9**	16,61±0,9**

Примечание. Здесь и в табл. 2 одна звездочка —  $p < 0,05$  по сравнению с плазмой крови, две —  $p < 0,05$  по сравнению с сывороткой крови.

Интерес же к исследованию липидного профиля сгустка в сравнении с сывороткой и плазмой крови определяется прежде всего тем, что в нем фиксируются отдельные липидные фракции, имеющие важное значение в формировании и функционировании компонентов системы гемостаза.

В связи с этим целью настоящего исследования было сравнительное изучение микрохроматографическими методами качественного состава и количества основных липидных компонентов сгустка, сыворотки и плазмы крови у здоровых людей и больных с хроническими неспецифическими воспалительными заболеваниями легких, находящихся в состоянии ремиссии.

### Методика

Материалом служила венозная кровь 10 здоровых людей и 10 больных с хроническими неспецифическими воспалительными заболеваниями легких 40—60 лет (мужчины). Для получения плазмы кровь смешивали, не допуская образования сгустков и воздушных пузырей, с антикоагулянтом (3,8 % раствором цитрата натрия) в соотношении 9:1. Затем кровь центрифугировали при 3000—4000 об/мин в течение 15 мин. Цитратную плазму использовали для получения сгустка без форменных элементов крови («чистый сгусток»). Для этого к 0,5—1 мл плазмы добавляли 0,05—0,1 мл 5 % раствора  $\text{CaCl}_2$ . Смесь перемешивали стеклянной палочкой, которую оставляли в плазме. Пробирки ставили в термостат на 10 мин при 37 °С. Образовавшийся сгусток переносили на обезжиренный фильтр и отжимали до исчезновения следов влаги на фильтре. Высушенный таким образом сгусток взвешивали на торсионных весах. Рассчитывали массу сгустка в миллиграммах на 1 мл исследуемой плазмы крови. По описанной методике получали 10—20 мг сгустка. Оставшуюся жидкую часть (сыворотка) использовали для анализа липидного состава.

Исследуемые сгустки (10—20 мг) гомогенизировали в течение 5 мин с 2 мл смеси хлороформ — метанол (соотношение 2:1) для извлечения общих липидов (ОЛ). Время экстракции после гомогенизации 10—20 мин. После этого материал фильтровали через обезжиренный фильтр с последующим промыванием 0,1—0,2 мл экстрагирующей смеси. Метанолом доводили объем до 1—2 мл, из него отбирали по 0,1 мл для определения ОЛ. Остаток упаривали на водяной бане при 40—50 °С досуха, растворяли в 0,2 мл хлороформа и использовали для последующей хроматографии.

Экстракцию и очистку общей липидной фракции из сыворотки и плазмы крови, количественное определение ОЛ плазмы, сыворотки крови и сгустков без форменных элементов проводили по методу, описанному ранее [2].

Качественный состав и количество отдельных липидных фракций сыворотки, плазмы и

сгустка без форменных элементов крови изучали с применением микротонкослойной хроматографии [2].

Рассчитывали относительное содержание и абсолютное количество всех липидных фракций. Данные обработаны методом вариационной статистики.

## Результаты и обсуждение

Результаты сравнительного изучения липидного состава плазмы, сыворотки и сгустка без форменных элементов крови здоровых людей представлены в табл. 1. Как видно из табл. 1, содержание ОЛ в цитратной плазме выше, чем в полученной после удаления сгустка сыворотке. Количество ОЛ в сгустке составляет примерно  $\frac{1}{6}$  часть от ОЛ плазмы крови ( $100,1 \pm 3,9$  мг%) с индивидуальными колебаниями от 80 до 115 мг%.

Липидный состав плазмы, сыворотки и сгустка крови был примерно одинаков. Основная масса липидов (в процентах от суммы ОЛ) представлена фосфолипидами (ФЛ), составляющими более  $\frac{1}{4}$  части, холестерином (ХС) и его эфирами (ЭХС) — свыше 30 %, а также свободными жирными кислотами (СЖК) и триглицеридами (ТГ). Иногда выявляется незначительное количество других фракций. Вместе с тем относительное содержание отдельных фракций в изучаемых объектах (особенно в сгустке) существенно различно. Если по липидным фракциям сыворотка и плазма крови количественно достоверно не отличаются друг от друга, то в составе липидов сгустка содержание СЖК было в 2 с лишним раза выше, чем в плазме или сыворотке крови; относительное количество ТГ, ЭХС было ниже, чем в сыворотке или плазме крови. Причем относительное содержание ХС и ЭХС было примерно одинаковым, тогда как в плазме и сыворотке крови отмечено преимущество ЭХС над ХС.

Сравнительный анализ абсолютного содержания ОЛ и отдельных липидных фракций показывает, что часть липидов плазмы переходит в сгусток, причем это хорошо коррелирует с остающейся частью липидов в сыворотке крови. Больше всего при образовании сгустка из плазмы крови захватывается ФЛ и СЖК, в сумме составляющих более 50 %. Остальные

Таблица 2

Липидный состав плазмы, сыворотки и сгустка крови больных с хроническими неспецифическими воспалительными заболеваниями легких ( $n=10$ )

Содержание липидов	ОЛ, мг %	ФЛ	ХС	СЖК	ТГ	ЭХС
Цитратная плазма: % от суммы ОЛ абсолютное содержание, мг%	— 552,6 $\pm$ 5,6**	27,6 $\pm$ 0,8 152,5 $\pm$ 1,1**	14,6 $\pm$ 0,7** 80,7 $\pm$ 0,9**	12,1 $\pm$ 0,9** 66,9 $\pm$ 1,2**	22,5 $\pm$ 0,4** 124,3 $\pm$ 0,5**	23,2 $\pm$ 1,4 128,2 $\pm$ 1,9**
Сыворотка: % от суммы ОЛ абсолютное содержание, мг%	— 433,6 $\pm$ 3,9*	26,9 $\pm$ 0,9 116,6 $\pm$ 1,0*	11,8 $\pm$ 0,7* 51,2 $\pm$ 0,8*	14,7 $\pm$ 0,7* 63,7 $\pm$ 0,8*	24,5 $\pm$ 0,5* 106,3 $\pm$ 0,6*	22,1 $\pm$ 0,6 95,8 $\pm$ 0,7*
Сгусток без форменных элементов (23,0 $\pm$ 1,7 мг): % от суммы ОЛ абсолютное содержание, мг%	— 105,2 $\pm$ 1,9*,**	28,0 $\pm$ 0,8 29,5 $\pm$ 0,5*,**	12,8 $\pm$ 0,7 13,5 $\pm$ 0,4*,**	25,0 $\pm$ 0,6*,** 26,3 $\pm$ 0,4*,**	22,0 $\pm$ 0,5** 23,1 $\pm$ 0,3*,**	12,2 $\pm$ 0,5*,** 12,8 $\pm$ 0,3*,**



50 % приходится на долю других фракций (ХС, ТГ, ЭХС).

Интересным представляется сопоставление абсолютной доли отдельных липидных фракций плазмы и сгустка крови. Если ФЛ сгустка составляют примерно  $\frac{1}{6}$  часть суммарного количества ОЛ плазмы, то ХС —  $\frac{1}{5}$ , ЭХС —  $\frac{1}{9}$ , ТГ —  $\frac{1}{8}$ , СЖК —  $\frac{1}{3}$ . Из сопоставления этих данных можно заключить, что в процессе образования «чистого сгустка» значительная часть липидов плазмы и прежде всего СЖК, ФЛ, ХС и в меньшей степени нейтральные липиды, ЭХС могут захватываться белковыми компонентами свертывающей системы крови. Эти процессы, по всей видимости, осуществляются при участии липопротеидов. Существуют данные о том, что комплекс фибриногена с фибронектином связывает значительное количество липопротеидов низкой плотности [7].

Учитывая, что значительное число заболеваний характеризуется существенными изменениями белкового и липидного профиля плазмы и сыворотки крови, логично предположить, что характер липидного спектра сгустка будет в значительной степени определяться метаболическими сдвигами в липидном и белковом профилях плазмы крови таких больных.

Подтверждением этого предположения являются данные табл. 2, в которой представлены сведения об изменениях липидного состава сгустка, плазмы и сыворотки крови у больных с хроническими неспецифическими воспалительными заболеваниями легких. Из представленных результатов следует, что, кроме некоторого снижения количества ОЛ, существенных изменений относительных величин большинства липидных фракций плазмы крови у больных с хроническими неспецифическими воспалительными заболеваниями легких не обнаружено. Содержание суммарных липидов в сыворотке крови у таких больных было также ниже, чем у здоровых людей. Отмечено снижение относительного и абсолютного количества ХС, а доля СЖК была выше, чем у здоровых людей.

При анализе липидного состава сгустка крови без форменных элементов у больных с хроническими неспецифическими воспалительными заболеваниями легких по сравнению со

здоровыми людьми обнаружено достоверное снижение относительной доли свободного ХС и ЭХС. Выше, чем у здоровых людей, было содержание ФЛ (абсолютное содержание), СЖК и ТГ. Фосфолипиды сгустка крови без форменных элементов у таких больных составляют  $\frac{1}{5}$  часть ФЛ плазмы, ХС —  $\frac{1}{6}$ , СЖК —  $\frac{2}{5}$ , ТГ —  $\frac{1}{5}$ , а ЭХС —  $\frac{1}{10}$ .

Эти данные свидетельствуют о том, что спектр липидного состава сгустка без форменных элементов у больных с хроническими неспецифическими воспалительными заболеваниями легких значительно отличается от характера липидного профиля сгустка у здоровых людей, что может служить дополнительным критерием для дифференциально-диагностических целей.

Проведенное исследование позволяет заключить, что в процессе образования сгустка крови без форменных элементов часть липидов плазмы переходит в сгусток. В липидном составе сгустка крови без форменных элементов здоровых людей определяются все те же фракции, что и в плазме и сыворотке крови, с преимущественным содержанием ФЛ и СЖК, в сумме составляющих около половины ОЛ сгустка.

Больше всего в сгусток крови без форменных элементов у здоровых людей переходят ФЛ и СЖК плазмы, тогда как у больных с хроническими неспецифическими заболеваниями легких — ФЛ, СЖК и ТГ. Изменения липидного спектра сгустка крови у больных с хроническими неспецифическими воспалительными заболеваниями легких являются более показательными, чем плазмы и сыворотки крови, что может быть использовано в целях диагностики указанных заболеваний.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ганелина И. Е., Дерягина Г. П., Криворученко И. В., Липовецкий В. М. // Тер. арх. — 1963. — № 7. — С. 13—23.
2. Грибанов Г. А., Сергеев С. А. // Вопр. мед. химии. — 1975. — № 6. — С. 652—655.
3. Зубаиров Д. М. Биохимия свертывания крови. — М., 1978.
4. Климов А. Н. // Биохимия липидов и их роль в обмене веществ. — М., 1981. — С. 45—47.
5. Кудряшов Б. А. Биологические проблемы регуляции жидкого состояния крови и ее свертывания. — М., 1975.

3. Проблемы и гипотезы в учении о свертывании крови / Под ред. О. К. Гаврилова. — М., 1981.
7. Чулкова Т. М., Панасюк А. Ф. // Бюл. экс-пер. биол. — 1987. — № 9. — С. 309—311.
8. Davie E. W., Fukikawa K. // Ann. Rev. Biochem. — 1975. — Vol. 44. — P. 799—829.
9. Suttie J. W., Jackson C. R. // Physiol. Rev. — 1977. — Vol. 57. — P. 71—108.

Поступила 22.11.88

# MICROANALYSIS OF LIPIDS IN SOME COMPONENTS OF THE HOMEOSTASIS SYSTEM

G. A. Gribov, M. A. Gorshkova

Chair of Organic and Biological Chemistry, State University, Kalinin

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1989

УДК 616.248-056.3-022-07:616.155.1:576.314

Е. А. Бородин, Ю. С. Ландышев, М. В. Савельева

## СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ИНФЕКЦИОННО-АЛЛЕРГИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Благовещенский медицинский институт

В развитии заболеваний важную роль играют повреждения биологических мембран [5, 24, 25]. Дефекты, затрагивающие плазматическую мембрану клетки и мембраны внутриклеточных органелл, установлены при гипертонической болезни [10, 11], атеросклерозе [3, 9, 15, 18], заболеваниях печени [1, 2, 14]. Интимные патогенетические механизмы развития бронхиальной астмы включают нарушения обмена  $\text{Ca}^{2+}$  [13, 21, 22]. Поскольку содержание ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме клеток регулируется  $\text{Ca}^{2+}$ -насосами плазматической мембраны и мембран саркоплазматического и эндоплазматического ретикулума, понятен интерес исследователей к выяснению структурно-функциональных свойств клеточных мембран при бронхиальной астме [16, 23].

В настоящей работе проведено исследование фосфолипидного состава, физико-химических свойств и активности  $\text{Mg}^{2+}$ -,  $\text{Na}^{+}$ -,  $\text{K}^{+}$ - и  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаз мембран эритроцитов у больных инфекционно-аллергической бронхиальной астмой (в дальнейшем — бронхиальной астмой) и предпринята попытка выяснить возможность регуляции активности АТФаз эритроцитов лекарственными средствами, исполь-

Lipid composition was studied in blood plasma, blood serum and blood clot of healthy persons and of patients with chronic unspecific lung impairments. Similar lipid composition was detected in blood clot (free of cells) and in blood plasma or blood serum where phospholipids and free fatty acids prevailed and constituted about a half of the total lipids content. During formation of blood clot a part of blood plasma lipids was transferred to the clot. Phospholipids and free fatty acids were mainly detected in the blood clot of healthy persons, while in patients with chronic unspecific lungs impairments triglycerides were also detected in the clot. Alterations in lipid composition of blood clot were most informative in patients with chronic unspecific lungs impairments as compared with blood serum and plasma, which might be used for diagnosis of the impairments studied.

зуемыми в фармакотерапии этого заболевания.

### Методика

Больные бронхиальной астмой средней степени тяжести составили 1-ю группу. Из них двойным слепым методом отбирали пациентов, которым назначали обычную терапию с включением бронхолитиков, отхаркивающих, противовоспалительных, биостимулирующих средств и по показаниям антибиотиков (подгруппа А), декариса в таблетках по 100 мг/сут курсом 3 дня с интервалом 5 дней, всего 3 курса (подгруппа Б), интала в ингаляциях с помощью спинhalера (подгруппа В). Во 2-ю группу были включены пациенты с гормонально-зависимой формой бронхиальной астмы, получавшие высокие дозы глюкокортикостероидов. Кровь у больных брали утром до приема пищи и собирали в стеклянные гепаринизированные пробирки. Все исследования проводили не позже чем через 1—1,5 ч после взятия крови.

Эритроциты выделяли из крови центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин, удаляли пленку лейкоцитов и трижды отмывали в растворе, содержащем 0,15 М  $\text{KCl}$ , 5 мМ трис- $\text{HCl}$ -буфер (рН 7,5). Метод получения не содержащих гемоглобина теней эритроцитов описан ранее [7].

Для получения гомогенатов миокарда крыс извлеченные сердца животных промывали в 30 мМ трис- $\text{HCl}$ -буфере (рН 7,5), взвешивали и растирали в фарфоровой ступке до получения однородной массы, которую гомогенизировали в гомогенизаторах со стеклянным, а затем с тефлоновым пестиком в 30 мМ трис- $\text{HCl}$ -буфере (рН 7,5) в соотношении 19 мл буфера на 1 г ткани сердца. Полученный го-

Таблица 1

Фосфолипидный состав (в %) мембран эритроцитов здоровых людей и больных бронхиальной астмой ( $M \pm m$ )

Фосфолипиды	Здоровые люди ( $n=18$ )	Больные бронхиальной астмой					
		со средней степенью тяжести заболевания				с гормонально-зависимой формой заболевания	
		до лечения ( $n=26$ )	после общего лечения ( $n=13$ )	после лечения инталом ( $n=12$ )	после лечения декарисом ( $n=10$ )	до лечения ( $n=14$ )	после лечения глюкокорти- костероидами ( $n=14$ )
Фосфатидилэ- ноламин	$26,2 \pm 3,3$	$27,3 \pm 2,2$	$26,4 \pm 4,6$	$24,6 \pm 3,3$	$27,2 \pm 3,7$	$24,4 \pm 1,8$	$26,6 \pm 3,3$
Фосфатидилхо- лин	$41,0 \pm 3,7$	$37,7 \pm 2,6$	$37,8 \pm 4,3$	$40,5 \pm 3,5$	$40,9 \pm 3,6$	$40,5 \pm 3,9$	$44,1 \pm 3,7$
Сфингомиелин	$29,2 \pm 2,1$	$29,3 \pm 3,1$	$26,6 \pm 4,1$	$31,1 \pm 2,2$	$27,2 \pm 3,1$	$31,4 \pm 3,0$	$26,6 \pm 2,1$
Фосфатидилсе- рин и фосфа- тидилинози- тол	$3,4 \pm 1,0$	$5,2 \pm 1,1$	$9,0 \pm 2,1^*$	$3,3 \pm 0,7^*$	$4,3 \pm 1,3$	$5,7 \pm 2,5$	$2,9 \pm 0,3^*$

Примечание. Звездочка —  $p < 0,05$  по сравнению с соответствующей группой больных до лечения. Здесь и в табл. 2:  $n$  — число больных.

могенат был неустойчив и при хранении выпадал в осадок.

Активность АТФаз эритроцитов и гомогената сердец крыс определяли по освобождению неорганического фосфора ( $\Phi_n$ ). Инкубационная смесь для измерения активности  $Mg^{2+}$ -АТФазы содержала 100 мМ KCl, 3 мМ  $MgCl_2$ , 0,5 мМ ЭГТА (для подавления активности  $Ca^{2+}$ -АТФазы), 30 мМ трис-HCl-буфер (pH 7,5). Среда инкубации для измерения активности  $Na^+$ -,  $K^+$ -,  $Mg^{2+}$ -АТФазы включала 10 мМ KCl, 100 мМ NaCl, 3 мМ  $MgCl_2$ , 0,5 мМ ЭГТА, 30 мМ трис-HCl-буфер (pH 7,5). В инкубационной среде для измерения активности  $Ca^{2+}$ -,  $Mg^{2+}$ -АТФазы содержались 100 мМ KCl, 50 мМ  $CaCl_2$ , 3 мМ  $MgCl_2$ , 30 мМ трис-HCl-буфер (pH 7,5). В каждую инкубационную смесь вносили по 0,2 мл гемолизата эритроцитов или 0,1 мл гомогената сердец крыс. Общий объем инкубационных смесей составлял 1 мл. Реакцию инициировали внесением 3 мМ АТФ. Пробы инкубировали при 37 °C с постоянным встряхиванием. Продолжительность инкубации 60 мин для гемолизатов эритроцитов и 3 мин для гомогенатов сердец крыс. Реакцию останавливали внесением 0,5 мл 15 % ТХУ с последующим центрифугированием при 3000 об/мин в течение 3 мин.

Для определения  $\Phi_n$  к 0,4 мл надосадочной жидкости добавляли 1,6 мл ацетатного буфера (pH 4,75), 0,2 мл 1 % молибдата аммония и 0,2 мл 1 % аскорбиновой кислоты. Через 30 мин измеряли оптическую плотность образцов при 720 нм.

Активность АТФаз рассчитывали, вычитая из содержания  $\Phi_n$  в пробах для определения активности фермента содержание  $\Phi_n$  в контрольных образцах. Активность  $Na^+$ -,  $K^+$ -АТФазы рассчитывали по разности активностей  $Na^+$ -,  $K^+$ -,  $Mg^{2+}$ -АТФазы и  $Mg^{2+}$ -АТФазы, а активность  $Ca^{2+}$ -АТФазы — по разности активностей  $Ca^{2+}$ -,  $Mg^{2+}$ -АТФазы и  $Mg^{2+}$ -АТФазы.

Для исследования прямого влияния ряда лекарственных препаратов, используемых при

лечении бронхиальной астмы, на активность АТФаз эритроцитов и в ряде экспериментов на активность  $Ca^{2+}$ -,  $Mg^{2+}$ -АТФазы гомогената миокарда в опытах *in vitro* в инкубационную смесь вносили эуфиллин, дексазон, интал и декарис в конечной концентрации от  $10^{-7}$  М до  $10^{-3}$  М. Все использованные лекарственные средства хорошо растворимы в воде. Балластные вещества из таблетированных форм отделяли центрифугированием.

Микровязкость и поверхностный заряд мембран тейер эритроцитов оценивали соответственно по спектрам флюоресценции пирена [6] и анилинафталиносulfоната (АНС-) [4]. Измерения выполняли на спектрофлуориметре MPF 4 («Hitachi», Япония).

Экстракцию липидов из эритроцитов проводили по методу Фолча [7]. Разделение фосфолипидов осуществляли в тонком слое силикагеля («Woelm», ФРГ) на стеклянных пластинках размером  $9 \times 12$  см в системе хлороформ — метанол — 28 % водный аммиак (14:6:1) с идентификацией пятен по известным величинам  $R_f$ , цветным реакциям и фосфолипидам-свидетелям. Содержание индивидуальных фосфолипидов определяли по  $\Phi_n$  [8] и выражали в процентах.

Статистическую обработку результатов, включая корреляционный анализ, проводили общепринятым методом [12].

## Результаты и обсуждение

Результаты исследования фосфолипидного состава мембран эритроцитов здоровых людей и больных бронхиальной астмой представлены в табл. 1.

Не обнаружено существенных различий в фосфолипидном составе эритроцитарных мембран больных бронхиальной астмой по сравнению со здоровыми людьми. Выявлена лишь тенденция к увеличению суммарного содержания кислых фосфолипидов —

фосфатидилсерина и фосфатидилинозитола в эритроцитах больных бронхиальной астмой. Содержание этих фосфолипидов продолжало возрастать с улучшением состояния больных при средней степени тяжести заболевания после лечения бронхолитиками, достигая 9% по сравнению с 3,4% в контроле, и возвращалось к величинам, характерным для здоровых людей, при применении декариса, интала, глюкокортикостероидов (у больных гормонально-зависимой бронхиальной астмой).

Было установлено, что мембраны эритроцитов больных бронхиальной астмой и здоровых людей не различаются существенно по микровязкости, оцениваемой соотношением флюоресценции эксимеров и мономеров пирена ( $F_{470}/F_{391}$ ), поверхностным зарядом, который измеряли по соотношению флюоресценции АНС<sup>-</sup> в средах с высокой и низкой ионной силой.  $\left(\frac{F_{150 \text{ мМ NaCl}}}{F_{5 \text{ мМ трис-HCl}}}\right) \cdot F_{470}F_{391}$  в мембранах больных и здоровых людей составило соответственно  $0,30 \pm 0,014$  и  $0,29 \pm 0,019$ , а  $\frac{F_{150 \text{ мМ NaCl}}}{F_{5 \text{ мМ трис-HCl}}}$  — соответственно  $1,64 \pm 0,033$  и  $1,54 \pm 0,086$ . Некоторое увеличение последнего показателя в мембранах эритроцитов больных бронхиальной астмой согласуется с повышением содержания в мембранах кислых фосфолипидов и указывает на незначительное увеличение плотности отрицательного заряда на поверхности мембраны эритроцита.

Результаты исследования активности АТФаз эритроцитов представлены в табл. 2. Активность  $Mg^{2+}$ -АТФазы не изменяется в эритроцитах больных бронхиальной астмой как при средней степени тяжести заболевания, так и при гормонально-зависимой его форме, однако возрастает после применения глюкокортикостероидов и интала. При лечении декарисом активность  $Mg^{2+}$ -АТФазы достоверно не отличается от показателя у здоровых людей.

Активность  $Na^{+}$ -,  $K^{+}$ -АТФазы увеличена у больных бронхиальной астмой средней степени тяжести в 2 раза по сравнению со здоровыми и продолжает возрастать после общепринятого комплексного лечения. В отличие от этого применение интала и декариса приводит к снижению активности фермента до величин контрольной груп-

Таблица 2

Активность АТФаз мембран эритроцитов здоровых людей и больных бронхиальной астмой ( $M \pm m$ )

Активность АТФаз. нмоль $Ф_n$ за 1 мин на 1 мл эритроцитов	Здоровые люди ( $n=18$ )	Больные бронхиальной астмой				с гормонально-зависимой формой заболевания	
		со средней степенью тяжести заболевания				до лечения ( $n=14$ )	после лечения глюкокортикостероидами ( $n=14$ )
		до лечения ( $n=26$ )	после обобщения- того лечения ( $n=14$ )	после лечения инталом ( $n=12$ )	после лечения декарисом ( $n=10$ )		
$Mg^{2+}$ зависимая $Na^{+}$ -, $K^{+}$ -активируемая $Ca^{2+}$ -активируемая	$17,7 \pm 1,2$ $15,2 \pm 1,6$ $39,8 \pm 2,9$	$18,3 \pm 2,2$ $32,0 \pm 3,1^*$ $29,3 \pm 3,3^*$	$24,6 \pm 6,2$ $45,7 \pm 4,9^{**}$ $59,9 \pm 6,1^{**}$	$22,3 \pm 2,2^{**}$ $11,6 \pm 2,0^{**}$ $33,1 \pm 2,7$	$16,4 \pm 2,0$ $14,2 \pm 1,3^{**}$ $37,8 \pm 2,7^{**}$	$19,7 \pm 1,7$ $18,2 \pm 1,9$ $24,1 \pm 2,8^*$	$32,5 \pm 4,5^{**}$ $9,9 \pm 1,3^{**}$ $35,3 \pm 3,0^{**}$

Примечание. Одна звездочка —  $p < 0,05$  по сравнению со здоровыми; две —  $p < 0,05$  по сравнению с соответствующей группой больных до лечения.



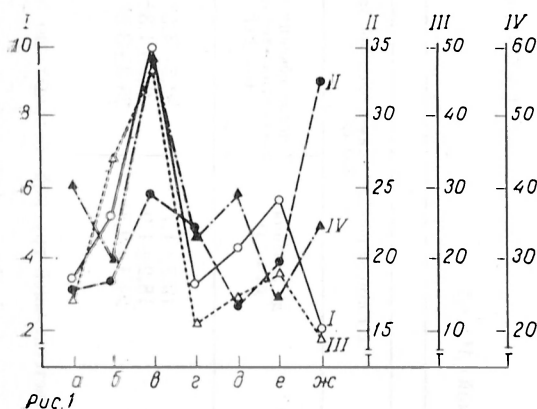


Рис. 1. Содержание фосфатидилсерина и фосфатидилинозитола (в отн. %) и активность АТФаз в мембранах эритроцитов (в нмоль  $\Phi_n$  за 1 мин на 1 мл эритроцитов) здоровых людей и больных бронхиальной астмой.

I — фосфатидилсерин + фосфатидилинозитол; II —  $Mg^{2+}$ -АТФаза; III —  $Na^{+}$ ,  $K^{+}$ -АТФаза; IV —  $Ca^{2+}$ -АТФаза. а — здоровые люди; б, в, г, д — больные со средней степенью тяжести бронхиальной астмы до (б) и после лечения бронхолитиками (в), инталом (г), декарисом (д); е, ж — больные с гормонально-зависимой формой бронхиальной астмы до (е) и после курса терапии глюкокортикостероидами (ж).

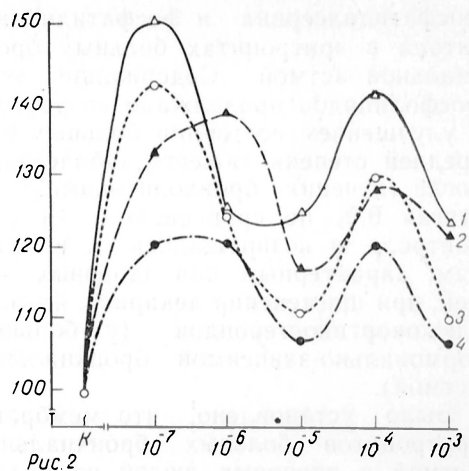


Рис. 2. Влияние различных концентраций декариса (1), эуфиллина (2), интала (3) и дексаметазона (4) на активность  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -АТФазы миокарда.

По оси абсцисс — концентрация препаратов (в М); по оси ординат — активность  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -АТФазы (в %, активность фермента в отсутствие лекарств принята за 100 %). К — контроль.

пы. У больных с гормонально-зависимой формой бронхиальной астмы активность  $Na^{+}$ ,  $K^{+}$ -АТФазы снижается после проведения курса терапии глюкокортикостероидами на 50 %.

Наибольший интерес представляют изменения активности  $Ca^{2+}$ -АТФазы мембран эритроцитов в связи с важной ролью ионов  $Ca^{2+}$  в развитии бронхиальной астмы. У больных обеих групп активность этого фермента в период приступов снижена на 27 % при средней степени тяжести заболевания и на 40 % при гормонально-зависимой форме болезни. Все виды проводимого лечения, сопровождающиеся прекращением приступов и улучшением клинического состояния больного, приводят к повышению активности  $Ca^{2+}$ -АТФазы. После лечения бронхолитиками активность фермента возрастает в 2 раза и значительно превышает таковую у здоровых людей. Применение интала, декариса и глюкокортикостероидов вызывало восстановление активности  $Ca^{2+}$ -АТФазы, в меньшей степени — при использовании интала.

Поскольку изменения в липидном составе мембран эритроцитов у обследованных больных затрагивает только суммарную фракцию фосфатидилсери-

на и фосфатидилинозитола мы сопоставили изменения в содержании этих липидов с активностью АТФаз эритроцитарных мембран (рис. 1). Отмечается отчетливая корреляция между изменениями содержания фосфатидилсерина и фосфатидилинозитола и активностью  $Na^{+}$ ,  $K^{+}$ -АТФазы эритроцитов ( $r=0,91$ ), что хорошо согласуется с известными данными об активирующем влиянии кислых фосфолипидов на  $Na^{+}$ ,  $K^{+}$ -АТФазу [10]. Активность  $Mg^{2+}$ - и  $Ca^{2+}$ -АТФазы не зависит от содержания в мембранах фосфатидилсерина и фосфатидилинозитола ( $r$  составляет соответственно 0,30 и —0,22).

Полученные результаты свидетельствуют о способности использованных в работе лекарственных средств модифицировать активность аденозинтрифосфатаз мембран эритроцитов в условиях *in vitro* у больных бронхиальной астмой. Эта способность может реализовываться как за счет изменения липидного окружения фермента, так и путем прямого влияния лекарств на отдельные стадии АТФазной реакции. С целью выяснения правомерности второго предположения были поставлены эксперименты в условиях *in vitro*, в ходе которых в инкубационную

Влияние лекарственных препаратов на активность АТФаз эритроцитов *in vitro* ( $M \pm m$ )

Активность АТФаз, $\Phi_n$ за 1 мин на 1 мл эритроцитов	Контроль	Эуфиллин ( $10^{-7}$ М)	Интал ( $10^{-7}$ М)	Декарис ( $10^{-7}$ М)	Дексазон ( $10^{-7}$ М)
$Mg^{2+}$ -зависимая	$46,5 \pm 3,5$	$57,9 \pm 4,5^*$	$55,4 \pm 4,3^*$	$47,3 \pm 3,6$	$61,1 \pm 5,1^*$
$Na^+$ -, $K^+$ -активируемая	$27,1 \pm 3,1$	$28,8 \pm 3,3$	$23,3 \pm 1,1$	$33,4 \pm 2,8^*$	$30,9 \pm 3,7$
$Ca^{2+}$ -активируемая	$48,6 \pm 3,4$	$56,8 \pm 4,4^*$	$36,5 \pm 3,3^*$	$55,5 \pm 3,9^*$	$49,1 \pm 3,0$

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

смесь для измерения АТФазной активности эритроцитарных мембран вносили использованные ранее лекарственные средства в концентрации  $10^{-7}$  М (табл. 3).

Эуфиллин, вызывая увеличение активности  $Na^{2+}$ -АТФазы и в меньшей степени  $Ca^{2+}$ -АТФазы, не влияет на  $Na^+$ -,  $K^+$ -АТФазную активность. Интал незначительно ингибирует  $Na^+$ -,  $K^+$ -АТФазу, существенно ингибирует  $Ca^{2+}$ -АТФазу и вызывает увеличение активности  $Mg^{2+}$ -АТФазы. Декарис не влияет на  $Mg^{2+}$ -АТФазу и умеренно повышает активность  $Na^+$ -,  $K^+$ - и  $Ca^{2+}$ -АТФаз. Дексазон повышает  $Mg^{2+}$ -зависимую активность и не оказывает существенного влияния на  $Na^+$ -,  $K^+$ - и  $Ca^{2+}$ -АТФазы. Влияние лекарств на активность АТФаз эритроцитов в условиях *in vitro* и *in vivo* характеризуется практически одинаковой направленностью изменений в случае  $Mg^{2+}$ - и  $Ca^{2+}$ -АТФаз и противоположной в случае  $Na^+$ -,  $K^+$ -АТФазы. По-видимому, в условиях *in vitro* влияние лекарств на  $Na^+$ -,  $K^+$ -АТФазу реализуется через изменение содержания в мембране кислых фосфолипидов (см. рис. 1).

АТФазная активность мембран эритроцитов невысока и при измерении ее по нарастанию содержания  $\Phi_n$  можно установить главным образом качественные изменения. Поэтому для количественной оценки зависимости активности АТФаз от концентрации лекарственных средств мы использовали препараты гомогенатов миокарда с высокой  $Ca^{2+}$ -,  $Mg^{2+}$ -АТФазной активностью. Измерить в этих препаратах  $Na^+$ -,  $K^+$ - или  $Mg^{2+}$ -АТФазную активность по приросту  $\Phi_n$  не представляется возможным в силу сложности подавления  $Ca^{2+}$ -активности.

Все лекарственные средства активируют  $Ca^{2+}$ -,  $Mg^{2+}$ -АТФазу, причем активирующий эффект для большинства лекарственных средств выражен сильнее при концентрациях  $10^{-7}$  и  $10^{-4}$  М и в меньшей степени при концентрациях  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  и  $10^{-3}$  М (рис. 2). Способность к активации  $Ca^{2+}$ -,  $Mg^{2+}$ -АТФазы миокарда убывает в ряду декарис — эуфиллин — интал — дексазон. Декарис и эуфиллин также наиболее эффективно активируют  $Ca^{2+}$ -АТФазу эритроцитов (табл. 2 и 3).

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о снижении активности  $Ca^{2+}$ -АТФазы мембран эритроцитов у больных инфекционно-аллергической бронхиальной астмой. Учитывая структурные нарушения клеточных мембран различных тканей при гипертонической болезни [10, 11], полученные результаты могут иметь непосредственное отношение к механизмам, ответственным за повышение тонуса гладкой мускулатуры бронхов и при бронхиальной астме. Лекарственные средства, используемые в фармакотерапии бронхиальной астмы, способны восстанавливать активность  $Ca^{2+}$ -АТФазы мембран эритроцитов в условиях *in vivo* и *in vitro*, причем активирующее действие препаратов на  $Ca^{2+}$ -АТФазу *in vitro* проявляется при их низких концентрациях ( $10^{-7}$ — $10^{-6}$  М), соответствующих концентрациям лекарственных средств в организме при применении их в терапевтических дозах. Наряду со снижением активности  $Ca^{2+}$ -АТФазы для мембран эритроцитов больных бронхиальной астмой характерно повышение активности  $Na^+$ -,  $K^+$ -АТФазы, коррелирующее с увеличением содержания в мембранах кислых фосфолипидов. Микровязкость эритроцитарной мембраны,

измеряемая по соотношению флюоресценции эксимеров и мономеров пирена, при бронхиальной астме не изменяется, но на поверхности мембраны умеренно увеличивается плотность отрицательного заряда согласно флюоресценции АНС.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Арчаков А. И. Микросомальное окисление. — М., 1975.
2. Блюгер А. Ф., Майоре А. Я., Залумане В. К. // Биомембраны: Структура, функции, медицинские аспекты. — Рига, 1981. — С. 185—195.
3. Бородин Е. А. // Успехи соврем. биол. — 1986. — Т. 102. — № 3 (6). — С. 432—446.
4. Бородин Е. А., Арчаков А. И. // Биол. мембраны. — 1987. — Т. 4. — № 7. — С. 719—728.
5. Бородин Е. А., Арчаков А. И., Лопухин Ю. М. // Вестн. АМН СССР. — 1985. — № 3. — С. 84—90.
6. Бородин Е. А., Добрецов Г. Е., Карасевич Е. И. и др. // Биохимия. — 1981. — Т. 46. — № 6. — С. 1109—1118.
7. Бородин Е. А., Сергиенко В. И., Халилов Э. М. и др. // Вопр. мед. химии. — 1981. — № 2. — С. 235—239.
8. Леменовская А. Ф., Коен Я. М., Перевозчикова К. А. и др. // Биохимия. — 1976. — Т. 41. — № 6. — С. 1000—1003.
9. Лопухин Ю. М., Арчаков А. И., Владимиров Ю. А., Когин Э. М. Холестериноз: (Холестерин биомембран: Теоретические и клинические аспекты). — М., 1983.
10. Постнов Ю. В., Орлов С. Н. // Кардиология. — 1983. — № 12. — С. 5—12.
11. Постнов Ю. В., Орлов С. Н. Первичная гипертензия как патология клеточных мембран. — М., 1987.
12. Рокицкий П. Ф. Основы вариационной статистики для биологов. — Минск, 1961.
13. Чучалин А. Г. // Тер. арх. — 1987. — № 1. — С. 121—127.
14. Bachmanova G. I., Archakov A. I. // Sov. med. Rev. Sect. B. (Lond.). — 1987. — Vol. 1. — P. 130—205.
15. Borodin E. A., Lopukhin Yu. M. // Ibid. — P. 205—253.
16. Coffey R. J., Middleton E. // Int. Arch. Allergy. — 1975. — Vol. 48. — P. 171—181.
17. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G. // J. biol. Chem. — 1957. — Vol. 226. — P. 497—509.
18. Jackson R. L., Gotto A. M. // Atherosclerosis Reviews. — New York, 1976. — Vol. 1. — P. 1—21.
19. Kimelberg H. K. // Molec. cell. Biochem. — 1976. — Vol. 10. — P. 171—190.
20. Meerson F. Z., Kagan V. E., Kozlov Yu. P. et al. // Basic Res. Cardiol. — 1982. — Vol. 77. — P. 465—485.
21. Middleton E. Jr. // J. Allergy. — 1984. — Vol. 73. — P. 643—650.
22. Middleton E. Jr. // Europ. J. resp. Dis. — 1983. — Vol. 128. — P. 123—132.
23. Mue S., Ise T., Shibahara S. // Tohoku J. exp. Med. — 1976. — Vol. 119. — P. 257—264.
24. Vladimirov Yu. A. // Sov. med. Rev. Sect. B. (Lond.). — 1987. — Vol. 1. — P. 52—129.
25. Wallach D. F. H. Plasma Membranes and Disease. — London, 1979.

Поступила 29.11.88

#### STRUCTURE-FUNCTIONAL PROPERTIES OF ERYTHROCYTE MEMBRANES IN PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA

E. A. Borodin, Yu. S. Landyshev, M. V. Savel'eva

Medical School, Blagovestchensk

A decrease in activity of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and activation of  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{K}^{+}$ -ATPase, correlating with elevation in content of phosphatidyl inositol and phosphatidyl serine, were detected in erythrocyte membranes of patients with the infectious-allergic form of bronchial asthma. Microviscosity of the erythrocyte membranes, estimated by fluorescence spectra of pyrene, was not altered, while negative charge, as shown by ANS- fluorescence, was slightly increased on the membrane surface. Euphylline, intal, levamisole and glucocorticosteroid were found to regulate the ATPases activity in vivo and in vitro.

© С. В. ГУНЬКО, Н. Ф. ЛЕУС, 1989

УДК 618.3-008.6-039.12-07:616.155.1-008.931:577.152.361]-074

С. В. Гунько, Н. Ф. Леус

#### АКТИВНОСТЬ $\text{Na}$ , $\text{K}$ -АТФазы КАК ОДИН ИЗ КРИТЕРИЕВ В ВЫДЕЛЕНИИ ГРУППЫ РИСКА ПО РАЗВИТИЮ ПОЗДНЕГО ТОКСИКОЗА ПРИ СКРИНИНГЕ БЕРЕМЕННЫХ

Одесский медицинский институт им. Н. И. Пирогова, НИИ глазных болезней и тканевой терапии им. В. П. Филатова, Одесса

Ранняя диагностика и прогнозирование гестозов по-прежнему — актуальная медико-социальная проблема в современном акушерстве. Значительная роль в патогенезе гестозов принадлежит нарушению электролитного

баланса. Известно, что одним из первичных патогенетических звеньев токсикоза является нарушение микроциркуляции [2, 9], приводящее наряду с другими патологическими процессами к уменьшению клубочковой филь-

трации и нарастанию уровня натрия в тканях [3, 4]. Na, К-АТФаза (КФ. 3.6.17.3) осуществляет перенос ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  против градиента концентрации через плазматическую мембрану клеток. За счет энергии, получаемой в результате гидролиза АТФ данным ферментом, происходит сохранение клеточного водно-солевого баланса [6, 8]. Активность Na, К-АТФазы регулируется концентрацией ионов. В то же время имеются данные, позволяющие рассматривать Na, К-АТФазу как гормонально-зависимый фермент, что подтверждается рядом экспериментальных работ на изолированном нефроне [9, 10].

Цель нашей работы — определение прогностической ценности уровня активности Na, К-АТФазы в формировании групп риска по развитию поздних токсикозов.

#### Методика

Активность Na, К-АТФазы определяли в гемолизате эритроцитов по методу И. А. Якушевой, Л. И. Орловой [6]. Кровь брали натощак из локтевой вены в количестве 4 мл в пробирку с гепарином, центрифугировали при 4000 об/мин в течение 10 мин. Эритроциты отделяли от плазмы и гемолизировали охлажденной бидистиллированной водой (1:4). Гемолизат может храниться при температуре  $-4^\circ\text{C}$  и ниже в течение 30 сут, что делает метод доступным при скрининге большого количества беременных. Гемоглобин определяли гемоглобинцианидным методом с использованием стандартных аналитических наборов.

#### Результаты и обсуждение

При обследовании в динамике женщин с несложненной беременностью нами установлено, что активность фермента в каждом случае была стабильной и соответствовала для этой группы беременных ( $12,87 \pm \pm 0,7$  мкг НФ/ч на 1 г гемоглобина). Эти цифры были приняты нами в качестве критерия нормального уровня активности Na, К-АТФазы.

При обследовании 259 здоровых женщин со сроком беременности от 20 до 34 нед без клинических проявлений позднего токсикоза были выделены 2 группы: у 143 женщин ранее беременность и роды протекали без осложнений (1-я группа), у 116 акушерский анамнез был отягощен поздним токсикозом и так называемым гестационным пиелонефритом при предыдущих беременностях (2-я группа). Все женщины во время беременности прошли полное клинико-лабораторное обследование. Традиционные клинические тесты на выявление претоксикоза в большинстве случаев были отрицательными.

У 48 беременных 1-й группы (с неотягощенным акушерским анамнезом) активность Na, К-АТФазы была ниже нормы ( $9,63 \pm 0,66$  мкг НФ/1 г гемоглобина,  $p < 0,05$ ), что предшествовало развитию позднего токсикоза у 46 женщин. Информативность прогноза у этой группы беременных составила 96 % (см. таблицу).

Прогнозирование позднего токсикоза беременности с учетом активности Na, К-АТФазы

Группа обследованных	Активность Na, К-АТФазы, мкг НФ/ч на 1 г гемоглобина	Число поздних токсикозов		Информативность, %
		прогноз	развитие токсикоза на 30—32-й неделе беременности	
1-я (без отягощенного акушерского анамнеза)				
В том числе:				
с низким уровнем активности Na, К-АТФазы	$9,63 \pm 0,66^*$ (48)	48	46	96
с повышенным уровнем активности Na, К-АТФазы	$13,31 \pm 0,45^*$ (3)	—	—	—
с нормальным уровнем активности Na, К-АТФазы	$12,96 \pm 0,86$ (92)	—	2	—
2-я (с отягощенным акушерским анамнезом)				
с низким уровнем активности Na, К-АТФазы	$8,36 \pm 0,48^{**}$ (116)	116	101	87

Примечание. Одна звездочка —  $p < 0,05$ , две —  $p < 0,01$ , три —  $p < 0,001$  относительно нормы.



У всех беременных 2-й группы активность Na, K-АТФазы была снижена по сравнению с нормой ( $8,56 \pm 0,48$  мкг НФ/1 г гемоглобина,  $p < 0,05$ ), поздний токсикоз в последующем развился на 30—32 неделе беременности у 101 из 116 женщин. Информативность прогноза развития позднего токсикоза у этой группы беременных составила 87 %.

Снижение активности Na K-АТФазы предшествовало развитию позднего токсикоза у беременных обеих групп за 2—4 нед до появления первых клинических признаков.

У 92 беременных 1-й группы была выявлена нормальная активность фермента —  $12,96 \pm 0,86$  мкг НФ/1 г гемоглобина, у 2 из них в последующем, к концу III триместра беременности, развился поздний токсикоз. В то же время ни у одной из 3 беременных 1-й группы с повышенным уровнем активности фермента ( $13,31 \pm 0,45$  мкг НФ/1 г гемоглобина,  $p < 0,05$ ) поздний токсикоз не развился.

Снижение активности Na, K-АТФазы, выявленное нами у беременных за 2—4 нед до появления первых клинических признаков, является, вероятно, результатом реализации нескольких патогенетических звеньев позднего токсикоза, в том числе следствием истощения ферментной системы после компенсаторного напряжения в ответ на уменьшение экскреции натрия [11]. Можно полагать, что снижение активности фермента является следствием изменений в диэнцефальном отделе нервной системы и обусловлено, в частности, влиянием альдостерона. Определенную роль в снижении активности фермента, встроенного в клеточную мембрану, играют структурные и функциональные изменения мембран, обусловленные процессами свободнорадикального перекисного окисления, которым принадлежит важная роль в патогенезе позднего токсикоза [1].

Таким образом, можно предположить, что снижение активности Na, K-АТФазы в эритроцитах отражает сложные патофизиологические процессы, приводящие к развитию позднего токсикоза. При возникших нарушениях электролитного обмена снижение активности Na, K-АТФазы до появления клинических признаков гестоза обуславливает дальнейшее усугубление этого патологического процесса и возникновение порочного круга.

Полученные нами результаты позволяют сделать следующие выводы:

1. Снижение активности Na, K-АТФазы в эритроцитах беременных можно рассматривать как ранний диагностический тест в общем комплексе клинико-биохимических исследований беременных.

2. Снижение активности Na, K-АТФазы ниже  $12,87 \pm 0,66$  мкг НФ/ч на 1 г гемоглобина в гемолизате эритроцитов беременных женщин является основанием для наблюдения этих беременных в группе риска по развитию поздних токсикозов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Абримченко В. В., Баскако В. П., Соколовский В. В. и др. // *Акуш. и гин.* — 1988. — № 6. — С. 67.
2. Ваиццко С. Л. Поздний токсикоз беременных, нарушение адаптационных механизмов, пути их коррекции и профилактики: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Киев, 1981. — С. 49—51.
3. Вихляева Е. М. Волемические нарушения в акушерско-гинекологической клинике и их коррекция. — М., 1977. — С. 110—135.
4. Грищенко В. И., Иванов И. П., Воронин К. В., Маневич Л. Е. Родовспоможение при позднем токсикозе беременных. — Киев, 1986. — С. 13—19.
5. Грищенко В. И., Щербина Н. А. // *Акуш. и гин.* — 1988. — № 9. — С. 61—62.
6. Якушева И. А., Орлова Л. И. // *Лаб. дело.* — 1970. — № 8. — С. 497—501.
7. Clough G. L. // *Life Sci.* — 1985. — Vol. 37, N 9. — P. 799—807.
8. Crus-Luto M., Behebe G., Lopes-Novoa J. H. // *Amer. J. Physiol.* — 1984. — Vol. 247, N 4. — P. 650—655.
9. Heilmann L., Siekmann U. // *Arch. Gynäk.* — 1981. — Bd 232, N 1. — S. 77—78.
10. Mujais L. K., Chekol M. A., Jones W. et al. // *J. clin. Invest.* — 1985. — Vol. 76, N 1. — P. 170—176.
11. Friedlaender M. M., Wald H., Pojoutzer M. M. // *Pflügers Arch.* — 1985. — Vol. 405, N 2. — P. 170—172.

Поступила 30.05.89

#### EVALUATION OF RISK GROUPS FOR LATE TOXICOSIS IN PREGNANT WOMEN SCREENING USING ACTIVITY OF $Na^+$ , $K^+$ -ATPASE AS ONE OF CRITERION

S. V. Gun'ko, N. F. Leus

Chair of Gynecology and Obstetrics, Faculty for Postgraduate Training of Physicians, N. I. Pirogov Medical School, Department of Biochemistry, V. P. Filatov Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy, Odessa

Activity of erythrocyte  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase was studied in screening of pregnant women.

Alterations in total antiradical status were estimated by means of estimation of erythrocytes resistancy to peroxidation. 259 healthy women with pregnancy of 20-34 weeks, without any clinical manifestations of hestosis were examined. The enzymatic activity studied was decreased in erythrocytes of women both with nonimpaired and aggravated obstetric history;

these groups of women were impaired with hestosis. Functions of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase enzymatic system appear to be impaired during the preclinical steps of hestosis development. Alterations in activity of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase in blood of pregnant women should be used in evaluation of risk groups for development of late toxicoses.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1989

УДК 614.611-002-07: [616.155.32-007.1 + 616.155.32-008.93:577.161.22

*И. Н. Сергеев, К. Д. Плечитый, Ф. И. Руснак, В. Б. Спиричев*

## **РЕЦЕПТОРЫ 1,25-ДИГИДРОКСИВИТАМИНА $\text{D}_3$ В ЛИМФОЦИТАХ И УРОВЕНЬ Т- И В-ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТОМ**

Институт питания АМН СССР

Институт общей патологии и патологической физиологии АМН СССР, Москва

1,25 - Дигидроксивитамин  $\text{D}_3$  [ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ] — гормональная форма витамина  $\text{D}_3$  — реализует свои эффекты по механизму, аналогичному механизму действия других стероидных гормонов [3, 8]. Рецепторы  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  выявлены в большинстве тканей организма, где этот гормон регулирует вне- и внутриклеточный обмен кальция.

В находящихся в покое моноцитах и активированных *in vitro* Т- и В-лимфоцитах крови человека также обнаружены рецепторы  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  [2, 10, 14], а макрофаги, моноциты и активированные Т-лимфоциты способны синтезировать  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  [15, 16]. Показано, что гормон влияет на продукцию интерлейкина-1 и интерлейкина-2,  $\gamma$ -интерферона, колониестимулирующего фактора, иммуноглобулинов и антител, регулирует пролиферацию и дифференцировку лимфоцитов *in vitro* [2, 3, 8, 13]. Эти данные позволяют рассматривать  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  как иммуномодулирующий гормон и, возможно, гормон иммунной системы.

В связи с этим мы исследовали содержание рецепторов  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  в лимфоцитах периферической крови (без их активации *in vitro*) у детей, больных гломерулонефритом — заболеванием, в патогенезе которого ведущая роль принадлежит аутоиммунному компоненту. Кроме того, учитывая ключевую роль  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  как кальцийрегулирующего гормона, мы оценивали показатели обмена кальция, а также определяли концентрацию сАМР в лимфоцитах, позволяющую косвенно судить об их функциональ-

ной активности. В комплексном лечении гломерулонефрита был использован синтетический аналог гормональной формы витамина  $\text{D}_3$  оксидевит (1-гидроксивитамин  $\text{D}_3$ ), превращающийся в организме в  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .

Полученные нами данные свидетельствуют, что у больных гломерулонефритом изменены показатели обмена кальция, резко повышена концентрация рецепторов  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  в лимфоцитах периферической крови, а также имеет место выраженная Т-лимфоцитопения. Лечение оксидевитом на фоне общепринятой комплексной терапии способствует нормализации показателей обмена кальция и численности Т-клеток, тогда как уровень рецепторов  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  в лимфоцитах остается высоким.

### **Методика**

В апреле — мае 1988 г. обследовано 10 детей в возрасте 7—12 лет с нефротической и смешанной формами гломерулонефрита (5 с острым и 5 с хроническим гломерулонефритом), находившихся на лечении в отделении нефрологии Института педиатрии АМН СССР. Все больные в период первичного обследования не получали кортикостероидов, цитостатических препаратов, гепарина, препаратов витамина D и кальция, диуретиков. В течение месячного курса лечения в стационаре им назначали оксидевит в дозе 1—1,5 мкг в день. В дополнение к этому больные получали преднизолон и гепарин. Контрольную группу составили 11 здоровых детей того же возраста.

Лимфоциты выделяли центрифугированием свежей гепаринизированной крови в фиколл — верографине (1,077 г/мл). Отмытые лимфоциты ресуспендировали в среде RPMI-1640 (концентрация белка лимфоцитов составляла 1 мг/мл) и немедленно использовали для оценки рецепторного связывания  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .

Т а б л и ц а 1

Концентрация общего и ионизирующего кальция, ПТГ, 25-ОНД в сыворотке крови, рецепторов  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , cAMP в лимфоцитах у больных гломерулонефритом ( $M \pm m$ )

Показатель	Контрольная группа	Больные гломерулонефритом		
		до лечения	через 1 нед лечения	через 4 нед лечения
Кальций, ммоль/л	$2,25 \pm 0,03$	$2,04 \pm 0,07^a$	$2,05 \pm 0,04^a$	$2,20 \pm 0,06$
$\text{Ca}^{2+}$ , ммоль/л	$1,14 \pm 0,01$	$1,09 \pm 0,015^a$	$1,06 \pm 0,04$	$1,13 \pm 0,03$
ПТГ, пг/мл	$185 \pm 8$	$252 \pm 19^a$	$240 \pm 37$	$326 \pm 99$
25-ОНД, нг/мл	$13,7 \pm 1,9$	$< 1,25^*$	$19,6 \pm 5,4^b$	$10,4 \pm 3,9^b$
Рецепторы $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , фмоль на 1 мг белка	$< 1,5^{**}$	$27,3 \pm 2,8^a$	$39,7 \pm 5,5^{a,b}$	$24,8 \pm 5,8^a$
cAMP, пмоль на 1 мг белка	$38,6 \pm 4,9$	$25,9 \pm 5,2$	$21,3 \pm 3,1^a$	$33,7 \pm 4,0$

\* У 2 больных концентрация 25-ОНД составила 1,64 и 3,17 нг/мл.

\*\* У 4 обследованных концентрация рецепторов  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  равнялась 1,83, 3,10, 2,65 и 12,5 фмоль/мг.

Примечание. Здесь и в табл. 2: а — достоверное отличие ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями контрольной группы, б — с показателями до лечения.

С этой целью к 200 мкл суспензии лимфоцитов добавляли 20 мкл раствора  $1,25$ -дигидроксид [26,27-метил- $^3\text{H}$ ] холекальциферола (удельная радиоактивность — 180 Ки/ммоль, "Amersham", Англия) в смеси изопропанол — среда инкубации (1 : 3). Концентрация  $^3\text{H}$ - $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  в пробах была насыщающей и составляла 0,5 нМ. Для оценки неспецифического связывания к пробам предварительно добавляли немеченый  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  в 500-кратном избытке. Инкубацию проводили в пробирках из боросиликатного стекла (12×75 мм) при 37 °С и постоянном встряхивании в течение 45 мин. Затем пробы охлаждали 15 мин при 0—4 °С, дважды отмывали холодным раствором Хенкса. Клетки растворяли в тканевом солубилизаторе ("Serva", ФРГ), радиоактивность измеряли в жидкостном сцинтилляционном счетчике "Rackbeta-1215" (LKB, Швеция). Количество специфически связанного  $^3\text{H}$ - $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  рассчитывали по разности между общим и неспецифическим связыванием, которое составляло 20—30 %. В части проб удаляли моноциты, используя их свойство прилипать к пластиковой поверхности (1 ч, 37 °С). Связывание  $^3\text{H}$ - $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  лимфоцитами после удаления моноцитов достоверно не отличалось от такового в исходной суспензии, поэтому в дальнейших экспериментах удаление моноцитов не проводили.

Содержание Т- и В-лимфоцитов в периферической крови определяли путем совместного розеткообразования клеток лимфоцитарной фракции с эритроцитами барана и зимозаном [1]. При этом также выявляли число Д-лимфоцитов (клеток, экспрессирующих рецепторы как эритроцитов барана, так и зимозана) и 0-лимфоцитов (клеток, лишенных основных фенотипических характеристик Т- и В-лимфоцитов).

Концентрацию 25-гидроксивитамина D (25-ОНД) в сыворотке крови определяли методом радиоконкурентного белкового связывания, используя наборы "Vitamin D-screening Kit" ("Bühlmann Lab", Швейцария); концентрацию паратгормона (ПТГ) (С-терминальный фрагмент) — радиоиммунологическим методом, используя наборы "Ria-mat PTH" ("Malinck-

rodt Diagnostica", ФРГ). Содержание cAMP в лимфоцитах определяли радиоиммунологически с помощью наборов "Cyclic AMP assay kit" ("Amersham", Англия). При подготовке проб к 0,2 мл суспензии лимфоцитов добавляли 0,2 мл 50 мМ трис-HCl-буфера, содержащего 8 мМ ЭДТА pH 7,5 и замораживали при —20 °С. Для определения концентрации cAMP применяли высокоскоростной супернатант, полученный после денатурации белков при 95 °С. Концентрацию ионизированного кальция в свежей сыворотке крови, полученной в анаэробных условиях, измеряли на анализаторе "Space-Stat 20" ("Orion Biomedical-LKB", Швеция), концентрацию общего кальция — ранее описанным методом [4].

## Результаты и обсуждение

Гломерулонефрит у детей сопровождался достоверным снижением концентрации общего и ионизированного кальция в сыворотке крови, при этом уровень ПТГ возрастал на 36 % (табл. 1). Концентрация 25-ОНД, основного циркулирующего в крови метаболита витамина D, снижалась до неопределяемого уровня, очевидно, вследствие его потери с экскретируемым в большом количестве с мочой витамином D-связывающим белком [7]. Таким образом, у детей, больных гломерулонефритом, наблюдались значительные нарушения обмена кальция, содержания в крови кальцийрегулирующих гормонов — ПТГ и витамина D.

Поскольку иммунологические механизмы являются ведущими в патогенезе гломерулонефрита, мы оценивали также некоторые показатели, харак-

Содержание (в %) Т-, В-, D- и 0-лимфоцитов в периферической крови больных гломерулонефритом ( $M \pm m$ )

Лимфоциты	Контрольная группа	Больные гломерулонефритом		
		до лечения	через 1 нед лечения	через 4 нед лечения
Т	51,0 $\pm$ 4,8	36,5 $\pm$ 3,9 <sup>a</sup>	41,6 $\pm$ 4,2	56,4 $\pm$ 4,7 <sup>b</sup>
В	10,8 $\pm$ 1,8	10,3 $\pm$ 1,2	14,4 $\pm$ 1,9	8,0 $\pm$ 1,3
D	1,2 $\pm$ 0,4	1,3 $\pm$ 0,4	1,6 $\pm$ 0,3	1,3 $\pm$ 0,3
0	37,0 $\pm$ 5,4	51,9 $\pm$ 5,8 <sup>a</sup>	42,4 $\pm$ 4,3	34,3 $\pm$ 4,0 <sup>b</sup>

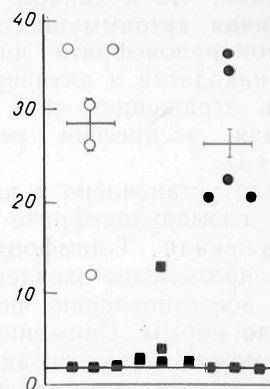
теризующие состояние иммунной системы. Результаты этого раздела работы приведены в табл. 2. У детей, больных гломерулонефритом, по сравнению со здоровыми почти в 1,5 раза снижено содержание Т-лимфоцитов в периферической крови, тогда как содержание малодифференцированных 0-клеток, напротив, существенно повышено, а число В- и D-лимфоцитов не изменено.

Важным представляется то обстоятельство, что лимфоциты у всех детей, больных гломерулонефритом, содержали в высокой концентрации рецепторы гормональной формы витамина D<sub>3</sub>, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, не отличавшиеся от рецепторов гормона в других тканях (см. рисунок). В то же время среди здоровых детей рецепторы 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> были обнаружены только у 27 %, причем в значительно более низкой концентрации. Значимость наблюдаемого нами феномена не вполне ясна, но очевидно, что активация лимфоцитов при гломерулонефрите сопровождается экспрессией рецепторов 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, что делает эти клетки «компетентными» для гормона. Следует отметить, что косвенным подтверждением активации лимфоцитов у больных гломерулонефритом может также служить снижение в них концентрации сАМР (см. табл. 1), так как известно, что уровень сАМР в лимфоцитах находится в обратной зависимости от их функциональной активности [6].

При лечении детей 1-гидроксивитамином D<sub>3</sub> (оксидевитом), превращающимся в печени в 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, через 1 нед терапии наблюдалось достоверное (на 45 %) повышение концентрации рецепторов гормона в лимфоцитах, однако через 4 нед их концентрация снижалась до исходной (см. табл. 1). Эти изменения concentra-

ции рецепторов 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> в лимфоцитах сопровождались реципрокными колебаниями в них уровня сАМР. Такое транзитное повышение концентрации рецепторов 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> в лимфоцитах, очевидно, можно было бы рассматривать как результат положительной ауторегуляции метаболизма витамина D<sub>3</sub> [3]. В то же время необходимо отметить, что больные получали кортикостероиды, которые также регулируют уровень рецепторов 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, причем их действие может выражаться как в повышении, так и в снижении концентрации рецепторов гормона [5, 12].

Необходимо подчеркнуть, что оксидевит способствовал нормализации функции почек у больных гломерулонефритом (оценивалась по клиренсу креатинина, экскреции с мочой белка, Р<sub>и</sub>, кальция — данные не представлены). Очевидно, именно этим можно



Концентрация рецепторов 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> в лимфоцитах у больных гломерулонефритом.

Квадраты — контрольная группа, пунктирная линия — предел чувствительности метода (1,5 фмоль на 1 мг белка); светлые кружки — больные острым гломерулонефритом, темные — больные хроническим гломерулонефритом; сплошные линии — средние значения  $\pm$  стандартная ошибка для последних 2 групп. По оси ординат — концентрация рецепторов 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (в фемтомолях на 1 мг белка лимфоцитов).



объяснить восстановление концентрации 25-OHД в крови. В повышении концентрации кальция в крови этих больных ведущая роль, по-видимому, принадлежит действию препарата на всасывание минерала в кишечнике.

В процессе лечения у больных также происходила постепенная нормализация иммунологических показателей (см. табл. 2): через 4 нед содержание Т-лимфоцитов в периферической крови увеличилось, а численность 0-лимфоцитов уменьшилась до показателей контрольной группы.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют, что при гломерулонефрите наблюдается экспрессия рецепторов 1,25 (ОН)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> в лимфоцитах. В литературе до настоящего времени имеется только одно наблюдение, подтверждающее подобную направленность изменений: среди больных ревматоидным артритом рецепторы 1,25 (ОН)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> в лимфоцитах обнаружены у 76 %, среди здоровых людей — только у 17 % [11].

В связи с этим следует отметить, что в последние годы получены данные об отсутствии рецепторов 1,25 (ОН)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> в находящихся в покое как Т-, так и В-лимфоцитах и их выраженной экспрессии при митогенной и антигенной стимуляции, что коррелирует с изменениями их функциональной активности и характером перехода из одной стадии клеточного цикла в другую [2, 10, 14]. Представляется несомненным, что в данном случае в силу наличия аутоиммунного процесса при гломерулонефрите лимфоциты больных находятся в активированном состоянии, отражением чего является интенсивная экспрессия рецепторов 1,25 (ОН)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

Как было установлено в нашей работе, при гломерулонефрите развивается выраженная Т-лимфоцитопения, тогда как применение оксидевита способствует восстановлению числа лимфоцитов до нормы. Снижение уровня Т-клеток может быть связано с развивающимся при гломерулонефрите дефицитом витамина D. Показано [9], что при культивировании лимфоидных клеток в среде, лишенной витамина D или его метаболитов, происходит торможение продукции клетками интерлейкина-2, тогда как внесение в культуру 1,25(ОН)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> в физиологических концентрациях восстанавли-

ливает их способность к продукции интерлейкина-2. Как известно, интерлейкин-2 является одним из основных клеточных цитокинов, воздействующих, в частности, на процессы пролиферации и дифференцировки Т-лимфоцитов [17]. В связи с этим становится ясной причина отмеченных нами изменений: под влиянием 1,25 (ОН)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> происходит восстановление способности клеток к продукции интерлейкина-2, что в свою очередь приводит к стимуляции пролиферации Т-лимфоцитов и активирует процессы клеточной дифференцировки, отражением чего является уменьшение числа малодифференцированных 0-лимфоцитов. В то же время концентрация рецепторов 1,25(ОН)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> в лимфоцитах остается высокой, что может указывать на сохранение в активированном состоянии значительной части Т- и (или) В-лимфоцитов.

Полученные данные об экспрессии рецепторов 1,25 (ОН)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> в лимфоцитах при гломерулонефрите свидетельствуют о необходимости при выполнении дальнейших исследований провести изучение этих рецепторов отдельно в популяциях Т- и В-лимфоцитов, что может иметь существенный интерес для углубления представлений о роли иммунной системы в патогенезе гломерулонефрита.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гришина Т. И., Мюллер Ф. // Бюл. exper. биол. — 1978. — № 4. — С. 503—506.
2. Плещинский К. Д. // Вопр. мед. химии. — 1988. — № 5. — С. 9—14.
3. Сергеев И. Н. // Там же. — 1989. — № 1. — С. 2—11.
4. Спиричев В. Б., Сергеев И. Н. // Теоретические и клинические аспекты науки о питании. — М., 1988. — Т. 8. — С. 59—78.
5. Chen T. L., Hauschka P. V., Feldman D. // Endocrinology. — 1986. — Vol. 118. — P. 1119—1126.
6. Coffey R. G., Hadden J. W. // Fed. Proc. — 1985. — Vol. 44. — P. 112—117.
7. Haddad J. G. // Bone Miner. Res. — 1987. — Vol. 5. — P. 281—308.
8. Haussler M. R. // Ann. Rev. Nutr. — 1986. — Vol. 6. — P. 527—562.
9. Haverly T., Haddad J. G., Neilson E. G. // J. Leukocyte Biol. — 1987. — Vol. 41. — P. 177—182.
10. Manolagas S. C., Provvedini D. M., Tsoukas C. D. // Molec. cell. Endocr. — 1985. — Vol. 43. — P. 113—122.
11. Manolagas S. C., Wernitz D. A., Tsoukas C. D. et al. // J. Lab. clin. Med. — 1986. — Vol. 108. — P. 596—600.
12. Nielsen H. K., Eriksen E. F., Strom T.,

- Mosekilde L. // Metabolism. — 1988. — Vol. 37. — P. 109—114.
13. Ostrem V. H., Lau W. F., Lee S. H. et al. // J. biol. Chem. — 1987. — Vol. 262. — P. 14164—14171.
  14. Rigby W. // Immunol. Today. — 1988. — Vol. 9. — P. 54—58.
  15. Reichel H., Koeffler H. P., Norman A. W. // J. clin. Endocr. — 1987. — Vol. 65. — P. 519—526.
  16. Reichel H., Koeffler H. P., Norman A. W. // J. biol. Chem. — 1987. — Vol. 262. — P. 10931—10937.
  17. Rosenstreich D. L., Yost S. L., Tu J. H. et al. // Einstein Quart. J. Biol. Med. — 1987. — Vol. 5. — P. 10—18.

Поступила 22.12.88

# CONTENT OF T AND B LYMPHOCYTES AS WELL AS OF THE CELL RECEPTORS TO 1,25-DIHYDROXYVITAMIN D<sub>3</sub> IN PATIENTS WITH GLOMERULONEPHRITIS

I. N. Sergeev, K. D. Plecily, F. I. Rusnak, V. B. Spirichev

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

Content of receptors to hormonal form of vitamin D<sub>3</sub>, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, constituted 27.3 fmole/mg of protein in lymphocytes of peripheric blood of children with glomerulonephritis. In the patients concentration of total and ionized form of Ca<sup>2+</sup> was decreased down to 2.04 mmole/L and 1.09 mmole/L, respectively, while an increase in parathormone (PTH) by 36 % and a distinct decrease in 25(OH)D concentration (lower than 1.25 ng/ml) was found in blood; content of cAMP was also decreased in lymphocytes by 33 %. At the same time, total content of T lymphocytes was decreased 1.5-fold in peripheric blood. Treatment with 1-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1-1.5 mg daily, within 4 weeks) led to normalization of total and ionized form of Ca<sup>2+</sup> and of 25(OH)D, but did not affect the PTH content in blood. Concentration of the receptors to 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> was elevated up to 39.7 fmole/mg after 1 week of the treatment, whereas it was decreased to the initial level 24.8 fmole/mg within 4 weeks; simultaneous alteration in the cAMP content was observed in lymphocytes. Treatment with 1-(OH)D<sub>3</sub> normalized also the T lymphocytes content in peripheric blood. The data obtained suggest that under conditions of glomerulonephritis only high content of receptors to 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in lymphocytes enabled to perform the cell response to the hormone effect.

## МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1989

УДК 616-006.6-07:616.153.96-053.1-097-078.833

А. И. Щербань, Л. В. Лукашевич, С. И. Марчук, Е. А. Нежинец

### ПРИМЕНЕНИЕ ИММУНОАФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ РАКОВО-ЭМБРИОНАЛЬНОГО АНТИГЕНА

Институт биоорганической химии АН БССР, Минск

Раково-эмбриональный антиген (РЭА) — гликопротеин с молекулярной массой ~180 кД — является маркером ряда злокачественных опухолей [10]. В медицине широко применяются коммерческие наборы реактивов для радиоиммунологического и иммуноферментного определения РЭА. Для серийного выпуска наборов требуются большие количества высокоочищенного антигена, который используется для приготовления стандартов, получения меченного радиоизотопной или ферментной меткой антигена, антисыворотки. Традиционные методы выделения РЭА включают различные сочетания ионообменной и

гель-хроматографии, аффинной хроматографии на лектинах, т. е. являются многоэтапными и дают низкий выход антигена (5—20 %) [2, 4].

Целью настоящей работы явилась разработка метода выделения РЭА на основе иммуноаффинной хроматографии, поскольку применение ее в процессе выделения белковых антигенов во многих случаях позволяет упростить методы выделения и достичь высокого выхода [8].

#### Методика

В работе использовали ДЭАЭ-сефадекс А-25, CNBr-сефарозу 4В, сефадекс G-200

(«Pharmacia», Швеция), КМ-целлюлозу («Whatman», Англия), холат натрия, додецилсульфат натрия, твин-20,  $\text{NaN}_3$  («Serva», ФРГ), нитроцеллюлозу («Bio-Rad», США), глицин («Reanal», ВНР), отечественные реактивы квалификации х. ч. и о. ч. с. ч.

Для выделения РЭА использовали метастазы аденокарциномы толстой кишки в печень, взятые при аутопсии. Опухолевую ткань хранили при  $-60^\circ\text{C}$ .

Фракцию IgG, содержащую антитела к РЭА (анти-РЭА IgG), выделяли из кроличьей антисыворотки к РЭА фракционированием сульфатом аммония (50% насыщения) с последующей ионообменной хроматографией на ДЭАЭ-сефадексе А-25 в 0,02 М фосфатном буфере pH 7,4 (фракции, содержащие анти-РЭА-IgG, не сорбировались на ионообменнике) и ионообменной хроматографией на КМ-целлюлозе в 0,02 М фосфатном буфере pH 5,6; фракции, содержащие анти-РЭА IgG, элюировали 0,02 М фосфатным буфером pH 7,8, содержащим 0,2 М NaCl.

Иммуносорбент анти-РЭА-IgG-сефароза 4В получали, иммобилизуя IgG на CNBr-сефарозе 4В в условиях, рекомендуемых фирмой «Pharmacia» (Швеция), при концентрации 12 мг IgG на 1 мл геля. Иммуносорбент промывали последовательно 0,01 М фосфатным буфером pH 7,4, содержащим 0,2 М NaCl, 0,05 М фосфатным буфером pH 7,4, содержащим 0,3% холат натрия и 1 М NaCl, 0,01 М фосфатным буфером pH 7,4, 0,1 М глицин-HCl pH 2,2, 0,01 М фосфатным буфером pH 7,4, содержащим 0,2 М NaCl; в этом же буфере иммуносорбент хранили, добавляя в качестве бактериостатика 0,03%  $\text{NaN}_3$ . Эффективность иммобилизации IgG составила 56%. Емкость иммуносорбента, определенная с очищенным РЭА, составила  $\sim 0,7$  мг РЭА на 1 мл геля.

$\alpha_1$ -Кислый гликопротеин ( $\alpha_1$ -КГ) выделяли из сыворотки крови здоровых доноров по методу [3]. В работе использовали также препараты  $\alpha_1$ -КГ и антисыворотки к  $\alpha_1$ -КГ, любезно предоставленные А. В. Курикой (ТИБОХ ДВНЦ АН СССР) и А. А. Молодых (ВОНЦ АМН СССР).

Определение РЭА и  $\alpha_1$ -КГ во фракциях в процессе их выделения проводили методом

двойной радиальной иммунодиффузии по Оухтерлонни. Концентрацию белка определяли по методу [6].

Радиоиммунологическое определение РЭА осуществляли с помощью серийно выпускаемого опытным производством ИБОХ АН БССР набора радио-РЭА- $^{125}\text{I}$  согласно инструкции по применению набора, используя стандарты РЭА, приготовленные на 0,05 М фосфатном буфере pH 7,4, содержащем 0,1% твин-20, 1% бычий сывороточный альбумин, 0,003 М ЭДТА, 0,03%  $\text{NaN}_3$ .

Контроль чистоты препаратов РЭА осуществляли методами электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия [5] и иммуноблоттинга [11].

## Результаты и обсуждение

РЭА экстрагировали из опухолевой ткани с помощью  $\text{HClO}_4$  по методу [4]. Опухолевую ткань гомогенизировали в дистиллированной воде при соотношении масса ткани/объем воды — 1 : 4 при 14 500 об/мин в течение 10 мин в гомогенизаторе типа Уоринга. Гомогенат центрифугировали 30 мин при 9000 g и  $4^\circ\text{C}$ . К надосадочной жидкости добавляли равный объем 2 М  $\text{HClO}_4$ , перемешивали 30 мин при  $4^\circ\text{C}$ , затем 30 мин центрифугировали при 9000 g и  $4^\circ\text{C}$ . Надосадочную жидкость нейтрализовали до pH 6,0 1 М NaOH, концентрировали в 25 раз ультрафильтрацией, диализировали против дистиллированной воды и лиофилизировали. Лيوфилизированный экстракт хранили при  $-20^\circ\text{C}$ .

Лيوфилизированный экстракт, полученный из 25 г опухолевой ткани, растворяли в 20 мл 0,01 М фосфатного буфера pH 7,4, содержащего 0,2 М NaCl, и наносили со скоростью 6 мл/( $\text{cm}^2 \cdot \text{ч}$ ) на колонку ( $1,4 \times 16$  см) с анти-РЭА IgG-сефарозой 4В, уравновешенную тем же буфером (эту и все последующие операции проводили при  $4^\circ\text{C}$ ). После нанесения экстракта колонку промывали со скоростью 25 мл/( $\text{cm}^2 \cdot \text{ч}$ ) 25 объемами каждого из следующих буферных растворов: 0,01 М фосфатным буфером pH 7,4, содержащим 0,2 М NaCl; 0,05 М фосфатным буфером pH 7,4, содержащим 0,3% холат натрия и 1 М NaCl, 0,05 М фосфатным буфером pH 7,4.

Элюирование РЭА с иммуносорбента осуществляли 0,1 М глицин-HCl pH 2,2 со скоростью 4 мл/( $\text{cm}^2 \cdot \text{ч}$ ). Фракции по 1 мл собирали в 0,5 мл 0,25 М фосфатного буфера pH 7,4. Фракции, содержащие РЭА (рис. 1), объединя-

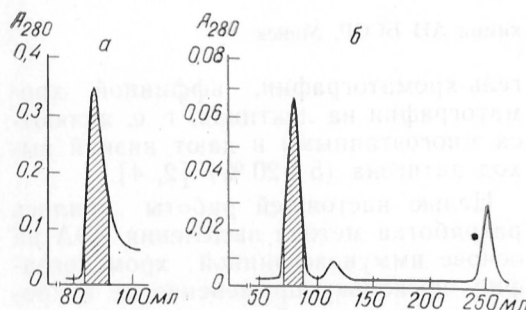


Рис. 1. Иммуноаффинная хроматография экстракта из опухолевой ткани на колонке с анти-РЭА-IgG-сефарозой 4В (а) (участок промывки колонки не показан) и гель-хроматография препарата РЭА на колонке с сефадексом G-200 (б).

Заштрихованные области — объединенные фракции, содержащие РЭА; оптическую плотность элюируемых растворов измеряли с помощью УФ-детектора «Uvicord S II» (LKB, Швеция).

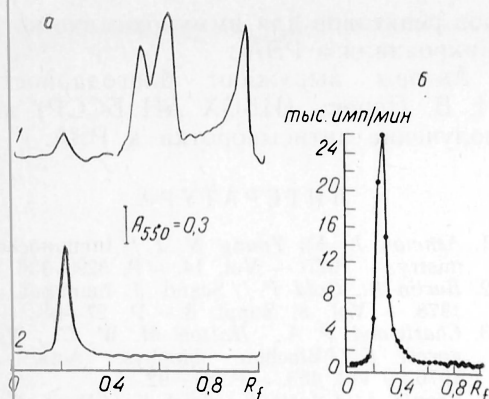


Рис. 2. Денситометрическое сканирование (а) электрофореграмм экстракта из опухолевой ткани (1) и конечного препарата РЭА (2) и иммунная реплика меченного  $^{125}\text{I}$  конечного препарата РЭА (б).

Электрофорез проводили в 7 % полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (загрузка геля: экстракт — 150 мкг белка, РЭА — 70 мкг). Иммунную реплику получали после электрофореза  $^{125}\text{I}$ -РЭА в 7 % полиакриламидном геле с помощью иммобилизованных на нитро-целлюлозе антител к экстракту из опухолевой ткани. РЭА йодировали по методу [7].

ли, концентрировали ультрафильтрацией и диализировали сначала против дистиллированной воды, а затем против 0,01 М фосфатного буфера pH 7,4, содержащего 0,5 М NaCl и 0,03 %  $\text{NaN}_3$ .

В эксперименте с  $^{125}\text{I}$ -РЭА было показано, что при используемых условиях с иммуносорбента элюируется 75—80 % адсорбированного РЭА. Иммуносорбент после регенерации может быть использован многократно.

По данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия препарат РЭА после иммуноаффинной хроматогра-

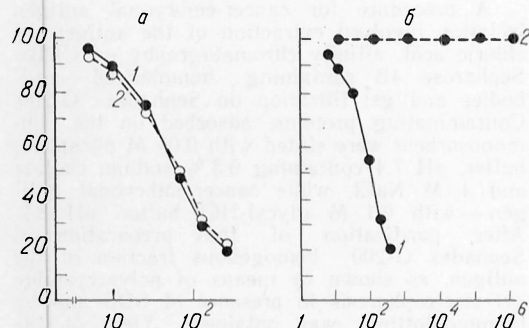


Рис. 3. Сравнение препарата РЭА из набора рино-РЭА- $^{125}\text{I}$  (1) и выделенного препарата РЭА (2) в радиоиммунологическом анализе (а) и ингибирование связывания  $^{125}\text{I}$ -РЭА с анти-РЭА IgG препаратами (б) РЭА (1) и  $\alpha_1$ -КГ (2).

По осям абсцисс — РЭА, иг/мл; по осям ординат — % связанного  $^{125}\text{I}$ -РЭА.

#### Выделение РЭА

Стадия выделения	Белок, мг	РЭА, мг	Выход, %
Гомогенат*	950	20	100
$\text{HClO}_4$ -экстракт	84	12,8	64
Анти-РЭА IgG-сефароза 4В	15	9,6	48
Сефадекс G-200	—	7,8	39

\* На 25 г опухолевой ткани.

фии содержал примеси белков, в связи с чем полученный препарат РЭА дополнительно очищали геле-хроматографией.

Объединенную фракцию (1,5 мл), содержащую РЭА, наносили на колонку (1,5×120 см) с сефадексом G-200, уравновешенную 0,01 М фосфатным буфером pH 7,4, содержащим 0,5 М NaCl и 0,03 %  $\text{NaN}_3$ , и проводили элюирование этим же буфером со скоростью 6 мл/(см<sup>2</sup>·ч). Хроматографический профиль элюции белков представлен на рис. 1. Фракции, содержащие РЭА, объединяли, концентрировали ультрафильтрацией, диализировали против дистиллированной воды и лиофилизировали.

Полученный после геле-хроматографии препарат РЭА гомогенен по данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и иммуноблоттинга (рис. 2).

Радиоиммунологическим анализом показана иммунологическая идентичность выделенного препарата РЭА и препарата РЭА, используемого при изготовлении набора рино-РЭА- $^{125}\text{I}$ . Кривые ингибирования связывания  $^{125}\text{I}$ -РЭА с анти-РЭА-IgG двумя препаратами РЭА практически совпадают (рис. 3).

В разработанном методе выделения РЭА выход антигена составляет ~40 % (см. таблицу), что значительно превышает выход РЭА в стандартных методах выделения [2, 4].

В работах [1, 12] также описано выделение РЭА на иммуносорбентах с высоким выходом белка, однако следует отметить, что в данных работах элюирование РЭА с иммуносорбентов проводили в жестких условиях — высокими концентрациями хаотропных агентов, 8 М мочевиной в



6,5 М муравьиной кислоте рН 2,1. Такие условия обработки РЭА могут повлиять на сохранность его нативных свойств. В разработанном же методе элюирование РЭА с иммуносорбента проводят при низком рН, при котором молекулы РЭА достаточно стабильны [10].

В работе [9] был описан метод выделения РЭА, включающий очистку РЭА на антителах к  $\alpha_1$ -КГ, иммобилизованных CNBr-сефарозе 4В. Если действительно реализуется возможность использования антител к  $\alpha_1$ -КГ для иммуноаффинной очистки РЭА, то это давало бы возможность более широкого применения иммуноаффинной хроматографии для выделения РЭА, поскольку  $\alpha_1$ -КГ в отличие от РЭА — легкодоступный белок, и проблема получения больших количеств антисыворотки для приготовления иммуносорбента была бы легко решена.

Для проверки возможности реализации данного подхода мы сравнили иммунологические свойства РЭА и  $\alpha_1$ -КГ. Как видно из рис. 3, б,  $\alpha_1$ -КГ (3 разных препарата) не конкурирует с меченым РЭА за связывание с анти-РЭА-IgG (антисыворотка к РЭА не адсорбировалась белками сыворотки крови человека). Антисыворотка к  $\alpha_1$ -КГ не связывала  $^{125}$ I-РЭА. Полученные результаты не подтвердили наличия иммунологического сходства РЭА и  $\alpha_1$ -КГ, а, следовательно, и возможности применения антител к  $\alpha_1$ -КГ для очистки РЭА.

Таким образом, проведенные исследования показали, что иммуноаффинной хроматографией экстракта из опухоли ткани на анти-РЭА-IgG-сефарозе 4В с элюированием неспецифически адсорбированных белков 0,05 М фосфатным буфером рН 7,4, содержащим 0,3 % холат натрия и 1 М NaCl, и элюированием РЭА 0,1 М глицин-HCl рН 2,2, можно после дополнительной очистки препарата РЭА гель-хроматографией на сефадексе G-200 получать высокоочищенный препарат РЭА с выходом ~40 %. Данный метод может быть применен в технологическом процессе производства набо-

ров реактивов для иммунохимического микроанализа РЭА.

Авторы выражают благодарность Н. В. Пивень (ИБОХ АН БССР) за получение антисыворотки к РЭА.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ashman L. K., Young N. J. // *Immunochemistry*. — 1977. — Vol. 14. — P. 329—336.
2. Burtin B., Gold P. // *Scand. J. Immunol.* — 1978. — Vol. 8, Suppl. 8. — P. 27—38.
3. Charlwood P. A., Hatton M. W. C., Regoezi E. // *Biochim. biophys. Acta*. — 1976. — Vol. 453. — P. 81—92.
4. Krantz J., Leferte S., Ariel N. // *Meth. Enzymol.* — 1982. — Vol. 84. — P. 32—48.
5. Laemmli U. K. // *Nature*. — 1970. — Vol. 227. — P. 680—685.
6. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // *J. biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
7. Marchalonis J. J. // *Biochem. J.* — 1969. — Vol. 113. — P. 299—305.
8. Mayes E. L. V. // *Meth. Molec. Biol.* — 1984. — Vol. 1. — P. 13—20.
9. Ochi Y., Fujiyama Y., Hosoda S. et al. // *J. immunol. Meth.* — 1982. — Vol. 52. — P. 213—221.
10. Rogers G. T. // *Biochim. biophys. Acta*. — 1983. — Vol. 695. — P. 227—249.
11. Towbin H., Gordon J. // *J. immunol. Meth.* — 1984. — Vol. 72. — P. 313—340.
12. Viento M., Engvall E., Rouslahti E. // Иммуносорбенты в очистке белков: Пер. с англ. — М., 1979. — С. 123—128.

Поступила 02.11.88

#### ISOLATION OF CANCER-EMBRYONAL ANTIGEN BY MEANS OF IMMUNOAFFINITY CHROMATOGRAPHY

A. I. Stcherban, L. V. Lukashevich, S. I. Marchuk, E. A. Nezhinets

Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Minsk

A procedure for cancer-embryonal antigen isolation involved extraction of the antigen by chloric acid, affinity chromatography on CNBr-Sephrose 4B containing immobilized antibodies and gel filtration on Sephadex G-200. Contaminating proteins, adsorbed on the immunosorbent were eluted with 0.05 M phosphate buffer, pH 7.4 containing 0.3 % sodium cholate and 1 M NaCl, while cancer-embryonal antigen — with 0.1 M glycyl-HCl buffer, pH 2.2. After purification of the preparation on Sephadex G-200 homogenous fraction of the antigen, as shown by means of polyacrylamide gel electrophoresis in presence of SDS and by immunoblotting, was obtained. Yield of the antigen was about 40 %.

А. Г. Меркулов, О. П. Шевченко

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ  
ЛАКТОФЕРРИНА В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ

НИИ трансплантологии и искусственных органов Минздрава СССР, Москва

Лактоферрин (Лф) — железосвязывающий гликопротеид (молекулярная масса 80 000 Д), обнаруженный в секретах ряда эндокринных желез человека и животных и являющийся компонентом специфических гранул полинуклеарных лейкоцитов [5]. Данные о содержании в сыворотке крови биологической роли Лф разноречивы, несомненно участие в бактерицидной и бактериостатической функциях [4, 15], регуляции гуморальных и клеточных иммунологических реакций [9, 10], противовоспалительных процессах [8], воздействии на систему комплемента [15], регуляции гранулоцитопозеза [8], активности моноцитов, макрофагов и нейтрофилов [16] и др. Широкий спектр его функциональных проявлений, резкие изменения уровня в сыворотке крови при ряде патологических состояний [7, 11], способность к комплексообразованию с другими белками и наличие рецепторов к нему у клеток крови [14, 17] обусловили наш интерес к Лф как к универсальному диагностическому показателю и возможному лиганду биоаффинного сорбента [1].

Содержание Лф в сыворотке крови определяют с помощью иммунодиффузионного анализа, пригодного, однако, лишь для высоких концентраций белка, а также с помощью радиоиммунологического [12, 19] и иммуноферментного [6] методов. Целью настоящей работы явилась разработка метода количественного определения Лф на основе «сэндвич-модификации» иммуноферментного анализа, а также апробация метода в процессе определения Лф у доноров (в сыворотке и плазме крови) и кардиохирургических больных.

## Методика

Источником получения Лф служило молоко здоровых родильниц, содержащее его в наиболее высокой концентрации (15—25 мг%). Для выявления антигенов использовали модифицированный метод двойной иммунодиффузии [3], иммуноэлектрофорез (ИЭФ), пе-

рекестный ИЭФ, диск-электрофорез в полиакриламидном геле с иммунопроявлением.

На I этапе выделения получали грубую фракцию белков, обогащенную Лф. Молозиво обезжиривали путем центрифугирования при 6000 об/мин в течение 1 ч, подкисляли до pH 4,0 уксусной кислотой, выдерживали 6 ч при 37 °C, центрифугировали 4 ч при 6000 об/мин для удаления казеинов, нейтрализовали трисом до pH 7,0. Полученную «сыворотку» концентрировали и грубо разделяли на мембранах Synpro (ЧССР) (0,025, 0,012, 0,0001 мк) под давлением азота 6 атм, заменяя этим широко распространенное переосаждение белков. Лф-содержащий продукт наносили на колонку 60×4,5 см, заполненную сефадексом G-200, рабочий буфер — 0,1 М трис-HCl, содержащий 0,05 М NaCl, pH 8,0, скорость потока 1,5 мл/ч. Содержание Лф на всех этапах контролировали иммунохимически (рис. 1). Фракции 10—24 собирали, диализовали против 0,02 М фосфатного буфера pH 6,0, подвергали ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-А50 («Pharmacia», Швеция), колонка 20×2,5 см. Стартовый буфер фосфатный pH 6,0. Обогащенный Лф материал собирали и подвергали последовательно дальнейшей очистке на КМ-целлюлозе и CM-Sephadex C-50 («Pharmacia», Швеция). Стартовый буфер ацетатный, pH 5,2. Элюировали с КМ-целлюлозы ступенчато, сначала ацетатным буфером, 0,008 М, pH 6,0, затем 0,1 М фосфатным, 0,2 М NaCl, pH 9,0. Последний элюат (титр Лф 1:16) наносили на CM-Sephadex C-50, после предварительного диализа против ацетатного буфера 0,01 М pH 5,0. Элюацию проводили линейным градиентом pH от 5,4 до

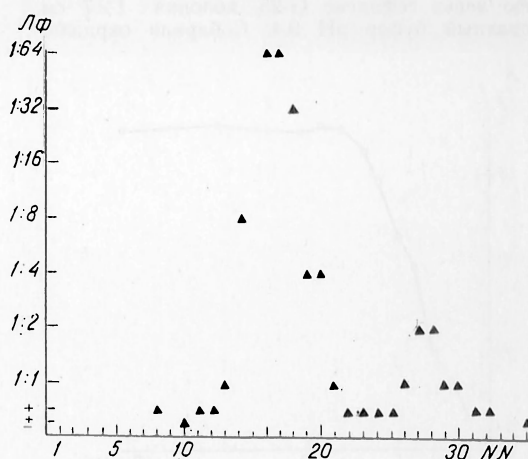


Рис. 1. Иммунохимический контроль концентрации лактоферрина (Лф) при гель-фильтрации.

По оси абсцисс — номера фракций; по оси ординат — титр Лф в анализируемых фракциях.

8,2 в фосфатном буфере. Фракции, обогащенные Лф, собирали, диализовали и лиофилизировали. Все этапы хроматографического выделения проводили при 4 °С.

Получение очищенного препарата Лф позволило использовать его в качестве лиганда специфического иммуносорбента. В качестве носителя использовали CN-Вг-сефарозу («Pharmacia», Швеция), концентрацию Лф 5 мг на 1 г сефарозы, рабочий буфер 0,1 М  $\text{NaHCO}_3$ . В последующем использовали колонку 0,6X6 см с Лф-сефарозой, уравновешенную 0,02 М фосфатно-солевым буфером с 0,05 М  $\text{NaCl}$ .

Олигоспецифическая антисыворотка к белкам молозива была получена путем иммунизации кроликов промежуточными продуктами выделения Лф. Иммунизацию осуществляли 3 инъекциями с интервалом 7 дней (суммарная доза по белку 100 мг). Ресимунизацию проводили через 1 мес, кровь брали через 6—8 дней после ресимунизации. Через колонку с Лф-сефарозой пропускали избыточный объем антисыворотки многократно в течение 2 ч. Затем колонку отмывали уравнивающим буфером до исчезновения следов белка. Элюцию проводили 0,2 М глицин- $\text{HCl}$  pH 2,8, нейтрализовали до pH 7,4 1 М трисом, диализовали против боратного буфера pH 9,4. Специфичность полученных антител была проверена в реакциях иммунодиффузии, где не отмечали наличия антител к другим плазменным и лейкоцитарным белкам, кроме Лф. Активность антител контролировали также в реакциях иммунофлуоресценции. Козья антисыворотка против плазменных белков кролика в иммунодиффузии приводила к образованию лишь 1 дуги преципитации. Антитела для конъюгации были сконцентрированы до 2—5 мг на 1 мл белка.

При конъюгировании использовали перийодатный метод; пероксидаза («Sigma», США) имела RZ 3,2. Соотношение пероксидаза:белок:  $\text{NaIO}_4$  было 1:1:2. К раствору пероксидазы (5 мг/0,5 мл бидистиллята) добавляли соответствующее количество  $\text{NaIO}_4$ , инкубировали 1 ч при 4 °С. Добавляли смесь в препарат антител и сразу же проводили гель-фильтрацию через сефадекс G-25, колонка 1X7 см, боратный буфер pH 9,4. Собирали окрашен-

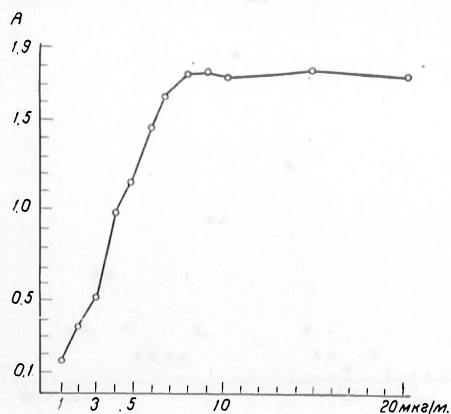


Рис. 2. Оптимизация концентрации антител для сенсibilизации планшетов.

По оси абсцисс — концентрация белка (мкг/мл); по оси ординат — оптическая плотность при 492 нм (здесь и на последующих рисунках).

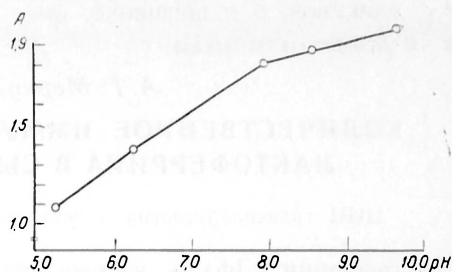


Рис. 3. Оптимизация pH основного буфера.

ную в оранжевый цвет узкую зону, освобождаясь при этом от  $\text{NaIO}_4$ , причем получающееся разведение не превышало 10 %. Реакционную смесь выдерживали 1,5 ч при 4 °С. Если концентрация белка была меньше 4 мг/мл, длительность реакции увеличивали до нескольких часов. Реакцию останавливали  $\text{NaBH}_3$  (60 мг/мл бидистиллята) из расчета  $1/20$  от количества белка. По истечении 15 мин еще раз добавляли  $\text{NaBH}_3$  в таком же количестве, инкубировали 0,5 ч при 4 °С. От избытка  $\text{NaBH}_3$  освобождались при помощи хроматографии на гидроксипатите (ГА) (колонка 1X0,7 см), pH реакционной смеси доводили до 7,0 раствором 1 М ацетатного буфера. Иммуноглобулины связываются с ГА в узкой зоне, окрашенной в оранжевый цвет. Промывали несколько раз бидистиллятом, элюировали 0,5 М фосфатным буфером pH 9,0. В полученный конъюгат добавляли бычий сывороточный альбумин до конечной концентрации 10 мг/мл и хранили при 4 °С.

Полученные антитела использовали для сенсibilизации полистироловых планшетов («Dynatech», ФРГ и Медполимер). Антитела вносили в боратном буфере, 0,01 М, pH 9,5, по 100 мкл, содержание белка 5 мкг/мл. Планшеты инкубировали 18 ч при 4 °С, затем 4-кратно отмывали фосфатно-солевым буфером с 0,05 % триптоном X-100. В лунки вносили образцы плазмы либо сыворотки в разведениях 1:20, 1:50, 1:100 в фосфатно-солевом буфере с триптоном X-100. Вносили 2 параллельных разведения образцов по 100 мкл. Инкубировали 0,5 ч при 37 °С. После отмывки вносили по 100 мкл субстратной смеси, состоящей

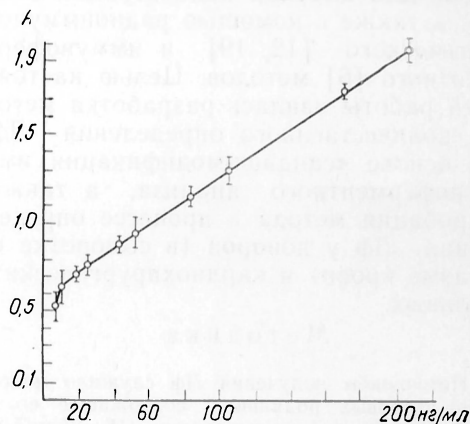


Рис. 4. Калибровочная кривая иммуноферментного определения Лф.

По оси абсцисс — концентрация Лф (нг/мл).

Содержание Лф в сыворотке крови в норме и после применения искусственного кровообращения (ИК)

Группа обследованных	Число образцов	Содержание Лф, мкг/мл ( $M \pm m$ )	$p$ по сравнению с нормой
Здоровые доноры	52	$2,02 \pm 0,3$	—
Больные:			
перед применением ИК	6	$2,0 \pm 0,2$	$> 0,5$
после 5 мин ИК	6	$1,6 \pm 0,21$	$> 0,5$
после 30 мин ИК	5	$1,64 \pm 0,15$	$> 0,5$
после 1—3 ч ИК	10	$1,65 \pm 0,15$	$> 0,5$
через 1—3 сут после ИК	6	$1,1 \pm 0,16$	$< 0,5$
Донорская кровь (плазма):			
2—4 ч хранения	5	$1,8 \pm 0,17$	
5—8 ч       »	7	$1,6 \pm 0,17$	
12—27 ч     »	4	$1,9 \pm 0,15$	

из 0,01 % ортофенилендиамина в 0,05 М цитратном буфере и 0,002 % раствора  $H_2O_2$  pH 4,8. После 15 мин инкубации при комнатной температуре реакцию останавливали, добавляя в лунки по 50 мкл 50 %  $H_2SO_4$ . Интенсивность окраски измеряли при 492 нм. Калибровочную кривую строили, используя стандарт Лф («Boehringerwerke», ФРГ) 0,035 мг/мл. Для разведения использовали фосфатно-солевой буфер с 0,05 % тритоном X-100, pH 7,4. Калибровочную кривую, используемую для определения содержания Лф, воспроизводили на каждой планшете.

### Результаты и обсуждение

В процессе выделения получен очищенный и сконцентрированный препарат Лф, электрофоретический анализ которого показал его гомогенность. Использование нескольких ионообменных колонок позволило отказаться от аффинной хроматографии, упростить процедуру выделения, свести к минимуму процент денатурированного Лф. Чистота Лф выше 98 %.

В ходе апробации метода подбирали оптимальные концентрации конъюгата, антител, субстратной смеси, разведения образцов. Для определения рабочей концентрации конъюгата строили серию калибровочных кривых при различных разведениях конъюгата. За оптимальное выбирали такое разведение, при котором экстинкция раствора в лунке с максимальной концентрацией Лф равна 1,9. Оптимальным было разведение 1 : 1000—1 : 1400.

Из рис. 2 видно, что увеличение концентрации антител выше 5—7 мкг/мл не сказывается на чувствительности метода, так как кривая выходит на плато. Это свидетельствует о полном насыщении гидрофобных связей поли-

стирола антителами при указанной концентрации.

Исследование влияния pH на количество сорбирующихся антител (рис. 3) показало, что оптимальным является диапазон pH 8,0—10,0; был выбран буфер с pH 9,4, позволяющий достичь наиболее интенсивной окраски. При дальнейшем увеличении pH буфера отмечали рост уровня неспецифической реакции.

При построении калибровочной кривой в результате анализа серий кривых был выбран участок линейной зависимости величин экстинкции от количества Лф. Максимальная концентрация Лф 200 нг/мл, с ее превышением кривая выходит на плато (рис. 4). Для выбора оптимального разведения образцов были исследованы 52 сыворотки крови доноров. Диапазон колебаний концентраций Лф в них составил 0,5—3,3 мкг/мл со средним значением  $2,02 \pm 0,3$  мкг/мл. Экспериментально были подобраны разведения 1 : 20, 1 : 50, 1 : 100, где экстинкции большинства исследуемых образцов соответствуют линейному участку калибровочной кривой и максимально перекрывают диапазон колебаний концентраций Лф в образцах. Задачей ставилось попадание как минимум 2 разведений в линейный участок для последующего получения среднего значения. Полученные значения концентраций Лф несколько отличаются от сообщаемых в литературе [6, 12, 19], что, возможно, объясняется использованием различных стандартов или особенностями доноров.

В таблице представлены результаты по апробации тест-системы для опре-



деления содержания Лф в сыворотке крови больных, а также в сыворотке (или в плазме) крови здоровых доноров. Предполагалось, что уровень Лф в плазме может отражать свойства и качество применяемой донорской крови, так как концентрация Лф часто возрастает после некоторых воздействий на кровь, что, возможно, происходит при разрушении лейкоцитов. Как видно из таблицы, при хранении донорской крови до 27 ч достоверного увеличения уровня Лф не наблюдается. Это, по-видимому, свидетельствует о стабильности лейкоцитов при хранении.

Исследованию были подвергнуты сыворотки кардиохирургических больных, оперированных по поводу протезирования клапанов сердца в условиях искусственного кровообращения (ИК). Отсутствие значительных колебаний уровня Лф могло бы свидетельствовать о щадящем действии на кровь оперативных мероприятий. Мы не отметили достоверного изменения уровня Лф (см. таблицу), что согласуется с ранее выдвинутыми предположениями [2]. Дальнейшее изучение Лф в сыворотке и плазме крови больных представляет интерес для диагностики и изучения молекулярных механизмов участия лейкоцитов в патологических процессах.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Меркулов А. Г., Шевченко О. П., Дмитриев А. А. // Хроматография в биологии и медицине. — М., 1986. — С. 115—116.
2. Шумаков В. И., Шевченко О. П., Саитгареев Р. Ш. // Трансплантация и искусственные органы. — М., 1986. — С. 164—168.
3. Храмова Н. И., Абелев Г. И. // Бюл. экспер. биол. — 1961. — № 12. — С. 107—111.
4. Arnold R., Gold M., McGhee J. // Science. — 1977. — Vol. 197. — P. 263.
5. Baggiolini M., DeDuve S., Masson P., Heremans J. // J. exp. Med. — 1970. — Vol. 131. — P. 559—570.
6. Beunette R. M., Mohla C. // J. Lab. clin. Med. — 1976. — Vol. 88. — P. 156—166.

7. Broun R. D., Guen E., Rickard K. A. et al. // Blut. — 1986. — Bd 52. — S. 289.
8. Broxmeyer H. E., De Sousa M., Smithyman A. // Blood. — 1980. — Vol. 55. — P. 324.
9. Duncan R. L., McArthur W. P. // Cell. Immunol. — 1981. — Vol. 63. — P. 308.
10. Fletcher J., Willars J. // Blood Cells. — 1986. — Vol. 11. — P. 447.
11. Guttentberg T. J., Haneberg B., Jorgensen T. // Clin. chim. Acta. — 1984. — Vol. 136. — P. 173—178.
12. Hansen N., Malouquist J., Thorell J. // Acta med. scand. — 1975. — Vol. 198. — P. 437—443.
13. Kijlstra A., Jeurissen H. M. // J. Immunol. — 1982. — Vol. 44. — P. 263.
14. Maneva A. J., Sirakov L. M., Manev V. // Int. J. Biochem. — 1983. — Vol. 15. — P. 981—984.
15. Masson P. L., Heremans J. F., Frignot J. J., Wauters J. // Thorax. — 1966. — Vol. 21. — P. 538.
16. Nishiya K., Horwitz D. A. // J. Immunol. — 1982. — Vol. 129. — P. 251.
17. Park L. S., Friend D., Gillis S., Urdall D. L. // J. biol. Chem. — 1986. — Vol. 261. — P. 205.
18. Reiter B. // Int. J. Tissue React. — 1983. — Vol. 5. — P. 87.
19. Runke P., Visser D., Kwa H. Q., Hart A. // Folia med. neth. — 1971. — Vol. 14. — P. 156—168.

Поступила 12.11.88

#### QUANTITATIVE IMMUNOENZYMATIC ESTIMATION OF LACTOFERRIN IN BLOOD SERUM AND PLASMA

A. G. Merkulov, O. P. Shevchenko

Institute of Transplantology and Artificial Organs, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

A procedure for quantitative estimation of lactoferrin is developed using the "sandwich" type of immunoenzymatic assay. Preparation of lactoferrin was purified from women colostrum by means of ion exchange chromatography; the sorbent (a ligand-containing complex of lactoferrin) was synthesized; the antibody conjugate against lactoferrin and peroxidase from horseradish was prepared; optimal conditions of the immunoenzymatic assay were selected. Concentration of lactoferrin in donor blood serum or plasma constituted 0.5-3.3 mg/ml; distinct alterations of the lactoferrin content were not found in blood of patients maintained on artificial circulation or in the blood used for transfusion.

В. В. Бычкова, А. Е. Берман

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА КОЛЛАГЕНОВЫХ БЕЛКОВ С ПОМОЩЬЮ БИОСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ХРОМАТОГРАФИИ НА СОРБЕНТЕ С КОЛЛАГЕНСВЯЗЫВАЮЩИМ ФРАГМЕНТОМ ФИБРОНЕКТИНА

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Традиционные способы выделения и очистки коллагенов разработаны для тканей с относительно высоким содержанием этих белков и состоят, как правило, из нескольких этапов (экстракция в кислых и нейтральных буферных растворах, солевое переосаждение, ионообменная хроматография, гель-фильтрация и др.) [10], на каждом из которых возможны существенные потери материала. Выделение коллагеновых белков из объектов с невысоким содержанием этих полимеров (например, так называемых «минорных» коллагенов или радиоактивно меченных коллагенов при изучении их метаболизма в различных условиях) требует разработки менее громоздких и в то же время достаточно специфических подходов.

Один из таких подходов разработан в настоящем исследовании. Метод основан на специфическом сродстве коллагенов различных типов к одному из пептидных фрагментов фибронектина — коллагенсвязывающему пептиду (КСП), иммобилизация которого на твердом носителе позволяет получить сорбент, обеспечивающий одноэтапную и эффективную очистку коллагена с помощью биоспецифической хроматографии.

### Методика

Выделение фибронектина из сыворотки крови крупного рогатого скота или человека осуществляли с помощью биоспецифической хроматографии на иммобилизованной желатине (желатин-сефарозе) по описанному методу [8]. Для протеолитического фрагментирования к раствору фибронектина в 0,05 М трис-НСl-буфере (рН 8,0; концентрация белка 1 мг/мл) добавляли раствор трипсина до конечной концентрации 10 мкг/мл и смесь инкубировали 45 мин при 37 °С. Протеолиз останавливали добавлением раствора соевого ингибитора трипсина и фенилметилсульфонилфторида до конечных концентраций соответственно 100 мкг/мл и  $10^{-4}$  М. Раствор диализовали против 0,05 М трис-НСl-буфера (рН 7,6), содержащего 0,1 М NaCl (буфер I), и проводили

выделение КСП с помощью хроматографии на желатин-сефарозе по той же схеме, что и в случае с нативным фибронектином.

Для иммобилизации КСП на BzCN-активированной сефарозе 10 мл геля активированной сефарозы смешивали с равным объемом раствора КСП в 0,1 М NaHCO<sub>3</sub> (рН 8,5), содержащего 0,5 М NaCl (концентрация белка 1,5—2,0 мг/мл), и смесь перемешивали 4 ч при комнатной температуре. Для блокировки имидокарбонатных групп, не вступивших в реакцию, к смеси добавляли этаноламин до 2 М (рН 8,5) и перемешивали 2 ч. Несвязавшийся блок удаляли промыванием геля буфером I до отсутствия в элюате оптической плотности  $A_{260}$ .

Для выделения радиоактивно меченных белков куриных эмбрионов в воздушный мешок 10-дневных эмбрионов вводили 200 мкл смеси <sup>14</sup>C-глицина и <sup>14</sup>C-пролина (по 20 мкКи каждой аминокислоты с удельной радиоактивностью соответственно 100 и 200 мКи/ммоль) и инкубировали 5 ч при 37 °С. Эмбрионы гомогенизировали в 0,05 М трис-НСl-буфере (рН 7,6), центрифугировали при 14 000 об/мин для осаждения ядер и митохондрий и из надосадочной жидкости осаждали белки при 60 % насыщения сульфата аммония. Белковый осадок растворяли в 5—10 мл буфера I, прогревали при 50 °С для денатурации коллагеновых белков, охлаждали до комнатной температуры, небольшое количество преципитирующих белков удаляли центрифугированием и надосадочную жидкость использовали для выделения радиоактивного коллагена с помощью хроматографии на КСП-сефарозе.

Культивирование фибробластов эмбриона человека (штаммы 814 и 845, полученные в Институте медицинской генетики АМН СССР) проводили, как описано ранее [1]. Использовали культуры, находящиеся в стационарной стадии роста. Для промывания белков в культуру после замены среды, содержащей сыворотку, на бессывороточную среду, содержащую аскорбиновую кислоту (50 мкг/мл) и β-аминопропионитрил (50 мкг/мл), добавляли 125 мкКи <sup>3</sup>H-пролина (50—60 мКи/ммоль; «Amersham», Англия) и инкубировали 24 ч. Клетки несколько раз ополаскивали буфером I, растворяли в 1—2 мл 0,2 М NaOH, добавляли 5 мл буфера I и доводили рН до 7,6. Полученный препарат использовали для хроматографии на КСП-сефарозе.

Выделение тотального препарата полирибосом из 10-дневных куриных эмбрионов и постановку бесклеточной системы белкового синтеза, содержащей указанные полирибосомы, проводили по описанным методам [2, 4]. После инкубации с <sup>3</sup>H-пролином в систему добавляли пуромидин («Calbiochem», США) до ко-

Таблица 1

Выделение и очистка коллагена из препарата тотальных радиоактивно меченных белков 10-дневных куриных эмбрионов с помощью хроматографии на КСП-сефарозе

№ опыта	Содержание расщепляемых коллагеназой белков, %	
	в исходном материале	в элюате с КСП-сефарозы
1	13,8	80,0
2	12,0	78,0
3	22,0	93,0
4	19,0	91,0
5	20,0	89,0
6	12,0	89,0
7	13,0	78,0

Примечание. В опытах № 3, 4 и 5 элюцию радиоактивных белков проводили нерадиоактивным коллагеном; в опытах № 6 и 7 белки метили  $^{14}\text{C}$ -аминокислотным гидролизатом.

печной концентрации 1 мМ и смесь инкубировали 20 мин. Рибосомный материал осаждали центрифугированием при 150 000 g в течение 3 ч. При этом полипептидные цепи, связанные с пуромицином, остаются в надосадочной жидкости. Их собирали, разводили в 5 раз буфером I и использовали для хроматографии на КСП-сефарозе. С этой целью через колонку с 5 мл КСП-сефарозы пропускали анализируемые белки в буфере I со скоростью 5 мл/ч. Несвязавшиеся радиоактивные соединения удаляли элюцией буфером I, а связавшиеся белки элюировали 0,5 М уксусной кислотой. В некоторых опытах связавшиеся радиоактивные коллагеновые белки элюировали раствором нерадиоактивного коллагена типа I или III (концентрация коллагена 1 мг/мл).

Выделение высокоочищенных препаратов бактериальной коллагеназы и постановку коллагеназной реакции проводили по описанным методам [3]. Электрофорез белков в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) осуществляли, как описано ранее [9].

### Результаты и обсуждение

Для оценки эффективности очистки коллагена с помощью биоспецифической хроматографии на иммобилизованном КСП были использованы в качестве исходного материала объекты, характеризующиеся невысоким содержанием коллагеновых белков, в частности препараты тотальных радиоактивно меченных белков куриных эмбрионов. Ранее было установлено, что содержание радиоактивного коллагена в указанном материале в случае мечения белков радиоактивным пролином не превышает 10—15 % от общей белковой радиоактивности [7].

Как следует из табл. 1, исходная смесь радиоактивных белков содержит 12—20 % расщепляемых коллагеназой полипептидов, что соответствует результатам цитированной выше работы. После хроматографии исходной смеси на КСП-сефарозе и удаления несвязавшихся радиоактивных соединений элюцию связавшихся белков осуществляли 0,5 М уксусной кислотой. Содержание расщепляемых коллагеназой полипептидов в элюате составило около 80 %, т. е. было в 4—6 раз выше, чем в исходном растворе.

В большинстве опытов, результаты которых представлены в табл. 1, в качестве радиоактивных предшественников использовали пролин и глицин. Содержание этих аминокислот в коллагене существенно выше, чем в неколлагеновых белках, что позволяет добиться более высокой удельной радиоактивности коллагена в смеси радиоактивных белков. В то же время можно было предположить, что высокое содержание расщепляемых коллагеназой полипептидов в элюате обусловлено не эффективностью очистки коллагена, а различиями в удельной радиоактивности коллагена и не расщепляемых коллагеназой неколлагеновых белков. Для проверки такой возможности в некоторых опытах мечение белков осуществляли введением в эмбрионы

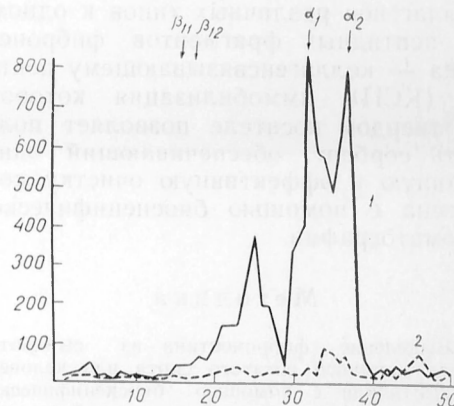


Рис. 1. Электрофорез в ПААГ радиоактивных белков из 10-дневных куриных эмбрионов, выделенных с помощью хроматографии на КСП-сефарозе.

По оси абсцисс — номера фракций, по оси ординат — радиоактивность (в имп/мин); 1 — белки перед электрофорезом не обработаны, 2 — белки обработаны бактериальной коллагеназой. Стрелки указывают положение  $\alpha$ -цепей и  $\beta$ -компонентов нерадиоактивного коллагена типа I, использованного в качестве свидетеля. Электрофорез проводили в трубках 7 % полиакриламидного геля, отдельные срезы геля растворяли в  $\text{H}_2\text{O}_2$  в присутствии 0,2 н. NaOH и определяли радиоактивность в сцинтилляционном счетчике.

гидролизата радиоактивно меченных белков, содержащего полный набор аминокислот. Из табл. 1 видно, что в этом случае содержание радиоактивных коллагеновых пептидов и в исходном материале, и в элюате такое же, как и в случае мечения пролином и глицином.

Доказательство высокой степени очистки коллагеновых белков было получено в опытах, в которых проводили элюцию связавшихся с КСП радиоактивных пептидов «специфическим» элюентом — нерадиоактивным коллагеном, т. е. путем конкурентного вытеснения связавшегося радиоактивного коллагена. В этом случае содержание в элюате расщепляемых коллагеназой радиоактивных белков составляет около 90 %, что несколько выше, чем при элюции уксусной кислотой (см. табл. 1). Использование конкурентной элюции в случае выделения радиоактивного коллагена, помимо высокой избирательности (и, следовательно, высокой очистки), имеет и другое преимущество. Оно удобно в тех условиях, когда нежелательно применение нефизиологических условий (высокая ионная сила, низкие значения pH, денатурирующие агенты и др.).

Таким образом, полученные результаты показывают, что с помощью одного этапа очистки — биоспецифической хроматографии на иммобилизованном КСП — удастся получить материал, практически полностью представленный коллагеновыми полипептидами.

Для более детальной характеристики очищенного коллагенового материала, в частности, для выяснения вопроса о возможной его деградации в ходе выделения, был проведен электрофоретический анализ полученных пептидов. Как видно на рис. 1, на электрофореграмме не обнаруживаются пептиды, не расщепляемые коллагеназой (т. е. полипептиды неколлагеновой природы). Коллагеновые пептиды представлены 3 фракциями, 2 из которых соответствуют по подвижности  $\alpha_1$ - и  $\alpha_2$ -цепям коллагена I типа — преобладающей форме в тотальном гомогенате куриных эмбрионов 9—10-дневного возраста [7]. Количественное соотношение между этими фракциями составляет примерно 2:1, что соответствует коллагену указанного типа (см. рис. 1). Действительно, при хроматографиче-

Таблица 2

Выделение и очистка коллагена из тотальных радиоактивно меченных белков, синтезированных в культуре фибробластов человека (опыты № 1 и 2), и из полипептидов, синтезированных в бесклеточной системе, содержащей полирибосомы из 10-дневных куриных эмбрионов (опыты № 3 и 4), с помощью хроматографии на КСП-сефарозе

№ опыта	Содержание расщепляемых коллагеназой белков, %	
	в исходном материале	в элюате с КСП-сефарозы
1	12,0	70,0
2	15,0	77,0
3	18,0	78,0
4	17,0	74,0

Примечание. Элюцию белков с КСП-сефарозы проводили нерадиоактивным коллагеном.

ском анализе на КМ-целлюлозе радиоактивных пептидов, выделенных из куриных эмбрионов с помощью предлагаемого сорбента, нами были обнаружены в основном  $\alpha_1$ - и  $\alpha_2$ -цепи в указанном соотношении (данные не приведены).

Третья фракция коллагеновой природы, обнаруживаемая на электрофореграмме (см. рис. 1), мигрирует со скоростью, промежуточной между скоростью миграции  $\alpha$ -цепей и  $\beta$ -компонентов, что соответствует мол. массе 150—170 кД. Таким образом, эта фракция вероятно, представлена биосинтетическими предшественниками  $\alpha$ -цепей, а именно, про- $\alpha$ -цепями на различных стадиях процессирования (полномерные предшественники  $\alpha$ -цепей, про- $\alpha$ -цепи, лишённые амино- или карбоксиконцевых пропептидов). На элек-

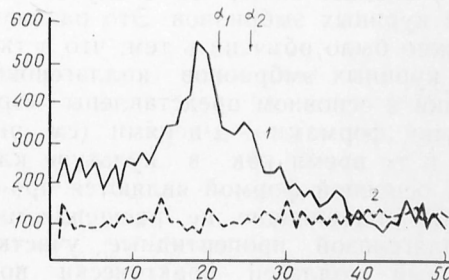


Рис. 2. Электрофорез в полиакриламидном геле радиоактивных белков из культуры эмбриональных фибробластов человека, выделенных с помощью хроматографии на КСП-сефарозе.

Условия электрофореза и обозначения те же, что на рис. 1.



трофореграмме не обнаруживаются низкомолекулярные коллагеновые пептиды, что указывает на отсутствие существенной деградации коллагена в ходе его выделения.

Помимо тотальной ткани куриных эмбрионов, в качестве другого объекта для выделения и очистки коллагена предлагаемым методом были использованы радиоактивные белки, синтезируемые в культуре фибробластов. Ранее нами было показано, что в случае инкубации культуры эмбриональных фибробластов человека с радиоактивным пролином содержание расщепляемых коллагеназой полипептидов в материале, секретируемом клетками в культуральную среду, составляет примерно 50 %, в то время как содержание указанных полипептидов в белках, не секретируемых (остающихся связанными с клетками), не превышает 10—20 % [1]. Было также установлено, что основной формой продуцируемого указанными клетками коллагенового материала являются про- $\alpha$ -цепи коллагена типа I [1]. С учетом указанных особенностей в настоящей работе в качестве исходного материала были использованы белки гомогената фибробластов после инкубации культуры с меченым пролином.

Как видно из табл. 2, содержание расщепляемых коллагеназой полипептидов в исходном продукте составляет 12—15 %, а в элюате после хроматографии — 75 %. Следует отметить, что в этих опытах элюцию связавшегося с сорбентом радиоактивного коллагена осуществляли по конкурентному принципу — нерадиоактивным коллагеном. Таким образом, в этих опытах содержание коллагена в конечном продукте оказалось ниже, чем в случае белков куриных эмбрионов. Это различие можно было объяснить тем, что в ткани куриных эмбрионов коллагеновые белки в основном представлены «зрелыми» формами —  $\alpha$ -цепями (см. рис. 1), в то время как в культуре клеток основной формой являются про- $\alpha$ -цепи, содержащие не расщепляемые коллагеназой пропептидные участки. Зрелый коллаген практически полностью расщепляется бактериальной коллагеназой, в то время как степень расщепления проколлагена не превышает 80 % [6]. Действительно, как видно на рис. 2, основная фракция, обнаруживаемая при электрофорезе выде-

ленных из фибробластов радиоактивных белков, представлена расщепляемыми коллагеназой полипептидами с молекулярной массой, большей, чем у  $\alpha$ -цепей, и соответствующей молекулярной массе про- $\alpha$ -цепей. Отщепляющиеся при коллагеназной обработке пропептиды обладают относительно низкой молекулярной массой и низкой радиоактивностью (поскольку содержат меньше пролина по сравнению с про- $\alpha$ -цепями), в связи с чем на электрофореграмме не обнаруживаются.

В качестве третьего объекта, характеризующегося низким содержанием коллагенового материала, были использованы радиоактивные пептиды, синтезированные в бесклеточной системе, содержащей выделенные из куриных эмбрионов полирибосомы. После инкубации системы с меченым пролином nascетные полипептиды (т. е. синтезированные *de novo* полипептиды, связанные с полирибосомами) освобождались от полирибосом обработкой пуромицином, который образует ковалентную связь с карбоксиконцевой аминокислотой полипептида [5]. Полученные пуромицинсвязанные полипептиды подвергали хроматографии на КСН-сефарозе. Как видно из табл. 2, в этом случае удается добиться столь же эффективной очистки коллагеновых полипептидов, что и при использовании в качестве исходного материала белков, синтезированных в куриных эмбрионах или в культуре фибробластов.

Следует отметить, что применение одноэтапного эффективного метода очистки коллагеновых пептидов, синтезированных в бесклеточных системах, может оказаться целесообразным при анализе продуктов трансляции мРНК коллагенов «минорных» типов, т. е. в случае низкого содержания коллагеновых матриц, когда анализ синтезируемого коллагенового материала с помощью традиционных методов затруднен.

Итак, на основании анализа очистки коллагена с использованием исходного материала, полученного из 3 различных объектов, можно заключить, что предлагаемый метод характеризуется простотой и высокой эффективностью.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Берман А. Е., Морозевич Г. Е., Оборотова Т. А., Мазуров В. И. // Биохимия. — 1987. — Т. 52, № 3. — С. 493—502.

2. Берман А. Е., Оборотова Т. А., Мазуров В. И. // Там же. — 1975. — Т. 40, № 2. — С. 432—440.
3. Берман А. Е., Оборотова Т. А. // Современные методы в биохимии. — М., 1977. — С. 273—276.
4. Берман А. Е., Оборотова Т. А., Тарасова Е. А., Мазуров В. И. // Вopr. мед. химии. — 1983. — № 2. — С. 107—115.
5. Спирип А. С., Гаврилова Л. П. Рибосома. — М., 1971.
6. Breul S. D., Bradley K. H., Hance A. J. et al. // J. biol. Chem. — 1980. — Vol. 255. — P. 5250—5260.
7. Diegelman R. F., Peterkofsky B. // Develop. Biol. — 1972. — Vol. 28. — P. 443—453.
8. Engvall E., Ruoslahti E. // Int. J. Cancer. — 1977. — Vol. 20. — P. 1—5.
9. Laemmli U. K. // Nature. — 1970. — Vol. 227. — P. 680—685.
10. Miller E. J., Rhodes R. K. // Meth. Enzymol. — 1982. — Vol. 82. — P. 33—64.

Поступила 14.11.88

# ISOLATION AND PURIFICATION OF COLLAGEN BY MEANS OF BIOSPECIFIC CHROMATOGRAPHY ON THE SORBENT CONTAINING COLLAGEN-BINDING FRAGMENT OF FIBRONECTIN

V. V. Bychkova, A. E. Berman

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

A new procedure is described for isolation of collagens from various preparations containing small amounts of these proteins. The procedure is based on specific affinity of collagens of various types to one of peptide fragments of fibronectin—collagen-binding peptide (CBP). Collagens were isolated after single-step chromatography of tissue homogenate on the sorbent containing immobilized CBP. High specificity and reproducibility of the procedure was shown when various preparations were used: chicken embryo proteins with total radioactive label, Proteins synthesized in fibroblast culture; polypeptides synthesized in cell-free system of protein synthesis.

## УКАЗАТЕЛЬ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ В ЖУРНАЛЕ ЗА 1989 ГОД

- Айдарханов Б. Б., Локишина Э. А., Ленская Е. Г. Молекулярные аспекты механизма антиокислительной активности витамина Е: особенности действия  $\alpha$ - и  $\gamma$ -токоферолов. 3, 2—9.
- Горошинская И. А. Роль изменения каталитических свойств моноаминоксидазы мозга в ответной реакции организма на экстремальные воздействия (Обзор). 2, 2—10.
- Дайхин Е. И., Федюшкина Н. А., Гусейнов А. Т. Клиническое значение исследования фактора активации тромбоцитов (Обзор). 2, 10—16.
- Доценко В. Л., Яровая Г. А., Пасхина Т. С. Сравнительный анализ методов определения калликреина и прекалликреина в плазме крови человека (Обзор). 6, 13—19.
- Киркель А. З. Аминоксидазы плаценты человека. 1, 11—18.
- Ланкин В. З., Вихерт А. М., Тихазе А. К., Соколяк С. М., Бондарь Т. Н. Роль перекисного окисления липидов в этиологии и патогенезе атеросклероза (Обзор). 3, 18—24.
- Образцов В. В., Гришанова А. Ю., Мишин В. М. Индукция микросомной монооксигеназы полностью фторированными органическими соединениями (Обзор). 3, 9—18.
- Прохоров Г. Г., Писаревский А. М., Николаев Ю. И. Методика редоксметрии в клинических исследованиях. 5, 2—6.
- Сергеев И. Н. Обмен и рецепция витамина D. 1, 2—11.
- Сургучев А. П. Полиморфизм генов человека, методы его выявления и связь с сердечно-сосудистыми заболеваниями (Обзор). 2, 16—23.
- Чулкова Т. М. Роль процессов тромбообразования в атеросклерозе (Обзор). 4, 2—8.
- Шидкин С. С. Проблема построения каталога мембранных белков эритроцитов человека (Обзор). 6, 2—13.

- Абакумова О. Ю., Куценко Н. Г., Карагулян С. Р., Гаврильчак А. В., Шехтер А. Б. Стимуляция синтеза ДНК и РНК в печени гепатэктомированных крыс фракциями цитозоля печени и кондиционированной среды, полученной при культивировании эксплантатов печени крыс. 1, 69—74.
- Агаджанов М. И., Симонян М. А., Казарян Ш. А. Влияние препарата супероксиддисмутазы на содержание эндогенной супероксиддисмутазы и перекисное окисление липидов при термических ожогах. 4, 28—30.
- Акопов С. Э., Григорян М. Р., Габриелян Э. С. Некоторые механизмы изменений функционального состояния полиморфноядерных лейкоцитов при атеросклерозе. 5, 68—71.
- Алексеева А. Е., Гребенщикова О. Г., Потанина Т. А., Прозоровский В. Н. Антигенная активность N-концевого пептида лактатдегидрогеназы мышцы свиньи, полученного при бромциановом расщеплении. 4, 66—72.
- Андреев Г. В., Ашмарин И. П., Зажирай В. Д., Лившиц В. А., Серебрякова Т. Н., Подорольская Л. В. Влияние тимотина на процесс ферментативного фибринолиза. 5, 108—111.
- Ахунов В. С., Краснополянская К. Д., Миренбург Т. В. Использование нагрузочных тестов с помощью меченого GM<sub>1</sub>-ганглиозида для дифференциальной диагностики GM<sub>1</sub>-ганглиозидоза. 5, 119—122.
- Бадейнова Е. Н., Левачев М. М., Богдарин Ю. А. Липиды, желчные и жирные кислоты желчи кроликов при гиперхолестеринемии. 1, 99—104.
- Биленко М. В., Серегин Л. А., Комаров Н. Г., Абакумова О. Ю. Регенерационная способность ишемизированной печени и влияние на нее резекции и экстрактов, стимулирующих пролиферацию. 2, 93—97.

- Бородин Е. А., Ландышев Ю. С., Савельева М. В. Структурно-функциональные свойства мембран эритроцитов у больных инфекционно-аллергической бронхиальной астмой. 6, 109—114.
- Бычкова В. В., Берман А. Е. Выделение и очистка коллагеновых белков с помощью биоспецифической хроматографии на сорбенте с коллагенсвязывающим фрагментом фибронектина. 6, 129—133.
- Вартанян О. А., Шинкаренко Л. И., Козлов А. В., Гольдштейн Н. И., Азизова О. А., Владимиров Ю. А. Изучение роли системы церулоплазмин-трансферрин в регуляции перекисного окисления липидов сыворотки крови при различных режимах гипербарической оксигенации. 1, 31—35.
- Васильев А. В., Коновалова Л. С., Плещинский К. Д., Пономарева Л. Г., Тутельян В. А. Активность лизосомальных гидролаз и обновление белка в печени, селезенке и тимусе крыс при антигенной стимуляции и дефиците белка. 1, 92—95.
- Васильев А. В., Воробейчик Т. А., Плещинский К. Д., Тутельян В. А. Активность лизосомальных протеиназ в печени, селезенке, тимусе и перитонеальных макрофагах мышей при иммунизации тимусзависимым и тимуснезависимым антигенами. 2, 121—123.
- Васильев А. В., Ли Хау Рен, Орехов А. Н., Тертов В. В., Ким Хан Джон, Тутельян В. А. Протеиназы лизосом интимы аорты человека и атерогенез. 4, 124—127.
- Васильев А. В., Ли Хау Рен, Орехов А. Н., Тертов В. В., Тутельян В. А. Влияние глюкагона и конканавалина А на аккумуляцию холестерина перитонеальными макрофагами мыши и клетками интимы аорты человека. 5, 90—93.
- Васильева Е. М., Зябкина А. Г. Активность АТФаз, содержание циклических нуклеотидов в сердце и перекисное окисление липидов в аорте спонтанно гипертензивных крыс. 5, 20—23.
- Васильева Т. Г., Доброгорская Л. Н., Краева Л. Н., Гончарова В. П.  $\alpha$ -2-Макроглобулин в спинномозговой жидкости при нейрохирургических заболеваниях. 6, 48—51.
- Венгеровский А. И., Саратиков А. С. Влияние гепатотоксинов на активность органеллоспецифических ферментов и метаболизм липидов печени. 3, 87—91.
- Верболович В. П., Подгорный Ю. К., Подгорная Л. М. Показатели резистентности эритроцитов человека к окислительному стрессу. 5, 35—40.
- Ворончихина Л. Д., Демьянова В. Т., Бердинских Н. К., Колупаева Н. В., Безносикова Т. П. Характер количественных изменений некоторых показателей обмена полиаминов в крови больных хроническими лейкозами. 1, 74—77.
- Гаскина Т. К., Курилович С. А., Горчаков В. Н. Изменение скорости лецитинхолестеролацил-трансферазной реакции и липидных показателей сыворотки крови под влиянием катергена в условиях острого экспериментального повреждения печени. 4, 24—28.
- Гашимова А. Д., Соколов А. И., Никольская Г. В., Гаппаров М. М. Изменение липидного обмена и обновления сигналовых кислот в составе гликопротеинов жировой ткани при углеводной нагрузке. 1, 114—118.
- Геворкян Г. А., Каянц А. С., Восканян Л. О. Синтез митохондриальных белков при изопротереноловом повреждении миокарда крыс. 5, 79—83.
- Герасимова Е. Н., Левачев М. М., Озерова И. Н., Полесский В. А., Щербакова И. А., Метельская В. А., Кулакова С. Н., Астахова Т. И., Никитин Ю. П., Перова Н. В. Сравнительный анализ липид-белкового спектра липопротеидов и жирнокислотного состава липидов плазмы крови и эритроцитов коренных жителей Чукотки и москвичей. 5, 7—11.
- Глинка Е. Ю., Сокольников А. А., Коденцова В. М. Об использовании ПАЛФ-эффекта как показателя обеспеченности витамином В<sub>6</sub>. 2, 52—59.
- Голотин В. Г., Гоненко В. А., Зимина В. В., Наумов В. В., Шевцова С. П. Влияние нонола и элеутерококка на изменение органов гипофизадреналовой системы крыс при экстремальном воздействии. 1, 35—37.
- Гончар Н. А., Гребенщикова О. Г., Заславская Н. В. Модификация гистидиндекарбоксилазы микрококка тетранитротметаном. 3, 112—116.
- Гончаренко Т. М., Никулина С. Е., Крылова О. Ю., Стволинская Н. С., Полякова Э. Д., Коровкин Б. Ф. Первичная культура гепатоцитов новорожденных крыс как система для моделирования апоптоза и метаболической инсемии. 6, 51—55.
- Гончарова В. Н., Морозова М. С., Разина Л. Г., Астахова Т. М., Мануилова И. А. Влияние синтетического аналога простагландина Е<sub>2</sub> сульпростонона на аденилатциклазную систему в децидуальной ткани женщин. 6.
- Горошинская И. А., Стоянович Т., Мичич Д. В., Мршуля Б. Б. Свойства моноаминоксидазы в мозге монгольских песчанок при церебральной инсемии. 5, 112—115.
- Гроздова И. Д., Климов Н. П., Мамаева Е. Г., Крехнов Б. В., Свешикова Е. С., Ивашкин В. Т., Васильев В. Ю., Северин Е. С. Активность протеинкиназ и содержание сАРР в слизистой оболочке желудка при неопухолевых заболеваниях. 6, 83—87.
- Губский Ю. И., Афонина Г. Б., Брюзгина Т. С., Кравченко Э. Я., Радловская З. Т., Прудный Т. П., Задорина О. В., Бордонос В. Г. Влияние левамизола на функциональную активность и жирнокислотный состав лимфоцитов при повреждении клеточных мембран тетрахлорметаном. 2, 64—68.
- 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 тетрахлорметана. 4, 119—124.
- Гулько С. В., Запорожан В. Н., Гулько В. А., Низова Н. Н. Исследование метаболического статуса селена у беременных в группе риска по развитию поздних токсикозов. 6.
- Гулько С. В., Леус Н. Ф. Активность Na,K-АТФазы как один из критериев в выделении группы риска по развитию позднего токсикоза при скрининге беременных. 6.
- Дворянинович Л. Н. Изменение синтеза нуклеиновых кислот в селезенке крыс с острым дефицитом витамина В<sub>1</sub> при иммуногенезе. 3, 92—96.
- Девяткина Т. А., Тарасенко Л. М., Коваленко Э. Г. Антиоксидантная недостаточность и реакция тканей на острый эмоционально-болевого стресс. 5, 45—49.
- Джафаров А. И., Магомедов Н. М., Баба-



- ев Х. Ф., Ахмедова Г. Ш., Бехбудова З. А. Перекисное окисление липидов и активность АТФаз в синапсомальных и митохондриальных фракциях мозга при гипоксии. 4, 51—56.
- Дяков В. Л., Дубовской А. В., Климова О. А., Суханов В. А. Использование иммуноспецифических методов для определения количества микросомальной эпоксидгидролазы. 4, 47—52.
- Дубинина Е. Е., Софронова Л. Н., Раменская Н. П., Ефимова Л. Ф., Петрова З. А. Состояние антиоксидантной системы эритроцитов у новорожденных детей при острой и хронической гипоксии. 1, 56—59.
- Ершиков С. М. Интенсивность глюконеогенеза в печени крыс в восстановительном периоде после длительной гипоксизации. 3, 55—58.
- Залеток С. П., Исмаилова И. М., Бердинских Н. К. Полиамины в лимфоцитах животных при экспериментальном опухолевом процессе. 1, 22—26.
- Занин В. А., Лукина В. И., Березов Т. Т. Выделение, некоторые физико-химические и каталитические свойства L-метилонин-γ-лиазы из *Pseudomonas taetrolens*. 4, 84—89.
- Иващенко В. В. Состояние прекалликренин-калликрениновой системы крови у больных с острой артериальной непроходимостью нижних конечностей. 6, 44—48.
- Калашников С. Г., Кузник Б. И. Изучение роли тимуса в регуляции синтеза цитомединов. 2, 33—36.
- Калинский М. И., Губский Ю. И., Рудницкая Н. Д., Курский М. Д. АТР-зависимый транспорт кальция в саркоплазматическом ретикулуме миокарда при адаптации к мышечной деятельности. 4, 31—34.
- Кальнова Н. Ю. Влияние радиотерапии на антиокислительную активность тканей и эритроцитов крови. 3, 25—28.
- Калюнов В. П., Петрусенко Г. П., Фомиченко К. В. Влияние фактора роста нервов, гуанетидина и их совместного применения на активность нуклеаз в тканях животных. 3, 117—120.
- Карагезян К. Г., Карапетян Э. Т., Сафарян М. Д. Динамика изменений перекисного окисления липидов и активности супероксиддисмутазы в эритроцитах у больных туберкулезом. 4, 11—12.
- Карагезян К. Г., Геворкян Д. М. Фосфолипиды-глицериды, перекисная резистентность эритроцитов, уровень в них малонового диальдегида и содержание α-токоферола в плазме крови и эритроцитах крыс с аллоксановым диабетом до и после применения комбинированной антиоксидантотерапии. 5, 27—30.
- Карелин А. А., Демидова В. С., Глоба А. Г., Марчук А. И., Вигорин Б. В. Стимулируемое интерлейкином-2 образование АТФ препаратами обогащенных плазматическими мембранами частиц из Т-клеток. 3, 120—125.
- Касимова Г. М., Мирталипов Д. Т., Абидов А. А., Акбаров З. С. Липиды эритроцитов при сахарном диабете с сосудистыми поражениями. 3, 42—47.
- Ковалева Г. Г., Карманский И. М. Действие холестеролэстеразы на липопротеиды низкой плотности. Влияние модифицированных липопротеидов на накопление холестерина в культивируемых клетках. 3, 47—51.
- Кожевникова К. А., Петрова-Маслакова Л. Г., Турфенова Н. С., Белова Е. В., Трюфанов В. Ф., Носкин В. А., Ваврин Р. З. Акцепция холестерина липопротеинами высокой плотности у лиц с дис-α-липопротеинемией и возможная роль в этом процессе апопротеина Е. 4, 43—48.
- Кожемякин Л. А., Шелепина Е. П., Антонов В. Г. Ксантинооксидазная активность тимоцитов при лимфоцитолитическом действии гипоксантина. 6.
- Коневалова Н. Ю., Чиркина И. А., Чиркин А. А. Действие факторов, стимулирующих пролиферацию гепатоцитов, на процесс эстерификации холестерина в сыворотке крови при регенерации печени. 2, 37—42.
- Конопля Е. Ф., Детинкин О. П., Житкович А. В. Прочность связей в ДНК-белковых комплексах ядер клеток печени крыс при старении. 2, 78—82.
- Конопля Е. Ф., Фильченков Г. Н. Возрастные особенности взаимодействия кортикостероидов с транспортными белками крови. 5, 40—45.
- Короткова М. Н., Санина И. В., Арион В. Я. Анализ иммунорегуляторных пептидов тимуса методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. 4, 38—42.
- Корсова Т. Л., Морозова Н. А., Познанская А. А., Курганов Б. И. Сравнительное изучение влияния коферментных форм витамина B<sub>12</sub> на монооксигеназную систему и перекисное окисление липидов в печени кроликов при отравлении фенилгидразином. 2, 97—102.
- Корф И. И., Цагикян Т. А., Мещерякова В. А., Левачев М. М., Арутюнова М. Б. Изменение состава жирных кислот плазмы крови и эритроцитов при остеохондрозе. 4, 81—84.
- Косникова И. В. Активность пентозофосфатного пути метаболизма глюкозы в ишемизированных скелетных мышцах человека и животных. 3, 28—30.
- Косухин А. Б., Махонина Л. А., Ким Э. А., Сыздыкова Р. Т. Механизм формирования спектра незэстерифицированных жирных кислот в биологических жидкостях у кроликов с алиментарной гиперхолестеринемией. 2, 46—52.
- Краковский М. Э., Аширметов А. Х., Мусабиев Э. И., Алиева Л. Г. Состояние монооксигеназной ферментной системы печени при сальмонеллезной инфекции у крыс. 4, 89—91.
- Красовская С. М., Платонова Л. В., Дземешкевич С. Л. Изучение устойчивости биопротезов клапанов сердца к протеолитическому воздействию коллагеназы и эластазы. 6.
- Крылов Ю. Ф., Кононенко Т. Л., Смирнов П. А., Тигранян Р. А., Калита Н. Ф., Мелконян А. Г. Изменение углеводного обмена, секреции инсулина и глюкагона у нормогликемических крыс при введении различных доз никотирамида. 3, 30—32.
- Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А., Кокряков В. Н., Азиева Л. Д., Пигаревский В. Е., Алешина Г. М., Ашмарин И. П. Катионные белки из нейтрофилов как ингибиторы неферментативной фибринолитической и антикоагулянтной активности плазмы крови. 3, 103—108.
- Кудряшов Б. А., Ульянов А. М., Тарасов Ю. А. Усиление протамина сульфатом диабетогенного действия аллоксана. 4, 128—131.
- Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А., Азиева Л. Д. Получение и изучение некоторых физико-



- химических свойств диабетогенного фактора крови больных диабетом. 6, 63—66.
- Кудряшов Б. А., Ульянов А. М., Тарасов Ю. А. Значение эндогенного гепарина в защите организма от действия факторов риска, вызывающих экспериментальный диабет. 6.
- Кулагин Ю. И., Левачев М. М., Сюрин А. А., Лукинович В. Л. Перекисное окисление и особенности жирнокислотного состава липидов клеточных мембран у больных гипертонической болезнью. 3, 129—132.
- Кулинский В. И., Чесмочакова Е. И. Изменения чувствительности адренореактивных систем разных подтипов при ревматизме у детей. 1, 88—91.
- Кулинский В. И., Чесмочакова Е. И. Комплекс катехоламины — адренореактивные системы разных подтипов при различных формах бронхиальной астмы у детей. 3, 76—80.
- Курбанов Х. К., Ромах О. Н. К механизму регуляции обмена тирозина при отравлении этанолом. 4, 102—105.
- Курбанов И. С., Мордвинцев П. И., Алиев Д. И., Ванин А. Ф. Влияние тиоловых соединений и железа на продукцию окиси азота из нитропрусида и нитроглицерина. 6, 87—91.
- Кухаренко В. И., Хохлова Ю. В. Уровень цАМФ и цГМФ в клетках спонтанных абортусов с трисомным и триплондным карнотипом. 4, 73—75.
- Кухаренко В. И., Пичугина Е. М., Дельвиг А. А. Соотношение коллагена типов I и III в штаммах фибробластных клеток человека с диплоидным и аномальным набором хромосом. 5, 94—96.
- Лемешко В. В., Доркина Е. Г., Никитченко Ю. В., Василенко Ю. К. Влияние тетрациклина и силибора на перекисное окисление липидов печени крыс разного возраста. 5, 49—54.
- Ли Ха Рен, Васильев А. В., Орехов А. Н., Тутельян В. А. Влияние эйкозапентаеновой кислоты и простагландинов различного ряда на аккумуляцию холестерина и пролиферацию клеток интимы аорты человека. 2, 112—115.
- Линчевская А. А., Кондратьева Л. А. Влияние гипотермии на структурно-функциональные свойства мембран эритроцитов белых крыс. 6, 36—39.
- Литвин Ю. П., Дворецкий А. И., Шанская А. М., Мороз Н. И. Перекисное окисление липидов и эндогенный фосфолипидный гидролиз в условиях травмы и дозированной гипотермической нагрузки. 5, 16—19.
- Литвинов Н. Н., Астахова Л. Ф., Долинская С. И. Влияние различных концентраций нитрозодиметиламина в зависимости от длительности воздействия на некоторые ферментные системы эндоплазматической сети и митохондрий почек крыс. 1, 60—64.
- Лобарева Л. С., Платонова Л. В., Рабинович С. Э., Палюлина М. В., Пасхина Т. С. Эффективный способ одновременного извлечения из мочи и очистки тканевого каликреина и кислотостабильного ингибитора трипсина. 5, 54—58.
- Лютова Л. В., Андреев Г. В., Карабасова М. А., Рыбакина Е. Г., Козинец И. А., Ашмарин И. П. Интерлейкин-I и фибринолиз. Исследования в условиях *in vivo*. 4, 75—78.
- Ляпина Л. А. Влияние гистонов на неферментативный фибринолиз плазмы. 1, 37—41.
- Мазо В. К., Саменкова Н. Ф. Связывание  $^3\text{H}$ -аланина и  $^{125}\text{I}$ -дийодтирозина белками сыворотки крови в опытах *in vitro* и *in vivo*. 6.
- Мареева Т. Б., Соковина Я. М., Вотрин И. И. Физико-химические и каталитические свойства гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы тромбоцитов доноров и больных гемофилией А. 5, 99—103.
- Маслов Л. Н., Харьковский А. В., Лишманов Ю. Б. К вопросу об адренергической регуляции уровня энкефалинов в миокарде. 1, 26—29.
- Маякова Т. И., Кузнецова Э. Э., Лазарева М. В., Долгушина Г. С. Количественное определение летучих жирных кислот газохроматографическим методом для экспресс-диагностики возбудителей неклостридиальной анаэробной инфекции. 5, 71—75.
- Медведева Н. В., Морозкин А. Д., Горошко-ва И. П., Рууге Э. К., Шербакова И. А., Перова Н. В., Лякишев А. А. Распределение липопротеинов низкой плотности по флотационным характеристикам в норме и при дислипидопроteinемиях. 3, 36—41.
- Меерсон Ф. З., Явич М. П., Рожницкая И. И., Твердохлеб В. П. Подавление репликации и активация репаративного синтеза ДНК при стрессе и предупреждение этих явлений предварительной адаптацией. 4, 48—51.
- Мелконян М. М., Карагезян К. Г., Овакьян С. Р. Особенности обмена фосфолипидов-глицеридов в мембранах эритроцитов белых крыс при акустическом стрессе. 2, 68—71.
- Мелконян М. М. Процессы перекисного окисления липидов и динамика сдвигов в уровне холестерина в плазме и мембранах эритроцитов в условиях воздействия низкочастотных акустических колебаний. 4, 12—16.
- Мельник Е. И., Циренина М. Л., Ушаков А. Н., Колтовая П. А., Боброва О. В., Крехов Б. В., Смольникова Н. М., Островская Р. У. Некоторые биохимические показатели у крыс при антенатальной алкоголизации. 3, 33—36.
- Мизина Т. Ю. Гипогликемический эффект тимолина в эксперименте на животных. 3, 80—82.
- Миренбург Т. В., Лебедева Т. В., Краснопольская К. Д., Барцева О. Б., Козлова В. М., Бахарева В. А. Биохимическая диагностика мукосультатидоза. 6, 27—31.
- Миримский А. С., Милова О. Г., Рослый И. М., Венгеров Ю. Я., Ермак Т. Н., Коюденко Л. Г., Дегтярева Л. В., Сидиков Б. М., Линберг Л. Ф. Компьютерная диагностика некоторых инфекционных болезней по газохроматографическому профилю липидов сыворотки крови. 2, 115—120.
- Мирошников В. М. Острофазовый белок зоны беременности в диагностической оценке термических поражений кожи. 3, 108—112.
- Мирошниченко В. П., Бусыгина О. Г., Северина И. С. Аналогия и различие в свойствах растворимых форм гуанилатциклазы сердца и тромбоцитов крови крысы. 4, 60—66.
- Муравьева Л. А., Волков Е. Ю. Некоторые факторы слизистой защиты гастродуоденальной системы в различные сроки после ушивания прободных язв. 6, 20—23.
- Нагорная В. Ф. Эластаза и ее ингибиторы в патогенезе доброкачественных опухолей яичников. 6, 73—77.
- Натанзон Л. В., Галаев Ю. В. Влияние бактериального эндотоксина на активность моно-

- аминоксидазы митохондрий печени. 3, 58—59.
- Никандров В. Н., Казюниц О. А. Модификация функциональных групп стрептокиназы при йодировании. 1, 41—47.
- Николаев А. И., Мамутов Ж. И., Карабано-вич А. К., Комарин А. С. Изменение активности микросомальных монооксигеназ печени у тимэктомизированных крыс в зависимости от возраста и ее коррекция гуморальным фактором тимуса. 4, 107—111.
- Николаев А. А., Анишкова Н. И., Ильков А. Л., Алтухов С. А. Иммунохимические и физико-химические свойства простатического бета-глобулина человека. 5, 11—16.
- Никулина С. Е., Крылова О. Ю., Гончаренко Т. М., Стволинская Н. С., Полякова Э. Д., Коровкин Б. Ф. Изменение уровня цАМФ и активности кислой фосфатазы в монослойной первичной культуре гепатоцитов новорожденных крыс в условиях аноксии и субстратного голодания. 5, 103—108.
- Нужный В. П., Тезиков Е. Б., Забирова И. Г., Герюмов А. И. Повреждение миокарда и симпатико-адреналовая система при синдроме отмены этанола у крыс. 4, 16—20.
- Овчинникова Л. Н., Горкин В. З., Анохина И. П. Особенности изменений каталитических свойств мембраносвязанных моноаминоксидаз при алкогольной интоксикации. 2, 124—128.
- Овчинникова Л. Н., Горкин В. З. Об особенностях перекисного окисления липидов при алкогольной интоксикации. 5, 86—90.
- Омельяненко В. Г., Марценюк О. В., Нечаев А. С., Рууге Э. К. Электростатический потенциал поверхности липопротеидов низкой плотности плазмы крови больных ишемической болезнью сердца: исследование с помощью флуоресцентного зонда. 1, 29—31.
- Парсаданян Г. К., Саркисян Л. В., Асла-нян И. Г., Адунц Г. Т., Адунц Г. Г. Влияние аллоксана *in vitro* на активность некоторых ферментов фосфорного обмена. 5, 23—26.
- Патечников В. Д. Перекисное окисление липидов, ферментная антиокислительная система и содержание кислой фосфатазы в слизистой оболочке желудка при язвенной болезни. 3, 51—54.
- Пашинцева Л. П., Гудима С. О., Козырева Е. А., Воронов А. В., Миериня А. А., Бассалык Л. С., Венгеров Ю. Ю., Вотрин И. И. Плацентарная щелочная фосфатаза — маркер злокачественных новообразований. 3, 68—71.
- Петриченко И. Е., Шартава А. Ш., Шахов Ю. А. О механизме активации глюкокортикоид-рецепторного аппарата лимфоцитов при остром инфаркте миокарда. 3, 64—68.
- Петрович Ю. А., Машкиллейсон А. Л., Сулейманова Г. Г., Лагунов А. И. Влияние антиоксидантов на активность кислых гидролаз лейкоцитов крови больных лейкоплакией слизистой оболочки полости рта. 5, 61—64.
- Петруняк В. В., Гончаренко М. С., Кондакова А. К., Мавров И. И. Изучение проницаемости для  $^{45}\text{Ca}$  и активности Са-АТФазы мембран эритроцитов больных псориазом. 6.
- Поддаре С.-М. Р., Лецкене М. П., Маурицс М. М., Плянчюнене Р. Р. Иммуноаффинная очистка  $\alpha_1$ -ингибитора протеаз из плазмы крови человека. 5, 96—99.
- Правдина Н. Ф., Галегов Г. А. Ингибирующее действие 3'-азидо-3'-дезоксирибавири-5'-трифосфата на синтез РНК, катализируемый РНК-полимеразой вируса гриппа А и клеточной ДНК-зависимой РНК-полимеразой II. 1, 104—106.
- Прокопенко П. П., Тигранян Р. А., Муратови Г. Л., Плохой В. И., Хавинсон В. Х. Характеристика кислотного экстракта эпифиза и его фракций. 4, 79—81.
- Промыслов М. Ш., Левченко Л. И., Демчук М. Л., Габриэлян П. И. Роль липидов фракции средних молекул в характеристике патологического процесса. 4, 105—107.
- Попова Н. К., Войтенко Н. Н., Маслова Л. П. Влияние эмоционального стресса и кортико-стерона на активность моноаминоксидаз мозга крыс. 4, 114—119.
- Пузач С. С., Горбач З. В. Характеристика продуктов расщепления тиамина тиаминазой I моллюсков. 2, 82—84.
- Рашковецкий Л. Г., Прозоровский В. П., Коровкин Б. Ф. Выделение и иммунохимические свойства ЛДГ-5 из мышц свиньи. 3, 60—63.
- Рашковецкий Л. Г., Посков Ф. С., Прозоровский В. Н., Коровкин Б. Ф. Получение стафилококкового иммуносорбента, сенситизированного антителами к М-субединицам ЛДГ. 3, 136—139.
- Рожинская И. В., Поверенный А. М., Ротт Г. М. Особенности определения ауто-антител к миоглобину человека методом иммуноферментного анализа. 4, 97—102.
- Розанов В. А., Конелевич В. М., Савицкий И. В. Изменения в системе ГАМК головного мозга при многократном инъектировании пиридоксаль-5'-фосфата и его шиф-фова основания с ГАМК. 2, 42—46.
- Романцев Ф. Е., Прозоровский В. П., Козлов Е. А., Карнов Д. А., Требухина Е. Л., Ржанинова А. А. Определение аминокислотного состава хрящевой ткани и изоферментов креатинфосфокиназы с использованием фенилтиокарбамильных производных аминокислот. 3, 71—75.
- Савина М. И., Решина В. М. Метаболизм ядерных белков в клетках тимуса и костного мозга мышей с гепатомой 22. 1, 111—114.
- Свешников А. А., Офицерова Н. Б., Ральникова С. В., Кузнецов А. П. Роль циклических нуклеотидов в репаративном костеобразовании. 4, 9—11.
- Селевич М. И. Метаболизм гликолипидов головного мозга крыс при остром и хроническом введении этанола. 5, 75—78.
- Сенчук В. В., Пикулев А. Т., Шолух М. В. Влияние винкристина на  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазную активность актомиозиноподобного белка из саркомы-45 и актомиозина из скелетной мышцы крыс. 1, 18—22.
- Сергеев И. П., Плещитый К. Д., Руснак Ф. И., Спиричев В. Б. Рецепторы 1,25-дигидрокситамина  $\text{D}_3$  в лимфоцитах и уровень Т- и В-лимфоцитов у больных гломерулонефритом. 6, 117—121.
- Серебренникова Э. Г. Роль жирных кислот фосфолипидов различных органов белых крыс в формировании резистентности к глубокому многократному переохлаждению. 4, 92—96.
- Сморodin Е. П., Арукаву Х. Э. Выделение  $\alpha_2$ -макроглобулина плазмы крови человека комбинацией методов псевдоглицандной аф-

- финной хроматографии и гель-фильтрации. 5, 83—86.
- Соколов Н. Н., Фицнер А. Б., Аникейчева Н. В., Коваленко Н. А. Роль двухвалентных катионов в реакции эндонуклеолиза ДНК рестриктазами. 6, 66—69.
- Соколов Б. П., Шер Б. М., Козлов Е. А., Цветкова Т. А., Рудаков С. С., Дельвиц А. А., Калинин В. Н. Нарушение структуры коллаген I типа и наличие сшивок между цепями коллагенов I и III типов у больного с изолированной формой килевидной деформации грудной клетки. 6, 91—102.
- Стапуленис Р. Р., Иванов Л. Л., Лукошьявичус Л. Ю., Даукантайте И. С., Кондратас Д. З., Прайкявичюс А. К. Изучение свойств лейцил-тРНК-синтетазы из миокарда свиньи в норме и при экспериментальной ишемии. 4, 56—60.
- Струкова С. М., Коган А. Е., Тара А. А., Лавиксаар А. А. Противотромботический эффект активатора протенина С из змеиного яда. 5, 115—119.
- Струмило С. А., Киселевский Ю. В., Таранда Н. И., Забродская С. В., Опарин Д. А. Взаимодействие пируватдегидрогеназного комплекса из сердечной мышцы с тиаминдифосфатом и его производными. 2, 102—105.
- Табукашвили Р. И., Ушаков И. Б. Некоторые биохимические механизмы комбинированного действия экстремальных факторов. 4, 111—114.
- Терновой В. А., Яковлев В. М. Влияние пониженных температур на состав жирных кислот в плазмалогенных и диацильных формах фосфолипидов в ткани печени крыс. 5, 58—61.
- Титаренко О. Т., Тиходеев С. А., Перова Т. Л., Липская Е. А. Биохимические критерии воспалительного процесса при остеомиелите позвоночника. 3, 100—103.
- Тихонов Ю. В., Мейснер И. С., Пименов А. М., Тогузов Р. Т. Особенности обмена пуриновых соединений в гепатоме 22, печени и эритроцитах крови мышей в процессе развития опухоли. 3, 125—129.
- Ткаченко А. В. Функциональные изменения в синапсомембранной мембране при взаимодействии с билирубином и сывороточным альбумином *in vitro*. 6, 39—44.
- Толкачева Н. В., Левачев М. М., Медведев Ф. А., Кулакова С. Н., Мазурец А. Ф., Борисенко В. Г. Транспорт жирных кислот и продуктов их перекисного окисления сывороточным альбумином при ишемическом и некоронарогенном повреждении сердечной мышцы. 2, 89—92.
- Трубицына Н. В., Михеев А. М., Березин В. А., Ефимов О. Е., Привалова Л. И. Анализ белков сыворотки крови больных хроническим алкоголизмом методом перекрестного иммуноэлектрофореза. 3, 133—136.
- Улиньской А. П., Крауцис К. И., Дзярюс А. П. Активность 5 $\alpha$ - и 5 $\beta$ -стероидредуктазы в субклеточных структурах печени крыс при росте карциносаркомы Уокера. 1, 77—81.
- Фещенко С. П., Краснополянская К. Д., Ребрин И. А., Рудаков С. С. Молекулярная гетерогенность компонентов протеогликановых агрегатов гиалинового хряща человека в норме и при системных костных дисплазиях. 2, 24—33.
- Фортинская Е. С., Торховская Т. И., Наливайко Е. С., Ключникова Ж. И., Халилов Э. М. Исследование влияния трехкратной гемосорбции на активность лецитинхолестеринацилтрансферазы. 2, 109—112.
- Фролова Н. Ю., Принцев М. Д., Третьяков А. В., Кожемякин Л. А., Коровкин Б. Ф. Исследование систем циклических нуклеотидов различных отделов миокарда собак при экспериментальном инфаркте. 1, 64—68.
- Фролькис В. В., Богацкая Л. Н., Новикова С. Н. Ингибиторы биосинтеза белка и развитие дислипидотендеций у кроликов. 6.
- Хакимов З. З. Влияние бензола на функциональную активность монооксигеназной системы печени при термическом ожоге. 5, 64—67.
- Харченко Е. П., Калихевич В. П., Соколова Т. В., Шестак К. И., Ардемасова З. А. Высокоактивные аналоги опиатоподобных пептидов гисторфина и канпорфина. 2, 106—109.
- Хасина М. А., Зуев Ю. Ф. Исследование связи резистентности легкого к развитию патологических процессов с его жирнокислотным составом. 4, 35—38.
- Хацернова Б. Я., Силаева С. А., Голенченко В. А., Николаев А. Я., Розкин М. Я., Некрасов А. В., Берестецкая Т. З., Ефимов В. С. Гепарин и его антагонист — четвертичная аммонийная соль олигомера-25-кондинна: распределение по субклеточным органеллам, влияние на синтез ДНК в регенерирующей печени крыс. 3, 83—87.
- Цукерман Е. С., Померанцева Т. Я., Познанская А. А., Корсова Т. Л., Клементьева И. В., Смирнова Т. Н., Авакумов В. М., Курганов Б. И. Влияние метилкобаламина и аденосилкобаламина на процессы кроветворения и обмен витамина В<sub>12</sub> при экспериментальной феллигидразиневой анемии у кроликов. 1, 106—111.
- Чирятьев Е. А., Леонова О. П., Бишевский А. Ш. Аминокислотный состав и свойства ингибиторов самосборки фибрина. 3, 96—100.
- Чубинская С. Г., Севастьянова Н. А., Векслер И. Г., Слуцкий Л. И. Биохимические изменения соединительнотканых компонентов злокачественных новообразований и легких у мышей при метастазировании и применении химиопрепаратов. 5, 30—34.
- Чубукина А. Н., Златопольский А. Д., Зайденберг М. А., Бычкова В. В. Выделение различающихся по размерам и биологической активности пептидных фрагментов фибронектина с помощью аффинной хроматографии на иммобилизованном плазмине. 6.
- Чулкова Т. М. Атерогенные модификации липопротеидов низкой плотности в процессе образования фибрина и фибринолиза. 2, 72—75.
- Шараев П. Н., Иванов В. Г., Кутявин Л. И. Изучение обмена гликозаминогликанов при воздействии на организм стрессогенными факторами. 4, 20—23.
- Шатров Г. П., Гмошинский И. В., Зайцев А. Н. Всасывание меченного <sup>14</sup>C красителя «активный красный 5СХ», иммобилизованного на полисахаридах, в желудочно-кишечном тракте крыс. 1, 95—99.
- Шкуматов Л. М. Кинетика исчезновения инсулина из плазмы крови крыс. 2, 75—78.
- Шлейкин А. Г., Артамонова В. Г., Бурыкина Г. Н., Горькова Л. Б., Дерновая Л. В.



- Об активности аминоксидаз плазмы крови и тромбоцитов при сенсибилизации и аллергии. 1, 52—55.
- Шлейкин А. Г., Горькова Л. Б., Пожиленкова К. С., Свездочкин А. Г. О механизме изменения связывания аминокислот белками плазмы крови при аллергии. 2, 86—89.
- Шутенко Ж. В., Симхович Б. З., Мейрера Д. В., Калвиш И. Я., Лукевич Э. Я. Регуляция карнитинзависимого метаболизма жирных кислот в миокарде крыс при помощи 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионата. 2, 59—64.
- Щербакова И. А., Перова Н. В., Щельцына Н. В., Чепурненко Н. В., Мелькина О. Е., Соколова М. А. Влияние пищевых воздействий на субфракционный спектр липопротеидов высокой плотности. 1, 81—88.
- Щербань А. И., Лукашевич Л. В., Марчук С. И., Нежинец Е. А. Применение иммуноаффинной хроматографии для выделения раково-эмбрионального антигена. 6.
- Яковлев П. Б., Лаугалене Н. Ф., Веса В. С., Хидуев С. Х., Смирнова И. П., Березов Т. Т. Усовершенствованная схема очистки L-лизин- $\alpha$ -оксидазы гриба *Trichoderma* sp. 2, 84—86.

#### Методы биохимических исследований

- Артунян Е. Е., Грубер И. М., Поляченко В. М., Никольская И. И., Дебов С. С. Способ получения метилаз Sau6782-типа. 6.
- Волчегорский И. А., Налимов А. Г., Яровинский Б. Г., Лифшиц Р. И. Сравнение различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гепат-изопренольных экстрактах крови. 1, 127—131.
- Грибанов Г. А., Горшкова М. А. Сравнительный микроанализ липидов некоторых компонентов системы гемостаза. 6.
- Дилакян Э. А., Локшина Л. А., Молодых А. А., Орехович В. П., Поздnev В. Ф. К вопросу об использовании некоторых флюорогенных субстратов для определения активности пептидгидролаз в сыворотке крови. 1, 131—136.
- Доценко В. Л., Яровая Г. А., Нешкова Е. А. Использование трипептидного хромогенного субстрата для одновременной оценки четырех показателей активности калликреин-кининовой системы. 2, 128—133.
- Зирайский Е. И., Назимова С. В., Олефиренко Г. А., Пчелкина З. М., Петрунин Д. Д., Татаринов Ю. С., Фукс Б. Б. Иммуноферментный анализ плацента-специфического альфа-микроглобулина в сыворотке крови донора. 5, 130—132.
- Карнова Е. А., Городецки В. К. Колориметрический метод определения неферментативно гликозилированного гемоглобина в крови человека. 1, 122—127.
- Кендыш И. П., Братцев В. А., Климова Т. В., Климова А. И. Радиоиндикаторный метод определения активности панкреатической липазы в организме. 1, 137—140.

- Коржова Л. П., Фролова Е. В., Ромаков Ю. А. Спектрофлюориметрический метод регистрации продуктов окислительной деструкции эумеланинов. 3, 139—143.
- Лялков Б. Г., Воинов Д. И. Определение молекулярных типов триацилглицеридов в липопротеидах плазмы крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием ЭВМ. 1, 118—122.
- Маркова О. А., Калашников В. В., Хватов В. Б. Иммуноферментный метод определения антитромбина III. 5, 127—130.
- Меркулов А. Г., Шевченко О. П. Количественное иммуноферментное определение лактоферрина в сыворотке и плазме крови. 6.
- Модель М. А. К определению активности глутатионпероксидазы. 4, 132—134.
- Тоцаков В. Ю., Данилов М. А., Шестакова Н. К., Козловская Т. И., Куликова Е. Ю. Получение суспензии изолированных гепатоцитов с помощью отечественного препарата коллалитина. 4, 134—137.
- Хайдукова И. Л., Шахов Ю. А., Чернышева Н. П., Малахов В. Н. Получение фракций сыворотки крови человека, пригодных для избирательного изменения уровня липидов и аполипопротеидов при приготовлении стандартных сывороток. 2, 134—139.
- Хайдукова И. Л., Шахов Ю. А., Еремеева М. Е., Малахов В. Н. Использование сульфата аммония для приготовления контрольных сывороток крови с повышенным содержанием холестерина, триглицеридов и холестерина липопротеидов высокой плотности. 5, 133—138.
- Хоха А. М. Определение кортикостерона в плазме крови крыс методом адсорбционной микро-ВЭЖХ. 5, 122—127.

#### Рецензии

- Березов Т. Т., Сяткин С. П. Рецензия на книгу Бердинских Н. К., Залеток С. П. «Поллиаминны и опухолевый рост». 4, 138—139.
- Тягелыд Л. Я. Рецензия на книгу Н. Ф. Стародуб, В. И. Назаренко. Гетерогенная система гемоглобина. — К.: Наукова думка, 1987. — 200 с. 1, 141.

#### Хроника

- V Всесоюзный съезд геронтологов и гериатров. 4, 137—138.
- Совещание по медицинской биохимии. 5, 138—143.

#### Юбилейная дата

- В. Варази — Жизнь, отданная науке (К 100-летию со дня рождения). 4, 139—141.

#### Некролог

- Владимир Александрович Белицер (1906—1988). 4, 141—142.



- Шишкин С. С. Проблема построения каталога мембранных белков эритроцитов человека
- Доценко В. Л., Яровая Г. А., Пасхина Т. С. Сравнительный анализ методов определения калликреина и прекалликреина в плазме крови человека (обзор)
- Муравьева Л. А., Волков Е. Ю. Некоторые факторы слизистой защиты гастродуоденальной системы в различные сроки после ушивания прободных язв
- Фролькис В. В., Богацкая Л. Н., Новикова С. Н. Ингибиторы биосинтеза белка и развитие дислипидопроteinемий у кроликов
- Миренбург Т. В., Лебедева Т. В., Краснополская К. Д., Барцева О. Б., Козлова В. М., Бахареv В. А. Биохимическая диагностика мукосульфатидоза
- Красовская С. М., Платонова Л. В., Дземешкевич С. Л. Изучение устойчивости биопротезов клапанов сердца к протеолитическому воздействию коллагеназы и эластазы
- Линчевская А. А., Кондратьева Л. А. Влияние гипотермии на структурно-функциональные свойства мембран эритроцитов белых крыс
- Ткаченко А. В. Функциональные изменения в синантосомальной мембране при взаимодействии с билирубином и сывороточным альбумином in vitro
- Иващенко В. В. Состояние прекалликреин-калликреиновой системы крови у больных с острой артериальной непроходимостью нижних конечностей
- Васильева Т. Г., Доброгоpская Л. Н., Краева Л. Н., Гончарова В. П.  $\alpha_2$ -Макроглобулин в спинномозговой жидкости при нейрохирургических заболеваниях
- Гончаренко Т. М., Никулина С. Е., Крылова О. Ю., Стволинская Н. С., Полякова Э. Д., Коровкин Б. Ф. Первичная культура гепатоцитов новорожденных крыс как система для моделирования аноксии и метаболической ишемии
- Гончарова В. Н., Морозова М. С., Разина Л. Г., Астахова Т. М., Мануилова И. А. Влияние синтетического аналога простагландин Е<sub>2</sub> сульпростона на аденилатциклазную систему в децидуальной ткани женщин
- Петрунька В. В., Гончаренко М. С., Кондакова А. К., Мавров И. И. Изучение проницаемости для <sup>45</sup>Са и активности Са-АТФазы мембран эритроцитов больных псориазом
- Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А., Азиева Л. Д. Получение и изучение некоторых физико-химических свойств диабетогенного фактора крови больных диабетом
- Соколов Н. Н., Фицнер А. Б., Аникейчева Н. В., Коваленко Н. А. Роль двухвалентных катионов в реакции эндонуклеолиза ДНК рестриктазами
- Мазо В. К., Саменкова Н. Ф. Связывание <sup>3</sup>Н-аланина и <sup>125</sup>И-диiodтирозина белками сыворотки крови в опытах in vitro и in vivo
- Shishkin, S. S. Problems in compiling of the catalogue for human erythrocyte membrane proteins
- Dotsenko, V. L., Yarovaya, G. A., Paskhina, T. S. Comparative analysis of assays for estimation of kallikrein and prekallikrein in human blood plasma
- Muravyova, L. A., Volkov, Ye. Yu. Some protective factors of gastroduodenal mucosal membrane within various periods after perforating ulcer surgical treatment
- Flol'kis, V. V., Bogatskaya, L. N., Novikova, S. N. Inhibitors of protein biosynthesis and dislipoproteinemias in rabbits
- Mirenberg, T. V., Lebedeva, T. V., Krasnopol'skaya, K. D., Bartseva, O. B., Kozlova, V. M., Bakharev, V. A. Biochemical diagnosis of mucosulfatidosis
- Krasovskaya, S. M., Platonova, L. V., Dzemeshkevich, S. L. Resistance of heart valve bioprosthesis to proteolytic hydrolysis catalyzed by collagenase and elastase
- Linchevskaya, A. A., Kondrat'eva, A. A. Structure-functional properties of rat erythrocyte membranes in hypothermia
- Tkachenko, A. V. Functional alterations in synaptosomal membrane after interaction with bilirubin and blood serum albumin in vitro
- Ivaschenko, V. V. The state of the blood prekallikrein-kallikrein system in patients with acute arterial obstruction of legs
- Vasil'eva, T. G., Dobrogorskaya, L. N., Kraeva, L. N., Goncharova, V. P.  $\alpha_2$ -Macroglobulin from cerebrospinal fluid in neurosurgical impairments
- Goncharenko, T. M., Nikulina, S. E., Krylova, O. Yu., Stvolinskaya, N. S., Polyakova, E. D., Korovkin, B. F. A primary culture of hepatocytes from new born rats is a suitable system for simulation of anoxia and "metabolic ischemy"
- Goncharova, V. N., Morozova, M. S., Razina, L. G., Astakhova, T. M., Manuilova, I. A. Effect of synthetic analogue of prostaglandin E<sub>2</sub> on the adenylate cyclase system of decidual tissue of women
- Petrunyaka, V. V., Goncharenko, M. S., Kondakova, A. K., Mavrov, I. I. Permeability for <sup>45</sup>Ca and activity of Ca<sup>2+</sup>-ATPase in erythrocyte membranes of patients with psoriasis
- Kudryashov, B. A., Lyapina, L. A., Azieva, L. D. Isolation and some physico-chemical properties of the diabetogenic factor from blood of patients with diabetes
- Sokolov, N. N., Fitzner, A. B., Anikeycheva, N. V., Kovalenko, N. A. Role of two-valent cations in endonucleolysis of DNA catalyzed by restrictases
- Mazo, V. K., Samenkova, N. F. Binding of <sup>3</sup>H-alanine and <sup>125</sup>I-diiodotyrosine with blood serum proteins in vitro and in vivo

Ногорная В. Ф. Эластаза и ее ингибиторы в патогенезе доброкачественных опухолей печени

73

Гунько С. В., Запорожан В. Н., Гунько В. А., Низова Н. Н. Исследование метаболического статуса селена у беременных в группе риска по развитию поздних токсикозов

78

Кудряшов Б. А., Ульянов А. М., Тарасов Ю. А. Значение эндогенного гепарина в защите организма от действия факторов риска, вызывающих экспериментальный диабет

80

Гроздова И. Д., Климов Н. П., Мамеева Е. Г., Крехнов Б. В., Свешникова Е. С., Ивашкин В. Т., Васильев В. Ю., Северин Е. С. Активность протеинкиназы и содержание сАМР в слизистой оболочке желудка при неопухолевых заболеваниях

83

Курбанов И. С., Мордвинцев П. И., Алиев Д. И., Ванин А. Ф. Влияние тиоловых соединений и железа на продукцию окиси азота из нитропруссиды и нитроглицерина

87

Соколов Б. П., Шер Б. М., Козлов Е. А., Цветкова Т. А., Рудаков С. С., Дельвиг А. А., Калинин В. Н. Нарушение структуры коллагена I типа и наличие сшивок между цепями коллагенов I и III типов у больного с изолированной формой килевидной деформации грудной клетки

91

Чубукина А. Н., Златопольский А. Д., Зайденберг М. А., Бычкова В. В. Выделение различающихся по размерам и биологической активности пептидных фрагментов фибронектина с помощью аффинной хроматографии на иммобилизованном плазмине

103

Грибанов Г. А., Горшкова М. А. Сравнительный микроанализ липидов некоторых компонентов системы гемостаза

105

Бородин Е. А., Ландышев Ю. С., Савельева М. В. Структурно-функциональные свойства мембран эритроцитов у больных инфекционно-аллергической бронхиальной астмой

109

Гунько С. В., Леус Н. Ф. Активность Na, K-АТФазы как один из критериев в выделении группы риска по развитию позднего токсикоза при скрининге беременных

114

Сергеев И. Н., Плечитый К. Д., Руснак Ф. И., Спиричев В. Б. Рецепторы 1,25-дигидроксивитамина D<sub>3</sub> в лимфоцитах и уровень Т- и В-лимфоцитов у больных гломерулонефритом

117

#### Методы биохимических исследований

Щербань А. И., Лукашевич Л. В., Марчук С. И., Незжинец Е. А. Применение иммуноаффинной хроматографии для выделения раково-эмбрионального антигена

121

Меркулов А. Г., Шевченко О. П. Количественное иммуноферментное определение лактоферрина в сыворотке и плазме крови

125

Бычкова В. В., Берман А. Е. Выделение и очистка коллагеновых белков с помощью

Nagornaya, V. F. Elastase and its inhibitors in pathogenesis of ovary benign tumors

Gun'ko, S. V., Zaporozhan, V. N., Gun'ko, A. V., Nizova, N. N. Metabolic status of selenium in the group of pregnant women with rise of late toxicoses development

Kudryashov, B. A., Uljanov, A. M., Tarasov, Yu. A. Role of endogenous heparin in protection against risk factors responsible for experimental diabetes

Grozдова, I. D., Ivashkin, V. T., Klimov, N. P., Krekhnov, B. V., Mamaeva, E. G., Sveshnikova, E. V., Severin, E. S., Vasil'ev, V. Yu. Activity of protein kinases and content of cAMP in gastric mucosal membrane under conditions of non-malignant diseases

Kurbanov, I. S., Morvincev, P. I., Aliev, D. I., Vanin, A. F. Effects of thiol-containing preparations and iron on formation of nitric oxide from nitroprusside and nitroglycerol

Sokolov, B. P., Sher, B. M., Kozlov, E. A., Tsvetkova, T. A., Rudakov, S. S., Del'vig, A. A., Kalinin, V. N. Impairment in structure of collagen I and presence of cross-links between peptide chains of collagens I and III in the patient with isolated form of pigeon chest

Chubukina, A. N., Zlatopolsky, A. D., Zaidenberg, M. A. Isolation of fibronectin peptide fragments, dissimilar in their size and biological activity, by means of affinity chromatography on a column with immobilized plasmin

Gribanov, G. A., Gorshkova, M. A. Microanalysis of lipids in some components of the homeostasis system

Borodin, E. A., Landyshev, Yu. S., Savel'eva, M. V. Structure-functional properties of erythrocyte membranes in patients with bronchial asthma

Gun'ko, S. V., Leus N. F. Evaluation of risk groups for late toxicois in pregnant women screening using activity of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase as one of criterion

Sergeev, I. N., Plecity, K. D., Rusnak, F. I., Spirichev, V. B. Content of T and B lymphocytes as well as of the cell receptors to 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in patients with glomerulonephritis

#### Methods of Biochemical Investigations

Stcherban, A. I., Lukashevich, L. V., Marchuk, S. I., Nezhinets, E. A. Isolation of cancer-embryonal antigen by means of immunoaffinity chromatography

Merkulov, A. G., Shevchenko, O. P. Quantitative immunoenzymatic estimation of lactoferrin in blood serum and plasma

Bychkova, V. V., Berman, A. E. Isolation and purification of collagen by means of

Указатель

Index

Адрес редакции журнала:

Москва 109801, Солянка, 14

АМН СССР

Тел. 297-16-44

Зав. редакцией Л. А. Фирсова

Редактор К. И. Кочкарёва.  
Технический редактор Н. К. Евстигнеева.

Художественный редактор Р. Р. Катеева.  
Корректор З. П. Бабуева.

Сдано в набор 20.09.89. Подписано в печать 31.10.89. Формат 70×108<sup>1/16</sup>. Печать высокая.  
Усл. печ. л. 12,78. Усл. кр. отт. 13,30. Уч. изд. л. 15,42.  
Тираж 1528. Заказ 2263. Цена 1 р. 30 к.

Ордена Трудового Красного Знамени  
Издательство «Медицина» Москва 101000, Петровверигский пер., 6/8

Ордена Трудового Красного Знамени  
Чеховский полиграфический комбинат  
Государственного комитета СССР по печати  
142300, г. Чехов Московской области