

Архив журнала

Вопросы медицинской химии

ISSN 0042-8809

1990

Том 36 выпуск 2

Внимание! Распознавание текста проведено в автоматическом режиме для облегчения работы поисковых систем. Будьте внимательны при копировании, возможны ошибки и неточности. Используйте сканированный графический вариант.

Archive of journal

Voprosy meditsinskoi khimii

ISSN 0042-8809

1990

Volume 36 issue 2

Attention! OCR has been performed automatically for search engines only. Be careful when copying, errors are possible. Use scanned picture as standard.

<http://pbmc.ibmc.msk.ru>

Содержание малонового диальдегида в микросомах и митохондриях печени крыс с аллоксановым диабетом (в нмоль на 1 мг белка)

Перекисное окисление	Митохондриальная фракция		Наружная мембрана митохондрий		Внутренняя мембрана митохондрий		Микросомальная фракция	
	контроль (n=10)	диабет (n=10)	контроль (n=10)	диабет (n=9)	контроль (n=10)	диабет (n=8)	контроль (n=10)	диабет (n=10)
Аскорбатзависимое р	10,81±1,12	19,35±1,03 <0,001	7,56±0,98	16,68±1,13 <0,001	5,02±0,98	8,35±0,75 <0,05	16,25±1,50	25,55±2,00 <0,001
НАДФ·Н-зависимое р	9,08±1,02	14,06±1,30 <0,02	5,52±0,82	8,96±0,76 <0,001	5,09±1,30	7,95±0,98 <0,25	15,41±2,30	23,70±1,80 <0,001

Таблица 3

Содержание цитохромов b₅ и Р-450 и интенсивность гидроксилирования анилина в микросомах печени крыс с аллоксановым диабетом (в нмоль на 1 мг белка)

Показатель	Контроль (n=9)	Диабет (n=9)
Пара-аминофенол р	4,12±0,33	2,48±0,22 <0,01
Цитохром b ₅ р	0,56±0,05	0,42±0,04 <0,02
Цитохром Р-450 р	0,81±0,06	0,44±0,04 <0,001

ления липидов в развитии патологического состояния в неразрывной связи с изучением другого класса реакций микросомального окисления — реакций гидроксилирования. Этот процесс был изучен нами на примере окисления субстрата II типа — анилина — при одновременном контроле за количественным содержанием цитохромов b₅ и Р-450. Проведенные наблюдения показали, что у крыс с аллоксановым диабетом реакция гидроксилирования протекает намного медленнее, чем у интактных животных. Эти сдвиги сопровождаются также заметным снижением содержания цитохромов b₅ и Р-450 (табл. 3).

Интенсификация процессов перекисного окисления липидов при диабете, приводящая к значительному выходу продуктов свободнорадикального окисления липидов, оказывает повреждающее действие на мембраны эндоплазматического ретикула и главным образом на активность цитохромов b₅ и Р-450, являющихся мембранно-связанными липидзависимыми компонентами окислительной цепи.

Таким образом, комплекс патогенетических изменений, происходящих при диабете в печени, обусловлен существенными нарушениями в окислительных процессах, что позволяет правильно понять молекулярный механизм возникновения диабета и, следовательно, изыскать пути оптимизации лечебно-профилактических мероприятий, среди которых немаловажное значение будет иметь применение средств антирадикальной защиты биологических систем клетки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М., 1972. — С. 241—242.
2. Карагезян К. Г., Вартанян Г. С., Бадалян М. Г. // Бюл. экпер. биол. — 1980. — № 12. — С. 679—681.
3. Карагезян К. Г., Овсепян Л. М., Адонц К. Г. и др. // Биол. журн. Армении. — 1985. — № 7. — С. 570—575.

4. Карузина И. И., Арчаков А. И. // Современные методы в биохимии. — М., 1977. — С. 56—57; 60—61.
5. Тиракулов Я. Х., Саатов Т. С., Исаев Э. И. и др. // Пробл. эндокринол. — 1979. — № 2. — С. 54—67.
6. Awasthi J. C., Chuang T. F., Keenan T. W. et al. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1970. — Vol. 39, N 5. — P. 822—832.
7. Bartlett G. R. // J. biol. Chem. — 1959. — Vol. 234, N 3. — P. 466—468.
8. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // Ibid. — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265—275.
9. Omura T., Sato R. // Ibid. — 1964. — Vol. 239, N 7. — P. 2370—2378.
10. Shanailman C., Erwi H. W., Greenawalt J. U. // J. cell. Biol. — 1967. — Vol. 32, N 3. — P. 719—721.
11. Wojtczak L., Baranska I. et al. // Biochim. biophys. Acta. — 1971. — Vol. 249, N 1. — P. 41—52.

Поступила 13.06.89

OXIDATIVE REACTIONS AND PHOSPHOLIPIDS METABOLISM IN HEPATOCYTE MEMBRANES UNDER CONDITIONS OF ALLOXANE DIABETES

K. G. Karagezyan, L. M. Ovsepyan, K. G. Adontz

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

Total content of phospholipids and their individual components were distinctly increased in microsomal, mitochondrial fractions and in inner mitochondrial membrane of rat hepatocytes under conditions of alloxane diabetes. The concentrations of these substances were decreased in outer mitochondrial membrane. Activation of lipid free-radical oxidation was found in all the membrane structures studied. In microsomal fraction of hepatocytes the rate of hydroxylation reaction was decreased, accompanied by a decrease in content of cytochromes b₅ and P-450.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 615.919:598.121.015.4:612.1151.07

И. Б. Калмыкова, О. Б. Зайченко, Э. С. Садыков, Н. А. Барабанщикова, Л. Я. Юкельсон

ГЕМОКОАГУЛЯЦИОННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЯДА ЩИТОМОРДНИКА AGKISTRODON HALYS HALYS И ЕГО ТРОМБИНОПОДОБНОЙ ФРАКЦИИ

НИИ гематологии и переливания крови Минздрава Узбекской ССР, Институт биохимии АН Узбекской ССР, Ташкент

Использование протеиназ змеиных ядов для целей медицинской коагулологии неоднократно обсуждалось в литературе [5, 6]. В качестве препаратов таких протеиназ применялись целые яды змей, описаны методические приемы использования их для диагностики некоторых нарушений свертывания крови [1]. При детальном анализе

Тест	Контроль			Тромбин, актив- ность 1,1 ед/мл			0,1 % раствор яда щитомордника			0,1 % раствор агихала		
	М	т	σ	М	т	σ	М	т	σ	М	т	σ
Рекальцификация плазмы, с	124,0	4,6	11,2	—	—	—	25,25	1,4	2,5	10,43	1,93	4,7
Свертывание фибриногена, 2 г/л, с	—	—	—	71,0	2,2	8,3	Нет сгустка	—	—	8,5	0,5	1,5
Тромбиновое время, с	—	—	—	25,66	2,1	5,4	38,25	4,5	7,8	10,0	0,5	2,7
Свертывание плазмы при добавлении гепарина, 0,1 ед/мл, с	—	—	—	71,71	2,5	6,1	64,0	1,8	3,2	18,71	1,6	3,8
Свертывание плазмы без тромбоцитов, без CaCl ₂ , с	—	—	—	25,66	2,1	4,8	17,25	1,8	3,2	5,25	0,17	0,5
Свертывание плазмы, обработанной BaSO ₄ , ли- шенной VII, X, II факторов, с	—	—	—	34,12	1,8	5,2	39,75	3,95	6,8	7,75	0,3	0,98
Растворение сгустка из плазмы в 5 М мочеvine, с	52,0	1,5	4,8	Не растворяется			2,0	0	0	24,14	1,5	3,7

состава ядов в них выявлены компоненты со взаимноисключающим действием. Так, в яде щитомордника, рекомендованном ранее в диагностическом «анцистродоновом тесте» как препарат тромбиноподобного фермента [3], мы обнаружили протеазы, исключающие реализацию тромбиноподобного эффекта этого фермента [2, 4]. Поэтому очищение действующего начала от препятствующих его эффектам других компонентов ядов представляется абсолютно необходимым и не только при изготовлении диагностических реагентов, но и при использовании таких препаратов как средств коррекции гемостаза в организме человека и животных.

В настоящей работе представлены результаты сравнительного изучения гемокоагулирующего действия цельного яда обыкновенного щитомордника *Agkistrodon halys halys* и выделенной из него тромбиноподобной фракции, от которой отделены ферменты других белковых компонентов, препятствующих этому эффекту.

Методика

Исследования проведены на образцах плазмы, полученной от 3—5 доноров. Коагулологические тесты выполняли в соответствии с известными рекомендациями [1]. В экспериментах применяли препараты тромбина и фибриногена производства Каунасского предприятия бакпрепаратов, партии высушенного над хлористым кальцием яда обыкновенного щитомордника (коллекция 1985 г.) и его тромбиноподобную фракцию агихал, полученную в Институте биохимии АН Узбекской ССР; остальные реагенты отечественного производства имели квалификацию «хч» или «чда». Растворяющим агентом служила дистиллированная вода, так как физиологический раствор или буфер Михаэлиса, обычно используемые в коагулологических тестах, частично инактивируют яд и его тромбиноподобную фракцию.

Результаты и обсуждение

Данные о коагулологических свойствах цельного яда щитомордника и выделенной из него тромбиноподобной фракции представлены в таблице.

В тесте рекальцификации цитратной плазмы агихал действовал значительно эффективнее цельного яда щитомордника и по сравнению с контролем ускорял свертывание в 12 раз, тогда как яд — только в 5 раз. При действии на очищенный фибриноген агихал по сравнению с тромбином также ускорял образование сгустка фибрина (в 8—9 раз), тогда как в присутствии цельного яда фибриновый сгусток вовсе не фиксировался. Можно полагать, что в цельном яде щитомордника присутствуют несколько компонентов,

по-разному влияющих на свертывание крови. Эта точка зрения нашла подтверждение в наших последующих экспериментах. Так, в отличие от цельного яда, увеличивающего тромбиновое время плазмы, агихал уменьшал его в 2,5 раза, что может свидетельствовать о содержании в яде компонента, препятствующего действию тромбина. На роль этого компонента может претендовать белок с антикоагулянтными свойствами, препятствующий действию тромбиноподобного фермента, обнаруженный нами в яде щитомордника и отделенный от агихала в процессе его получения [2].

Помимо тромбиноподобного фермента и препятствующего его действию антикоагулянта, в цельном яде щитомордника содержатся фактор или факторы, стимулирующие свертывание крови по иному, чем тромбиноподобный эффект, механизмам. Так, различия в действии цельного яда на плазму и фибриноген могут быть обусловлены содержанием в яде факторов, влияющих на другие звенья каскада свертывания. По этой же причине гепарин, не влияющий на тромбиноподобные протеазы, подавляет коагулирующий эффект яда на плазме. Удаление из среды II, VII и X плазменных факторов гемостаза путем адсорбирования их на сульфате бария мало влияет на эффект агихала, но в 2 раза уменьшает стимулирующий свертывание эффект цельного яда щитомордника (см. таблицу).

Интересны физические свойства фибриновых сгустков, образованных под действием на плазму цельного яда и тромбиноподобной фракции. В первом случае сгустки имеют рыхлую структуру и практически сразу растворяются в 5 М мочеvine. Фибриновый сгусток, образуемый тромбиноподобной фракцией, также менее стабилен, чем в контроле; он быстро (за 24, 14 с) и полностью растворялся в 5 М мочеvine. Известно, что тромбиноподобные протеазы в отличие от тромбина не активируют фибринстабилизирующий фактор, что может объяснить меньшую стабильность сгустка, формируемого фракцией тромбиноподобного фермента в наших опытах. Еще меньшая стабильность сгустка обнаруживается при действии цельного яда щитомордника, что может свидетельствовать о содержании в яде дополнительных протеаз, тормозящих процесс тромбообразования. Данные исследования свидетельствуют о перспективности использования отдельных компонентов яда змей при исследованиях механизмов гемостаза.

1. Лабораторные методы исследования системы гемостаза / Балуда В. П., Баркаган З. С., Гольдберг Е. Д. — Томск, 1980.
2. Садыков Э. С., Барабаничкова Н. А., Шувалова И. А., Юкельсон Л. Я. // Химия природ. соединений. — 1985. — № 6. — С. 851—852.
3. Цыпкина Л. П., Колтакова С. И., Бакрадзе М. А. // Вопросы герпетологии. — Л., 1977. — С. 222—223.
4. Юкельсон Л. Я., Садыков Э. С., Барабаничкова Н. А., Сахибов Д. Н. // Химия природ. соединений. — 1985. — № 6. — С. 850—851.
5. Seegers W. H., Ouyang C. // Snake Venoms / Ed. Ch. Yu. Lee. — New York, 1979. — P. 684—750.
6. Stocker K. // Natural Toxins / Eds D. Eaker, T. Wadström. — New York, 1980. — P. 111—123.

Поступила 29.08.89

HEMOCOAGULATION PROPERTIES OF VENOM AND ITS THROMBIN-LIKE FRACTION FROM AGKISTRODON HALYS HALYS

I. B. Kalmykova, O. B. Zaychenko, E. S. Sadykov,
N. A. Barabantschikova, L. Ya. Yukelson

Institute of Hematology and Blood Transfusion, Ministry of Public Health of the Uzbek SSR, Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Uzbek SSR, Tashkent

Venom and its fraction with hemocoagulation properties from *Agkistrodon halys halys* exhibited dissimilar effects on blood plasma and fibrinogen preparation. The major component of this fraction proved to be a thrombin-like enzyme, properties of which were studied by means of several coagulation tests. Dissimilarity in coagulating effects of the venom and its thrombin-like fraction as well as different physical properties of blood clots formed after their action suggest that the venom from *Agkistrodon halys halys* contained other protein factors affecting blood coagulation besides the thrombin-like proteases.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 615.356:577.161.3].015.2:[615.216.2+615.214.2].015.4:616.36-018.1.576:314

В. И. Шаранов, О. Р. Грек, А. А. Зыков

ВЛИЯНИЕ α -ТОКОФЕРОЛА И ЛИДОКАИНА НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ ПЕРЕСТРОЙКУ МЕМБРАН ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА ПЕЧЕНИ ПРИ ИНДУКЦИИ ФЕНОБАРБИТАЛОМ В ПОСТИШЕМИЧЕСКОМ ПЕРИОДЕ

Новосибирский медицинский институт, Институт физиологии Сибирского отделения АМН СССР

В проведенных ранее исследованиях показано, что транзиторная ишемия печени сопровождается ингибированием активности ферментов монооксигеназной системы и ограничением индуктивного ответа на фенобарбитал (ФБ) в постишемическом периоде [4, 6, 14]. Снижение активности микросомальных гидроксилазных реакций сопряжено с изменениями жирно-кислотного состава, гидрофобных свойств и структурной организации эндоплазматического ретикулума гепатоцитов в восстановительном периоде после ишемии [13, 14].

Пусковыми факторами в повреждении фосфолипидов микросомальных мембран при ишемии являются активация перекисного окисления липидов и эндогенных фосфолипаз [1, 8, 11]. В связи с этим профилактическое введение совместного антиоксидантов и ингибиторов фосфолипаз предупреждало значительные нарушения гидроксилаз-

ной активности монооксигеназных ферментов печени после ишемического воздействия [4, 7, 12]. Однако механизмы, лежащие в основе нарушения индуктивного ответа микросомальных монооксигеназ на ФБ в постишемическом периоде, остаются неизученными.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния комбинированного введения α -токоферола и лидокаина на изменения жирно-кислотного состава, гидрофобных свойств микросомальных мембран и индуцируемости монооксигеназных ферментов при введении ФБ в восстановительном периоде после 30-минутной тотальной ишемии печени.

Методика

Эксперименты выполнены на 350 крысах-самцах линии Вистар массой 200—250 г. Тотальную ишемию печени создавали пережатием печеночной артерии и воротной вены на 30 мин как описано ранее [6].

В I серии опытов животным в постишемическом периоде вводили ФБ в дозе 50 мг/кг 1 раз в сутки в течение 4 дней до декапитации на 7, 14, 21-е сутки. Во II серии опытов предварительно до окклюзии сосудов печени животным вводили α -токоферол (100 мг/кг внутривенно за 12 ч) и лидокаин (10 мг/кг внутривенно за 1 ч до операции). ФБ в постишемическом периоде вводили по указанной выше схеме до декапитации животных на 7-е и 14-е сутки. Контролем в этих сериях служили индуцированные ФБ крысы. В III серии опытов после предварительного совместного введения α -токоферола и лидокаина в аналогичных дозах животных декапитировали на 1, 3, 7, 14, 21-е сутки постишемического периода. Контролем в этой серии служили животные, получавшие до операции физиологический раствор.

Микросомальную фракцию печени выделяли дифференциальным центрифугированием [2]. Структурные перестройки мембран эндоплазматического ретикулума (ЭР) регистрировали по изменению жирно-кислотного состава и параметров связывания гидрофобного флуоресцентного зонда 1-анилинонафталин-8-сульфоната (1,8-АНС) с мембранами микросом. Общую фракцию микросомальных липидов экстрагировали по методу Folch и соавт. [16]. Жирно-кислотный состав липидной фракции микросом определяли методом газовой хроматографии на приборе «Хром-4» как описано ранее [13]. Рассчитывали относительное содержание индивидуальных жирных кислот, суммарное содержание насыщенных и ненасыщенных жирных кислот и индекс насыщенности — ИН (отношение суммы насыщенных жирных кислот к сумме ненасыщенных). Способность микросомальных мембран связывать 1,8-АНС изучали методом двойных обратных величин [3] как описано ранее [13]. Рассчитывали константу связывания для 1,8-АНС (K_s), концентрацию центров связывания для 1,8-АНС на мембране (N) и суммарное сродство зонда ($K_s N$) к мембране микросом. Флуоресценцию связанного зонда измеряли на флуоресцентном спектрофотометре MPF-4 («Hitachi», Япония). Длина волны возбуждения 360 нм, флуоресценции 480 нм.

О функциональной перестройке микросомальных мембран судили по изменению активности ферментов монооксигеназной системы печени после введения ФБ. В микросомальной фракции определяли концентрацию цитохромов P-450 и b_5 [22], скорость амидопирин-N-деметилазной и анилин-N-гидроксилазной реакций [9] в указанные выше периоды после ишемии. Спектральную константу диссоциации (K_s) для анилина, характеризующую сродство цитохрома P-450 к субстрату, определяли по методу Schenkman и соавт. [26]. Определение максимального связывания анилина с цитохромом P-450 (ΔA_{\max}), отражающего концентрацию «связывающего белка» цитохрома, проводили согласно описанию Kato и соавт. [18]. Измерения выполняли на спектрофотометре «Hitachi-356» (Япония). Концентрацию белка в микросомах определяли методом Lowry и соавт. [19]. Полученные результаты обработаны общепринятыми статистическими методами с использованием критерия *t* Стьюдента.

Результаты и обсуждение

У интактных животных введение ФБ вызывало увеличение суммарного содержания ненасыщенных жирных кислот в липидах микросом и сни-