

ТОМ 36

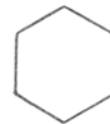
ВЫПУСК 3

МАЙ — ИЮНЬ

# ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.



## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

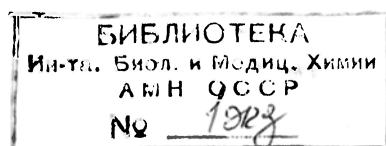
Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. А. ТУТЕЛЬЯН (зам. редактора), А. И. АРЧАКОВ, И. П. АШМАРИН, Т. Т. БЕРЕЗОВ,  
Ю. В. БУКИН, А. В. ВАСИЛЬЕВ, Е. Н. ГЕРАСИМОВА, В. З. ГОРКИН, И. Б. ЗВАРСКИЙ,  
В. Л. КОЗЕЛЫЦЕВ (ответственный секретарь), А. Н. КЛИМОВ, Б. Ф. КОРОВКИН,  
Л. А. ЛЮКШИНА, В. Н. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАНЧЕНКО, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ,  
Ю. А. РОМАКОВ, В. А. САКС, С. Е. СЕВЕРИН, В. Б. СПИРИЧЕВ, Е. А. СТРОЕВ

## 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)  
ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)



## ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЛКОВО-ПЕПТИДНЫХ ГОРМОНОВ МЕТОДАМИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ (ОБЗОР)

Институт биоорганической химии СО АН СССР, Институт клинической и экспериментальной медицины СО АМН СССР, Новосибирск

С развитием технологии рекомбинантных дезоксирибонуклеиновых кислот (ДНК) исследователи получили комплекс методов, имеющих широкие перспективы использования в молекулярной биохимии белково-пептидных гормонов.

Создание эффективных методов выделения матричных рибонуклеиновых кислот (мРНК) из эукариотических тканей, усовершенствование бесклеточных систем трансляции мРНК, разработка систем обратной транскрипции, а также развитие методов определения первичной структуры нуклеиновых кислот позволили выделить специфические мРНК для целого ряда белково-пептидных гормонов, синтезировать на них ДНК-копии и расшифровать первичную структуру таких комплементарных ДНК — кДНК (а следовательно, и мРНК, и самих гормонов-полипептидов).

Молекулярное клонирование фрагментов геномной ДНК в сочетании с методами дот- и блотгибридизации дает возможность выделить, а затем проанализировать структуру генов, кодирующих большую часть известных белково-пептидных гормонов. кДНК, синтезированные на специфических мРНК пептидных гормонов, а также клонированные фрагменты соответствующих генов являются высокочувствительными зондами для молекулярной гибридизации. Они позволяют вести анализ полиморфизма генов, кодирующих пептидные гормоны, исследовать изменения содержания специфических мРНК для пептидных гормонов в тканях при различных функциональных состояниях.

На основе клонированных специфических кДНК стало возможным создание бактериальных штаммов — продуцентов биологически активных пептидных гормонов. Усовершенствование бактериальных систем экспрессии клонированных кДНК и разработка эукариотических систем экспрессии клонированных генов позволяют создать еще более эффективные штаммы — продуценты белково-пептидных гормонов для нужд здравоохранения и народного хозяйства.

В настоящем сообщении приводится краткий обзор генно-инженерных методов, имеющих перспективы в молекулярной биохимии белково-пептидных гормонов, и рассмотрено использование комплекса таких методов для изучения структуры и генетической регуляции одного из белковых гор-

монов — проопиомеланокортина (ПОМК) гипофиза млекопитающих.

### Методы выделения мРНК и клонирования кДНК

Источником выделения специфических мРНК, кодирующих белково-пептидные гормоны, служат ткани эндокринных желез млекопитающих, продуцирующие эти гормоны. Содержание мРНК для белково-пептидных гормонов в тканях желез варьирует в зависимости от интенсивности продукции и секреции этих белков от нескольких долей до десятков процентов (0,1—10) [4, 38, 81].

Для выделения таких мРНК используют в основном 2 методических подхода (рис. 1). При достаточно высоком содержании мРНК в ткани ее выделяют сочетанием методов ультрацентрифугирования в градиентах плотности с препаративным электрофорезом в агарозных или полиакриламидных гелях [4—6, 16, 17, 38]. мРНК выделяют обычно из полирибосом, полученных из тканей стандартными методами [12, 20, 21, 72, 74, 85].

Перспективным, хотя и трудоемким, методом выделения специфических мРНК, отличающихся низким содержанием в тканях (минорных мРНК), является иммунохимическое фракционирование полирибосом с последующей экстракцией мРНК с помощью аффинной хроматографии на поли-У-сефарозе или олиго-(dT)-целлюлозе. Фракционирование (обогащение) полирибосом достигается путем хроматографии их на иммуносорбентах, содержащих специфические антитела, или с помощью непрямой иммунопреципитации с использованием двух типов антител [20, 72, 74, 83—85].

В последние годы для выделения суммарных мРНК широко применяют обработку тканей 4 М гуанидинизотиоцианатом [35, 92] или экстракцию 3 М LiCl с 8 М мочевиной [28].

ДНК-копии мРНК, выделенных и охарактеризованных с помощью бесклеточной трансляции, получают с помощью обратной транскриптазы из вируса миелобластома птиц (AMV) [2, 16, 29, 34].

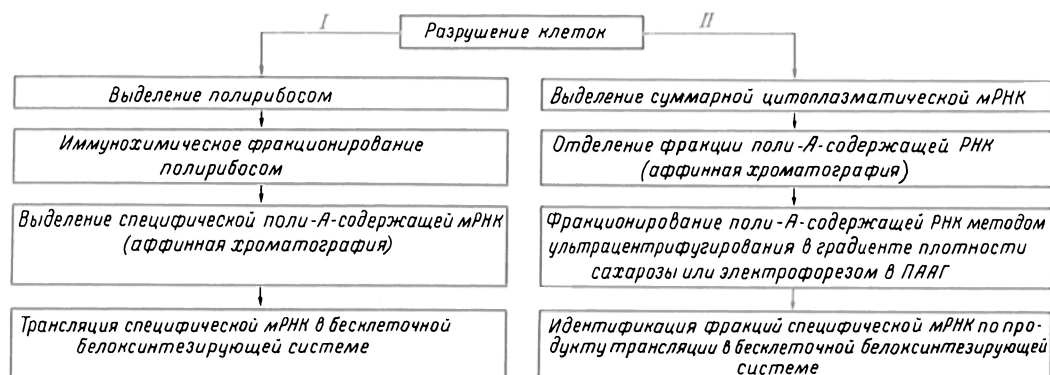
В качестве затравки для ревертазы обычно служат олигонуклеотиды, состоящие из остатков dT (олиго-dT). В тех случаях, когда известна последовательность 3'-концевой области мРНК, можно применять синтетические олигонуклеотиды, комплементарные этой области.

Клонирование (амплификация) кДНК осуществляют в составе векторных плазмид и бактериофагов, используя стандартную методику работ с рекомбинантными ДНК, подробно описанную в современных руководствах [16, 18, 23, 46—49]. Наиболее употребительным является коннекторный метод клонирования кДНК (рис. 2) [11]. Для клонирования полноразмерных кДНК весьма эффективно применяется схема Окаямы — Берга [69].

При использовании коннекторного метода клонирования синтез второй цепи кДНК проводят



Рис. 1. Две стратегии выделения мРНК из эукариотических клеток.



с помощью обратной транскриптазы AMV, используя 3'-конец первой цепи в качестве самозатравки. Образовавшаяся на 3'-конец «шпильку» гидролизуют, обрабатывая смесь  $S_1$ -нуклеазой, а затем с помощью терминальной дезокси-нуклеотидилтрансферазы на 3'-концах цепей кДНК синтезируют коннекторы (поли-Г или поли-Ц) (см. рис. 2). При этой схеме клонирования возможно также использование синтетических затравок (олиго-А или олиго-Т) или олигонуклеотидов, комплементарных 3'-концевому участку первой цепи кДНК.

При клонировании кДНК по схеме Окаямы—Берга [69] в качестве праймера служит олиго-дТ-последовательность, пришитая к линейаризованной плазмидой ДНК. Такой прием позволяет с большим выходом получать полноразмерные копии мРНК и заметно облегчает саму процедуру клонирования.

Современные методы генной инженерии позволяют синтезировать полноразмерные кДНК на специфических мРНК, кодирующих белково-пептидные гормоны, и, осуществив клонирование кДНК в векторных молекулах, получить достаточное количество материала для определения его первичной структуры (последовательности нуклеотидов). Использование перечисленных методов позволило к настоящему времени выделить специфические мРНК, синтезировать кДНК и определить первичную структуру более 10 белково-пептидных гормонов.

#### Методы анализа первичной структуры нуклеиновых кислот

Наиболее широко используемыми методами быстрого определения нуклеотидных последовательностей ДНК являются химический метод Максама—Гилберта [15] и метод дидеокситерминации цепи, предложенный F. Sanger и соавт. [82]. В методе Максама—Гилберта в качестве субстратов используются фрагменты ДНК, несущие радиоактивную метку в одном из концов. Для меченения ДНК обычно применяют ферментативное введение в конец одно- или двухцепочечного фрагмента [ $^{32}\text{P}$ ]-фосфата или [ $^{32}\text{P}$ ]-меченного нуклеотида. Чаще всего используются 3 фермента и 3 меченых субстрата. Это полинуклеотидкиназа и [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]-АТФ для 5'-концов, терминальная трансфераза и [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]-рибонуклеозидтрифосфаты для 3'-концов, а также ДНК-полимераза и [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]-дезоксинуклеозидтрифосфаты, которыми осуществляется достройка липких концов, образующихся при гидролизе ДНК многими рестрик-

тазами. Последний способ также дает 3'-меченые концы, но отличается тем, что позволяет вводить метку избирательно в один из концов двухцепочечного фрагмента, если они отличаются по структуре 5'-выступающих концов. Это достигается за счет введения в реакционную смесь соответствующего набора меченых и немеченых дезокси-нуклеозидтрифосфатов.

Двухцепочечную ДНК, меченную с обоих концов, или подвергают расщеплению подходящей рестриктазой с последующим выделением образующихся меченных с одного конца субфрагментов, или разделяют цепи фрагмента ДНК с помощью гель-электрофореза. Полученный тем или иным способом фрагмент ДНК, содержащий метку в одном из концов, разделяют на 4 порции и подвергают частичному химическому расщеплению специфично к определенным основаниям.

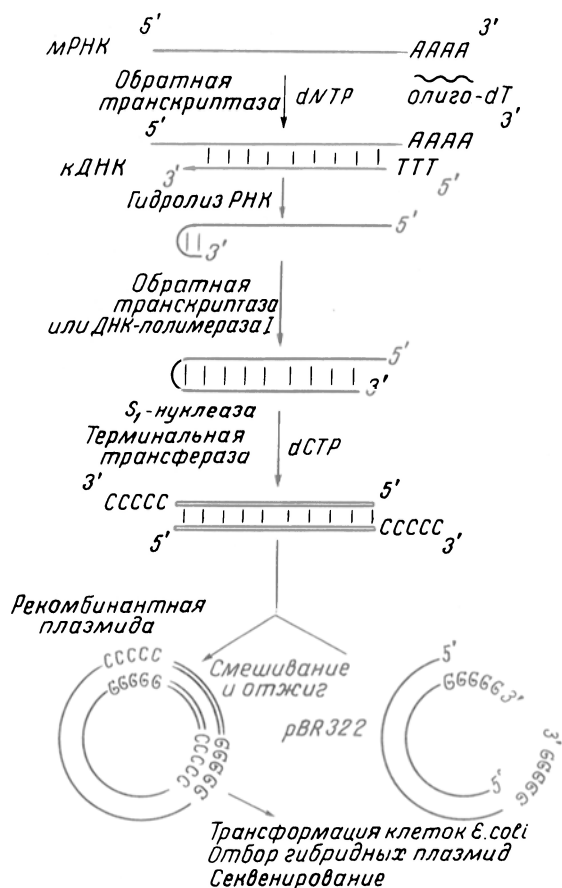


Рис. 2. Схема клонирования кДНК в составе векторных плазмид с помощью коннекторного метода.

Условия гидролиза подбирают таким образом, чтобы на анализируемую область молекулы ДНК приходился в среднем 1 разрыв. Наиболее часто используют следующую комбинацию реакции: модификацию по остаткам гуанина осуществляют диметилсульфатом, выщелачивание пуриновых оснований проводят муравьиной кислотой, разрушение пиримидиновых оснований осуществляют водным гидразином, избирательный гидролиз по остаткам цитозина проводят водным гидразином в присутствии хлористого натрия. Завершающей стадией во всех случаях является расщепление цепи ДНК по модифицированному участку под действием пиперидина.

Продукты специфического частичного химического гидролиза разделяют по длине электрофорезом в высокоразрешающем денатурирующем полиакриламидном геле (ПААГ). Следующий этап — радиоавтография этого геля. Последовательность нуклеотидов считывают с радиоавтографа, отмечая какой из специфических к основанию агент расщепляет каждый из последующих нуклеотидов вдоль цепи.

Метод Максама—Гилберта позволяет определять последовательность до 600 нуклеотидов от меченого конца фрагмента ДНК, если использовать для разделения продуктов специфического гидролиза несколько гелей разной процентности.

Другой метод определения последовательности нуклеотидов, ДНК, разработанный F. Sanger и соавт. [82], основан на способности ДНК-полимеразы правильно синтезировать комплементарную радиоактивную копию одноцепочечной ДНК-матрицы с использованием в качестве затравки короткого фрагмента ДНК. Синтез ДНК проводят в присутствии 4 дезоксинуклеозидтрифосфатов (ddNTP), один (или более) из которых помечен [ $^{32}\text{P}$ ], добавляя в каждую из 4 отдельных реакционных смесей 1 из дидезоксинуклеозидтрифосфатов (ddNTP) — аналогов dNTP. Случайное включение в синтезирующуюся цепь ДНК ddNTP приводит к терминации роста цепи. Следовательно, в каждой реакции образуется популяция частично синтезированных молекул ДНК, меченных [ $^{32}\text{P}$ ] и имеющих одинаковые 5'-концы, но отличающихся расстоянием до 3'-концов, оканчивающихся одним и тем же основанием. Последующее разделение полученных фрагментов по длине в денатурирующем ПААГ, радиоавтография и чтение последовательности осуществляются так же, как и в методике Максама—Гилберта.

Ранее главной проблемой при анализе первичной структуры методом F. Sanger было получение одноцепочечной матрицы. Для этой цели использовали несколько процедур, в частности гидролиз экзонуклеазой III из *E. coli* [88]. Широкому распространению метода дидезокситерминации цепи способствовало появление серии векторов для клонирования ДНК на основе однонитевого бактериофага M13 [60]. Исследуемый фрагмент встраивают в двухцепочечную репликативную форму ДНК-фага, который трансфицируют клетки *E. coli*. Размножение фага M13 в клетках *E. coli* не сопровождается их лизисом, синтезируемые частицы фага непрерывно поступают из клеток в культуральную среду и легко могут быть получены в чистом виде. В зрелые фаговые

частицы упаковывается исключительно одноцепочечная +-форма ДНК, поэтому получение матрицы для анализа сводится к извлечению ДНК фенольной депротенинизацией препарата фага. В качестве затравки для ДНК-полимеразного синтеза используется синтетический олигонуклеотид, комплементарный участку ДНК векторного фага, расположенному в непосредственной близости от встроенного фрагмента. Таким образом, можно анализировать первичную структуру различных фрагментов, применяя одну и ту же затравку. В последние годы предложен ряд схем, которые позволяют получить набор перекрывающихся делеционных вариантов анализируемого фрагмента в составе ДНК-фага M13. Секвенирование таких гибридных ДНК дает возможность определять первичную структуру протяженных участков генома со скоростью до тысячи нуклеотидов в день.

#### *Компьютерный анализ секвенированных последовательностей*

Огромный объем информации, которую дают методы анализа первичной структуры нуклеиновых кислот, делает абсолютно необходимым использование компьютерной техники начиная от стадии считывания нуклеотидных последовательностей с радиоавтографа и кончая поиском общих закономерностей структурно-функциональной организации ДНК и подготовкой материалов к публикации.

Совершенствование методов секвенирования привело к тому, что лимитирующей стадией работы становится чтение последовательностей с радиоавтографа и накопление полученной информации. С целью облегчения этой стадии созданы специальные устройства, соединенные с ЭВМ, и специальные программы, позволяющие производить сборку вводимых фрагментов последовательности, считываемых с радиоавтографов, в единую целевую последовательность [45].

Для хранения, поиска и обработки нуклеотидных последовательностей созданы специальные автоматические системы — банки нуклеотидных последовательностей. К наиболее известным относятся Лос-Аламосский банк и банк М. Дайхофф в США, Гейдсельбергский банк ЕМВО в Европе. В СССР создан Всесоюзный банк нуклеотидных последовательностей [1].

Существует большое количество программ, позволяющих проводить компьютерный анализ результатов секвенирования (см. например, специальный выпуск журнала «Nucleic Acids Research», 1982, № 1; 1984, № 1; 1986, № 1, а также обзор [1]).

Основные задачи, решаемые с помощью такого рода программ, следующие.

1. Поиск определенных участков нуклеотидных последовательностей, таких, как сайты действия рестриктаз, консервативные участки, характерные для различных регуляторных элементов генома, и т. д.

2. Поиск участков ДНК, обладающих симметрией второго порядка, которые играют важную функциональную роль. Они или необходимы для связывания регуляторных белков, или отражают тот факт, что считываемая с этого участка одноцепочечная РНК образует определенную вторич-

ную структуру, необходимую для ее функционирования.

3. Поиск внутренних прямых и инвертированных повторов.

4. Сравнение различных нуклеотидных последовательностей, позволяющее выявлять степень эволюционного родства организмов, находить наиболее гомологичные районы в близких по функциям генах.

5. Перевод нуклеотидной последовательности в аминокислотную.

6. Статистический анализ последовательностей.

Программы, позволяющие решать эти задачи, а также ряд других, в конечном счете служат решению главной задачи — извлечению всей закодированной в ДНК информации.

*Экспрессия генов пептидных гормонов. Промежуточные векторы. Продукты пептидных гормонов, сконструированные методами генной инженерии*

Благодаря разработке методов бесклеточного синтеза белка в системах из зародышей пшеницы [70, 80], асцитных клеток и ретикулоцитов кролика стало возможным проведение «инвентаризации» мРНК пептидных гормонов. Было установлено, что все «большие» пептидные гормоны и прогормоны синтезируются начиная с  $\text{NH}_2$ -концевого сигнального пептида [25, 38]. При этом ПОМК [58, 79] и нейрозин [39] являются полипротеинами, состоящими из нескольких полипептидов. Рядом исследователей показано, что гонадотропные гормоны и тиреотропин, состоящие из двух субъединиц, кодируются двумя различными мРНК [50, 63]. При исследовании первичной структуры ДНК-копий мРНК, кодирующих пептидные гормоны, и изучении процесса созревания мРНК *in vivo* и *in vitro* установлено, что образование зрелых биологически активных гормонов из их предшественников происходит в основном четырьмя способами, как показано на рис. 3 [22, 38, 62, 64].

Выяснилось, что один из предшественников опиоидных пептидов — препроэнкефалин содержит в своей структуре несколько одинаковых ко-

пий одного пептида — энкефалина [25, 38]. В результате анализа структуры гена и применения метода РНК-блотгибридизации показано, что при транскрипции гена кальцитонина образуется первичный транскрипт, который процессирует в клетках гипоталамуса и щитовидной железы с образованием различных мРНК [26, 31]. Предполагают, что путем альтернативного сплайсинга образуются множественные формы тропонина Т в скелетных мышцах кур [38, 49]. Обнаружена также структурная гетерогенность сигнальных пептидов препросоматостатина [37]; показано существование 2 форм мРНК пролактина в гипофизе грызунов [52].

При трансформации бактериальных клеток плазмидами, содержащими наряду с эукариотической кДНК регуляторные элементы реципиента, в ряде случаев удается получить продукцию больших количеств биологически активных целевых белков. При работе с бактериальными системами применяются в основном 2 схемы получения генно-инженерных белковых продуктов.

В первой схеме используют конструкции, обеспечивающие синтез индивидуального белка в бактериальной клетке. Во второй схеме идут по пути получения искусственного белка, содержащего трансляционно слитые последовательности прокаримического и целевого белков. В качестве начальной аминокислотной последовательности во второй схеме чаще всего используют  $\beta$ -галактозидазу, находящуюся под контролем Лас-промотора [56]. Конструирование гибридных белков обычно используется при экспрессии небольших пептидов, поскольку индивидуальные пептиды быстро деградируют в клетках *E. coli* под действием пептидаз. В виде химерных белков, включающих  $\beta$ -галактозидазу, были получены соматостатин, лей-энкефалин ( $2 \cdot 10^5$  мол/клетку) [86];  $\beta$ -эндорфин (5 % клеточного белка) [87],  $\alpha$ -неоэндорфин ( $5 \cdot 10^5$  мол/клетку) [91] и ряд других пептидов.

Другой перспективный подход заключается в получении конструкций, в которых целевой пептид слит с фрагментом белка А из *Staphylococcus aureus*, который обладает способностью специфически связываться с IgG. Для получе-

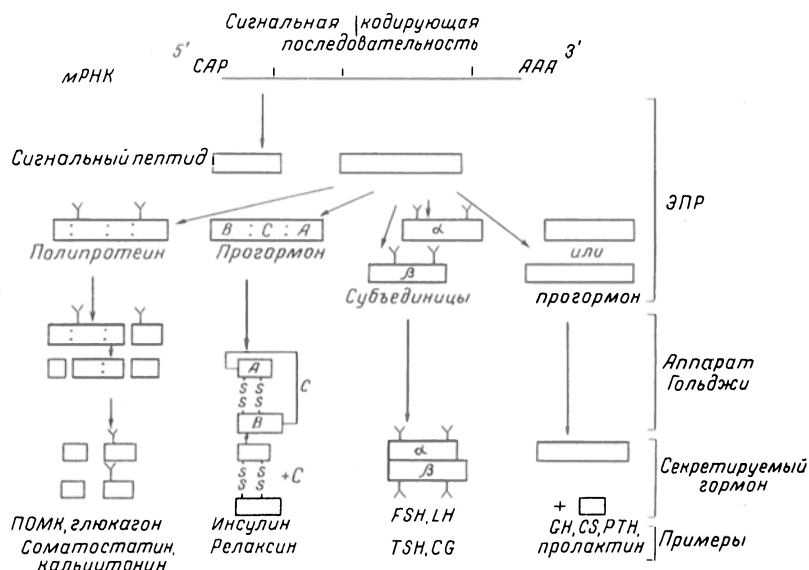


Рис. 3. Альтернативные пути синтеза, процессинга и сборки пептидных гормонов [38].

ния таких химерных белков используются специально сконструированные плазмиды [18, 23, 49]. Экспрессирующийся в прокариотических клетках слитый белок легко очищается аффинной хроматографией на колонке с IgG-сефарозой 6FF. Целевой пептид можно отделить от белка А с помощью кислотного гидролиза по участку Asp—Pго, специально введенному в место стыка. Выделение чистого пептида можно осуществить с использованием той же аффинной колонки.

Таким образом, в частности, удалось наработать и выделить чистый препарат биологически активного человеческого инсулиноподобного фактора роста (IGF-I) [65, 66]. В виде индивидуальных («чистых») белков к настоящему времени получен ряд пептидных гормонов, в том числе инсулин, соматотропин [38, 49, 71] и интерферон [93]. При использовании этой схемы для увеличения продукции целевого белка принципиальное значение имеет выбор адекватных промоторных систем, специфичных для каждого генно-инженерного варианта.

В настоящее время активно разрабатываются системы, пригодные для экспрессии чужеродных белков в эукариотических клетках [23, 40]. Такие системы незаменимы при синтезе белков, подвергающихся посттрансляционному процессингу и модификации.

#### *Рестрикционное картирование при анализе генетического полиморфизма генов пептидных гормонов*

В последние годы молекулярные зонды, представляющие собой клонированные кДНК белково-пептидных гормонов или соответствующие им фрагменты геномной ДНК, все более широко используют для анализа полиморфизма длины рестрикционных фрагментов соответствующих генов [27, 53, 76]. ДНК, необходимую для проведения анализа, получают обычно из лимфоци-

тов крови и затем подвергают гидролизу специфическими эндонуклеазами рестрикции.

Анализируемый ген имеет характерное число и расположение сайтов рестрикции, опознаваемых определенными рестриктазами, и соответствующий участок ДНК образует при гидролизе специфический набор фрагментов (рестриктов), определенным образом располагающихся на электрофореграмме. Визуализацию таких рестриктов гена осуществляют с помощью гибридизации с молекулярным зондом — изотопно меченной клонированной кДНК и последующей радиоавтографии. В случае структурных изменений в анализируемом гене может измениться число и расположение сайтов рестрикции и соответственно изменится число и расположение рестриктов гена на электрофореграмме (радиоавтографе). Такой анализ отражает изменения в первичной структуре (нуклеотидных последовательностях) исследуемых генов и уже используется при изучении полиморфизма генов инсулина человека [76]. Перспективным представляется применение таких методов для выявления полиморфизма генов других белково-пептидных гормонов — соматотропина, пролактина, проопиомеланокортина в организме людей с эндокринной патологией, и здоровых.

#### *Изучение уровня синтеза мРНК с помощью метода молекулярной гибридизации*

Основным методом измерения концентрации (индуцируемой) мРНК в тканях является гибридизация со специфической кДНК. Исследуя кинетику гибридизации мРНК с кДНК, можно рассчитать число различных РНК-последовательностей в ткани и число копий каждого вида мРНК на клетку. Использование метода гибридизации РНК со специфическими кДНК позволяет исследовать влияние различных регуляторных факторов на процесс транскрипции. Например, сравнивая по гибридизации образцы мРНК, выделенные из тканей с различным гормональным статусом, удастся выявить индуцируемые гормонами специфические типы мРНК [30, 73].

Молекулярная гибридизация мРНК—кДНК и ДНК—кДНК может осуществляться в нескольких вариантах: 1) в разведениях гибризируемого материала на миллионистых нитроцеллюлозных фильтрах — дотгибридизация; 2) на фильтрах — отпечатках с бактериального газона, содержащих иммобилизованную нуклеиновую кислоту клонов (гибридизация *in situ*); 3) на электрофореграммах нуклеиновых кислот или фильтрах — отпечатках с электрофореграмм — блотгибридизация (рис. 4).

В качестве зондов для молекулярной гибридизации используют клонированные кДНК. Комплементарные ДНК можно использовать в составе векторных плазмид или в составе одноцепочечного бактериофага M13 [59]. В первом случае изотопную метку вводят в состав молекулярного зонда с помощью ник-трансляции, а во втором — с помощью большого фрагмента ДНК-полимеразы I с использованием специфического олигонуклеотидного праймера [54].

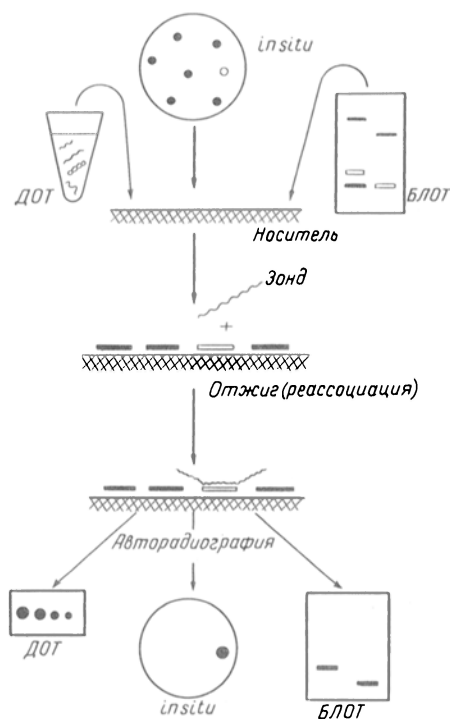


Рис. 4. Схема вариантов молекулярной гибридизации мРНК—кДНК и ДНК—кДНК.

Небольшие (точечные) структурные изменения в нуклеотидной последовательности гена можно зарегистрировать с помощью метода, предложенного группой авторов [61]. Принцип метода заключается в следующем. Синтезированный *in vitro* [ $^{32}\text{P}$ ]-меченный РНК-зонд, кДНК дикого типа, отжигают с тестируемой ДНК, которая содержит 1 нуклеотидную замену. Участок неспаривания в образовавшемся гетеродуплексе расщепляют РНКазой А, а затем определяют место разрыва, анализируя длины продуктов гидролиза с помощью гель-электрофореза. Этот подход был успешно опробован авторами в экспериментах по детекции точечных мутаций в ДНК пациентов, больных  $\beta$ -талассемией.

**Структурный анализ ДНК, комплементарных мРНК проопиомеланокортина гипофиза быка, человека и крысы. Изучение гормональной регуляции содержания мРНК — проопиомеланокортина в гипофизе крысы.**

Известно, что гормоны гипофиза — аденокортикотропин (АКТГ) и  $\beta$ -липотропин ( $\beta$ -АТГ), а также их производные —  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -меланоцитстимулирующие гормоны (МСГ), кортикотропиноподобный полипептид, эндорфин и энкефалин являются продуктами процессинга одного белка-предшественника — ПОМК [22, 55, 57, 63, 64]. Синтез и созревание этих гормонов осуществляется преимущественно в передней и промежуточной долях гипофиза [22, 32, 38, 55, 68, 78].

Один и тот же белок-предшественник ПОМК расщепляется (процессируется) на разные пептидные продукты в передней и промежуточной долях гипофиза. В результате образуются комплексы биологически активных пептидов, действующих на разные рецепторы и выполняющих различающиеся физиологические функции [22, 38, 55, 68] (рис. 5).

Известно, что производные морфина взаимодействуют с высокоспецифичными рецепторами, присутствующими в определенных участках мозга. В частности, они взаимодействуют с системами нейронов, ведающими болевыми ощущениями. Опиоидные пептиды (эндорфины, энкефалины) также взаимодействуют с опиатными рецепторами [55].

К настоящему времени в ряде лабораторий клонированы и секвенированы следующие мРНК (кДНК), кодирующие синтез главных белков — предшественников опиоидных пептидов: 1) ДНК-копии мРНК, кодирующих предшественник  $\beta$ -эндорфина (и энкефалина) — ПОМК [33, 36, 42, 44, 67, 68, 90]; 2) ДНК-копии мРНК, кодирующих предшественник многократно повторяющихся мет-энкефалина и лей-энкефалина — препроэнкефалин А [25, 55]; 3) ДНК-копии мРНК, кодирующих предшественник  $\beta$ -неоэндорфина/динорфина, названный предпроэнкефалином В [25, 55]. В результате этих работ сложилось представление о 3 главных первичных белках-предшественниках, из которых образуются опиоидные пептиды [22, 55].

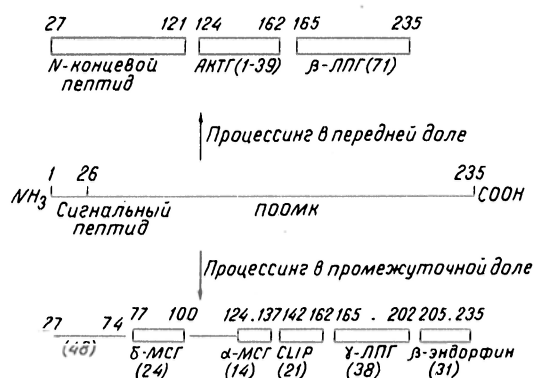


Рис. 5. Схема процессинга ПОМК в передней и промежуточной долях гипофиза.

Спектр действия эндогенных опиоидных пептидов и родственных им соединений в организме очень широк. К числу физиологических функций эндогенных опиоидов относятся такие, как защита организма от вредных воздействий, модуляции вегетативной нервной системы, нейроэндокринной функции, поведенческих реакций [55]. Физиологические эффекты опиоидов суммированы.

Физиологические функции эндогенных опиоидов [55].

1. Защита от вредных воздействий: активация гипофизарно-адренокортикоидной системы; регуляция симпатико-адреналовой системы; ингибирование болевой чувствительности.
2. Модуляция вегетативной нервной системы: сердечно-сосудистая и респираторная система; желудочно-кишечный тракт; мочеполовой тракт.
3. Модуляция нейроэндокринной функции: гормоны передней и задней доли гипофиза; желудочно-кишечные и печеночные гормоны; катехоламины.
4. Воздействие на поведение: двигательная и эмоциональная активность; потребление пищи и воды; сексуальное поведение.

Можно думать, что нарушение систем регуляции синтеза вышеназванных пептидов в организме приведет к существенным функциональным нарушениям. Принципиальное значение приобретает выяснение закономерностей экспрессии генов, кодирующих основные белки — предшественники опиоидных пептидов, в частности гена ПОМК, а также выяснение структурно-функциональной организации этих генов.

Нами выполнены работы по выделению мРНК из гипофиза быка, крысы и человека, синтезу и клонированию соответствующих специфических кДНК—ПОМК.

Проведен сравнительный анализ известных нуклеотидных последовательностей ДНК, кодирующих ПОМК 7 видов животных и человека, с целью выявления особенностей их структурно-функциональной организации. Все расчеты осуществлялись на ПЭВМ «Apple II» при помощи специально разработанного нами пакета программ. При выравнивании аминокислотных последовательностей степень сходства оценивали по

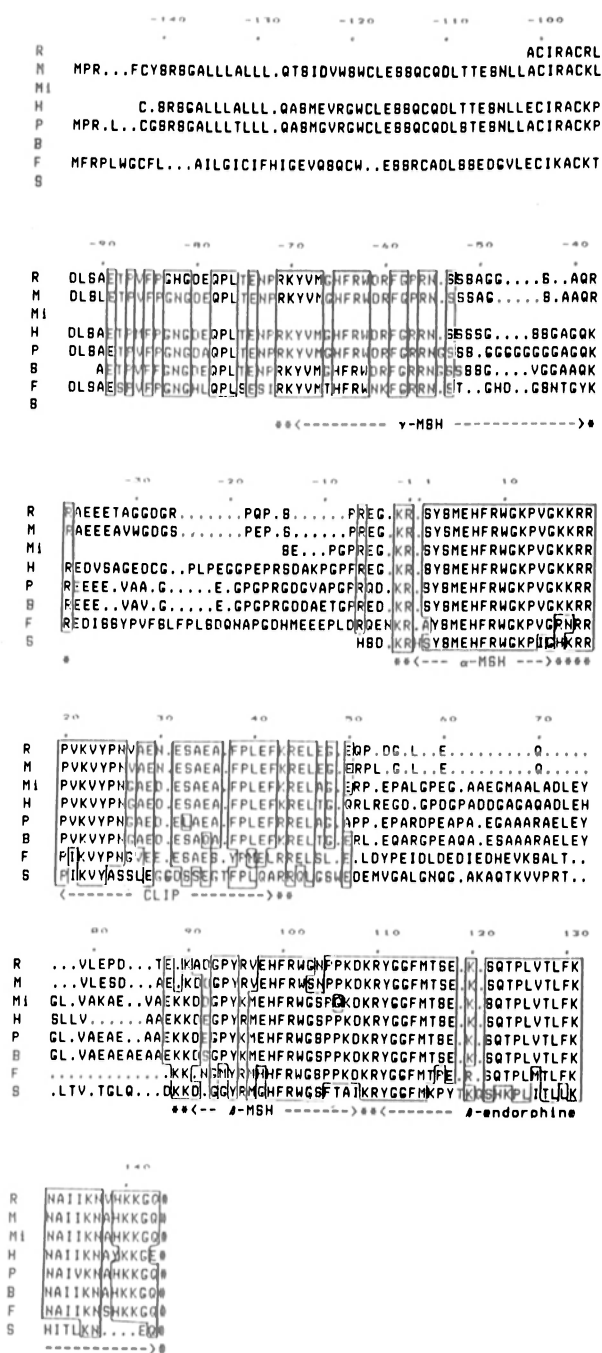


Рис. 6. Выравненные аминокислотные последовательности ПОМК крысы (R) [43], мыши (M) [55], норки (Mi) [7], человека (H) [8], свиньи (P) [55], быка (B) [19], лягушки (F) [55] и лосося (S) [55].

Нумерация аминокислотных остатков начинается с 1-го аминокислотного остатка α-МСГ. Стрелками указано расположение биологически активных доменов ПОМК. Блоками выделены аминокислоты, идентичные или родственные не менее чем у 6 проанализированных структур ПОМК.

[89]. Вторичную структуру моделировали с применением подхода [94].

На первом этапе провели выравнивание аминокислотных последовательностей ПОМК, которое показало, что у всех 8 видов позвоночных биологически активные домены в белке-предшественнике расположены сходным образом и фланкированы с обоих концов парами положительно заряженных аминокислот Lys — Lys, Arg — Arg, Lys — Arg (рис. 6). Показано, что эти пары выполняют роль сайтов узнавания специфических протеаз, участвующих в процессинге ПОМК [41].

Из рис. 6 видно также, что степень консервативности аминокислотных последовательностей неравномерна по всей длине белка-предшественника и может сильно различаться на разных участках ПОМК, причем границы консервативных и вариабельных участков четко совпадают с границами биологически активных доменов ПОМК. Таким образом, видно, что эволюционные характеристики аминокислотной последовательности ПОМК (консервативность, вариабельность отдельных участков) коррелируют с ее функциональной топографией. Так, например, высокой консервативностью отличаются участки аминокислотной последовательности ПОМК, соответствующие α- и β-меланотропинам, β-эндорфину. Участок между КТПП и β-МСГ, напротив, очень вариабелен и содержит многочисленные делеции, составившие у крысы и мыши почти половину длины этого района по сравнению с аналогичным районом ПОМК норки, человека и др.

Различия в вариабельности данных районов аминокислотной последовательности могут быть вызваны не только их различной функциональной значимостью и влиянием естественного отбора, но и зависимостью частоты возникновения мутаций от структурных особенностей участков ДНК, кодирующих эти районы. С целью выявления таких особенностей было проведено выравнивание и сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей, кодирующих ПОМК (рис. 7). Как и следовало ожидать, на уровне ДНК наблюдаются те же закономерности в распределении консервативных и вариабельных участков, что и на уровне аминокислотных последовательностей.

В процессе определения нуклеотидной последовательности к ДНК ПОМК норки [7] обратили внимание на значительное количество «компрессий» на радиоавтографах секвенирующих гелей в участках, соответствующих вариабельному району, появление таких «компрессий» обычно объясняют наличием шпильчатых структур в анализируемой ДНК [14]. Для того чтобы проверить это предположение, провели исследование структурных особенностей вариабельного участка ДНК, отличающих его от консервативных. Во-первых, он оказался насыщен прямыми повторами длиной 6—7 пар оснований и более, во-вторых, здесь наблюдается высокое содержание GC-пар (75—80 % против 60—65 % в среднем по другим районам). Известно, что прямые повторы играют определенную роль в механизме возникновения делеций и дупликаций в процессе репликации и репарации ДНК [24]. При этом высокое содержание GC-пар должно увеличивать стабильность вторичных структур, необходимых для реализации этих механизмов.

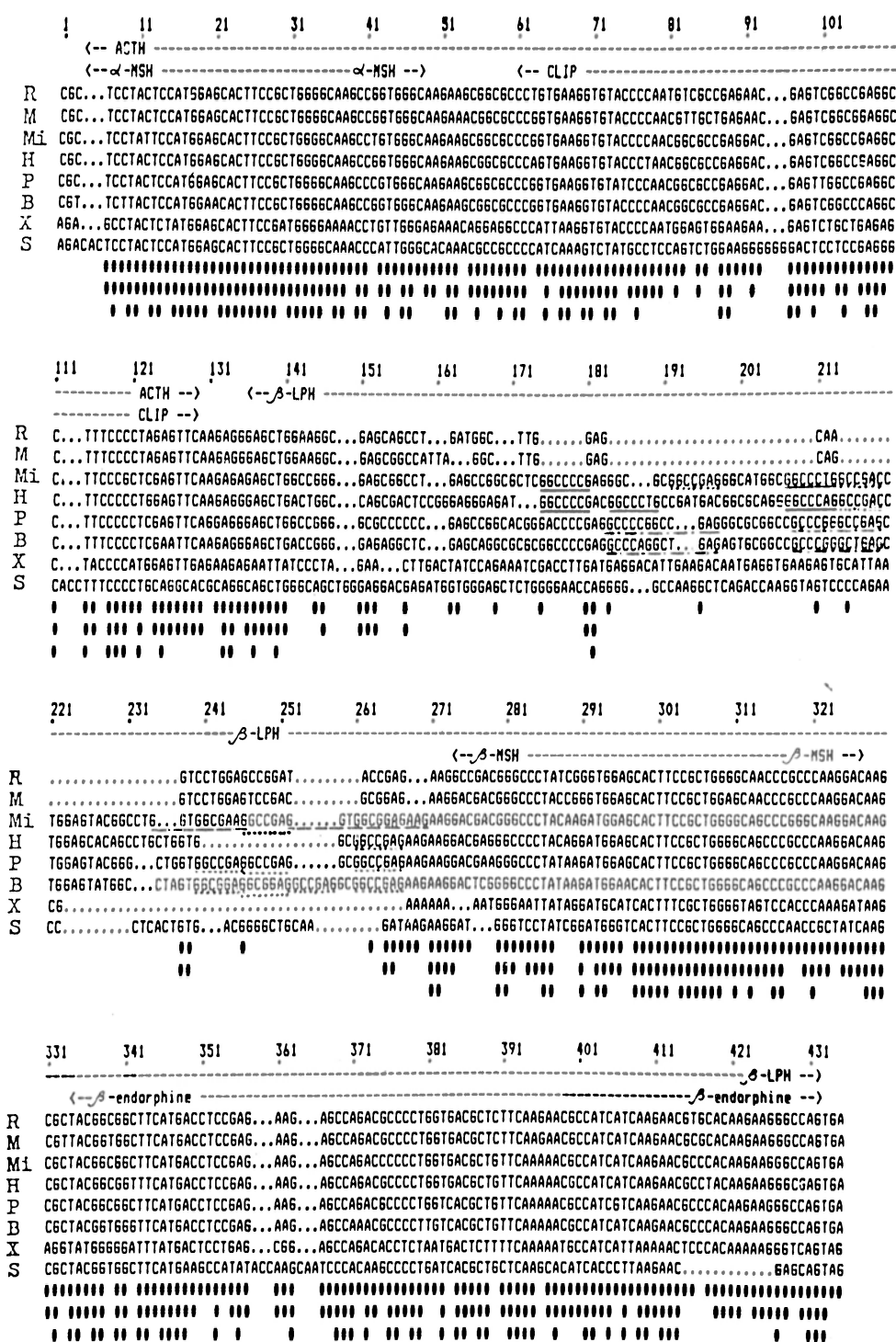
Кроме того, в вариабельном районе нами обнаружено значительное количество обратимых повторов, способных приводить к образованию шпильчатых структур, следствием чего может явиться увеличение вероятности появления делеций, инсерций и точечных мутаций в соответствии с моделью [77].

Чтобы проверить последнее предположение, мы построили возможную вторичную структуру цепи ДНК, кодирующей ПОМК норки, и отмети-



Рис. 7. Выравненные нуклеотидные последовательности ДНК, кодирующие ПОМК рас-  
сматриваемых видов животных.

Тремя звездочками отмечены позиции, для которых наблюдается совпадение нуклеотидов у всех 8 последовательностей; двумя — те, для которых совпадают 6 нуклеотидов. Стрелками указаны участки ДНК, кодирующие биологически активные домены ПОМК.



ли на ней наиболее переменные основания (рис. 8). Как видно, переменный участок располагается в высокоструктурированном районе, причем наибольшее число различий приходится на правую часть крестообразной структуры. Такая закономерность позволила нам предположить следующий возможный механизм возникновения мутаций. В соответствии с моделью [77] допускается образование в процессе репликации структур, подобных изображенным. Ферменты репарации, двигаясь в направлении 5'→3' вдоль новосинтезированной цепи, проверяют ее комплементарность материнской цепи, репарируя неспаренные участки. В районе А эти ферменты могут провести «коррекцию» нуклеотидной последователь-

ности, приведя ее в соответствие с «псевдородительской» частично комплементарной цепью (районом В) (рис. 9).

Таким образом, в районе А будут репарироваться участки, не полностью комплементарные району В, следствием чего может быть возникновение мутаций в этих участках. В пользу возможности осуществления подобного механизма свидетельствует тот факт, что в ДНК, кодирующих ПОМК крысы и мыши, делетирован район, точно совпадающий с одной из шпильчатых структур (см. рис. 6 и 7).

Можно предположить, что отмеченные нами структурные особенности ДНК и предложенный механизм могут реализоваться и в других случа-

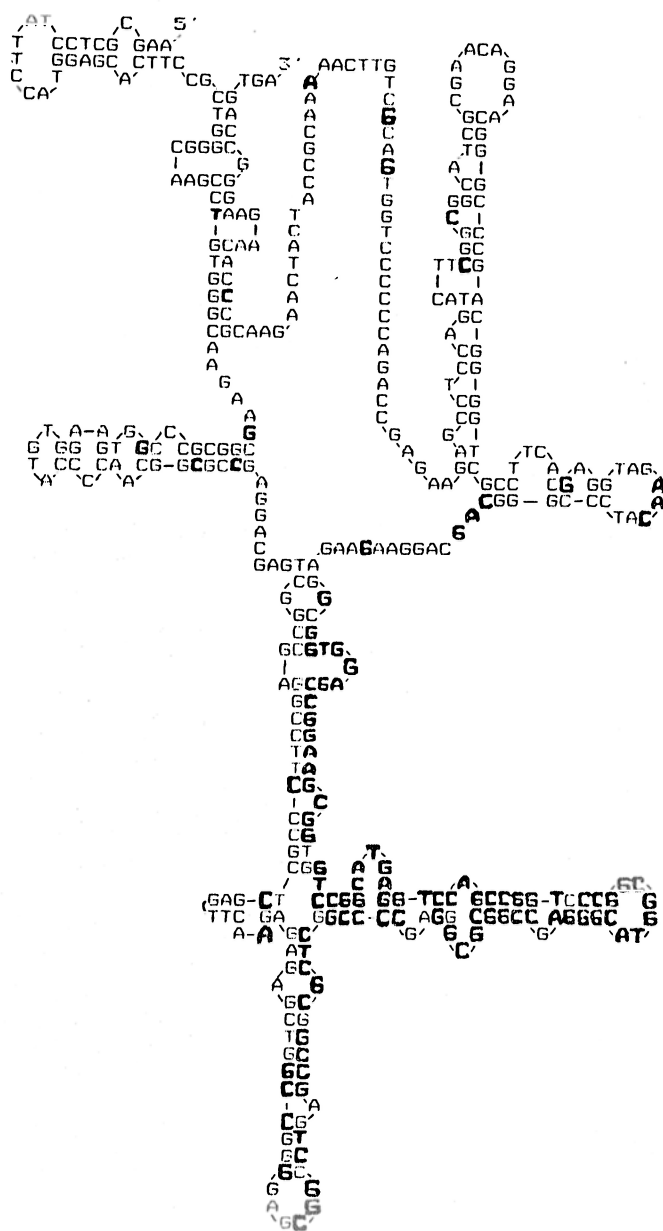


Рис. 8. Возможная вторичная структура ДНК, кодирующей переменный участок ПОМК норки, характеризующаяся минимумом свободной энергии.

Ярким шрифтом отмечены наиболее переменные основания. Стрелки ограничивают участок, отсутствующий в ДНК ПОМК крысы и мыши.

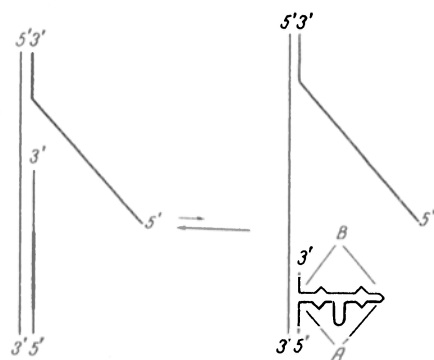
ях, когда наблюдается относительно высокая переменность определенных участков генома.

Примером использования методов генетической инженерии для получения продуцентов физиологически активных белков и пептидов может служить наша работа [3] по созданию бактериального штамма — продуцента  $\beta$ -липотропина быка.

Ранее было показано, что регуляторные элементы транскрипции и трансляции бацилл эффективно функционируют в клетках *E. coli* [13]. Поэтому для экспрессии последовательности ДНК, кодирующей  $\beta$ -липотропный гормон быка, мы воспользовались регуляторными элементами *B. amyloliquefaciens*, синтезированными химико-ферментативным путем [11].

При анализе структуры кДНК ПОМК быка, находящейся в составе плазмиды р СРОМС 8,

Рис. 9. Гипотетические структуры, возникающие в процессе репликации ДНК (синтезируется цепь ДНК, комплементарная мРНК).



нами был выявлен внутренний сайт для рестриктазы *EcoR* I, разграничивающий нуклеотидные последовательности, кодирующие адренкортикотропный и  $\beta$ -липотропный гормоны (рис. 10): В целях получения генно-инженерной конструкции, обеспечивающей экспрессии  $\beta$ -липотропного гормона, из плазмиды р СРОМС 8 был выделен фрагмент, имеющий размер 360 пар нуклеотидов (п. н.) и содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую 38—39 аминокислоты адренкортикотропного гормона, все (1—93) аминокислоты  $\beta$ -липотропного гормона, а также район, соответствующий 3'-нетранслируемой последовательности ПОМК и имеющий размер 101 п. н.

Чтобы нуклеотидная последовательность выделенного фрагмента попадала в рамку трансляции, обеспечиваемую используемыми нами блоками, к нему присоединяли *Bam* HI—*EcoR* I-фрагмент полилинкера плазмиды р ИС 8. Полученный фрагмент клонировали в составе плазмиды р ИС 8, встроив его по сайтам рестрикции *Bam* HI—*Pst* I (см. рис. 10). Отбор гибридных плазмид после трансформации компетентных клеток *E. coli* JM 103 проводили в присутствии хромофорного субстрата Y-gal и ИПТГ. В результате было отобрано несколько десятков клонов бактерий, не имеющих голубой окраски. Плазмидную ДНК одного из отобранных клонов, обозначенную как р ИС LPH, подвергли рестрикционному анализу и показали, что она содержит необходимый для дальнейшей работы фрагмент, фланкированный *Bam* HI—*Hind* III-сайтами рестрикции.

В дальнейшем для получения плазмиды, способной обеспечить эффективную продукцию  $\beta$ -липотропного гормона в клетках *E. coli*, работу проводили согласно схеме, представленной на рис. 11. Для этого *Bam* HI—*Hind* III-фрагмента кДНК с последовательностью, кодирующей  $\beta$ -липотропин, смешивали с фрагментом ДНК, включающим в себя один из регуляторных блоков *B. amyloliquefaciens*, имеющих *EcoR* I—*Sau* 3A липкие концы, и с большим *EcoR* I—*Hind* III-фрагментом плазмиды р ВР 327. Все перечисленные фрагменты выделяли путем электрофореза в ПААГ с последующей электроэлюцией. Смесь фрагментов ДНК обрабатывали ДНК-лигазой фага T4, продуктами лигазной сшивки трансформировали компетентные клетки *E. coli* JC 5183 и отбирали нужные клоны на чашках с тетрациклином (10 мкг/мл). Наличие полинуклеотидной последовательности  $\beta$ -липотропного гормона в рекомбинантных ДНК определяли при помощи гибридизации с синтетическим олигонуклеотидом.



*N-концевой пептид*

AlaGluThrProValPhePheGlyAsnGlyAspGluGlnProLeuThrGluAsnProArg 20  
 GCCGAGACGCCGGTGTCTTTGGCAACGGCGATGAGCAGCCGCTGACTGAGAACCCCCGG 60

LysTyrValMetGlyHisPheArgTrpAspArgPheGlyArgArgAsnGlySerSerSer 40  
 AAGTACGTCATGGGCCATTTCCGCTGGGACCCTTCGGCCGTCGGAATGGTAGCAGCAGC 120

SerGlyValGlyGlyAlaAlaGlnLysArgGluGluGluValAlaValGlyGluGlyPro 60  
 AGCGGAGTTGGGGGCGCGGCCAGAAAGCGCAGGAGGAAGTGGCGGTGGGCGAAGGCCCC 180

*N-концевой пептид* *АКТГ*

GlyProArgGlyAspAspAlaGluThrGlyProArgGluAspLysArgSerTyrSerMet 80  
 GGGCCCCGCGCGCATGACGCCGAGACGGGTCCGCGCGAGGACAGCGTTCTTACTCCATG 240

GluHisPheArgTrpGlyLysProValGlyLysLysArgArgProValLysValTyrPro 100  
 GAACACTTCCGCTGGGGCAAGCCGGTGGGCAGAAAGCGCGCCGGTGAAGGTGTACCCC 300

AsnGlyAlaGluAspGluSerAlaGlnAlaPheProLeuGluPheLysArgGluLeuThr 120  
 AACGGCGCCGAGGACGAGTCTGGCCCAAGGCTTTCCCTCGAATTCAGAGGAGAGTGACC 360

GlyGluArgLeuGluGlnAlaArgGlyProGluAlaGlnAlaGluSerAlaAlaAlaArg 140  
 GGGGAGAGGCTCGAGCAGGCGCGCGGCCCGAGGCCAGGCTGAGAGTGCGGCCGCCCCG 420

AlaGluLeuGluTyrGlyLeuValAlaGluAlaGluAlaGluAlaAlaGluLysLysAsp 160  
 GCTGAGCTGGAGTATGGCTAGTGGCGGAGGCGGAGGCCGAGGCGGCCGAGAGAGGAC 480

SerGlyProTyrLysMetGluHisPheArgTrpGlySerProProLysAspLysArgTyr 180  
 TCGGGGCCCTATAAGATGGAACACTTCCGCTGGGGCAGCCGCCCCAAGGACAGCGCTAC 540

GlyGlyPheMetThrSerGluLysSerGlnThrProLeuValThrLeuPheLysAsnAla 200  
 GGTGGGTTTCATGACCTCCGAGAAGAGCCAAACGCCCTTGTACGCTGTTCAAAAACGCC 600

IleIleLysAsnAlaHisLysLysGlyGln\*\*\* 211  
 ATCATCAAGAACGCCACAGAAGGGCCAGT GAGGGCGCAGCGGGCAGGGGCTCTCTCC 660

GCGGAAAGTTGACCCTGAAGGCCTCTCTTCTGCCCTCCTACCGCTTCGACGCTGGGTGA 720

GGATTCGCCCCAG 732

Рис. 10. Первичная структура кДНК ПОМК быка (плазмиды р СРОМС 8) [3].

леотидом 5'-TTCATCACCTCCCA-3'. Плазмиды одного из отобранных клонов была выделена в препаративных количествах и подвергнута рестрикционному анализу, который подтвердил ожидаемую структуру выделенной плазмиды, обозначенной как р LPH.

Оценку уровня экспрессии липотропного гормона быка осуществляли методом радиоиммунного анализа на нитроцеллюлозных фильтрах.

В различных экспериментах уровень экспрессии варьировал от 2 до 5 мг синтетического пептида на 1 л бактериальной культуры.

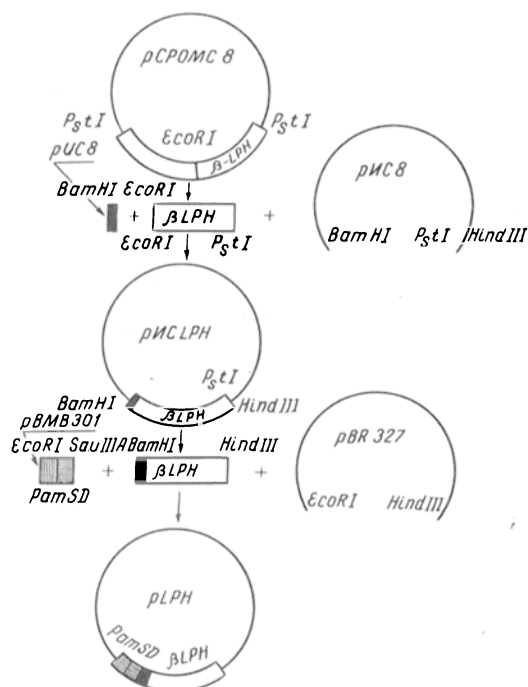


Рис. 11. Схема конструирования плазмиды, способной к экспрессии β-липотропного гормона [3].

Следует отметить, что сконструированный нами искусственный ген можно встраивать в плазмиды бацилл для последующей продукции β-липотропного гормона в грамположительных бактериях. Генно-инженерный β-липотропный гормон может найти несколько применений: во-первых, из литературы известна простая схема трипсинного высвобождения из сходной генно-инженерной конструкции биологически активного опиоидного пептида β-эндорфина [87], необходимого в медицинской практике. Во-вторых, генно-инженерный β-липотропин не загрязнен примесными интермедиатами процессинга ПОМК, которые трудно отделимы от самого гормона и неизбежно присутствуют в препаратах, выделенных из природных источников. Вследствие этого генно-инженерный β-липотропный гормон может оказаться полезным в эндокринологических исследованиях.

Представленные в настоящей работе результаты, на наш взгляд, убедительно иллюстрируют возможности использования комплекса современных методов генетической инженерии в исследовании структурно-функциональной организации белково-пептидных гормонов, а также перспективы применения таких методов для нужд практической медицины.

1. Александров А. А. // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева. — 1984. — Т. 29. — С. 64—70.
2. Беклемишев А. Б., Блинов В. М., Василенко С. К. и др. // Биоорган. химия. — 1984. — Т. 10, № 11. — С. 1535—1542.
3. Беклемишев А. Б., Головин С. Я., Ильичев А. А. и др. // Молекул. генет. — 1987. — № 10. — С. 19—23.
4. Гайцхоки В. С. // Молекул. биол. — 1976. — Т. 7. — С. 9—48.
5. Гайцхоки В. С. Информационные РНК клеток животных. — М., 1980.
6. Головин С. Я., Беклемишев А. Б., Мертвецов Н. П. и др. // Докл. АН СССР. — 1981. — Т. 261, № 4. — С. 1009—1012.
7. Головин С. Я., Бондарь А. А., Каргинов В. А. и др. // Биоорган. химия. — 1988. — Т. 14, № 2. — С. 273—275.
8. Головин С. Я., Каргинов В. А., Бондарь А. А. и др. // Там же. — 1987. — Т. 13, № 4. — С. 562—564.
9. Головин С. Я., Мамаев Л. В., Беклемишев А. Б. и др. // Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. биол. наук. — 1985. — Вып. 2. — С. 140—143.
10. Головин С. Я., Чесноков В. П., Блинова Н. Н. и др. // Там же. — 1981. — Вып. 2. — С. 115—121.
11. Горбунов Ю. А., Данилюк Н. К., Ильичев А. А. и др. // Биоорган. химия. — 1986. — Т. 12, № 5. — С. 647.
12. Ильдуганова Н. А., Блинова Н. Н., Мертвецов Н. П. // Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. биол. наук. — 1977. — Вып. 1. — С. 72—80.
13. Ильичев А. А., Миненкова О. И., Беликов С. И. и др. // Молекул. генет. — 1986. — № 8. — С. 19—24.
14. Краев А. С., Скрибин К. Г. // Итоги науки и техники: Молекулярная биология, генетическая инженерия: (Методы). — М., 1980. — Т. 12, ч. 2. — С. 141—197.
15. Максим А. М., Гилберт У. // Молекул. биол. — 1986. — Т. 20. — С. 581—638.
16. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии: Молекулярное клонирование. — М., 1984.
17. Мертвецов Н. П. Гормональная регуляция экспрессии генов. — М., 1986.
18. Мертвецов Н. П., Беклемишев А. Б., Савич И. М. Современные подходы к конструированию молекулярных вакцин. — Новосибирск, 1987.
19. Мертвецов Н. П., Головин С. Я., Беклемишев А. Б. и др. // Биохимия. — 1987. — Т. 52, № 5. — С. 707—714.
20. Мертвецов Н. П., Чесноков В. П., Блинова Н. Н. и др. // Молекул. биол. — 1978. — Т. 12. — С. 806—813.
21. Мертвецов Н. П., Чесноков В. П., Блинова Н. Н. и др. // Биохимия. — 1978. — Т. 43, № 5. — С. 919—927.
22. Скрибин К. Г. // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева. — 1984. — Т. 29, № 2. — С. 195—204.
23. Щелкунов С. П. Клонирование генов. — Новосибирск, 1986.
24. Albertini A. M., Hofer M. P., Calas M. P. et al. // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. — 1983. — Vol. 47, N 2. — P. 841—850.
25. Amara S. G., David D. N., Rosenfeld M. G. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1980. — Vol. 47. — P. 4444—4448.
26. Amara S. G., Jonas V., Rosenfeld M. G. et al. // Nature. — 1982. — Vol. 298. — P. 240—244.
27. Antronarakis E. E., Kazazian H., Orkin S. H. // Hum. Genet. — 1985. — Vol. 69. — P. 1—14.
28. Auffray C., Rougeon F. // Europ. J. Biochem. — 1980. — Vol. 107. — P. 303—314.
29. Baltimore D. // J. Cell. Physiol. — 1982. — Vol. 2. — P. 23—26.
30. Baralle F. E. // Int. Rev. Cytol. — 1983. — Vol. 81. — P. 71—106.
31. Bartla A., Richards R. J., Baxter J. D., Shine J. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1981. — Vol. 78. — P. 4868—4871.
32. Birnberg N. C., Lissitzky J. C., Hinman M., Herbert E. // Ibid. — 1983. — Vol. 80, N 22. — P. 6982—6986.
33. Brownstein M. J., Russel J. T., Gainer H. // Science. — 1980. — Vol. 207. — P. 373—378.
34. Buell N., Schimke R. T. // J. biol. Chem. — 1978. — Vol. 253, N 7. — P. 2471—2482.
35. Chirgwin J. M., Przybyla A. E., Mac Donald R. J., Rutter W. J. // Biochemistry (Wash.). — 1979. — Vol. 18. — P. 5294—5299.
36. Cochet M., Chang A. C. Y., Cohen S. N. // Nature. — 1982. — Vol. 297. — P. 335—339.
37. Cooke N. E., Coit D., Shine J. et al. // J. biol. Chem. — 1981. — Vol. 256. — P. 4007—4016.
38. Craig R. K., Hall L. // Genetic Engineering / Ed. R. Williamson. — London, 1983. — P. 57—125.
39. Daniels-McQueen S., McWilliams D., Birken S. et al. // J. biol. Chem. — 1978. — Vol. 253. — P. 7109—7114.
40. DNA Cloning / Ed. D. M. Glover. — Oxford, 1985. — P. 45—238.
41. Douglas J., Civelli O., Hebert E. // Ann. Rev. Biochem. — 1984. — Vol. 53. — P. 665—715.
42. Drouin J., Barbeau G., Boileau G. et al. // Rev. Canad. Biol. exp. — 1983. — Vol. 42. — P. 304—309.
43. Drouin J., Chamberland M., Charron J. et al. // FEBS Lett. — 1985. — Vol. 193. — P. 54—58.
44. Drouin J., Goodman H. M. // Nature. — 1980. — Vol. 288. — P. 610—613.
45. Elder J. K., Green D. K., Southern E. M. // Nucl. Acids Res. — 1986. — Vol. 14, N 1. — P. 417—424.
46. Genetic Engineering / Ed. R. Williamson. — London, 1981. — Vol. 1. — P. 1—167.
47. Genetic Engineering / Ed. R. Williamson. — London, 1981. — Vol. 2. — P. 1—150.
48. Genetic Engineering / Ed. R. Williamson. — London, 1982. — Vol. 3. — P. 1—173.
49. Genetic Engineering / Ed. R. Williamson. — London, 1983. — Vol. 4. — P. 1—185.
50. Godine J. E., Chin W. W., Habener J. F. // J. biol. Chem. — 1980. — Vol. 255. — P. 8780—8783.
51. Grymes R. A., Travers P., Engelberg A. // Nucl. Acids Res. — 1986. — Vol. 14, N 1. — P. 87—98.
52. Gubbins E. J., Maurer R. A., Hartley J. L., Donelson J. E. // Ibid. — 1979. — Vol. 6, N 3. — P. 915—930.
53. Haneda M., Chan S. J., Kwok S. C. M. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1983. — Vol. 80. — P. 6366—6370.
54. Hu N.-T., Messing J. // Gene. — 1982. — Vol. 17. — P. 271—277.
55. Imura H., Kato Y., Nakai Y. et al. // J. Endocr. — 1985. — Vol. 107. — P. 147—157.
56. Itakura K., Hirose T., Crea R. et al. // Science. — 1977. — Vol. 198. — P. 1056—1063.
57. Kita T., Inoue A., Nakanishi S., Numa S. // Europ. J. Biochem. — 1979. — Vol. 93. — P. 213—220.
58. Loh Y. P., Gainer H. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1982. — Vol. 79. — P. 108—112.
59. Meinkoth J., Wahl G. // Analyt. Biochem. — 1984. — Vol. 138. — P. 267—284.
60. Messing J. // Meth. Enzymol. — 1983. — Vol. 101. — P. 20—30.
61. Myers R. M., Larin Z., Maniatis T. // Science. — 1985. — Vol. 230. — P. 1242—1246.
62. Nakanishi S., Inoue A., Kita T. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1978. — Vol. 75. — P. 6021—6025.
63. Nakanishi S., Inoue A., Kita T. et al. // Nature. — 1979. — Vol. 278. — P. 423—427.
64. Nakanishi S., Inoue A., Taii S., Numa S. // FEBS Lett. — 1977. — Vol. 84, N 1. — P. 105—109.
65. Nilsen B., Abrahamsen L., Uhlen M. // EMBO J. — 1985. — Vol. 4, N 4. — P. 1075—1080.
66. Nilsen B., Holmgren E., Josephson S. et al. // Nucl. Acids Res. — 1985. — Vol. 13, N 4. — P. 1151—1162.
67. Notake M., Tobimatsu T., Watanabe Y. // FEBS Lett. — 1983. — Vol. 156, N 1. — P. 67—71.
68. Numa S. // Acta endocr. (Kbh.). — 1983. — Suppl. 256. — P. 16.
69. Okayama H., Berg P. // Molec. Cell. Biol. — 1982. — Vol. 2, N 2. — P. 161—170.
70. Oliver C. L., Grobler-Robie A., Boyd C. D. // Meth. molec. Biol. — 1984. — Vol. 2. — P. 137—145.
71. Olson K. C., Fenno J., Lin N. et al. // Nature. — 1981. — Vol. 293. — P. 408—411.
72. Palacios R., Palmiter R. D., Schimke R. T. // J. biol. Chem. — 1972. — Vol. 247, N 8. — P. 2316—2321.
73. Parker M. G. // Molec. Cell. Endocr. — 1978. — Vol. 10, N 2. — P. 119—133.
74. Payour F., Schimke R. T. // Europ. J. Biochem. — 1979. — Vol. 101, N 1. — P. 271—282.
75. Pelham H. R., Jackson R. J. // Ibid. — 1976. — Vol. 67. — P. 247—256.
76. Phillips J. A., Hjelle B. L., Seeburg P. H., Zachman M. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1981. — Vol. 78. — P. 6372—6375.
77. Ripley L. S., Glickman B. W. // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. — 1983. — Vol. 47, N 2. — P. 851—861.
78. Roberts J. L., Chen Ch.-L. C., Eberwine J. H. et al. // Recent Progr. Horm. Res. — 1981. — Vol. 38. — P. 227—256.
79. Roberts J. L., Herbert E. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1977. — Vol. 74. — P. 4826—4830.
80. Roberts B. E., Paterson B. M. // Ibid. — 1973. — Vol. 70. — P. 2330—2334.
81. Roberts J. L., Seeburg P. H., Shine J. et al. // Ibid. — 1979. — Vol. 76. — P. 2153—2157.

82. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. // *Ibid.*— 1977.— Vol. 74.— P. 5463—5467.
83. Schechter I. // *Biochemistry (Wash.)*.— 1974.— Vol. 13, N 5.— P. 1875—1885.
84. Schütz G., Kieval S., Groner B. et al. // *Nucl. Acids Res.*— 1977.— Vol. 4, N 1.— P. 71—84.
85. Shapiro D. J., Taylor J. M., McKnight S. et al. // *J. biol. Chem.*— 1974.— Vol. 249, N 12.— P. 3665—3671.
86. Shemyakin M. F., Chestukhin A. V., Dolganov G. M. et al. // *Nucl. Acids Res.*— 1980.— Vol. 8.— P. 6163—6174.
87. Shine J., Fettes I., Lan N. C. Y. et al. // *Nature*.— 1980.— Vol. 285.— P. 456—461.
88. Smith A. J. H. // *Nucl. Acids Res.*— 1979.— Vol. 6, N 3.— P. 831—848.
89. Staden R. // *Ibid.*— 1982.— Vol. 10, N 9.— P. 2951—2961.
90. Takahashi H., Nakamata Y., Watanabe Y. et al. // *Ibid.*— 1983.— Vol. 11, N 19.— P. 6847—6858.
91. Tanaka S., Oshima T., Ohsue K. // *Ibid.*— 1982.— Vol. 10.— P. 1741—1754.
92. Ullrich A., Shine J., Chirgwin J. et al. // *Science*.— 1977.— Vol. 196.— P. 1313—1319.
93. Weissmann C. // *Interferon* / Ed. I. Gresser.— London, 1981.— P. 101—134.
94. Williams A. L., Tinoco I. // *Nucl. Acids Res.*— 1986.— Vol. 14, N 1.— P. 299—315.

Поступила 05.10.89

## GENETIC ENGINEERING APPROACHES IN CHEMISTRY OF PROTEIN AND PEPTIDE HORMONES

N. P. Mervetsov, V. A. Karginov

Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Institute of Clinical and Experimental Medicine, Siberian Branch of the Academy of Medical Sciences of the USSR, Novosibirsk

Use of genetic engineering technique in cloning and sequence assay of cDNA and genes coding for mammal protein and peptide hormones is reviewed. Recent data on molecular aspects of gene reorganization in some inherited disorders are considered involving analytical methods for evaluation of gene activity, especially of genes coding for peptide hormones. Sequence assay of mRNA coding for mammal proopiomelanocortins (precursor of adrenocorticotrophic hormone),  $\beta$ -lipotropic hormones of pituitary body, is discussed.

© Ю. А. ПЕТРОВИЧ, Н. А. ТЕРЕХИНА, 1990

УДК 617.7-07:617.764-008.83

Ю. А. Петрович, Н. А. Терехина

## БИОХИМИЯ СЛЕЗЫ И ЕЕ ИЗМЕНЕНИЕ ПРИ ПАТОЛОГИИ (ОБЗОР)

Кафедра биохимии Московского медицинского стоматологического института и кафедра биохимии Пермского медицинского института

Слеза (Сл) — жидкость в конъюнктивальном мешке и на поверхности роговицы (прекорнеальная пленка толщиной 5—10 мкм). Слезная пленка обеспечивает гладкость, прозрачность и светопреломление роговицы. Сл очищает поверхность глаза от микробов и инородных тел. За сутки у здорового взрослого человека выделяется до 2 мл Сл. Без дополнительного раздражения скорость ее секреции 1—2 мкл/мин. Секретция снижена при гиповитаминозе А, параличе лицевого нерва, перерезке 1-й ветви тройничного нерва, синдроме Шегрена и при ряде глазных болезней.

В последние годы резко возросло число публикаций по биохимии Сл. Это связано, во-первых, с обнаружением влияния Сл на метаболизм роговицы, во-вторых, с выявлением диагностической ценности анализа Сл при многих общих

и глазных болезнях, в-третьих, с разработкой микрометодов анализа и адекватных способов сбора Сл и, в-четвертых, с применением лакриматоров — активаторов слезотечения в лечебных и других целях.

С учетом сказанного в обзоре приведены работы по биохимии Сл, опубликованные преимущественно в последние 5—10 лет. Мы стремились максимально охватить сведения об изменениях Сл при общих офтальмологических болезнях и не повторять ссылки на изменения иммуноглобулинов и антипротеиназ в Сл при воспалении в глазу в обзорах для офтальмологов, в которых цитирование оканчивается 1976 г. [3] и 1984 г. [9].

*Методы получения Сл* влияют на ее состав. При использовании разных методов ее сбора могут быть получены противоречивые результаты.

Механическую стимуляцию секреции Сл можно вызвать, вводя тонкую полоску фильтровальной бумаги в конъюнктивальный мешок. Однако эта бумага адсорбирует не только Сл, но и содержимое эпителиальных клеток роговицы и конъюнктивы после микротравматизации их адсорбентом [67]. В зависимости от свойств бумаги, бинта или ваты и элюирующей среды результаты биохимического анализа могут значительно различаться. Во избежание микротравм глаза можно собирать Сл микрокапилляром без стимуляции либо со стимуляцией слезоотделения (химической, механической, эмоциональной) из конъюнктивального мешка либо с поверхности нижнего века. Собранный микрокапилляром, без прикосновения к глазу, стимулированная Сл содержит секрет слезных желез с минимумом других компонентов.

Повышают секрецию Сл аммиак, лук, бромгексин, хлорацетофенон и др., уменьшают ее ганглиоблокаторы, психотропные и спотворные средства,  $\beta$ -блокаторы. В зависимости от вида стимуляции или ингибирования состав Сл также изменяется.

*Физико-химические свойства.* Плотность Сл колеблется от 1,001 до 1,009, рН от 6,5 до 7,8. При длительно закрытых веках рН Сл снижается, так как эпителий роговицы продуцирует в Сл  $\text{CO}_2$ . У новорожденных детей рН Сл выше, чем у взрослых лиц [23].

*Белки и другие азотсодержащие соединения.* Белки в Сл в основном секретируют слезные железы. Количество белка в Сл зависит от скорости слезотечения и способа получения Сл. Так, при осторожном сборе микрокапилляром без прикосновения к глазу в нестимулированной Сл уровень белка составляет 20 г/л, а в стимулированной Сл — лишь 3—7 г/л [67]. Микротравма тканей глаза при получении Сл повышает концентрацию белка. В зависимости от метода анализа и способа сбора в Сл выделено до 60 фракций белков [18, 44].

Отмечены возрастные различия белкового состава Сл человека. В первую неделю у новорожденных уровень общего белка в Сл повышается [12]. К 50 годам секреция IgA снижается, а церулоплазмина и IgG повышается [48].

В Сл здоровых взрослых женщин содержание общего белка несколько выше, чем у мужчин [67]. После ожога роговицы щелочью или

после ультрафиолетового (УФ) облучения глаза уровень его повышается в Сл в 1,5—2 раза из-за нарушения барьерной функции эпителия роговицы и гематоофтальмического барьера. При бактериальном конъюнктивите и после экстракции катаракты, при ношении контактной линзы содержание общего белка умеренно повышается.

Часть альбуминов Сл при электрофорезе движется как сывороточный преальбумин, но антисыворотка к последнему не реагирует с альбумином Сл, так как синтезирующийся в слезной железе преальбумин с мол. м. 150 кД специфичен для Сл [44]. Часть альбумина Сл сывороточного происхождения. При электрофорезе на агарозе у женщин в Сл выше, чем у мужчин, уровень обеих фракций альбуминов,  $\alpha_2/2$ -глобулинов и  $\gamma$ -глобулинов, а уровень лизоцима ниже. При вирусном кератите и конъюнктивите, при ирите и иридоциклите резко уменьшается содержание альбуминов слезного происхождения. Содержание сывороточного альбумина и лизоцима существенно увеличивается при бактериальном конъюнктивите, УФ-облучении и ожоге щелочью.

У здоровых людей  $\alpha_1$ -глобулины в Сл отсутствуют. Ценным для диагностики оказался иммуноэлектрофорез Сл, так как при синдроме Дауна у детей, начиная с двухнедельного возраста, и у взрослых лиц в Сл появляется фракция  $\alpha_1$ -глобулинов, всегда отсутствующая при сердечно-сосудистой патологии, аденогенитальном синдроме, инфекции мочеполовых путей, гипоглобулинемии, гипопластической анемии, диарее, лихорадке и ряде других заболеваний [12].

При вирусном кератите и конъюнктивите уровень  $\alpha_2/1$  и  $\alpha_2/2$ -глобулинов снижается, а  $\alpha_2/3$ -глобулины вообще не обнаруживаются. Последняя фракция не выявляется также при бактериальном конъюнктивите и после УФ-облучения. Что касается  $\beta_1$ -,  $\beta_3$ - и  $\gamma$ -глобулинов, то их содержание в Сл повышается при бактериальном конъюнктивите, вирусном кератите и конъюнктивите, ирите и иридоциклите, ожоге роговицы щелочью и после УФ-облучения. Фракция  $\beta_2$ -глобулинов повышается только при двух последних видах патологии.

Белки Сл здорового человека при нетравмирующем сборе Сл иммунологически отличаются от белков его же крови и тканей, а также от белков Сл животных. На содержание иммуноглобулинов в Сл влияет метод ее сбора. Так, при нетравмирующем сборе уровень IgA и IgG в Сл составляет 100—150 мг/л, IgM — менее 50 мг/л и IgE — 3—14 мг/л, а при получении Сл даже с небольшой микротравмой роговицы уровень иммуноглобулинов повышается (например, IgA до 1000 мг/л) [43, 71].

При благоприятном течении инфекции глаза, вызванной вирусом простого герпеса (ВПГ), значительно повышается количество IgA в Сл. Острая фаза герпетического кератита, частые рецидивы его сопровождаются понижением уровня IgA, что способствует осложненному течению герпеса и важно для прогноза [9]. При наиболее тяжелом дисковидном герпетическом кератите находят в Сл дефицит противогерпетических антител, а при их высоком титре болезнь протекает доброкачественнее [11].

Наличие в Сл вирусспецифического sIgA важ-

но для диагностики ВПГ-инфекции глаза, в то время как присутствие IgA и IgG не имеет диагностической ценности [30]. Точно так же вирусспецифические sIgA появляются в Сл после оральной иммунизации инактивированной гриппозной вакциной [15] и при инфицировании хламидиями [28]. Однако при лепре и в послеоперационный период, при воспалении глаза количество sIgA в Сл снижается [54].

Изоэлектрофокусирование Сл больных множественным склерозом выявило олигоклональный IgG [22]. Аналогичный IgG найден в их ликворе, а у здоровых людей в Сл и ликворе он отсутствовал. При гингивитозе в Сл повышается уровень IgG [17], при аллергии — уровень IgE [45]. В Сл могут поступать ВПГ при офтальмогерпесе и вирус иммунодефицита человека при СПИДе [32].

В Сл находятся лактоферрин, трансферрин, церулоплазмин, комплемент. Лактоферрин Сл — ингибитор гемолитического комплемента. Концентрация лактоферрина снижается после экстракции катаракты [40].

Гликопротеиды прескорнеальной пленки способствуют ее стабилизации [67] и адгезии к поверхности роговицы. Слизь с гликопротеидами секретируется бокаловидными клетками конъюнктивы и клетками ацинусов слезных желез. Гексозамин — маркер дефицита слизи при синдроме Шегрена. N-ацетилглюкозаминовая кислота гликопротеидов Сл при электрофорезе движется с  $\alpha$ -глобулинами [21]. Уровень сиаловых кислот в Сл у здоровых людей — 1,1 мМ, при офтальмогерпесе он снижается в 1,5—2,5 раза, при выздоровлении нормализуется.

При двухмерной восходящей хроматографии на бумаге свободных аминокислот в Сл после стимуляции слезоотделения парами брамацетона более всего выявили глицина — 13,4—26,2 мг/л и лишь следы  $\alpha$ -аминомасляной кислоты, гистидина, фенилаланина, пролина, тирозина, таурина [26, 29]. Содержание аланина, аргинина, аспарагиновой, глутаминовой кислот, лейцина и изолейцина, лизина, серина, треонина, валина, глутамина колебалось от 1,7 до 12,7 мг/л. Непостоянно находили цистеин, цистин, метионин. При герпесе роговицы в Сл накапливался аргинин, необходимый для воспроизводства ВПГ, поэтому при лечении офтальмогерпеса применяли аргиназу [44].

Уровни мочевины в СЛ и плазме крови близки. У здоровых людей в среднем около 300 мг/л. Уровень мочевины в Сл можно использовать для диагностики уремии, так как его повышение в плазме и Сл коррелирует. Безболезненность сбора Сл — преимущество сравнительно с получением крови. Корреляция указывает на неограниченный переход мочевины через барьер кровь — слеза [67]. Содержание небелкового азота в Сл составляет около 500 мг/л.

**Ферменты.** Активность малатдегидрогеназы (МДГ), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ), глутаматдегидрогеназы, сорбитолдегидрогеназы, изонитратдегидрогеназы, пируваткиназы, альдолазы, аспартатаминотрансферазы в Сл, собранной фильтровальной бумагой из конъюнктивального мешка, значительно выше, чем в стимулированной Сл, осторожно собранной микрокапилляром [33, 44, 67]. Это подтверждает, что источники указанных ферментов — глазные ткани, а не

слезная железа, и для них формируется барьер кровь — слеза, препятствующий их проникновению из крови в Сл. Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) при остром сборе Сл микрокапилляром у здорового человека не обнаруживается [7].

Активность ЛДГ в эпителии роговицы в 70 раз выше, чем в слезной железе, что свидетельствует в пользу корнеального происхождения ЛДГ Сл при получении ее с микротравмой эпителия [44]. Доказательством выхода ЛДГ из эпителия является то, что активность ЛДГ в эпителии роговицы в 50 раз выше, чем в конъюнктиве. В эпителии роговицы активность ЛДГ в сотни раз выше, чем в ее строме [5]. Определение ЛДГ в Сл — чувствительный метод установления малых повреждений роговицы [44]. Появление в Сл человека ЛДГ с одновременным повышением активности МДГ и Г-6-ФДГ используют для прогноза рецидива герпеса роговицы при клинически нормальном состоянии роговицы, когда другими методами рецидив еще не прогнозируется [7].

Характерны видовые отличия изоферментов ЛДГ: в Сл и эпителии роговицы человека преобладают ЛДГ<sub>5</sub>, ЛДГ<sub>4</sub>, а у кролика — ЛДГ<sub>1</sub>, ЛДГ<sub>2</sub> [2, 3, 5, 44].

Для состава Сл имеют значение особенности метаболизма эпителия. Часть необходимого кислорода в строму и эндотелий роговицы поступает из кровеносных сосудов лимба и водянистой влаги. В значительной степени эпителий получает кислород из воздуха со Сл и частично из сосудов лимба и жидкости передней камеры глаза через строму. Это нарушает обмен эпителия при ношении контактных линз. При открытых веках запас кислорода в роговице достаточен, а при закрытых веках напряжение кислорода в эпителии роговицы уменьшается в 3 раза, замедляя аэробный метаболизм [33]. Гипоксия роговицы повышает проницаемость ее мембран и активность ЛДГ в анаэробном направлении, снижает содержание АТФ [73].

С помощью ксантин-ксантиноксидазной системы, генерирующей свободные радикалы, обнаружено, что Сл человека ингибирует образование гидроксилрадикала [46]. При гелевой фильтрации Сл на сефадексе G-75 показано, что ингибирующий эффект частично связан с низкомолекулярной фракцией, содержащей Са, а в меньшей степени — с фракцией, в состав которой входил лактоферрин.

Ряд ферментов поступает в Сл здорового глаза в основном из слезных желез: α-амилаза, протсинкиназа, пероксидаза, аргиназа, лизоцим, гексокиназа, α-глюкозидаза, α-галактозидаза, β-галактозидаза, β-глюкуронидаза, α-фукозидаза, α-маннозидаза, арилсульфатаза, кислая фосфатаза (КФ), щелочная фосфатаза (ЩФ), аланин-аминотрансфераза.

Так как в Сл из конъюнктивального мешка человека активность β-N-ацетилгексозаминидазы в 3 раза выше, а активатора плазминогена в 10 раз выше, чем в Сл, полученной через канюлю непосредственно из протока слезной железы [64], основным их источником в Сл следует считать не слезную железу, а другие ткани глаза.

Концентрация лизоцима в Сл здоровых людей составляет около 2 г/л — выше, чем в других жидкостях организма [67]. Она повышается в юно-

шеском возрасте, а также при ревматоидном артрите [45] и снижается к старости [60]. Уровень лизоцима в Сл уменьшается при болезни Шегрена [27], офтальмогерпесе, трахоме [60], белковом голодании [71], лепре [59], сухом [75] и аденовирусном кератоконъюнктивитах [39], после удаления катарактного хрусталика [56].

Активность пероксидазы в Сл варьирует: у крысы  $3,7 \cdot 10^5$  ед/л, у человека  $10^3$  ед/л, а у кролика она вообще не обнаруживается [67].

После химического ожога, травмы, инфекции, при изъязвлении роговицы в Сл появляется коллагеназа [76] в результате активации проколлагеназы роговицы трипсином либо плазмином, образовавшимся из плазминогена под действием плазминоген активатора Сл [16]. Язва роговицы с высоким уровнем плазмина в Сл хорошо поддается лечению анопротинином — ингибитором сериновых протеиназ [55]. Эластаза Сл — показатель воспалительного процесса в глазу. Повышение ее активности можно объяснить резким увеличением числа эмигрировавших в Сл полиморфноядерных лейкоцитов [51]. При язве роговицы активность эластазы Сл увеличивается в 15 раз по сравнению с контролем [57]. В Сл больных с саркоидозом повышена активность ангиотензинпревращающего энзима [41].

Активность лизосомных гидролаз в Сл в 2—10 раз выше, чем в сыворотке крови [67]. Роговица и конъюнктива могут быть дополнительными источниками лизосомных ферментов Сл после травмы этих тканей.

Ацетилсалициловая кислота снижает активность β-N-ацетилгексозаминидазы в Сл, стабилизируя мембраны лизосом и снижая секрецию лизосомных ферментов слезными железами.

При отслойке сетчатки в Сл активность щелочной фосфатазы (ЩФ) повышается, а кислой фосфатазы (КФ) не изменяется. Активность ЩФ и КФ увеличивается с возрастом, но не зависит от пола. При герпетическом кератите в Сл изменяется активность КФ [10], что, видимо, можно связать с уменьшением активности КФ в роговице. Наиболее резко изменяется КФ Сл при увеитах.

Активность лизосомных гликозидаз можно определять с целью дифференциальной диагностики лизосомных болезней. В роговице найдена большая группа лизосомных гликозидаз [3, 4]. При болезни Фабри в Сл в 3 раза снижена активность α-галактозидазы [42, 49], у гомозигот ее активность стабильна при 50 °С, а у гетерозигот и у здоровых людей уменьшена в 4—5 раз. При болезни Тея — Сакса в Сл дефицит β-N-ацетилгексозаминидазы [61], при фукозидозе дефицит α-фукозидазы, при маннозидозе дефицит α-маннозидазы [47], при GM<sub>1</sub>-ганглиозидозе дефицит β-галактозидазы [65], при гликогенозе II типа дефицит α-глюкозидазы, при метахроматической лейкодистрофии и мукосальфатидозе дефицит сульфатазы А, при последнем отмечен также дефицит сульфатазы В [70].

Противоречивы сведения об активности β-N-ацетилгексозаминидазы в Сл при диабетической ретинопатии: повышена [72], не изменена [67], снижена [34]. Однако у мышей при генетически обусловленном диабете ее активность в Сл также уменьшается [52].



Ингибиторы протеиназ присутствуют в Сл в меньшем количестве, чем в плазме крови [77]. Антипротеиназы Сл человека иммунологически не идентичны сывороточным [53]. Содержание  $\alpha_1$ -антитрипсина равно 1—4 мг/л,  $\alpha_2$ -макроглобулина — 30 мг/л,  $\alpha_1$ -антитрипсиногена — 10 мг/л, интер- $\alpha$ -трипсиноингибитора — 5 мг/л [45]. Ингибиторы протеиназ секретируются слезной железой [67].

При бактериальных инфекциях, язве роговицы уровень ингибиторов в Сл повышен, а при офтальмогерпесе содержание  $\alpha_1$ -антитрипсина и  $\alpha_2$ -макроглобулина снижено [9, 77]. При этом  $\alpha_1$ -антитрипсин расходуется на связывание активированных протеиназ [9].

В Сл обнаружена ДНКаза, направленная против вирусов и бактерий, т. е. обладающая защитной функцией [8]. Кроме того, Сл содержит защитную пероксидазно-тиоцианатную противобактериальную систему.

**Углеводы.** Противоречивые данные получены о наличии в Сл глюкозы. Это противоречие обусловлено, во-первых, тем, что неповрежденный эпителий роговицы и конъюнктивы обладает барьерной функцией для глюкозы и повышенный уровень ее выявляется при сборе Сл методом, повреждающим эпителиальный барьер, в частности фильтровальной бумагой или при небрежной манипуляции стеклянным капилляром [67]. Во-вторых, повышенный уровень глюкозы в Сл может объясняться применением неспецифических методов, например Хагедорна — Йенсена, с помощью которых, кроме глюкозы, определяются многие редуцирующие вещества, в том числе даже не углеводы. Так, по редуцирующим веществам в Сл некорректно установили 1,1 мМ глюкозы, к тому же после сбора Сл с микроповреждением эпителия роговицы [35]. Если же Сл получали без повреждения тканей и определяли глюкозу специфическим энзимным методом, то концентрация ее у здоровых лиц была на порядок ниже, а у больных сахарным диабетом, даже при уровне глюкозы в крови выше 20 мМ, содержание ее в Сл почти не изменялось [69]. Тот же специфический энзимный анализ провели в Сл, полученной фильтровальной бумагой из конъюнктивального мешка, и во всех случаях количество глюкозы было выше, чем при нетравматическом методе сбора Сл. Особенно резко увеличился уровень глюкозы в Сл, начиная с гипергликемии 10 мМ, а при гипергликемии около 20 мМ концентрация глюкозы в Сл приближалась к 10 мМ.

Поэтому можно согласиться с тем, что определение глюкозы в Сл — более надежный критерий компенсации сахарного диабета, чем содержание глюкозы в крови [6], если получать Сл методом, сопряженным с микротравмой тканей переднего отдела глаза. В связи с этим отметим, что при диспансеризации больных сахарным диабетом предложен простой экспресс-метод исследования сахара Сл с помощью глюкометра, при котором окраска появляется при концентрации глюкозы в Сл выше 0,5 мМ [1]. Одновременно с повышением концентрации глюкозы увеличивается содержание лактата. Уровень лактата (1—5 мМ) и пирувата (0,05—0,35 мМ) в Сл здоровых лиц несколько выше, чем в крови [69]. Эти величины

существенно не изменяются при механическом раздражении полоской фильтровальной бумаги [67], так как эпителий роговицы и конъюнктивы не препятствует выходу лактата и пирувата в Сл.

Внутривенно введенный этанол легко переходит из плазмы крови в Сл, и в этих жидкостях его концентрации близки [36].

**Липиды** содержатся в слезной пленке [67]. В Сл женщин количество общих липидов составляет 2,4 г/л, у мужчин — 1,96 г/л [63]. В Сл здоровых людей уровень холестерина равен 0,2 г/л [68]. При катаракте хрусталика содержание общих липидов в Сл повышается, а при вирусном кератите и после ожога глаза щелочью снижается [63]. Помимо свободного холестерина и холестероидов, в Сл присутствуют фосфолипиды, триацил-, диацил- и моноацил-глицериды, свободные жирные кислоты, воска.

Сл влияет на стабильность липосом, введенных в слезный мешок. Адреналин быстрее выходил из липосомного носителя при контакте со Сл [62]. Влияние Сл на высвобождение 5-карбоксифлюоресцеина из липосомных везикул, состоящих из фосфатидилхолина, стеариламина и холестерина, снижалось при повышении количества холестерина [14]. Это следует учесть при разработке методов введения лекарств через слезный мешок.

**Гормоны, медиаторы, витамины.** В стимулированной Сл, собранной микрокапилляром, обнаружены адреналин, норадреналин, дофамин. При глаукоме их содержание уменьшается [77]. Трийодтиронин переходит в Сл из плазмы крови в 20 раз быстрее, чем тироксин. При гипертиреозе это соотношение не изменяется [37].

Уровень гистамина в Сл повышен при конъюнктивите.

В Сл, собранной фильтровальной бумагой, найдено 75 пг/мл простагландина F — ниже, чем в сыворотке крови [25]. При конъюнктивите и трахоме его количество в Сл увеличивается. При остром увеите концентрация простагландина E<sub>2</sub> в Сл уменьшается, после экстракции катаракты повышается, но через 2 нед нормализуется [38].

В секреторной функции слезных желез принимает участие циклазная система. Так, c3', 5'-AMP [24], форсколин как активатор аденилатциклазной системы, а метилксантин и метилизобутирилксантин как ингибиторы фосфодиэстеразы, повышают секрецию пероксидазы в Сл [31]. Показано участие системы инозитолтрифосфата в секреции слезной железы [58]. Вместе с тем c3', 5'-GMP не влияет на секрецию пероксидазы в Сл.

Слезные железы секретируют ретинол, причем введение пилкарпина и ацетилхолина увеличивает его поступление в Сл [66]. О витамине С в Сл мнения противоречивы. Так, в Сл, стимулированной парами аммиака, уровень аскорбиновой кислоты 110 мкМ был близок к его уровню в плазме крови [50]. Однако в нестимулированной Сл витамин С не удалось определить [46].

**Вода и неорганические вещества.** Сл содержит 98 % воды [46]. Из Сл в эпителий роговицы поступают неорганические катионы и анионы. В частности, Са и Mg стабилизируют адгезию

клеток эпителия. Роговица лучше сохраняется и уменьшается десквамация ее эпителия в растворе, близком по концентрации минеральных элементов к Сл [13].

В Сл человека содержание Na (130—170 мМ) близко к сывороточному [67], уровень К (26—42 мМ), Cl (26—42 мМ), Zn выше, чем в сыровотке [63]. Ион К активно транспортируется в Сл из эпителия роговицы и миоэпителиальных клеток слезных желез при их сокращении [44]. Важную роль в секреции Na и К в Сл играет апикальная и базально-латеральная локализация Na, К-АТФазы в ацинарных клетках слезных желез [74]. Содержание Са, (0,4—1 мМ) и Mg (0,3—0,6 мМ) в Сл ниже, чем в сыровотке крови [63]. При стимуляции секреции в Сл снижается концентрация Са, неорганического фосфата, но увеличивается содержание К [19]. В Сл у мужчин выше, чем у женщин, концентрация Са, Mg, но ниже уровень Mn. При бактериальном конъюнктивите повышается содержание этих катионов, при вирусном кератите увеличивается количество Na, а при иридоциклите снижается уровень 5 перечисленных элементов. У детей с фиброзным циститом повышено содержание Са в Сл [19]. Уровень Mn в Сл при эмоциональной секреции повышен [45].

**Лекарственные препараты.** Обнаружение Li в Сл [20] представляет интерес, так как препараты Li купируют острое маниакальное возбуждение у психических больных и предупреждают аффективные приступы. Пенициллин, эритромицин и большое число других антибиотиков легко выявляются в Сл [45], что позволяет избежать лишнего взятия крови, которое не всеми больными, особенно детьми, спокойно переносится. Таким образом с помощью анализа Сл судят о фармакодинамике препаратов у людей.

**Заключение.** Приведенные в обзоре работы преимущественно последних лет свидетельствуют о том, что исследование Сл важно не только в теоретическом плане. Оно имеет диагностическое и прогностическое значение не только в офтальмологии, но и при наследственных болезнях, в том числе при многих гликозидозах, при системной патологии, например при болезни Шегрена, саркоидозе, множественном склерозе, лепре, уремии. Имеет оно значение и при таких распространенных заболеваниях, как сахарный диабет, ревматоидный артрит и при ряде других патологических процессов. Обнаружение в Сл лекарственных препаратов позволяет применить ее анализы в качестве скрининг-тестов.

Вне всякого сомнения, в ближайшие годы СЛ, отражающая состояние не только глаза, но и всего организма, даст много новой информации для теоретической и клинической биохимии. Биохимикам, работающим в различных областях медицины, следует уделять больше внимания исследованию Сл, методике получения ее, что может иметь решающее значение для правильной интерпретации результатов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Байтерякова Л. С., Усова Л. А. // Офтальмол. журн.— 1987.— № 2.— С. 112—113.
2. Касавина Б. С., Зангева В. Д. // Вестн. офтальмол.— 1974.— № 1.— С. 72—75.
3. Касавина Б. С., Кузнецова Т. П. // Там же.— 1978.— № 5.— С. 79—82.
4. Касавина В. С., Чеснокова Н. В. // Офтальмол. журн.— 1974.— № 4.— С. 307—310.
5. Петрович Ю. А., Боровик Г. А. // Докл. АН СССР.— 1973.— Т. 212.— С. 1465—1468.
6. Сомов Е. Е., Бржеский В. В. // Офтальмол. журн.— 1986.— № 7.— С. 433—438.
7. Терехина Н. А., Петрович Ю. А., Гольдфельд Н. Г. А. с. 1320755 СССР // Открытия.— 1987.— № 24.— С. 211.
8. Хурсин Н. Е. // Вопр. мед. химии.— 1973.— Т. 24.— С. 845—847.
9. Чеснокова Н. В. // Мед. реф. журн.— 1986.— № 3.— С. 7—11.
10. Чеснокова Н. В., Шутов П. А. // Вирусные заболевания глаз.— М., 1982.— С. 36—38.
11. Чекина А. Ю., Коломиец Н. Д., Коломиец А. Г., Петрашвили Л. А. // Офтальмол. журн.— 1985.— № 8.— С. 502—506.
12. Allerhand J., Karelitz S., Isenberg H. D. et al. // J. Pediat.— 1963.— Vol. 62.— P. 235—238.
13. Bachman W. G., Wilson G. // Invest. Ophthalm.— 1985.— Vol. 26.— P. 1484—1488.
14. Barber R. F., Shek P. N. // Biochim. biophys. Acta.— 1986.— Vol. 879.— P. 157—163.
15. Bergmann K. G., Waldman R. H., Tischner H., Phol W. D. // Int. Arch. Allergy.— 1986.— Vol. 80.— P. 107—109.
16. Berman M. B., Barber J. C., Talamo R. C., Langley C. E. // Invest. Ophthalm.— 1973.— Vol. 12.— P. 759—770.
17. Berta R., Kalman Z. // Radiobiol.-radiother.— 1987.— Bd 28.— S. 546—549.
18. Bonavida B., Sapse A. T., Sersarz E. E. // Nature.— 1969.— Vol. 221.— P. 375—376.
19. Botelho S. Y., Goldstein A. M., Rosenlund M. L. // J. Pediat.— 1973.— Vol. 83.— P. 601—606.
20. Brenner R., Cooper T. B., Yablonski M. C. et al. // Amer. J. Psychiat.— 1982.— Vol. 139.— P. 5—9.
21. Cabezas J. A., Porte J. U., Frois M. D. et al. // Biochim. biophys. Acta.— 1964.— Vol. 83.— P. 318—325.
22. Coyle P. K., Sibony P., Johnson C. // Neurology.— 1987.— Vol. 37.— P. 857—859.
23. Dahl H., Dahl C. // Acta ophthalm.— 1985.— Vol. 63.— P. 692—694.
24. Darft D. A., Donowitz M., Joshi V. M. et al. // J. Physiol. (Lond.).— 1984.— Vol. 352.— P. 375—384.
25. Dhir S. P., Garg S. K., Sharma Y. R., Lath N. K. // Amer. J. Ophthalm.— 1979.— Vol. 87.— P. 403—404.
26. Erdei Z. // Szemészet.— 1986.— Vol. 105.— P. 30—31.
27. Erickson O. F. // Stanford med. Bull.— 1955.— Vol. 13.— P. 292—294.
28. Finney P. M., Bushell A. C. // J. Immunol. Meth.— 1986.— Vol. 86.— P. 71—74.
29. Flachsmeyer R., Wiechert P. // Graefe's Arch. klin. exp. Ophthalm.— 1963.— Bd 165.— S. 516—518.
30. Fox P. D., Knaw P. T., McBride B. W., McGill J. I. // Brit. J. Ophthalm.— 1986.— Vol. 70.— P. 584—588.
31. Friedman Z. Y., Lowe M., Selinger Z. // Biochim. biophys. Acta.— 1981.— Vol. 675.— P. 40—45.
32. Fujikawa L. S., Palestine A. G., Nussenblatt R. B. et al. // Lancet.— Vol. 2.— P. 529—530.
33. Fullard R. J., Carney L. G. // Acta ophthalm.— 1986.— Vol. 64.— P. 216—220.
34. Fushimi H., Tarui S. // Clin. chim. Acta.— 1976.— Vol. 71.— P. 1—8.
35. Giardini A. // Boll. Ocul.— 1948.— Vol. 27.— P. 585—594.
36. Giles H. G. // Canad. J. Physiol. Pharmacol.— 1987.— Vol. 65.— P. 2491—2493.
37. Gloumaud J., Liotet S. // J. franc. Ophthalm.— 1987.— Vol. 10.— P. 639—645.
38. Glund B. S., Jensen O. L., Krogh E., Birgens H. S. // Acta ophthalm.— 1985.— Vol. 63.— P. 375—379.
39. Gupta A. K., Sarin G. S., Lamba P. A., D'Souza P. // Brit. J. Ophthalm.— 1986.— Vol. 70.— P. 439—441.
40. Immonen I., Friberg K., Sorsila R., Fuhrquist F. // Acta ophthalm.— 1987.— Vol. 65.— P. 27—29.
41. Jensen O. L., Glund B. S., Birgens H. S. // Ibid.— 1985.— Vol. 63.— P. 341—345.
42. Johnson D. L., Del Monte M. A., Cottier E., Desnick R. J. // Clin. chim. Acta.— 1975.— Vol. 63.— P. 81—90.
43. Josephson A. S., Lockwood D. W. // J. Immunol.— 1964.— Vol. 93.— P. 532—539.
44. Kahan I. L. Zur Biochemie des Auges.— Budapest, 1982.
45. Kastl R. P. // Laboratory Diagnosis in Ophthalmology.— New York, 1987.— P. 206—220.

46. Kuizenga A., Van Haeringen N. J., Kijlstra A. // Invest. Ophthalm.— 1987.— Vol. 28.— P. 305—313.
47. Libert J., Van Hoof F., Tondeur M. // Ibid.— 1976.— Vol. 15.— P. 626—639.
48. McGill J. I., Liakos G. M., Goulding N., Seal D. V. // Brit. J. Ophthalm.— 1984.— Vol. 68.— P. 316—320.
49. Palfalvi M., Kahan I. L., Es S. B. // Szemészet.— 1982.— Vol. 110.— P. 100—106.
50. Paterson C. A., O'Rourke C. // Arch. Ophthalm.— 1987.— Vol. 105.— P. 376—377.
51. Prause J. H. Acta ophthalm.— 1983.— Vol. 61.— P. 272—282.
52. Rao G. M. // Horm. metabol. Res.— 1981.— Vol. 13.— P. 533—534.
53. Rennert O. M., Kaiser D., Sollberg H., Joller-Jemelka S. // Hum. Genet.— 1974.— Bd 23.— S. 73—77.
54. Saha K., Sarin G. S., Chanraborty A. K., Sen D. K. // Int. J. Leprosy.— 1977.— Vol. 45.— P. 338—342.
55. Salonen E. V., Tervo T., Torma E., Terkkänen A. et al. // Acta ophthalm.— 1987.— Vol. 65.— P. 3—12.
56. Sand B., Jensen O. L., Eriksen J. S., Vinding T. // Ibid.— 1986.— Vol. 64.— P. 212—215.
57. Schmut O. // Klin. Mbl. Augenheilk.— 1986.— Bd 188.— S. 593—595.
58. Schultze I., Strob H., Bauerdorfer S., Thovenod F. // Curr. Eye Res.— 1985.— Vol. 4.— P. 467—470.
59. Sen D. K., Sarin G. S. // Int. J. Leprosy.— 1982.— Vol. 50.— P. 322—324.
60. Sen D. K., Sarin G. S. // Brit. J. Ophthalm.— 1986.— Vol. 79.— P. 246—248.
61. Singer J. B., Collier E., Krimmer R. // Lancet.— Vol. 2.— P. 1116—1119.
62. Stratford R. E., Yang D. C., Redell M. A., Lee H. H. // Int. J. Pharm.— 1983.— Vol. 13.— P. 263—272.
63. Tapeszto I. // Int. Ophthalm. Clin.— 1973.— Vol. 13.— P. 119—147.
64. Thörig L., Van Haeringen N. J., Wijngaard A. // Exp. Eye Res.— 1984.— Vol. 38.— P. 605—609.
65. Tsuboyama A., Miki T., Yoshida M. et al. // Clin. chim. Acta.— 1977.— Vol. 80.— P. 237—242.
66. Ubels J. L., Foley K. M., Rismonde V. // Invest. Ophthalm.— 1986.— Vol. 27.— P. 1261—1268.
67. Van Haeringen N. J. // Surv. Ophthalm.— 1981.— Vol. 26.— P. 84—96.
68. Van Haeringen N. J., Glasius E. // Exp. Eye Res.— 1975.— Vol. 20.— P. 271—277.
69. Van Haeringen N. J., Glasius E. // Graefe's Arch. klin. exp. Ophthalm.— 1977.— Bd 202.— S. 1—7.
70. Van Hoof F., Libert J., Aubert-Tulkens G., Serris M. V. // Metabol. Ophthalm.— 1977.— Vol. 1.— P. 165—171.
71. Watson R. R., Reyes M. A., McMurrey D. N. // Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.).— 1978.— Vol. 157.— P. 215—219.
72. Whiting P. H., Ross I. S., Borthwick L. J. // Clin. chim. Acta.— 1979.— Vol. 197.— P. 191—195.
73. Wilkinson J. N., Robinson J. N. // Nature.— 1974.— Vol. 249.— P. 662—663.
74. Wood R. L., Mirceff A. K. // Invest. Ophthalm.— 1986.— Vol. 27.— P. 1293—1296.
75. Yelos P., Cherry P. M. // Amer. J. Ophthalm.— 1985.— Vol. 103.— P. 31—33.
76. Zajacs M., Berta A. // Klin. Mbl. Augenheilk.— 1985.— Bd 187.— S. 401—402.
77. Zirm M., Schmut O., Hofmann H. // Graefe's Arch. klin. exp. Ophthalm.— 1976.— Bd 198.— S. 74—89.

Поступила 01.11.88

УДК 616.153.915-39-07

А. Н. Децина, А. Г. Бачинский

## ОЦЕНКА СКЛОННОСТИ ЛИПИДОВ К ПЕРЕКИСНОМУ ОКИСЛЕНИЮ ПРИ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ НА ОРГАНИЗМ

ВНИИ молекулярной биологии НПО «Вектор», пос. Кольцово, Новосибирская обл.

Содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в тканях при многих хронических заболеваниях и ряде неблагоприятных воз-

действий на организм возрастает [1—3, 6, 8, 9]. В большинстве случаев при этом в жирно-кислотном составе липидов наблюдаются изменения, характеризующиеся снижением содержания полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) [5]. Есть основания полагать, что именно ПОЛ является процессом, определяющим направление и глубину наблюдаемых изменений в жирно-кислотном составе липидов тканей организма при неблагоприятных воздействиях. Поэтому при оценке степени ненасыщенности липидов или при выявлении их склонности к перекисному окислению (в качестве реакции на неблагоприятные воздействия) целесообразно пользоваться обобщенным индексом, учитывающим суммарную ненасыщенность липидов и (или) их реакционную способность в процессах ПОЛ.

Обычно для выявления суммарной ненасыщенности или для оценки склонности липидов к окислению используются индексы ненасыщенности, определяемые отношением суммарных количеств ПНЖК к насыщенным [4], суммой произведений процентного содержания кислот на число двойных связей в каждой из них [5] и т. д. Однако использование этих индексов в редких случаях является достаточно обоснованным и предполагает возможность ошибочных выводов и заключений, связанных с тем, что они не учитывают истинную реакционную способность жирно-кислотных фрагментов липидов в процессах ПОЛ.

Методика. При сопоставлении различных индексов коэффициенты линейной регрессии и их доверительные интервалы рассчитывали с использованием пакета программ «Статистика», реализованного на языке ФОРТРАН IV в системе ЕС ЭВМ.

Результаты и обсуждение. В табл. 1 представлены относительные скорости окисления индивидуальных жирных кислот в зависимости от количества двойных связей по данным [7].

При расчете коэффициентов реакционной способности использовали величины относительной скорости окисления жирных кислот при 37 °С. Однако из-за отсутствия сопоставимых данных для жирных кислот, не имеющих связей С=С, переход к насыщенным системам осуществляли с учетом относительных скоростей окисления стеариновой и олеиновой кислот при 110 °С. Из данных, представленных в табл. 1, видно, что повышение температуры процесса окисления приводит к сглаживанию различий в относительной реакционной способности исходных соединений. Поэтому можно ожидать, что соотношение склонностей к окислению стеариновой и олеиновой кислот при 37 °С будет более высоким, чем 1:11. Однако, учитывая их весьма низкие абсолютные скорости окисле-

Таблица 1

Относительная реакционная способность (ОРС) жирных кислот в процессах перекисного окисления и коэффициенты реакционной способности (КРС)

Показатель	Количество двойных связей в жирной кислоте						
	0	1	2	3	4	5	6

ОРС:							
при 37 °С	—	0,025	1	2	4	6	8
при 110 °С	1	11	114	179	—	—	—
КРС	1	11	435	870	1739	2609	3478



Таблица 2

Сопоставление ИН и ИРС липидов цитоплазматических мембран клеток (по данным [11])

Показатель	Полноценная сыворотка	Делипидизированная сыворотка	
	без добавок	+C18:1	+C18:2
Содержание C18:1, %	20,9	29,6	12,3
Содержание C18:2, %	1,7	1,2	11,7
ИН	143,2	110,6	139,3
ИРС <sub>ПОЛ</sub>	54 241	35 643	43 828

Примечание. ИН и ИРС<sub>ПОЛ</sub> рассчитывали по формулам (1) и (2) для всего набора жирных кислот, приведенных в [11].

ния, которые при наличии ПНЖК вносят незначительный вклад в общую реакционную способность липидов, ожидаемыми различиями можно пренебречь.

В соответствии с вышеизложенным индекс реакционной способности (ИРС) к ПОЛ (ИРС<sub>ПОЛ</sub>) предлагается рассчитывать по следующей формуле:

$$\text{ИРС}_{\text{ПОЛ}} = \sum C_i K_i, \quad (1)$$

где  $C_i$  — относительное содержание индивидуальных (насыщенных и ненасыщенных) жирных кислот, а  $K_i$  — коэффициент реакционной способности (см. табл. 1).

Для проверки наличия связи между ИРС<sub>ПОЛ</sub> и традиционно используемым индексом ненасыщенности (ИН) был проведен расчет их значений для 52 наборов жирно-кислотных составов липидов, приведенных в работах [10—16], а также изучено наличие зависимостей между полученными величинами. Оказалось, что для большинства вариантов расчетов ИН корреляция с ИРС<sub>ПОЛ</sub> является достоверной, хотя и не очень высокой (коэффициент корреляции ниже 0,77). Для ИН, определяемого по формуле:

$$\text{ИН} = \sum C_i n_i, \quad (2)$$

коэффициент линейной корреляции оказался несколько более высоким (0,83). Здесь  $n_i$  — число двойных связей в индивидуальной жирной кислоте, а  $C_i$  — ее относительная концентрация. Однако и в этом случае расхождения между величинами ИН, рассчитанными по формуле (2) и регрессионному уравнению:

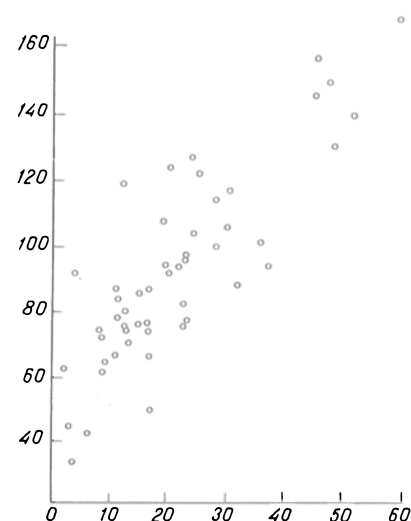
$$\text{ИН} = 52,6 + 0,00165 \text{ИРС}_{\text{ПОЛ}}, \quad (3)$$

могут оказаться достаточно высокими и достигать в отдельных случаях 40—50 % (см. рисунок).

В качестве примера, свидетельствующего о практической важности адекватного выбора критерия оценки, можно сослаться на результаты работы [11], авторы которой изучали действие радиации на культуру клеток LDV, меняя жирно-кислотный состав клеточных липидов посредством добавления в питательную среду олеиновой (C18:1) и линолевой (C18:2) кислот. Зафиксированное при этом увеличение содержания в клеточной мембране соответствующих кислот (табл. 2) рассматривалось как повышение степени ненасыщен-

Корреляционная зависимость между величинами ИН и ИРС<sub>ПОЛ</sub>.

По оси абсцисс — ИРС<sub>ПОЛ</sub> · 10<sup>-3</sup>, по оси ординат — ИН.



ности. Обнаружив отсутствие заметных различий в склонности клеток с разным содержанием жирных кислот C18:1 и C18:2 к радиационному воздействию, авторы [11] сделали вывод о том, что вызываемое радиацией ПОЛ цитоплазматических мембран не является определяющим в процессе клеточного радиационного повреждения. Проведенный нами расчет ИРС<sub>ПОЛ</sub> по данным этой работы показал, что, несмотря на увеличенное содержание некоторых жирных кислот при введении в питательную среду их эндогенных аналогов, существенного изменения значений индексов не происходит в связи со снижением общего количества других, более реакционноспособных, ПНЖК. Следует подчеркнуть, что использование ИН, рассчитываемых по формуле (2), наиболее близких к ИРС<sub>ПОЛ</sub>, также приводит к аналогичным результатам. Таким образом, вывод авторов работы [11] мог претерпеть существенные изменения, если бы они воспользовались индексами, в большей степени отражающими реакционную способность липидов в процессах ПОЛ.

Другие примеры свидетельствуют о наличии различий между ИРС<sub>ПОЛ</sub> и разнообразными вариантами ИН. Так, в работе [5] приводятся ИН липидов печени при ее хронических поражениях, определяемые по формуле [2]. На основании величин этих индексов авторы делают вывод о том, что наиболее значительные изменения ненасыщенности наблюдаются при портальном и билиарном циррозах печени (табл. 3). Однако величины ИРС<sub>ПОЛ</sub>, которые также могут характеризовать глубину изменений ненасыщенности и направление этих изменений, свидетельствуют о том, что, если для портального цирроза и наблюдается некоторое снижение ИРС<sub>ПОЛ</sub>, сопоставимое с ошибкой определения (~20 %), то для билиар-

Таблица 3

Сопоставление ИН и ИРС липидов печени в норме, а также при хронических гепатитах, циррозах и жировом гепатозе (по данным [5])

Индекс	Контроль	Хронический гепатит	Персистирующий гепатит	Портальный цирроз	Билиарный цирроз	Жировой гепатоз
ИН	123	105	108	86	82	105
ИРС <sub>ПОЛ</sub>	33 565	23 098	23 642	16 911	20 992	21 683

Таблица 4

Сопоставление ИН и ИРС липидов плазмы крови, мембран эритроцитов и тромбоцитов здоровых людей и больных гиперлипипротемией II типа (по данным [4])

Объект исследования	Пациенты	ИН	ИРС <sub>ПОЛ</sub>
Плазма крови	Здоровые:	1,37	52 644
	Больные:		
	тип Па	2,03	51 889
	тип Пб	1,90	55 085
Эритроциты	Здоровые	0,98	62 583
	Больные:		
	тип Па	1,12	71 767
	тип Пб	1,07	68 382
Тромбоциты	Здоровые	0,99	52 750
	Больные (тип Па)	1,50	55 275

Примечание. ИН рассчитывали по формуле:

$$\text{ИН} = \frac{\sum C_i n_i}{\sum C_j},$$

где  $C_i$  — соответствует относительной концентрации ПНЖК, а  $n_i$  — число двойных связей в ее молекуле;  $C_j$  — относительная концентрация насыщенной кислоты.

ного цирроза эта величина практически не отличается от соответствующих значений для других заболеваний печени. Если рассмотреть данные, полученные в работе [4], характеризующие изменения состава жирных кислот мембран эритроцитов, тромбоцитов и липидов плазмы крови при заболевании гиперлипипротемией, то вывод, который можно было бы сделать на основании значений ИН (увеличение степени ненасыщенности при заболевании), оказался бы некорректным, так как значения ИРС<sub>ПОЛ</sub> у больных и здоровых людей практически не различаются (табл. 4).

Число подобных примеров может быть значительно увеличено, так как изучение связи между неблагоприятными воздействиями на организм и усилением процессов ПОЛ привлекает пристальное внимание исследователей [1–4]. Отметим также, что использование любых индексов, отражающих относительную ненасыщенность (реакционную способность) липидов без учета их общего содержания в клетках, органах и т. п., не всегда является методически оправданным.

Таким образом, предложены новые индексы реакционной способности (ИРС<sub>ПОЛ</sub>), характеризующие склонность липидов к ПОЛ, а также глубину и направление изменений ненасыщенности липидов. Использование этих индексов может иметь определенные преимущества по сравнению с традиционно применяемыми в таких случаях индексами ненасыщенности.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Айрапетянц М. Г., Левшина И. П., Гуляева И. В. // Журн. выш. нервн. деят. — 1986. — Т. 36, № 3. — С. 554–560.
2. Коваленко В. М., Вилков Г. А., Степаненко Е. М., Крыжановский Г. П. // Бюл. экспер. биол. — 1987. — Т. 104, № 10. — С. 440–441.
3. Козлов Г. С., Посков С. М. // Вопр. мед. химии. — 1986. — Т. 32, № 5. — С. 1–44.
4. Корф И. И., Мещерякова В. А., Самсонов М. А. и др. // Там же. — 1987. — Т. 33, № 3. — С. 73–77.
5. Мохов В. М., Блюдзин Ю. А. // Там же. — 1987. — Т. 33. — С. 38–42.
6. Панисюк Е. Н., Скакун Л. П. // Косм. биол. — 1985. — Т. 19, № 1. — С. 48–52.

7. Ушкалова В. Н., Иоанидис Н. В., Артамонова Н. А., Бурковская И. Ф. // Современные проблемы биоорганической химии и химии природных соединений. — Алма-Ата, 1984. — С. 499–509.
8. Худжамбердиев М. // Бюл. экспер. биол. — 1985. — Т. 100, № 9. — С. 285–286.
9. Шилина Н. К. // Структура, биосинтез, превращения липидов в организме животного и человека. — М., 1975.
10. Anderton P., Wild T. F. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1981. — Vol. 103. — P. 285–291.
11. George A. M., Lunec J., Cramp W. A. // J. Radiat. Biol. — 1983. — Vol. 43, N 4. — P. 363–378.
12. Klenk H.-D., Choppin P. W. // Virology. — 1970. — Vol. 40. — P. 939–947.
13. Lynch R. D., Locicero J., Scheneberger E. E. // Lipids. — 1986. — Vol. 21. — P. 447–453.
14. McSharry J. J., Wagner R. R. // J. Virol. — 1971. — Vol. 7, N 1. — P. 59–70.
15. Moore N. F., Moore J. C., Kelly D. C. // Microbiologica. — 1984. — Vol. 7. — P. 267–272.
16. Stoll L. L., Spector A. A. // In Vitro. — 1984. — Vol. 20, N 9. — P. 732–738.

Поступила 09.12.88

#### ESTIMATION OF LIPID TENDENCY TO PEROXIDATION UNDER PATHOLOGICAL CONDITIONS

A. N. Detsina, A. G. Bachinsky

Institute of Molecular Biology, Research-Industrial Association "Vector", Kol'tsovo, Novosibirsk region

New indices are developed for estimation of lipid tendency to peroxidation as well as of the rate of alterations occurring in the reactivity of fatty acid residues. Interrelationship of these patterns with routinely used indices of unsaturation is discussed.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616-001.5-001.36-092.9-07:616.831-008.9

М. П. Логинова, М. В. Ассур, И. Г. Болдина

#### СОСТОЯНИЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА МОЗГА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ГЕМОРАГИЧЕСКОМ ШОКЕ

НИИ скорой помощи им. И. И. Джанелидзе, Ленинград

Известно, что головной мозг является органом, ответственным за формирование защитно-приспособительных реакций на экстремальные воздействия и поддержание гомеостаза в организме. В предшествующих исследованиях, проведенных в нашей лаборатории, была обнаружена большая, чем считалось ранее, устойчивость энергетического обмена в головном мозге при травматическом шоке [8, 16]. Данные литературы о состоянии энергообеспечения этого органа при геморрагическом шоке немногочисленны, противоречивы и характеризуют его изменения в пределах 0,5–4 ч от начала процесса [2, 10, 12, 22, 24, 26]. Вместе с тем, по клиническим данным, период нестабильной гемодинамики продолжается около 17 ч [18]. В связи со сказанным целью работы явилось исследование системы адеиноновых нуклеотидов, редокс-состояния клеток и показателей углеводного обмена мозга при тяжелом геморрагическом шоке с длительной артериальной гипотензией.

Методика. Эксперименты поставлены на 40 беспородных крысах-самцах массой 250–300 г. Фиксацию животных и катетеризацию бедренных артерий осуществляли под нембуталовым наркозом (40 мг на 100 г массы тела). Геморрагический шок воспроизводили по методу Уиггерса

Таблица 1

**Изменение физиологических показателей в динамике геморрагического шока у неустойчивых и устойчивых к кровопотере животных ( $M \pm m$ )**

Показатель	Группа животных	
	неустойчивые (10)	устойчивые (11)
Фиксация (контроль)		
АД, мм рт. ст.	108 $\pm$ 3,2	108 $\pm$ 2,0
ЧД в минуту	78 $\pm$ 2,2	69 $\pm$ 4,0
Температура тела, °С	35,9 $\pm$ 0,4	34,5 $\pm$ 0,5
Начало декомпенсации кровообращения:		
АД, мм рт. ст.	32 $\pm$ 0,5*	34 $\pm$ 0,3*
ЧД в минуту	64 $\pm$ 4,3*	55 $\pm$ 4,4*
температура тела, °С	28,5 $\pm$ 0,9*	27,0 $\pm$ 0,8*
объем максимальной кровопотери, % от ОПК	44,74 $\pm$ 3,0	60,9 $\pm$ 3,0**
объем максимальной кровопотери, % к массе тела	2,67 $\pm$ 0,2	3,6 $\pm$ 0,2**
Продолжительность гипотензии, ч	1,33 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 0,14**
Необратимый шок:		
АД, мм рт. ст.	31 $\pm$ 1,8*	35 $\pm$ 0,3***
ЧД в минуту	70 $\pm$ 5,7	62 $\pm$ 5,9
температура тела, °С	26,2 $\pm$ 0,4*	24,4 $\pm$ 0,8*
Продолжительность гипотензии, ч	4,1 $\pm$ 0,6	14,1 $\pm$ 1,4
Агональное состояние:		
температура тела, °С	24,6 $\pm$ 0,7*	23,9 $\pm$ 0,6*
скорость изменения температуры тела, °С/час	3,9 $\pm$ 0,3	1,3 $\pm$ 0,06**
Продолжительность жизни, ч	6,3 $\pm$ 0,9	19,0 $\pm$ 1,8**

Примечание. Здесь и в табл. 3 одна звездочка — достоверность различий по сравнению с контролем, две — по сравнению с неустойчивыми к кровопотере животными. В скобках — количество животных.

в модификации [20]. Кровопускание выполняли до заданного уровня артериального давления (АД) — 30–35 мм рт. ст. в течение 30 мин. В процессе шока измеряли АД, частоту дыхания (ЧД), ректальную температуру. Ткань мозга (большие полушария) замораживали погружением головы животного в жидкий азот, экстракты ткани готовили по [21]. Содержание креатинфосфата (КФ), аденозинтри-, ди- и монофосфатов (соответственно АТФ, АДФ и АМФ), лактата и пирувата в безбелковых экстрактах определяли ферментными методами [21], уровень гликогена — по [14], глюкозы — глюкозооксидазным методом [24]. Энергетический потенциал адениновых нуклеотидов вычисляли по [19]. Ткань на анализ для исследования забирали в следующие периоды шока: а) в начале декомпенсации кровообращения, когда для поддержания АД на уровне 30–35 мм рт. ст. требовалось поступление в организм крови и начиналась спонтанная ее инфузия из резервуара; б) в необратимой фазе шока, когда происходила инфузия 70 % максимального объема выпущенной крови; в) в агональном состоянии животных — после падения АД ниже 10 мм рт. ст. Статистическую обработку данных проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

**Результаты и обсуждение.** По продолжительности течения шокового процесса (от 2 до 30 ч) подопытные животные были разделены на 2 группы: менее и более устойчивых к кровопотере (1-я и 2-я соответственно). Агональное состояние наступало в среднем соответственно через 6 и 19 ч при большем объеме кровопотери у устойчивых особей и одинаковой у животных обеих групп ректальной температуре (табл. 1). Нужно подчеркнуть, что скорость снижения температуры в процессе шока у неустойчивых к кровопотере крыс была в 3 раза больше, чем у резистентных животных.

В начале декомпенсации кровообращения в тка-

ни мозга у всех особей содержание КФ, адениновых нуклеотидов, их сумма и энергетический потенциал не отличались от контрольных значений (табл. 2). Уровень лактата, пирувата и отношение лактат/пируват существенно не изменялись. Необратимая фаза шока также характеризовалась относительной стабильностью уровня макроэргических фосфорных соединений и метаболитов углеводного обмена.

В агональном состоянии в 1-й группе отмечалось резкое падение содержания КФ и АТФ — соответственно до 12 и 19 % от контроля и 6-кратное повышение количества АМФ (табл. 3). Сумма адениновых нуклеотидов снижалась до 60 % от контрольных значений, а энергетический потенциал уменьшался вдвое. Отношение лактат/пируват возрастало почти в 2 раза за счет некоторого повышения уровня лактата и снижения содержания пирувата.

У устойчивых к кровопотере животных в агональном состоянии была обнаружена большая вариабельность величин показателей энергетического обмена. Аналогичное явление мы отмечали ранее в печени устойчивых к кровопотере крыс в этот период геморрагического шока [9]. Поэтому по степени нарушений энергетического обмена в мозге резистентные особи были также разделены на I и II подгруппы. В I подгруппе (3 из 11 животных) величины показателей энергетического обмена в мозге свидетельствовали об истощении макроэргических фосфорных соединений и были близки к соответствующим значениям у низкоустойчивых крыс в момент их гибели. Однако у этих животных уровень лактата и пирувата был соответственно в 1,5 и 2 раза ниже, чем у неустойчивых крыс. У большинства животных II подгруппы агональное состояние развивалось при сохранении энергетических ресурсов в мозге — нормальном уровне КФ, АТФ и АДФ с незначительной тенденцией к увеличению АМФ. Общий фонд адениновых нуклеотидов и их энергетический потенциал поддерживались в пределах контрольных значений. Содержание лактата и пирувата было соответственно на 46 и 26 % ниже исходного, отношение лактат/пируват оставалось нормальным и было в 2,5 раза ниже, чем у неустойчивых крыс.

Таким образом, несмотря на тяжесть и длительность гипотензии, содержание адениновых нуклеотидов, их сумма и энергетический потенциал в головном мозге всех животных сохранялись на нормальном уровне до терминальной фазы процесса. У неустойчивых к кровопотере крыс в агональном состоянии наблюдались активация анаэробного гликолиза и полное истощение макроэргических фосфорных соединений в мозге, характерное для ишемического повреждения ткани [23], что согласуется с результатами исследований других авторов, полученных на аналогичной модели шока [12]. Наибольший интерес, на наш взгляд, представляют данные о стабильности пула адениновых нуклеотидов и их энергетического потенциала при отсутствии активации анаэробного гликолиза у большинства долгоживущих животных вплоть до их гибели, которая наступала через 12–30 ч гипотензии. Поддержание уровня АТФ в мозге или нерезкое его снижение при постгеморрагической гипотензии на уровне

Таблица 2  
Содержание метаболитов энергетического обмена в мозге крыс при геморрагическом шоке с уровнем стабильной гипотензии 30—35 мм рт. ст. (ммоль на 1 г сырой ткани;  $M \pm m$ )

Период опыта	КФ	АТФ	АДФ	АМФ	Сумма адениновых нуклеотидов	Энергетический потенциал	Лактат	Пируват	Лактат/пируват	Глюкоза	Гликоген
Контроль ( $n=9-11$ )	$2,10 \pm 0,15$	$2,56 \pm 0,10$	$0,34 \pm 0,04$	$0,16 \pm 0,02$	$3,01 \pm 0,14$	$0,891 \pm 0,009$	$3,82 \pm 0,55$	$0,228 \pm 0,018$	$17,50 \pm 2,09$	$0,74 \pm 0,26$	$4,72 \pm 0,84$
Начало декомпенсации кровообращения ( $n=5-6$ )	$2,19 \pm 0,40$	$2,54 \pm 0,32$	$0,29 \pm 0,06$	$0,14 \pm 0,04$	$2,96 \pm 0,41$	$0,910 \pm 0,009$	$5,36 \pm 1,26$	$0,198 \pm 0,034$	$21,85 \pm 3,31$	$1,15 \pm 0,41$	$3,61 \pm 0,33$
Необратимый шок ( $n=6$ )	$2,60 \pm 0,19$	$2,61 \pm 0,13$	$0,36 \pm 0,02$	$0,21 \pm 0,03$	$3,21 \pm 0,17$	$0,880 \pm 0,012$	$3,78 \pm 0,87$	$0,182 \pm 0,015$	$20,48 \pm 4,08$	$0,79 \pm 0,20$	$4,80 \pm 0,79$

30 и 40 мм рт. ст., но при значительно меньшей ее продолжительности (2,5 и 4 ч) отмечали Миллер [26] и В. Л. Кожура [10]. При этом ряд авторов наблюдали усиление гликолитических процессов в этой ткани [2, 3, 26]. Переход на такой же характерный для мозга путь утилизации глюкозы, по мнению М. III. Промыслова [15], является прогностически неблагоприятным, о чем также свидетельствуют и результаты нашего исследования.

Уровень метаболитов углеводного обмена в мозге всех животных оставался достаточно высоким вплоть до их гибели, чему, несомненно, способствовало снижение интенсивности окислительных процессов, характерное для гипоксических состояний любой этиологии [13]. Однако падение пула адениновых нуклеотидов на фоне нормальных значений глюкозы и гликогена указывает, очевидно, на нарушение утилизации глюкозы в клетках мозга низкоустойчивых особей. У большей части резистентных животных, по-видимому, поддерживалось оптимальное соотношение между доставкой глюкозы и ее потреблением, доказательством чего является сохранение способности митохондрий мозга к синтезу АТФ после тяжелой многочасовой циркуляторной гипоксии.

Полученные данные о возможности длительного сохранения энергетического гомеостаза мозга находятся в соответствии с современными представлениями о защитных механизмах поддержания кровотока и биоэлектрических процессов в мозге при снижении системного АД [4, 5, 7].

На подобной нашей модели шока [22, 28], а также на модели травматического шока по Кеннону [9, 11] были установлены критические значения системного АД (40—25 мм рт. ст.), при дальнейшем снижении которых происходит падение энергетического потенциала клеток мозга. Однако наши исследования показали, что у устойчивых особей энергетический гомеостаз мозга может поддерживаться даже при падении АД ниже 10 мм рт. ст. Этот неожиданный феномен становится понятным, если учесть данные литературы о критическом  $P_{O_2}$  ткани, лимитирующем работу дыхательной цепи митохондрий, которое составляет всего 1—3 мм рт. ст. [1, 17]. Кроме того, при падении АД ниже пороговых значений возможна компенсация ограниченного кровотока за счет повышения экстракции кислорода клетками мозга [27].

По данным А. И. Назаренко [6], у высокоустойчивых к гипоксии крыс потребность мозга в кислороде в обычных условиях меньше, чем у низкоустойчивых животных, в то время как способность этой ткани экстрагировать кислород в условиях сниженной его доставки у устойчивых особей значительно выше. В свою очередь В. Б. Лемус [11] пришел к заключению, что наибольшая устойчивость к геморрагическому шоку с поддерживаемой гипотензией характерна для животных с более медленным фоновым ритмом электрокортикограммы и преобладанием возбуждательного процесса в ядрах гипоталамической области. Под контролем центров гипоталамуса находятся не только механизмы регуляции сосудистого тонуса, но и химической терморегуляции. Значительное (на 8—9 °С) падение температуры тела, наблюдаемое нами у всех

Таблица 3

Содержание метаболитов энергетического обмена в мозге крыс при геморрагическом шоке с уровнем стабильной гипотензии 30—35 мм рт. ст. в агональном состоянии (ммоль на 1 г сырой ткани;  $M \pm m$ )

Период опыта	КФ	АТФ	АДФ	АМФ	Сумма адениновых нуклеотидов	Энергетический потенциал	Лактат	Пируват	Лактат/пируват	Глюкоза	Гликоген
Контроль ( $n=9-11$ )	$2,10 \pm 0,15$	$2,56 \pm 0,10$	$0,34 \pm 0,04$	$0,16 \pm 0,02$	$3,01 \pm 0,14$	$0,89 \pm 0,009$	$3,82 \pm 0,55$	$0,228 \pm 0,018$	$17,50 \pm 0,09$	$0,74 \pm 0,26$	$4,72 \pm 0,84$
Агональное состояние: неустойчивые ( $n=5-7$ )	$0,26 \pm 0,05^*$	$0,48 \pm 0,10^*$	$0,42 \pm 0,07$	$0,93 \pm 0,26^*$	$1,83 \pm 0,32^*$	$0,425 \pm 0,085^*$	$4,6^* \pm 0,86$	$0,186 \pm 0,038$	$31,70 \pm 0,65^*$	$0,59 \pm 0,21$	$4,06 \pm 0,72$
устойчивые I ( $n=3$ )	$0,11 \pm 0,06^*$	$0,31 \pm 0,06^*$	$0,42 \pm 0,25$	$0,56 \pm 0,30$	$1,31 \pm 0,32^*$	$0,430 \pm 0,088^*$	$1,76 \pm 0,27^{***}$	$0,092 \pm 0,018^*$	$19,29 \pm 0,018$	$0,42 \pm 0,24$	$3,21 \pm 1,09$
II ( $n=11$ )	$2,09 \pm 0,34^{**}$	$2,22 \pm 0,23^{**}$	$0,39 \pm 0,04$	$0,39 \pm 0,13$	$3,02 \pm 0,12^{**}$	$0,802 \pm 0,054^{**}$	$2,07 \pm 0,43$	$0,168 \pm 0,022^*$	$13,29 \pm 2,86^{**}$	$0,49 \pm 0,16$	$3,92 \pm 0,81$

животных на ранней стадии шока, можно расценивать как защитную реакцию организма, которая способствует замедлению скорости метаболических процессов, требующих больших энергетических затрат. Для головного мозга экономное расходование энергии на этой стадии процесса достигается отключением его от активной внешней деятельности, что позволяет сохранить жизнедеятельность и, главное, продлевает деятельность мозга как регулирующей системы внутренней среды, которая проходит под доминирующим контролем филогенетической программы, заложенной, как предполагают, в генетическом аппарате нервных клеток подкорковых структур и спинного мозга [7]. Меньшая скорость снижения температуры тела в последующих фазах шока и способность резистентных особей длительно поддерживать системное АД на заданном уровне свидетельствуют, по-видимому, о наличии у них (в сравнении с низкоустойчивыми) более совершенных механизмов регуляции гемодинамики и температурного гомеостаза, что, несомненно, имеет значение для оптимальной перестройки метаболических процессов, в том числе и энергетического обмена.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Барбашова Э. И. // Кислородный режим организма и его регулирование. — Киев, 1966. — С. 156—166.
2. Виленский И. Т. О патогенезе и профилактике тяжелых последствий длительной гипотензии, вызванной кровопотерей: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Пермь, 1973.
3. Зиновьев Ю. В., Козлов С. А., Овсянникова Е. Ю. // Вопр. мед. химии. — 1977. — № 2. — С. 151—155.
4. Мамасишвили В. А. // Регуляция мозгового кровообращения. — Тбилиси, 1980. — С. 25—28.
5. Мведлишвили Г. И. Механизм регулирования адекватного кровоснабжения головного мозга. — Тбилиси, 1979. — С. 67—75.
6. Назаренко А. И. // Кислородный гомеостаз и кислородная недостаточность. — Киев, 1978. — С. 93—98.
7. Казуева Т. В. Энергетический обмен при травматическом шоке и кровопотере: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Л., 1985.
8. Казуева Т. В., Ассур М. В., Вашетина С. М. и др. // Актуальные вопросы патогенеза и лечения острой кровопотери. — М., 1986. — С. 10—12.
9. Кожура В. Л. // Бюл. экспер. биол. — 1977. — № 11. — С. 569—570.
10. Лемус В. Б. Центральная регуляция кровообращения при травме и кровопотере. — Л., 1983.
11. Леонов А. М., Акуленко М. Е. // Пат. физиол. — 1973. — № 5. — С. 50—54.
12. Прохорова М. И. Нейрохимия. — Л., 1979.
13. Прохорова М. И., Туликова З. И. Большой практикум по углеводному и липидному обмену. — Л., 1965.
14. Промыслов М. Ш. Обмен веществ в мозге и его регуляция при черепно-мозговой травме. — М., 1984.
15. Травматическая болезнь / Под ред. О. С. Насонкина, И. И. Дерябина. — Л., 1987.
16. Шушков Г. Д., Казуева Т. В., Коврижных Э. Е. и др. // Бюл. экспер. биол. — 1974. — № 11. — С. 27—29.
17. Хавкина И. В. // Регуляция энергетического обмена и устойчивость организма. — Пушкино, 1975. — С. 139—143.
18. Цибин Ю. П., Гальцева И. В., Разумова Н. К. // Травматический шок. — Л., 1977. — С. 76—80.
19. Atkinson D. E. // Biochemistry (Wash.). — 1968. — Vol. 7, N 11. — P. 4030—4034.
20. Bacalzo L. V., Cary A. L., Miller L. D. // Surgery. — 1971. — Vol. 70, N 4. — P. 555—560.
21. Bergmeyer H. U. Methods of Enzymatic Analysis. — New York, 1975. — Vol. 1. — P. 565.
22. Eklof B., Mac Millan V., Siesjo B. K. // Acta physiol. scand. — 1972. — Vol. 86, N 4. — P. 515—527.
23. Farber E. // Fed. Proc. — 1973. — Vol. 32. — P. 1534—1539.
24. Kaasik A. E., Nielsson L., Siesjo B. K. // Acta physiol. scand. — 1970. — Vol. 27, N 2. — P. 448—458.

25. Krebs H. A., Bennet D. A. H., de Gasquet A. et al. // Biochem. J.—1963.— Vol. 86, N 1.— P. 22—27.
26. Miller A. T., Shen A. L., Bonner F. B. // Arch. int. Physiol. Biochem.—1974.— Vol. 82, N 1.— P. 69—74.
27. Siesjo B. K. // J. Neural. Transmis.—1978.— Suppl. 14.— P. 17—22.
28. Siesjo B. K., Zwetnow N. N. // Acta physiol. scand.—1970.— Vol. 79, N 1.— P. 114—124.

Поступила 31.02.89

## ENERGY METABOLISM IN BRAIN UNDER EXPERIMENTAL CONDITIONS OF HEMORRHAGIC SHOCK

M. P. Loginova, M. V. Assur, I. G. Boldina

Institute of Urgent Medical Service, Leningrad

State of energy metabolism was studied in brain of rats at agonal steps caused by bleeding during severe and long-term hypotension (30 mmHg, up to 30 hrs). Fast loss of high energy-containing phosphates, cell energy potential of adenine nucleotides and an increase in the lactate/pyruvate ratio were found in non-resistant rats. At the same time, in the most resistant rats normal content of creatine phosphate, ATP was maintained; energy potential was unaltered and anaerobic glycolysis was not activated. Content of glucose and glycogen did not alter considerably in all the animals studied.

© З. А. ТУПИКОВА, В. К. ОСИПОВИЧ, 1990

УДК 617-001.17-07:616.153.915-39]-092.9

З. А. Тупикова, В. К. Осипович

## ВЛИЯНИЕ СРЕДНИХ МОЛЕКУЛ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ ОБОЖЖЕННЫХ ПАЦИЕНТОВ, НА СОСТОЯНИЕ ПРОЦЕССОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ТКАНЯХ ЖИВОТНЫХ

Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Ленинград

Низкомолекулярные белковые (пептидные) антиоксиданты в сыворотке крови одним из первых обнаружил А. А. Barber [13]. Позже присутствие подобных веществ в сыворотке крови было подтверждено другими исследователями [14, 20, 23]. По данным М. Vidlakova и соавт. [25], эти пептиды защищают ненасыщенные жирные кислоты от перекисной деструкции во время их внутрисосудистого транспорта. Однако химическая природа веществ данного класса остается пока не изученной.

В предыдущих исследованиях [11] *in vitro* было показано, что на роль пептидных антиоксидантов могут претендовать среднемолекулярные пептиды или так называемые средние молекулы (СМ). В частности, установлено, что в концентрации 0,6 мг/мл, соответствующей содержанию СМ в сыворотке крови пострадавших с ожогами средней тяжести, эти вещества практически полностью блокируют аскорбатзависимое окисление липидов (ПОЛ) в тканевых гомогенатах. Но для решения практических вопросов медицинской химии значительно больший интерес представляют исследования эффективности СМ *in vivo* непосредственно при внутривенном введении.

Методика. Опыты выполнены на 39 белых беспородных мышках-самцах массой 20—22 г, находившихся на обычном рационе вивария. Для создания биологической модели с измененной активностью ПОЛ 18 животным наносили ИК-излучением ожог III степени в области спины на площади

10—12 % поверхности тела, остальные мыши являлись интактными. Через 3 сут после травмы 10 обожженным животным, а также 8 интактным вводили СМ, выделенные из сыворотки крови пострадавших с ожогами II—III степени на площади 18—45 % поверхности тела. Фракцию СМ получали по опубликованной ранее методике [6]. Лиофилизировали, затем растворяли в физиологическом растворе и стерильно вводили животным в хвостовую вену в объеме 0,3 мл, включающем 700 мкг пептидов, что соответствовало содержанию СМ в 1 мл сыворотки крови пострадавших с ожогами. 8 обожженных и 6 интактных мышей являлись контролем. Им внутривенно вводили 0,3 мл физиологического раствора. Дополнительным контролем служили 7 интактных животных без введения физиологического раствора. Через сутки после введения СМ или физиологического раствора животных декапитировали, извлекали мозг и печень и оценивали интенсивность ПОЛ в этих тканях по накоплению малонового диальдегида (МДА) [11]. Полученные результаты выражали в наномолях МДА на 1 г сырой ткани в час. Статистическую достоверность различий по сериям опытов определяли методом Стьюдента — Фишера.

**Результаты и обсуждение.** Внутривенное введение СМ интактным животным умеренно снижало интенсивность аскорбатзависимого ПОЛ и не оказывало существенного влияния на интенсивность НАДФН-зависимого и спонтанного ПОЛ в мозге (табл. 1). Интенсивность НАДФН-зависимого, спонтанного и особенно аскорбатзависимого ПОЛ в мозге мышей с ожогами была несколько выше, чем у интактных животных. Введение СМ обожженным животным вызывало нормализацию процессов ПОЛ.

Иные результаты были получены при исследовании эффекта внутривенного введения СМ на интенсивность ПОЛ в печени. Как свидетельствуют данные табл. 2, введение СМ интактным мышам стимулировало ПОЛ в НАДФН-зависимой и спонтанной системах инкубации. Интенсивность всех исследуемых процессов в печени животных через 3 сут после нанесения ожога резко снижалась. Введение СМ обожженным мышам вызвало еще более выраженное угнетение аскорбатзависимого ПОЛ при одновременной активизации НАДФН-зависимого и спонтанного процессов.

Таким образом, ожоговая травма способствовала резкой активации ПОЛ в головном мозге животных и снижению этих процессов в печени. Несколько неожиданные результаты, полученные при исследовании печени, согласуются с данными других авторов [1, 2], которые через 1—7 сут после ожога наблюдали резкое уменьшение содержания МДА и способности липидов субклеточных фракций печени крыс к окислению при индукции ПОЛ *in vitro* в аскорбат- и НАДФН-зависимой системах. Эти результаты, по их мнению, указывают на то, что после ожога *in vivo* ПОЛ в печени усиливается и субстрат окисления к моменту индукции ПОЛ *in vitro* оказывается уже в значительной степени окисленным. Кроме того, снижение уровня МДА может быть следствием того, что после ожога усиливаются реакции не только образования МДА, но и его расходования, причем реакции расходования продуктов ПОЛ превосходят по интенсивности их образование [1]. В головном мозге, отличающемся значительно более высоким, чем в печени, содержанием потенциальных субстратов ПОЛ [17], угнетения этого процесса, связанного с полным расходованием субстрата после ожога, не происходило.

Введение фракции СМ животным с ожогами, т. е. на фоне изменения равновесия в системе

Влияние внутривенного введения СМ на интенсивность ПОЛ в мозге intactных и обожженных животных

Система инкубации	Содержание МДА, нМ на 1 г ткани				
	группа животных				
	интактные	интактные + физиологический раствор	интактные + СМ	обожженные	обожженные + СМ
Аскорбатзависимая	455,7±34,7 (7)	461,1±51,2 (6)	398,8±23,5 (8)	629,2±28,6 (8)	501±19,2 (10)
НАДФН-зависимая	366,0±27,4 (7)	372,1±21,7 (6)	364,4±19,0 (8)	392,1±13,1 (8)	290,6±10,2 (10)
Спонтанная	143,7±17,9 (7)	139,2±15,8 (6)	149,5±10,4 (8)	165,6±7,9 (8)	154,0±6,9 (10)

Примечание. Здесь и в табл. 2 в скобках — число наблюдений;  $p_1$  — достоверность различий относительно intactных животных,  $p_2$  — относительно обожженных.

ПОЛ — антиоксиданты, закономерно вызывало более резкие нарушения интенсивности ПОЛ. Направленность этих сдвигов, как правило, была противоположна динамике показателей, вызываемой самой термической травмой. Так, в головном мозге животных, где интенсивность ПОЛ после ожога существенно повышалась, введение СМ способствовало нормализации интенсивности ПОЛ во всех системах инкубации. В печени, где после нанесения ожога отмечалось угнетение интенсивности ПОЛ, этих явлений не наблюдалось.

Нельзя не отметить и тот факт, что изменение уровня ПОЛ под влиянием СМ в мозге носит позитивный характер. Так, чрезмерная активация ПОЛ в мозге после ожога может приводить к нарушению связывания нейрональных рецепторов с нейротрансмиттерами, появлению дополнительных каналов проводимости и нарушению функции нервной системы в целом [3, 5, 7, 8, 12, 16, 24]. Снижая интенсивность ПОЛ, СМ тем самым предотвращает развитие этих явлений. С другой стороны, отмеченное после ожога резкое угнетение интенсивности ПОЛ в печени, т. е. в энергетическое депо организма, может отрицательным образом сказаться на состоянии обменных процессов, так как выработка определенных количеств продуктов ПОЛ (гидроперекисей) необходима для регуляции указанных процессов путем обратной инактивации ферментов, обратимых изменений проницаемости мембран и др. Действие СМ в этом случае направлено на активацию НАДФН-зависимого ПОЛ, т. е. процесса, строго регулируемого ферментными системами за счет более глубокого ингибирования аскорбатзависимого

ПОЛ. На основании этих данных можно сделать вывод, что действие СМ на ПОЛ имеет регуляторный характер и направлено на поддержание этого процесса на биологически наиболее целесообразном уровне.

Следует отметить, что наличие у СМ регуляторных свойств предполагается и другими авторами. Так, по данным некоторых исследователей [18, 19], СМ при утомлении снижают потребление глюкозы эритроцитами и тем самым предотвращают избыточное накопление молочной кислоты в крови и развитие метаболического ацидоза. В. Е. Рябини и соавт. [9] отмечают регуляторный характер действия СМ на процессы тканевого дыхания. По данным других авторов [15], СМ участвуют в регуляции реакций клеточного иммунитета.

Таким образом, на основании данных литературы и полученных нами результатов можно предположить, что СМ не являются абсолютно «вредными» для организма, как считалось ранее. В их состав наряду с токсическими веществами [10] входят и важные регуляторные компоненты, однако существующие в настоящее время методы фракционирования далеко не всегда позволяют их дифференцировать. Косвенным подтверждением важной биологической роли отдельных фракций СМ служат и данные ряда исследователей [21, 22] об их высокой реабсорбции в почечных канальцах.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Аристархова С. А., Булакова Е. Б., Заец Т. Л. // Вопр. мед. химии. — 1983. — № 4. — С. 102—106.
2. Булакова Е. Б., Заец Т. Л., Шелудченко Н. И. и др. //

Таблица 2

Влияние внутривенного введения СМ на интенсивность ПОЛ в печени intactных и обожженных животных

Система инкубации	Содержание МДА, нМ на 1 г ткани				
	группа животных				
	интактные	интактные + физиологический раствор	интактные + СМ	обожженные	обожженные + СМ
Аскорбатзависимая	180,0±19,7 (6)	174,2±14,4 (6)	201,0±21,2 (8)	116,2±14,6 (7)	89,7±9,3 (8)
НАДФН-зависимая	115,4±10,6 (6)	110,9±9,7 (6)	161,7±16,9 (7)	80,6±5,5 (7)	91,9±3,8 (9)
Спонтанная	57,9±8,5 (7)	60,1±7,7 (6)	93,7±10,3 (8)	12,3±3,4 (8)	20,9±3,0 (8)



Нарушения гомеостаза и их коррекция при ожоговой травме.— М., 1982.— С. 15—19.

3. Вагин Ю. Е., Кондратьев В. Е., Бурлакова Е. Б. // Труды Моск. о-ва испытателей природы.— 1975.— Т. 52.— С. 65—67.
4. Журавлев А. И. // Биантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии.— М., 1982.— С. 3—36.
5. Кольс О. Р., Ревин В. В., Свердлов Е. А. и др. // Там же.— С. 110—113.
6. Маркелов И. М., Вихриев Б. С., Тушикова З. А. и др. // Вопр. мед. химии.— 1983.— № 3.— С. 105—108.
7. Никушин Е. В., Браславский В. Е., Крижановский Г. Н. // Журн. невропатол. и психиатр.— 1981.— № 6.— С. 810—815.
8. Прилипко Л. Л., Лудеман Р. Р. // Вести. АМН СССР.— 1982.— № 1.— С. 33—37.
9. Рябинин В. Е., Лифшиц Р. И., Чарная Л. Ф. и др. // Вопр. мед. химии.— 1984.— № 3.— С. 113—116.
10. Тушикова З. А. // Там же.— 1983.— № 1.— С. 2—10.
11. Тушикова З. А. // Там же.— № 3.— С. 108—111.
12. Adam-Vizi V. // Biochem. Pharmacol.— 1982.— Vol. 31.— P. 2231—2236.
13. Barber A. // Arch. Biochem.— 1961.— Vol. 92.— P. 38—43.
14. Boehme D. H., Kosecki R., Carson S. // Brain Res.— 1977.— Vol. 136.— P. 11—21.
15. Cichocki T., Hanicki Z., Komorowska Z. // Donausymposium fur Nephrologie.— Budapest, 1977.— P. 13.
16. Demopoulos H. B., Flamm E. S., Pietronigro D. D. // Acta physiol. scand.— 1982.— Vol. 492.— P. 91—119.
17. Kartha V. N., Krishnamurthy S. // Indian J. Physiol. Pharmacol.— 1978.— Vol. 22.— P. 44—52.
18. Lutz W. // Acta physiol. pol.— 1977.— Vol. 28.— P. 117—125.
19. Markiewicz K., Lutz W., Choleva M. // Europ. J. clin. Invest.— 1980.— Vol. 10.— P. 281—284.
20. Placer Z., Stabachova Z. // Biochim. biophys. Acta.— 1961.— Vol. 18.— P. 427—428.
21. Schindhelm K., Schlatter E., Schurek H. J. // Contrib. Nephrol.— 1980.— Vol. 19.— P. 191—200.
22. Schindhelm K., Schlatter E., Schurek H. J. // Nephron.— 1982.— Vol. 30.— P. 166—172.
23. Stocks J., Gutteridge M. C., Sharp R. M. // Clin. Sci.— 1974.— Vol. 47.— P. 223—233.
24. Svoboda P., Mosinger B. // Biochem. Pharmacol.— 1981.— Vol. 30.— P. 427—432.
25. Vidlakova M., Erazimova J., Horki J. // Clin. chim. Acta.— 1972.— Vol. 36.— P. 61—66.

Поступила 31.01.89

#### EFFECT OF BLOOD SERUM PEPTIDES OF MIDDLE MOLECULAR MASS ON LIPID PEROXIDATION IN ANIMAL TISSUES

Z. A. Tupikova, V. K. Osipovich

Military Medical Academy, Leningrad

Intensity of ascorbate-, NADPH-dependent and spontaneous lipid peroxidation were studied in mice brain and liver tissues after intravenous administration of middle molecular mass peptides, isolated from blood serum of animals with thermic burns. Positive effect of these peptides on lipid peroxidation was detected in tissues of animals with altered rate of lipid peroxidation (strong burns of 10-12 % of body surface served as a biological model). The data obtained suggest that individual components of blood serum middle molecular fraction appear to exhibit the regulating effects on lipid peroxidation in animal tissues.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 612.351.11:577.152.2+612.352.2:547.915-39].014.482

Л. Ф. Легонькова, Г. З. Абакумов, М. И. Бушма, П. И. Лукиенко

#### ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ УДФ-ГЛЮКУРОНОЗИЛ-, ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗ И ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ МИКРОСОМ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ $\gamma$ -ОБЛУЧЕНИИ И ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ $\alpha$ -ТОКОФЕРОЛА

Институт биохимии АН БССР, Гродно

Общее  $\gamma$ -облучение животных вызывает значительное снижение активности и содержания в эндоплазматическом ретикулуме печени ферментов, катализирующих окислительное гидроксилирование ксенобиотиков [4, 5, 15]. Основной причиной инактивации этих ферментов, считают стимуляцию перекисного окисления липидов — ПОЛ (в частности в мембранах эндоплазматической сети), приводящую к их дезорганизации. Сведения о влиянии ионизирующей радиации на ферменты конъюгации, функционально связанные с гидроксилазами, в литературе отсутствуют.

В настоящей работе изучали изменения активности УДФ-глюкуронозилтрансферазы (в микросомах), глутатион-S-трансферазы (в микросомах и цитозоле), ПОЛ (в микросомах) печени крыс при  $\gamma$ -облучении и возможность использования  $\alpha$ -токоферола в качестве защитного средства.

Методика. Опыты проведены на 76 беспородных крысах-самцах массой 160—200 г. Животные были разделены на 3 группы — контрольную и 2 опытные. Животных 1-й опытной группы подвергали однократному общему облучению  $\gamma$ -квантами  $^{60}\text{Co}$  на установке «Луч-1» в экспозиционной дозе 219 мкЛ/кг (8,5 Гр) мощностью 478 мкА/кг. Крысам 2-й опытной группы в течение 9 дней до облучения и на протяжении всего периода после облучения вводили масляный раствор  $\alpha$ -токоферола в виде эмульсии в 1 % водном растворе желатина (в желудок, 100 мг/кг, с 12-часовыми интервалами). Контрольные и животные 1-й опытной группы получали соответствующий объем 1 % раствора желатина. Через 1, 5 и 10 сут после облучения крыс декапитировали, печень перфузировали охлажденным 1,15 % раствором КС1 и выделяли микросомальную и цитозольную фракции [3]. Активность УДФ-глюкуронозилтрансферазы в микросомах определяли по [9] (субстрат — п-нитрофенол), глутатион-S-трансферазы в цитозоле и микросомах по [8] [субстрат — 1-хлор-2,4-динитробензол (ХДНБ)]. Активность ферментов рассчитывали по скорости убывающей п-нитрофенола (УДФГТ) или по скорости образования конъюгата с глутатионом (глутатион-S-трансфераза) за 1 мин на 1 мг микросомального или цитозольного белка, определяемого по [10].

Интенсивность ПОЛ в микросомах определяли хемилюминесцентным методом [2] на хемилюминиметре ХЛМ-01 (конечная концентрация белка 0,5 мг/мл), а также по скорости образования малонового диальдегида (МДА) [2]. Об активности свободнорадикального перекисного окисления судили по интенсивности  $\text{Fe}^{2+}$ -индуцируемой «быстрой вспышки» свечения. Антиокислительную активность микросом определяли по способности их подавлять «быструю вспышку» в растворе окисленной олеиновой кислоты.

Результаты и обсуждение. Через 1 сут после облучения крыс в микросомальной фракции печени обнаружено значительное повышение активности ПОЛ: латентный период индукции хемилюминесценции при внесении в суспензию микросом  $\text{Fe}^{2+}$  уменьшился со  $180 \pm 48$  до  $56 \pm 9,5$  с; интенсивность «быстрой» вспышки хемилюми-



Изменение активности УДФ-глюкуронозил-, глутатион-S-трансфераз и ПОЛ микросом печени крыс через 1, 5 и 10 сут после однократного  $\gamma$ -облучения (8,5 Гр) и защитное действие  $\alpha$ -токоферола (200 мг/кг, в желудок, 9, 14, 29 дней) ( $M \pm m$ )

Показатель	Контроль	Время после облучения, сут		
		1	5	10
УДФ-глюкуронозилтрансфераза, нмоль паранитро-фенола/мин	10,97 $\pm$ 1,8	10,14 $\pm$ 1,2 14,07 $\pm$ 1,4**	5,39 $\pm$ 0,8* 17,04 $\pm$ 2,3***	6,68 $\pm$ 0,8* 8,96 $\pm$ 1,5**
Глутатион-S-трансфераза, нмоль конъюгата GSH с ХДНБ/мин (микросомы)	128,0 $\pm$ 16,5	143,10 $\pm$ 14,2 171,80 $\pm$ 8,2*	56,4 $\pm$ 2,8* 164,0 $\pm$ 6,9***	149,5 $\pm$ 14,4 226,6 $\pm$ 17,8***
Глутатион-S-трансфераза, нмоль конъюгата GSH с ХДНБ/мин (цитозоль)	1303,0 $\pm$ 122,0	1809,0 $\pm$ 102,0* 2101,0 $\pm$ 151,0*	815,0 $\pm$ 52,0* 1407,0 $\pm$ 48,0**	1544,0 $\pm$ 274,0 2018,0 $\pm$ 188,0*
Fe <sup>2+</sup> -стимулированная хемилюминесценция микросом, «быстрая вспышка», ими/мин	770,0 $\pm$ 131,0	1068,0 $\pm$ 197,0* 296,0 $\pm$ 11,0***	1510,0 $\pm$ 261,0* 640,0 $\pm$ 31,0**	821,0 $\pm$ 22,0 374,0 $\pm$ 15,0***
Антиокислительная активность, %	66,7 $\pm$ 4,3	57,8 $\pm$ 2,6 61,1 $\pm$ 1,0	20,3 $\pm$ 7,3* 64,8 $\pm$ 7,5**	63,3 $\pm$ 2,0 68,0 $\pm$ 1,3
НАДФН-зависимое ПОЛ, нмоль МДА/мин	1,91 $\pm$ 0,2	1,45 $\pm$ 0,09 0,35 $\pm$ 0,16***	1,31 $\pm$ 0,11 0,04 $\pm$ 0,01***	1,2 $\pm$ 0,17 0,16 $\pm$ 0,02***
Аскорбатзависимое ПОЛ, нмоль МДА/мин	1,19 $\pm$ 0,13	1,56 $\pm$ 0,05 0,06 $\pm$ 0,02***	1,30 $\pm$ 0,03 0,01 $\pm$ 0,001***	1,13 $\pm$ 0,15 0,02 $\pm$ 0,01***

Примечание. Показатели приведены на 1 мг белка микросомальной и цитозольной (глутатион-S-трансферазы) фракции; показатели в единицах СИ соответствуют указанным значениям, умноженным на  $(6 \cdot 10^{-1} \text{ нмоль} \cdot \text{С}^{-1} \cdot \text{мкг}^{-1} \text{ белка})$ . Звездочки — достоверность различий: одна по сравнению с показателем в контроле ( $p \leq 0,05$ ), две — по сравнению с показателем у облученных и нелеченных животных. GSH — глутатион. В числителе —  $\gamma$ -облучение; в знаменателе —  $\alpha$ -токоферол +  $\gamma$ -облучение.

несценции возросла в сравнении с их величиной у интактных крыс на 37,7 %; образование МДА в аскорбатзависимой системе увеличивалось на 31 %. Антиокислительная активность удерживалась в пределах контрольного уровня. При этом каталитические функции УДФ-глюкуронозил- и глутатион-S-трансфераз в микросомах существенно не изменялись, скорость конъюгации субстрата с глутатионом в цитозольной фракции была повышена на 39 % (см. таблицу).

Предварительное введение  $\alpha$ -токоферола в течение 9 сут до облучения в значительной мере предупреждало активацию реакций ПОЛ микросом и способствовало повышению активности ферментов конъюгации. Светосумма «быстрой вспышки» свечения была ниже по сравнению с таковой у нелеченных облученных крыс на 73 %, а скорость образования МДА в НАДФН- и аскорбатзависимых системах — снижена на 95,3 и 81,7 %. Активность УДФ-глюкуронозил- и глутатион-S-трансфераз микросом печени возрастала в сравнении с ее уровнем у интактных животных на 28,2 и 34,0 %. Каталитическая активность цитозольной глутатион-S-трансферазы была увеличена на 61 %.

На 5-е сутки после облучения уровень ПОЛ в микросомах, судя по светосумме «быстрой вспышки» свечения, удерживался на повышенном уровне. В этот период наблюдалось значительное снижение (более чем в 3 раза) антиокислительной активности микросом, а также снижение каталитической активности УДФ-глюкуронозил- и глутатион-S-трансфераз на 48 и 51 %. Активность цитозольной глутатион-S-трансферазы также была ингибирована (на 36 %).

В микросомах печени крыс, получавших  $\alpha$ -токоферол в течение 9 сут до облучения и 5 сут после облучения, ПОЛ было значительно снижено по сравнению с таковым у нелеченных животных, а активность УДФ-глюкуронозил- и глутатион-S-трансфераз (микросомальной и цитозоль-

ной) были выше в 3,3 и 1,7 раза соответственно.

Через 10 сут после облучения активность свободнорадикальных реакций и глутатион-S-трансферазы нормализовались, функция УДФ-глюкуронозилтрансферазы оставалась сниженной (на 40 %). У крыс, которым вводили  $\alpha$ -токоферол наблюдалось торможение реакций ПОЛ и стимуляция исследуемых ферментов конъюгации. Активность УДФ-глюкуронозил- и глутатион-S-трансфераз микросом превышала их активность у нелеченных животных на 34 и 51 %, а цитозольной глутатион-S-трансферазы на 30 %.

Таким образом, общее  $\gamma$ -облучение крыс в дозе 8,5 Гр вызывает в микросомах печени стимуляцию свободнорадикальных реакций ПОЛ (с максимумом активности через 1 сут после облучения) и ингибирование активности УДФ-глюкуронозил- и глутатион-S-трансфераз (с наиболее выраженным действием на 5-е сутки). Предварительное многократное введение  $\alpha$ -токоферола (в дозе 200 мг/кг, в желудок) значительно препятствовало нарушению функции ферментов.

Повреждающее действие ионизирующего облучения на ферменты, по-видимому, обусловлено преимущественно активацией ПОЛ, приводящего к деструкции клеточных и субклеточных мембран эндоплазматического ретикулума [1, 14], с которыми структурно и функционально связаны УДФ-глюкуронозил- и глутатион-S-трансферазы. Это предположение подтверждается не только нашими данными о повышении ПОЛ, предшествующем ингибированию активности ферментов, и о защитном действии антиоксиданта  $\alpha$ -токоферола, но и данными литературы [6, 7], согласно которым активность УДФ-глюкуронозилтрансферазы может быть значительно снижена при стимуляции перекисного окисления микросомальных фосфолипидов введением пероксидированных ненасыщенных жирных кислот.

Более выраженное угнетение УДФ-глюкуронозилтрансферазы в сравнении с таковым глута-

тион-S-трансферазы, вероятно, обусловлено наличием в молекуле этого фермента двух тиоловых групп, близко расположенных друг от друга [12], что делает ее более чувствительной к повреждающему действию продуктов перекисного окисления.

Наблюдаемое в начальном периоде после облучения увеличение активности глутатион-S-трансферазы в цитозоле, по-видимому, может рассматриваться как реакция мобилизации антиоксидантной системы, одним из компонентов которой является глутатион-S-трансфераза [13]. Защитное действие  $\alpha$ -токоферола, очевидно, связано с его антиоксидантными и мембраностабилизирующими свойствами [11].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Архипов А. С., Бурлакова Е. Б., Козлов Ю. П. // Физио-химия лучевого поражения. — М., 1969. — С. 3.
2. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М., 1972.
3. Карузина И. И., Арчаков А. И. // Современные методы в биохимии. — М., 1977. — С. 49—63.
4. Сергеев П. В. Стероидные гормоны. — М., 1984. — С. 239.
5. Халилов Э. М., Большев В. Н. // Фармакол. и токсикол. — 1976. — № 4. — С. 500—506.
6. Чимингорян Л. А., Мхитарян В. Г. // Журн. exper. и клин. мед. — 1981. — Т. 21, № 3. — С. 236—241.
7. Bently D. N., Wood G. C., Graham A. B. // Med. Biol. — 1979. — Vol. 57. — P. 274—280.
8. Habig W. A., Pabst M. J., Jakoby W. B. // J. biol. Chem. — 1974. — Vol. 249, N 22. — P. 7130—7139.
9. Isselbacher K. J. // Recent Progr. Horm. Res. — 1956. — Vol. 12. — P. 134—143.
10. Lowry O. A., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265—275.
11. McCay P. B., Poger J. L., Pfeiffer P. M. et al. // Lipids. — 1971. — Vol. 6, N 5. — P. 297.
12. Storey I. D. E. // Biochem. J. — 1965. — Vol. 95. — P. 201—208.
13. Tohru H., Talsuya N., Heitaroh J. // Biochem. Pharmacol. — 1984. — Vol. 33, N 16. — P. 2635—2639.
14. Wills E. D. // Int. J. Radiat. Biol. — 1969. — Vol. 17, N 3. — P. 217—228.
15. Yukawa O., Nakazawa T. // Radiat. Res. — 1974. — Vol. 58. — P. 101—110.

Поступила 31.01.89

#### ALTERATIONS IN ACTIVITY OF UDP-GLUCURONYL- OR GLUTATHIONE-S-TRANSFERASES AND IN LIPID PEROXIDATION IN RAT LIVER MICROSOMES AFTER $\gamma$ -IRRADIATION; PROTECTIVE EFFECT OF $\alpha$ -TOCOPHEROL

L. F. Legon'kova, G. Z. Abakumov, M. I. Bushma, P. I. Lukienko  
Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Grodno

Stimulation of lipid peroxidation, accompanied by a decrease in activity of UDP-glucuronyl- and glutathione-S-transferases, was observed in rat liver microsomes within one day after  $\gamma$ -irradiation. Maximal alteration of the patterns studied was detected within 5 days. Preadministration of  $\alpha$ -tocopherol, within 14 days at a dose of 200 mg/kg of body mass, prevented distinctly the impairing effect of irradiation.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 612.354.2/3.001.57:612.351.11:577.152.1

В. И. Сергиенко, А. К. Мартынов, Ю. Б. Васильев, В. А. Гринберг, В. Н. Шилов, Т. В. Булыгина

#### НЕПРЯМОЕ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЕРЕНОСЧИКОВ АКТИВНОГО КИСЛОРОДА В МОДЕЛИРОВАНИИ ДЕТОКСИЦИРУЮЩЕЙ ФУНКЦИИ ПЕЧЕНИ

НИИ физико-химической медицины Минздрава РСФСР; Институт электрохимии АН СССР, Москва

Так как при создании электрохимической модели монооксигеназной системы печени возникла серьезная проблема совместимости электрохимической ячейки с кровью, нами был предложен метод непрямого электрохимического окисления крови с использованием переносчиков активного кислорода. При этом кровь не вступает в контакт с электрохимической системой, электролизу подвергается раствор переносчика кислорода (0,89 % раствор NaCl). В этом растворе, который вводится пациенту в виде гипохлорита натрия, происходит накопление активного кислорода. Гипохлорит натрия позволяет обойти «эффект белковой защиты» токсичных метаболитов и моделирует не только функции монооксигеназы печени, но и молекулярные механизмы фагоцитоза.

Ранее нами были рассмотрены возможности электрохимического окисления в моделировании функции монооксигеназы печени для очистки от ядовитых и балластных веществ крови и тканей [4]. Было выявлено, что при прямом электроокислении токсинов в крови возникают проблемы работоспособности электрохимической ячейки в крови, «белковой защиты» токсина и совместимости электрохимической ячейки с кровью [4, 5]. Электроокисление крови на вибрирующих электродах или в «кипящем слое» позволило значительно снизить травму крови, но, тем не менее, не решило принципиально проблему гемосовместимости, которая сдерживала внедрение метода в клиническую практику.

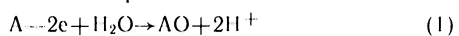
Настоящая работа посвящена результатам экспериментальных исследований метода непрямого электрохимического окисления с использованием гипохлорита натрия как переносчика активного кислорода для моделирования функции монооксигеназы печени и молекулярных механизмов фагоцитоза.

Методика. Методика экспериментов в основном была описана ранее [4].

Результаты и обсуждение. Катализаторы-переносчики широко используют в электрохимии органических соединений для повышения селективности или ускорения процессов электрохимического окисления различных органических соединений [1, 12]. Идея использования переносчиков активного кислорода для окисления токсичных субстанций в крови возникла при изучении механизма действия прямого электроокисления [4], когда при переходе к растворам, содержащим альбумин, или к плазме крови наблюдали изменение механизма окисления токсинов, т. е. переход к опосредственному окислению об-

разующимся на аноде гипохлоритом натрия. В предлагаемом методе непрямого электрохимического окисления крови [9] с использованием переносчиков активного кислорода кровь непосредственно не вступает в контакт с электрохимической системой, а электролизу подвергается раствор переносчика кислорода, который затем вводится пациенту. В крови этот раствор вступает в реакцию с токсинами, окисляя их. Схема непрямого электроокисления может быть условно изображена так.

1. Электрохимическое окисление переносчика кислорода (А) на электроде:

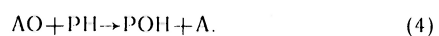


2. Введение АО в организм.

3. Освобождение переносчиком активного кислорода или прямое окисление токсина (РН):



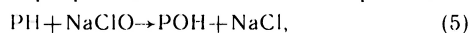
или



Переносчик кислорода должен быть нетоксичным для организма, легко из него выводиться, легко отдавать активный кислород и по возможности быть в состоянии преодолеть «белковую защиту» [4]. Для того чтобы максимально моделировать функции монооксигеназ печени [2, 10, 16, 23], он должен иметь окислительно-восстановительный потенциал (А/АО), близкий к обратному потенциалу кислорода.

В качестве наиболее удобного и физиологического переносчика кислорода нами предложен изотонический раствор хлористого натрия (0,89 %) или используемый в медицине физиологический раствор, в котором при электролизе на платиновых, окисных платино-титановых и других подходящих анодах происходит накопление активного кислорода в виде гипохлорита натрия. Редокс-потенциал раствора гипохлорита натрия совместимой с кровью концентрации при рН 7,4 равен 1,1 В (отн. н. в. э.), т. е. несколько выше обратимого кислородного потенциала в тех же условиях [25, 27]. Однако при введении в кровь за счет разбавления его редокс-потенциал практически достигает значения обратимого кислородного электрода.

Окислительные свойства гипохлорита натрия, устойчивость его растворов, его реакции с различными органическими веществами хорошо изучены [17, 18, 22, 26, 29]. В присутствии органических веществ гипохлорит натрия в разбавленных водных растворах при рН 7,0 окисляет их по реакции:



т. е. осуществляет реакцию их гидроксирования. Среди известных реакций окисления органических соединений гипохлоритом имеются почти все типы реакций [5, 13, 14, 17—22, 26, 29], катализируемых цитохром Р-450, универсальным детоксицирующим ферментом печени [2].

Гипохлорит натрия — соединение, имеющее небольшую молекулярную массу и малые размеры. Поэтому он может свободно проходить через клеточные мембраны и, следовательно, окислять токсины, находящиеся не только в крови, но и в тканях, что очень важно в клинической практике.

Гипохлорит является идеальным переносчиком активного кислорода, так как он не только моделирует функции монооксигеназ, но и позволяет моделировать молекулярные механизмы фагоцитоза. Известно, что активные соединения хлора, брома, иода и, в частности, гипохлорита натрия образуются в макрофагах во время активации фагоцитоза [28].

Бактерицидные свойства хлорноватистой кислоты, солью которой является гипохлорит натрия, давно используют при хлорировании воды [7—8], а сам гипохлорит натрия в последнее время широко используют как обеззараживающее и дезинфицирующее средство [11].

Известны способы получения гипохлорита натрия с помощью электрохимического окисления с использованием диафрагменных и бездиафрагменных электролизеров и химическим взаимодействием полученного электролизом хлора с щелочью. Однако выпускаемые промышленностью растворы гипохлорита натрия непригодны для медицинского применения из-за наличия значительного количества примесей и избыточного содержания элементарного хлора. Поэтому мы предлагаем получать раствор гипохлорита нужной концентрации электролизом физиологического раствора. Нежелательными побочными продуктами, образующимися при электролизе изотонического раствора хлористого натрия, являются избыточный элементарный хлор и перекись водорода, образующаяся на некоторых катодах в результате восстановления кислорода воздуха.

На основе проведенных экспериментов были найдены оптимальные для получения наиболее совместимого с кровью раствора гипохлорита условия электролиза, при которых полностью исключается изменение рН, образование перекиси водорода, а появление растворенного элементарного хлора сводится к минимуму. Такие условия создаются в бездиафрагменном электролизере с электродами из титана микропромотированного платиной при плотности тока  $D = 32 \text{ мА/см}^2$ .

Для определения кинетики и механизма окисления различных токсинов гипохлоритом натрия одновременно фиксировали убыль гипохлорита натрия во времени путем йодометрического титрования на автотитраторе ТТТ2 («Radiometer», Дания) с йодоселективным электродом и убыль токсина специфичным аналитическим методом (спектрофотометрически, полярографически, хроматографически и др. в зависимости от природы токсина), при этом определяли природу продуктов окисления и величину их накопления.

На рис. 1 представлены кривые йодометрического титрования гипохлорита в присутствии некоторых лекарственных веществ. Наиболее хорошо окисляется реланиум, затем следуют димедрол, дроперидол и фенobarбитал. Наиболее подробно нами был изучен гексенал и другие производные барбитуровой кислоты, так как отравление барбитуратами остается одной из серьезных проблем клинической медицины [6]. Прямое окисление этих веществ на платиновом электроде было нами изучено ранее [3].

На рис. 2 представлена типичная анодная полярограмма гексенала на гладком платиновом электроде и кривые, свидетельствующие о его убыли после добавления практически эквивалентного

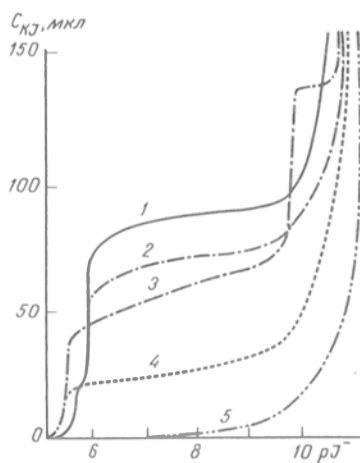


Рис. 1. Кривые титрования раствора гипохлорита натрия (1200 мг/л) после введения в него одинаковой добавки различных лекарственных препаратов.

1 — исходный раствор гипохлорита; 2 — после добавки фенобарбитала; 3 — дроперидола; 4 — димедрола; 5 — реланиума.

количества гипохлорита натрия. Значительный интерес представляло выяснение влияния «эффекта белковой защиты» [4] при воздействии гипохлорита на гексенал в присутствии белка, так как белок сводил «на нет» прямое электроокисление гексенала. На рис. 2 видно, что добавление бычьего сывороточного альбумина в количествах, сравнимых с концентрацией альбумина в сыворотке крови (5 г %), не приводит к снижению скорости и глубины окисления гексенала.

Было изучено окисление гипохлоритом транквилизатора феназепама. Поскольку этот препарат нерастворим в воде, все эксперименты проводили с его растворами в метоксиэтаноле. На рис. 3 представлены кривые титрования растворителя и препарата. Видно, что метоксиэтанол окисляется незначительно. При добавлении феназепама расход гипохлорита значительно увеличивается. При исследовании спектров поглощения феназепама было определено, что после воздействия на препарат гипохлорита исчезает пик, характеризующий азометиленовую связь, и появляется пик, соответствующий окисленному производному феназепама.

Интересные данные были получены при окислении гипохлоритом таких ксенобиотиков, как метанол, этанол, формальдегид и ацетальдегид. Состав продуктов окисления в этом случае в сильной степени зависит от концентрации гипохлорита. Хотя ацетальдегид хорошо окисляется гипохлоритом до ацетата, а формальдегид до  $\text{CO}_2$ , при окислении этанола и метанола гипохлоритом в совместимой с кровью концентрации (1200 мг/л) в растворе первоначально происходит накопление более токсичных для организма ацетальдегида

и формальдегида и лишь затем происходит их дальнейшее окисление. Таким образом, при детоксикации гипохлоритом необходимо учитывать возможность того, что, как и при окислении на цитохроме P-450, иногда могут образовываться более токсичные продукты, чем субстраты.

В качестве типичных представителей эндогенных гидрофобных токсинов, как и в случае прямого электроокисления [4], были использованы билирубин и холестерин. Результаты экспериментов показали, что гипохлорит натрия в эквимолекулярном соотношении окисляет билирубин нацело как в буферном растворе, так и при добавлении альбумина. Билирубин под действием гипохлорита первоначально образует биливердин, дающий зеленое окрашивание, а затем бесцветные продукты окисления, неопределяемые спектрофотометрически. Таким образом, гипохлорит позволяет обойти «эффект белковой защиты» [5] токсичных метаболитов. Это было подтверждено и в опытах с плазмой крови, полученной при замедленном переливании у детей с гемолитической болезнью новорожденных. На рис. 4 видно, что при добавлении гипохлорита натрия к плазме крови в соотношении 1:1 степень и скорость окисления билирубина увеличивается с возрастанием концентрации гипохлорита. Токсичность плазмы (оцененная в опытах на мышах с блокадой РЭС) при этом снижалась параллельно уменьшению концентрации билирубина.

При исследовании окисления холестерина в растворе метоксиэтанола было показано, что с увеличением концентрации гипохлорита увеличивается степень окисления холестерина, но до определенного предела (рис. 5). Вероятно, этот предел обусловлен тем, что холестерин в данной ситуации находится в мицеллах, куда доступ гипохлорита ограничен. Последующая хроматография полученных производных холестерина показала появление целого ряда пиков, соответствующих различным окисленным формам холестерина [15]. Аналогичные результаты были получены и с плазмой крови, полученной от кроликов с экспериментальным атеросклерозом, и с плазмой или лимфой, полученной от людей с различными заболеваниями.

Перспективность метода непрямого электрохимического окисления с использованием гипохлорита, показанная в опытах *in vitro*, потребовала изучения возможности его использования в клинике. Для этого прежде всего исследовали влияние гипохлорита натрия на интактный организм, была

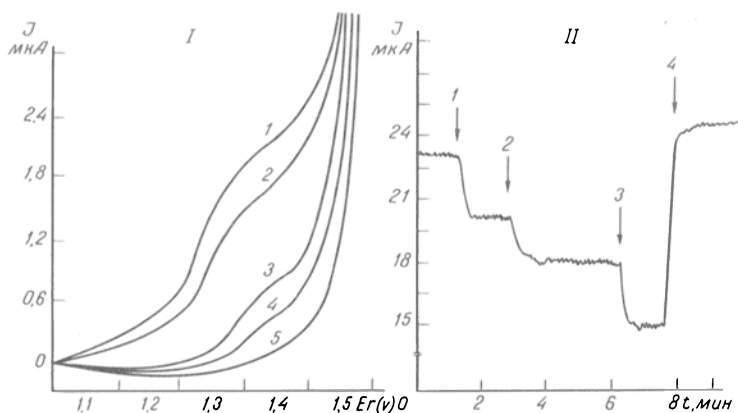


Рис. 2. Полярограммы раствора гексенала с исходной концентрацией 2 мМ (1) в физиологическом растворе через различные промежутки времени (2 — 2 мин, 3 — 6 мин, 4 — 12 мин, 5 — фон) после введения в контакт с 1,87 мМ раствором гипохлорита натрия — I; потенциостатическая кривая ( $E = 1,3$  В) окисления гексенала с исходной концентрацией 70 мМ в 5 % растворе бычьего сывороточного альбумина раствором гипохлорита натрия — II.

Стрелками отмечены добавки гипохлорита (1 — 2 мМ, 2 — 1 мМ, 3 — 2 мМ) и гексенала (4) — 7 мМ.

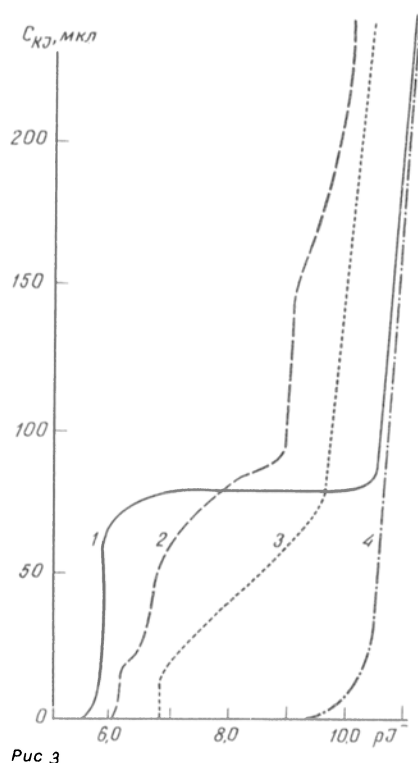


Рис. 3

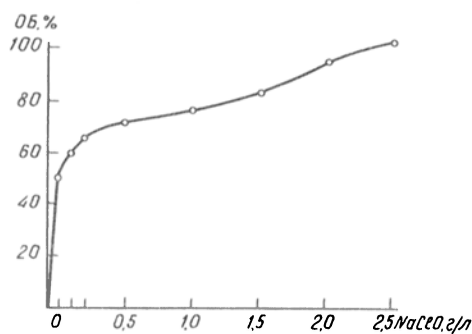


Рис. 4

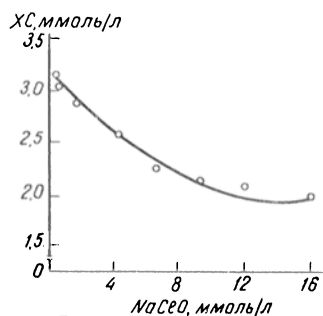


Рис. 5

Рис. 3. Кривые титрования раствора гипохлорита натрия (1200 мг/л) до (1) и после введения в него: 2 — метоксиэтанола, 3 — раствора феназепам в метоксиэтаноле, 4 — контрольное титрование воды.

Рис. 4. Зависимость окисления билирубина (ОБ) в сыворотке крови новорожденных с гемолитической болезнью при добавлении гипохлорита натрия к сыворотке в соотношении 1:1 по объему от концентрации гипохлорита.

Рис. 5. Зависимость степени окисления холестерина от концентрации гипохлорита натрия в растворе.

доказана на беспородных белых мышах с блокадой РЭС его нетоксичность в концентрации от 500 до 2500 мг/л при внутривенном, внутримышечном, внутривнутрибрюшинном, подкожном и пероральном введениях. Была найдена его концентрация, совместимая с кровью (1200 мг/л), при которой морфологические показатели крови практически не изменялись, не было обнаружено гемолиза в периферической крови, изменения биохимических показателей крови не выходили за пределы видовой нормы. Исследование, проведенное в Институте канцерогенеза Всесоюзного онкологического научного центра АМН СССР, показало полное отсутствие канцерогенности гипохлорита.

Метод непрямого электрохимического окисления путем введения раствора гипохлорита натрия был испытан на мышах, кроликах и собаках с моделями отравления сиднокарбом, феназепамом, гексеналом, с гипербилирубинемией и экспериментальным атеросклерозом и показал свою высокую эффективность, возможность моделировать детоксикационную функцию печени по окислению ксенобиотиков и эндогенных токсинов.

Было также показано, что гипохлорит натрия в совместимой с кровью концентрации обладает универсальным воздействием на микроорганизмы, относящиеся к самым разнообразным видам и группам. Оказалось, что гипохлорит натрия оказывает бактерицидное действие как на штаммы, чувствительные к антибиотикам, так и полностью нечувствительные к 7 видам антибиотиков. Таким образом, гипохлорит натрия может моделировать молекулярные механизмы фагоцитоза.

Исследования в модельных растворах, в плазме крови и в экспериментах на животных позволили перейти к клиническому использованию непрямого электрохимического окисления.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Авруцкая И. А., Кокорев Г. А. // Электролиз и биоэлектрохимия. — М., 1975. — С. 34; 52.
2. Арчаков А. И. Микросомальное окисление. — М., 1975.
3. Васильев Ю. Б., Сергиенко В. И., Гринберг В. А., Мартынов А. К. // Электрохимия. — 1986. — Т. 22. — С. 151.
4. Васильев Ю. Б., Гринберг В. А., Сергиенко В. И. и др. // Там же. — 1987. — Т. 23. — С. 000.
5. Козлов Ю. П., Воробьев Т. П., Пурмаль А. П. // Журн. физ. химии. — 1984. — Т. 58. — С. 1677.
6. Комаров Б. Д., Лужников Е. А., Шиманко И. И. Хирургические методы лечения острых отравлений. — М., 1981.
7. Кульский Л. А. Улучшение качества питьевой воды. — Киев, 1948.
8. Кульский Л. А. Теоретические основы и технология кондиционирования воды. — Киев, 1983.
9. Лопухин Ю. М., Казаринов В. Е., Васильев Ю. Б. и др. // А. с. 1194425 СССР // Открытия. — 1985. — № 44.
10. Метелица Д. И. Активация кислорода ферментными системами. — М., 1982.
11. Сыркина И. Г. Производство гипохлорита за рубежом. — М., 1980.
12. Томилов А. П., Майрановский С. Г., Фиошин М. Я., Смирнов В. А. Электрохимия органических соединений. — Л., 1968. — С. 559.
13. Akhtar M., Barton D. H. R. // J. Amer. chem. Soc. — 1961. — Vol. 83. — P. 2213.
14. Bertha P., Bernhard M. // Tetrahedron Lett. — 1984. — Vol. 25. — P. 1895.
15. Blandon P. // Chemistry Cholesterol / Ed. R. P. Cook. — New York, 1958. — P. 5—115.
16. Boyd G. S., Smellie R. M. S. Biological Hydroxylation Mechanisms. — New York, 1972.
17. Cady G. // Inorganic Syntheses / Ed. T. Moeller. — New York, 1957. — P. 156.
18. Comprehensive Inorganic Chemistry / Eds J. C. Bailor et al. — New York, 1973. — Vol. 2. — P. 1399.
19. Kohlaro T. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. — 1984. — Vol. 2. — P. 985.
20. Kristovskovs S. // Nauchni Tr. Plovdivs. Univ. — 1983. — Vol. 21. — P. 215.
21. Lister M. W., Rosenblum P. // Canad. J. Chem. — 1963. — Vol. 41. — P. 2727.
22. Mellor J. W. A Comprehensive Treatise on Inorganic and Theoretical Chemistry. — London, 1922. — Vol. 2. — P. 240—418.

23. Molecular Mechanisms of Oxygen Activation / Ed. O. Hayaishi. — New York, 1974.
24. Olga B., Bernhard M. // J. Chem. Soc. Perkins Trans. — 1984. — P. 1967.
25. Parsons R. // Handbook of Electrochemical Constant. — London, 1959. — P. 71—73.
26. Secoy C. H., Cady G. H. // J. Amer. Chem. Soc. — 1940. — Vol. 62. — P. 1036.
27. Valensi G., Deltombe E., de Zoubov N. et al. Paris. — P. 590—601.
28. Walters I. // Crit. Rev. Toxicol. — 1978. — Vol. 5. — P. 377.
29. Waters W. A. Mechanisms of Oxidation of Organic Compounds. — New York, 1963.

Поступила 17.05.88

# INDIRECT ELECTROCHEMICAL OXIDATION USING ACTIVE OXYGEN CARRIERS IN SIMULATION OF THE LIVER TISSUE DETOXICATING FUNCTION

V. I. Sergienko, A. K. Martynov, Yu. V. Vasil'ev, V. A. Grinberg, V. N. Shilov, T. V. Bulgina

Institute of Physico-Chemical Medicine, Ministry of Public Health of the RSFSR, Institute of Electrochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow.

As development of the electrochemical model of liver tissue monooxygenase system met with a serious problem of compatibility between electrochemical unit and blood, a procedure of indirect electrochemical oxidation of blood was proposed where carriers of active oxygen were used. Blood did not contact with the electrochemical system and electrolysis occurred in solution of oxygen carrier (0.89 % NaCl), which accumulated active oxygen in the form of sodium hypochlorite. Sodium hypochlorite, administered into patients, enabled to bypass "the effect of protein protection" of toxic metabolites; it simulated both liver tissue monooxygenase functions and phagocytosis molecular mechanisms.

© В. И. РУБИН, Г. А. БЕЗРУКОВА, 1990

УДК 616.151.5-07:616.155.1-008.939.15

В. И. Рубин, Г. А. Безрукова

## ДЕСТАБИЛИЗАЦИЯ ЛИПИДНЫХ СТРУКТУР ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ СВЕРТЫВАНИИ КРОВИ

Саратовский медицинский институт

По современным представлениям дестабилизация клеточных мембран обусловлена повреждением их липидных структур за счет активации процессов перекисного окисления липидов, а также воздействия на фосфолипиды цитоплазматических мембран эндогенных фосфолипаз [1, 3, 7].

Ранее нами было показано, что свертывание крови *in vitro* сопряжено с активацией процессов свободнорадикального окисления липидных структур эритроцитов [2], что выражается в накоплении в красных клетках крови гидропероксидов липидов и повышении мембранной проницаемости эритроцитов. Вследствие указанного в сыворотку крови из эритроцитов выходит определенное количество биосубстратов, в частности холестерина и гемоглобина.

С целью более углубленного выявления причин, приводящих к дестабилизации липидных структур при свертывании крови *in vitro* было проведено сравнительное исследование уровня активности эндогенной фосфолипазы А (ФЛазы), концентрации холестерина (ХС), свободных жирных кислот (СЖК), общих фосфолипидов (ФЛ),

а также количественного соотношения фракций ФЛ в эритроцитах цельной крови и крови, содержащей антикоагулянт.

**Методика.** Под наблюдением находилось 30 практически здоровых лиц, у которых кровь для исследования забирали из кубитальной вены утром, натощак. Объектом исследований служили эритроциты цельной крови и крови, взятой с добавлением 3,8 % раствора цитрата натрия в соотношении 9:1. Через 20—30 мин после взятия крови эритроциты цельной крови и крови, содержащей антикоагулянт, трижды промывали физиологическим раствором с последующим центрифугированием в течение 15 мин со скоростью 2000 об/мин. Полученную суспензию эритроцитов использовали для биохимических исследований.

Выделение ХС из эритроцитов проводили добавлением к этиловому спирту суспензии эритроцитов в соотношении 9:1 и последующей экстракцией в течение 30 мин при 37 °С при постоянном перемешивании. Концентрацию ХС определяли ферментативным методом [13] на химической аналитической системе ФП-900 фирмы «Labsystems», Финляндия.

Для других исследований липиды экстрагировали смесью хлороформ — гентан — метанол (250:250:12), добавляемой к суспензии эритроцитов в соотношении 1:20 при постоянном перемешивании в течение 30 мин при 37 °С. Очищение липидного экстракта проводили 0,74 % раствором хлорида кальция. В очищенном липидном экстракте определяли содержание СЖК [9], общих ФЛ [4] и соотношение их отдельных фракций методом тонкослойной хроматографии [10] на пластинках Kieselgel-60 фирмы «Merck».

Определение активности ФЛазы А в эритроцитах проводили методом гидролиза в органической фазе [5] и оценивали по степени просветления лецитиновой эмульсии. За единицу активности ферментного препарата принимали вызываемое им при стандартных условиях опыта уменьшение оптической плотности на 0,01 за 1 мин. Удельную активность ФЛазы эритроцитов рассчитывали на 1 мг гемоглобина [4] ферментного препарата, внесенного в реакционную смесь. Полученные данные обрабатывали с использованием *t*-критерия Стьюдента.

**Результаты и обсуждение.** Проведенное сравнительное определение удельной активности ФЛазы в эритроцитах цельной крови и крови, взятой в присутствии цитрата натрия, показало, что на начальных стадиях формирования сгустка крови, т. е. спустя 20—30 мин от ее забора, уровень активности фермента был в среднем на 23 % выше ФЛазной активности эритроцитов крови, содержащей антикоагулянт (см. таблицу).

Достоверное повышение ФЛазной активности эритроцитов при свертывании крови в пробирке, на наш взгляд, обусловлено идентичностью механизмов свертывания как *in vitro*, так и в сосудистом русле, при котором необходимым условием внутрисосудистого тромбообразования является активация ФЛазы А форменных элементов крови [8].

Известно, что активация эндогенной ФЛазы А приводит к дестабилизации липидных структур клеточных мембран, проявляющейся нарушением нормальных количественных соотношений отдельных фракций ФЛ, изменением молярного соотношения ХС/ФЛ и повышением концентрации СЖК [3]. В связи с этим нами было проведено сравнительное исследование содержания общих ФЛ, СЖК, ХС, а также анализ фосфолипидного спектра эритроцитов цельной крови и крови, содержащей антикоагулянт, в результате которого удалось установить, что у всех обследованных лиц процесс свертывания крови в пробирке сопровождался достоверным повышением концентрации СЖК в красных клетках крови. В среднем содержание указанных метаболитов в эритроцитах



**Изменение состава липидного компонента эритроцитов при свертывании крови в пробирке ( $\bar{X} \pm \sigma$ )**

Показатели	Эритроциты с антикоагулянтом	Эритроциты цельной крови
Удельная активность ФЛазы, усл. ед.	0,566 $\pm$ 0,104	0,695 $\pm$ 0,109
СЖК, мкмоль/л	58,41 $\pm$ 8,45	69,69 $\pm$ 10,10
ХС, ммоль/л	3,65 $\pm$ 0,14	3,25 $\pm$ 0,24
ФЛ, ммоль/л	4,03 $\pm$ 0,27	3,87 $\pm$ 0,32
ХС/ФЛ	0,91	0,83
Состав ФЛ, %:		
ЛФХ	1,08 $\pm$ 0,23	2,86 $\pm$ 0,51
СФМ	25,78 $\pm$ 1,52	24,62 $\pm$ 1,82
ФХ	31,96 $\pm$ 2,34	30,63 $\pm$ 2,23
ФС	16,29 $\pm$ 3,37	15,89 $\pm$ 3,56
ФЭА	24,90 $\pm$ 2,57	26,13 $\pm$ 2,44

цельной крови было на 19 % выше, чем в эритроцитах цитратной крови.

В то же время не было выявлено статистически достоверной разницы в содержании общих ФЛ в эритроцитах цельной крови и крови, содержащей антикоагулянт. Однако в отдельных случаях при сопоставлении абсолютных значений концентрации ФЛ в параллельных образцах было отмечено незначительное повышение этого показателя в эритроцитах цельной крови.

Что касается сравнительного анализа фосфолипидного спектра эритроцитов, то последний показал существенные изменения в количественном распределении фракций ФЛ, возникающие при свертывании крови в пробирке. Наибольшие изменения происходили при этом с фракцией лизофосфатидилхолинов (ЛФХ), доля которой в фосфолипидном спектре возрастала при свертывании крови в среднем в 2,7 раза. Параллельно происходило снижение в эритроцитах содержания фосфатидилхолина (ФХ), сфингомиелина (СФМ) и фосфатидилсерина (ФС), а также незначительное повышение доли фосфатидилэтаноламина (ФЭА). Как известно, цитоплазматическим мембранам присуща асимметрия распределения ФЛ по сторонам биослоя. Так, СФМ, ФХ преобладают главным образом в наружном слое мембраны, а ФЭА и ФС локализованы на ее внутренней поверхности. Неравномерное расположение фракций ФЛ связано с особенностями влияния отдельных ФЛ на свертывание крови. Так, ФЛ внутреннего слоя биомембран ускоряют этот процесс, а ФЛ наружной стороны биослоя — тормозят [1]. Поэтому выявленное различие в соотношении отдельных фракций ФЛ эритроцитов цельной крови и крови, содержащей антикоагулянт, позволяет сделать вывод, что связанные со свертыванием крови изменения в составе ФЛ эритроцитов направлены на усиление процессов коагуляции. Что касается значительного увеличения в составе ФЛ эритроцитов цельной крови доли ЛФХ, то, по современным представлениям, накопление этого специфического маркера мембранодеструкции может служить дополнительным доказательством активации эндогенной ФЛазы А в красных клетках крови при ее свертывании [6].

Для выявления изменения микровязкости мембран эритроцитов [7] при свертывании крови в пробирке нами было проведено сравнительное исследование содержания общего ХС и молярного соотношения ХС/ФЛ в эритроцитах цельной крови и крови, содержащей цитрат натрия.

Исследования показали, что в отличие от общих ФЛ концентрация ХС в эритроцитах цельной крови была достоверно ниже, чем в эритроцитах крови, содержащей антикоагулянт. Уменьшение содержания ХС в эритроцитах цельной крови, приводившее к снижению молярного соотношения ХС/ФЛ, позволило нам сделать вывод, что начальные процессы свертывания крови в пробирке характеризуются увеличением микровязкости мембран эритроцитов. Такое изменение микровязкости мембран за счет снижения в них концентрации ХС и связанного с этим изменения ориентации полярных групп холинсодержащих ФЛ, по мнению Q. F. Ahkong и соавт., лежит в основе механизма инициированного слияния клеток [11].

Так, как в отличие от ФЛ, фиксированных в мембранах посредством белковых структур, ХС в эритроците связан с ФЛ менее прочно [12], можно предположить, что модификация ФЛ-комплекса мембран эритроцитов на начальных стадиях свертывания крови в пробирке приводит к частичному разрыву связей ФЛ — ХС, вследствие чего последний теряется мембраной.

Таким образом, проведенное исследование показало, что начальные стадии свертывания крови *in vitro* характеризуются активацией эндогенной ФЛазы А эритроцитов, приводящей к дестабилизации липидных структур мембран красных клеток крови, что выражается в повышении концентрации СЖК, изменении количественных соотношений отдельных фракций в составе ФЛ, накоплении в них доли лизопродуктов, потери клеточными мембранами определенной доли ХС, а также изменении микровязкости мембран эритроцитов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Андреев Г. В., Суворова Л. А. // Успехи совр. биол. — 1986. — Т. 101, № 3. — С. 436—448.
2. Безрукова Г. А., Рубин В. И. // Пат. физиол. — 1988.
3. Биологические мембраны. Двенадцать очерков о структуре, свойствах и функциях мембран / Под ред. Д. С. Парсон: Пер. с. 230. — М., 1978.
4. Биохимические методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. А. А. Покровского. — М., 1969.
5. Брокерхоф Х., Денсен Р. Липолитические ферменты. — М., 1978.
6. Вельтишев Ю. Е., Юрьева Э. А., Воздвиженская Е. С. // Вопр. мед. химии. — 1987. — № 2. — С. 2—9.
7. Климов А. Н., Адженис Е. Г., Лозовский В. Т. // Там же. — 1984. — № 4. — С. 71—74.
8. Проблемы и гипотезы в учении о свертывании крови / Под ред. О. К. Гаврилова. — М., 1981.
9. Прохоров М. Ю., Тиунов М. П., Шахалис Д. А. // Лаб. дело. — 1977. — № 9. — С. 535—536.
10. Тырышкин А. М., Сапрыкина Э. В., Сальник Ф. Ю. // Вопр. мед. химии. — 1987. — № 6. — С. 121—124.
11. Ahkong Q. F., Gramp F. C., Fisher D. // Nature: New Biol. — 1973. — Vol. 242, N 120. — P. 215—217.
12. Green J. R., Green C. // Biochem. Soc. Trans. — 1973. — Vol. 1, N 2. — P. 365—368.
13. Manual of Laboratory Operations. Lipid Research Clinical Program. — Washington, 1974. — Vol. 1. — P. 9—37.

Поступила 20.07.88

## DESTABILIZATION OF ERYTHROCYTE LIPID STRUCTURES IN BLOOD COAGULATION *IN VITRO*

V. I. Rubin, G. A. Bezrukova

Medical School, Saratov

Main parameters of lipid complex were studied in erythrocytes of whole blood and of the blood containing anti-

coagulant. Initial steps of blood coagulation involved activation of erythrocyte endogenous phospholipase A, which led to destabilization of erythrocyte lipid structures as a result of an increase in concentration of free fatty acids, accumulation of lysophospholipids as well as of alterations in microviscosity of erythrocyte membranes.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 615.31:547.953].015.46.07

Н. Г. Синилова, А. П. Дуплищева, Г. Б. Кирилlicheва, В. В. Чупин, Г. А. Серебренникова, М. А. Туманян

## ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ СВОЙСТВ ФОСФОЛИПИДОВ

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР, Институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова, Москва

Необходимость регуляции естественного иммунитета является проблемой, актуальность которой как в теоретическом, так и в практическом аспекте все более возрастает. В связи с этим в настоящее время широко развернулись поиски препаратов-иммуномодуляторов среди различных классов химических соединений. В этом отношении несомненный интерес представляет класс липидов. Так, среди нейтральных липидов были выявлены соединения, обладающие выраженной способностью повышать неспецифическую резистентность мышей к заражению энтеробактериями [11]. Среди фосфолипидов также были обнаружены вещества с различными проявлениями иммунологической активности [3, 7, 8, 10]. Изучение иммуномодулирующих свойств фосфолипидов представляет интерес еще и потому, что они являются основными компонентами такой прогрессивной лекарственной формы, как липосомные препараты. Вместе с тем систематических исследований, посвященных изучению их воздействия на различные факторы естественного иммунитета, а также взаимозависимости между особенностями молекулярной структуры, характером биологической активности, практически не проводилось.

Целью настоящей работы было изучение иммуностимулирующей активности основных представителей фосфолипидов — фосфатидилэтаноламинов и фосфатидилхолинов — и выяснение зависимости между особенностями структуры и эффективностью их действия.

**Методика.** В работе использованы основные представители класса фосфолипидов — различные фосфатидилэтаноламины (кефалины) и фосфатидилхолины (лецитины) алкильного типа, а также соответствующие классы плазмалогенов и холестерилфосфохолины (табл. 1). Все препараты получены на кафедре химии и технологии тонких органических соединений Московского института тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова. Их индивидуальное строение было установлено с помощью ТСХ и спектральных методов (масс-спектрометрии, ИК-спектроскопии, ПМР,  $^{31}\text{P}$ -ЯМР и др.).

Препараты вводили однократно, внутривенно или подкожно, в дозе 100 мкг на животное. В работе использовали мышей-самцов белых беспородных и линии СВА массой 18–20 г в возрасте 63–77 дней. Вышедших из опыта животных усыпляли наркотическим эфиром.

Иммуностимулирующее действие препаратов оценивали по способности стимулировать неспецифическую резистентность организма к инфекции, по действию на стволовые клетки

(изменение количества эндогенных очагов кроветворения в селезенках летально облученных животных) и по активации макрофагов перитонеального экссудата (МПЭ) мышей. Об активации макрофагов судили по уровню снижения активности эндоплазматической 5'-нуклеотидазы МПЭ мышей [9].

**Определение неспецифической резистентности к инфекции** проводили общепринятыми методами [2, 6] путем заражения мышей живой культурой бактерий брюшного тифа (*S. typhi* 2) или *Klebsiella pneumoniae* K2. Заражение бактериями брюшного тифа производили внутривенно через 3 сут после введения препаратов; заражение *Klebsiella pneumoniae* проводили внутривенно через 2 сут после введения препаратов.

**Определение эндогенных очагов кроветворения** проводили по методу [11]. Через 1 сут после введения препаратов мышей облучали тотально ( $^{60}\text{Co}$ ) в дозе 7 Гр (ЛД<sub>90/30</sub>). На 9–10-й день после облучения животных забивали, извлекали селезенки и подсчитывали среднее число колоний, приходящихся на одну селезенку.

**Определение активности 5'-нуклеотидазы** в МПЭ беспородных мышей и линии СВА проводили по методике [4]. При подкожном введении препаратов активность 5'-нуклеотидазы определяли через 1 сут, при внутривенном введении — через 1, 14 и 20 сут [5].

**Результаты и обсуждение.** Изменение неспецифической резистентности мышей к инфекции под влиянием фосфолипидов представлено в табл. 2. Все исследованные фосфолипиды обладали иммуностимулирующей активностью. Они в 2–4 раза повышали резистентность мышей к заражению как бактериями брюшного тифа, так и *Klebsiella pneumoniae*.

По эффективности действия фосфатидилэтаноламины (кефалины) практически не отличались от соответствующих фосфатидилхолинов (лецитинов). Эффективность действия холестерилфосфохолина была ниже, чем у глицерофосфолипидов. Это согласуется с данными, полученными ранее при исследовании нейтральных глицеролипидов и производных холестерина [6].

Фосфолипиды — кефалины и лецитины — оказывали воздействие на стволовые клетки, увеличивая образование очагов кроветворения у летально облученных животных (табл. 3).

Известно, что пусковым механизмом действия большинства иммуностимуляторов является вызываемая ими активация макрофагов. Одним из биохимических признаков активации макрофагов является снижение активности 5'-нуклеотидазы макрофагов [9]. Было показано, что как при подкожном, так и при внутривенном введении фосфолипидов наблюдалось выраженное снижение активности этого фермента уже через 1 сут после введения препарата. Снижение активности 5'-нуклеотидазы сохранялось до 20 сут эксперимента. По степени снижения ферментативной активности кефалины и лецитины практически не различались между собой.

Наблюдаемое снижение ферментативной активности в макрофагах свидетельствует об активации клеток макрофагально-фагоцитирующей системы. Активация может быть вызвана как непосредственным воздействием исследуемых препаратов на мембрану этих клеток, так и явиться результатом перераспределения субпопуляций макрофагов и накоплением в перитонеальном экссудате клеток с низкой активностью 5'-нуклеотидазы [11].

Фосфолипиды, помимо самостоятельного использования в медицинской практике, применяются в настоящее время и для создания липосомных форм лекарственных препаратов. Для



# Препараты фосфолипидов, использованные в работе

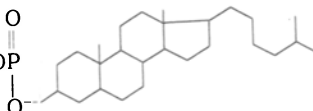
№ п/п	Класс фосфолипидов, общая формула	Наименование препаратов
Глицерофосфолипиды		Фосфатидилэтаноламины (кефалины)
I		1-0-гексадецил——Sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин
II		1-0-гексадецил——2-стеароил-Sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин
III		1-0-октадецил——2-стеароил-Sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин
IV		Цис-1-0- (1-гексадеценил) ——2-стеароил-Sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин
V		Цис-1-0- (1-гексадеценил) ——2-олеоил-Sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин
VI	$\text{CH}_2\text{—O—R}_1$	Цис-1-0- (1-октадеценил) ——2-стеароил-Sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин
VII	$\text{CH—O—CO—R}_2$	Цис,цис-1-0- (1,9-гексадекадиенил)-2-стеароил-Sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин
VIII	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{CH}_2\text{—O—P—OCH}_2\text{CH}_2\text{NX}^+ \\ \mid \\ \text{O}^- \end{array}$	Цис,цис-1-0- (1,9-октадекадиенил)-2-стеароил-Sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин
IX		Цис,цис-1-0- (1,9-октадекадиенил)-2-олеоил-Sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин
X		Фосфатидилхолины (лецитины)
XI		1-0-гексадецил——2-стеароил-Sn-глицеро-3-фосфохолин
XII		1-0-гексадецил——2-лауроил-Sn-глицеро-3-фосфохолин
XIII		1-0- (2-метоксигексадеценил)-2-стеароил-Sn-глицеро-3-фосфохолин
†XIII		1-0-октадецил——2-ацетил-Sn-глицеро-3-фосфохолин
		Производные холестерина
XIV	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{XNCH}_2\text{CH}_2\text{OP}^+ \end{array}$ 	Холестерил-фосфохолин

Таблица 1

X	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
---	----------------	----------------

H<sub>3</sub>—C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>—C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>—C<sub>17</sub>H<sub>35</sub>—CH=CH—(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CH<sub>3</sub>—CH=CH—(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CH<sub>3</sub>—CH=CH—(CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub>—CH<sub>3</sub>CH=CH—(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>—CH=CH—(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>CH=CH—(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>—CH=CH—(CH<sub>3</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub>CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>=CH—(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub>C<sub>17</sub>H<sub>35</sub>C<sub>17</sub>H<sub>35</sub>—C<sub>17</sub>H<sub>35</sub>—(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>—CH(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub>—C<sub>17</sub>H<sub>35</sub>—C<sub>17</sub>H<sub>35</sub>—C<sub>17</sub>H<sub>35</sub>—(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>—CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub>—C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>—C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>—CH<sub>2</sub>—CH(OCH<sub>3</sub>)—(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CH<sub>3</sub>—C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>—C<sub>17</sub>H<sub>35</sub>—CH<sub>11</sub>H<sub>23</sub>—C<sub>17</sub>H<sub>35</sub>—CH<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>

Таблица 2

Влияние фосфолипидов на неспецифическую резистентность к инфекции

Препарат	S. typhi <sub>2</sub>		Kl. pneumoniae K2	
	ЛД <sub>50</sub> , млн микр. кл. (M±m)	ИСА	ЛД <sub>50</sub> , микр. кл. (M±m)	ИС
<b>Фосфатидилэтанол-амины (кефалины):</b>				
I	125,1±24,0	3,2	1554±200,0	3,4
II	124,0±22,5	3,1	1462±180,0	3,2
III	133,2±18,7	3,3	—	—
IV	136,0±22,0	3,4	1531±195,0	3,3
V	136,8±18,7	3,5	—	—
VI	112,0±18,0	2,8	1325±150,0	2,9
VIII	84,0±15,0	2,1	—	—
IX	80,0±10,0	20,0	—	—
<b>Фосфатидилхолины (лецитины):</b>				
X	123,0±20,0	3,3	2559±360,0	5,6
XI	144,0±25,0	3,6	2194±340,0	4,8
XII	132,0±15,1	3,3	1782±195,0	3,9
XIII	100,0±13,3	2,5	1554±200,0	3,4
<b>Холестерилфосфолин (XIV)</b>				
	94,5±19,6	2,3	822±98,0	1,8
Контроль	40,2±5,5	1,0	457±60,0	1,0

Примечание. Каждая экспериментальная группа состояла из 35—40 животных. ИС — иммуностимулирующая активность.

этой цели в качестве основных компонентов липосомной мембраны применяют фосфатидилхолин, а также холестерин. Количество фосфолипидов, используемых для создания липосом, обычно значительно превышает количество заключенного в них лекарственного средства. Как показано выше, фосфолипиды не являются индиф-

ферентными веществами для иммунной системы организма, поэтому при конструировании липосомных форм медицинских препаратов нельзя не учитывать иммуностимулирующих свойств фосфолипидов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Земсков В. М., Родионов С. В., Пантин В. И. // Журн. микробиол. — 1985. — № 8. — С. 46—50.
2. Синилова Н. Г., Дуплищева А. П., Ромашевская Е. И. и др. // Вопр. мед. химии. — 1987. — № 6. — С. 103—107.
3. Синилова Н. Г., Дуплищева А. П., Серебренникова Г. А., Чупин В. В. // Всесоюзный симпозиум по биохимии липидов: Тезисы докладов. — Алма-Ата, 1987. — С. 121.
4. Туманян М. А., Кирилличева Г. Б. // Иммунология. — 1984. — № 5. — С. 29—31.
5. Туманян М. А., Кирилличева Г. Б., Кирилличев А. А. // Бюл. exper. биол. — 1987. — № 3. — С. 330—332.
6. Туманян М. А., Дуплищева А. П., Синилова Н. Г. и др. // Вопр. мед. химии. — 1981. — № 3. — С. 372—376.
7. Фукс Б. Б., Стерлина А. Г. // Иммунология. — 1985. — № 2. — С. 66—67.
8. Allison A. C. // J. Reticuloendoth. Soc. — 1979. — Vol. 26, N 6. — P. 619—630.
9. Edelson P. I., Cohn Z. A. // J. exp. Med. — 1976. — Vol. 144. — P. 1581—1595.
10. Modolell M., Andreesen R., Pahlke W. et al. // Cancer Res. — 1979. — Vol. 39, N 2—3. — P. 4681—4686.
11. Till L. E., McCulloch E. A. // Radiat. Res. — 1961. — Vol. 14, N 2. — P. 213—222.

Поступила 01.08.88

## IMMUNOMODULATING PROPERTIES OF PHOSPHOLIPIDS

N. G. Sinilova, A. P. Duplisheva, G. B. Kirillicheva, V. V. Chupin, G. A. Serebrennikova, M. A. Tumanyan

N. F. Gamaleja Institute of Epidemiology and Microbiology, Academy of Medical Sciences of the USSR, M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow

Immunomodulating properties of glycerophospholipids were studied. Both phosphatidyl ethanolamines and phosphatidyl cholines exhibited similar immunostimulating effects.

Таблица 3

Влияние фосфолипидов на эндогенное колониеобразование и активность 5'-нуклеотидазы в МПЭ (в % от контроля)

Препарат	Число эндогенных колоний ( <i>M±m</i> )	Активность 5'-нуклеотидазы			
		при подкожном введении препаратов	при внутривенном введении препаратов		
			через 1 сут	через 1 сут	через 14 сут
<b>Фосфатидилэтаноламины (кефалины):</b>					
III	3,0±0,45	69,5±5,9	57,1±1,5	32,0±3,2	68,7±2,4
IX	1,8±0,3	53,3±11,05	—	—	—
<b>Фосфатидилхолины (лецитины)</b>					
X	2,4±0,35	—	—	—	—
XI	2,8±0,4	—	—	—	—
XII	—	51,08±6,2	49,0±2,5	—	5,04±2,5
<b>Холестерилфосфохолин (XIV)</b>	—	—	42,8±2,3	35,0±2,05	64,9±3,1
Контроль	1,3±0,25	100±1,2	100,0±2,4	100±2,09	100±1,7

## АНТИОКИСЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОТИВОАРТРИТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Белорусский университет им. В. И. Ленина, Минск, Минский медицинский институт

Установлено важное значение свободнорадикальных процессов в патогенезе артритов [5, 8, 13, 14]. В клинической практике используют препараты фермента супероксиддисмутазы (СОД) [7] и низкомолекулярных антиоксидантов [4, 11], дающие в ряде случаев хороший лечебный эффект. Установлено также, что нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), применяемые при лечении артритов, подавляют генерацию активных форм кислорода лейкоцитами, что обусловлено главным образом ингибированием образования кислородных радикалов [4, 6, 9]. Однако НПВП, обладая и антиоксидательным действием *in vivo* [2, 15] и *in vitro* [2, 12], что, по-видимому, важно для их терапевтического эффекта. Однако остается неясным, ингибируют ли НПВП свободнорадикальные реакции или оказывают опосредованное действие.

В данной работе проведено сравнительное исследование антиоксидательной активности НПВП (ацетилсалициловая кислота, индометацин, ибупрофен, ортофен) и ряда базисных средств (делагил, d-пеницилламин, декарис), используемых при лечении артритов, в условиях НАДФН- и  $\text{CCl}_4$ -зависимого перекисного окисления липидов (ПОЛ) в микросомах печени крыс, а также реакции аутоокисления адреналина.

**Методика.** Микросомальную фракцию выделяли из печени крыс линии Вистар массой 130–180 г, голодавших в течение 24 ч. Печень промывали охлажденным 0,9 % раствором NaCl, гомогенизировали в трех объемах того же раствора и центрифугировали при 12 000 g 20 мин. Полученный супернатант центрифугировали при 105 000 g 60 мин.

В случае НАДФН-зависимого ПОЛ среда инкубации содержала 0,05 М фосфатный буфер pH 7,4, 0,02 М NaCl, 10 мкМ  $\text{FeSO}_4$ , 0,3 мМ НАДФН, 1–1,5 мг/мл микросомального белка в конечном объеме 5 мл.

При  $\text{CCl}_4$ -зависимом ПОЛ среда инкубации содержала 0,05 М фосфатный буфер pH 7,4, 0,02 М NaCl, 0,6 мМ ЭДТА, 3,4 мМ  $\text{CCl}_4$ , вносимый в виде спиртового раствора с конечной концентрацией  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  2 %, 1–1,5 мг/мл микросомального белка в конечном объеме 5 мл.

Реакции начинали внесением НАДФН и проводили в случае НАДФН-зависимого ПОЛ при 22–24 °С, в случае  $\text{CCl}_4$ -зависимого ПОЛ — при 37 °С.

Интенсивность ПОЛ оценивали по количеству образующегося малонового диальдегида (МДА), который определяли следующим образом: к 1 мл инкубационной смеси добавляли 1,5 мл 10 % трихлоруксусной кислоты и 2,5 мл 0,5 % тиобарбитуровой кислоты. После 10 мин кипячения пробы центрифугировали для удаления денатурированного белка и измеряли оптическую плотность при 532 нм.

Реакцию аутоокисления адреналина (Serva), ФРГ) проводили при комнатной температуре в 0,02 М фосфатном буфере pH 7,8. Скорость окисления оценивали по образованию окрашенных продуктов с максимумом 480 нм.

Ацетилсалициловая кислота, индометацин, ибупрофен, декарис, кверцетин, рутин вносили в среду инкубации в виде растворов в диметилформамиде: делагил, ортофен, d-пеницилламин — в виде водных растворов, ионол — в виде спиртового. Степень ингибирования свободнорадикальных процессов оценивали по торможению образования соответствующих продуктов в сравнении с контрольным образцом, куда вносили только соответствующий растворитель.

Спектральные исследования проводили на спектрофотометре «Specord M-40» (ГДР).

**Результаты и их обсуждение.** В табл. 1 приведены данные, характеризующие антиоксидательную активность исследованных препаратов, а также ряда антиоксидантов — кверцетина, рутина, ионола — в условиях ПОЛ *in vitro*. ПОЛ проводили в микросомальной фракции печени крыс. Для инициирования ПОЛ использовали НАДФН,  $\text{Fe}^{2+}$  (НАДФН-зависимое ПОЛ) и НАДФН,  $\text{CCl}_4$  ( $\text{CCl}_4$ -зависимое ПОЛ). Как видно из табл. 1, ацетилсалициловая кислота и индометацин не оказывали существенного влияния на процесс НАДФН-зависимого ПОЛ даже при концентрации 10 мМ. Некоторое антиоксидательное действие в этих условиях выявлено у ибупрофена, делагила и ортофена. Наиболее эффективным при НАДФН-зависимом ПОЛ оказался d-пеницилламин, ингибирующий при концентрации 5 мМ образование МДА почти на 90 %. Однако эффективность даже этого препарата была на несколько порядков ниже, чем у ионола и кверцетина.

В условиях  $\text{CCl}_4$ -зависимого ПОЛ делагил, ортофен и ибупрофен ингибировали образование МДА приблизительно в той же степени, что и при НАДФН-зависимом процессе. В то же время эффективность d-пеницилламина в указанных системах существенно различалась. По-видимому, это связано с тем, что НАДФН-зависимое ПОЛ протекает только в присутствии ионов железа [8] и наряду с ловушками свободных радикалов подавляется различными хелаторами, связывающими ионы металлов, например этилендиаминотетрауксусной кислотой (ЭДТА).  $\text{CCl}_4$ -зависимое ПОЛ иницируется без участия ионов железа и нечувствительно к присутствию хелаторов. Поскольку известно, что d-пеницилламин обладает способностью связывать ионы металлов [3], можно допустить, что в случае НАДФН-зависимого ПОЛ он оказывает двойное действие — нейтра-

Таблица 1

Ингибирование противовоспалительными препаратами и антиоксидантами ферментативного перекисного окисления в микросомальной фракции печени крыс

Препарат	Концентрация, мМ	Количество образующегося МДА, % от контрольного уровня	
		НАДФН-зависимое ПОЛ	$\text{CCl}_4$ -зависимое ПОЛ
Ацетилсалициловая кислота	10,0	95	—
Индометацин	10,0	96	—
Ибупрофен	5,0	74	81
Ортофен	5,0	71	64
Делагил	2,0	69	63
Купренил (d-пеницилламин)	5,0	13	82
Декарис	2,0	99	—
Рутин	0,05	18	70
Кверцетин	0,01	21	32
Ионол	0,001	63	56
Аскорбиновая кислота	0,1	102	63

**Примечание.** За контрольный уровень принимали количество МДА, образующегося в среде инкубации, содержащей только соответствующий растворитель. Здесь и в табл. 2 каждое значение представляет собой среднее по данным трех отдельных экспериментов.

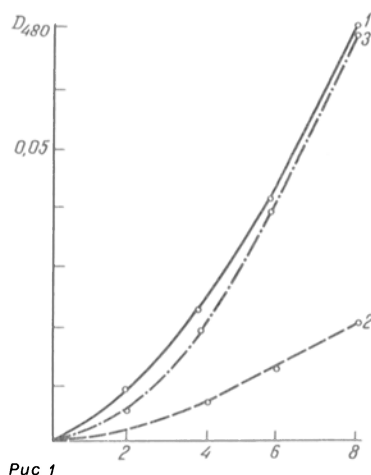


Рис 1

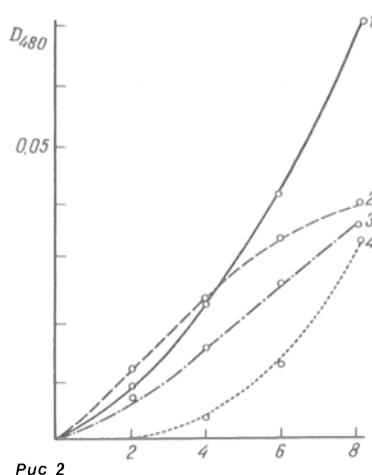


Рис 2

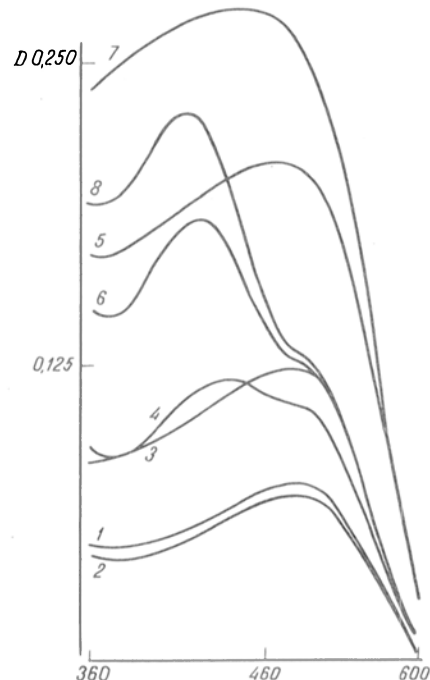


Рис 3

Рис. 1. Ингибирование аутоокисления адреналина ( $0,4 \cdot 10^{-3}$  М) супероксиддисмутазой (СОД) и ЭДТА.

1 — окисление адреналина в отсутствие ингибиторов, 2 — в присутствии СОД (8 мкг/мл), 3 — в присутствии ЭДТА (0,1 мМ). Здесь и на рис. 2 по оси абсцисс — время, ч; по оси ординат — длина волны, нм.

Рис. 2. Ингибирование аутоокисления адреналина ( $0,4 \cdot 10^{-3}$  М) базисными средствами, используемыми при лечении артритов.

1 — окисление адреналина в отсутствие ингибиторов, 2 — в присутствии 0,8 мМ декариса, 3 — в присутствии 0,8 мМ делагила, 4 — в присутствии 0,8 мМ d-пенициллина.

Рис. 3. Динамика спектральных изменений, характеризующих процесс аутоокисления адреналина ( $0,4 \cdot 10^{-3}$  М) и его ингибирование декарисом.

1, 3, 5, 7 — спектры поглощения адреналина соответственно после 4, 6, 8 и 10 ч аутоокисления; 2, 4, 6, 8 — спектры поглощения адреналина соответственно после 4, 6, 8 и 10 ч аутоокисления в присутствии декариса (0,8 мМ; декарис вносили в среду инкубации по прошествии 4 ч от начала аутоокисления адреналина).

лизует свободные радикалы (антирадикальный механизм) и связывает ионы железа (хелатирующий механизм). В случае же  $\text{CCl}_4$ -зависимого ПОЛ реализуется только антирадикальный механизм. Аналогичный феномен описан ранее для рутина [1]. Таким образом, d-пеницилламин может использоваться как препарат с мягким хелатирующим действием, блокирующий включение ионов железа в процессы свободнорадикального окисления, но не влияющий, как следует из данных литературы [3], на запасы железа в организме и уровень его в плазме крови. Так как развитие воспалительного процесса в суставах сопровождается появлением в синовиальной жидкости свободного железа [8, 13], представляется вероятным, что лечебный эффект d-пенициллина в этих случаях может быть связан с его хелатирующими свойствами.

Для оценки антиоксидантного действия противоартритных препаратов в водной фазе использовали реакцию окисления адреналина в адренохром. Окисление проводили при pH 7,8; о скорости реакции судили по нарастанию оптической плотности при 480 нм. Хотя реакция в этих условиях протекает достаточно медленно, она, по-видимому, соответствует схеме, предложенной в работе [10] для описания быстрого окисления адреналина при pH 10,0, включающей образование промежуточных радикальных продуктов и анион-радикала кислорода. Эффективное торможение рассматриваемой реакции СОД (более чем на 70 %; рис. 1) подтверждает высказанное предположение.

Аскорбиновая кислота и кверцетин эффективно ингибируют окисление адреналина (табл. 2). В то же время ионол (см. табл. 2) и ЭДТА (см. рис. 1) оказывают менее выраженное действие.

Из исследованных препаратов наиболее существенно ингибировали окисление адреналина базисные средства (см. табл. 2). При этом эффективность d-пенициллина снижалась, а делагила и особенно декариса увеличивалась в течение процесса окисления адреналина (см. рис. 2). По-видимому, это обусловлено тем, что в данных условиях делагил и декарис способны превращаться в активные интермедиаты, обладающие выраженным антиокислительным действием. Действительно, как видно из рис. 3, при совместной инкубации декариса и частично окисленного адреналина образуется соединение с максимумом поглощения при 406 нм, накопление которого приводит практически к полному ингибированию окисления адреналина.

венно ингибировали окисление адреналина базисные средства (см. табл. 2). При этом эффективность d-пенициллина снижалась, а делагила и особенно декариса увеличивалась в течение процесса окисления адреналина (см. рис. 2). По-видимому, это обусловлено тем, что в данных условиях делагил и декарис способны превращаться в активные интермедиаты, обладающие выраженным антиокислительным действием. Действительно, как видно из рис. 3, при совместной инкубации декариса и частично окисленного адреналина образуется соединение с максимумом поглощения при 406 нм, накопление которого приводит практически к полному ингибированию окисления адреналина.

Таблица 2

Ингибирование противоартритными препаратами и антиоксидантами реакции аутоокисления адреналина

Препарат	Концентрация, мМ	Количество образующегося адренохрома, % от контрольного уровня
Ацетилсалициловая кислота	0,8	100
Индометацин	0,8	80
Ибупрофен	0,8	85
Ортофен	0,8	100
Делагил	0,8	60
Купренил (d-пеницилламин)	0,8	32
Декарис	0,8	77
Рутин	0,08	60
Кверцетин	0,02	49
Аскорбиновая кислота	0,04	9
Ионол	0,02	81

Примечание. Длительность окисления 6 ч. За контрольный уровень принимали количество адренохрома, образующегося в среде инкубации, содержащей только соответствующий растворитель.

Исследованные нестероидные противовоспалительные препараты либо не влияли на реакцию аутоокисления адреналина (ацетилсалициловая кислота, ортофен), либо незначительно ингибировали ее (индометацин, ибупрофен).

Таким образом, препараты, используемые для лечения артритов, обладают некоторой антиоксидантной активностью, однако предположение о том, что это свойство является одним из механизмов действия антифлогистиков, ставится под сомнение, так как, во-первых, антиоксидательная активность не является универсальным свойством как исследованных противоартритных препаратов в целом, так и нестероидных противовоспалительных препаратов (см. табл. 1, 2), во-вторых, антиоксидантное действие исследованных соединений в водной фазе и особенно в условиях перекисного окисления липидов менее эффективно, чем у известных природных и синтетических антиоксидантов и проявляется лишь в концентрациях, значительно превышающих терапевтическое. Таким образом, влияние противоартритных препаратов на свободнорадикальные процессы носит в основном опосредованный характер.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Костюк В. А., Погачев А. И., Терещенко С. М., Афанасьев И. Б. // Биохимия. — 1988. — Т. 53, № 8. — С. 1365—1370.
2. Насыров Х. М., Фархутдинов Р. Р. // Вопр. мед. химии. — 1985. — № 1. — С. 40—43.
3. Сигилин Я. А., Шварц Г. Я., Арзамасцев А. П., Либерак С. С. Лекарственная терапия воспалительного процесса. — М., 1988. — С. 209.
4. Biemond P., Swaak A. J. G., Penders J. M. A. et al. // Ann. rheum. Dis. — 1986. — Vol. 45. — P. 249—255.
5. Biemond P., Swaak A. J. G., van Eijk H. G., Koster J. F. // Arthr. a. Rheum. — 1986. — Vol. 29. — P. 1187—1193.
6. Friman C., Johnston C., Chew C., Davis P. // Scand. J. Rheum. — 1986. — Vol. 15. — P. 41—46.
7. Goebel K. M., Storck U. // Amer. J. Med. — 1983. — Vol. 74. — P. 124—128.
8. Halliwell B., Gutteridge J. M. C. // Biochem. J. — 1984. — Vol. 219. — P. 1—14.
9. Minta J. O., Williams M. D. // J. Rheum. — 1985. — Vol. 12. — P. 751—757.
10. Misra H. P., Fridovich I. // J. biol. Chem. — 1972. — Vol. 247. — P. 3170—3175.
11. Miyachi Y., Yoshioka A., Imamura S., Niwa Y. // Ann. rheum. Dis. — 1986. — Vol. 45. — P. 244—248.
12. Pekoe G. // Agents a. Actions. — 1982. — Vol. 12. — P. 232—238.
13. Rowley D., Gutteridge J. M. C., Blake D. et al. // Clin. Science. — 1984. — Vol. 66. — P. 691—695.
14. Wade C. R., Jackson P. G., Highton J., van Rij A. M. // Clin. chim. Acta. — 1987. — Vol. 164. — P. 245—250.
15. Yoshikawa T., Tanaka H., Kondo M. // J. appl. Biochem. — 1983. — Vol. 5. — P. 382—387.

Поступила 28.09.88

#### ANTIOXIDATIVE ACTIVITY OF THE ANTIARTHRITIC DRUGS

V. A. Kostyuk, A. I. Potapovich, N. F. Soroka

Byelorussian State University, Medical School, Minsk.

Antioxidative activity of acetyl salicylic acid, indometacin, ibuprofen, orthophen, delagil, D-penicillamine and levamisol was studied under conditions of NADPH- and  $CCl_4$ -dependent lipid peroxidation both in rat liver microsomes and in adrenalin autooxidation. All the drugs studied exhibited only slight antioxidative activity being dissolved in water, and especially towards lipid peroxidation, as compared with quercitol and ionol; their activity was noted at concentrations exceeding distinctly the therapeutic doses. At the same time, D-penicillamine inhibited lipid peroxidation not only by means of

free radicals neutralization but also via binding of iron ions. This property of the drug may be responsible for its effects, to some extent, in treatment of joint inflammations.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.89-008.441.13-07:616.153.1:577.152.353

И. В. Чуваев, Э. И. Краснова, М. С. Усатенко, Е. М. Крупицкий, Т. Г. Рыбакова, А. Я. Гриненко

#### ДИНАМИКА АКТИВНОСТИ КРЕАТИНКИНАЗЫ И ЕЕ ИЗОФЕРМЕНТОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ АЛКОГОЛИЗМОМ

НИИ экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград; Ленинский областной наркологический диспансер; Ленинградский научно-исследовательский психоневрологический институт им. В. М. Бехтерева

Наиболее часто применяемые методы объективной диагностики алкоголизма основаны на определении в крови активности ферментов ( $\gamma$ -глутамилтрансферазы, алкогольдегидрогеназы, аспарат- и аланинаминотрансфераз и др.), источником которых является ткань печени [5]. Однако данные методы несовершенны и могут использоваться лишь в качестве дополнительных критериев для выявления алкоголизма [2, 5]. В связи с этим поиск чувствительных и специфических методов обнаружения систематического употребления алкоголя привлекает внимание исследователей [7].

Креатинкиназа — КК (КФ 2.7.3.2) — фермент энергетического обмена, представленный в тканях тремя органоспецифичными изоферментами ММ-, МВ- и ВВ-типа. ММ-КК содержится преимущественно в скелетных мышцах, МВ-КК — в сердце и ВВ-КК — в нервной ткани [4].

Известно, что активность КК в сыворотке крови повышается при заболеваниях, связанных с деструкцией клеточных мембран [4]. Имеются сведения об увеличении активности КК в крови при острой и хронической алкогольной интоксикации [8, 10]. Эти факты указывают на принципиальную возможность использования креатинкиназного теста для диагностики алкоголизма. Необходимым условием разработки такого теста является изучение динамики активности КК и ее изоферментов в крови больных алкоголизмом на различных стадиях заболевания. Выяснение данного вопроса явилось целью нашего исследования.

**Методика.** Исследовали сыворотку крови 32 больных хроническим алкоголизмом II стадии (от 26 до 50 лет). Из них 20 человек поступили в стационар с алкогольным абстинентным синдромом (ААС) и в соответствии с [3] были разделены на 3 группы: 1-я — с умеренным ААС, 2-я — с ААС средней тяжести и 3-я — с выраженным ААС. Активность КК определяли в сыворотке крови у каждого больного на 1, 3 и 7-е сутки пребывания в стационаре и через 1 и 2 мес. Остальные 12 человек прошли ранее курс лечения и находились в момент обследования в состоянии стойкой длительной ремиссии (от 1 года до 14 лет).

Наряду с определением общей активности КК изучали ее изоферментный спектр. В качестве контроля использовали сыворотку крови 15 клинически здоровых добровольцев (от 20 до 40 лет).

Разделение изоферментов КК осуществляли с помощью колоночной хроматографии на ДЭАЕ-сефадексе А-50 [9]. Предварительно выбирали оптимальные условия разделения изоферментов. Разделение проводили на микроколонке высотой  $8 \times 0,5$  см; высота слоя сефадекса 2,5 см. На колонку наносили 1 мл сыворотки крови. Изоферменты ММ-КК,



# Динамика изменений общей активности КК в сыворотке крови больных алкоголизмом

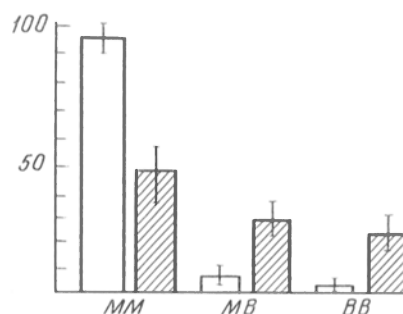
Состояние обследованных	Выраженность ААС	Срок воздержания от приема алкоголя	Активность КК, МЕ на 1 л сыворотки крови
Клинически здоровые добровольцы (n=15)	—	—	25±6
ААС:			
умеренный (n=7)		1 день	44±3 <sup>а</sup>
		3 дня	65±7 <sup>а, б, г</sup>
		7 дней	33±5
средней тяжести (n=7)		1 день	54±4 <sup>а</sup>
		3 дня	140±9 <sup>а, б, в</sup>
		7 дней	41±5 <sup>а</sup>
выраженный (n=8)		1 день	53±4 <sup>а</sup>
		3 дня	230±31 <sup>а, б, в</sup>
		7 дней	46±5 <sup>а</sup>
Ремиссия		до 2 мес (n=8)	40±4 <sup>а</sup>
		от 1 до 14 лет (n=12)	53±3 <sup>а</sup>

Примечание. Буквами а—г отмечена достоверность различий показателей: а — по отношению к контролю, б — по сравнению с 1-ми и 7-ми сутками ААС, в — по сравнению с 3-ми сутками умеренного ААС, г — по сравнению с 3-ми сутками выраженного ААС.

МВ-КК и ВВ-КК элюировали ступенчатым методом 50 мМ трис-НСl-буфером (рН 7,0), содержащим 100, 200 и 400 мМ NaCl соответственно. Каждый изофермент элюировали 5 мл используемых растворов; элюаты собирали фракциями по 1 мл. Активность КК определяли колориметрическим методом [6] на спектрофотометре «Specord M-40» («Јена», ГДР). Статистическую обработку результатов проводили по Стьюденту.

**Результаты и обсуждение.** Результаты исследования активности КК в сыворотке крови больных с ААС свидетельствуют о наличии прямой зависимости между степенью выраженности ААС и максимальным подъемом активности фермента в крови (см. таблицу). Пик активности КК у больных всех трех групп приходился на 3-и сутки ААС, а к 7—8-м суткам, когда ААС был практически полностью купирован, активность фермента резко снижалась до уровня, достоверно не отличавшегося от исходного. На протяжении последующих 2 мес лечения в стационаре активность КК у больных всех групп значительно не изменялась.

При изучении изоферментных спектров КК было показано, что повышение ее общей активности в крови на 3-и сутки ААС происходит вследствие увеличения содержания всех трех форм КК. При этом относительное увеличение активности ВВ-КК (в 8 раз) было более выражено, чем увеличение МВ и ММ-изоферментов (в 1,8 и 2,4 раза соответственно). Указанная динамика активности КК в крови в период ААС обращает на себя внимание в связи с тем, что по клиническим наблюдениям алкогольный делирий развивается именно на 3—4-е сутки ААС. Известно, что при ААС повышается проницаемость мембранных структур, в том числе гематоэнцефалического барьера, причем, как свидетельствуют наши данные, максимум увеличения проницаемости приходится именно на 3-и сутки. В соответствии с представлениями И. П. Анохиной и Б. М. Когана [1], это может приводить к увеличению проникновения из крови в мозг дофамина и токсических продуктов его



Изоферментный спектр КК в сыворотке крови больных алкоголизмом в состоянии ремиссии.

По оси абсцисс — ММ-, МВ- и ВВ-изоферменты КК; по оси ординат — содержание изоферментов КК в сыворотке крови, %. Светлые столбики — сыворотка крови клинически здоровых лиц, заштрихованные — сыворотка крови пациентов, находящихся в состоянии ремиссии (от 1 до 14 лет).

обмена, что считается одной из возможных причин возникновения делирия. Обнаруженное ранее [8] значительное увеличение активности КК при алкогольном делирии также свидетельствует в пользу данных предположений. Исследования, проведенные на лицах, находящихся в состоянии стойкой ремиссии (см. таблицу), показали, что длительное воздержание от алкоголя (от 1 до 14 лет) не приводит к полной нормализации активности КК в крови. Изучение изоферментного спектра КК у пациентов в длительной ремиссии выявило существенное смещение его в сторону увеличения содержания МВ- и ВВ-изоформ по сравнению с таковым у здоровых добровольцев (см. рисунок). Содержание МВ-КК и ВВ-КК у больных в состоянии ремиссии было примерно равным и составляло 20—23 % общей активности, в то время как у здоровых испытуемых содержание указанных изоферментов составляло 0—8 и 0—3 % соответственно. Такое резкое смещение изоферментного спектра, по-видимому, нельзя объяснить только стойкими нарушениями проницаемости мембран клеток, в частности гематоэнцефалического барьера и миокарда. Не исключена также возможность, что при хронической алкогольной интоксикации происходит депрессия гена, ответственного за синтез В-субъединицы КК в тканях скелетной мускулатуры (который в норме не проявляет своей активности), вследствие чего и может наблюдаться увеличение процентного содержания МВ- и ВВ-изоформ КК.

Таким образом, изменение общей активности КК и ее изоферментного спектра может служить одним из маркеров хронического алкоголизма. Результаты нашей работы подтверждают предположение о целесообразности применения креатинкиназного теста для диагностики алкоголизма, а также, возможно, и для оценки вероятности развития алкогольного делирия. Данный тест представляется особенно ценным вследствие того, что изменения активности КК и ее изоферментного спектра, наблюдаемые у больных алкоголизмом, отчетливо выражены и сохраняются в периодах длительных ремиссий.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Анохина И. П., Коган Б. М. // Итоги науки и техники. Сер. Токсикология. — 1984. — Т. 13. — С. 151—178.
2. Бокй И. В., Усатенко М. С., Трифанов В. Ф. // Использование алкогольдегидрогеназного теста в качестве до-

- полнительного критерия для диагностики алкоголизма: Метод. рекомендации.— Л., 1985.— С. 21.
3. Гофман А. Г., Графова И. В. // Всероссийская науч.-практ. конф.; 4-я: Материалы.— М., 1983.— С. 35—36.
  4. Лызлова С. Н. Фосфогенкиназы.— Л., 1974.— С. 168.
  5. Панченко Л. Ф., Антоненков В. Л., Яковченко В. А. // Этанол и обмен веществ.— Минск. 1982.— С. 143—160.
  6. Петрова Т. А., Лызлова С. Н. // Вестн. Ленингр. гос. ун-та.— 1985.— № 24.— С. 88—90.
  7. Успенский А. Е. // Клин. мед.— 1986.— № 6.— С. 128—135.
  8. Яковченко В. А., Макаровский В. В., Дроздов Э. С., Корен А. П., Никулин В. Л. // Сборник науч. трудов НИИ общей и судеб. психиатр. им. Сербского.— М., 1985.— С. 76—78.
  9. Yaminch W., Lewis I. // Clin. chim. Acta.— 1984.— Vol. 142, N 1.— P. 113—121.
  10. Spargo E. // J. Neurol. Sci.— 1984.— Vol. 63, N 3.— P. 307—316.

Поступила 05.12.88

# DYNAMICS OF ACTIVITY OF CREATINE KINASE AND ITS ISOENZYMES IN BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH ALCOHOLISM

I. V. Chuvpov, E. I. Krasnova, M. S. Usatenko, E. M. Krupitsky, T. G. Rybakova, A. Ya. Grinenko

Institute of Experimental Medicine, Academy of Medical Sciences of the USSR, Regional Narcological Dispensary, V. M. Bekhterev Institute of Psychoneurology, Leningrad

Activity of creatine kinase (CK) and its isoenzymes was studied in blood serum of 32 patients with alcohol abstinent syndrome of various severity as well as in persons with long-term remission (from 1 to 14 years) as compared with the enzymatic activity in healthy volunteers. The severity of alcohol abstinent syndrome correlated with an increase in the total enzyme activity in blood, where content of the all three CK isoenzymes (MM, MB and BB), especially of BB-CK, was elevated. Content of MB and BB isoenzymes was increased in blood of patients with long-term remission, while activity of each of the isozyme constituted up to 20-30 % of total CK activity, which was by one decimal order higher as compared with control values. Importance of the alterations observed in activity of creatine kinase and its isoenzymes for diagnosis of alcoholism, especially under conditions of alcohol abuse and long-term alcohol abstinence, is discussed.

Целью работы явилось изучение влияния полипептидного препарата тимуса — тималина [11] на биохимические и иммунологические параметры дифференцировки и функциональную активность лимфоцитов при приобретенных иммунодефицитных состояниях.

Методика. Изучение действия тималина (завод медицинских препаратов «Ленмьсопрома») проведено у 117 больных с приобретенными иммунодефицитными состояниями (хронические гнойно-воспалительные заболевания), которым наряду с общепринятым лечением ежедневно внутримышечно вводили по 5—10 мг препарата тимуса в течение 5—7 сут. Контрольную группу составили 83 больных с аналогичной патологией и таким же лечением (за исключением тималина).

Биохимическое и иммунологическое исследования у больных обеих групп проводили до и после лечения (интервал между исследованиями составлял 7—12 дней). В лимфоцитах, выделенных в градиенте плотности фиколло — пака («Pharmacia», Швеция) и лизированных путем повторного замораживания и оттаивания, определяли изоферменты ЛДГ с помощью электрофореза в агаровом геле [5]. У части обследованных изоферменты ЛДГ определяли в популяции лимфоцитов, обогащенных Т-клетками. Для этого взвесь лимфоцитов пропускали через колонку с нейлоновой ватой («Fenwal Laboratories», США) [14]. Анализ изоэнзимограм осуществляли денситометрически. После определения изоферментов ЛДГ, исходя из тетрамерного строения молекулы фермента, рассчитывали соотношение полипептидных субъединиц Н и М (коэффициент Н/М — ЛДГ<sub>1-5</sub>), которое характеризует процессы окисления в клетках и степень их зрелости [15, 19]. Для определения внутриклеточного уровня циклических нуклеотидов лимфоциты, выделенные из крови указанным ранее методом, инкубировали в течение 10 мин при 37 °С. Затем клетки делили на 2 равные части (контроль и опыт) и в суспензию лимфоцитов (опыт) добавляли тималин в концентрации 1 мкг/мл, растворенный в среде 199. Содержание цАМФ и цГМФ в клетках определяли с использованием наборов реактивов «Amersham», Англия) с последующим подсчетом радиоактивности проб в жидкостно-сцинтилляционном счетчике («Nuclear Chicago», США). Исходный уровень нуклеотидов принимали за 100 (контроль). Изменение содержания цАМФ и цГМФ после добавления в суспензию клеток тималина (опыт) по отношению к контролю характеризовало чувствительность циклазной системы к препарату тимуса и выражалось в процентах.

Количество Т-лимфоцитов и их субпопуляций определяли по наличию дифференцированных антигенов на поверхности клеток с помощью мышиных моноклональных антител ОКТЗ, ОКТ4, ОКТ8 («Ortho», США) иммунофлюоресцентным методом [20]. У больных также оценивали реакцию торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ) с конканавалином А (КонА) [7] и реакцию гиперчувствительности замедленного типа (РГЗТ) на внутрикожное введение туберкулина. Чувствительность лимфоцитов к тималину определяли с помощью индекса чувствительности (ИЧ) — отношения процентного содержания «активных» Т-лимфоцитов (Еа-РОК) после добавления тималина в концентрации 1 мкг/мл в культуру клеток к их исходному количеству [11]. Количество В-лимфоцитов (Ig<sup>+</sup>) определяли в прямой иммунофлюоресцентной реакции с помощью антииммуноглобулиновой сыворотки («Sevac», ЧССР) [7]. С целью определения нормальных биохимических и иммунологических показателей обследовано 35 практически здоровых доноров. Результаты исследований подвергнуты математико-статистической обработке на ЭВМ ЕС-1022 с использованием пакетов программ.

Результаты и их обсуждение. Результаты исследований представлены в таблице. Изменение спектра изоферментов ЛДГ в лимфоцитах (снижение ЛДГ<sub>1</sub> и ЛДГ<sub>2</sub>, увеличение ЛДГ<sub>4</sub> и ЛДГ<sub>5</sub>), снижение коэффициента Н/М — ЛДГ<sub>1-5</sub> до лечения указывают на увеличение количества незрелых Т-лимфоцитов в крови, для которых характерным является усиление анаэробного гликолиза — типа метаболизма, присущего малодифференцированным клеткам. Подтверждением этому служит выявленное увеличение содержания цАМФ в лимфоцитах при добавлении к ним тималина,

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 615.361.438.03:[616-092:612.017.1.064]:015.4:616.155.32].036.8

В. Х. Хавинсон, А. Л. Кожемякин, В. Г. Морозов, Л. А. Кожемякин

## ВЛИЯНИЕ ТИМАЛИНА НА БИОХИМИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЛИМФОЦИТОВ

Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Ленинград

Процессы созревания и дифференцировки Т-лимфоцитов, осуществляющих реакции клеточного иммунитета, контролируются тимусом. Фактор (или факторы), вырабатываемый этим центральным органом иммунитета, с одной стороны, индуцирует появление специфических маркеров на поверхности предшественников Т-клеток, а с другой — контролирует функциональную активность Т-лимфоцитов [21]. Процессы дифференцировки и пролиферации сопровождаются закономерными изменениями внутриклеточного содержания циклических нуклеотидов [8, 18], спектра изоферментов лактатдегидрогеназы (ЛДГ) [9, 19] и рецепторного аппарата [17] иммунокомпетентных клеток.

**Биохимические и иммунологические показатели дифференцировки и функциональной активности лимфоцитов у больных с приобретенными иммунодефицитными состояниями ( $X \pm m$ )**

Показатель	Норма	Обследуемые контрольной группы		Обследуемые, получавшие тималин	
		до лечения	после лечения	до лечения	после лечения
ЛДГ <sub>1</sub> , %	19,7±0,9	13,8±1,2*	14,6±1,4	13,3±2,1*	17,6±1,7**
ЛДГ <sub>2</sub> , %	33,9±1,3	24,4±2,1*	26,7±1,9	25,8±3,3*	31,5±1,2**
ЛДГ <sub>3</sub> , %	26,9±1,2	32,9±2,8	28,7±2,4	29,7±2,1	28,1±3,6
ЛДГ <sub>4</sub> , %	14,9±0,7	19,7±1,1*	20,9±1,5	22,6±1,8*	17,5±1,1
ЛДГ <sub>5</sub> , %	4,4±0,5	9,2±0,7*	9,1±0,6	8,5±0,6*	6,3±0,3**
Н/М—ЛДГ <sub>1-5</sub>	1,68±0,04	1,14±0,16*	1,18±0,09	1,15±0,06	1,48±0,05**
Содержание в лимфоцитах при добавлении тималина (по отношению к исходному уровню, принятому за 100 %), %:					
цАМФ	98,7±5,4	157,3±9,8*	176,4±12,6	168,8±10,3*	122,3±7,9**
цГМФ	109,2±6,1	117,3±6,7	111,7±7,2	115,4±11,6	119,7±8,3
Лимфоциты ( $\cdot 10^9$ /л)	1,09±0,08	0,52±0,07*	0,73±0,11**	0,53±0,06*	0,98±0,12**
ОКТ3 <sup>+</sup>	0,65±0,05	0,29±0,03*	0,37±0,03	0,30±0,03*	0,61±0,03**
ОКТ4 <sup>+</sup>	0,41±0,03	0,21±0,02*	0,26±0,03	0,22±0,02*	0,31±0,03
ОКТ8 <sup>+</sup>	0,29±0,02	0,22±0,04	0,31±0,03	0,26±0,03	0,36±0,04
ОКТ4 <sup>+</sup> /ОКТ8 <sup>+</sup>	1,64±0,12	1,33±0,11*	1,42±0,13	1,36±0,12*	1,96±0,17**
РТМЛ с КонА, %	59,1±1,7	88,4±6,7*	75,3±4,1	84,1±6,8*	83,0±4,2**
РГЗТ на туберкулин, мм	10,8±0,6	3,1±0,4*	4,8±0,7	3,6±0,5*	9,7±0,8**
ИЧ к тималину	1,33±0,03	1,18±0,11*	1,22±0,13	1,17±0,12*	1,31±0,15**

Примечание. Одна звездочка — статистически достоверные различия с нормой ( $p < 0,05$ ), две — с показателем до лечения в данной группе ( $p < 0,05$ ).

что также характерно для клеток, находящихся на ранних этапах дифференцировки. У обследуемых обнаружено достоверное снижение всех количественных и функциональных показателей Т-системы иммунитета. Следует отметить существенное уменьшение числа Т-хелперов/индукторов (ОКТ4<sup>+</sup>), Т-супрессоров/киллеров (ОКТ8<sup>+</sup>) и особенно их соотношения.

После применения тималина в лимфоцитах обследуемых отмечена тенденция к нормализации спектра изоферментов ЛДГ, а также чувствительности циклазной системы к фактору тимуса, в то время как у больных контрольной группы эти показатели оставались на уровне исходных. При изучении спектра изоферментов ЛДГ в популяции лимфоцитов, обогащенной Т-клетками, коэффициент Н/М — ЛДГ<sub>1-5</sub> до лечения составлял  $1,36 \pm 0,08$  (норма  $1,83 \pm 0,02$ ). Применение тималина способствовало повышению этого коэффициента до  $1,63 \pm 0,07$ , что указывало на взаимосвязь изменений спектра изоферментов ЛДГ с процессами созревания Т-лимфоцитов. Введение тималина способствовало восстановлению показателей клеточного иммунитета, что коррелировало с клинической эффективностью препарата. У обследуемых контрольной группы в те же сроки исследования показатели Т-системы иммунитета изменились незначительно.

Развитие иммунодефицитного состояния у больных с хроническими гнойно-воспалительными заболеваниями, по-видимому, является следствием нарушения процессов созревания и дифференцировки Т-лимфоцитов, которое сопровождается угнетением их функциональной активности. Существенное значение имеют дегенеративные изменения тимического эпителия, влекущие за собой нарушение процессов дифференцировки Т-лимфоцитов. Так, установлена возможность образования аутоантител к антигенам эпителиальных клеток тимуса и телец Гассала [22], а также появления в тимусе иммунных комплексов [1]. Кроме того, изменение морфологии тимуса также отмече-

но при вирусной инфекции [23], туберкулезе [2], остеомиелите [10].

Сдвиг в популяции лимфоидных клеток в сторону малодифференцированных Т-лимфоцитов может быть обусловлен нарушением восприятия дифференцировочных сигналов предшественниками Т-клеток на одном из этапов их созревания. Это происходит при патологических состояниях, протекающих с выраженным аутоиммунным компонентом, образованием аутоантител к пре-Т-лимфоцитам, а также при блокаде иммунными комплексами рецепторов лимфоцитов [13]. Таким образом, нарушение процессов дифференцировки и функциональной активности Т-лимфоцитов может быть основой и (или) проявлением ряда вторичных иммунодефицитных состояний, что коррелирует с появлением незрелых Т-клеток в периферической крови [3, 6, 12, 16].

На фоне применения тималина отмечены нормализация внутриклеточных биохимических процессов и усиление экспрессии дифференцировочных антигенов, что сопровождалось восстановлением функциональной активности Т-лимфоцитов. Можно полагать, что препарат тимуса способствует регенерации эпителия тимуса, которая сопровождается нормализацией синтеза и секреции клетками пептидов тимуса. Тималин, вероятно, способствует также восстановлению рецепторного аппарата Т-лимфоцитов. Биохимические и иммунологические показатели дифференцировки лимфоцитов могут быть использованы для диагностики и контроля эффективности проводимого лечения больных с приобретенными иммунодефицитными состояниями.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гнездицкая Э. В., Белецкая Л. В., Косач Г. А., Малкина Л. А. // Бюл. экспер. биол. — 1982. — № 3. — С. 76—79.
2. Ельшанская М. П., Ерохин В. В. // Там же. — № 11. — С. 112—116.
3. Калия В. С. // Здравоохран. Белоруссии. — 1980. — № 1. — С. 17—19.

4. Кожемякин А. Л., Морозов В. Г., Хавинсон В. Х. // Биохимия.— 1984.— Т. 49, № 4.— С. 658—666.
5. Маркелов И. М. // Лаб. дело.— 1966.— № 12.— С. 707—711.
6. Матвейков Г. П., Досин Ю. М., Каляя Е. С. и др. // Тер. арх.— 1982.— № 12.— С. 44—47.
7. Морозов В. Г., Хавинсон В. Х. Методические рекомендации по проведению иммунологических исследований: (Методы оценки Т- и В-систем иммунитета).— Л., 1980.
8. Морозов В. Г., Хавинсон В. Х., Кожемякин А. Л., Кожемякин Л. А. // Вопр. мед. химии.— 1982.— № 4.— С. 114—118.
9. Робинсон М. В., Топоркова Л. Б., Труфакин В. А. // Цитология.— 1980.— Т. 22, № 1.— С. 86—88.
10. Соловьев М. М., Сулиев Т. К., Гринцевич И. И. и др. // Бюл. экпер. биол.— 1983.— № 6.— С. 123—124.
11. Хавинсон В. Х., Морозов В. Г. // Иммунология.— 1981.— № 5.— С. 28—31.
12. Ersler W. B., Ney P., Britt J. et al. // Thymus.— 1981.— Vol. 3, N 4—5.
13. Fagiolo E. // Blut.— 1982.— Bd 44, N 4.— S. 225—230.
14. Greaves M. F., Brown G. // J. Immunol.— 1974.— Vol. 112, N 1.— P. 420—423.
15. Griend R. J., Astealdi A., Vossen J. M. et al. // Ibid.— 1981.— Vol. 126, N 2.— P. 636—640.
16. Hobbs J. R., Byrom N. A., Campbell M. A. et al. // Thymus, Thymic Hormones and T-Lymphocytes.— London, 1980.— P. 143—153.
17. Horowitz S. O., Goldstein A. L. // Clin. Immunol. Immunopath.— 1978, N 4.— P. 408—418.
18. Naylor P. H., Goldstein A. L. // Life Sci.— 1979.— Vol. 25, N 4.— P. 301—310.
19. Plum I., Ringoir S. // J. Reticuloendoth. Soc.— 1974.— Vol. 21, N 4.— P. 225—230.
20. Reinherz E. L., Kung P. C., Goldstein G., Schlossman S. F. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1979.— Vol. 76, N 8.— P. 4061—4065.
21. Scheid M. P., Goldstein G., Boyse E. A. // J. exp. Med.— 1978.— Vol. 147, N 6.— P. 1727—1743.
22. Singh V. K., Hoffman M. A. // Immunol. Lett.— 1984.— Vol. 7, N 5.— P. 249—252.
23. Tonielli G., Rossi G. B., Garaci E. et al. // Thymus, Thymic Hormones and T-Lymphocytes.— London, 1980.— P. 7—13.

Поступила 15.12.88

#### EFFECT OF THYMALINE ON BIOCHEMICAL AND IMMUNOLOGICAL PATTERNS OF LYMPHOCYTE DIFFERENTIATION AND FUNCTIONAL ACTIVITY

V. Kh. Khavinson, A. L. Kozhemyakin, V. G. Morozov, L. A. Kozhemyakin

Military-Medical Academy, Leningrad.

Polypeptide preparation thymaline obtained from thymus was found to normalize the LDH isoenzyme spectrum and cyclase system in lymphocytes of patients. Thymaline contributed also to expression of differentiation antigens on T-lymphocytes surface. As a result of this functional activity of T-lymphocytes was restored, which correlated with improvement of the patients clinical state. Biochemical and immunological patterns of lymphocytes differentiation may be used both in diagnosis and control of treatment efficiency in patients with acquired immunodeficiency syndrome.

© Э. И. ХАСИНА, О. И. КИРИЛЛОВ, 1990

УДК 616.36-092:612.766]-003.93-07:616.36-008.934.586.3

Э. И. Хасина, О. И. Кириллов

#### СОДЕРЖАНИЕ ГЛИКОГЕНА И АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА ПЕЧЕНИ В РЕАДАПТАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ ПОСЛЕ 20-СУТОЧНОЙ ГИПОКИНЕЗИИ КРЫС

Институт биологии моря Дальневосточного научного центра АН СССР, Владивосток

Изменения углеводного обмена печени в процессе длительной гипокинезии [1, 3, 6, 10] обычно рассматривают как атрибут развития общего адаптационного синдрома Селье [1, 4, 7, 10]. Как было показано нами ранее [10], в течение нескольких первых часов и суток гипокинезии у крыс происходит увеличение поступления глюкозы из печени в кровяное русло, распад гликогена в печени, снижение активности гексокиназы (ГК) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6Ф-ДГ) (аларм-реакция по Селье), однако через 10—15 сут содержание гликогена нормализуется, а активность ГК и Г6Ф-ДГ возрастает до уровня, превышающего таковой в контроле, что свидетельствует об адаптации к хроническому стрессу (стадия резистентности по Селье). Представлялось интересным проследить, каким образом осуществляется нормализация отмеченных изменений после прерывания гипокинезии на этом этапе.

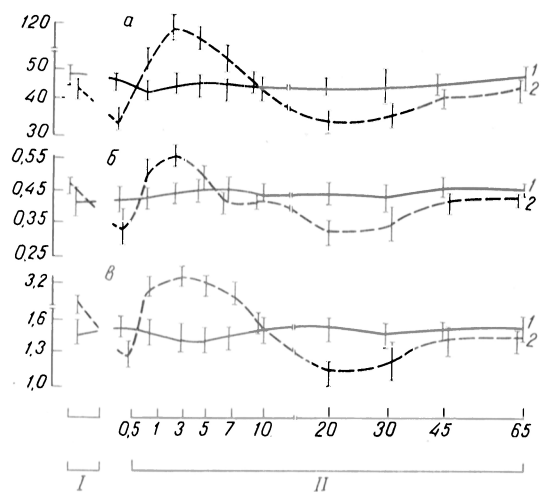
Методика. Самцов крыс Вистар с исходной массой тела 130—150 г подвергали 20-суточному ограничению двигательной активности в пеналах, после чего животных пересаживали в обычные клетки. Контрольных крыс содержали в обычных клетках в течение всего эксперимента. По 8 контрольных и подопытных крыс были декапитированы на 20-е сутки гипокинезии, а также через 12 ч, 1, 3, 5, 10, 20, 30, 45 и 65 сут реадaptационного периода. В печени определяли содержание гликогена [13], а также активность ГК (КФ 2.7.1.1.) [14] и Г6Ф-ДГ (КФ. 1.1.1.49) [9]. Статистические различия результатов оценивали с помощью t-теста Стьюдента.

Результаты и обсуждение. У крыс, подвергнутых 20-суточной гипокинезии, содержание гликогена в печени было одинаковым с контролем (см. рисунок). Активность ГК была несколько выше контрольного уровня, но разница между группами не являлась статистически значимой. Вместе с тем у гипокинезированных крыс наблюдали статистически достоверное увеличение активности Г6Ф-ДГ печени. Эти явления характерны для стадии резистентности хронического стресса.

Взвешивание крыс показало, что под влиянием 20-суточной гипокинезии масса тела уменьшилась на 14 % ( $187 \pm 8,8$  г в контроле,  $164 \pm 4,4$  г в опыте;  $p=0,002$ ). Известно, что гипокинезия вызывает в организме генерализованные катаболические изменения, которые захватывают все виды обмена; снижение массы тела у гипокинезированных крыс принято рассматривать как следствие этих нарушений [2, 7].

В реадaptационном периоде после 20-суточной гипокинезии восстановление показателей углеводного обмена печени носило фазовый характер.

Фаза I-я (первые 12 ч). Как видно из рисунка, через 12 ч реадaptации в печени подопытных крыс происходило уменьшение содержания гликогена. Поскольку стимуляция гликогенолиза слу-



Содержание гликогена (а), активность ГК (б) и Г6Ф-ДГ (в) у контрольных (1) и подопытных (2) крыс.

По оси абсцисс — продолжительность эксперимента; I — 20-суточная гипокинезия; II — реадaptационный период (в сут); по осей ординат — величина исследуемых показателей: содержание гликогена (в мг на 1 г ткани); активности ГК и Г6Ф-ДГ (в мкмоль НАДФ-Н/мин на 1 г ткани).

жит одним из наиболее характерных признаков аларм-реакции, этот факт подтверждает точку зрения, согласно которой извлечение крыс из пеналов и возвращение их к обычным условиям содержания является достаточно интенсивным стимулом, чтобы вызвать новый острый стресс (так называемый «стресс реадaptации» [2, 7, 10]). Активность ГК и Г6Ф-ДГ в печени подопытных крыс через 12 ч реадaptации была несколько ниже, чем в контроле, без статистической значимости между результатами, однако по отношению к уровню, имевшему место у крыс, подвергнутых 20-суточной гипокинезии; падение активности ГК и Г6Ф-ДГ оказалось статистически достоверным ( $p=0,047$  и  $0,013$  соответственно). Очевидно во время острого реадaptационного стресса происходит супрессия гликолиза и прямого окисления глюкозы в пентозофосфатном цикле.

Фаза 2-я (от 1-х до 7-х суток). Уже через сутки реадaptации содержание гликогена в печени не только восстанавливалось до контрольного уровня, но и превышало его. Высокое содержание гликогена до 7-х суток. Активность ГК была умеренно выше контрольного уровня на 1-е и 3-и сутки реадaptационного периода и не отличалась от него на 5-е и 7-е сутки. Активность Г6Ф-ДГ в интервале от 1-х до 7-х суток реадaptации была значительно выше, чем в контроле.

Наличие подобной анаболической фазы в реадaptационном периоде представляет собой многократно описанное явление, которое обычно трактуется как выражение суперкомпенсации израсходованных метаболических резервов [4, 8]. Другой подход состоит в том, что реадaptационный стресс рассматривается не только как острая реакция на извлечение крыс из пеналов, но и как хронический, длительно протекающий процесс; в этом случае анаболическая фаза отождествляется со стадией резистентности реадaptационного стресса [12]. В настоящем исследовании анаболическая фаза в интервале от 1-х до 7-х суток после извлечения крыс из пеналов могла формироваться благодаря 2 процессам: восстановлению элементов стадии резистентности, имевшей место у ги-

покинезированных крыс, и возникновению элементов стадии резистентности в развитии нового, реадaptационного стресса.

На 7-е сутки реадaptационного периода масса тела контрольных крыс равнялась  $195 \pm 7,9$  г, подопытных —  $166 \pm 9,3$  г ( $p=0,037$ ), т. е. разница составляла 17 %. Отсюда следует, что в течение первой недели реадaptации масса тела подопытных крыс оставалась на том же уровне, что и в момент извлечения крыс из пеналов. Данное обстоятельство существенно, так как оно свидетельствует о том, что анаболические изменения углеводного обмена печени в интервале от 1-х до 7-х суток реадaptационного периода носили локальный характер. Это соответствует наблюдениям других авторов, показавших, что анаболическая преобладающая в реадaptационном периоде после гипокинезии какое-то время ограничивается небольшим числом метаболических процессов (накопление запасов холестерина в надпочечниках [12], повышение синтеза гликогена в печени [7], активация окисления глюкозы через пентозофосфатный путь [5]), тогда как в других системах сохраняются глубокие катаболические нарушения [2, 7, 10].

Фаза 3-я (от 10-х до 30-х суток). На 10-е сутки реадaptационного периода содержание гликогена и активность исследованных ферментов в печени возвращались к контрольным значениям (см. рисунок). Поскольку в параллельном исследовании, выполненном на этих же крысах, в данный срок нормализовалось содержание кортикостерона в плазме, которое затем сохранялось на уровне контроля до конца опытов [12], можно считать, что, начиная с 10-х суток, явления реадaptационного стресса окончательно снимались. Неожиданным оказалось то, что позднее, на 20-е сутки реадaptации, содержание гликогена и активность ГК и Г6Ф-ДГ в печени статистически достоверно уменьшались по сравнению с контролем, т. е. углеводный обмен печени — на этот раз вне связи с адренокортикальной стимуляцией — повторно приобрел катаболическую направленность. На 30-е сутки различия в содержании гликогена и активности ГК и Г6Ф-ДГ между опытной и контрольной группами сохранялись, хотя и становились статистически недостоверными.

Масса тела подопытных крыс на 10-е сутки реадaptации составляла  $171 \pm 8,4$  против  $197 \pm 7,3$  г в контроле ( $p=0,037$ ), на 20-е сутки —  $217 \pm 5,8$  против  $241 \pm 6,3$  г в контроле ( $p=0,014$ ), т. е. продолжала оставаться статистически достоверно уменьшенной. Только к 30-м суткам масса тела достигала величины, статистически достоверно не отличающейся от контрольного уровня ( $229 \pm 7,0$  и  $249 \pm 10,8$  г соответственно;  $p=0,132$ ). Таким образом, явления стресса в реадaptационном периоде после гипокинезии снимались значительно раньше восстановления массы тела, а следовательно, и исчезновения генерализованных катаболических изменений. Последние, согласно данным литературы, сохраняются в течение длительного времени, иногда вдвое или втрое превышающего продолжительность самой гипокинезии [2, 7]. По-видимому, после расформирования локального очага анаболического преобладания, характерного для стадии резистентности реадaptационного стресса, показатели углеводного обмена не могут

удержаться на контрольном уровне, а приобретают противоположную катаболическую направленность из-за необходимости восстановления равновесия между ними и состоянием остальных метаболических процессов целого организма: происходит как бы реюстирование углеводного обмена печени к сохраняющемуся общему катаболическому фону.

Фаза 4-я (от 45-х до 65-х суток). В этом интервале реадaptационного периода масса тела и масса печени, содержание гликогена и активность ГК и Г6Ф-ДГ печени восстанавливались до уровня контроля (см. рисунок). На 65-е сутки реадaptации масса тела контрольных крыс равнялась  $295 \pm 8,0$  г, подопытных —  $301 \pm 7,7$  г ( $p=0,625$ ).

Полученные данные показывают, что нормализация углеводного обмена печени после длительной гипокинезии представляет собой не линейный, а сложно протекающий процесс. Характер отдельных фаз реадaptационных изменений углеводного обмена печени определяется, с одной стороны, состоянием стрессовых механизмов, а с другой — состоянием остальных метаболических звеньев целого организма.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ершиков С. М. // Вопр. мед. химии. — 1987. — № 2. — С. 87—90.
2. Коваленко Е. А. // Космическая биол. — 1976. — № 1. — С. 3—5.
3. Лобова Т. П., Потапов П. П. // Там же. — 1981. — № 3. — С. 45—50.
4. Панин П. Е. Биохимические механизмы стресса. — Новосибирск, 1983.
5. Потапов П. П., Тихомирова Н. Н. // Космическая биол. — 1986. — № 3. — С. 85—87.
6. Рассолова Н. П., Попков А. П., Сапелькина И. М., Гребенникова М. И. // Там же. — 1983. — № 2. — С. 26—33.
7. Федоров И. В. Обмен веществ при гиподинамии. — М., 1982.
8. Яковлев П. П. Биохимия спорта. — М., 1974.
9. Glock C. E., Mc Lean F. // Biochem. J. — 1953. — Vol. 55. — P. 400—408.
10. Khasina E. I., Kirillov O. I. // Acta physiol. hung. — 1986. — Vol. 67. — P. 435—439.
11. Khasina E. I., Kurilenko L. A., Kirillov O. I. // Z. mikrosk. anat. Forsch. — 1985. — Bd 99. — S. 603—610.
12. Khasina E. I., Kurilenko L. A., Kirillov O. I. // Ibid. — 1986. — Bd 100. — S. 410—418.
13. Seifter D., Dayton S., Novic B., Nuntwyler E. // Arch. Biochem. — 1951. — Vol. 25. — P. 191—200.
14. Vinuela S., Salas M., Sols A. // J. Biol. Chem. — 1963. — Vol. 238. — P. 1176—1179.

Поступила 15.02.89

within 10 days and decreased repeatedly at the period between 20 and 30 days. Only within 45-65 days of the readaptation period content of glycogen as well as activity of HK and G6PD were completely normalized.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 618.36-008.94-02:577.175.44]-07

Е. И. Карпыза, М. Н. Ермоленко, О. В. Свиридов

### ХАРАКТЕРИСТИКА СПЕЦИФИЧЕСКОГО СВЯЗЫВАНИЯ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ С ПЛАЗМАТИЧЕСКИМИ МЕМБРАНАМИ СИНЦИТИОТРОФОБЛАСТА ПЛАЦЕНТЫ ЧЕЛОВЕКА

Лаборатория химии белковых гормонов; Институт биоорганической химии АН БССР, Минск

Гормоны щитовидной железы оказывают координирующее воздействие на целый комплекс биологических процессов, составляющих основу роста и дифференцировки, и, следовательно, играют ведущую роль в регуляции нормального функционирования организма. На клеточном уровне иницирование самых разнообразных биохимических процессов осуществляется путем переноса тиреоидных гормонов из плазмы крови через плазматическую мембрану и их взаимодействия с ядерным рецептором [8, 10]. Гипотезам о пассивной диффузии тиреоидных гормонов из плазмы крови в клетку пришли на смену экспериментально обоснованные концепции об активном транспорте с участием специфических мембранных белков [14].

При беременности у человека плацента является важным органом-мишенью тиреоидных гормонов. Клетки и субклеточные фракции плаценты способны связывать [9] и метаболизировать тиреоидные гормоны [13]. Кроме того, по мнению отдельных авторов [11], плацента может опосредствовать уникальную связь между тиреоидными гормонами и транспортными белками плазмы матери, с одной стороны, и плодом — с другой.

Ранее нами были подробно изучены белки, связывающие тиреоидные гормоны в плазме и амниотической жидкости матери и в пуповинной крови новорожденных [3, 6, 7], описаны физико-химические [2] и биологические [5] свойства связанного с беременностью молекулярного варианта тироксинсвязывающего глобулина. Подробно изучены молекулярные аспекты комплексообразования тиреоидных гормонов и их структурных аналогов с этими белками [1]. Логическим развитием этих исследований нам представляется выяснение роли тироксинсвязывающих белков плазмы в механизме транспорта тиреоидных гормонов в ткани, специфичные для беременности. В качестве модельной системы *in vitro* нами выбрана система тиреоидный гормон — связывающий белок плазмы — плазматическая мембрана щеточной кисти синцитиотрофобласта и поставлена задача изучить взаимодействие между отдельными ее компонентами и характеристики связывания системы в целом.

Важным этапом исследований в этом направлении явилось изучение кинетических и термодинамических характеристик взаимодействия

#### CONTENT OF GLYCOGEN AND ACTIVITY OF SEVERAL ENZYMES INVOLVED IN CARBOHYDRATE METABOLISM IN RAT LIVER TISSUE DURING THE READAPTATION PERIOD FOLLOWED BY 20 DAYS HYPOKINESIA

E. I. Khasina, O. I. Kirillov

Institute of Marine Biology, Far Eastern Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Vladivostok.

Content of glycogen and activity of hexokinase (HK) were similar to control value, while activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) was increased in liver tissue of rats after 20 days long hypokinesia. Acute stress (or readaptation stress) was observed in the animals after discontinuation of the immobilization, which was characterized by a decrease in content of glycogen and in activity of HK and G6PD in liver tissue. These patterns studied exceeded the control values within the first week after immobilization, they became similar to controls



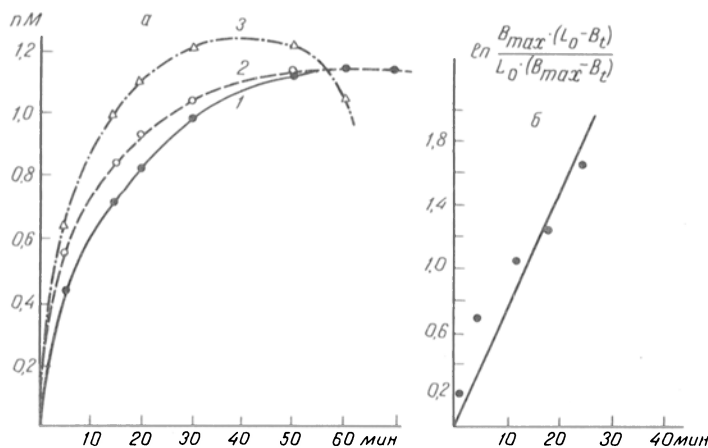


Рис. 1. Кинетика ассоциации  $[^{125}\text{I}] \text{ T}_3$  с плазматическими мембранами щеточной окантовки синцитиотрофобласта плаценты человека.

$a$  — кинетические кривые при 4 °C (1), 22 °C (2) и 37 °C (3);  $b$  — линеаризация кинетической кривой при 22 °C.

трийодтиронина ( $\text{T}_3$ ) и его структурных аналогов с мембранами в отсутствие белков плазмы крови. Полученные результаты представлены в данной работе.

**Методика.** Нормальную послеродовую плаценту получали из областного родильного дома Минска. Транспортирование и хранение плаценты при 0—4 °C в буфере Кребса перед экспериментом составляло не более 3 ч. Плацентарную ткань отделяли от плодовых оболочек, делили на части по 25—30 г, которые немедленно использовали в работе или хранили не более 3 дней при —20 °C.

Образец ткани измельчали с помощью ножниц, промывали 0,1 М  $\text{CaCl}_2$  и буфером Кребса и использовали для получения плазматических мембран щеточной окантовки синцитиотрофобласта [17]. Ткань суспендировали в буфере Кребса, содержащем  $10^{-4}$  М фенилметилсульфонилфторид («Sigma», США), и перемешивали на магнитной мешалке в течение 30 мин. Полученный гомогенат фильтровали через несколько слоев марли, центрифугировали 15 мин при 600 g, осадок отбрасывали, фракцию плазматических мембран осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 25 000 g и дважды промывали буфером Кребса. О нативности и степени чистоты мембран судили по активности 5'-нуклеотидазы [17]. В последующих экспериментах использовали мембранные препараты, в которых удельная активность фермента была в 6—10 раз выше, чем в исходном гомогенате. Общий мембранный белок определяли по методу Лоури [15].

В работе использовали  $[^{125}\text{I}] \text{ T}_3$  с удельной активностью 74 ПБк/моль (В/О «Изотоп»), радиоинертные йодтиронины («Sigma», США), соли, основания и кислоты марки х. ч. отечественного производства. Все буферные растворы готовили, используя дважды перегнанную в стеклянной аппаратуре воду.

Для определения параметров связывания препарат мембран (0,4—0,5 мг общего белка) в пластиковых пробирках инкубировали с различными количествами  $[^{125}\text{I}] \text{ T}_3$  и «холодных» йодтиронинов в 1,0 мл трис- $\text{HCl}$  (pH 7,4), содержащем 0,1 М  $\text{NaCl}$  и 0,01 М  $\text{CaCl}_2$ , варьируя температуру и время инкубации. Затем смесь центрифугировали в течение 15 мин при 4 °C и 25 000 g. Надосадочную жидкость тщательно удаляли и измеряли активность осадка в автоматическом счетчике «Ria Gamma» 1274 (LKB, Финляндия).

За неспецифическое связывание принимали связывание  $[^{125}\text{I}] \text{ T}_3$  в присутствии  $10^{-6}$  М  $\text{T}_3$ . Вычитая эту величину из общего связывания, получали значение специфического связывания. Константы скорости ассоциации ( $k_1$ ) и диссоциации

( $k_i$ ) рассчитывали по методу [12]. Равновесные параметры связывания определяли путем графического анализа данных по Скэтчарду [16]. Полученные данные обработаны общепринятыми методами вариационной статистики. Далее по тексту приведены средние значения кинетических и равновесных параметров, каждый из которых был рассчитан по результатам 5—7 независимых экспериментов с использованием различных препаратов мембран.

**Результаты и обсуждение.** Результаты определения временной и температурной зависимостей специфического связывания  $[^{125}\text{I}] \text{ T}_3$  с плазматическими мембранами синцитиотрофобласта человека представлены на рис. 1. Процессы связывания при 4 и 22 °C кинетически отличались весьма незначительно и через 30 мин после смешения компонентов системы достигалась максимальная величина специфического связывания меченого гормона. Однако при 37 °C кинетическая кривая имела более сложную форму, что могло указать на протекание наряду со связыванием побочных процессов, таких как деградация мембран и (или) меченого лиганда.

Мы оценили кинетические параметры связывания при 22 °C, исходя из уравнения для псевдопервого порядка ассоциации:

$$\ln [B_{\max}(L_0 - B_t) / L_0(B_{\max} - B_t)] = k_1(L_0 - B_{\max})t, \quad (1)$$

где  $B_{\max}$  — концентрация связанного лиганда в состоянии равновесия (на плато кинетической кривой);  $B_t$  — концентрация лиганда, связанного в момент времени  $t$ ;  $L_0$  — общая концентрация добавленного лиганда;  $k_1$  — константа скорости ассоциации. Значение  $k_1$  определяли по наклону прямой графика зависимости выражения в левой части уравнения 1 (на рис. 1 обозначено  $\ln B$ ) от времени. Величина  $k_1$  оказалась равной  $1,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$ .

Важной характеристикой процесса связывания является его обратимость, т. е. способность связанного лиганда диссоциировать из комплекса.

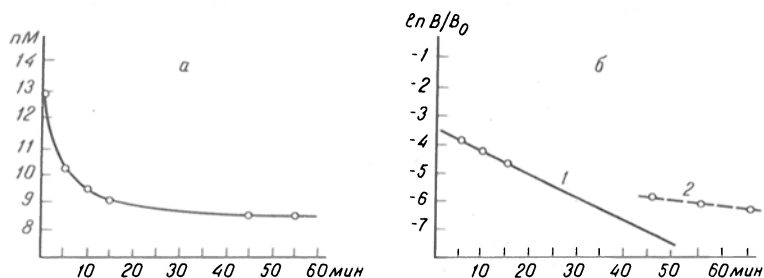
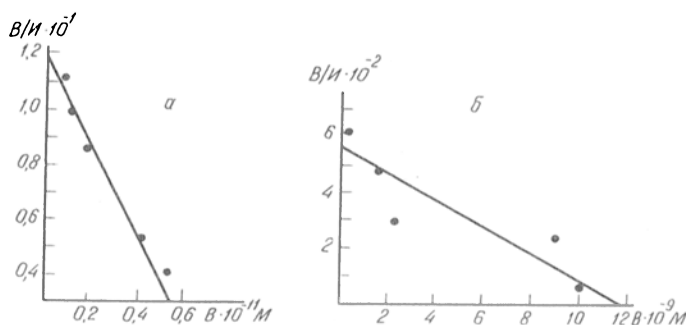


Рис. 2. Кинетика диссоциации комплекса  $[^{125}\text{I}] \text{ T}_3$  с плазматическими мембранами плаценты.

$a$  — экспериментальная кривая диссоциации при 22 °C;  $b$  — линеаризация участков кривой, соответствующих быстрой и медленной фазам диссоциации.

Рис. 3. Графический анализ по Скэтчарду специфического связывания  $T_3$  с плазматическими мембранами плаценты.

*a* — высокоаффинное связывание; *b* — низкоаффинное связывание.



Только для обратимых процессов имеет смысл рассчитывать равновесные параметры связывания. На рис. 2 показана кривая диссоциации во времени при 22 °С связанного с мембранами [ $^{125}$ I]  $T_3$ , вызванная введением в систему после достижения равновесия большого избытка ( $10^{-6}$  М)  $T_3$ . Предполагая первый порядок реакции диссоциации, имеем

$$\ln (B_t/B_{\max}) = -k_{-1}t, \quad (2)$$

где  $B_{\max}$  — исходная (равновесная) концентрация лиганда;  $B_t$  — концентрация лиганда в момент времени  $t$  процесса диссоциации. Для расчета  $k_{-1}$  строится соответствующий график (см. рис. 2). Из рис. 2 видно, что процесс диссоциации имеет явно выраженный двухфазный характер. Для быстрой фазы (0—15 мин, прямая 1 на рис. 2, б)  $k_{-1} = 2,4 \cdot 10^{-1}$  мин $^{-1}$ . На основании полученного значения  $k_{-1}$  можно вычислить время полужизни ( $t_{1/2}$ ) комплекса из уравнения 2, приняв  $B_t/B_{\max} = 0,5$ . В нашем случае  $t_{1/2} = 2,9$  мин. Соотношение  $k_1/k_{-1}$  даст значение равновесной константы диссоциации ( $K_d$ ), равное  $2,4 \cdot 10^{-11}$  М.

Необходимо отметить, что измерения кинетических параметров взаимодействия [ $^{125}$ I]  $T_3$  с мембранами в данной работе носят оценочный характер, так как точные значения соответствующих величин можно получить лишь с использованием инструментальных методов быстрой кинетики.

Исследование специфического связывания  $T_3$  с плазматическими мембранами в равновесных условиях показало, что гормон взаимодействует с двумя типами сайтов (рис. 3). Высокоаффинное связывание характеризовалось константой ассоциации ( $K_a$ ), равной  $2,0 \cdot 10^{10}$  М $^{-1}$  и концентрацией связывающих сайтов ( $B_{\max}$ ) 12,5 фмоль  $T_3$  на 1 мг мембранного белка. Следует отметить, что значения  $K_d$ , полученные кинетическим методом (с учетом быстрой фазы диссоциации) и путем измере-

ний в равновесных условиях, оказались весьма близкими ( $2,4 \cdot 10^{-11}$  и  $5,0 \cdot 10^{-11}$  М соответственно). Низкоаффинные сайты имели  $K_d = 4,8 \cdot 10^6$  М $^{-1}$  и  $B_{\max} = 36$  пмоль/мг.

Для выяснения таких характеристик связывания тиреоидных гормонов плазматическими мембранами плаценты, как селективность и стереоспецифичность, были проведены эксперименты по конкурентному ингибированию связывания [ $^{125}$ I]  $T_3$  структурными аналогами и стереоизомерами тиреоидных гормонов (рис. 4).

Тироксин ( $T_4$ ) проявлял меньшее, чем  $T_3$ , но достаточно высокое сродство к связывающим сайтам. D-изомеры тиреоидных гормонов слабо конкурировали с природными изомерами за участки связывания. Необычная форма кривых ингибирования тироуксусной и тиропропионовой кислотами может быть обусловлена тем, что эти аналоги взаимодействуют с мембранами по иному механизму, чем  $T_3$  и  $T_4$ . Утрата молекулой структурных особенностей, характерных для йодтиронинов, полностью лишает ее сродства к плазматической мембране, как это видно на примере дийодтирозина.

Таким образом, специфическое связывание тиреоидных гормонов с плазматическими мембранами щеточной окантовки синцитиотрофобласта человека *in vitro* является насыщаемым, обратимым, чувствительным к температуре процессом, который характеризуется также высокой селективностью и стереоспецифичностью в отношении химического строения и пространственной структуры связываемых соединений. Предстоит выяснить, как протекает этот процесс в условиях, более близких к физиологическим, т. е. в присутствии транспортных белков плазмы крови.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Будникова Л. П., Ермоленко М. Н., Свиридов О. В. // Рукопись деп. в ВИНТИ 24.11.86, № 7998—Б68.
2. Ермоленко М. Н., Свиридов О. В., Стрельченко О. А. // Биохимия. — 1985. — Т. 50, № 2. — С. 1997—2002.
3. Ермоленко М. Н., Карпыза Е. И., Свиридов О. В. // Пробл. эндокринолог. — 1987. — № 4. — С. 34.
4. Свиридов О. В., Ермоленко М. Н. // Изв. АН БССР. — 1987. — № 5. — С. 59—64.
5. Свиридов О. В., Киселева Э. Э., Ермоленко М. Н., Карпыза Е. И. // Докл. АН БССР. — 1989. — Т. 33, № 1. — С. 89—91.
6. Свиридов О. В., Ермоленко М. Н., Будникова Л. П., Карпыза Е. И. // Пробл. эндокринолог. — 1989.
7. Свиридов О. В., Ермоленко М. Н., Пышко Е. С. и др. // Биохимия. — 1989.
8. Транкова А. А., Вережагина Г. В. // Пробл. эндокринолог. — 1984. — № 4. — С. 76—80.
9. Alderson R., Pastan I., Cheng S.-Y. // Endocrinology. — 1985. — Vol. 116, N 6. — P. 2621—3630.
10. Eberhardt N. L., Apriletti T. W., Baxter T. D. // Biochemi-

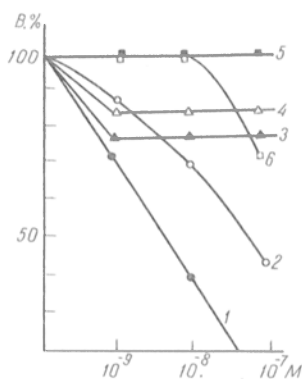


Рис. 4. Ингибирование связывания [ $^{125}$ I]  $T_3$  с плазматическими мембранами плаценты трийодтиронином и его структурными аналогами.

Уровень связывания [ $^{125}$ I]  $T_3$  в отсутствие ингибиторов принят за 100. 1 — L- $T_3$ ; 2 — L- $T_4$ ; 3 — 3,3',5'-трийодтироуксусная кислота; 4 — 3,3',5'-трийодтиропропионовая кислота; 5 — 3,5-дийод-L-тирозин; 6 — D- $T_3$ , D- $T_4$ .

cal Actions of Hormones.— New York, 1980.— P. 311—394.

11. *Ecins R.* // *Lancet*.— 1985.— Vol. 1.— P. 1129—1132.
12. *Frost A. A., Pearson R. G.* // *Kinetics and Mechanism*.— New York, 1961.— P. 77—102.
13. *Hidal I. T., Kaplan M. M.* // *J. clin. Invest.*— 1985.— Vol. 76, N 3.— P. 947—955.
14. *Haffner R. P.* // *FEBS Lett.*— 1987.— Vol. 224, N 2.— P. 251—256.
15. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* // *J. biol. Chem.*— 1951.— Vol. 193, N 1.— P. 265—275.
16. *Scatchard G.* // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*— 1949.— Vol. 51.— P. 660—664.
17. *Smith C. H., Nelson D. M., King B. F. et al.* // *Amer. J. Obstet. Gynec.*— 1977.— Vol. 128, N 1.— P. 190—196.

Поступила 17.02.89

#### SPECIFIC BINDING OF THYROID HORMONES WITH PLASMATIC MEMBRANES OF HUMAN PLACENTAL SYNCYTIOTROPHOBLAST

*E. I. Kurpyza, M. N. Ermolenko, O. V. Sviridov*

Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Minsk

Kinetic and equilibrium characteristics of the interaction of triiodothyronine ( $T_3$ ) and its structural analogues with plasmatic membranes of human placental syncytiotrophoblast were studied. The specific binding was temperature-dependent, saturable, reversible, selective and stereospecific. The following values of the binding parameters were obtained: association rate constant —  $1.0 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ , dissociation rate constant (fast phase) —  $2.4 \cdot 10^{-1} \text{ min}^{-1}$ , half-life time of the complex — 2.9 min, equilibrium association constants for high- and low-affinity sites —  $2.0 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$  and  $4.8 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ , respectively, concentrations of the corresponding sites — 12.5 fmol and 36.0 pmol per mg of membrane protein, respectively. The affinity for membranes decreased in the following order:  $L=T_3 > L=T_4 > 3,3,5\text{-triiodothyroacetic acid} > 3,3,5\text{-triiodothyropropionic acid} > D=T_3 > D=T_4 > 3,5\text{-diiodo-L-tyrosine}$ .

© Н. И. СОЛОВЬЕВА, З. И. ВОЛКОВА, 1990

УДК 616.12-002.77-074: [616.155-008.931:577.152.34]

*Н. И. Соловьева, З. И. Волкова*

#### ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК КРОВИ ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР;  
Институт ревматологии АМН СССР

Ревматоидный артрит (РА) относится к системным заболеваниям соединительной ткани, при котором происходит нарушение метаболизма всех основных компонентов соединительнотканного матрикса — коллагена, протеогликанов и гликопротеинов. Необратимые деструктивные процессы, происходящие в суставном хряще при РА, осуществляются гидролитическими ферментами и в первую очередь протеиназами, которые освобождаются из различных клеток, находящихся в воспаленном суставе. Состав клеток в зоне эрозии суставного хряща варьирует, в ней обнаруживаются нейтрофилы, макрофаги, плазматические и тучные клетки, фибробласты. Все эти клетки содержат целый набор протеолитических ферментов [2—4, 7, 14]. Клетки синовиума и суставного хряща также продуцируют различные протеиназы [13]. Внимание многих исследователей обращено на изучение роли протеиназ при РА [2, 8, 12]. Однако основные работы в этом плане про-

ведены на синовиальной жидкости и сыворотке крови [6, 12, 14] и чаще всего связаны с исследованием отдельных тканевых протеиназ. Одним из основных источников протеолитических ферментов крови, особенно при развитии воспалительных и деструктивных процессов, являются нейтрофилы (Нф), мононуклеарные клетки (МН) и тромбоциты (Т). Особый интерес при развитии РА представляет исследование коллагенолитической активности, так как 90 % белков хряща составляют коллаген.

Задачей настоящего исследования было изучение протеолитической (коллагенолитической и казеинолитической) активности при РА в Нф, МН и Т в зависимости от особенностей течения патологического процесса и продолжительности заболевания до и после лечения.

**Методика.** В качестве объекта исследований использовали Нф, МН и Т здоровых и больных РА лиц. Клетки крови получали из венозной крови; в качестве антикоагулянта использовали ЭДТА. Разделение клеток проводили в градиенте плотности фикола — верографина [1]. Клетки разрушали многократным замораживанием и оттаиванием (5—7 раз) в физиологическом растворе, содержащем 0,1 % тритон X-100. Лизаты клеток центрифугировали при 6000 об/мин в течение 30 мин при 4 °С. В супернатантах определяли концентрацию белка по Лоури и коллагенолитическую и казеинолитическую активность при нейтральном значении pH. Для определения казеинолитической активности в качестве субстрата использовали  $^{14}\text{C}$ -ацетилированный казеин [11] с удельной радиоактивностью  $2 \cdot 3 \cdot 10^6$  имп/мин/мг. Пробы, содержащие 20 мкл 1 %  $^{14}\text{C}$ -ацетилированного казеина и 0,1 или 0,2 мл лизата клеток в 0,05 М фосфатном буфере, pH 7,8, инкубировали в течение 1 ч при 37 °С. Лизаты Т инкубировали в течение 3 часов. Реакцию останавливали добавлением 10 % трихлоруксусной кислоты (ТХУ), после чего пробы центрифугировали и в надосадочной жидкости определяли радиоактивность.

Для определения коллагенолитической активности в качестве субстрата использовали ацетилированный  $^{14}\text{C}$ -уксусным ангидридом коллаген I типа из кожи крыс [10]. Удельная радиоактивность полученных препаратов составляла  $1,5 \cdot 2 \cdot 10^6$  имп/мин/мг. Пробы объемом 50 мкл, содержащие 50 мкг (20—30 000 имп/мин) 0,1 %  $^{14}\text{C}$ -коллагена в 0,05 М трис-HCl-буфере pH 7,5, в присутствии 0,2 М NaCl и 0,005 М  $\text{CaCl}_2$ , инкубировали 2 ч при 37 °С до формирования пленок, представляющих собой реконструированные фибриллы коллагена. Пленки промывали дистиллированной водой и затем на них наносили лизаты клеток по 0,1 и 0,2 мл. Инкубацию проводили в течение 3 ч при 37 °С, пробы охлаждали в ледяной бане, центрифугировали и в надосадочной жидкости определяли радиоактивность.

Протеолитическую активность выражали в микрограммах  $^{14}\text{C}$ -коллагена или  $^{14}\text{C}$ -казеина, гидролизированных за 1 ч в пересчете на  $10^6$  клеток и на 1 мг белка лизата клеток. В качестве ингибиторов протеолитической активности были использованы ЭДТА, ДФФ (диэтилопропилфторфосфат), ПХМБ (*n*-хлормеркурибензоат) — специфические ингибиторы трех основных классов нейтральных протеиназ («Serva», ФРГ) — металлозависимых, сериновых и тимолиновых протеолитических ферментов соответственно. Некоторые из этих реагентов, например ЭДТА, могут быть ингибиторами по отношению к металлозависимым протеиназам и активаторами по отношению к тимолиновым протеиназам.

Было обследовано 5 практически здоровых лиц и 18 с достоверным РА в возрасте от 18 до 60 лет. Из них 11 лиц были с суставной формой заболевания и 7 — с системными проявлениями; у 4 была I степень активности патологического процесса, у 6 — II, у 8 — III. Медленно прогрессирующее течение болезни наблюдалось у 9, быстро прогрессирующее — у 9; I—II стадия процесса рентгенологически диагностирована у 4 больных и III—IV — у 14. Больные РА были с давностью заболевания от нескольких месяцев до 20 лет.

**Результаты и обсуждение.** Результаты исследований коллагенолитической и казеинолитической активности в лизатах клеток крови при РА представлены в табл. 1 и 2. Установлено, что

Казеинолитическая активность в клетках крови в норме и при различных вариантах течения ревматоидного артрита

Т а б л и ц а 1

Показатель	Нейтрофилы			Мононуклеарные клетки			Тромбоциты
	белок, мкг на $10^6$ клеток	А	Б	белок, мкг на $10^6$ клеток	А	Б	А
Доноры (5)	102,0±17,0	356,0±45,3	34,5±3,5	154,0±16,5	61,0±6,9	9,3±1,1	31,7±6,2
Больные РА	67,3±9,8	788,5±117,4	55,7±7,6 (18)	101,0±13,6	212,2±41,7*	20,4±4,3* (18)	27,2±11,6 (16)
Форма заболевания:							
суставная	66,8±14,4	798,9±161,1	57,4±9,6 (11)	97,6±15,5	254,9±56,3	24,1±6,1 (12)	26,6±7,6 (9)
с системными проявлениями	68,3±12,0	772,1±179,1	53,1±13,0 (7)	116,4±25,4	127,0±39,7	12,9±3,6 (6)	27,9±9,1 (7)
Прогрессирование болезни:							
быстрое	65,2±9,8	798,0±141,4*	61,6±13,5 (9)	103,6±10,2	224,3±81,2	25,0±9,0 (8)	29,3±3,9 (7)
медленное	69,7±17,8	779,1±199,1	49,4±11,9 (9)	94,1±9,2	202,6±43,1*	16,7±3,4 (10)	25,5±7,0 (9)
Степень активности процесса:							
I	88,4±31,0	774,5±200,1	58,1±11,6 (4)	96,0±15,4	343,0±95,5*	32,5±10,8* (5)	24,4±16,0 (3)
II	68,5±31,1	741,0±221,0	48,1±15,5 (6)	112,0±20,4	181,7±84,2	18,4±8,2 (6)	26,4±10,2 (6)
III	56,0±11,3	868,6±200,5	60,3±12,4 (8)	86,5±11,0	179,6±88,6	21,1±9,8 (7)	29,1±8,5 (7)
Стадия заболевания:							
I—II	76,6±21,8	775,7±186,0	55,3±13,2 (4)	96,3±15,3	313,1±100,4*	27,5±10,9 (5)	27,0±12,1 (4)
III—IV	64,8±11,1	792,0±145,0	55,8±9,2* (14)	112,9±18,0	173,4±39,9*	17,7±4,3 (13)	27,2±6,6 (12)
Продолжительность болезни (годы):							
до 5	92,1±28,7	540,0±168,2	54,6±11,4 (5)	73,0±17,0*	241,4±102,0	21,0±10,0 (6)	29,2±15,2 (4)
от 6 до 10	61,5±10,4	1012,9±185,9*	65,0±10,5* (8)	108,7±11,0	210,6±37,1*	18,5±4,6 (7)	30,3±8,5 (8)
свыше 10	52,2±8,4*	677,8±224,7	42,0±18,7 (5)	113,3±11,0	179,6±88,6	21,1±9,8 (5)	19,0±7,1 (4)

Примечание. Здесь и в табл. 2: А — активность  $^{14}\text{C}$ -казеина на 1 мг белка клеток, мкг; Б — активность  $^{14}\text{C}$ -казеина на  $10^6$  клеток, мкг. Одна звездочка — достоверность по отношению к норме, две — достоверность между группами. В скобках — число обследованных.

Коллагенолитическая активность в клетках крови в норме и при различных вариантах течения ревматоидного артрита

Т а б л и ц а 2

Показатель	Нейтрофилы			Мононуклеарные клетки			Тромбоциты
	белок, мкг на $10^6$ клеток	А	Б	белок, мкг на $10^6$ клеток	А	Б	А
Доноры (5)	102,6±17,0	86,3±13,3	8,1±0,6	154,0±16,5	63,4±8,8	9,7±1,6	30,9±9,5
Больные РА	76,8±10,8	120,7±15,9	9,2±1,3 (15)	116,5±15,6	84,6±26,3	9,8±2,6 (15)	20,6±4,0 (13)
Форма заболевания:							
суставная	84,6±18,6	117,8±24,7	9,5±1,9 (8)	116,7±17,9	97,2±13,3	11,7±4,6 (9)	19,4±4,8 (7)
с системными проявлениями	67,9±11,3	124,1±21,5	8,4±2,2 (7)	115,7±30,6	65,9±27,4	6,9±3,5 (6)	22,1±7,4 (6)
Прогрессирование болезни:							
быстрое	81,7±7,0	173,4±27,8*	13,8±2,4* (5)	126,1±28,7	106,2±41,7	12,3±4,8 (6)	27,0±7,4 (4)
медленное	74,4±15,9	94,4±13,2**	6,9±1,0** (10)	109,8±18,8	53,9±18,2	6,7±2,4 (4)	17,8±4,9 (9)
Степень активности процесса:							
I	93,5±29,4	152,3±42,5	11,9±2,9 (4)	129,0±9,7	143,6±62,3	18,5±6,3 (4)	25,9±10,9 (3)
II	77,3±16,0	71,9±4,1**	5,8±1,2 (6)	108,3±24,1	48,9±19,6	5,4±2,3 (6)	16,3±4,7 (6)
III	62,8±16,4	154,2±15,9*	11,3±2,2 (5)	115,7±39,3	80,4±28,7	8,1±4,0 (5)	23,9±9,2 (4)
Стадия заболевания:							
I—II	80,5±20,4	151,5±42,6	11,0±3,2 (4)	124,9±12,9	116,9±61,2	16,8±7,7 (4)	13,0±3,2 (4)
III—IV	75,4±13,3	109,5±15,2	8,6±1,4 (11)	113,2±20,5	72,9±19,9	8,7±2,5 (11)	24,0±5,4 (9)
Продолжительность болезни (годы):							
до 5	131,3±29,1	121,5±66,2	12,5±3,8 (3)	121,3±4,4	131,4±84,1	17,0±8,6 (3)	18,6±2,9 (2)
от 6 до 10	63,9±10,1	123,9±23,2	9,8±1,7 (8)	116,3±30,0	92,9±26,3	9,9±3,7 (7)	27,7±6,2** (7)
свыше 10	61,8±16,8	86,3±16,8	5,6±1,7 (4)	113,3±25,7	45,0±22,3	5,3±2,7 (5)	9,3±3,0* (4)

удельная казеинолитическая активность при РА по группе больных в целом увеличена в Нф и МН в 2,2 и 3,2 раза соответственно по сравнению с нормой. Активность на  $10^6$  клеток увеличивалась в меньшей степени: в 1,5 и 2,2 раза соответственно в Нф и МН. В Т казеинолитическая активность оставалась в пределах нормы. Коллагенолитическая активность во всех исследуемых клетках изменялась в меньшей степени, чем казеинолитическая: удельная коллагенолитическая активность в Нф и МН была увеличена в 1,4 раза, активность на  $10^6$  клеток оставалась в пределах нормы, а в Т была снижена на 40 %. Концентрация белка в Нф и МН при РА была снижена в 1,5 раза по сравнению с нормой.

При суставной форме РА протеолитическая активность в Нф и МН была несколько выше, чем у больных РА с системными проявлениями (см. табл. 1 и 2). Если казеинолитическая и коллагенолитическая активности в нейтрофилах существенно не различались в зависимости от формы РА, то в МН обе активности были значительно (в 1,5—2 раза) выше при суставном РА, чем при РА с системными проявлениями. Следует подчеркнуть, что коллагенолитическая активность в клетках у больных РА с системными проявлениями находилась в пределах нормы или была ниже ее. Существенных различий в количестве белка в Нф и МН при этом обнаружено не было. В тромбоцитах казеинолитическая активность была в пределах нормы как при суставном, так и при системных проявлениях РА, а коллагенолитическая активность — ниже нормы на 30 %. Протеолитическая активность в Нф и МН коррелировала с остротой патологического процесса. Особенно четко это было выражено в МН в отношении коллагенолитической активности. Существенные различия в протеолитической и особенно в коллагенолитической активности были получены в зависимости от течения заболевания (см. табл. 1, 2). При медленно прогрессирующем течении РА коллагенолитическая активность в Нф и МН находилась в пределах нормы или была ниже ее, а при быстро прогрессирующем течении она была в 1,5—2 раза выше нормы. Концентрация белка при этом существенно не изменялась. В Т протеолитическая активность находилась в пределах нормы или была ниже ее. Полученные данные свидетельствуют о том, что уровень протеолитической активности в Нф и МН отражал интенсивность деструктивных процессов, которые наиболее выражены при быстро прогрессирующем течении РА.

Изучение коллагенолитической и казеинолитической активности в зависимости от степени активности патологического процесса показало, что в исследуемых клетках протеолитическая активность при этом изменяется по-разному. В Нф при I и III степени РА казеинолитическая и коллагенолитическая активности были близки соответственно по значениям и существенно (в 1,5—2 раза) выше нормы. При II степени РА протеолитическая активность была ниже, чем при I и III степени, причем коллагенолитическая активность — существенно ниже нормы (см. табл. 1, 2). Количество белка в Нф значительно снижалось от I к III степени РА. В МН коллагенолитическая и казеинолитическая активности при I степени РА были в 2—5 раз выше нормы и существенно

Таблица 3

Влияние лечения на протеолитическую активность в клетках крови больных ревматоидным артритом

Обследованные	Субстрат	Нейтрофилы		Мононуклеарные клетки			Тромбоциты	
		белок, мкг на $10^6$ клеток	А	Б	белок, мкг на $10^6$ клеток	А	Б	А
Доноры (5)	Казеин Коллаген	$102,6 \pm 17,0$	$356,0 \pm 45,3$	$34,5 \pm 3,5$	$154,0 \pm 16,5$	$61,0 \pm 6,9$	$9,3 \pm 1,1$	$31,7 \pm 6,2$
Больные РА: до лечения (5) после лечения	Казеин		$86,3 \pm 13,3$	$8,1 \pm 0,6$		$63,4 \pm 8,8$	$9,7 \pm 1,5$	$30,9 \pm 9,5$
	Коллаген	$70,8 \pm 10,9$	$943,0 \pm 145,0^*$	$62,1 \pm 7,1^{***}$	$138,3 \pm 32,2$	$336,3 \pm 76,9^*$	$28,4 \pm 12,5$	$19,5 \pm 9,3$
	Казеин	$55,2 \pm 5,6^*$	$191,1 \pm 21,3^{***}$	$13,5 \pm 2,4^{***}$		$135,1 \pm 24,4^{**}$	$16,5 \pm 5,3$	$47,5 \pm 13,4$
	Коллаген		$743,8 \pm 114,2^*$	$41,7 \pm 7,6^*$	$132,8 \pm 14,3$	$159,5 \pm 83,0$	$19,3 \pm 9,3$	$64,5 \pm 28,4$
			$100,8 \pm 17,5^{**}$	$5,1 \pm 1,0^{***}$		$58,1 \pm 23,6^*$	$8,0 \pm 4,9$	$42,2 \pm 14,4$
		(5)	(5)	(5)	(4)	(4)	(4)	(5)

Примечание. А — активность  $^{14}\text{C}$ -казеина (коллагена) на 1 мг белка, присутствующего в клетках крови, мкг; Б — активность  $^{14}\text{C}$ -казеина (коллагена) на  $10^6$  клеток, мкг. Одна звездочка — достоверность по отношению к норме, две — достоверность между группами. В скобках — число обследованных.

Действие ЭДТА, ДФФ и ПХМБ на протеолитическую активность клеток крови при ревматоидном артрите

Субстрат	Ингибитор	Активность, % к исходной					
		нейтрофилы		мононуклеарные клетки		тромбоциты	
		С	Д	С	Д	С	Д
Казеин	ЭДТА	87,2±5,2 (2)	122,0±9,4 (9)	88,0 (1)	157,1±15,3 (12)	Не обнаружено	218,6±21,8 (11)
	ДФФ	72,9±6,3 (7)	127,7±12,7 (6)	60,5±5,1 (7)	107,5±1,8 (4)	42,7±8,8 (7)	125,0±25,0 (2)
	ПХМБ	85,3±4,7 (6)	176,2±39,6 (4)	57,7±8,0 (9)	204,0±66,9 (4)	24,3±5,2 (7)	252,3±114,9 (3)
Коллаген	ЭДТА	52,9±11,2 (11)	231,0±59,8 (4)	46,7±14,3 (7)	179,3±41,9 (4)	78,0 (1)	155,9±32,5 (6)

Примечание. С — ингибирование, Д — активация. В скобках — число обследованных.

снижались при II и III степени патологического процесса. Количество белка в МН при этом было снижено незначительно. В Т протеолитическая активность существенно не изменялась в зависимости от активности РА и была несколько ниже нормы. Нф и МН являются основными источниками протеолитических ферментов при воспалительных процессах и характеризуют универсальный механизм активации протеиназ при воспалении [2, 4], что имеет место и при развитии РА.

Полученные данные свидетельствуют о том, что протеолитическая активность в Нф, МН и Т не коррелировала со степенью активности РА, а также с такими показателями воспаления, как  $\alpha_2$ - и  $\gamma$ -глобулиновые фракции, скорость оседания эритроцитов (СОЭ), фибриноген, серомукоид, церулоплазмин. Снижение протеолитической и, особенно, коллагенолитической активности по мере развития активности патологического процесса можно объяснить выходом ферментов из клеток в плазму. Это подтверждается данными по протеолитической активности, полученными на сыворотке крови [6] и согласуется с нашими результатами по снижению содержания белка в Нф и МН от I к III степени РА.

Анализ данных по протеолитической активности в зависимости от стадии заболевания показал, что коллагенолитическая активность в Нф и МН резко снижалась от I—II к III—IV стадии, а в Т несколько увеличивалась, оставаясь значительно ниже нормы. Казеинолитическая активность в МН снижалась в том же направлении, а в Нф и Т оставалась на одном уровне. Эти данные свидетельствуют о том, что коллагенолитическая активность в Нф и МН коррелировала с интенсивностью деструктивных процессов, которые наиболее выражены при II стадии заболевания, в то время как при III—IV стадии, как правило, уже развиваются процессы фиброза и склероза.

Протеолитическая активность и концентрация белков в исследуемых клетках крови снижались в зависимости от продолжительности заболевания. Коллагенолитическая активность у больных с длительностью заболевания свыше 10 лет снижалась во всех клетках до значений, которые были значительно ниже нормы, а казеинолитическая активность также снижалась, но оставалась при этом в Нф и МН значительно выше нормы.

Проведенная терапия, включающая противовоспалительные нестероидные препараты, стероидные гормоны, введенные внутрисуставно, физиотера-

певтические мероприятия, приводящие к улучшению состояния больных, оказывали влияние на протеолитическую активность (табл. 3). Под влиянием лечения в исследуемых клетках крови происходило снижение протеолитической активности, однако казеинолитическая активность оставалась во всех клетках значительно выше нормы, а коллагенолитическая активность в Нф и МН снижалась до значений, которые были ниже нормы. Исключение составляли Т, где коллагенолитическая активность оставалась выше нормы.

Исследование действия ингибиторов ЭДТА, ДФФ, ПХМБ на казеинолитическую активность подтвердило, что в лизатах исследуемых клеток крови при РА присутствуют все основные типы нейтральных протеиназ [4, 5], и показало некоторые отличия в наборе ферментов в различных клетках (табл. 4).

Ингибирование ЭДТА коллагенолитической активности свидетельствует о том, что в Нф и МН при РА в значительных количествах содержатся металлозависимые коллагенолитические ферменты, к которым, в частности, относится коллагеназа, что подтверждает имеющиеся в литературе данные [2, 4, 5, 12, 14]. Кроме того, в присутствии ЭДТА во всех исследуемых клетках во многих случаях наблюдали значительное увеличение протеолитической активности, что свидетельствует о присутствии в этих клетках тиоловых и металлозависимых тиоловых протеиназ. Причина увеличения в ряде случаев протеолитической активности под действием ДФФ и ПХМБ не ясна. Можно предположить, что это связано с разрушением, например, фермент-ингибиторных комплексов соответствующих протеиназ. Нельзя также исключить присутствия каких-то примесей в препаратах самих ингибиторов, которые могут оказывать некоторое активирующее действие на соответствующие ферменты.

Представленные данные свидетельствуют о том, что протеиназы являются важными факторами патогенеза при РА. Особенно четкая корреляция патологического процесса с протеолизом была получена при исследовании коллагенолитической активности, которая несомненно связана с деструктивными процессами. При суставной форме заболевания, быстро прогрессирующем течении РА, а также у больных на I—II стадии заболевания, где процессы деструкции более выражены, казеинолитическая и особенно коллагенолитическая активность была значительно выше нормы как в Нф, так и в МН. В то же время, при си-



стемном проявлении РА, медленно прогрессирующим течением патологического процесса, а также на III—IV стадии РА и у больных с длительностью заболевания свыше 10 лет, у которых процессы деструкции выражены в меньшей степени, коллагенолитическая активность была в норме или ниже ее. Эти данные, а также результаты по ингибиторному анализу протеиназ указывают на то, что в развитии процессов деструкции и воспаления при РА принимают участие разные типы протеолитических ферментов. Однако в настоящее время с целью повышения защитного потенциала организма при воспалительных заболеваниях в качестве лечебных средств применяются ингибиторы только сериновых протеиназ — трасилол, контрикал, гордокс, в то время как необходимо комплексное использование ингибиторов различных типов протеолитических ферментов при лечении.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Астахова Т. А., Волкова З. И., Трофимов Т. М. и др. // Тер. арх. — 1987. — № 4. — С. 62—67.
2. Веремеенко К. Н., Голобородько О. П., Қизим А. И. Протеолиз в норме и при патологии. — Киев, 1988.
3. Локишина Л. А., Соловьева Н. И., Орехович В. Н. // Вопр. мед. химии. — 1987. — № 5. — С. 38—43.
4. Маянский А. Н., Маянский Д. Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. — Новосибирск, 1983.
5. Оглоблина О. Г. // Вопр. мед. химии. — 1988. — № 5. — С. 2—9.
6. Руденко В. Г. // Тер. арх. — 1987. — № 4. — С. 70—72.
7. Bromley M., Wooley D. E. // Arthr. a. Rheum. — 1984. — Vol. 19, N 27. — P. 853—857.
8. Etherington D. J. // Protein Degradation in Health and Disease / Eds D. Evered, J. Whelen. — Amsterdam, 1980. — P. 87—103.
9. Fritz H., Schiessler H., Geiger R. // Agents a. Actions. — 1978. — Vol. 8. — P. 57—64.
10. Harris E. D., Vater C. A. // Meth. Enzymol. — 1982. — Vol. 82. — P. 423—452.
11. Hatcher V. B., Vertheim M. S., Rhee C. Y. et al. // Biochim. biophys. Acta. — 1976. — Vol. 451. — P. 499—510.
12. Mullins D. E., Rohrlach S. T. // Ibid. — 1983. — Vol. 695. — P. 177—214.
13. Murphy G., Mc Guire M. B., Russell R. G. G. et al. // Clin. Sci. — 1981. — Vol. 61. — P. 711—716.
14. Wooley D. E., Yoffe J. R., Evanson J. M. // Proteinases in Inflammation and Tumor Invasion. — Berlin, 1986. — P. 61—76.

Поступила 17.02.89

#### CELLULAR PROTEOLYTIC ACTIVITY IN RHEUMATOID ARTHRITIS

N. I. Solov'eva, Z. I. Volkova

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

Collagenolytic and neutral caseinolytic activities were studied in lysates of neutrophils, mononuclear cells and thrombocytes of patients with rheumatoid arthritis, considering the steps and duration of the disease, before and after medical treatment. 5 healthy persons and 18 patients with rheumatoid arthritis were investigated. Specific caseinolytic activity (per 1 mg of protein) was increased in the patients neutrophils and monocytes 2.2- and 3.2-fold, respectively, while the activity per  $10^6$  cells was increased 1.5- and 2.2-fold, respectively. Specific collagenolytic activity was increased 1.4-fold in neutrophils and monocytes, whereas the activity per  $10^6$  neutrophils was increased by 20 % and per  $10^6$  monocytes — near normal values. In thrombocytes collagenolytic activity was decreased by 40 % and caseinolytic activity was similar to controls. Concentration of protein was decreased 1.5-fold in neutrophils and monocytes of the patients as compared with healthy persons. Proteinases are of importance in pathogenesis of rheumatoid arthritis and collagenolytic

activity correlated most distinctly with development of the disease. After medical treatment collagenolytic activity was normalized in the patients cells studied, while caseinolytic activity was markedly decreased but remained above control values. Experiments with proteinase inhibitors enabled to detect major types of neutral proteinases in blood cells of patients with rheumatoid arthritis and to find some differences in the enzyme patterns in various blood cell populations.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.381-002.1-092.9-074:[616.36-008.931:577.15]

З. З. Хакимов, А. Х. Аширметов, М. Э. Краковский, Л. В. Печникова

#### СОСТОЯНИЕ МИКРОСОМАЛЬНОЙ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ОСТРОМ КАЛОВОМ ПЕРИТОНИТЕ

ЦИИЛ Ташкентского медицинского института

Острый перитонит является грозным осложнением различных заболеваний органов брюшной полости и, несмотря на достигнутые успехи в его лечении, все еще сопровождается высокой летальностью [5, 6]. Характерными симптомами этого заболевания служат выраженная интоксикация организма, а также изменение всех видов обмена, приводящее в итоге к нарушению функций его жизненно важных органов [6, 9]. Степень интоксикации при перитоните, а следовательно, и течение заболевания, вероятно, зависят как от площади поражения брюшины, так и от интенсивности детоксикационных процессов, протекающих в основном в печени при участии микросомальных ферментов гепатоцитов. Однако в литературе практически нет работ, посвященных изучению активности ферментов микросомальной системы печени при остром перитоните, что и послужило основанием для проведения настоящего исследования.

Методика. Опыты проводили на 72 белых крысах-самцах (смешанной популяции) массой 180—220 г, содержащихся в виварии на обычном лабораторном рационе. Острый разлитой перитонит вызывали путем внутрибрюшинного введения крысам 2 % взвеси аутокала в дозе 350 мг/кг. Через 24, 48 и 72 ч после воспроизведения перитонита животных забивали декапитацией в холодной комнате. Методом дифференциального центрифугирования на центрифуге VAC-601 выделяли микросомальную фракцию печени, в которой определяли содержание микросомального белка [13], цитохромов P-450 и  $b_5$  [14], активность N-деметилазы амидопирина [7] и гидроксилазы анилина [2]. Рассчитывали каталитическую активность цитохрома P-450 по отношению к субстратам I и II типа. В ткани печени определяли содержание гликогена [15], молочной [11] и пировиноградной [3] кислот. Результаты экспериментов обрабатывали методом вариационной статистики на микрокалькуляторе МК-52 по программе [10].

Результаты и обсуждение. Через 24 ч после воспроизведения острого калового перитонита у животных наблюдалось снижение содержания цитохромов P-450 и  $b_5$  на 58,2 и 46,3 %. Активность N-деметилазы амидопирина и гидроксилазы анилина уменьшалась на 21,2 и 48 % соответственно. Через 48 ч наблюдалось еще более существенное снижение содержания цитохромов и активности ферментов (на 79,7, 48,8, 48, 41 % соответственно; табл. 1). В последующий срок наблюдения (через 72 ч) выявлено некоторое повышение содержания цитохромов P-450 и  $b_5$ ,

## Активность микросомальных ферментов и содержание цитохромов в печени крыс с острым каловым перитонитом

Срок перитонита, ч	Содержание цитохромов, нмоль на 1 мг белка		N-деметилаза амидопирина, нмоль НСОН/мг·мин	Анилингидроксилаза, нмоль p-аминофенола/мг·мин	Каталитическая активность цитохрома P-450 по отношению	
	P-450	b <sub>5</sub>			к амидопирину, нмоль НСОН/нмоль цитохрома P-450·мин	к анилину, нмоль p-аминофенола/нмоль цитохрома b <sub>5</sub> ·мин
Контроль	0,793±0,041	0,408±0,014	0,835±0,045	1,014±0,067	6,801±0,63	1,40±0,13
24	0,332±0,019	0,219±0,09	0,658±0,011	0,529±0,05	14,1±0,60	1,65±0,23
p	<0,001	<0,001	<0,01	<0,002	<0,001	>0,05
48	0,163±0,049	0,213±0,045	0,434±0,026	0,591±0,065	41,1±12,7	5,48±1,58
p	<0,001	<0,01	<0,001	<0,002	<0,05	<0,05
72	0,343±0,044	0,273±0,014	0,482±0,046	0,771±0,056	11,4±1,4	2,68±0,46
p	<0,001	<0,001	<0,002	<0,05	<0,05	>0,05

активности N-деметилазы амидопирина и гидроксилазы анилина на 59,4, 33,1, 42,3, 23 % относительно аналогичных показателей через 48 ч калового перитонита.

Следовательно, при остром перитоните у крыс наблюдается угнетение активности монооксигеназной ферментной системы печени, наиболее выраженное через 2 сут после его воспроизведения. Во все сроки острого калового перитонита происходит существенное повышение каталитической активности цитохрома P-450 по отношению к амидопирину (на 107, 503, 69 % соответственно; см. табл. 1). Каталитическая активность этого гемопротеида в отношении анилина увеличилась менее значительно и лишь через 48 и 72 ч после его воспроизведения статистически значимо превышала уровень контроля (на 291 и 91,4 % соответственно).

Обращает на себя внимание то обстоятельство, что при остром каловом перитоните активность N-деметилазы амидопирина и гидроксилазы анилина уменьшается почти в равной степени. Полагают [4], что субстраты I типа, к которым относятся амидопирин, окисляются низкоспиновой изоформой цитохрома P-450, локализованной в основном на наружной поверхности липопротеидной мембраны, тогда как субстраты II типа, представителем которых является анилин, окисляются высокоспиновой изоформой гемопротеида — цитохромом P-448, глубже погруженным в липопротеидную мембрану ближе к ее внутренней поверхности. Поэтому при воздействии на организм различных альтерирующих агентов чаще повреждается низкоспиновая подфракция цитохрома P-450 [12]. В то же время высокоспиновая форма цитохрома очень чувствительна к действию фосфолипаз, которые образуются в организме при воздействии на него микробных эндотоксинов. Не

исключено также непосредственное влияние на цитохром P-450 самих эндотоксинов бактерий, поскольку в ряде исследований обнаружено снижение содержания этого гемопротеида при введении животным эндотоксина E. coli [16, 17].

В нарушении активности микросомальных ферментов при перитоните значительную роль может играть развивающаяся в печени гипоксия, поскольку известно, что в этих условиях также повышается активность фосфолипаз [1, 8]. Для оценки степени гипоксии в печени нами проведены исследования у животных с острым перитонитом содержания молочной и пировиноградной кислот, а также гликогена (табл. 2). При этом выявлено существенное увеличение содержания молочной и пировиноградной кислот, а также коэффициента лактат/пируват на фоне резкого уменьшения количества гликогена в гепатоцитах, свидетельствующего о развитии гипоксического состояния в печени. Поскольку в условиях гипоксии, а также при поступлении из брюшной полости вследствие нарушения барьерной функции брюшины при остром перитоните большого количества микробных токсинов активизируются фосфолипазы, становится понятным существенное повреждение как низкоспиновой, так и высокоспиновой изоформ цитохрома P-450, обнаруженное в наших опытах.

Увеличение при перитоните каталитической активности цитохрома P-450 по отношению к субстратам I и II типа указывает на включение механизмов компенсации, направленных на повышение эффективности работы микросомальной окислительной системы печени, даже в самых неблагоприятных для организма условиях. Вероятно, именно этим, а также активацией генетического аппарата гепатоцитов, приводящей к синтезу ферментного белка de novo, объясняется некоторое увеличение содержания цитохромов

Таблица 2

## Содержание гликогена, молочной и пировиноградной кислот в печени крыс с острым каловым перитонитом

Срок перитонита, ч	Гликоген, г %	Молочная кислота, ммоль на 1 г ткани	Пировиноградная кислота, ммоль на 1 г ткани	Отношение молочной кислоты/пировиноградная кислота
Контроль	4,16±0,55	2,49±0,21	0,187±0,21	13,3±1,06
24	1,92±0,28	4,27±0,32	0,214±0,036	19,9±1,84
p	<0,001	<0,05	>0,05	<0,05
48	1,06±0,21	6,33±0,57	0,202±0,041	31,3±3,01
p	<0,001	<0,001	>0,05	<0,01
72	0,74±0,20	7,04±0,68	0,195±0,031	35,9±3,21
p	<0,001	<0,001	>0,05	<0,001

P-450 и b<sub>5</sub>, а также активности маркерных ферментов микросом, наблюдаемое через 72 ч после воспроизведения калового перитонита.

Таким образом, при остром каловом перитоните отмечается выраженное угнетение активности ферментов микросомальной окислительной системы печени, наиболее выраженное через 48 ч после его возникновения, в основе которого лежит, вероятно, инактивация цитохрома P-450 эндотоксинами микробного происхождения и образующимися при гипоксии и эндотоксинемии фосфолипазами.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Алеченко А. В., Андреева Л. Б., Слесарева Л. Ф., Биленко М. В. // Структура, биосинтез и превращение липидов в организме человека и животного.— Л., 1978.— С. 19.
2. Арчаков А. И., Карузина Н. И., Тверитиков В. И. и др. // Биохимия.— 1975.— Т. 40, № 1.— С. 32—39.
3. Бабаскин П. М. // Лаб. дело.— 1976.— № 8.— С. 497.
4. Ляхович В. В., Цирлов И. Б. Индукция ферментов метаболизма ксенобиотиков.— Новосибирск, 1981.
5. Маломан Б. И. Диагностика и лечение острого разлитого перитонита.— Кишинев, 1985.
6. Попов В. А. Перитонит.— Л., 1985.
7. Попов П. // Экспер. мед. морфол.— 1973.— Т. 12, № 3.— С. 130—135.
8. Сейфулла Р. Д., Онищенко П. А., Артамонова С. Д. и др. // Фармакол. и токсикол.— 1979.— № 2.— С. 157—162.
9. Шелестюк П. И. Острый перитонит.— Саранск, 1984.
10. Юрах Е. М., Зозуля В. И., Пицык Р. Л., Герзанич И. И. // Врач. дело.— 1985.— № 11.— С. 114—117.
11. Barker S. B., Summerson W. H. // J. biol. Chem.— 1941.— Vol. 138.— P. 535—554.
12. Lang M., Laitinen M., Hietanen E., Vainio H. // Acta pharmacol. (Kbh.).— 1976.— Vol. 39.— P. 273—288.
13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem.— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
14. Omura T., Sato R. // Ibid.— 1964.— Vol. 230.— P. 2370—2378.
15. Seifter S., Dayton S., Novie B. et al. // Arch. Biochem.— 1950.— Vol. 25.— P. 191—200.
16. Sonowane B. R., Iaffe S. I. // Pediat. Res.— 1980.— Vol. 14.— P. 939—942.
17. Williams I. F., Lowitt S., Szentivanyi A. // Immunopharmacology.— 1980.— Vol. 2.— P. 285—291.

Поступила 09.01.89

#### THE MICROSOMAL OXIDATIVE SYSTEM OF RAT LIVER TISSUE IN ACUTE FECAL PERITONITIS

Z. Z. Khakimov, A. Kh. Ashirmetov, M. E. Krakovsky, L. V. Pechnikova

Central Research Laboratory, Medical School, Tashkent.

Content and activity of cytochrome P-450, activity of main microsomal enzymes as well as content of glycogen, lactic and pyruvic acids were studied in liver tissue of rats within 24, 48 and 72 hrs after simulation of acute fecal peritonitis. Inhibition of the enzymatic activity of microsomal oxidative system correlated with hypoxia which developed in liver tissue within all the periods of acute fecal peritonitis studied. At the same time, catalytic activity of cytochrome P-450 was increased towards substrates of the I and II types. Endotoxemia and hypoxia of liver tissue, resulting in activation of phospholipases, appear to be mainly responsible for inhibition of microsomal enzymes activity in liver tissue under conditions of acute peritonitis.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 615.217.24.015.4: [616.127-008.931:577.175.34].076.9

Р. Г. Карапетян, Т. Н. Акопян, А. И. Оганисян, С. С. Оганесян

#### ВЛИЯНИЕ КАРДИОАКТИВНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ КРЫС

НИИ кардиологии Минздрава Армянской ССР и Институт экспериментальной биологии АН Армянской ССР, Ереван

В настоящее время установлена важная роль протеолитических ферментов в метаболизме мышечных белков сердечной ткани. Известно, что изменения скорости деградации миофибриллярных белков в значительной степени могут определять процессы гипертрофии [11] и атрофии [9]. В деградации миофибриллярных белков принимают участие ферменты как лизосомальной локализации, так и растворимые [12].

Кардиоактивный препарат пропранолол может изменять активность протеолитических ферментов экстракта сердечной ткани крыс с экспериментальным сужением аорты [14]. Эти сведения указывают на необходимость изучения влияния кардиоактивных препаратов, широко применяемых в клинике, на протеолитическую активность ферментов сердечной мышцы. Подобные исследования позволят оценить целесообразность клинического применения этих препаратов, а также возможный механизм их действия.

В настоящей работе изучали действие β-блокаторов (пропранолола, тразикара и корданума) и Са-антагонистов (финоптина и нифеидипина) на активность протеиназ сердечной мышцы крыс. Исследовали активность тканевого экстракта, а также некоторых препаратов ферментов. Следует отметить, что работы по изучению протеолитических ферментов мышечной ткани малочисленны по сравнению с ферментами из других тканей. Это в основном связано с низкой протеолитической активностью, характерной для мышечной ткани [5, 17]. В данной работе для измерения протеиназной активности был использован белковый конъюгат с флуоресцентной меткой, позволяющий резко повысить чувствительность определения активности [2].

Методика. В опытах использовали 170 белых беспородных крыс-самцов массой 150—200 г. Животных, находящихся под эфирным наркозом, декапитировали, извлекали сердца и тщательно отмывали их от остатков крови физиологическим раствором. Сердце измельчали и растирали в гомогенизаторе типа Поттера в 0,05 М трис-НСl-буфере pH 7,5, содержащем 0,1 М KCl, 1 мМ дитиотрейтол (ДТТ) и 2 мМ ЭДТА в отношении 1:4 (вес/объем). Гомогенат центрифугировали при 5000 об/мин 30 мин и полученный супернатант центрифугировали при 100 000 g в течение 90 мин. Супернатант, обозначенный как экстракт сердечной мышцы, использовали для измерения протеолитической активности.

Катепсин D получали по модифицированному методу [3]. Сердца извлекали, измельчали и гомогенизировали описанным выше способом в 0,025 М ацетатном буфере pH 4,5, содержащем 0,2 % тритон X-100 в отношении 1:2 (вес/объем). Гомогенат центрифугировали при 5000 об/мин 30 мин, а затем при 90 000 g 60 мин. Препарат фермента получали ионообменной хроматографией супернатанта (90 000 g) на SP-сефадексе С-50 с последующей элюацией градиентом NaCl 0—1 М и гель-фильтрацией на сефадексе G-50. Фермент хранили в замороженном состоянии при —20 °С.

Частично очищенную Ca<sup>2+</sup>-активируемую нейтральную

протеазу получали по модифицированному методу [6]. Экстракт миокарда, полученный описанным выше способом, наносили на колонку ДЭАЭ-сефадекса А-50 (2,8×10 см), уравновешенную буфером 0,05 М трис-НСl рН 7,6, содержащим 1 мМ ЭДТА и 1 мМ ДТТ (буфер А); колонку промывали этим же буфером и препарат элюировали градиентом NaCl (0—0,6 М). Полученный элюацией активный пик собирали и осаждали сульфатом аммония (80 % насыщения). Осадок собирали центрифугированием, суспендировали в буфере А и наносили на колонку сефарозы-4В (4,5×39 см), уравновешенную тем же буфером. Собирали пик фермента, который активировался миллимолярными концентрациями  $\text{Ca}^{2+}$  и хранили в ледяной бане. Всю процедуру выделения выполняли при 4 °С.

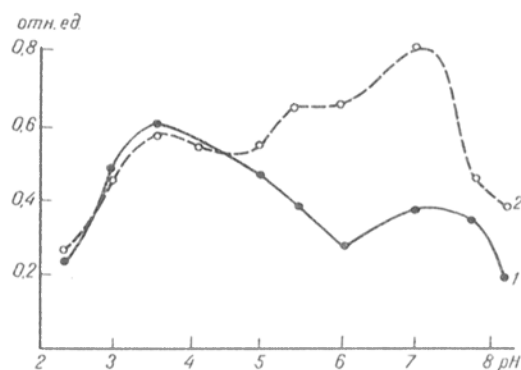
Протеолитическую активность экстракта и препаратов ферментов определяли по методу [2], в объеме 0,6 мл, в качестве субстрата использовали гемоглобин, модифицированный пиридоксаль-5'-фосфатом. После инкубации с субстратом при 37 °С в течение 1—2 ч реакцию останавливали добавлением 0,15 мл 30 % трихлоруксусной кислоты (ТХУ). После центрифугирования рН супернатанта доводили 1 М цитратом натрия и измеряли флуоресценцию при 410 нм (возбуждение 330 нм) на флуориметре «Farrand». рН зависимость протеолитической активности экстракта миокарда измеряли в смеси Мак Ильвейна (рН 2,2—8,2) [1]. При определении активности  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемой нейтральной протеазы реакционная смесь содержала 0,05 М трис-НСl рН 7,25, 1 мМ ДТТ, 1 мМ свободный  $\text{Ca}^{2+}$ . Влияние кардиоактивных соединений на протеолитическую активность экстракта миокарда проверяли в 0,1 М цитратном буфере рН 3,2; в 0,1 М ацетатном буфере рН 5,25, и 0,05 М трис-НСl-буфере рН 7,25. Кардиоактивные препараты предварительно инкубировали с ферментами или экстрактом в течение 10 мин при комнатной температуре. Пропранолол, корданум и финоптин использовали в виде готовых растворов, применяемых в клинической практике. Таблетки тразикора и нифедипина растворяли в 5 мл воды и спирта соответственно.

Концентрацию белка определяли по Лоури [15] и Брэдфорду [4].

**Результаты и обсуждение.** В деградации мышечных белков принимают участие 3 класса протеолитических ферментов, характеризующихся кислым, нейтральным и щелочным рН-оптимумами. Мы изучали протеолитическую активность экстракта сердечной мышцы в зависимости от рН среды, используя в качестве субстрата гемоглобин, модифицированный пиридоксаль-5'-фосфатом. В отсутствии  $\text{Ca}^{2+}$  и ДТТ мы обнаружили два пика (см. рисунок). Добавление в среду инкубации  $\text{Ca}^{2+}$  и ДТТ приводит к появлению дополнительных пиков при рН 5—6 и значительному возрастанию активности при нейтральном рН, что указывает на наличие в экстракте тиол- и  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых протеолитических ферментов.

Было изучено влияние кардиоактивных препаратов на протеиназную активность экстракта миокарда при рН 3,2, 5,25 и 7,25. Протеиназную активность во всех случаях, кроме рН 3,2, оценивали в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  и ДТТ.

Как видно из табл. 1, пропранолол и тразикор при рН 3,2, а также нифедипин при рН 5,25 вы-



Зависимость протеолитической активности экстракта миокарда крыс от рН инкубационной среды.

1 — в среде инкубации отсутствуют  $\text{Ca}^{2+}$  и ДТТ; 2 — в среде инкубации присутствуют 1 мМ свободный  $\text{Ca}^{2+}$  и 1 мМ ДТТ. По оси ординат — расщепление гемоглобина, модифицированного пиридоксаль-5'-фосфатом, выраженное в относительных единицах флуоресценции.

зывают увеличение протеолитической активности на 20—40 %. Корданум и финоптин при рН 5,25 и 7,25, а также пропранолол при нейтральном рН подавляют расщепление белкового субстрата на 10—25 %. Значительное ингибирование протеолитической активности при рН 3,2 наблюдается под действием нифедипина (около 50 %).

Известно, что экстракт любой ткани содержит множество протеолитических ферментов. В кислой области рН одним из основных ферментов, ответственных за протеолиз, является катепсин D. Так, имеются данные о возможном участии катепсинов, в частности катепсина D, в деградации миофибриллярных белков [13, 19, 24]. В нейтральной среде важная роль придается  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой эндопептидазе, которая, как считают, также принимает участие в метаболизме миофибриллярных белков [7, 22, 23]. Кроме того,  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемая нейтральная протеаза приобретает особое значение при патологии, так как для активации одной из форм этого фермента необходимы миллимолярные количества кальция [7, 23], что и наблюдается при некоторых видах патологии, когда увеличивается концентрация внутриклеточного свободного кальция [8].

Следующим этапом работы было изучение влияния кардиоактивных соединений на активность исследуемых ферментов с тем чтобы выяснить, является ли эффект этих соединений результатом их непосредственного взаимодействия с внутриклеточными протеиназами или опосредован через другие механизмы.

Как видно из табл. 2, кроме нифедипина, остальные изученные нами кардиоактивные препараты

Таблица 1

Влияние кардиоактивных препаратов на протеолитическую активность экстракта сердца крыс в зависимости от рН (в % от контроля,  $n=4$ )

рН	Препараты				
	β-блокаторы			Са-антагонисты	
	пропранолол ( $3 \cdot 10^{-4}$ М)	корданум ( $6 \cdot 10^{-4}$ М)	тразикор ( $1,5 \cdot 10^{-3}$ М)	финоптин ( $5 \cdot 10^{-4}$ М)	нифедипин ( $6 \cdot 10^{-4}$ М)
3,2	124,5±10,1*	102,0±8,0	122,7±8,2*	105,8±10,0	44,0±14,7*
5,25	92,6±4,3	75,2±6,8*	92,5±4,9	79,0±5,7*	136,8±17,0*
7,25	89,2±6,0	77,0±0,7*	119,2±18,5	74,0±7,2*	103,5±2,0

Примечание. Здесь и в табл. 2 звездочка —  $p \leq 0,05$ .

Влияние кардиоактивных препаратов на катепсин D и  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемую нейтральную протеазу сердца крыс (в % от контроля)

Фермент	Препараты				
	$\beta$ -блокаторы			Са-антагонисты	
	пропранолол ( $3 \cdot 10^{-4}$ М)	корданум ( $6 \cdot 10^{-4}$ М)	тразикар ( $1,5 \cdot 10^{-3}$ М)	финоптин ( $5 \cdot 10^{-4}$ М)	нифедипин ( $6 \cdot 10^{-4}$ М)
Катепсин D	102,3 $\pm$ 3,9	97,1 $\pm$ 5,1	99,7 $\pm$ 2,6	92,4 $\pm$ 4,3	49,2 $\pm$ 2,5*
Са-активируемая нейтральная протеаза	91,3 $\pm$ 5,2	86,7 $\pm$ 1,8*	98,8 $\pm$ 3,7	68,9 $\pm$ 3,0*	25,5 $\pm$ 6,5*

Примечание. Для катепсина D  $n=10$ , для Са-активируемой нейтральной протеазы  $n=4$ .

не действуют на активность катепсина D. Этот результат указывает на то, что в экстракте нифедипин непосредственно взаимодействует с катепсином D. Повышение протеолитической активности экстракта при pH 3,2 в присутствии пропранолола и тразикара связано либо с повышением активности других катепсинов, либо с опосредованным действием на катепсин D.

Данные, полученные для  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой протеазы, указывают, что ингибиторами активности фермента являются нифедипин (75 %), финоптин (30 %) и в меньшей степени корданум (15 %). Одним из объяснений ингибиторного действия нифедипина и финоптина на миллимолярную форму  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемой нейтральной протеазы может служить следующий факт. Известно, что mM форма  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемой нейтральной протеазы из тканей млекопитающих состоит из двух субъединиц 80 и 30 кД, которые содержат кальмодулинподобный С-концевой домен [21]. Протеазная активность фермента регулируется главным образом этими доменами (приблизительно на 50 % гомологичными со структурой кальмодулина) за счет связывания ионов кальция [18]. Некоторые антагонисты кальция способны подавлять биологическую активность кальмодулина [16]; найдена корреляция между сродством испытанных веществ к кальмодулину и ингибированием его функциональной активности [10]. Таким образом, можно предположить, что нифедипин и в меньшей степени финоптин могут, связываясь с субъединицами фермента, снижать  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительность, изменяя тем самым протеазную активность.

Наблюдаемое различие в действии нифедипина на активность экстракта и очищенного фермента, вероятно, обусловлено наличием различных форм или типов ферментов, активных в нейтральной среде. В частности, при очистке  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой протеазы из миокарда нами были идентифицированы высокомолекулярные формы ферментов (молекулярные массы оценены на колонке сефарозы-4В и по предварительным данным больше 300 кД), активность которых проявлялась в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$ . Общая активность высокомолекулярных форм  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых протеиназ значительно выше, чем у известной  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемой нейтральной протеазы. В то же время они являются чрезвычайно лабильными и их активность теряется полностью уже на 2-й день очистки. Вероятно, присутствием этих высокомолекулярных протеиназ и объясняется различие эффекта нифедипина на уровне экстракта, так как активность mM формы  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемой нейтральной

протеазы составляет незначительную часть от общей  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой активности. Изучение влияния кардиоактивных препаратов на активность обнаруженных ферментов, а также других нейтральных протеаз позволит выяснить механизм действия кардиотропных препаратов на протеолитическую активность сердечной ткани.

Таким образом, изученные кардиоактивные соединения, относящиеся к группе  $\beta$ -блокаторов, не оказывают существенного влияния на активность катепсина D и mM формы  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемой нейтральной протеазы. Са-антагонисты нифедипин и финоптин ингибируют активности изученных ферментов, что может играть существенную роль при выборе правильной тактики применения этих кардиоактивных средств в разные периоды развития сердечно-сосудистых заболеваний.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Асатиани В. С. Методы биохимических исследований.— М., 1956.
2. Akopyan T. N., Arutunyan A. A., Lajtha A. et al. // Neurochem. Res.— 1978.— Vol. 3.— P. 89—99.
3. Akopyan T. N., Barchudaryan N. A., Karabashyan L. V. et al. // Ibid.— 1979.— Vol. 4.— P. 465—470.
4. Bradford M. E. // Analyt. Biochem.— 1976.— Vol. 72.— P. 248—254.
5. Clark A. F., DeMartino G. N., Groall D. E. // Biochem. J.— 1986.— Vol. 235.— P. 279—282.
6. Croall D. E., DeMartino G. N. // J. biol. Chem.— 1983.— Vol. 258.— P. 5660—5665.
7. Dayton W., Schollmeyer J. V. // J. molec. cell. Cardiol.— 1980.— Vol. 12.— P. 533—551.
8. Fleckenstein A., Janke J., Döring H. H., Leder O. // Pathophysiology and Morphology of Myocardial Alterations.— Baltimore, 1975.— P. 21—42.
9. Furuno K., Goodman M. N., Goldberg A. B. // J. molec. cell. Cardiol.— 1978.— Vol. 10, Suppl. 1.— P. 74.
10. Herzig J. W., Tkachuk V. A., Baidenkov G. N. et al. // Biomed. biochem. Acta.— 1987.— Vol. 46.— P. 440—443.
11. Hopkins B. E., Steer B. E. // J. molec. cell. Cardiol.— 1978.— Vol. 10, Suppl. 1.— P. 36.
12. Ishiura S., Sugita H. // International Symposium on Adaptive Mechanisms of Muscle: Abstracts.— Szeged, 1986.— P. 58.
13. Jones T. L., Ogunro E. A., Samarel A. M. et al. // Amer. J. Physiol.— 1983.— Vol. 245.— P. 294—299.
14. Kwiatkowska-Patzer B., Zalevska T. // Basic Res. Cardiol.— 1987.— Vol. 82.— P. 18—23.
15. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. Z., Randall R. J. // J. biol. Chem.— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
16. Mannhold R., Kramer A., Schäfer W. et al. // Arch. Pharmacol.— 1987.— Bd 320.— S. 683—692.
17. Marks N., Lajtha A. // Handbook of Neurochemistry.— New York, 1971.— Vol. 5.— P. 49—136.
18. Minami Y., Emory Y., Kawasaki H. et al. // J. Biochem. (Tokyo).— 1987.— Vol. 101.— P. 889—895.
19. Ogunro E. A., Spencer I. R., Ferguson A. G. et al. // J. molec. Cell. Cardiol.— 1979.— Vol. 11, Suppl. 1.— P. 46.
20. Prussachenko V. K., Catsura V. V. // Ibid.— 1988.— Vol. 12, Suppl. 1.— P. 131.

21. Suzuki K., Emori Y., Ohno S. et al. // Biomed. biochem. Acta. — 1987. — Vol. 45. — P. 1487—1491.
22. Tolnai S. // Life Sci. — 1987. — Vol. 41. — P. 1117—1122.
23. Togo-Oka T., Masaki T., Okamoto J. et al. // J. molec. cell. Cardiol. — 1979. — Vol. 11. — P. 769—786.
24. Wildenthal K. // Ibid. — 1978. — Vol. 10. — P. 595—599.

Поступила 16.01.89

# EFFECT OF CARDIOACTIVE DRUGS ON PROTEOLYTIC ACTIVITY OF RAT HEART MUSCLE

R. G. Karapetyan, T. N. Akopyan, A. I. Oganisyan, S. S. Oganisyan

Institute of Cardiology, Ministry of Public Health of the Armenian SSR, Institute of Experimental Biology, Academy of Sciences of the Armenian SSR, Yerevan

Cardioactive drugs —  $\beta$ -adrenoblocking agents (propranolol, trasicor and cordanum) and  $Ca^{2+}$ -antagonists (nifedipine and phenoptine) — exhibited both activating and inhibitory effects on proteolytic activity in rat heart tissue extract. The  $\beta$ -adrenoblocking agents did not affect distinctly the activity of partially purified cathepsin D and  $Ca^{2+}$ -dependent neutral protease from myocardium. Nifedipine inhibited cathepsin D by 50% and  $Ca^{2+}$ -dependent neutral protease — by 75%; phenoptine inhibited also the latter enzyme by 30%.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.74-008.939.6-02:612.766.1]-07

И. В. Астратенкова, О. Б. Башарина, В. С. Чайковский

## АНДРОГЕННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ СОДЕРЖАНИЯ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ БЕЛКОВ В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ ПРИ ФИЗИЧЕСКИХ НАГРУЗКАХ

НИИ физической культуры, Ленинград

В настоящее время накоплен большой экспериментальный материал, указывающий на участие андрогенов в регуляции биосинтеза белка в скелетных мышцах, их анаболическое действие в условиях физических нагрузок. При систематическом введении анаболических стероидов и тестостерона в условиях мышечной деятельности наблюдается увеличение массы мышц, их силы [7, 13]. Применение этих гормонов позволяет спортсменам тренироваться с более значительными нагрузками и улучшать спортивный результат [1, 13]. Однако механизмы действия гормонов на обмен индивидуальных тканеспецифических белков скелетных мышц не изучались.

Ранее нами было установлено, что физическая нагрузка вызывает фазовые изменения в содержании тканеспецифических белков скелетных мышц [5, 6]. Значительное снижение содержания белков в катаболической фазе адаптации к нагрузке сменяется фазой их суперкомпенсации (анаболической), которая является биохимической основой приспособления мышц к физической активности. Показано, что анаболическая фаза адаптации представляет собой андрогеннасыщенное состояние скелетных мышц (высокое содержание тестостерона в крови и мышцах одновременно с повышенным уровнем рецепторного связывания андрогенов), во время которого осуществляется гормональная регуляция биосинтетических процессов, обеспечивающих функциональное восстановление мышечной ткани [4].

Наиболее распространенным подходом к оценке воздействия андрогенов на те или иные процессы в организме является изучение эффекта кастрации и (или) дополнительного введения гормона [8, 11]. В том и другом случае установлено влияние андрогенов на обмен белков в скелетных мышцах [12, 14]. В своих исследованиях мы использовали модель андрогенизации организма в результате однократного введения тестостерона.

Цель работы заключалась в изучении влияния однократной физической нагрузки и введения тестостерона на динамику содержания тканеспецифических белков скелетных мышц — миоглобина и аспаратаминотрансферазы.

**Методика.** Эксперименты проводили на белых крысах-самках массой 180—220 г. Выполнены 2 серии экспериментов. Животные были разделены на группы по 7 крыс в каждой. Все животные подвергались однократной интенсивной физической нагрузке, заключавшейся в плавании с дополнительным грузом (12% от массы тела) в воде температуры 30—32 °С в течение 6—7 одноминутных интервалов с 1,5 мин отдыха между ними. Тестостерон-пропионат в дозе 1 мг на 1 кг массы животным I серии экспериментов вводили непосредственно после нагрузки, II серии — через 48 ч отдыха. Животных исследовали сразу, а также через 2, 4, 12, 24, 48, 72, 96, 120 и 144 ч после нагрузки. Крыс контрольной группы нагрузке не подвергали. Для анализа брали четырехглавую мышцу бедра. Содержание тестостерона в крови определяли радиоиммунологическим методом [3], рецепторное связывание андрогенов — как описано ранее [4], содержание миоглобина — спектрофотометрическим [6], аспаратаминотрансферазы — иммунохимическим [2] методом.

**Результаты и обсуждение.** Однократное введение тестостерона непосредственно после физической нагрузки приводит к повышению его уровня в крови в течение 2 дней (максимальное увеличение в 26 раз), что вызывает значительное подавление рецепторного связывания андрогенов в исследуемый период (рис. 1, а). Можно предполо-

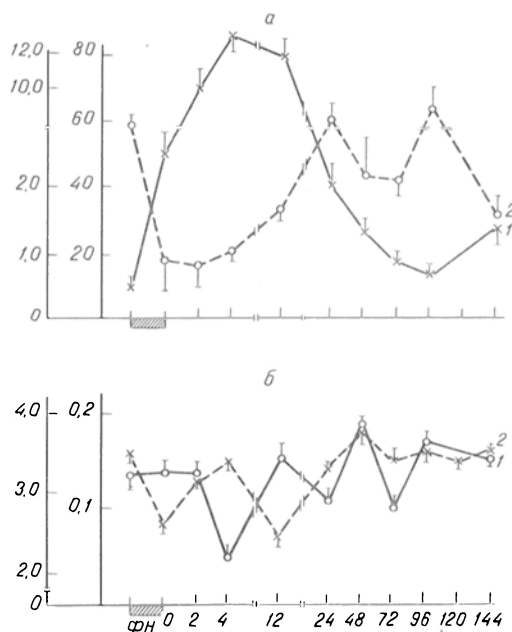


Рис. 1. Влияние однократной физической нагрузки и введения тестостерон-пропионата на содержание тестостерона в крови (а, 1), рецепторное связывание андрогенов (а, 2), содержание миоглобина (б, 1) и аспаратаминотрансферазы (б, 2) в мышцах крыс.

По оси абсцисс — время после физической нагрузки (в ч); по оси ординат: а, слева — содержание тестостерона (1, нг/мл), справа — рецепторное связывание андрогенов (2, расп/мин на 1 мг белка); б — содержание миоглобина (1, слева) и аспаратаминотрансферазы (2, справа), мг на 1 г ткани. ФН — физическая нагрузка.



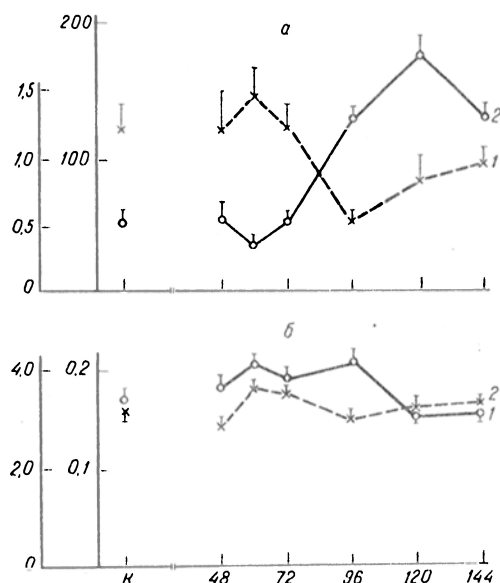


Рис. 2. Влияние однократной физической нагрузки и введение тестостерон-пропионата через 48 ч отдыха на содержание тестостерона в крови (а, 1), рецепторное связывание андрогенов (а, 2), содержание миоглобина (б, 1) и аспартатаминотрансферазы (б, 2) в мышцах крыс. Обозначения те же, что на рис. 1.

жить, что уменьшение числа цитоплазматических рецепторов стероидных гормонов связано с их транслокацией в ядра клеток, а два пика нормализации (24 и 96 ч) — с их возвращением в цитоплазму [9, 10] и синтезом рецепторных белков *de novo* [15]. В результате дополнительного введения тестостерона происходит нарушение естественной реакции гормональной системы на нагрузку и в период отдыха наблюдается андрогендефицитное состояние скелетных мышц. Оба исследуемых процесса приближаются к контрольному уровню, в то время как адаптивные изменения, вызываемые физической нагрузкой, требуют значительного их усиления [4]. Нарушение обеспечения приспособительных процессов в скелетных мышцах тестостероном и чувствительности мышц к андрогенному сигналу приводит к ликвидации анаболической фазы адаптации к нагрузке белков мышц (см. рис. 1). Динамика уменьшения содержания миоглобина и аспартатаминотрансферазы в период отдыха практически не отличается от наблюдаемой в отсутствие гормонального воздействия [5, 6].

Для уточнения регуляторной роли андрогенов в анаболической фазе адаптации к нагрузке мы использовали модель с введением тестостерона через 48 ч отдыха. Динамика содержания тестостерона в крови и рецепторного связывания андрогенов в мышцах значительно отличалась от результатов экспериментов I серии (рис. 2). Введение тестостерона в период отдыха вызывало незначительное увеличение содержания гормона в крови в течение суток и последующее длительное снижение его уровня. Это явление можно объяснить следующими процессами: ускорением метаболизма и усилением утилизации тестостерона тканями, в частности скелетными мышцами, в анаболической фазе адаптации к нагрузке; существенным подавлением продукции эндогенного тестостерона, что может указывать на повышение чувствительности гонад к гормональному воздействию в отдаленный период отдыха после нагрузки. В резуль-

тате высокой скорости элиминации гормона из крови не происходило заметного снижения уровня рецепторного связывания в мышцах в течение 24 ч после введения гормона (см. рис. 2). Затем уровень рецепторного связывания значительно (в 2,8 раза) возрастал. При введении тестостерона через 48 ч отдыха суперкомпенсаторное повышение содержания миоглобина и аспартатаминотрансферазы, как и в экспериментах I серии, отсутствовало (см. рис. 2).

На основании полученных данных можно сделать вывод, что экзогенная андрогенизация организма в период отдыха после физической нагрузки приводит к андрогендефицитному состоянию скелетных мышц в анаболической фазе адаптации к нагрузке, снимает суперкомпенсаторное повышение содержания белков в мышцах и, следовательно, не может служить адекватной моделью андрогенизации организма, возникающей в результате воздействия физических нагрузок. В то же время мы можем утверждать, что именно в период отдыха после физической нагрузки реализуется анаболический эффект андрогенов благодаря естественному повышению их содержанию в крови и мышцах, а также повышению в этот период чувствительности мышц к гормональному воздействию.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Вуру А. А., Кыргеев П. К. Гормоны и спортивная работоспособность. — М., 1983.
2. Халмуратов А. Г., Чернухина Л. А., Максименко Л. Ю. // Укр. биохим. журн. — 1986. — Т. 58, № 4. — С. 57—62.
3. Чайковский В. С., Зорина А. Д., Корнева И. А. и др. // Пробл. эндокринологии. — 1983. — № 4. — С. 39—43.
4. Чайковский В. С., Евтинова И. В., Башарина О. Б. // Вопр. мед. химии. — 1985. — № 6. — С. 80—86.
5. Чайковский В. С., Астратенкова И. В., Королева Т. В. // Всероссийский съезд по лечебной физкультуре и спортивной медицине, 3-й: Материалы. — Свердловск, 1986. — С. 202.
6. Чайковский В. С., Башарина О. Б., Шаляпина И. В. и др. // Вопр. мед. химии. — 1987. — № 4. — С. 79—82.
7. Alen M., Hakkinen K. // J. Sports Med. Phys. Fit. — 1987. — Vol. 27, N 1. — P. 38—46.
8. Girgin A., Kelestimir H., Tipirdman S. // Doga: Vet. Haydancilik Ser. — 1987. — Vol. 11, N 2. — P. 143—149.
9. Kyanumoto S., Sato N., Nemoto T. et al. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1984. — Vol. 120, N 3. — P. 953—958.
10. Liao S., Witte D., Schilling K. // J. Steroid Biochem. — 1984. — Vol. 20, N 1. — P. 11—17.
11. Markku A., Matti R., Reijo V. // Med. Sci. Sports Exercise. — 1985. — Vol. 17, N 3. — P. 354—359.
12. Martinez J. A., Buttery P. J., Pezson J. T. // Brit. J. Nutr. — 1984. — Vol. 52, N 3. — P. 515—521.
13. Ryan A. J. // Fed. Proc. — 1981. — Vol. 40, N 12. — P. 2682—2688.
14. Santidrian S., Moreyra M., Munro H. N. et al. // Metabol. clin. exp. — 1982. — Vol. 31, N 12. — P. 1200—1205.
15. Smith R. G., Syms A. J., Norris I. S. // J. Steroid Biochem. — 1984. — Vol. 20, N 1. — P. 277—281.

Поступила 17.01.89

## ANDROGEN REGULATION OF PROTEIN CONTENT IN MUSCLE TISSUE IN PHYSICAL EXERCISES

I. V. Astratenkova, O. B. Basharina, V. S. Tchikovskiy

Institute of Physical Culture, Leningrad

Administration of testosterone after exercises led to suppression of the hormone production during the anabolic phase within 72-120 hrs of muscles adaptation to physical loading. Content of the androgen receptors was also altered. The supercompensatory phase in content of proteins (myoglobin and aspartate

aminotransferase as index) was absent due to an impairing effect of testosterone on muscle adaptation. These data suggest that administration of testosterone could not serve as an adequate model of a body androgenization which was observed in anabolic phase of muscle adaptation to physical exercises.

© С. П. АНИКЕЕВА, 1990

УДК 612.111.1:547.922]:[612.111:612.262

С. П. Аникеева

## ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАЦИИ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТА НА СКОРОСТЬ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ $O_2$

ВНИИ охраны здоровья матери и ребенка Минздрава СССР, Москва

В последние годы возрос интерес исследователей к изучению биофизических и биохимических свойств мембраны эритроцита (ЭМ) [1—3]. Хроматографические методы позволили выяснить спектральный состав липидов ЭМ. Достигнуты большие успехи в идентификации белковой части ЭМ [4].

Показана тесная взаимосвязь липидно-белковых взаимодействий с активностью функционирования различных ферментных систем, локализованных на ЭМ [5]. Доказано, что микроокружение эритроцитов, состав плазмы крови оказывают существенное влияние на морфологию клетки [6]. Так, повышение рН крови сопровождается изменением формы клеток и уменьшением их объема. Снижение фонда АТФ в эритроците приводит к изменениям в ЭМ, вследствие чего эритроцит из дискоцита трансформируется в эхиноцит [6]. Инкубация эритроцитов *in vitro* с липопротеидами низкой плотности приводит к превращению двояковогнутых дисков эритроцитов в сфероциты. Липопротеиды высокой плотности такого действия не оказывают, более того, этот вид липопротеидов способен предотвращать эффект липопротеидов низкой плотности. Изменения в липидно-белковых отношениях в ЭМ могут приводить к изменению ионного состава клетки и снижению общего заряда клетки, тем самым способствуя увеличению агрегации эритроцитов, изменению реологических свойств крови [7].

Из сказанного выше видно, что изменения в составе ЭМ способны существенным образом влиять на транспортную функцию эритроцитов. Возникает вопрос: как это сказывается на основной функции эритроцита — транспорте  $O_2$ ?

Литературных данных, анализирующих влияние модификации ЭМ на газотранспортную функцию эритроцита, нет. В связи с этим нами проведена серия исследований, в которых изучалась кинетика высвобождения  $O_2$  из эритроцитов в условиях модификации мембран холестерином.

**Методика.** Скорость отдачи  $O_2$  изучали в замкнутой полярографической ячейке, имеющей большую поляризуемую поверхность. При электролизе пробы крови, насыщенной газовой смесью (4,91 %  $CO_2$ , остальное — кислород), происходит непрерывное диффузное извлечение  $O_2$ , сопровождаемое соответствующим снижением содержания связанного кислорода и величины  $pO_2$  в пробе. Методики математического анализа экспериментальных данных взяты из работы [8].

Процедура модификации мембраны заключалась в следующем: кровь, разведенную в 4 раза фосфатным буфером (рН 7,4),

Скорость десатурации  $O_2$  из пробы крови  $10^{-6}$  (в мл  $O_2/см^3$  за 1 с)

Уровень HbO <sub>2</sub> , %	Опыт	Контроль
25	19,7 ± 3,07	25,8 ± 0,92
50	46,3 ± 1,25	67,4 ± 1,93
75	79,6 ± 2,48	98,2 ± 2,76

сатурировали в течение 3—4 мин газовой смесью (4,91 %  $CO_2$ , остальное — кислород). Затем кровь в условиях, исключающих ее дегазацию, быстро разделяли на 2 порции (контроль и опыт). В опытную пробу крови добавлялся холестерин из расчета 7,5 мг на 1,5 мл разведенной крови. Контролем служила кровь без добавления холестерина. Обе порции крови инкубировались в течение 2 ч при  $t$  37 °С. Затем пробы помещали в термостатируемую электролитическую ячейку. Кулонометрический электролиз проводили при постоянном потенциале 1,37 В. Постоянная величина рН крови достигалась за счет электрофоретического поступления  $H^+$  от электролита (0,15 М HCl), который заливается в электролизер над крышкой электролитической ячейки. Скорость вращения мешалки 500 об/мин. Величина эффективной площади электрода 3,4  $см^2$ .

Графическая регистрация проводилась на потенциометре КСП-4.

В таблице представлены данные статистической обработки 12 опытов, в которых скорость высвобождения  $O_2$  выражалась в условных единицах.

Одновременно проводили морфологический контроль состояния ЭМ. Для этого после 2 ч инкубации из крови контроля и опыта делали мазки. Мазок крови после фиксации метанолом в течение 30 с обрабатывали раствором 1 %  $AgNO_3$  с последующей докраской 1 % эозинном. Такой способ хорошо контрастирует мембранное вещество эритроцита.

Визуальный контроль проводили на микроскопе МБИ-15У42 под иммерсией с вазелиновым маслом.

Было установлено, что после инкубации с холестерином возросло количество эритроцитов (до 42 % в поле зрения), диаметр которых превышал аналогичный показатель в контрольных мазках на 20 %.

**Результаты и обсуждение.** Как видно из представленного материала, инкубация эритроцитов с холестерином существенно снижает скорость десатурации  $O_2$  эритроцитами. Наиболее яркие изменения выявлены при 50 % и 75 % концентрации HbO<sub>2</sub>. Как показывает морфологический контроль мазков крови, холестерин вызывает изменение формы эритроцита, по-видимому, за счет встраивания его в бимолекулярный слой ЭМ, что согласуется с данными литературы [7], показавшими, что при инкубации эритроцитов с холестерином их объем увеличивается. Кроме того, включение холестерина в ЭМ способствует увеличению «жесткости» мембранных структур; в этих условиях можно предположить уменьшение коэффициента латеральной диффузии. Это предположение основывается на косвенной информации: по данным флюоресцентного и парамагнитного зондов, при введении холестерина в искусственные мембраны из лецитина вращательная подвижность (диффузия) снижается [9]. Вместе с тем известно [10], что в большинстве систем коэффициенты поступательной и вращательной диффузии коррелируют между собой. Таким образом, снижение вращательной диффузии зондов при увеличении содержания холестерина в мембране можно рассматривать как указание на одновременное снижение коэффициента поступательной диффузии  $O_2$ , что достаточно согласуется с нашими экспериментальными данными.

Кроме того, наши опыты позволяют априори предположить, что коэффициент диффузии  $O_2$  для

холестерина будет, по-видимому, выше, чем для фосфолипидов.

В литературе приводится коэффициент диффузии  $O_2$  в мембране, равный  $1,7 \cdot 10^{-7}$  см<sup>2</sup> за 1 с [8, 9]. Однако при этом в основном в расчет бралась лишь толщина мембраны и не учитывались качественный ее состав, а также возможности влияния химического состава плазмы крови. Между тем нам представляется весьма важным этот аспект данной проблемы, учитывая, что в зависимости от срока выброса эритроцита из депо мембрана эритроцита претерпевает определенные изменения в своем составе [7]. Отсюда логично предположить, что газотранспортная функция у различных по возрасту эритроцитов будет неодинаковой. Существенное влияние на газотранспортную функцию эритроцита может оказывать уровень отдельных фракций липидов плазмы крови, так как между липидами мембран эритроцитов и липидами плазмы происходит постоянный обмен фракциями [6]. В связи с этим можно предположить, что увеличение уровня холестерина в плазме крови, регистрируемое при ряде патологических состояний, должно сопровождаться нарушениями кислород-транспортной функции эритроцитов.

Отдельной проблемой является определение влияния внутривенных инфузий различных лекарственных средств на газотранспортную функцию эритроцитов. Особенно остро, по нашему мнению, она стоит в неонатологии, когда приходится прибегать к внутривенным вливаниям различного рода липидных смесей для парентерального питания детей, тем более что физиологической особенностью эритроцитов новорожденных в течение 1 сут жизни, как показали наши исследования, является снижение скорости десатурации  $O_2$  в сравнении со взрослыми людьми. При патологических состояниях эта физиологическая особенность эритроцитов новорожденных на фоне парентерального питания может быть одним из ведущих факторов патогенеза тяжелой гипоксии новорожденных.

Автор считает своим приятным долгом выразить благодарность сотруднику Института химической физики АН СССР доктору хим. наук В. А. Рогинскому, руководителю клинической лаборатории ВНИИ ОЗМиР Минздрава СССР доктору мед. наук Ю. Д. Балике за полезную дискуссию при обсуждении результатов данной работы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бунчаненко А. Л., Вассерман А. М. Стабильные радикалы. — М., 1973.
2. Ияков В. Г., Берестовский Т. Д. Динамическая структура липидного биослоя. — М., 1976.
3. Казенков А. М., Маслова М. И. // Физиол. журн. — 1987. — Т. 22, № 12. — С. 1587—1596.
4. Лопухин Ю. М. и др. Холестериноз. — М., 1983.
5. Мембраны и болезни. — М., 1980. — С. 17—20.
6. Симонян К. С. и др. Посмертная кровь в аспекте трансфузиологии. — М., 1975. — С. 210—232.
7. Фридрих П. Ферменты: четвертичная структура и надмолекулярные комплексы: Пер. с англ. — М., 1986.
8. Чернецкий Е. А., Воробей А. В. // Структура и функция эритроцитарной мембраны. — Минск, 1981. — С. 2.
9. Mathsson J. C. B., King A. D. J. // Colloid Interface Sci. — 1978. — Vol. 66. — P. 464—469.
10. Feinbanks G., Steck T. L., Wallach D. // Biochemistry (Wash.). — 1971. — Vol. 10. — P. 2906—2917.
11. Shen B. W., Gosselphs R., Steck T. L. // J. Cell Biol. — 1988. — Vol. 102, N 3. — P. 997—1000.

Поступила 04.02.89

#### DEPENDENCE OF THE OXYGEN LIBERATION RATE ON MODIFICATION OF ERYTHROCYTE MEMBRANES

S. P. Anikeeva

All-Union Research Centre of Motherhood and Childhood Protection, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

Specific patterns of blood deoxygenation were studied using cholesterol-modified erythrocyte membranes by means of polarographic coulombometry in microlyzer. The rate of oxygen liberation was decreased in erythrocytes enriched with cholesterol as compared with controls. Effects of the membrane quantitative composition on its diffusion properties are discussed.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 615.357:577.175.53].015.4:612.123:[547.963.915].07

Л. Е. Панин, И. Г. Свечникова, Н. Н. Маянская

#### РОЛЬ ПЛАЗМЕННЫХ ЛИПОПРОТЕИДОВ ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ КАК МОДУЛЯТОРОВ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ГОРМОНАЛЬНОГО ЭФФЕКТА ГИДРОКОРТИЗОНА

Институт биохимии Сибирского отделения АМН СССР, Новосибирск

Известно, что глюкокортикоиды принимают активное участие в регуляции экспрессии генов, отвечающих за синтез таких индуцибельных ферментов, как тирозинаминотрансфераза, фосфоэнолпируваткарбоксикиназа и др. [6]. Показано, что глюкокортикоиды участвуют также в индукции синтеза глюко-6-фосфатдегидрогеназы в печени [10]. Однако для реализации этого эффекта необходимо присутствие липопротеидов высокой плотности (ЛПВП). Оказалось, что активация хроматина и усиление экспрессии генов в данном случае связаны с транслокацией в ядро лизосомальных ферментов, в первую очередь протеиназ [8], механизм которой остался неясным. Роль ЛПВП в этом механизме также пока неясна.

Учитывая эти обстоятельства, важно изучить, как соотносятся в клетке регуляторные эффекты 2 классов физиологически активных соединений: глюкокортикоидов и ЛПВП плазмы крови. В настоящей работе сделана попытка выяснить некоторые принципиальные отличия в механизме действия гидрокортизона и гидрокортизона с ЛПВП на ядерный хроматин, биосинтез нуклеиновых кислот и белка в ткани печени.

**Методика.** Настоящее исследование проводили на переживающих срезах печени крыс-самок Вистар массой 150—200 г. После декапитации животных печень извлекали и промывали холодным физиологическим раствором. Срезы толщиной 0,3 мм готовили при помощи острого лезвия и помещали в бикарбонатный буфер, pH 7,4 (Кребс—Рингер), содержащий 2 % бычьего сывороточного альбумина. Среду насыщали смесью 95 и 5 %  $CO_2$ . Инкубацию проводили при температуре 37 °C в течение 2 ч при постоянном покачивании.

В инкубационную среду добавляли гидрокортизон фирмы «Merck» (ФРГ) в конечной концентрации  $10^{-6}$  М, ЛПВП — из расчета 0,2 мг на 1 мл среды. Последние выделяли из плазмы крови крыс методом изоплотного ультрацентрифугирования в растворе  $KBr$  [13]. В ряде экспериментов использовали специфические ингибиторы: пенстатин, подавляющий активность карбоксипептидаз (1 мг на 1 мл), ингибитор трипсина из соевых бобов, подавляющий активность сериновых протеиназ (1 мг на 1 мл), йодацетамид, угнетающий активность

**Изменение молярной концентрации мест связывания АО ( $n_{уд}$ ) с хроматином ядер и константы связывания зонда (Кс) в переживающих срезах печени крыс под влиянием кортизола и кортизола с ЛПВП ( $M \pm m$ )**

Условия опыта	$n_{уд} \cdot 10^{-6} \text{ М на 1 мг}$ белка	$K_s \cdot 10^6 \cdot \text{М}^{-1}$
Контроль	$7,02 \pm 0,54$ (35)	$1,32 \pm 0,19$ (44)
Гидрокортизон	$8,89 \pm 0,99$ (15)	$2,40 \pm 0,34$ (23)
Гидрокортизон + +ЛПВП	$13,76 \pm 1,78^*$ (9)	$1,69 \pm 0,37$ (20)
Гидрокортизон + +ЛПВП + пепста- тин	$8,26 \pm 0,84$ (10)	$1,46 \pm 0,26$ (10)
Гидрокортизон + +ЛПВП + йодаце- тамид	$6,10 \pm 1,03$ (10)	$1,18 \pm 0,22$ (9)
Гидрокортизон + +ЛПВП + соевый ингибитор	$5,93 \pm 1,21$ (9)	$1,76 \pm 0,27$ (9)
Гидрокортизон + +ЛПВП + винбла- стин	$7,15 \pm 1,19$ (14)	$1,68 \pm 0,38$ (13)
Гидрокортизон + +ЛПВП + колхицин	$7,59 \pm 1,48$ (5)	$1,15 \pm 0,23$ (7)
ЛПВП	$6,95 \pm 0,78$ (6)	

Примечание. В скобках — число опытов, звездочка —  $p < 0,01$ .

гиоловых протеиназ (0,5 мг на 1 мл), актиномицин D — ингибитор ДНК-зависимого синтеза РНК ( $10^{-7}$  М). Применяли также ингибиторы внутриклеточного перемещения — винбластин ( $10^{-6}$  М) и колхицин ( $5 \cdot 10^{-7}$  М), блокирующие транслокацию лизосомальных ферментов в ядро. Для оценки скорости биосинтеза суммарной РНК добавляли  $^3\text{H}$ -уридин с активностью 23 мкюри/моль фирмы «Amersham» (Англия) — 1 мкюри на 1 мл и для оценки скорости биосинтеза общего белка —  $^{14}\text{C}$ -лейцин с активностью 58 мкюри/ммоль фирмы «Amersham» (Англия) — 1 мкюри на 1 мл среды.

После инкубации срезы печени отмывали холодным 0,15 М NaCl и выделяли из них ядра по методу [12] в модификации, описанной в работе [11]. Суспензию ядер в 0,05 М цитрат-фосфатном буфере pH 4,4, содержащем 0,15 М NaCl, инкубировали при температуре 4 °C в течение 12 ч с раствором акридинового оранжевого (АО). Коммерческий препарат АО дважды перекристаллизовывали из спиртового раствора. Флуоресценцию измеряли на спектрофлуориметре MPF-4 (Япония) при максимуме возбуждения 503 нм и 2 максимумах флуоресценции: 530 нм (специфическое связывание по типу интеркаляции с двухцепочечными участками ДНК) и 615 нм (связывание АО с одноцепочечными нуклеиновыми кислотами). Исключение электростатического взаимодействия с ядерными белками достигалось за счет избытка ионов  $\text{H}^+$  и NaCl, конкурирующих с АО за анионные места связывания в молекулах белка. Предварительная обработка ядер раствором ЭДТА низкой концентрации (0,1 мМ) приводила к избирательной денатурации (расплетению) двухнитевой РНК, в результате чего последняя не участвовала в специфическом связывании зонда.

Для анализа изменений ядерного хроматина под влиянием гидрокортизона и гидрокортизона с ЛПВП проводили флуоресцентное зондирование ДНК, осуществляя 2 последовательные операции: а) титрование постоянного количества АО ( $1,1 \cdot 10^{-6}$  М) клеточными ядрами в интервале концентраций от 0,1 до 0,8 мг ядерного белка на 1 мл; б) титрование постоянного количества ядер (0,4 мг на 1 мл) раствором АО в интервале концентраций от  $5,5 \cdot 10^{-7}$  до  $4,4 \cdot 10^{-6}$  М. По данным титрования, строили графики в двойных обратных координатах и рассчитывали константу связывания (Кс) для АО и число молей центров связывания зонда ( $n_{уд}$ ) на 1 мг белка ядер [11]. Белок определяли методом Лоури [14]. Радиоактивность РНК и растворимость белковой фракции измеряли на  $\beta$ -счетчике «Мультимат-30» (Франция).

Достоверность полученных результатов оценивали с помощью  $t$ -критерия Стьюдента.

**Результаты и обсуждение.** В переживающих срезах печени белых крыс гидрокортизон практически не изменял молярной концентрации мест связывания АО с ДНК, но достоверно увеличивал константу связывания (табл. 1). Напротив, совместное действие гидрокортизона и ЛПВП не изменяло Кс для АО, но практически вдвое увеличивало число мест связывания. Флуоресцентное зондирование ДНК широко используется для оценки активации хроматина, обусловленной разными факторами. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что действие одного гидрокортизона и совместное действие его с ЛПВП на ядерный хроматин принципиально отличаются друг от друга. В первом случае, вероятно, речь идет об известном механизме гормональной регуляции экспрессии генов, реализуемом через цитозольный рецептор глюкокортикоидов [6]. По-видимому, это усиление экспрессии уже работающих генов. Во втором случае речь идет о транслокации лизосомальных ферментов в ядро и активации хроматина в связи с лимитированным протеолизом некоторых его белков [8]. Этот механизм, вероятно, связан с включением в экспрессию новых генов. В нем ключевые позиции занимают карбоксильные, сериновые и тиоловые протеиназы [8, 9].

Добавление в среду инкубации вместе с гидрокортизоном и ЛПВП пепстатина, ингибитора трипсина из соевых бобов и йодацетамида полностью устраняло наблюдаемый эффект. В данном

случае Кс для АО и молярная концентрация мест связывания его с ДНК практически не отличались от контроля (см. табл. 1). Использование колхицина и винбластина также снимало данный эффект. Не изменяли число место связывания и ЛПВП, добавленные в среду инкубации.

Ранее нами АО использовали для оценки активации хроматина в опытах *in vivo* у крыс при интенсивной физической нагрузке и частичной резекции печени [5]. Были получены аналогичные результаты по связыванию зонда, что и в опытах *in vitro*. Более того, было показано, что при данных воздействиях на организм животных в крови наблюдалось увеличение концентрации глюкокортикоидов и отмечался сдвиг липопротеидного спектра в сторону увеличения содержания ЛПВП [7, 9]. При частичной резекции печени особенно увеличивалось содержание ЛПВП<sub>3</sub>. Именно данная фракция липопротеидов высокой плотности, а не ЛПВП<sub>2</sub>, была необходима для индукции синтеза глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в переживающих срезах печени крыс наряду с глюкокортикоидами [10].

Таким образом, исследования *in vitro* свидетельствуют о том, что увеличение концентрации в крови глюкокортикоидов и ЛПВП является необходимым и достаточным условием для активации хроматина и усиления экспрессии генов, наблюдаемых как в опытах *in vivo*, так и *in vitro*.

Близкие результаты по активации хроматина с использованием АО и этидия бромиды были получены другими авторами на модели частичной реакции печени [2, 3]. Исходя из интенсивности флуоресценции АО, связанного с хроматином, активность последнего увеличивалась на 40 % по сравнению с контролем. Анализ спектра мРНК не проводили. Известно, что одним из основных эффектов глюкокортикоидов является увеличение количества рибосомной РНК в тканях-мишенях [4]. Изменение спектра мРНК под влиянием

Изменение скорости включения  $^3\text{H}$ -уридина в РНК и  $^{14}\text{C}$ -лейцина в белок (в им. в 1 мин на 1 мг белка) в переживающих срезах печени крыс под влиянием гидрокортизона и гидрокортизона с ЛПВП ( $M \pm m$ )

Условия опыта	Включение $^3\text{H}$ -уридина в РНК	Включение $^{14}\text{C}$ -лейцина в белок
Контроль	1860 $\pm$ 157	1320 $\pm$ 130
Гидрокортизон	2604 $\pm$ 228*	1880 $\pm$ 167*
Гидрокортизон + ЛПВП	3255 $\pm$ 356**	2740 $\pm$ 214**
Гидрокортизон + апо-ЛПВП	3111 $\pm$ 287**	2607 $\pm$ 209**
ЛПВП	—	1073 $\pm$ 156

Примечание. Число опытов в каждой серии 10. Одна звездочка  $p < 0,05$ , две —  $p < 0,01$ .

гидрокортизона и ЛПВП нами не изучалось и требует дальнейших исследований.

Анализ экспрессии генов в переживающих срезах печени крыс под влиянием гидрокортизона и гидрокортизона с ЛПВП проводился нами по оценке скорости включения  $^3\text{H}$ -уридина в общий пул РНК и  $^{14}\text{C}$ -лейцина в белок растворимой фракции. Было показано достоверное увеличение обоих показателей под влиянием одного гормона (табл. 2). Однако результат был значительно выше, если в среду инкубации добавляли гормон вместе с ЛПВП. Для РНК увеличение скорости включения меченого уридина составляло 125 % по отношению к гидрокортизону и 175 % по отношению к контролю. Для белка аналогичные результаты, полученные по включению меченого лейцина, составляли соответственно 145 и 207 %.

Добавление в среду инкубации апо-ЛПВП, полученных после делипидирования ЛПВП, в том же количестве в пересчете на белок совместно с гидрокортизоном также увеличивало скорость биосинтеза РНК и белка (см. табл. 2). Одни ЛПВП, добавленные в среду инкубации, эффекта не оказывали.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что гидрокортизон и ЛПВП оказывают кооперативный эффект на экспрессию генов, который не воспроизводится ни одним из компонентов в отдельности. Для участия ЛПВП в кооперативном механизме важную роль играет не липидный, а белковый компонент.

Активация хроматина в ядрах печени под влиянием гидрокортизона и гидрокортизона с ЛПВП в принципе отличается друг от друга: гидрокортизон повышает  $K_s$  для АО и достоверно не изменяет молярную концентрацию мест связывания с ДНК, гидрокортизон с ЛПВП, напротив, не изменяет  $K_s$  для АО, но значительно увеличивает число место связывания зонда с ДНК. Увеличение экспрессии генов под влиянием гидрокортизона существенно менее выражено, чем под влиянием гидрокортизона и ЛПВП. Последний механизм носит кооперативный характер, не воспроизводится ни одним из компонентов в отдельности и является лизосомозависимым. Ингибиторы лизосомальных протеиназ (пенстагин, соевый ингибитор трипсина и йодацетамид), а также внутриклеточного перемещения (колхицин, винбластин) полностью предотвращают активацию хроматина. В реализации эффекта ЛПВП в данном механизме важную роль играет не липидный, а белковый компонент.

1. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флюоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. — М., 1980.
2. Колесников В. А., Сондоре О. Ю., Федосеева Г. Е., Зеленый А. В. // Цитология. — 1979. — Т. 21, № 9. — С. 1029—1035.
3. Куш А. А., Колесников В. А., Зеленый А. В. // Молекул. биол. — 1975. — Т. 9, № 1. — С. 138—144.
4. Кырге П. К. // Успехи физиол. наук. — 1981. — Т. 12, № 1. — С. 56—79.
5. Маянская Н. Н., Панин Л. Е. // Вопр. мед. химии. — 1984. — № 6. — С. 53—56.
6. Мергвецов П. П. Гормональная регуляция экспрессии генов. — М., 1986.
7. Панин Л. Е. Биохимические механизмы стресса. — Новосибирск, 1983.
8. Панин Л. Е. // Вопр. мед. химии. — 1987. — № 5. — С. 96—102.
9. Панин Л. Е., Маянская Н. Н. Лизосомы: Роль в адаптации и восстановлении. — Новосибирск, 1987.
10. Панин Л. Е., Филатова Т. Г. // Пробл. эндокринол. — 1986. — № 4. — С. 69—71.
11. Blobel G., Potter V. R. // J. molec. Biol. — 1967. — Vol. 26, N 2. — P. 279—292.
12. Chauveau J., Moule Y., Rouiller C. // Exp. Cell Res. — 1956. — Vol. 11. — P. 317—321.
13. Hatch F. T., Lees R. S. // Advanc. Lipid Res. — 1968. — Vol. 6. — P. 2—68.
14. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265—275.

Поступила 07.02.89

#### BLOOD PLASMA HIGH DENSITY LIPOPROTEINS AS MODULATORS OF SPECIFIC HORMONAL EFFECT OF HYDROCORTISONE

L. E. Ranin, N. N. Mayanskaya, I. G. Svechnikova

Institute of Experimental Medicine, Siberian Branch of the Academy of Medical Sciences of the USSR, Novosibirsk

Hydrocortisone affected less distinctly the gene expression in rat liver slices as compared with the simultaneous effect of the hormone and blood plasma high density lipoproteins (HDL). These substances acted cooperatively and the phenomenon observed was not reproduced by means of individual components. The protein moiety of HDL, but not of lipid part of the molecule, was of importance in realization of the effect. Inhibitors of lysosomal proteinases (pepstatin, soy bean inhibitor of trypsin and iodoacetamide) as well as inhibitors of lysosomes intracellular translocation (colchicine and vinblastin) blocked completely the cooperative action of hydrocortisone and HDL. Hydrocortisone-dependent activation of chromatin and stimulation of genes expression led to an increase in the binding constant of acridine orange with DNA, while molar concentration of binding sites of the probe was practically unaltered. At the same time, simultaneous effect of hydrocortisone and HDL did not alter the constants for acridine orange binding but concentration of the probe binding sites with DNA was distinctly increased.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616-006.81-06:1616.154:577.164.121-008.64-07

Ю. В. Букин, М. Я. Курицман, А. Ф. Мукерия, Д. Г. Заридзе

#### ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ НЕДОСТАТОЧНОСТЬ РИБОФЛАВИНА У БОЛЬНЫХ МЕЛАНМОЙ

ИИИ канцерогенеза ВОИЦ АМН СССР, Москва

Ранее полагали, что в плазме крови основная часть рибофлавина, служащего источником образования в клетках коферментных форм витамина  $B_2$  — ФМН и ФАД, присутствует в виде комплексов с альбумином [7]. Однако было показано [9], что при физиологических концентрациях витамина 10-кратные индивидуальные раз-



личия в величинах связывания ( $2\text{-}^{14}\text{C}$ ) рибофлавина белками плазмы крови здоровых доноров обусловлены образованием его комплексов с иммуноглобулинами, которые связывают рибофлавин значительно более прочно, чем альбумин. Аномально высокие величины связывания рибофлавина иммуноглобулинами плазмы крови выявлены при обследовании больных с некоторыми злокачественными новообразованиями [10]; статистически значимые отличия от нормы выявлены у больных меланомой и раком молочной железы. Природа иммуноглобулинов, связывающих рибофлавин, характер взаимодействия рибофлавина с иммуноглобулинами и физиологическое значение рибофлавинсвязывающих иммуноглобулинов в норме и при патологии остаются неясными. Комплексообразование рибофлавина с иммуноглобулинами плазмы крови происходит в результате ассоциации витамина с недостаточно охарактеризованными субфракциями IgG и IgA [9, 10]; реакция комплексообразования носит, возможно, неспецифический характер, но нельзя исключить при некоторых патологических состояниях взаимодействия отдельных субклассов иммуноглобулинов с витаминами по типу антиген — антитело, как это было показано, например, при обследовании больного множественной миеломой [8].

С физиологической точки зрения комплексообразование рибофлавина с белками плазмы крови представляется в норме важным процессом, который предупреждает быстрое удаление рибофлавина с мочой и тем самым поддерживает в циркулирующей крови депо легкоомobile-уемого витамина. Однако отмеченное у некоторых онкологических больных аномально высокое содержание в плазме крови иммуноглобулинов, относительно прочно связывающих рибофлавин, может в принципе существенно нарушать динамику обмена витамина в организме и оказывать по крайней мере 2 метаболических эффекта: ограничивать экскрецию свободного рибофлавина с мочой и доступность рибофлавина для тканей, лимитируя образование в клетках коферментных форм витамина. Первый из указанных эффектов находит прямое и косвенное подтверждение в ряде исследований. Было показано, в частности [4], что у ряда онкологических больных экскреция рибофлавина с мочой до и после нагрузки витамином значительно снижена по сравнению с нормой. Найдено также, что избыточная продукция рибофлавинсвязывающего белка IgG у больного множественной миеломой [5] ассоциируется с низкими величинами экскреции витамина с мочой [11]. Возможная функциональная недостаточность рибофлавина у онкологических больных из-за развивающегося дефицита коферментных форм витамина  $\text{B}_2$  в тканях до настоящего времени оставалась неизученной. Учитывая имеющиеся данные об аномально высоких величинах связывания рибофлавина плазмой крови и фракцией иммуноглобулинов у больных меланомой [10], мы изучили при этом заболевании функциональную обеспеченность организма витамином  $\text{B}_2$ , используя в качестве широко апробированной функциональной тест-системы ФАД-зависимую эритроцитарную глутатионредуктазу (ЭГР; КФ 1.6.4.2). По данным литературы [2, 7

Коэффициент активации (КА) ЭГР у больных меланомой

Обследуемая группа и КА	Распределение КА в группах		Обеспеченность организма витамином $\text{B}_2$
	интервал КА	% от числа наблюдений	
Контроль (20)	0,91—1,13	100	Норма
Больные меланомой (36)	0,94—1,62	100	Резкие различия
из них: (18)	0,94—1,20	50	Норма
(8)	1,21—1,28	22	Частичный дефицит
(10)	1,31—1,62	28	Выраженный »

Примечание. В скобках — число наблюдений при различных уровнях КА.

12], повышение активности ЭГР в присутствии добавок в пробы ФАД на 21—30 или на 31 % и выше (коэффициент активации ЭГР, равный 1,21—1,30 или 1,31 и выше) указывает соответственно на частичный или выраженный дефицит в организме витамина  $\text{B}_2$ .

Методика. Коэффициент активации ЭГР (ФАД-эффект) при заболевании меланомой изучали у 36 больных обоего пола в возрасте 19—59 лет. Кровь для анализа брали во время пребывания больных в стационаре или при посещении ими поликлинического отделения ВОИЦ АМН СССР в связи с метастазированием опухоли и проведением курса химиотерапии. Контролем при определении ФАД-эффекта служила кровь здоровых доноров (10 человек) и кровь 10 здоровых сотрудников отделения эпидемиологии и профилактики опухолей НИИ канцерогенеза ВОИЦ АМН СССР, взятая при прохождении очередного диспансерного обследования. В целом контрольная группа включала 20 лиц обоего пола в возрасте 30—57 лет. Коэффициент активации ЭГР определяли в стандартных условиях [12], регистрируя скорость ферментативной реакции в присутствии ФАД или без него в течение 10 мин при  $37^\circ\text{C}$  в термостатированных кюветах размером 1 см на спектрофотометре фирмы «Beckman-26» (США). В работе использовали ФАД фирмы «Merck» (ФРГ), окисленный глутатион фирмы «Reanal» (ВНР), НАДФ- $\text{H}_2$  фирмы «Serva» (ФРГ) и ЭДТА- $\text{Na}_2$  отечественного производства квалификации химически чистый.

Результаты и обсуждение. Данные, полученные при изучении ФАД-эффекта у больных меланомой, суммированы в таблице. Как следует из приведенных результатов, у половины больных меланомой выявлена функциональная недостаточность рибофлавина (коэффициент активации ЭГР 1,21 и выше). Почти у 30 % обследованных больных коэффициент активации ЭГР превышал величину 1,31, что свидетельствует о выраженном дефиците витамина  $\text{B}_2$ . Сопоставление полученных индивидуальных величин активации ЭГР с возрастом больных, длительностью заболевания, временем, прошедшим после удаления первичного опухолевого очага, наличием метастазов, проведением курса химиотерапии или лучевой терапии не выявило какой-либо зависимости между этими параметрами. Отсутствие видимой связи между аномально высокими величинами связывания рибофлавина белками плазмы крови больных меланомой и такими показателями, как пол, возраст больного, характер химиотерапевтического вмешательства, было отмечено ранее [10]. Однако для окончательных выводов в обоих случаях требуется более подробное обследование в динамике значительно большего числа больных.

Следует отметить, что при назначении 2 боль-



ным меланомой высоких доз рибофлавина (1 раз в день по 50 мг перорально в течение 3 дней) высокие исходные коэффициенты активации ЭГР (1,32 и 1,54) снизились до нормы (соответственно до 0,90 и 1,05). Нормализация витаминного статуса организма при функциональном дефиците рибофлавина у онкологических больных может иметь важное значение и повышать резистентность организма к опухоли, поскольку участие ФАД-зависимых ферментов в энергетическом обмене, биосинтезе нуклеиновых кислот, биосинтезе S-аденозилметионина и других физиологически активных соединений играет существенную роль в функции надпочечников и формировании гуморального и клеточного иммунитета [2, 7]. Показано, в частности, что при гиповитаминозе В<sub>2</sub> нарушается образование антител и снижается фагоцитарная активность [5, 6].

В последние годы дефицит рибофлавина в организме рассматривается в качестве одного из возможных факторов, повышающих риск канцерогенных воздействий [1, 3]. Возможная патобиохимическая роль алиментарных и метаболических арибофлавинозов на разных стадиях канцерогенеза, а также на ранних и поздних стадиях роста злокачественных опухолей заслуживает всестороннего изучения в целях своевременной витаминопрофилактики рака или стимуляции иммунологической реактивности онкологических больных.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Букин Ю. В. // *Вопр. онкол.*— 1986.— № 11.— С. 35—49.
2. Гвоздева Л. Г., Смирнова А. И. // *Методы оценки и контроля витаминной обеспеченности населения* // Под ред. В. Б. Спиричева.— М., 1984.— С. 72—78.
3. Коган Я. А. // *Хирургия.*— 1960.— № 2.— С. 103—108.
4. Плещитый К. Д. // *Тер. арх.*— 1980.— № 2.— С. 131—140.
5. Плещитый К. Д. // *Вопр. питания.*— 1981.— № 3.— С. 3—10.
6. Cooperman J. M., Lorez R. // *Handbook of Vitamins, Nutritional, Biochemical, and Clinical Aspects* / Ed. L. J. Machlin.— New York, 1984.— P. 299—327.
7. Farhangi M., Osseman E. F. // *New Engl. J. Med.*— 1976.— Vol. 294.— P. 177—183.
8. Innis W. S. A., McCormick D. B., Merrill A. H. Jr. // *Biochem. Med.*— 1985.— Vol. 34.— P. 151—165.
9. Innis W. S. A., Nixon D. W., Murray D. R. et al. // *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*— 1986.— Vol. 181.— P. 237—241.
10. Pinto J., Huang Y. P., Chaudhuri R., Rivlin R. S. // *Clin. Res.*— 1975.— Vol. 23.— P. 426-A.
11. Prentice A. M., Bates C. J. // *Brit. J. Nutr.*— 1981.— Vol. 45.— P. 37—65.
12. Zaridze D. G. // *Wld Rev. Nutr. Diet.*— 1986.— Vol. 48.— P. 195—221.

Поступила 14.03.89

#### FUNCTIONAL RIBOFLAVIN DEFICIENCY IN PATIENTS WITH MELANOMA

Yu. V. Bukin, M. Ya. Kurzman, A. F. Mukerija, D. G. Zaridze

Institute of Carcinogenesis, All-Union Cancer Research Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Preliminary data on the functional riboflavin deficiency in patients with malignant skin melanoma are discussed. In 50 % of 36 patients with skin melanoma the glutathione reductase activation coefficient was higher than 1.21 and in 28 % of the patients — above 1.31. Oral administration of high doses of riboflavin normalized the riboflavin status.

© Н. В. КОЛОМИЕЦ, Т. Ф. ПИРОГОВА, 1990

УДК 616.133.33-074:[616.153.96:577.112.856

Н. В. Коломиец, Т. Ф. Пирогова

#### НЕКОТОРЫЕ ПОДХОДЫ К ХИМИЧЕСКОЙ ХАРАКТЕРИСТИКЕ «АТЕРОГЕННЫХ» И «АНТИАТЕРОГЕННЫХ» КЛАССОВ ЛИПОПРОТЕИДОВ У БОЛЬНЫХ С НЕЙРОСОСУДИСТЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Рижский медицинский институт

Нарушение липидного обмена является признанным фактором риска развития сосудистых заболеваний. Состояние липидного обмена у больных, страдающих атеросклеротическими поражениями коронарных сосудов, изучено достаточно подробно. В то же время роль дислиппротеидов в развитии цереброваскулярного атеросклеротического процесса все еще не ясна, данные литературы о связи нарушений липидного метаболизма с цереброваскулярными заболеваниями малочисленны и противоречивы. Изучение химических компонентов классов липопротеидов (ЛП), выделенных из сыворотки крови больных с нейрососудистыми заболеваниями, поможет определить значение нарушений липидного метаболизма в патогенезе этих заболеваний.

Интерес к исследованию «атерогенных» классов липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) и очень низкой плотности (ЛПОНП) обусловлен связью повышения концентрации этих классов ЛП в сыворотке крови с риском развития атеросклеротических повреждений сосудов [5], хотя, по мнению некоторых авторов, «антиатерогенные» липопротеиды высокой плотности (ЛПВП) являются интегральным показателем, отражающим скорость и эффективность обмена ЛП в организме [8]. В последние годы наибольшее внимание уделяется изучению белковой части ЛП комплексов. Обнаружено, что концентрация апоВ в крови больных ишемической болезнью сердца является более достоверным фактором риска по сравнению с концентрацией липидов, а содержание апоА у этих больных более достоверно коррелирует с клиническими показателями, чем уровень холестерина в ЛПВП [9]. Доказана информативность определения и общего содержания белка в отдельных классах ЛП. Например, степень аномальности ЛПВП, выделенных из крови больных первичным циррозом печени, предлагают характеризовать отношением фосфолипидов в ЛПВП к общему содержанию белка в этом классе ЛП, причем значение этого коэффициента коррелирует с клинической картиной заболевания [14]. В свою очередь полидисперсные ЛПНП с повышенным содержанием белка и коэффициента белок/липиды обнаруживаются чаще у больных атеросклерозом и диабетом по сравнению со здоровыми людьми [12]. Во всех случаях содержание белка в разных классах ЛП определялось после разделения их сложными и занимающими много времени методами ультрацентрифугирования. Однако имеются данные, что классический метод ультрацентрифугирования не является самым подходящим для выделения ЛПВП, так как получаемые при этом ЛПВП «загрязнены» другими ЛП, и степень выделения

их часто ниже 90 %. Кроме того, используемые в высоких концентрациях соли изменяют характеристики ЛП. Наиболее оптимальным методом отделения ЛПВП признается осаждение ЛПНП — ЛПОНП гепарином в присутствии 1 М раствора хлористого марганца [15].

В изучении гетерогенности отдельных классов ЛП [12], апопротеинов сыворотки крови и их изоформ [11, 13] достаточно часто используются различные модификации метода диск-электрофореза в полиакриламидном геле (ДЭФ в ПААГ). При этом применяются предварительное ультрацентрифугирование и делипидирование с помощью различных агентов, что делает процесс исследования трудоемким и не исключает возможности денатурации ЛП белков. Исходя из этого, нами были поставлены задачи с помощью метода ДЭФ в ПААГ, во-первых, проверить полноту разделения классов ЛПВП и ЛПНП — ЛПОНП гепарин-марганцевой смесью и, во-вторых, апробировать способы исследования белкового, липидного и фосфолипидного спектров в классах ЛП, выделенных из сыворотки крови больных с нейрососудистыми заболеваниями.

**Методика.** В работе использовали сыворотку крови человека. Для отделения ЛПВП от ЛПНП и ЛПОНП применяли осаждение ЛПНП — ЛПОНП гепарином в присутствии 1 М раствора хлористого марганца [15]. Надосадок, содержащий ЛПВП, осторожно и по возможности полностью отбирали в другую пробирку. Оставшийся осадок ЛПНП — ЛПОНП растворяли в физиологическом растворе, доводя объем до соответствующего количеству исходной сыворотки. В надосадке, в растворенном осадке и цельной сыворотке определяли содержание белка биуретовым методом [4]. Кроме того, в растворенном осадке определяли содержание белка по Лоури [3] и по измерению степени светопоглощения в ультрафиолетовой области при 280 нм [2]. Калибровочные растворы готовили из альбумина человеческой сыворотки. В надосадке, в растворенном осадке и сыворотке унифицированным методом определяли содержание общих липидов, и в той же сыворотке турбидиметрическим методом по Бурштейну и Самаю определяли содержание ЛПНП — ЛПОНП в условных единицах [4]. Наконец, сыворотку, надосадок и растворенный осадок разделяли с помощью метода ДЭФ в ПААГ. Полиакриламидный гель готовили на реактивах фирмы «Ренал» (ВНР). Электрофорез проводили в столбиках многослойного геля по Пироговой и Дундуре [7]. Образцы исходной сыворотки, надосадка и растворенного осадка наносили каждый на 3 геля. Количество вносимого материала на 1 гель рассчитывали по содержанию белка в исходном образце (по 250 мкг белка в гель), эти гели после окончания электрофореза окрашивали 0,5 % раствором амидо черного 10 Б для выявления белковых фракций. На два других геля тот же образец наносили в другом количестве — из расчета, что в каждый гель должно быть внесено 100 мкг общих липидов. Один из этих гелей после окончания электрофореза окрашивали для выявления ЛП фракций суданом черным Б [7], другой гель инкубировали при 60 °С в специальном растворе, описанном ранее [6] для выявления фосфолипидных фракций. Для количественной оценки выявленные фракции записывали на денситометре ДМ-1, затем рассчитывали электрофоретическую подвижность каждой фракции относительно альбумина ( $R_d$ ) и процентное содержание отдельных фракций.

**Результаты и обсуждение.** Для сопоставлений белковых спектров выделенных из сыворотки крови классов ЛП необходимо точно рассчитать вносимое на гель количество белка в образце. Результаты определения общего белка биуретовым методом в 7 образцах сывороток крови и выделенных из них классов ЛПВП и ЛПНП — ЛПОНП представлены в табл. 1.

Как видно из приведенных данных, биуретовый метод дал завышенные результаты содер-

Таблица 1  
Содержание общего белка в сыворотке крови и фракциях, содержащих ЛПВП и ЛПНП — ЛПОНП

№ образца	Содержание белка, г/л		
	сыворотка крови	фракция ЛПВП	фракция ЛПНП — ЛПОНП
1	70,8	80,0 (70,4)	20,5 (10,9)
2	90,0	95,0 (85,4)	8,8 (—)
3	93,3	94,6 (85,0)	18,5 (8,9)
4	84,0	88,8 (79,2)	10,3 (0,7)
5	89,4	93,6 (84,0)	6,0 (—)
6	76,8	79,8 (70,2)	8,5 (—)
7	71,4	82,4 (72,8)	5,4 (—)

Примечание. Цифры в скобках — см. пояснение в тексте.

жания белка в классах ЛП. Мы допустили, что это связано с присутствием гепарин-марганцевой смеси, используемой для выделения указанных классов, хотя в литературе ссылок на это не обнаружили. Постановка биуретовой реакции с приготовленным 1М раствором гепарин-марганцевой смеси в количестве, соответствующем ее содержанию во фракциях ЛП, дала при фотометрировании величину экстинкции, соответствующую содержанию белка 9,6 г/л. В табл. 1 в скобках приведены данные о содержании белка во фракциях ЛП, когда контролем в реакции служил физиологический раствор с добавлением гепарин-марганцевой смеси. Анализируя этот опыт, видим, что в 4 образцах белок во фракции ЛПНП — ЛПОНП вообще не определялся из-за недостаточной чувствительности биуретового метода, а содержание белка во фракции ЛПВП отражает не только белковую часть ЛП комплекса, но и другие сывороточные белки, не содержащие липидов и не осаждающиеся вместе с ЛПНП — ЛПОНП. Мы попробовали использовать более чувствительный метод Лоури для определения белка в ЛПНП — ЛПОНП, но это оказалось невозможным, поскольку в ходе реакции появлялось постороннее коричневое окрашивание, а в контрольных пробах (физиологический раствор с добавлением гепарин-марганцевой смеси) даже выпадал коричневый осадок. Поэтому для определения белка во фракции ЛПНП — ЛПОНП мы остановились на методе поглощения при 280 нм. Результаты исследования 4 образцов выделенных ЛПНП — ЛПОНП представлены в табл. 2, там же приведены данные определения в исходных сыворотках ЛПНП — ЛПОНП и общих липидов в этом классе ЛП.

Таблица 2  
Содержание белка во фракции ЛПНП — ЛПОНП сыворотки крови

№ образца	Содержание белка в ЛПНП — ЛПОНП, г/л	Содержание ЛПНП — ЛПОНП, усл. ед.	Содержание липидов, г/л
1	8,45	58	4,8
2	6,60	43	4,0
3	16,0	63	4,5
4	28,50	140	4,2

Примечание. Приведенные в первом столбце результаты представляют собой среднее арифметическое из значений нескольких параллельных проб.

Сравнительная характеристика белкового, липидного и фосфолипидного спектров одного образца сыворотки крови

№ геля	Белковый спектр						Липидный спектр						Фосфолипидный спектр					
	сыворотка крови		фракция ЛПНП — ЛПОНП		фракция ЛПВП		сыворотка крови		фракция ЛПНП — ЛПОНП		фракция ЛПВП		сыворотка крови		фракция ЛПНП — ЛПОНП		фракция ЛПВП	
	R <sub>a</sub>	%	R <sub>a</sub>	%	R <sub>a</sub>	%	R <sub>a</sub>	%	R <sub>a</sub>	%	R <sub>a</sub>	%	R <sub>a</sub>	%	R <sub>a</sub>	%	R <sub>a</sub>	%
1	0,87	13,0	0,87	10,5	0,87	13,1	0,88	8,1	0,86	6,1	0,87	10,1	0,85	11,5			0,87	12,1
2	0,78	11,5	0,79	8,6	0,79	13,1	0,81	12,1	0,80	5,9	0,79	19,2						
3	0,73	3,8	0,73	3,4	0,74	3,3												
4	0,69	5,3	0,70	4,3	0,71	6,9	0,71	14,1	0,72	11,9	0,71	26,3	0,71	9,8			0,71	10,3
5	0,65	15,3	0,65	12,3	0,64	18,8	0,64	13,7	0,62	12,7	0,63	17,1	0,65	21,3	0,63	15,0	0,65	29,3
6	0,62	2,3	0,62	3,1	0,60	4,1												
7	0,59	5,3	0,58	4,3	0,56	2,0	0,59	6,9			0,58	13,1	0,58	4,9			0,59	8,6
8	0,54	4,6	0,55	2,5	0,54	2,4	0,56	3,2			0,54	5,1	0,55	4,9				
9	0,50	7,6	0,51	7,4	0,51	5,3					0,49	3,0	0,50	8,2			0,50	5,2
10	0,48	3,1	0,47	2,2	0,49	2,4												
11	0,46	5,3	0,46	4,9	0,47	4,9							0,47	3,3	0,47	10	0,48	10,3
12	0,44	2,3	0,44	3,7	0,45	4,1					0,44	3,0	0,45	3,3	0,42	17,5	0,45	6,9
13	0,40	11,5	0,41	6,2	0,42	9,0	0,41	1,6			0,40	3,0	0,41	9,8	0,39	10,0	0,42	17,2
14	0,37	1,5	0,38	4,3	0,40	3,3												
15									0,25	3,4								
16	0,20	9,2	0,19	5,2			0,20	8,1	0,18	10,2			0,18	8,2				
17			0,14	10,5			0,14	17,7	0,11	28,0			0,12	11,5	0,14	30,0		
18			0,06	1,5														
19	0,04	3,8	0,05	1,9			0,09	4,0										
20	0,02	2,3	0,03	3,4			0,05	10,5	0,04	10,2			0,03	3,3	0,05	7,5		
21									0,01	12,7					0,01	10,0		

Теоретически рассчитанное общее содержание белка в классах ЛПНП — ЛПОНП не превышает 1 г/л. Сопоставление полученного содержания белка во фракциях ЛПНП — ЛПОНП, определенного спектрофотометрическим методом, с рассчитанным теоретически указывает на то, что при добавлении к сыворотке крови гепарин-марганцевой смеси наряду с ЛПНП — ЛПОНП осаждаются и какие-то другие сывороточные белки. Однако обращает на себя внимание тот факт, что содержание белка во фракции ЛПНП — ЛПОНП коррелирует с содержанием ЛПНП — ЛПОНП по Бурштейну и Самаю, но с количеством общих липидов во фракции ЛПНП — ЛПОНП корреляции не обнаружено.

Следующим этапом работы было разделение выделенных классов ЛП методом ДЭФ в ПААГ с последующим выявлением на полученных гелях белкового, липидного и фосфолипидного спектров. Поскольку как белковый, так и липидный спектры сыворотки крови у каждого человека имеют свои индивидуальные особенности, в табл. 3 представлены результаты, полученные при использовании в эксперименте сыворотки крови одного больного.

Результаты, полученные при окрашивании гелей, на которых разгоняли фракцию сыворотки крови, содержащую классы ЛПНП — ЛПОНП (гели 2, 5 и 8), и фракцию, содержащую ЛПВП (гели 3, 6 и 9), свидетельствуют о том, что отделение класса ЛПВП гепарин-марганцевой смесью является полным: на гелях 3, 6 и 9 нет окрашенных зон в области ЛПНП. Однако на гелях 2, 5 и 8 видны зоны с подвижностями фракций ЛПВП, что свидетельствует о необходимости проводить повторное осаждение гепарин-марганцевой смесью для получения ЛПНП — ЛПОНП, не загрязненных ЛПВП.

При окрашивании амидо черным 10 Б выделенных ЛПНП — ЛПОНП (гель 2) выявилось большее по сравнению с сывороткой крови (гель 1)

количество фракций в области ЛПНП, так как большое разбавление исходного материала на геле 1 до необходимой для внесения на гель концентрации белка приводит к тому, что содержание некоторых минорных фракций ЛПНП оказывается ниже чувствительности метода. Количество белковых фракций и их подвижность во фракции, содержащей ЛПВП (гель 3), соответствуют таковым сыворотки крови (гель 1), из которой этот класс ЛП был выделен. Сопоставляя белковые спектры попарно с соответствующими липидными спектрами (гели 1—4, 2—5, 3—6), можно заметить, что белковых фракций во всех случаях выявляется больше, чем липидных, но все липидные фракции имеют соответствующие им по электрофоретической подвижности фракции в белковом спектре.

При сопоставлении относительных электрофоретических подвижностей липидных фракций выделенных ЛПНП — ЛПОНП (гель 5) и ЛПВП (гель 6) с фракциями цельной сыворотки (гель 4) видно, что в спектре ЛПВП проявились 2 дополнительные фракции с  $R_a=0,49$  и  $0,44$ ; в спектре ЛПНП — ЛПОНП дополнительная по сравнению с цельной сывороткой фракция имеет электрофоретическую подвижность  $R_a=0,25$ , изменилась и электрофоретическая подвижность двух фракций у катодного конца геля. Если появление новых фракций в классах ЛПВП и ЛПНП — ЛПОНП по сравнению с цельной сывороткой, из которой их выделили, можно, как и при окраске гелей на белки, объяснить относительно меньшим содержанием ЛПВП и ЛПНП — ЛПОНП в образце цельной сыворотки, вносимой в гель, в результате чего какие-то малые фракции могут не выявляться, то отмеченное изменение электрофоретических подвижностей фракций может быть следствием непосредственного воздействия гепарин-марганцевой смеси. Той же причиной мы объясняем появление в гелях 5 и 6 дополнительной окрашенной зоны перед альбумином, по

цвету отличающейся от остальных липидсодержащих фракций.

Интересные данные получены при выявлении фосфорсодержащих фракций в гелях. Фосфолипидный спектр сыворотки крови (гель 7) содержит ряд фракций, отсутствующих в липидном спектре (гель 4), —  $R_f = 0,50, 0,47, 0,45$ , что можно объяснить, во-первых, более высокой чувствительностью метода проявления суданом черным Б фосфолипидных компонентов по сравнению с липидными, а во-вторых, прокрашиванием фосфорсодержащих нелипидных компонентов, наличие которых в сыворотке крови доказано другими авторами [10]. Хотя по некоторым данным [1] синхронность выявления отдельных фракций в параллельных пробах при разделении сыворотки крови методом ДЭФ в ПААГ и окраске на белки не превышает 72 %, в наших экспериментах при постановке параллельных проб мы получили воспроизводимость 100 %, поэтому можем утверждать, что наблюдаемое распределение фосфолипидного спектра по отношению к липидному носит явно не случайный характер. «Дополнительные» фосфолипидные фракции во всех обследованных образцах сыворотки крови наблюдались в области фракции «медленных» ЛПВП.

Таким образом, изучение белкового, липидного и фосфолипидного спектров сыворотки крови методом ДЭФ в ПААГ продемонстрировало достаточную полноту отделения класса ЛПВП от ЛПНП — ЛПОНП с помощью осаждения гепарин-марганцевой смесью. Кроме того, изучение сыворотки крови больных, страдающих различными формами цереброваскулярных заболеваний, указанным методом позволило установить, что имеются характерные существенные различия как между белковым, липидным и фосфолипидным спектрами сыворотки крови больных и здоровых людей, так и при различных клинических формах нейрососудистых заболеваний.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ларуни А. С. // Вопр. мед. химии. — 1987. — № 4. — С. 141—142.
2. Бэйли Дж. Методы химии белков: Пер. с англ. — М., 1965. — С. 266—270.
3. Биохимические методы исследования в клинике / Под ред. А. А. Покровского. — М., 1969. — С. 62—63.
4. Колб В. Г., Камышников В. С. Справочник по клинической химии. — Минск, 1982. — С. 31—33; 202—203; 241—242.
5. Климов А. Н. // Биохимия липидов и их роль в обмене веществ. — М., 1981. — С. 45—75.
6. Коломисц Н. В., Пирогова Т. Ф., Ковш О. Я. и др. // Изменение липидного обмена при патологии внутренних органов. — Рига, 1987. — С. 40—46.
7. Пирогова Т. Ф., Дундуре Б. Л. // Изв. АН ЛатвССР. — 1972. — № 1. — С. 68—71.
8. Титов В. П., Чернядьева И. Ф. // Лаб. дело. — 1987. — № 8. — С. 561—640.
9. Титов В. П., Чернядьева И. Ф., Аламдарова И. П., Осипов С. Т. // Там же. — 1983. — № 6. — С. 29—38.
10. Торховская Т. И., Халидов Э. М., Фортинская Е. С. и др. // Всесоюзный биохимический съезд, 5-й: Тезисы стендовых сообщений. — М., 1986. — Т. 3. — С. 139—140.
11. Hostmark A. T., Lystad E., Spydevold O. et al. // Biochem. Med. — 1984. — Vol. 31, N 1. — P. 56—64.
12. Fisher W. R. // Metabolism. — 1983. — Vol. 32, N 3. — P. 283—291.
13. Kane J. P. // Analyt. Biochem. — 1973. — Vol. 53. — P. 350—364.
14. Teramoto T., Kato H., Hashimoto J. et al. // Clin. chim. Acta. — 1985. — Vol. 149. — P. 135—148.
15. Wiebe D. A., Smith S. J. // Clin. Chem. — 1985. — Vol. 31, N 5. — P. 746—750.

Поступила 14.03.89

#### SOME APPROACHES TO CHEMICAL CHARACTERISTICS OF "ATHEROGENOUS" AND "ANTIATHEROGENOUS" LIPOPROTEINS IN PATIENTS WITH NEUROVASCULAR DISEASES

N. V. Kolomiets, T. F. Pirogova

Medical School, Riga

Purity of various classes lipoproteins was analyzed after precipitation of low and very low density lipoproteins by means of heparin in presence of 1 M  $MnCl_2$ . Polyacrylamide gel disc electrophoresis was chosen to be suitable procedure for studies of protein, lipid and phospholipid spectra of individual lipoprotein classes in order to evaluate the state of lipid metabolism in patients with various clinical forms of cerebrovascular pathology.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.36-008.93:662.232.4.91-07

Л. А. Кожемякин, К. Н. Зеленин, Ю. Ю. Бонитенко, Л. И. Иванова, А. Ю. Ершов, А. В. Земляной, М. А. Королёк

#### ИНГИБИТОРЫ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ОСНОВНЫЕ ФЕРМЕНТНЫЕ СИСТЕМЫ, ОКИСЛЯЮЩИЕ АЛИФАТИЧЕСКИЕ СПИРТЫ

Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Ленинград

Изучение механизмов окисления алифатических спиртов в печени человека и млекопитающих привлекает внимание исследователей в связи с разработкой средств фармакологической коррекции нарушений метаболизма в условиях интоксикации данными соединениями.

Окисление спиртов происходит с участием 4 ферментативных систем алкогольдегидрогеназы (АДГ, КФ 1.1.1.1), микросомальной этанолюкисляющей системы (МЭОС), каталазы (КФ 1.1.1.16) и ксантиноксидазы (КСО, КФ 1.2.3.2) [2, 11]. Механизм биотрансформации алифатических спиртов протекает по типу «летального синтеза», поэтому весьма актуальной и перспективной является идея использования ингибиторов АДГ для лимитирования скорости их окисления в клетках печени [10, 19, 22]. Наличие в составе активного АДГ атомов цинка и многочисленных SH-групп позволяет предполагать, что вещества, способные связывать цинк, взаимодействовать с SH-группами фермента или комплексами АДГ — НАД и АДГ — НАДН, могут быть потенциальными ингибиторами АДГ [8].

Известен широкий спектр веществ, способных ингибировать АДГ, однако высокая токсичность и ограниченная доступность не позволяет использовать их в качестве антидотов [7—9].

Целью работы явилась сравнительная характеристика соединений 4 основных классов ингибиторов АДГ: 4-метилпиразола, изовалерамида, ДМСО и диоксима бензоилуксусного альдегида (ДБУА). Последний является представителем новой группы веществ — диоксимов, эффективно подавляющих активность АДГ. Кроме того, исследовалось действие данных соединений *in vitro*

# Константы ингибирования АДГ печени крыс и печени лошади

Ингибитор	K <sub>i</sub> , mM		Тип ингибирования
	АДГ печени лошади	АДГ печени крысы	
4-Метилпиразол	0,000013 [9]	0,000041	Конкурентный
ДМСО	5,0 [20]	2,64	Бесконкурентный
Изовалерамид	0,020 [7]	0,062	»
ДБУА	—	0,040	Смешанный конкурентный — неконкурентный
		0,086*	

Примечание. Звездочкой обозначены значения K<sub>i</sub> — константы диссоциации комплекса фермент — ингибитор — субстрат (EIS).

на ферменты альтернативного пути окисления спиртов: каталазу, КСО, МЭОС и альдегиддегидрогеназу (КФ 1.2.1.3).

**Методика.** В опытах использовались беспородные крысы-самцы массой 150—200 г. Животных забивали под легким эфирным наркозом, печень перфузировали холодным физиологическим раствором, измельчали и гомогенизировали в фосфатном буфере 0,1 М рН 7,4 при 4 °С. Гомогенат центрифугировали 10 мин при 1000 g. Затем надосадочную жидкость центрифугировали 10 мин при 14 000 g. Осадок митохондрий промывали, обрабатывали 9 % раствором тритона Х-100 и использовали для определения активности альдегиддегидрогеназы [14]. Надосадок центрифугировали в течение 1 ч при 105 000 g, и в надосадочной жидкости определяли активность АДГ, КСО и каталазы.

Активность АДГ определяли по скорости восстановления п-нитрозодиметиламинина (НДМА), поскольку, как было показано М. С. Усатенко, данный метод является более чувствительным по сравнению с традиционным [4]. Инкубационная среда содержала 2 мл 26 мкМ п-НДМА в Na-пирофосфатном буфере 0,05 М рН 8,8; 0,1 24 мМ раствора НАД<sup>+</sup> и 0,1 мл 0,41 М раствора этилового спирта. Реакцию запускали добавлением цитозольной фракции, полученной после ультрацентрифугирования. Изменение оптической плотности регистрировали с минутным интервалом в течение 5 мин при 440 нм на спектрофотометре СФ-26 при температуре 25 °С. Исследуемые вещества добавляли в инкубационную среду перед добавлением субстрата в конечной концентрации 0,15 мМ. Кинетические константы ферментативных реакций определяли методами графического анализа [12, 13, 16].

Общую альдегиддегидрогеназную активность митохондриальной фракции печени определяли спектрофотометрически по поглощению при 340 нм [14]. Реакционная смесь содержала: 50 мМ 0,1 М Na-пирофосфатного буфера рН 8,8; 0,5 мМ НАД; 5 мМ ацетальдегида; 1 мкМ амиталя; 0,5 мМ гидроксиламинхлорида.

Активность каталазы определяли по методу F. Roland [21], активность КСО — по методу Н. М. Kalsar, основанному на измерении увеличения содержания мочевой кислоты в пробе после инкубации раствора ксантина с биологическим образцом [15].

Осадок микросом, полученный после ультрацентрифугирования, использовали для определения активности МЭОС, о которой судили по степени окисления метилового спирта. Количество образующего формальдегида определяли по Эншу [18]. Белок определяли по Лоури [17].

Препараты ингибиторов — ДБУА, 4-метилпиразола, изовалерамида — были синтезированы по методам соответственно [5—7]. Частоту полученных соединений проверяли методом тонкослойной хроматографии. ДМСО использовали марки х. ч., дважды перегнанный непосредственно перед опытом.

Результаты обработаны статистически с использованием критерия Стьюдента.

**Результаты и обсуждение.** Успешная фармакологическая модуляция активности алкогольметаболизирующих систем *in vivo* возможна только после тщательного определения основных свойств используемых препаратов *in vitro*. К таким свойствам относится характер ингибирования и соотношение степени ингибирования различных путей окисления спиртов. Кинетические характе-

ристики изучаемых соединений приведены в таблице. Исходя из полученных констант ингибирования, можно расположить исследуемые вещества по убывающей эффективности их действия на АДГ в следующем порядке: 4-метилпиразол→ДБУА→→изовалерамид→ДМСО. Как показывает сравнение с данными литературы по ингибированию *in vitro* АДГ печени лошади, соотношение констант ингибирования для первых 3 веществ сохраняется, хотя они несколько ниже, чем константы ингибирования АДГ печени крысы [7, 9, 20]. Как видно, наибольшим сродством к АДГ обладает 4-метилпиразол, но в экспериментах *in vivo* было установлено, что вследствие конкурентного характера ингибирования при насыщающих концентрациях спиртов он становится малоэффективным [9]. Изовалерамид и ДБУА имеют более высокие K<sub>i</sub>, но данные соединения обладают низкой токсичностью (ЛД<sub>50</sub> > 3 г/кг), хорошо растворимы в воде и их эффективность в меньшей степени зависит от концентраций спиртов [1, 7].

Результаты исследования влияния ингибиторов АДГ на ферменты альтернативного пути окисления спиртов показали, что 4-метилпиразол и изовалерамид в дозах, эффективно тормозящих активность АДГ (0,15 мМ), не влияли на активность каталазы, КСО и МЭОС. Наиболее активным оказался ДБУА. На фоне ингибирования МЭОС и альдегиддегидрогеназы на 63 и 54 % соответственно он активировал каталазу на 44 % и КСО на 56 %.

Известно, что основные токсические эффекты спиртов связаны с гипертрофированностью пула пиридиннуклеотидов, обусловленной реактивностью АДГ и накоплением промежуточных продуктов [3]. Результаты, полученные *in vitro*, позволяют предположить, что ДБУА благодаря комплексному действию на изучаемые ферментные системы способен ослабить негативные последствия действия спиртов на организм. Так, ингибирование АДГ на фоне активации каталазы и КСО должно привести к снижению концентрации токсических метаболитов и переходу метаболизма спиртов на НАД-независимый путь, т. е. к уменьшению образования восстановленных форм пиридиннуклеотидов [3].

Таким образом, сравнение *in vitro* действия изучаемых соединений на ферментные системы, окисляющие алифатические спирты, показало, что новый ингибитор АДГ — ДБУА, обладающий низкой токсичностью и избирательной биологической активностью, является перспективным соединением для дальнейшего изучения его свойств *in vivo* как возможного антидота.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Иванова Л. И., Еришов А. Ю. // Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова: Науч. конф. молодых ученых, 9-я: Тезисы докладов. — Л., 1986. — С. 48.
2. Метелица Д. И., Попова Е. М. // Биохимия. — 1979. — Т. 44. — С. 1932—1935.
3. Метелица Д. И. Активация кислорода ферментными системами. — М., 1982.
4. Усатенко М. С., Федюлина М. А., Бойкий И. В., Бородин Ю. С. // Вопр. мед. химии. — 1984. — № 5. — С. 33—36.
5. Answers H. // Chem. Ber. — 1934. — Bd 67. — S. 1062.
6. Brederick H., Herliker H., Schweizer E. H. // Ibid. — 1960. — Bd 93, N 5. — S. 1208—1211.
7. Chadha V. K., Leidal K. G., Plapp B. V. // J. med.

- Chem.— 1983.— Vol. 26, N 6.— P. 916—921.
8. Chadha V. K., Leidal K. G., Plapp B. V. // Ibid.— 1985.— Vol. 28, N 1.— P. 36—40.
  9. Cederbaum A. J., Berl L. // Arch. Biochem.— 1982.— Vol. 216, N 2.— P. 530—543.
  10. Clay K. L., Murphy R. S., Watkins D. W. // Toxicol. appl. Pharmacol.— 1975.— Vol. 34, N 1.— P. 49—61.
  11. Copen G. Alcohol and Aldehyde Metabolising Systems.— New York, 1977.
  12. Cornish-Bowden A. // Biochem. J.— 1974.— Vol. 137, N 1.— P. 143—144.
  13. Dixon M. // Ibid.— 1953.— Vol. 55, N 1.— P. 170—171.
  14. Feidincen R. J., Weiner H. // J. biol. Chem.— 1972.— Vol. 247, N 1.— P. 260—266.
  15. Kalcir H. M. // Ibid.— 1947.— Vol. 167, N 2.— P. 429—443.
  16. Lineweaver H., Burk D. S. // J. Amer. Chem. Soc.— 1934.— Vol. 56.— P. 658—666.
  17. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem.— 1951.— Vol. 193, N 1.— P. 265—275.
  18. Nash T. // Biochem. J.— 1953.— Vol. 55, N 2.— P. 416—421.
  19. Parry M. F., Wallach M. D. // Amer. J. Med.— 1974.— Vol. 57, N 1.— P. 143—150.
  20. Perlman R. L., Wolfs S. // Science.— 1968.— Vol. 160, N 3825.— P. 317—319.
  21. Roland F., Beers J. R., Siser J. W. // J. biol. Chem.— 1952.— Vol. 195, N 1.— P. 133—140.
  22. Thurman R. G., Wendell G. D. // Biochem. Pharmacol.— 1979.— Vol. 28, N 2.— P. 273—279.

Поступила 29.03.89

# INHIBITORS OF ALCOHOL DEHYDROGENASE AND THEIR EFFECT ON MAIN ENZYMATIC SYSTEMS INVOLVED IN OXIDATION OF ALIPHATIC ALCOHOLS

L. A. Kozhemyakin, K. N. Zelenin, Yu. Yu. Bonitenko, L. I. Ivanova, A. Yu. Ershov, A. V. Zemlyanov, M. A. Korolyuk  
S. M. Kirov Military-Medical Academy, Leningrad

Effects of four main inhibitors of rat liver tissue alcohol dehydrogenase (4-methyl pyrasol, dimethyl sulfoxide, amide isovaleric acid and dioxime benzoylacetate aldehyde) were studied. Constants and type of inhibition of these substances were evaluated. Effects of these inhibitors on alternative pathways of aliphatic alcohols oxidation were studied: on microsomal ethanol oxidizing system, catalase, xanthine oxidase and on aldehyde dehydrogenases.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.12-008.331.1-07:[616-018.1:576.314]-008.9

А. А. Сюрин, Ю. И. Кулагин, Е. И. Аникин, А. Ф. Прохода, С. Б. Кабелюженко, Л. И. Щербина

## ФУНКЦИЯ МЕМБРАННЫХ Са-АТФаз И НЕФЕРМЕНТАТИВНОЕ ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН У БОЛЬНЫХ ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ

Крымский медицинский институт, Симферополь

Определенная роль в возникновении и формировании гипертонической болезни (ГБ) принадлежит кальциевой перегрузке тканей [10, 14]. По мнению ряда авторов, ее причиной является функциональная недостаточность мембранных Са-АТФаз, обусловленная системным генетически детерминированным дефектом клеточных мембран. Этот дефект проявляется уменьшением сродства Са-насоса к  $\text{Ca}^{2+}$  и снижением эффективности стимуляции кальмодулином максимальной активности Са-АТФаз [11, 18]. Однако на модели ГБ (у спонтанно гипертензивных крыс) получены данные о вероятном усилении процессов выведения кальция из клетки [9].

Проницаемость клеточных мембран для кальция, функциональная активность мембранных транспортных АТФаз могут быть связаны, как известно, и со структурно-функциональными изменениями липидной компоненты мембран под влиянием неферментативного перекисного окисления липидов (ПОЛ) [2, 7, 17], интенсификация которого с развитием количественных и качественных изменений мембранных липидов обнаружена ранее у больных ГБ [12, 13].

Целью настоящего исследования было изучение активности мембранных Са-АТФаз у больных ГБ в различные периоды клинического течения во взаимосвязи со степенью выраженности ПОЛ клеточных мембран.

**Методика.** Исследовано 23 больных ГБ II стадии (по классификации ВОЗ) в возрасте  $42 \pm 3,5$  года, госпитализированных в терапевтическую клинику в связи с возникновением гипертонического криза. Больные получали стандартное комплексное лечение (в том числе медикаментозное — вазодилаторы, салуретики, антиадренергические средства, транквилизаторы). Группу контроля составили 45 здоровых добровольцев в возрасте  $38 \pm 2,7$  года. В мембранах эритроцитов однократно у здоровых и в динамике у больных ГБ (на 1, 2 и 3—4-й неделях от начала возникновения гипертонического криза) были исследованы активность Са-АТФаз, количество общих липидов, уровень продуктов ПОЛ. Активность Са-АТФаз определяли по методике [5], уровень первичных продуктов ПОЛ — диеновых конъюгатов и кетонов — по модифицированной методике [4], вторичных продуктов — малонового диальдегида — по модифицированной нами методике [15], липидов — по [1]. Мембраны эритроцитов получали по способу [7].

**Результаты и обсуждение.** У больных ГБ в течение 1-й недели от начала возникновения гипертонического криза (см. таблицу) активность мембранных Са-АТФаз по сравнению с уровнем у здоровых возрасла ( $p < 0,001$ ). Этот период обострения заболевания характеризовался лишь тенденцией к нормализации артериального давления (АД) под влиянием активной терапии и значительной интенсификацией процессов ПОЛ мембран со снижением в них количества липидов. Однако уже на 2-й неделе от начала криза в условиях неустойчивой нормализации АД активность Са-АТФаз падала как по сравнению с предшествующим периодом ( $p < 0,001$ ), так и по сравнению с соответствующим показателем у здоровых ( $p < 0,05$ ). При сохранении повышенного уровня ПОЛ мембран количество первичных и вторичных перекисных продуктов (в % по отношению к таковому у здоровых) достоверно различалось ( $p < 0,01$ ) и составляло соответственно  $115 \pm 3,6$  и  $136 \pm 5,6$ .

На 3—4-й неделе от начала криза при ликвидации клинических проявлений последнего и снижения АД до индивидуально «рабочего» уровня при поддерживающей терапии отмечалась нормализация всех изучаемых показателей.

Таким образом, у больных ГБ при обострении заболевания (кризе) на фоне вспышки перекисного окисления липидов клеточных мембран отмечались достоверные, но разнонаправленные во времени изменения активности мембранных Са-АТФаз. Известно, что с инициацией ПОЛ мембран связан ряд факторов, которые могут приводить к повышению активности Са-АТФаз. Так, возникновение в мембранах перекисных кластеров проницаемости, в том числе для  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$ , увеличивает внутриклеточную концентрацию этих ионов



Показатель	Обследованные			
	здоровые ( $n=43$ )	больные ГБ ( $n=23$ )		
		1-я неделя	2-я неделя	3—4-я неделя
Активность мембранных Са-АТФаз, мкМ неорганического фосфора в 1 ч на 1 мл эритроцитов	$6,48 \pm 0,38$	$8,20 \pm 0,46^*$	$4,88 \pm 0,67^{**}$	$6,83 \pm 0,20^{**}$
Липиды мембран, мг/мл	$2,92 \pm 0,04$	$2,16 \pm 0,06^*$	$2,32 \pm 0,04^{**}$	$2,78 \pm 0,06^{**}$
ПОЛ мембран, ед. экстинкции на 1 мг липидов:				
диеновые конъюгаты и кетоны	$0,052 \pm 0,002$	$0,082 \pm 0,003^*$	$0,060 \pm 0,002^{**}$	$0,050 \pm 0,002^{**}$
малоновый диальдегид	$0,022 \pm 0,001$	$0,036 \pm 0,003^*$	$0,030 \pm 0,002^{**}$	$0,021 \pm 0,001^{**}$

\* Данные достоверно отличаются от таковых у здоровых.

\*\* Данные достоверно отличаются от полученных в предшествующем исследовании.

[7]; активное образование при этом комплекса Са-АТФаза — кальмодулин, возрастание сродства к кальцию соответствующих мест связывания и сокращение длительности рабочего цикла этой системы резко усиливают интенсивность выведения кальция из клетки [3, 16]. Вместе с тем каталитическая активность Са-АТФаз существенно снижается под влиянием накопления в мембранах гидрперекисей липидов [6]. В нашем случае на 1-й неделе криза активность фермента была повышена весьма умеренно — на 27 %, что, вероятно, подтверждает неодинаковую направленность влияющих на фермент факторов и, следовательно, указывает на его неадекватную (недостаточную) потребностям активность.

Представляется более сложной корреляция с процессами ПОЛ снижения активности Са-АТФаз в периоде 2-й недели от начала гипертонического криза. Так, в частности, изучение полученных в это время данных не позволило обнаружить корреляции между активностью Са-АТФаз и другими определяемыми показателями. Однако рассмотрение динамики ПОЛ мембран позволяет предположить, что одним из факторов, приводящих к снижению активности Са-АТФаз, может быть изменение в структуре продуктов ПОЛ. Нами анализировался прирост первичных и вторичных продуктов ПОЛ и их соотношение. Расчеты показали, что соотношение прироста процентного содержания вторичных продуктов ПОЛ мембран к первичным (так называемый коэффициент диссоциации продуктов ПОЛ мембран) в 1-ю и 2-ю недели от начала криза составляло соответственно 1,1 и 2,4, т. е. существенно повышалось именно на 2-й неделе. При этом между величиной коэффициента диссоциации продуктов ПОЛ на 2-й неделе послекризисового периода и активностью Са-АТФаз выявлена высокая обратная корреляция ( $r = -0,91$ ). Такая зависимость наряду с указанными выше особенностями позволяет объяснить отмеченную двухфазность в изменении активности Са-АТФаз влиянием комплекса факторов, сопутствующих активации неферментативного ПОЛ мембран.

Таким образом, полученные данные позволяют считать, что интенсификация ПОЛ клеточных мембран у больных ГБ сопровождалась функциональной недостаточностью мембранных механизмов выведения кальция из клетки при обострении заболевания. Отмеченные факты обосновывают целесообразность применения антиоксидантов и препаратов — антагонистов кальция в комплексе

ном лечении гипертонического криза. Кроме того, высокая степень достоверности в различии активности Са-АТФаз на 1-й и 2-й неделях от начала криза позволяет проводить мониторинг последнего.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Барышков Ю. А., Вельтищев Ю. Е., Фомина З. П. и др. // Лаб. дело. — 1966. — № 6. — С. 350—352.
2. Бурлакова Е. Б. Биохимия липидов и их роль в обмене веществ. — М., 1981.
3. Вереников А. А., Марахова И. И. Транспорт ионов у клеток в культуре. — Л., 1986.
4. Гаврилов В. В., Мишкорудная М. И. // Лаб. дело. — 1983. — № 3. — С. 33—36.
5. Макаренко Е. В. // Там же. — 1987. — № 2. — С. 14—17.
6. Козлов Ю. П., Каган В. Е., Архипенко Ю. В. Молекулярные механизмы повреждения кислородом системы транспорта кальция в саркоплазматическом ретикулуме скелетных мышц. — Иркутск, 1983.
7. Меерсон Ф. З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. — М., 1989.
8. Петрова М. П., Сербинова Т. В., Васильев П. С. // Лаб. дело. — 1978. — № 8. — С. 503.
9. Пинелис В. Г., Манухина Е. Б., Марков Х. М. // Бюл. экспер. биол. — 1987. — № 2. — С. 151—154.
10. Постнов Ю. В., Орлов С. П., Покудин П. И. и др. // Кардиология. — 1982. — № 12. — С. 63—64.
11. Постнов Ю. В., Орлов С. П. Первичная гипертензия как патология клеточных мембран. — М., 1987.
12. Сюрин А. А., Кулагин Ю. И. // Сов. мед. — 1987. — № 11. — С. 62—65.
13. Сюрин А. А., Кобозев Г. В., Кулагин Ю. И. и др. // Рукопись деп. во ВНИИМИ МЗ СССР № Д-17156 от 15.02.89.
14. Kiowski N., Bolli O., Erne P. et al. // J. cardiovasc. Pharmacol. — 1987. — Vol. 10, Suppl. — 10. — P. 23—27.
15. Ohkava H., Ohishi N., Jagi K. // Analyt. Biochem. — 1979. — Vol. 95, N 2. — P. 351—358.
16. Romero P. J., Romero E. // Biochim. biophys. Acta. — 1984. — Vol. 778. — P. 245—252.
17. Silvis J., Read B., Mc Elhaney R. // Science. — 1978. — Vol. 199. — P. 902—904.
18. Higaki J., Ogihara T., Kumahara Zn. // International Society of Hypertensich: Meeting, 10-th: Abstracts. — Interlaken, 1984.

Поступила 24.05.89

#### FUNCTIONS OF MEMBRANE-BOUND $Ca^{2+}$ -ATPASES AND NONENZYMATIC LIPID PEROXIDATION IN CELL MEMBRANES OF PATIENTS WITH HYPERTENSION

A. A. Syurin, Yu. I. Kulagin, E. N. Anikin, A. F. Prokhoda, C. B. Kabydyuzhenko, A. I. Scherbina

Crimean Medical School, Simpheropol

Alterations in activity of membrane-bound  $Ca^{2+}$ -ATPases were shown to depend on the rate of lipid peroxidation in cell membranes of patients with hypertension during the period of crisis. On the basis from these results antioxidants

and  $\text{Ca}^{2+}$ -antagonistic drugs could be used for treatment of hypertensive crisis. Monitoring of the disease is possible by means of estimation of the membrane-bound  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases activity.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 615.373:578.245.015.4:612.432 + 612.826.015.2:547.95:547.943.014.46:547.262

Л. Ф. Панченко, Н. Н. Теребилина, В. В. Малиновская, Л. С. Манахова, О. Б. Петриченко, А. М. Балашов

## МОДИФИКАЦИЯ ПОД ВЛИЯНИЕМ $\alpha$ -ИНТЕРФЕРОНА ВЫЗВАННЫХ ЭТАНОЛОМ ИЗМЕНЕНИЙ СОДЕРЖАНИЯ ОПИОИДНЫХ ПЕПТИДОВ В СТРИАТУМЕ И ГИПОФИЗЕ КРЫС

Всесоюзный научный центр медико-биологических проблем наркологии Минздрава СССР; НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР, Москва

Биологическая активность известного антивирусного эндогенного соединения  $\alpha$ -интерферона (ИФ) в настоящее время интенсивно изучается. Можно считать установленным, однако, что функция ИФ как агента антивирусной защиты не является главной в спектре его физиологических свойств. Полагают [5], что основная роль ИФ и родственных соединений сводится к поддержанию гомеостаза в норме и при различных патологических состояниях за счет регуляторного влияния на многие клеточные процессы.

Недавно было показано [4, 6], что ИФ способен влиять на функционирование опиатных систем. Учитывая функциональную принадлежность ИФ к иммунной системе и существенную роль эндогенных опиоидов в обеспечении нервной деятельности, можно предположить, что ИФ участвует в согласовании иммунологического и нейроэндокринного звеньев регуляции. Между тем данные литературы по этому вопросу ограничиваются констатацией факта действия ИФ на опиатные рецепторы [1, 13] или пострецепторные процессы [17], но не затрагивают его возможное влияние на эндогенные опиоидные пептиды. Выяснение этого аспекта биологической активности ИФ явилось одной из задач настоящего исследования.

Вместе с тем известно значение нарушений функций опиатных систем как одного из ведущих звеньев развития алкогольных заболеваний и наркоманий [9], более того, в патогенезе опиоидной

наркомании и алкоголизма реализуются сходные опиоидные механизмы. В этой связи данные о модификации ИФ течения синдрома отмены морфина у крыс [7] могут служить основой для выявления влияния ИФ на вызываемые этанолом изменения состояния опиатных систем, в том числе эндогенных опиоидных пептидов.

## Методика

Исследования выполнены на препаратах тканей гипофиза и стриатума белых беспородных крыс массой 250–280 г. Содержание эндогенных опиоидных пептидов определяли с помощью радиоиммунологического метода, используя коммерческие наборы фирмы «Immuno Nuclear Corp.» (США). Концентрационные величины вычисляли автоматически, используя процессор «Data — Vox», ЛКВ (Швеция) в режиме «оп — line» при сравнении с калибровочной кривой. Радиорецепторные определения проводили, как описано ранее [2]. Раствор этанола (25 % объем/объем) вводили внутривентриально в дозе 4,5 г/кг за 30 мин, а ИФ или плацебо — в боковую желудочку головного мозга ( $10^3$  ед/кг в объеме 20 мкл) или внутривентриально ( $10^4$  ед/кг) за 1 ч до забоя животных. В качестве плацебо использовали смесь белков человека, выделенных согласно процедуре получения ИФ без предварительной индукции лейкоцитов вирусом болезни Ньюкасла. Препарат ИФ из лейкоцитов человека (удельная антивирусная активность  $2,5 \cdot 10^3$  ед/мг белка) и плацебо были получены в отделе интерферона Института эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР.

Результаты подвергали статистической обработке с использованием критерия  $t$  Стьюдента.

## Результаты и обсуждение

Этанол при однократном введении не влиял на содержание  $\beta$ -эндорфина в нейрогипофизе, но снижал его концентрацию в аденогипофизе (табл. 1). Эти результаты согласуются с данными [12] об увеличении уровня  $\beta$ -эндорфина в плазме крови здоровых людей после острого алкогольного отравления. Вместе с тем сведения литературы [14, 15] о влиянии алкоголя на концентрацию  $\beta$ -эндорфина в гипофизе имеют противоречивый характер.

При центральном введении ИФ не оказывал влияния на уровень  $\beta$ -эндорфина в тканях гипофиза, что, вероятно, обусловлено непроницаемостью для него гематоэнцефалического барьера [10]. Напротив, внутривентриальная инъекция ИФ, но не плацебо, приводила к нормализации обусловленного этанолом снижения концентрации  $\beta$ -эндорфина в аденогипофизе, при этом не обнаружено воздействия ИФ на содержание этого нейропептида у интактных крыс.

Таблица 1

Содержание  $\beta$ -эндорфина в гипофизе крыс после однократного введения этанола и ИФ ( $M \pm m$ )

Условия опыта	Область гипофиза	Концентрация $\beta$ -эндорфина, фмоль на 1 мг ткани			
		контроль	ИФ		плацебо внутривентриально
			$10^3$ ед/кг внутрь желудочков мозга	$10^4$ ед/кг внутривентриально	
Физиологический раствор	Нейрогипофиз	$13,66 \pm 1,11$	$16,18 \pm 0,82$	$16,30 \pm 1,29$	—
Этанол	Аденогипофиз	$15,80 \pm 1,67$	$16,72 \pm 1,07$	$15,02 \pm 0,34$	$13,50 \pm 2,10$
Физиологический раствор		$4,25 \pm 0,35$	$4,23 \pm 0,33^{00}$	$3,59 \pm 0,37$	—
Этанол		$2,83 \pm 0,19^{**}$	$3,26 \pm 0,14^*$	$3,76 \pm 0,26^{***,****}$	$2,98 \pm 0,17$

Примечание. Здесь и в табл. 2: представлены результаты 5 определений для каждой группы животных. Концентрация белка и объем вводимого раствора плацебо соответствовали аналогичным величинам для препарата ИФ. Достоверность различия составляет: одна звездочка —  $p < 0,05$ , две звездочки —  $p < 0,01$  — по отношению к контрольной группе, получавшей физиологический раствор; три звездочки —  $p < 0,05$ , получавшей этанол; четыре звездочки —  $p < 0,05$  — по отношению к группе, получавшей плацебо.

Содержание мет-энкефалина в стриатуме крыс после однократного введения этанола и ИФ ( $M \pm m$ )

Условия опыта	Концентрация мет-энкефалина, нг на 1 мг ткани			
	контроль	ИФ		плацебо в желудочки мозга
		10 <sup>3</sup> ед/кг внутривенно	10 <sup>3</sup> ед/кг внутрь желудочков мозга	
Физиологический раствор	0,96 ± 0,11	0,77 ± 0,08	0,99 ± 0,11	—
Этанол	0,61 ± 0,07*	0,54 ± 0,11*	0,38 ± 0,04***,****,*****	0,58 ± 0,11

Полученные результаты можно рассматривать в качестве свидетельства регуляции ИФ процессов высвобождения  $\beta$ -эндорфина из аденогипофиза по механизму обратной связи. Это предположение согласуется со взглядами [16] о наличии общего предшественника для молекул ИФ,  $\beta$ -эндорфина, АКТГ. То обстоятельство, что воздействие ИФ оказывается эффективным лишь при алкоголизации животных, но не наблюдается у интактных крыс, может обуславливаться усилением значения регуляторных процессов в условиях измененного этиловым спиртом состояния клеточных мембран [11] и, вероятно, изменением конформации ассоциированных с ними ИФ-связывающих участков. Пока трудно обсуждать природу рецепции ИФ в аденогипофизе, однако, не исключено, что она имеет опиоидный характер. Маловероятным представляется альтернативное предположение об изменении под воздействием ИФ нисходящей регуляции гипофиза, поскольку в этом случае должна была проявиться его активность при центральном, а не периферическом введении.

Однократное введение крысам этанола приводит к снижению содержания мет-энкефалина в стриатуме (табл. 2), что вероятно, обусловлено усилением его выброса в синаптическую щель. Аналогичные наблюдения были описаны [3].

Системное введение ИФ не влияло на содержание мет-энкефалина у интактных крыс и выраженность эффекта этанола. Однако поступление ИФ в желудочковую систему мозга приводило к более глубокому снижению концентрации нейропептида; тогда как плацебо не изменяло степень влияния этанола на мет-энкефалин. Различия в эффективности ИФ при его центральном введении обусловлены, как и в случае с  $\beta$ -эндорфином, непроницаемостью гематоэнцефалического барьера для ИФ [10]. Выявленное усиление действия этанола на уровень мет-энкефалина в стриатуме под влиянием ИФ может обеспечиваться разными механизмами: мембранотропностью алкоголя [11] и специфическим эффектом ИФ. Специфическая регуляция выброса мет-энкефалина ИФ, предполагая вследствие незначительности использованной его дозы ( $2 \cdot 10^{-8}$  М), может быть опосредована через опиатные рецепторы. Если допустить, что ИФ связывается опиатными рецепторами по антагонистическому типу [4], т. е. блокирует развитие пострецепторных опиоидзависимых процессов, то становится понятным дальнейшее снижение концентрации мет-энкефалина за счет усиленного его выброса из клеток.

Мы проверили это предположение с помощью радиорецепторного анализа, определив способность ИФ вытеснять из активного центра опиат-

ных рецепторов <sup>3</sup>H-налоксон. Величины эффективной концентрации ИФ, обеспечивающей вытеснение из рецептора 50 % метки в присутствии и отсутствии 100 мМ NaCl, составили  $2260 \pm 170$  и  $2190 \pm 150$  ед/мл соответственно, и их отношение было близко к 1. Независимость рецепторного взаимодействия ИФ от катионов  $\text{Na}^+$  является биохимическим доказательством его антагонистического характера. Аналогичные данные получены в электрофизиологических экспериментах [13], авторы которых обнаружили, что взаимодействие ИФ с опиатными рецепторами не приводит к усилению пострецепторной электрической активности клеток коры головного мозга, т. е. осуществляется не по агонистическому типу. Однако, судя по величине эффективной концентрации, опиатная рецепторная активность ИФ и, следовательно, выраженность его антагонистических свойств значительно ниже, чем у «классического» антагониста — налоксона. Этим обстоятельством, на наш взгляд, может объясняться неэффективность ИФ в изменении уровня мет-энкефалина в стриатуме интактных крыс при нормальном физиологическом уровне гомеостаза опиатных систем.

Таким образом, ИФ способен влиять на концентрацию опиоидных пептидов лишь в случае измененного (например, этанолом), состояния опиатных систем, причем механизмы регуляции им уровня мет-энкефалина и  $\beta$ -эндорфина, вероятно, неодинаковы. Найденные различия в действии ИФ на содержание мет-энкефалина и  $\beta$ -эндорфина на фоне алкогольной интоксикации свидетельствуют в пользу представления о различной организации опиатных систем в стриатуме и гипофизе [8], иллюстрируя специфичность активности ИФ в отношении этих образований нервной системы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Лябьева Т. П., Балашов А. М., Панченко Л. Ф. // Нейрохимия. — 1988. — Т. 7, № 1. — С. 73–77.
2. Балашов А. М., Брусов О. С., Балакирева Н. П., Панченко Л. Ф. // Биохимия. — 1981. — Т. 46. — С. 1067–1072.
3. Буров Ю. В., Юхананов Р. Ю., Майский А. И. // Бюл. экспер. биол. — 1983. — № 7. — С. 48–51.
4. Панченко Л. Ф., Лябьева Т. П., Малиновская В. В. и др. // Там же. — 1987. — № 7. — С. 87–89.
5. Хесин Я. Е., Амченкова А. М., Наровлянский А. Н. // Вести. АМН СССР. — 1984. — № 1. — С. 80–84.
6. Blalock J. E., Smith E. M. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1980. — Vol. 77. — P. 5972–5974.
7. Dajny N. // Neuropharmacology. — 1981. — Vol. 22. — P. 647–651.
8. Herz A., Holtt V., Przewlocki R. // Progr. Biochem. — 1980. — Vol. 16. — P. 11–21.
9. Hoffman P. L., Tabakoff B. // Alcohol and Brain. — New York, 1985. — P. 19–68.
10. Jordan G. W. // Molec. Aspects Med. — 1982. — Vol. 5. — P. 197–207.

11. Littleton J. M. // Brit. J. Alcohol Alcoholism.— 1979.— Vol. 14.— P. 23—26.
12. Naher D., Soble M. G., Pickav D. // Pharmacopsychiat.— 1981.— Vol. 14.— P. 160—161.
13. Reyes-Vazquez C., Weisbrodt N., Dafny N. // Life Sci.— 1984.— Vol. 35.— P. 1015—1021.
14. Schultz R., Wüster M., Duka T., Herz A. // Psychopharmacology.— 1980.— Vol. 68.— P. 221—227.
15. Seizinger B. R., Bovermann K., Maysinger D. et al. // Pharmacol. Biochem. Behav.— 1983.— Vol. 18, Suppl. 1.— P. 361—369.
16. Smith E. M., Blalock J. E. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1981.— Vol. 78.— P. 7530—7534.
17. Smith E. M. // Progr. clin. biol. Res.— 1985.— Vol. 192.— P. 259—264.

Поступила 15.07.88

# $\alpha$ -INTERFERON MODIFIED ALTERATIONS, CAUSED BY ETHANOL, IN CONTENT OF OPIOID PEPTIDES IN RAT STRIATUM AND HYPOPHYSIS

L. F. Panchenko, N. N. Terebilina, V. V. Malinovskaya, L. S. Manakhova, O. B. Petrichenko, A. M. Balashov

All-Union Research Centre of Medico-Biological Problems of Narcology, Ministry of Public Health of the USSR; N. F. Gamaleya Institute of Epidemiology and Microbiology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Content of Met-enkephaline in striatum and of  $\beta$ -endorphine in rat hypophysis were estimated after administration of ethanol and  $\alpha$ -interferon into the animals. Ethanol decreased Met-enkephaline content in striatum and of  $\beta$ -endorphine in hypophysis. Preadministration of  $\alpha$ -interferon into brain ventricles before ethanol administration led to an increase in concentration of Met-enkephaline, while content of  $\beta$ -endorphine was unaltered. In peripheric administration  $\alpha$ -interferon normalized content of  $\beta$ -endorphine in adenohypophysis but did not affect the Met-enkephaline concentration. Effects of  $\alpha$ -interferon on content of Met-enkephaline and  $\beta$ -endorphine, related to dissimilar organization of the opiate systems in hypophysis and striatum tissues, are discussed.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 617.713-002.44-036.12-092: [617.764.1-008.831:577.152.34

В. Л. Доценко, Р. И. Нахикян, Н. И. Соловьева, Т. К. Платонова, Г. А. Яровая

## ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ СЛЕЗНОЙ ЖИДКОСТИ КАК ФАКТОРЫ ПАТОГЕНЕЗА ХРОНИЧЕСКИХ ЯЗВ РОГОВОЙ ОБОЛОЧКИ ГЛАЗА

ЦОЛИУВ Минздрава СССР, Москва

Важное место в патологии глаза занимают хронические язвы роговой оболочки глаза, причины развития которых, а также факторы, препятствующие заживлению, до настоящего времени привлекают пристальное внимание исследователей. Это заболевание, связанное с нарушением эпителиального слоя роговицы и более глубокими повреждениями ее стромы, возникает чаще всего как осложнение после тяжелых вирусных инфекций и травм роговой оболочки глаза.

Протеолитические ферменты принимают участие в развитии этого заболевания [20]. Патогенетическая роль некоторых протеиназ исследована при изъязвлениях роговицы, происходящих вследствие химического [10] или термического [8] ожогов, при бактериальных и герпетических инфекциях [7, 22, 24, 27], при отторжении трансплантата после

кератопластики [9, 19]. Источником протеиназ, очевидно, могут служить как клеточные элементы роговицы (эндотелиальные и эпителиальные клетки, кератоциты) [11], так и полиморфноядерные лейкоциты, макрофаги и моноциты, привлеченные в очаг повреждения [11, 19, 27]. Особая роль, по всей вероятности, принадлежит протеолитическим ферментам плазмы крови и их предшественникам, попадающим во влагу передней камеры и слезную жидкость при нарушении проницаемости микрососудов глаза, слезной железы и конъюнктивы. Однако этот вопрос с достаточной полнотой исследован лишь в отношении системы активаторы пламиногена — пламиноген в слезной жидкости больных с хронической язвой роговой оболочки [12, 26].

Между тем исследование природы протеолитических ферментов при этой патологии в доступной для исследования слезной жидкости, омывающей роговую оболочку и конъюнктиву, имеет не только теоретическое, но и практическое значение. Представление о «ферментной среде» слезной жидкости больного глаза необходимо для более полной коррекции патологических процессов, протекающих в изъязвленной роговой оболочке.

## Методика

Слезную жидкость обследуемых больных отбирали в пластиковые контейнеры, замораживали и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ , размораживая только перед исследованием. Изучены образцы слезной жидкости 46 больных, в числе которых 17 мужчин и 29 женщин в возрасте 28—76 лет, поступивших во Всесоюзный НИИ глазных болезней Минздрава СССР для лечения хронических язв роговой оболочки глаза, не поддающихся традиционным методам лечения.

Об уровне протеолитической активности слезной жидкости судили по скорости расщепления N-бензоил-L-аргинин-этилового эфира (БАЭЭ), специфического субстрата для сериновых протеиназ типа трипсина.

Для анализа в кварцевую кювету отбирали 5—10 мкл слезной жидкости, доводили 0,1 мл 0,5 М трис-НСl до pH 8,0, добавляли 1,9 мл 0,05 М трис-НСl pH 8,0 и 1 мл  $1,5 \cdot 10^{-5}$  М раствора БАЭЭ. Скорость реакции определяли в термостатированной кювете при  $37^{\circ}\text{C}$  на спектрофотометре «Hitachi U-3800» (Япония) при длине волны 253 нм.

Чувствительность БАЭЭ-эстеразной активности слезной жидкости к действию  $\epsilon$ -аминокапроновой кислоты ( $\epsilon$ -АКК, фирма «Хемапол», ЧССР, 20 мг/мл), ингибитора трипсина из бобов сои (ИТС, фирма «Реанал», ВНР, 2 мг/мл) и гордокса (фирма «Гедесон Рихтер», ВНР, 10 тыс. Е/мл) анализировали путем сопоставления исходной активности с активностью, не обладающей чувствительностью к действию избытка ингибитора (остаточная активность пробы после инкубации с ингибитором в течение 15 мин при  $37^{\circ}\text{C}$ ). Результаты выражали в процентах к начальной активности. Антириптическую активность и ингибиторную активность  $\alpha_2$ -макрглобулина ( $\alpha_2$ -МГ) определяли методом Т. С. Пасхиной и В. Ф. Нартиковой [5], выражая результаты в ингибиторных единицах (ИЕ) на 1 мл, где 1 ИЕ — это количество ингибитора, подавляющего активность фермента, расщепляющего 1 мкмоль БАЭЭ в 1 мин при pH 8,0 и  $25^{\circ}\text{C}$ . Наличие антигена  $\alpha_2$ -МГ устанавливали твердофазным иммуноферментным методом [3].

В серии экспериментов, поставленных с целью определения в слезной жидкости фактор-ХIIа-подобной активности (активатор прекалликреина), использовали препарат прекалликреина, полученный из плазмы крови человека описанным ранее методом [21]. Исходное прекалликреин-активирующее действие оценивали по приросту БАЭЭ-эстеразной активности прекалликреина после инкубации 10—30 мкл слезной жидкости, 100 мкл прекалликреина ( $150 \text{ нмоль} \cdot \text{мин}^{-1}$ ) и 100 мкл 0,5 М трис-НСl pH 8,0 в пластиковой пробирке в течение 15 мин при  $37^{\circ}\text{C}$ . Перед измерением объем инкубата доводили до 2 мл 0,05 М трис-НСl pH 8,0, добавляли 1 мл раствора БАЭЭ и измеряли результирующую активность в течение 6—9 мин. Наличие в слезной жидкости предшественника фактор-ХII-подобной активности проверяли путем предваритель-

Таблица 2

Коллагенолитическая активность слезной жидкости больных с хроническим изъязвлением роговой оболочки глаза

Образец слезной жидкости	Концентрация белка, мг/мл	Коллагенолитическая активность, мкг коллагена на 1 мг белка
1	9,90	7,9
2	Следы	Следы
3	0,49	»
4	11,17	15,9
5	7,72	17,2
6	8,10	10,6
7	8,85	16,5
8	2,03	57,5

ной обработки образца жидкости трипсином с последующим подавлением последнего овомукоидом; состав пробы: 10—30 мкл слезной жидкости, 100 мкл 0,5 М трис-НСl pH 8,0, 100 мкл трипсина (40 мкг/мл в 0,02 н. HCl) и 100 мкл овомукоида (2 мг/мл).

Активность коллагеназы в исследуемых образцах слезной жидкости определяли по гидролизу [ $^{14}$ C]-ацетилированного коллагена I типа из кожи крыс [18]. Удельная радиоактивность полученных препаратов коллагена составляла  $1,5—2 \cdot 10^6$  имп·мин $^{-1}$ ·мг $^{-1}$ . Пробы объемом 50 мкл, содержащие 50 мкг 0,1 % [ $^{14}$ C]-коллагена в 0,05 М трис-НСl pH 7,5, в присутствии 0,2 М NaCl и 0,005 М CaCl $_2$  инкубировали 2 ч при 37 °C до формирования пленок, представляющих собой реконструированные фибриллы коллагена. Перед употреблением пленки промывали дистиллированной водой, после чего на них наносили аликвоты слезной жидкости по 10—20 мкл и общий объем пробы доводили до 0,2 мл 0,01 М трис-НСl pH 7,5, содержащим 0,005 М CaCl $_2$ . Инкубировали пробы при 37 °C в течение ночи, после чего их центрифугировали и в супернатанте определяли радиоактивность. Коллагенолитическую активность выражали в количестве [ $^{14}$ C]-коллагена, расщепленного ферментом, на 1 мг белка, находящегося в слезной жидкости, или на 1 мл ее объема.

Количество белка в слезной жидкости определяли методом Лоури [23].

## Результаты и обсуждение

Образцы слезной жидкости, отобранные у больных с хронической язвой роговой оболочки, обладали эстеразной активностью по синтетическому субстрату N- $\alpha$ -замещенному этиловому эфиру бензоиларгинина (БАЭЭ). Уровни активности в образцах были в значительной мере неоднородны и колебались от величин, близких к нулю, до 3 мкмоль·мин $^{-1}$ ·мл $^{-1}$ . Контрольные образцы слезной жидкости, отобранные у здоровых людей, практически не проявляли БАЭЭ-эстеразной активности. В табл. 1 приведены индивидуальные или средние величины активностей образцов слезной жидкости в различных группах обследованных больных.

Как известно, эфиры аргинина являются субстратами для сериновых протеиназ трипсинового типа, к которым относятся как плазменные, так и клеточные ферменты, участвующие в формировании очага воспаления: тканевой и плазменный калликреины, некоторые ферменты системы свертывания крови и комплемента, плазмин, его активаторы и другие ферменты [2]. Высокая БАЭЭ-эстеразная активность слезной жидкости свидетельствует о массивном проникновении в нее сериновых протеиназ как из плазмы крови, так и из

клеточных элементов в очаге повреждения роговой оболочки (эпителиальные клетки, кератоциты стромы, полиморфноядерные и мононуклеарные клетки). Весомым подтверждением участия клеток в формировании суммарной протеолитической активности слезной жидкости при хроническом изъязвлении роговицы может служить ее коллагенолитическая активность (табл. 2). Слезная жидкость здорового человека имела близкую к нулю коллагеназную активность.

Высокая активность сериновых протеиназ и коллагеназы в слезной жидкости обследованных больных может, по всей вероятности, служить патогенетическим фактором расширения зоны дефекта роговицы, что вызывает необходимость специфического подавления этой активности при лечении больного.

Природу ферментов в суммарной БАЭЭ-эстеразной активности слезной жидкости устанавливали с помощью ингибиторного анализа — метода, позволяющего по степени уменьшения общей активности образца при действии определенного ингибитора судить о наличии в данном образце того или иного фермента. При анализе результатов такого исследования мы исходили из вероятного присутствия в слезной жидкости основных сериновых протеиназ с БАЭЭ-эстеразным действием, которые обычно присутствуют в очаге воспаления: калликреины плазмы крови и клеток, плазмин и клеточные активаторы плазминогена [2, 4]. При этом принимали во внимание, что  $\epsilon$ -АКК подавляет активность плазмина и его активаторов, но не подавляет активность калликреинов; ИТС тормозит активность калликреина плазмы крови и плазмина, но не подавляет активность калликреина ткани и активаторов плазминогена; и,

Таблица 1  
Суммарная БАЭЭ-эстеразная активность слезной жидкости больных с различными проявлениями язв роговой оболочки глаза

Клиническая форма язвы роговицы	Число больных	Суммарная БАЭЭ-эстеразная активность, мкмоль БАЭЭ× × мин $^{-1}$ × × мл $^{-1}$
Глубокая язва роговицы	13	$1,06 \pm 0,230$
Язва Мурена	6	$0,110 \pm 0,056$
Конъюнктивит, точечная эрозия роговицы	1	0,048
Эрозия роговицы после герпетического стромального кератита	4	$0,327 \pm 0,194$
Глубокий абсцесс роговицы	2	$0,455 \pm 0,459$
Повторная эрозия роговицы после жесткой контактной линзы	1	0,182
Ожог роговицы (дымовая бомба)	3	$0,487 \pm 0,487$
Повторная эрозия после механической травмы	2	$0,236 \pm 0,236$

Таблица 3

Степень подавления БАЭЭ-эстеразной активности отдельных образцов слезной жидкости больных с хроническим изъязвлением роговицы в результате действия ингибиторов сериновых протеиназ

Образец слезной жидкости	Ингибиторы	Активность, мкмоль/мин/мл		% ингибирования
		до воздействия	после воздействия	
1	$\epsilon$ -АКК	1,57	1,43	8,9
	ИТС	1,57	0,41	73,9
2	$\epsilon$ -АКК	1,16	0,27	76,7
	ИТС	1,16	0,55	52,6
3	$\epsilon$ -АКК	1,46	1,50	0,0
	ИТС	1,46	0,55	63,3
	Гордокс	1,46	0,00	100,0

АТА и ингибиторная активность  $\alpha_2$ -МГ в образцах слезной жидкости больных с хронической язвой роговой оболочки глаза, ИЕ/мл

Образец слезной жидкости	АТА	$\alpha_2$ -МГ
1	9,8	0
2	0	0
3	9,0	7,1
4	Не определяли	2,4
5	»	1,1
6	»	1,8
7	»	1,6
8	»	0,55
9	3,3	1,77
10	5,3	1,31
11	4,5	2,62
12	2,9	2,73

наконец, основной тканевый ингибитор протеиназ из органов крупного рогатого скота (типа Кунитца) — гордокс — подавляет активность всех упомянутых протеиназ, кроме активаторов плазминогена [2, 14, 15, 17]. В табл. 3 приведены примеры чувствительности БАЭЭ-эстеразной активности отдельных образцов жидкости больных к действию ингибиторов.

Ингибиторный анализ свидетельствовал о неоднородности образцов слезной жидкости по ферментному составу. Так, уровень эстеразной активности под действием  $\epsilon$ -АКК, ингибитора плазмина и его клеточных активаторов, снижался в 10 исследованных образцах в пределах 8,9—90,5 %; инкубация с ИТС тех же образцов слезной жидкости приводила к снижению активности на 33—74 %, а гордокс в 2 из 3 проанализированных образцов подавлял активность полностью, в одном — на 80 %. Устойчивая к действию  $\epsilon$ -АКК доля БАЭЭ-эстеразной активности образца могла рассматриваться как активность калликреинов плазмы крови и клеток; доля, устойчивая к действию ИТС, — как тканевые калликреин и активаторы плазминогена. Нечувствительность к действию гордокса могла быть следствием присутствия в образце комплекса протеиназ с  $\alpha_2$ -МГ, сохраняющим активность по низкомолекулярным субстратам.

В изучении ингибиторного спектра слезной жидкости больных мы ограничились двумя основными ингибиторными активностями: антитриптической (АТА) и активностью  $\alpha_2$ -МГ. В табл. 4 приведены величины активности  $\alpha_2$ -МГ и АТА в слезной жидкости обследованных больных (1 ИЕ равно количеству ингибитора, подавляющего 1 мкмоль/мин активности трипсина). Эти данные могут служить свидетельством больших колебаний в содержании  $\alpha$ -1-протеиназного ингибитора и  $\alpha_2$ -МГ в слезной жидкости больных.

Присутствие в слезной жидкости больных большого количества  $\alpha_2$ -МГ, определенного по результатам функционального теста (остаточная активность трипсина в комплексе с  $\alpha_2$ -МГ, рассчитанная по скорости расщепления БАЭЭ), было подтверждено анализом антигенной индивидуальности данного белка иммуноферментным методом.

Антигенный анализ позволил выявить в 6 образцах в среднем 2,86 мкг  $\alpha_2$ -МГ в 1 мл слезной жидкости, что примерно в 2 раза больше, чем в слезной жидкости здорового человека ( $1,13 \pm 0,145$  мкг/мл) [3].

Для выявления в образцах слезной жидкости больного фактор-ХII подобной активности, т. е. активности, переводящей неактивный предшественник калликреина, прекалликреин, в активный фермент, 3 образца слезной жидкости инкубировали с препаратом прекалликреина плазмы крови человека. В одном случае было выявлено слабое активирующее действие ( $13$  нмоль/мин<sup>2</sup> в 1 мл). После обработки 8 образцов слезной жидкости трипсином (для активирования возможно присутствующего в образцах XII фактора системы свертывания крови) в 5 случаях не было отмечено никакого активирующего прекалликреин действия. В одном случае (у больного с язвой роговицы, в связи с ношением контактных линз) активирующее прекалликреин действие оказалось очень заметным:  $2,93$  мкмоль/мин<sup>2</sup> в 1 мл, в двух дру-

гих — незначительным —  $55$  и  $384$  нмоль/мин<sup>2</sup> в 1 мл соответственно.

Эти, а также приведенные ранее данные свидетельствуют о значительной неоднородности ферментного и ингибиторного состава слезной жидкости больных с хронической язвой роговицы.

В настоящее время считается, что основным повреждающим строму роговой оболочки глаза фактором является коллагеназа, источником которой служат клеточные элементы роговицы в зоне изъязвления и полиморфноядерные лейкоциты [11, 30]. Мы подтвердили присутствие коллагеназной активности в слезной жидкости, омывающей конъюнктиву, склере и роговую оболочку. Однако в деструкции коллагена могут принимать участие и другие протеиназы и пептидазы, в частности плазмин [16]. Этот фермент не только усиливает секрецию ироколлагеназы и предшественника активатора плазминогена из нейтрофилов и кератоцитов [13, 31], но и непосредственно активировать проколлагеназу нейтрофилов [12]. Другие сериновые протеиназы, например калликреины плазмы крови и ткани, увеличивают проницаемость капилляров и способствуют проникновению в слезную жидкость предшественников протеиназ плазмы крови [17]. Кроме этого, они активируют латентную коллагеназу [25] и активатор плазминогена [29].

Как показывают представленные в работе результаты, а также результаты других исследований [6, 7], слезная жидкость обладает значительным ингибиторным потенциалом. Однако присутствующий в образцах  $\alpha$ -1 протеиназный ингибитор, в основном обуславливающий антитриптическую активность [28], не может служить, очевидно, достаточным регулятором протеолитических процессов в язвенном дефекте, поскольку не ингибирует плазменный калликреин [2, 4]. Другой поливалентный ингибитор протеолитических ферментов —  $\alpha_2$ -МГ, образуя комплекс с протеиназами, не подавляет полностью их активность по белковым субстратам [1, 2, 10].

Установленная высокая протеолитическая активность слезной жидкости больных с хронической язвой роговой оболочки глаза является отражением сложных процессов, происходящих в зоне изъязвления, а также в капиллярах конъюнктивы и слезной железы больного глаза. Выяснение природы ферментов, составляющих эту актив-



ность, может служить основанием для адекватного лечения заболевания соответствующими ингибиторами.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Веремеенко К. Н., Кизим А. И., Колесник Л. А. // Вестн. АМН СССР.— 1984.— № 8.— С. 60—64.
2. Веремеенко К. Н., Голобородько О. П., Кизим Л. И. Протеолиз в норме и при патологии.— Киев, 1988.
3. Калашников В. В., Платонова Т. К., Свищев А. В. // Вопр. мед. химии.— 1989.—
4. Мосолов В. В. Протеолитические ферменты.— М., 1971.
5. Нартикова В. Ф., Пасхина Т. С. // Вопр. мед. химии.— 1979.— № 4.— С. 494—496.
6. Чеснокова Н. Б., Касавина Б. С. // Вирусные заболевания глаз.— М., 1982.— С. 35—36.
7. Чеснокова Н. Б., Касавина Б. С., Щипанова А. И. // Вестн. офтальмол.— 1983.— № 1.— С. 48—50.
8. Чеснокова Н. Б., Сосудина Н. Е. // Вопр. мед. химии.— 1986.— № 4.— С. 110—113.
9. Чикало И. И., Навроцкая Л. Я. // Офтальмол. журн.— 1960.— № 5.— С. 259—264.
10. Berman M., Gordon J., Garcia L. et al. // Exp. Eye Res.— 1975.— Vol. 20.— P. 231—234.
11. Berman M. // Collagenase in Normal and Pathological Connective Tissues / Eds D. E. Wolley, J. M. Evanson.— Chichester, 1980.— P. 141.
12. Berman M., Leary R., Gage J. // Invest. Ophthalm.— 1980.— Vol. 19.— P. 1204—1221.
13. Berman M., Manseau E., Low M., Aiken D. // Ibid.— 1983.— Vol. 24.— P. 1358—1366.
14. Fritz H., Fink E., Truscheit F. // Fed. Proc.— 1979.— Vol. 38.— P. 2753—2759.
15. Geiger R., Clausnitzer B., Fink E., Fritz H. // Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.— 1980.— Bd 361.— S. 1795—1803.
16. Gross J. // Biochemistry of Collagen.— New York, 1976.— P. 275—317.
17. Harpel P. C. // Chemistry and Biology of the Kallikrein-Kinin System in Health and Disease / Eds. J. J. Pisano, K. F. Austen.— 1976.— P. 169—177.
18. Harris E. D., Valor C. A. // Meth. Enzymol.— 1982.— Vol. 82.— P. 423.
19. Hayasaka Seiji // Lysosomes in Biology and Pathology / Eds. J. T. Dingle et al.— 1984.— P. 421.
20. Itoi M., Gnädinger M., Slansky H. et al. // Exp. Eye Res.— 1969.— Vol. 8.— P. 369—373.
21. Kawiak J., Kawalec M., Dotsenko V. L., Yarovaya G. A. // Clin. chim. Acta.— 1984.— Vol. 141.— P. 287—292.
22. Kessler E., Mondino B., Brown S. // Invest. Ophthalm.— 1977.— Vol. 16.— P. 116—125.
23. Lowry C. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem.— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
24. Onodera, Tsuyoshi // Acta Soc. ophthalm. Jap.— 1987.— Vol. 91.— P. 465—472.
25. Rybak M., Stancikova M., Simonianova E. et al. // Kinin'84.— New York, 1984.— P. 117.
26. Salonen E.-M., Tervo T., Torma E. et al. // Acta ophthalm.— 1987.— Vol. 65.— P. 3—12.
27. Steuhl K.-P., Doering J., Henni A. et al. // Invest. Ophthalm.— 1987.— Vol. 28.— P. 1159—1168.
28. Travis J., Salvesen G. S. // Ann. Rev. Biochem.— 1983.— Vol. 52.— P. 655—709.
29. Tschesche H., Lupke U., Geiger R., Fink E. // Kinin'84.— New York, 1984.— P. 140.
30. Weimar V. // J. exp. Med.— 1957.— Vol. 105.— P. 141.
31. Werb Z., Aggeler J. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1978.— Vol. 75.— P. 1839.

Поступила 07.12.88

## PROTEOLYTIC ENZYMES OF LACRIMAL FLUID AS FACTORS OF PATHOGENESIS OF EYE CORNEA CHRONICAL ULCERS

V. L. Dotsenko, R. I. Nakikhyan, N. I. Solov'eva, T. N. Platonova, G. A. Yarovaya

Central Institute for Postgraduate Training of Physicians, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

Proteolytic enzymes, particularly collagenase, are involved in development of eye cornea chronical ulcers. Analysis of lacrimal fluid obtained from the patients enabled to find not only the collagenase activity but and serine enzymes exhibiting BAEE esterase activity. Plasmin, blood plasma and tissue kallikreins regulated permeability of capillaries in conjunctiva and lacrimal gland as well as they activated latent collagenase. Studies of BAEE esterase activity in lacrimal fluid of the patients are required for prescription of adequate pathogenetic treatment.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 618.3-008.6-039.12-037.07:[616.152.23:616.153.1:577.152.193]-074

С. В. Гунько, Н. Ф. Леус, В. А. Гунько

## ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СТАТУСА СЕЛЕНА ПРИ СКРИНИНГЕ БЕРЕМЕННЫХ ВО ВТОРОЙ ПОЛОВИНЕ БЕРЕМЕННОСТИ

Одесский медицинский институт им. Н. И. Пирогова, НИИ глазных болезней и тканевой терапии им. В. П. Филатова, Одесса

Существует аргументированная концепция, согласно которой одной из наиболее вероятных предпосылок развития позднего токсикоза является утрата способности отдельных метаболических звеньев организма обезвреживать свободные радикалы, образующиеся в процессе обмена веществ в норме [1].

Известно, что антиокислительная система глутатиона играет роль универсального метаболического пути удаления вредных соединений [4]. Доказано, что функционирование этой системы в значительной мере зависит от обеспеченности селеном [5—7], поскольку селен в значительной мере определяет уровень активности глутатионпероксидазы (КФ 1.11.1.9), которая осуществляет восстановление гидроперекисей с участием глутатиона.

Имеются убедительные свидетельства, что активность селензависимой глутатионпероксидазы в крови беременных значительно снижается при развитии позднего токсикоза [1, 2]. В то же время выявлено, что активность фермента может снижаться уже на доклиническом этапе заболевания [1]. Однако при обсуждении механизмов изменения глутатионпероксидазной реакции не предпринималось попыток оценить обеспеченность селеном обследуемых беременных.

В связи с изложенным представляется перспективным изучение функционального статуса селена (активности селензависимой глутатионпероксидазы и содержания селена) в крови беременных во второй половине беременности.

## Методика

Исследовали цельную кровь 260 беременных женщин, здоровых и с различными стадиями позднего токсикоза в сроки от 20 до 34 нед беременности. Возраст обследованных от 18 до 32 лет.

Активность глутатионпероксидазы определяли спектрофотометрическим методом [3]. Принцип метода заключается в определении скорости образования в процессе глутатионпероксидазной реакции окисленного глутатиона 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 ультрафиолетового излучения с длиной волны 366 нм.

## Результаты и обсуждение

Все беременные, в крови которых был исследован функциональный статус селена, являются жительницами Одесской области. Ни одна из беременных не получала препаратов селена и препаратов, в состав которых входит восстановленный глутатион.

Данные об активности глутатионпероксидазы и содержании селена в крови здоровых беременных во второй половине беременности и беременных с различными стадиями позднего токсикоза представлены в таблице.

При анализе полученных данных необходимо отметить, что изменения активности глутатионпероксидазы и содержания селена в крови беременных с различными стадиями позднего токсикоза не являются однозначными. Выявлено, что у ряда беременных всех клинических групп, в том числе с тяжелыми формами токсикоза, активность фермента была стабильной, составляя 101—96 % ( $p < 0,05$ ) от активности фермента в крови женщин с физиологически протекающей беременностью. Можно предположить, что стабильность активности глутатионпероксидазы в крови этих беременных обусловлена достаточно высоким содержанием селена — 108—102 пг/мл крови ( $p < 0,01$ ). У беременных с содержанием селена в крови, близким к нормальному уровню, отмечено значительное (на 39 %), статистически достоверное ( $p < 0,01$ ) увеличение активности глутатионпероксидазы на начальном этапе токсикоза. Увеличение активности фермента можно, вероятно, расценить как компенсаторную реакцию на увеличение интенсивности свободнорадикальных реакций. В то же время реализация данного защитного механизма возможна, очевидно, при достаточной обеспеченности селеном.

В то же время выявлено значительное, коррелирующее со степенью тяжести позднего токсикоза снижение активности глутатионпероксидазы в крови большей группы беременных. У беременных этой группы содержание селена в крови также значительно ниже нормы, причем выявлена выраженная корреляционная зависимость между активностью глутатионпероксидазы и содержанием селена; коэффициент корреляции составляет соответственно 0,7 ( $p < 0,05$ ) для клинической группы беременных с отеками, 0,8 ( $p < 0,01$ ) — для группы с нефропатией I степени, 0,9 ( $p < 0,01$ ) — с нефропатией II степени, 0,65 ( $p < 0,05$ ) — с нефропатией III степени.

Полученные данные позволяют предположить, что одним из важных механизмов изменения глутатионпероксидазной активности в крови беременных с поздним токсикозом является обеспеченность селеном. При развитии позднего токсикоза в условиях повышенной генерации гидроперексидов, в том числе липидных, в организме беременной глутатионпероксидазная реакция является адекватной при содержании селена в крови 120—80 пг/мл крови, при этом активность фермента

## Активность глутатионпероксидазы и содержание селена в крови беременных во второй половине беременности

Группа обследованных	Активность глутатионпероксидазы, кат/мл крови	Содержание селена, пг/мл крови
Беременные с физиологической беременностью	$132 \pm 6^{**}$ (95)	$120 \pm 0,8^{***}$ (95)
Отеки беременных	$184 \pm 9^{**}$ (57)	$108 \pm 0,6^{***}$ (57)
	$126 \pm 4^*$ (20)	$84 \pm 1,2^{***}$ (20)
Нефропатия:	$130 \pm 8^*$ (19)	$112 \pm 0,4^{***}$ (19)
I степени	$84 \pm 7^*$ (21)	$57 \pm 0,8^{***}$ (21)
II »	$128 \pm 5^*$ (10)	$116 \pm 0,6^*$ (10)
	$72 \pm 6^*$ (26)	$54 \pm 1,0^{***}$ (26)
III »	$134 \pm 9$ (4)	$112 \pm 0,8$ (4)
	$90 \pm 7^*$ (6)	$48 \pm 0,5^*$ (6)
Преэклампсия	$88 \pm 9$ (2)	$60 \pm 0,9$ (2)

Примечание. Одна звездочка —  $p < 0,05$ , две —  $p < 0,01$ , три —  $p < 0,001$  относительно нормы. В скобках — число обследованных.

стабильна даже при развитии тяжелых клинических форм позднего токсикоза.

Содержание селена в крови беременной ниже, чем 80 пг/мл крови, может являться одним из факторов риска нарушения функционирования антиокислительной системы глутатиона при развитии позднего токсикоза беременных. Активность глутатионпероксидазы в данном случае может служить важным прогностическим критерием при оценке степени тяжести позднего токсикоза.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Абрамченко В. В., Баскако В. П., Соколовский В. В. и др. // Акуш. и гин.— 1988.— № 6.— С. 67.
2. Грищенко В. И., Иванов И. П., Воронин К. В., Маневич Л. Е. Родовспоможение при позднем токсикозе беременных.— Киев, 1986.— С. 13—19.
3. Ланкин В. З., Гуревич С. М. // Докл. АН СССР.— 1976.— Т. 226, № 3.— С. 705—710.
4. Mc Cay P. B., Gibson D. D., Fong K. L. et al. // Biochim. biophys. Acta.— 1976.— Vol. 431.— P. 459—468.
5. Rotruch J. T., Pope A. Z., Ganter E. A. et al. // Science.— 1978.— Vol. 179.— P. 588—590.
6. Sunde R. A., Evenson J. K. // Trace Element Metabolism in Man and Animals (TEMA-5).— London, 1985.— P. 480—484.
7. Thomson C. D., Duncan A. // Trace Element Metabolism in Man and Animals (TEMA-4).— Berlin, 1982.— P. 280—282.
8. Watkinson J. H. // Analyt. Chem.— 1966.— Vol. 38, N 1.— P. 92—96.

Поступила 30.05.89

## STATUS OF SELENIUM METABOLISM IN SCREENING OF PREGNANT WOMEN DURING THE SECOND HALF OF PREGNANCY

S. V. Gun'ko, N. F. Leus, V. A. Gun'ko

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 selenium-dependent glutathione peroxidase and content of selenium in blood were studied during the pregnant women screening. 260 healthy women with pregnancy of 20-34 weeks without any clinical manifestations of hestosis were examined. Decrease of the enzyme activity, correlating with the selenium content, was detected in blood of women with selenium content, was detected in blood of women with clinical forms of hestosis. At the same time, the enzyme activation simultaneously with normal concentration of selenium in blood, were found in some women at the initial steps of toxicosis. Glutathione peroxidase reaction appears to correlate with selenium content during the preclinical steps of hestosis development. Content of selenium in blood of pregnant women

as low as 80 pg/ml may be among the rise factors responsible for impairment of the glutathione antioxidant system under conditions of late toxicosis in pregnant women.

© Ю. В. КИСЕЛЕВСКИЙ, В. В. ЛЕЛЕВИЧ, 1990

УДК 616.89-008.441.13-092.9-07:616.127-008.934.556.23-074

Ю. В. Киселевский, В. В. Лелевич

## ОСОБЕННОСТИ ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНЫХ ЭТАПОВ ГЛИКОЛИЗА В МИОКАРДЕ КРЫС С РАЗЛИЧНОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ МОТИВАЦИЕЙ

Кафедра биохимии Гродненского медицинского института

Высокая частота алкогольных кардиомиопатий (АКМП) привлекает особое внимание к изучению молекулярных механизмов ее развития, патохимических сдвигов в миокарде при действии этанола. Суммируя имеющиеся данные литературы, нельзя объяснить развитие АКМП только острым или хроническим действием этанола [1, 12]. Выявлена важная роль нарушений углеводного и энергетического обменов в патогенезе развития АКМП [17, 18]. При действии этанола в миокарде угнетаются гликогенолиз и окислительное фосфорилирование, активизируется гликолиз и происходит накопление жирных кислот [17, 18]. Это может обуславливать нарушение сократительной способности миокарда. До настоящего времени остается невыясненной взаимосвязь выраженности алкогольной мотивации и частоты последующего развития АКМП. Показана метаболическая индивидуальность крыс, предпочитающих воду (КПВ), и крыс, предпочитающих этанол (КПЭ), по обмену глюкозы, скорости утилизации пирувата и накопления лактата [4, 9]. Данные различия, по мнению некоторых авторов [10], являющиеся предпосылкой создания более низкого уровня эндогенного этанола у КПЭ. Уровень и особенности обмена эндогенного этанола и ацетальдегида играют определенную роль в формировании синдрома предпочтения этанола [9]. Изучение связи заключительных этапов гликолиза с процессом образования ацетальдегида и феноменом предпочтения к этанолу послужило предметом настоящего исследования.

**Методика.** Опыты проводили на 32 крысах-самцах массой 180–200 г, предварительно отобранных по признаку предпочтения этанола или воды в условиях свободного выбора по методике, описанной ранее [8]. После отбора выделили 2 группы животных — КПВ и КПЭ. Перед исследованием крыс подвергали 12-часовому голоданию при доступе к воде. Острую алкогольную интоксикацию у КПВ и КПЭ моделировали внутрибрюшинным введением 25 % раствора этанола из расчета 2,5 г на 1 кг массы тела. Контрольной группе вводили эквивалентные количества физиологического раствора. Животных декапитировали через 1 ч после введения этанола или физиологического раствора. Сразу после декапитации извлекали сердце и в среде, содержащей 0,3 М сахарозу; 0,005 М калиевую соль ЭДТА; 0,005 М трис-НСl-буфер pH 7,4, выделяли митохондрии методом дифференциального центрифугирования [11]. Трижды промытые митохондрии разрушали добавлением тритона X-100 до 0,5 % концентрации [19]. В митохондриальном экстракте измеряли скорость ферментативной реакции пируватдегидрогеназного комплекса (ПДК) по восстановлению НАД при 340 нм на регистрирующем спектрофотометре «Specord UV VIS» (ГДР) в термостатируемой кювете (30 °C). Реакционная среда содержала: 50 мМ трис-НСl-буфер pH 7,5; 1 мМ дигитонейтол; 2 мМ MgCl<sub>2</sub>;

0,1 мМ КоА; 1 мМ НАД; 1 мМ пируват Na; 0,2 мМ триаминдифосфат (ТДФ) или без такового. В постмитохондриальной фракции определяли активность пируваткиназы (ПК) (КФ 2.7.1.40) по окислению НАДН<sub>2</sub> в реакции, сопряженной с ЛДГ [13]. Белок определяли по Лоури.

**Результаты и обсуждение.** Активность ПК в постмитохондриальной фракции миокарда одинакова в исходном состоянии у крыс с различной алкогольной мотивацией (рис. 1). Это согласуется с результатами, полученными для фермента из печени [9]. Данные исследования проводили в условиях 10-кратного насыщения фосфоэнолпируватом (ФЭП). В клетке реальное содержание ФЭП значительно ниже [7]. Поэтому приходится учитывать, что в физиологических условиях фермент функционирует при неполном насыщении субстратом. Определение ПК с концентрацией ФЭП  $0,6 \cdot 10^{-3}$  М, соответствующей  $K_m$  для сердечной изоформы [15], показало ее снижение у КПВ до 38 % от исходной, а у КПЭ — до 17 %. Расчет отношения активности фермента при различной обеспеченности субстратом (коэффициент  $r$ ) [14] выявляет различие между сравниваемыми группами. Коэффициент  $r$  определяется по отношению скорости ферментативной реакции при насыщающей и низкой (равной  $K_m$ ) концентрации субстрата и используется для определения соотношения разных кинетических форм фермента. У КПВ коэффициент равен 2,62, а у КПЭ — 5,85. Это позволяет сделать заключение о преобладании у животных с выраженной алкогольной мотивацией конформационной формы ПК с низким сродством к субстрату (Т-форма). Данная особенность может быть обусловлена более низким уровнем инсулина у КПЭ [3]. Острая алкогольная интоксикация ингибирует активность ПК только у КПЭ и на этом фоне она достоверно ниже, чем у КПВ. Это согласуется с более выраженным ингибированием начальных реакций гликолиза в печени КПЭ в аналогичных экспериментальных условиях [5]. Нагрузка этанолом в условиях дефицита субстрата существенно не изменяет активность фермента в сравниваемых группах животных. Расчет коэффициента  $r$  в условиях острой алкоголизации выявляет интересную закономерность выравнивания этого показателя между группами КПВ и КПЭ (1,55 и 1,39 соответ-

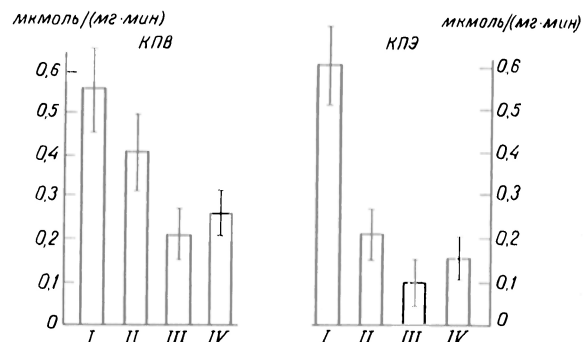


Рис. 1. Активность пируваткиназы (в мкмоль на 1 мг белка в 1 мин) в постмитохондриальной фракции миокарда КПВ и КПЭ при острой алкогольной интоксикации.

I — контрольная группа; II — острая алкогольная интоксикация; III — дефицит субстрата; IV — дефицит субстрата при острой алкоголизации. Здесь и на рис. 2: кружок — статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) с соответствующей подгруппой животных с противоположной алкогольной мотивацией.

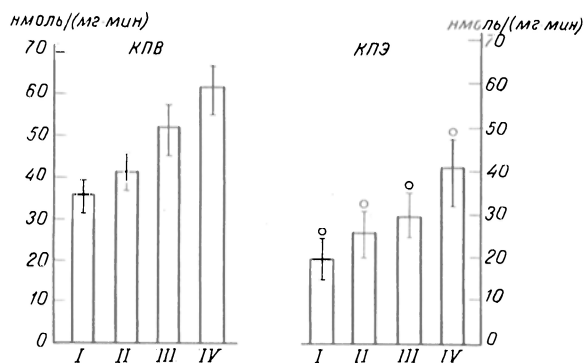


Рис. 2. Активность пируватдегидрогеназы (нмоль/мг белка/мин) в митохондриях миокарда КПЭ и КПВ при острой алкогольной интоксикации.

I — контрольная группа; II — острая алкогольная интоксикация; III — внесение экзогенного ТДФ; IV — внесение экзогенного ТДФ при острой алкоголизации.

ственно), что указывает на конформационный переход молекулы ПДК в релаксированную форму.

Активность ПДК в митохондриях миокардиоцитов КПЭ в интактном состоянии на 47 % ( $p < 0,01$ ) ниже, чем у КПВ (рис. 2). Разница в активности ПДК у животных с полярным отношением к этанолу может быть обусловлена упомянутыми выше кинетическими особенностями ПДК в этих группах. Недостаток субстрата ПДК может снижать активность фермента путем активирования киназы этого мультиферментного комплекса [16]. Эти сведения дополняют общее представление о замедленной утилизации глюкозы и окисления пирувата у крыс с выраженной алкогольной мотивацией [6, 10]. Следует отметить, что данная закономерность прослеживается на уровне различных органов — печени, сердца. Нагрузка этанолом достоверно не изменяет активности ПДК в сравниваемых группах животных (2-я группа). Скорость декарбоксилирования пирувата ПДК в значительной степени определяется обеспеченностью апофермента ТДФ. Учитывая важную роль этой ферментной системы в образовании эндогенного ацетальдегида, интересным представилось исследование активности ПДК в условиях избытка ТДФ. Внесение в среду определения ТДФ выявляет достоверное повышение активности фермента только в группе крыс с низкой алкогольной мотивацией (см. рис. 2). Это указывает на более высокое содержание апофермента ПДК у КПВ в сравнении с КПЭ. Данное предположение соответствует представлениям о более мощных процессах энергообразования из углеводов в этой группе животных. Острая алкогольная интоксикация не изменяет активности ПДК в условиях избытка ТДФ как у КПВ, так и у КПЭ. Однако при этом активность фермента у животных с выраженной алкогольной мотивацией достоверно ниже, чем у КПВ.

Таким образом, КПЭ характеризуются замедленным функционированием конечных этапов гликолиза. Это в известной мере может обуславливать избыточное потребление этанола, как оптимального источника энергии, катаболизируемого в обход гликолитического пути. Учитывая определенную взаимосвязь активности ПДК и ПДК, уровня эндогенного ацетальдегида и выраженности алкогольной мотивации, можно говорить о роли конечных реакций гликолиза в формировании этой сложной поведенческой реакции.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гвоздок А., Бада В., Круты Ф. и др. // Кардиология. — 1976. — № 10. — С. 136—137.
2. Дзяк В. П., Микунис Р. И., Скупник А. М. Алкогольная кардиомиопатия. — Киев, 1980.
3. Лелевич В. В., Тарасов Ю. А., Лукашик П. К. и др. // Пробл. эндокринологии. — 1986. — № 1. — С. 53—56.
4. Лелевич В. В., Островский Ю. М., Лукашик П. К. // Вопр. мед. химии. — 1984. — № 4. — С. 32—36.
5. Лелевич В. В. Особенности начальных реакций гликолиза в печени крыс с различной алкогольной мотивацией: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Минск, 1984.
6. Лелевич В. В. // Здоровоохр. Белоруссии. — 1984. — № 1. — С. 68—69.
7. Ньюсхолм Э., Старк К. Регуляция метаболизма: Пер. с англ. — М., 1977.
8. Островский Ю. М., Садовник М. П., Величко М. Г. // Вестн. АН БССР. Сер. биол. наук. — 1976. — № 9. — С. 96—99.
9. Островский Ю. М. Этанол и обмен веществ. — Минск, 1982.
10. Островский Ю. М., Сатановская В. И., Садовник М. П. Биологический компонент в генезисе алкоголизма. — Минск, 1986.
11. Покровский А. А., Арчаков А. И. // Современные методы в биохимии. — М., 1968. — Т. 2. — С. 5.
12. Тареев Е. М., Мухин А. С. // Кардиология. — 1977. — № 12. — С. 17—33.
13. Bergmeyer H. Methoden der enzymatischen Analyse. — Weinheim, 1962. — S. 253—259.
14. Felin J. E., Sols A. // Molec. cell. Biochem. — 1976. — Vol. 13, N 1. — P. 31—44.
15. Hall E. R., Cottam G. L. // Int. J. Biochem. — 1978. — Vol. 9. — P. 785—794.
16. Kerbey A. L., Randle P. J., Cooper. R. H. // Biochem. J. — 1976. — Vol. 154. — P. 327—348.
17. Klein H. H., Spaar U., Kreuser H. // Basic Res. Cardiol. — 1984. — Vol. 79, N 2. — P. 238—243.
18. Rubine E. // New Engl. J. Med. — 1979. — Vol. 301, N 1. — P. 28—33.
19. Watanabe T., Goto H., Ogasawara N. // Biochim. biophys. Acta. — 1974. — Vol. 358. — P. 340.

Поступила 13.03.89

## SPECIFIC PROPERTIES OF FINAL STEPS OF GLYCOLYSIS IN MYOCARDIUM OF RATS CONSUMING VARIOUS AMOUNTS OF ALCOHOL

Yu. V. Kiselevsky, V. V. Lelevich

Chair of Biochemistry, Medical School, Grodno

Decreased activity of pyruvate dehydrogenase was found in myocardium of rats consuming ethanol as compared with animals consuming water. Acute alcoholization did not alter this pattern. Myocardial pyruvate kinase exhibited increased affinity to substrate in animals consuming ethanol.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.379-008.64-07:616.15+.514

Б. А. Кудряшов, М. И. Балаболкин, А. М. Ульянов, Л. А. Ляпина, З. И. Левитская

## ВОССТАНОВЛЕНИЕ ФУНКЦИИ ПРОТИВОСВЕРТЫВАЮЩЕЙ СИСТЕМЫ У БОЛЬНЫХ ИНСУЛИНЗАВИСИМЫМ ДИАБЕТОМ ПУТЕМ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ В ОРГАНИЗМЕ АКТИВНОСТИ ЕСТЕСТВЕННОГО ДИАБЕТОГЕННОГО ФАКТОРА

МГУ им. М. В. Ломоносова, Московский медицинский стоматологический институт им. Н. А. Семашко

В предшествующих исследованиях было установлено присутствие естественного диабетогенного фактора (ДФФ) в плазме крови животных [1, 12]

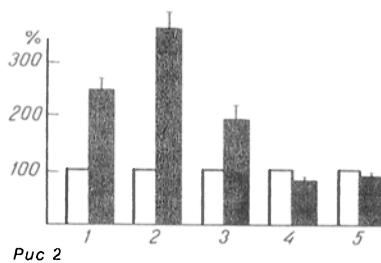
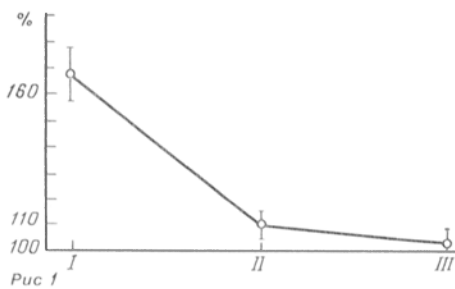


Рис. 1. Активность ДГФ в плазме крови больных инсулинозависимым диабетом до и после гепаринотерапии.

По оси абсцисс — I — до лечения, II и III — соответственно через 1—1,5 и 3 мес лечения; по оси ординат — концентрации сахара в крови, %.

Рис. 2. Показатели противосвертывающей системы (в % к исходному уровню) у больных инсулинозависимым диабетом до и после гепаринотерапии.

1 — СФА; 2 — НФ; 3 — содержание эндогенного гепарина; 4 — фибриноген; 5 — фактор XIII. Светлые столбики — до лечения гепарином, темные — после лечения.

и людей [2, 12], больных инсулинозависимым диабетом. Показано, что этот фактор является белком — альбумином с мол. м. порядка 60 000 Д [5, 10].

Внутривенное введение плазмы крови, содержащей ДГФ, полученной из организма животных или людей [1, 2, 12], больных инсулинозависимым диабетом, вызывает у здоровых крыс-реципиентов гипергликемию [1, 12, 17] и резистентность организма к инсулину. При этом установлено, что профилактическая инъекция животным гепарина полностью защищает их организм от развития указанных выше явлений [1, 2, 12, 15].

Внутривенная инъекция здоровым крысам очищенного препарата ДГФ приводит к возникновению сложного симптомокомплекса, характеризующегося устойчивой гипергликемией [13], резистентностью организма к инсулину [3] и резким падением уровня содержания иммунореактивного инсулина в крови [13]. Этот эффект сопровождается активацией свертывания крови [14] и блокадой функции противосвертывающей системы, недостатком гепарина в крови и нарушением ферментативного фибринолиза [11].

Учитывая, что ДГФ присутствует в плазме крови практически у всех больных инсулинозависимым диабетом [2, 7, 12], возникла необходимость осуществить поиски средств для нейтрализации активности ДГФ в организме. В итоге было показано, что систематическое внутримышечное введение гепарина в больной организм животных [13] и человека [6, 7] в небольших дозах приводит к устранению активности ДГФ вследствие образования комплекса гепарин — ДГФ [5, 9], лишённого диабетогенной активности.

Настоящая работа посвящена продолжению изучения указанного эффекта с концентрацией внимания на возможности восстановления функции противосвертывающей системы в организме больных, страдающих инсулинозависимым диабетом.

**Методика.** Под наблюдением находились 18 больных инсулинозависимым диабетом — 16 мужчин и 2 женщины. Больные были в возрасте от 17 лет до 41 года. Начало заболевания установлено в возрасте от 6 до 34 лет, с длительностью от 1 года до 16 лет. В течение исследований все больные были клинически компенсированы на дозах инсулина от 30 до 56 МЕ в сутки. Гликемия патоцка колебалась от 6 до 9 ммоль/л. Кровь брали из локтевой вены патоцка с цитратом натрия (3,8 %) в соотношении 1:9. Гепарин вводили внутримышечно в сроки от 1—1,5 до 3 мес в дозе 2500 МЕ 2 раза в сутки. Активность ДГФ в плазме крови определяли спустя 2 сут после отмены инъекций гепарина по ранее описанному методу [16]. Суммарная фибринолитическая активность плазмы (СФА) и ее ферментный фибринолиз (НФ) определяли по методу [8], уровень гепарина в крови устанавливали по [20], концентрацию фибриногена — по методу [19]. Показатели  $T_1$ ,  $T_2$  и  $T$  коагулограммы плазмы крови получены на коагулографе Н-334.

**Результаты и обсуждение.** При исследовании обнаружено наличие в плазме крови всех больных ДГФ, обладающего значительной гипергликемической активностью. Одновременно у больных наблюдалась сильно выраженная депрессия функции противосвертывающей системы, характеризующаяся низкой СФА и в особенности НФ, недостатком гепарина в плазме крови и рядом показателей коагулограммы, свидетельствующих о наличии гиперкоагуляции крови у больных. После проведения курса гепаринотерапии анализ крови показал, что использованные дозы гепарина непосредственно не оказывают заметного влияния на свертываемость крови. Наряду с этим во всех случаях было установлено полное исчезновение активности ДГФ в плазме крови больных, получавших инъекции гепарина в течение как 1—1,5 мес, так и 3 мес (рис. 1). Особое значение имеет то, что при устранении гепарином активности ДГФ у больных наблюдалось весьма положительное изменение в состоянии противосвертывающей системы (рис. 2). Как видно, после гепаринотерапии СФА достигла 250 %, НФ возрос почти до 300 %, а содержание эндогенного гепарина в крови достигло 200 % по сравнению с соответствующими величинами до гепаринотерапии. Полученные данные свидетельствуют о восстановлении функции противосвертывающей системы в организме больных диабетом, которая, как известно, обеспечивает регуляцию жидкого состояния крови [3, 4]. Это явление приобретает большое значение на фоне опубликованных современных данных, свидетельствующих, что при сахарном диабете у больных происходит хроническое внутрисосудистое свертывание крови [18]. Таким образом, нами показано, что при помощи своевременного систематического введения малых доз гепарина больным инсулинозависимым диабетом с целью нейтрализации диабетогенной активности ДГФ возникает восстановление нарушенной функции противосвертывающей системы. Это явление, несомненно, ведет к предупреждению развития в организме внутрисосудистого свертывания крови и тромботических осложнений, нередко имеющих место при диабете. Показано, что этот эффект обусловлен образованием комплекса гепарин — ДГФ [5, 9], лишённого диабетогенной активности.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Баскакова Г. М., Кудряшов Б. А., Пытель Ю. А. // Пробл. эндокринол. — 1981. — № 4. — С. 42—45.
2. Жуковский М. А., Кудряшов Б. А., Ульянов А. М. и др. // Педиатрия. — 1985. — № 2. — С. 7—9.
3. Кудряшов Б. А. // Биологические проблемы регуляции жидкого состояния крови и ее свертывания. — М., 1975. — С. 1—488.

4. Кудряшов Б. А. // Успехи соврем. биол.— 1989.— № 1.— С. 55—68.
5. Кудряшов Б. А., Амосова Я. М., Ляпина Л. А., Ульянов А. М. // Фармакол. и токсикол.— 1987.— № 3.— С. 49—52.
6. Кудряшов Б. А., Жуковский М. А., Шербаева Л. И. и др. // Педиатрия.— 1985.— № 8.— С. 46—47.
7. Кудряшов Б. А., Левитская Э. И., Ляпина Л. А., Ульянов А. М. // Современные проблемы экспер. и клин. эндокринологии.— Съезд эндокринологов УССР, 4-й: Тезисы докладов.— Киев, 1987.— С. 209.
8. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А. // Лаб. дело.— 1971.— № 6.— С. 326—329.
9. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А. // Вопр. мед. химии.— 1986.— № 2.— С. 64—65.
10. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А., Ульянов А. М. // Пробл. эндокринологии.— 1985.— № 6.— С. 51—53.
11. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А., Ульянов А. М. // Физиол. журн. СССР.— 1986.— № 3.— С. 373—376.
12. Кудряшов Б. А., Показенкова Г. В., Пытель Ю. А. // Пробл. эндокринологии.— 1982.— № 5.— С. 61—64.
13. Кудряшов Б. А., Ульянов А. М., Ляпина Л. А. // Вопр. мед. химии.— 1986.— № 5.— С. 57—59.
14. Кудряшов Б. А., Ульянов А. М., Ляпина Л. А. // Пат. физиол. и экспер. терапии.— 1986.— № 4.— С. 44—47.
15. Кудряшов Б. А., Ульянов А. М., Пытель Ю. А. // Вестн. Моск. ун-та: Сер. Биол.— 1986.— № 1.— С. 51—54.
16. Кудряшов Б. А., Пытель Ю. А., Ульянов А. М., Тарасов Ю. А. // Бюл. экспер. биол. и мед.— 1986.— № 7.— С. 16—18.
17. Ляпина Л. А., Кудряшов Б. А., Баратова Л. А. // Докл. мед. химии.— 1987.— № 6.— С. 69—72.
19. Смоленский В. С., Бокарев И. Н., Великов В. К., Фролова А. И. и др. // Клин. мед.— 1982.— № 1.— С. 49—52.
20. Bidwell E. // Biochem. J.— 1953.— Vol. 55, N 4.— P. 497—506.
20. Warren R., Wysocki A. // Surgery.— 1958.— Vol. 44, N 3.— P. 435—441.

Поступила 15.03.89

# RESTORATION OF THE ANTICOAGULATION SYSTEM FUNCTIONS IN PATIENTS WITH INSULIN-DEPENDENT DIABETES BY MEANS OF NEUTRALIZATION OF THE DIABETOGENIC FACTOR IN THESE PATIENTS

B. A. Kudryashov, M. I. Balabolkin, A. M. Uljanov, L. A. Liapina, Z. I. Levitskaya

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

Functions of the anticoagulation system were restored in patients with insulin-dependent diabetes after neutralization of the diabetogenic factor in blood of patients by repeated administration of heparin at low doses. Development of thrombosis was also prevented in these patients.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 612.124:577.112.854].08+ [616.153.96:577.112.854]-074

А. Е. Сухарев, А. А. Николаев, М. Ю. Васильев

## УРОВЕНЬ СЫВОРОТОЧНОГО ЛАКТОФЕРРИНА В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Астраханский медицинский институт

Лактоферрин человека продуцируется клетками железистого эпителия и костного мозга [10]. Функция этого ферропротеина недостаточно изучена, однако его способность отнимать железо у бактерий [13], ингибировать реакцию связывания компонента через воздействие на С-3-конвертазу [9], образовывать крупные агрегаты с ацидофильными протеинами [8] и изменять функциональные свойства нейтрофилов [11] позволяют

считать лактоферрин одним из факторов неспецифической защиты организма. Источником сывороточного лактоферрина являются клетки миелоидного ряда, о чем свидетельствует факт его обнаружения в гранулах нейтрофилов и их предшественников [11]. Однако до настоящего времени не проводилось целенаправленных исследований, посвященных определению уровня лактоферрина в сыворотке взрослых здоровых людей при различной патологии и оценке этого теста.

Целью работы было скрининговое исследование уровня лактоферрина в норме и при разнотипной опухолевой и неопухолевой патологии и выявление возможных закономерностей, определяющих уровень этого белка в сыворотке крови, а также перспективность использования теста на лактоферрин в клинической практике.

**Методика.** В работе использованы сыворотки крови 292 взрослых доноров молодого и среднего возраста обоего пола, впервые сдавших кровь, и 518 сывороток больных (острая пневмония — 28, хронические неспецифические заболевания легких — 84, туберкулез легких — 100, рак легких — 63, мастопатия — 13, рак молочной железы — 24, аденома предстательной железы — 40, рак предстательной железы — 37, лимфогранулематоз — 6, рак пищевода — 14, рак желудка — 20, рак кишечника — 10, рак печени — 11, вирусный и хронический гепатиты — 17 и 16, цирроз печени — 19). Сыворотки больных получены из областного онкологического диспансера и других больниц Астрахани.

Все пробы крови обрабатывали стандартно во избежание изменений уровня лактоферрина за счет различных условий обработки. Сыворотку отделяли от сгустка через сутки после взятия крови из локтевой зоны, консервировали азидом натрия (0,0001 %) и хранили в холодильнике при 4 °С в течение 1—2 мес. По нашим данным, концентрация лактоферрина в сыворотке при указанных условиях хранения не изменяется. Повторное определение показало, что небольшое снижение (на 20—25 %) отмечается только через 6—8 мес.

Определение лактоферрина проводили методом энзиммеченных антител. Стандартный препарат лактоферрина получали из женского молока фракционированием сульфатом аммония, осаждением ацетоном и ионообменной хроматографией на СМ-сефадексе С-50 [4].

Моноспецифическую антисыворотку к стандартному препарату лактоферрина получали путем иммунизации кроликов субконъюнктивально суммарно до 6 мг белка на 1 животное. Полученные антисыворотки высокоспецифичны и по данным иммуноэлектрофоретического анализа выявляли в цельном женском молоке только 1 антиген — лактоферрин.

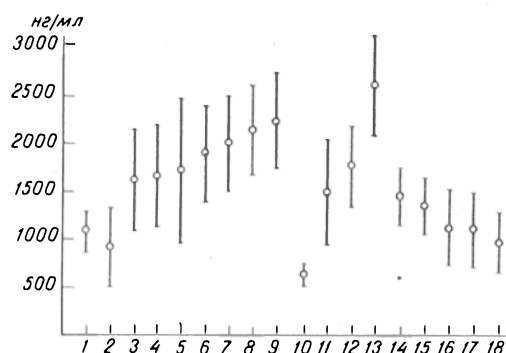
Специфические антитела к лактоферрину выделяли иммуноаффинной хроматографией [3] на сорбенте, приготовленном на основе CNBr-сефарозы 4В ("Pharmacia", Швеция). Элюцию антител проводили 0,2 М глицин-HCl-буфером pH 2,2. Элюат диализовали и лиофилизировали. Антитела конъюгировали с пероксидазой хрена ("Calbiochem", США) перйодатным методом [7], используя для конъюгации 4 мг антител и 2 мг пероксидазы.

Проведение иммуноферментного определения описано ранее [2]. В качестве твердой фазы применяли 96-луночные плашки ("Linbro"). Концентрация антител — 10 мкг/мл, рабочее разведение конъюгата — 1:600. Субстратная смесь: 3,8 мМ 5-аминосалициловая кислота, 0,01 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pH 6,0. Оптическую плотность раствора измеряли на многоканальном спектрофотометре «Мультискан МС» ("Flow") при длине волны 510 нм. Предел чувствительности иммуноферментного определения составил 1,5 нг в 1 мл.

**Результаты и обсуждение.** Определение уровня лактоферрина у здоровых взрослых людей показало, что он составляет 1055±191 нг/мл. У мужчин концентрация лактоферрина несколько выше, чем у женщин (1112±73 и 993±55 нг/мл соответственно), однако это различие статистически не достоверно.

Результаты определения лактоферрина у больных сведены нами в гистограмму (см. рисунок),





Уровень лактоферрина в сыворотке крови здоровых и больных людей.

По оси ординат — содержание лактоферрина, нг/мл. 1 — здоровые взрослые люди, 2 — рак печени, 3 — рак гениталий, 4 — рак молочной железы, 5 — рак легких, 6 — рак пищевода, 7 — рак желудка, 8 — рак кишечника, 9 — лимфогранулематоз, 10 — рак простаты, 11 — аденома простаты, 12 — мастопатия, 13 — острая пневмония, 14 — туберкулез легких, 15 — хронические неспецифические заболевания легких, 16 — цирроз печени, 17 — хронический гепатит, 18 — вирусный гепатит.

отражающую средние уровни и пределы колебаний сывороточного лактоферрина.

Обращает на себя внимание значительное повышение концентрации лактоферрина при злокачественных заболеваниях пищеварительного тракта. При раке пищевода уровень лактоферрина составляет  $1836 \pm 574$  нг/мл, при раке желудка —  $1946 \pm 536$  нг/мл и при раке кишечника —  $2088 \pm 474$  нг/мл. Наиболее высокий уровень в группе злокачественных заболеваний отмечен при лимфогранулематозе —  $2197 \pm 533$  нг/мл, что согласуется с известными сообщениями [12] о повышении уровня лактоферрина при лейкозах.

Среди незлокачественных заболеваний наибольшая концентрация лактоферрина отмечается при острой пневмонии —  $2566 \pm 611$  нг/мл. Хронические неспецифические заболевания легких характеризуются гораздо более низким уровнем лактоферрина —  $1348 \pm 344$  нг/мл. При туберкулезе легких уровень несколько выше, чем при хронических неспецифических заболеваниях легких, но значительно ниже, чем при острых пневмониях ( $1415 \pm 325$  нг/мл). Сравнивая различную легочную патологию по уровню лактоферрина, мы видим, что концентрация этого белка в крови больных отражает, вероятнее всего, интенсивность реактивных процессов. Применительно к этим видам патологии лактоферрин можно традиционно связывать с выраженностью лейкоцитарной инфильтрации как одного из факторов воспаления. Следовательно, лактоферрин можно в данном случае считать показателем активности воспалительного процесса.

Принадлежность лактоферрина к группе острофазовых белков подтверждается повышением его уровня практически при всех опухолевых заболеваниях. Кроме упомянутых выше опухолей пищеварительного тракта, лактоферрин повышен при раке молочной железы ( $1697 \pm 594$  нг/мл), гениталий ( $1658 \pm 577$  нг/мл), легкого ( $1700 \pm 792$  нг/мл).

Особое положение занимают заболевания печени. При злокачественных опухолях, остром и хроническом воспалении не наблюдается повышения уровня лактоферрина. При циррозе печени уровень лактоферрина составляет  $1075 \pm 370$  нг/мл, при хроническом гепатите —  $1068 \pm 373$  нг/мл,

при вирусном гепатите —  $940 \pm 289$  нг/мл и при раке печени —  $893 \pm 396$  нг/мл. Эти данные свидетельствуют о некотором снижении уровня лактоферрина (статистически недостоверном) при печеночной патологии.

Динамическое наблюдение за больными вирусным гепатитом показало повышение уровня лактоферрина от очень низких значений (231—452 нг/мл) в день поступления до нормального уровня после успешного лечения. У больных раком печени уровень лактоферрина снижался по мере нарастания тяжести состояния. Эта тенденция противоположна наблюдавшейся нами при других видах патологии зависимости уровня лактоферрина от интенсивности и распространенности патологического процесса. Преждевременно делать из этого наблюдения выводы о роли печени в поддержании уровня сывороточного лактоферрина, однако мы считаем вероятным существование такого механизма.

Статистический анализ показал, что достоверный уровень различий с концентрацией лактоферрина у здоровых доноров существует только у больных острой пневмонией, раком кишечника и лимфогранулематозом (в сторону повышения) и с больными раком простаты (в сторону понижения). Последний факт интересен тем, что простата принадлежит к числу немногих органов, синтезирующих лактоферрин [4]. Показано также [5], что злокачественные опухоли простаты характеризуются резким снижением или полной утратой лактоферрина. Эти факты позволяют высказать предположение, что часть сывороточного лактоферрина в норме поставляется предстательной железой, как это доказано для сывороточной кислой фосфатазы.

Оценивая изменение уровня лактоферрина при различной патологии, мы считаем возможным рассматривать этот белок как показатель острой фазы, не связанной с определенным видом патологии.

Полученные данные могут быть использованы для дальнейших исследований и клинической оценки теста на лактоферрин в динамических наблюдениях. Хотя диагностическая значимость теста на лактоферрин невысока (кроме, вероятно, случаев дифференциальной диагностики аденомы и рака простаты), определение лактоферрина может быть полезным в комплексе с другими острофазовыми белками для уточнения степени активности патологического процесса, а также как объективный критерий эффективности противопалительной терапии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Айсен П. // Неорганическая биохимия: Пер. с англ. — М., 1979. — Т. 1. — С. 331—360.
2. Васильев М. Ю., Авдеев Г. И. // Экспер. онкол. — 1985. — Т. 7, № 5. — С. 56—60.
3. Иммуносорбенты в очистке белков: Пер. с англ. — М., 1979.
4. Николаев А. А., Аншакова Н. И. // Вопр. мед. химии. — 1985. — № 3. — С. 128—132.
5. Николаев А. А. // Вопр. онкол. — 1988. — № 9. — С. 1064—1071.
6. Якубовская Р. И., Немцова Е. Р., Коханова И. Д. и др. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 6. — С. 75—79.
7. Farr A. G., Nakdhe P. K. // J. immunol. Meth. — 1981. — Vol. 47, N 2. — P. 125—144.

8. Heckman A. // Biochim. biophys. Acta.— 1971.— Vol. 251.— P. 380—387.
9. Kievits F. // Immunology.— 1985.— Vol. 54, N 3.— P. 449—459.
10. Masson P. L., Heremans J. F., Schone E. // J. exp. Med.— 1969.— Vol. 130.— P. 643—657.
11. Miyauchi J., Watanabe J. // Cell. Tissue Res.— 1987.— Vol. 247.— P. 245—258.
12. Obsen J. et al. // Scand. J. Haemat.— 1979.— N 5.— P. 397—406.
13. Van Snick J., Masson P. L., Heremans J. // J. exp. Med.— 1974.— Vol. 140, N 4.— P. 1068—1084.

Поступила 30.03.89

# CONTENT OF BLOOD SERUM LACTOFERRIN UNDER CONDITIONS OF NORMAL AND PATHOLOGICAL STATES,

A. E. Sukharev, A. A. Nikolaev, M. Yu. Vasil'ev

Medical School, Astrakhan

Lactoferrin was estimated in human blood serum of 292 healthy persons and of 518 patients with various tumoral and non-tumoral diseases by means of an immunoenzymatic assay. The highest content of lactoferrin was detected under conditions of lymphogranulomatosis, malignant tumors of colon and acute pneumonia, while the protein concentration was decreased in impairments of liver tissue and in cancer of prostate.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 615.919:579.852].015.4.07

Н. Н. Отдельнова, Н. П. Чеснокова, Т. Н. Жевак

## МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ТОКСИНОВ АНАЭРОБНОЙ ГАЗОВОЙ ИНФЕКЦИИ

Саратовский медицинский институт

В литературе имеются сведения об анаэробной газовой инфекции, вызываемой различными ассоциациями возбудителей, в частности *Cl. perfringens*, *Cl. oedematiens* в сочетании с другими анаэробными и аэробными микроорганизмами [2, 4, 5, 8—10].

Несмотря на использование принципов комплексной терапии газовой гангрены, процент тяжелых осложнений и летальность при указанной патологии остаются высокими, что указывает на необходимость дальнейшего уточнения механизмов патогенного действия бактериальных экзотоксинов, разработки новых принципов патогенетической терапии, а также установления объективных критериев оценки тяжести метаболических и функциональных расстройств, эффективности

использования средств специфической и неспецифической терапии анаэробной газовой инфекции.

Как известно, основным токсичным компонентом вирулентных штаммов *Cl. perfringens* всех биотипов является  $\alpha$ -токсин, обладающий летальной, гемолитической и энзиматической активностью [11, 12, 14, 15]. Возбудители вида *Cl. oedematiens* реализуют патогенное действие в значительной мере за счет летального фактора —  $\alpha$ -токсина, а также  $\beta$ -токсина — дерматонекрозина [1, 3, 16].

Несмотря на особенности биологических свойств возбудителей анаэробной газовой инфекции, а также определенные различия факторов и ферментов патогенности, являются очевидными и общие закономерности цитопатогенного действия различных экзотоксинов, обусловленные наличием лецитиназной, коллагеназной, протеиназной, липазной, гиалуронидазной и т. д. активности [1, 3, 7].

Цель исследования — установление взаимосвязи тяжести клинических проявлений газовой гангренозной интоксикации с состоянием проницаемости биологических мембран для разработки объективных критериев прогноза токсикоинфекции и оценки эффективности комплексной терапии.

Методика. Эксперименты поставлены на белых крысах обоего пола массой около 250 г. Газово-гангренозную интоксикацию вызывали внутримышечным введением комплекса токсинов *Cl. perfringens* и *Cl. oedematiens* в дозах, составляющих соответственно 20 и 22,5 DLM на 100 г массы животного. В динамике интоксикации изучена активность сывороточных ферментов — аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), альдолазы, являющихся маркерами состояния проницаемости цитоплазматических мембран. Одновременно исследована активность указанных ферментов в тканях печени, почек, легких, мозга, икропояжной мышцы (на стороне введения токсина и в интактной конечности). Определение активности сывороточных и тканевых ферментов проводили общепринятыми методами с использованием соответствующих наборов реактивов [6, 13].

Результаты и обсуждение. Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о том, что уже в ранний доклинический период интоксикации спустя 2 ч после внутримышечного введения токсина возникало выраженное увеличение активности сывороточных ферментов — АСТ, АЛТ, альдолазы (табл. 1), которое указывало на повышение проницаемости цитоплазматических мембран. В период гематогенного распространения токсина и фиксации его в тканях отме-

Таблица 1

Изменение активности альдолазы, АСТ и АЛТ сыворотки крови в динамике газовой гангренозной интоксикации (в ммоль/мл/ч)

Фермент	Контроль	Стадия интоксикации		
		легкая (2 ч)	среднетяжелая (10 ч)	тяжелая (20 ч)
Альдолаза	1,96±0,20	3,45±0,21 $p<0,001$	3,99±0,32 $p<0,001$ $p_1>0,05$	2,30±0,20 $p>0,05$ $p_1<0,001$
АСТ	2,1±0,5	3,7±0,2 $p<0,01$	6,4±0,6 $p<0,001$ $p_1<0,001$	6,4±0,3 $p<0,001$ $p_1>0,1$
АЛТ	2,1±0,1	4,1±0,2 $p<0,001$	2,8±0,3 $p>0,05$ $p_1<0,001$	4,9±0,9 $p<0,01$ $p_1<0,05$

Примечание. В скобках время после введения токсина. Здесь и в табл. 2 и 3 число экспериментов в каждой серии 10—15;  $p$  — по сравнению с контролем;  $p_1$  — по сравнению с предшествующей стадией интоксикации.

Изменение активности АСТ (в мкмоль/мл/ч) в динамике газово-гангренозной интоксикации ( $M \pm m$ )

Ткань	Контроль	Стадия интоксикации		
		легкая	среднетяжелая	тяжелая
Печень	1857 $\pm$ 139	663,6 $\pm$ 95,8 $p < 0,01$	1901 $\pm$ 84,4 $p > 0,1$ $p_1 < 0,001$	2101 $\pm$ 230,8 $p > 0,1$ $p_1 > 0,05$
Почки	777,5 $\pm$ 32,2	272,7 $\pm$ 27,9 $p < 0,001$	1370 $\pm$ 97,8 $p < 0,01$ $p_1 < 0,001$	957,5 $\pm$ 79,6 $p < 0,05$ $p_1 < 0,01$
Легкие	397,5 $\pm$ 23,1	80,9 $\pm$ 6,5 $p < 0,001$	356,2 $\pm$ 26,3 $p > 0,05$ $p_1 < 0,001$	267,7 $\pm$ 19,6 $p > 0,05$ $p_1 < 0,02$
Спинной мозг	1377,2 $\pm$ 72,0	340,0 $\pm$ 41,2 $p < 0,001$	1145 $\pm$ 101,1 $p > 0,05$ $p_1 < 0,001$	1186 $\pm$ 84,0 $p > 0,05$ $p_1 > 0,05$
Икроножная мышца: интактная конечность	766,0 $\pm$ 38,0	385,0 $\pm$ 23,1 $p < 0,001$	1672,7 $\pm$ 96,2 $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$	1114,0 $\pm$ 66,4 $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$
на стороне введения токсина	---	293,2 $\pm$ 21,6 $p < 0,001$ — $p_2 < 0,01$	605,0 $\pm$ 60,7 $p < 0,05$ $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	703,8 $\pm$ 87,2 $p > 0,05$ $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,01$

Примечание. Здесь и в табл. 3;  $p_2$  — по сравнению с мышцей интактной конечности.

чалось подавление активности АСТ в печени, почках, легких, мозге, мышце (табл. 2). Активность АСТ икроножной мышцы на стороне введения токсина снижалась в большей степени, чем на интактной конечности. Что касается активности АЛТ, то она заметно снижалась в гомогенатах печени, мозга, легких, мышцы на стороне введения токсина (табл. 3). В почках и в мышце интактной конечности активность АЛТ не изменялась.

В последующих сериях экспериментов представлялось целесообразным выяснить как изменится соотношение активности сывороточных и тканевых ферментов по мере развития выраженных клинических проявлений газово-гангренозной интоксикации, характеризующихся возникновением значительных расстройств микроциркуляции, водно-солевого баланса, кислотно-щелочного состояния организма. Как оказалось, спустя 10 ч после введения токсина на фоне локальных расстройств гемодинамики, отека конечностей, общей гиподинамии отмечалось дальнейшее возрастание активности сывороточной АСТ (см. табл. 1). В то же время активность АЛТ несколько снижалась по сравнению с предыдущей стадией интоксикации и достигала контрольных величин, а активность альдолазы сыворотки крови оставалась высокой, как и в доклинический период интоксикации. Обращает на себя внимание тот факт, что активность АЛТ тканей печени, почек, мозга, мышц на стороне введения токсина и интактной стороне оставалась низкой, как и в предыдущий период интоксикации (см. табл. 3). Активность АСТ тканей начинала возрастать по сравнению с предыдущим периодом интоксикации, достигая контрольных величин в печени и мозге, а также превышая контрольные показатели в легких и мышце интактной конечности (см. табл. 2).

Последующие серии экспериментов были поставлены на животных в условиях тяжелой генерализованной интоксикации, характеризующейся развитием полной адинамии, одышки, тахикардии, отеком конечности в месте введения токсина, распространяющимся на переднюю брюшную

стенку. В указанный период интоксикации активность сывороточных трансаминаз оставалась высокой, а активность альдолазы сыворотки крови снижалась по сравнению с предыдущим периодом интоксикации и достигала контрольных показателей (см. табл. 1). В то же время ферментативная активность тканей изменялась неоднозначно. Активность АЛТ оставалась ниже нормы в печени, превышала контрольные показатели в мышце интактной конечности (см. табл. 3). В почках, мозге, легких, мышце на стороне введения токсина активность АЛТ возрастала по сравнению с предыдущей стадией интоксикации и достигала контрольных показателей. В легочной ткани, как и в предыдущий период интоксикации, активность АЛТ оставалась в пределах нормы.

На терминальной стадии интоксикации выявлена нормализация активности АСТ в гомогенатах печени, легких, мозга, мышцы на стороне введения токсина (см. табл. 2). Ферментативная активность АСТ гомогенатов тканей почек, икроножной мышцы интактной конечности превышала контрольные показатели, как и в предыдущий период интоксикации.

Таким образом, характерной особенностью газово-гангренозной интоксикации является повышение активности сывороточных ферментов — трансаминаз и альдолазы. Ферментативная активность сыворотки крови возрастает уже в ранний доклинический период интоксикации — период гематогенного распространения токсина и фиксации его в тканях, что свидетельствует о важной роли токсического фактора в дестабилизации биологических мембран и выходе цитоплазматических ферментов в регионарный и системный кровоток. Эксперименты, проведенные в динамике интоксикации, позволили выявить коррелятивную взаимосвязь состояния активности АСТ и АЛТ с тяжестью клинических проявлений патологии. На терминальной стадии интоксикации, осложненной расстройствами системной гемодинамики и микроциркуляции, активность сывороточных ферментов значительно превышала соответствующие показа-

Изменение активности АСТ (в мкмоль/мл/ч) тканей в динамике газовой гангренозной интоксикации ( $M \pm m$ )

Ткань	Контроль	Стадия интоксикации		
		легкая	среднетяжелая	тяжелая
Печень	2544 $\pm$ 219,0	1240,9 $\pm$ 153,8 $p < 0,001$	1340,2 $\pm$ 210 $p < 0,01$ $p_1 > 0,05$	1430 $\pm$ 146 $p < 0,001$ $p_1 > 0,1$
Почки	284,9 $\pm$ 32,1	281,2 $\pm$ 37,6 $p > 0,2$	143,5 $\pm$ 22,9 $p < 0,05$ $p_1 < 0,01$	214,5 $\pm$ 53,0 $p > 0,05$ $p_1 > 0,05$
Легкие	145,0 $\pm$ 37,4	31,0 $\pm$ 1,9 $p < 0,01$	83,2 $\pm$ 18,9 $p > 0,05$ $p_1 < 0,02$	83,1 $\pm$ 7,3 $p > 0,05$ $p_1 > 0,1$
Спинной мозг	101,3 $\pm$ 6,1	48,1 $\pm$ 6,9 $p < 0,001$	49,1 $\pm$ 6,0 $p < 0,001$ $p_1 > 0,1$	77,5 $\pm$ 10,0 $p < 0,05$ $p_1 < 0,05$
Икроножная мышца: интактная конечность	352,0 $\pm$ 40,5	223,6 $\pm$ 50,8 $p > 0,05$	206,6 $\pm$ 37,0 $p < 0,05$ $p_1 > 0,1$	496,0 $\pm$ 48,7 $p < 0,05$ $p_1 < 0,001$
на стороне введения токсина	—	173,6 $\pm$ 24,0 $p < 0,02$	116,4 $\pm$ 27,4 $p < 0,001$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	247,6 $\pm$ 29,1 $p > 0,05$ $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,01$

тели раннего доклинического периода интоксикации. Последнее указывает на то, что патогенные эффекты газовой гангренозной токсинемы на процессы проницаемости цитоплазматических мембран потенцируются за счет прогрессирующей циркуляторной гипоксии и соответствующих расстройств кислотно-щелочного состояния организма.

Изучение ферментативной активности тканей не позволило выявить выраженной селективности цитопатогенного действия токсинемы газовой гангрены. Подавление активности ферментов гомогенатов тканей имело место как в зоне введения токсина (икроножная мышца), так и далеко за пределами его введения (в различных внутренних органах, мышце интактной конечности) в период гематогенного распространения токсина и фиксации его в тканях. По мере развития клинических проявлений интоксикации и уменьшения концентрации токсина на терминальных стадиях патологии отмечалось постепенное возрастание ферментативной активности гомогенатов тканей.

Результаты проведенных экспериментов позволяют заключить, что состояние активности сывороточных трансаминаз является чувствительным интегративным показателем проницаемости биологических мембран, который может быть использован для объективной оценки тяжести течения газовой гангренозной интоксикации и эффективности фармакологической коррекции метаболических и функциональных расстройств. Активность сывороточной альдолазы не может быть использована в качестве критерия оценки тяжести газовой гангренозной интоксикации и эффективности комплексной терапии при указанной патологии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Арапов Д. А. Анаэробная газовая инфекция.— М., 1972.
2. Буачидзе Т. О., Чубинидзе Д. П., Джанашивили М. И. // Сепсис.— Тбилиси, 1987.— С. 611—613.
3. Далин М. В., Фиш Н. Г. Белковые токсины микробов.— М., 1980.
4. Иванов Г. К. // Анест. и реаниматол.— 1986.— № 5.— С. 69—70.

5. Кулевник Н. И., Ваврик Ж. М., Лычук Е. В. и др. // Вестн. хир.— 1985.— № 1.— С. 129—131.
6. Лабораторные методы исследования в клинике / Меншиков В. В., Делекторская Л. Н., Золотницкая Р. П. и др.— М., 1987.
7. Мельников В. Н., Мельников Н. И. Анаэробная инфекция.— М., 1973.
8. Осипов А. П., Бронников Ю. А., Филинков С. Ф. // Клини. хир.— 1987.— № 1.— С. 62.
9. Пушкарев Н. И., Парфенов Б. И. // Вестн. хир.— 1985.— № 1.— С. 131—133.
10. Сухомлинова Г. И., Зуева Л. П., Яфаев Р. Х. и др. // Журн. микробиол.— 1988.— № 5.— С. 31—34.
11. Fujii J., Namura S., Oshita Y., Sakurai J. // Jap. J. med. Sci.— 1984.— Vol. 37, N 4.— P. 194—195.
12. Ohsaka A., Tsuchiya M. // Microvasc. Res.— 1982.— Vol. 23, N 1.— P. 135.
13. Reilman S., Frankel S. // Amer. J. clin. Path.— 1957.— Vol. 28, N 1.— P. 56.
14. Stevens D. A., Troyer B. E., Merrick D. T. // Infect. Dis.— 1988.— Vol. 157, N 2.— P. 272—279.
15. Szmigielski S., Janiak M., Mollby R., Wadstrom T. // Toxicol.— 1978.— Vol. 16, N 6.— P. 567—574.
16. Taguchi R., Ikerawa H. // Anim. Plant Microbial Toxins.— 1976.— Vol. 1, N 4.— P. 429—436.

Поступила 03.04.89

#### METABOLIC EFFECTS OF ANAEROBIC GAS INFECTION TOXINS

N. N. Otdel'nova, N. P. Chesnokova, T. N. Zhevak

Medical School, Saratov

Activity of blood serum transaminases correlated distinctly with severity of clinical symptoms of gas-gangrenous intoxication, studied in rats in dynamics of the impairment. Activity of the tissue enzymes did not exhibit this correlation. Evaluation of transaminases activity may be used as an objective criterion of the toxic infection development as well as of complex therapy efficiency.

## ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ МЕТ-ЭНКЕФАЛИНА В НАДПОЧЕЧНИКАХ И ПЛАЗМЕ КРОВИ КРЫС ПРИ ОСТРОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

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

Известна важная роль энкефалиновой системы в патогенезе алкоголизма [1, 4, 5]. Однако молекулярные механизмы действия этанола на метаболизм энкефалинов в головном мозге изучены недостаточно полно. В частности, остается неясной значимость нарушений процессов образования, высвобождения и обратного захвата этих пептидов в активацию энкефалиновой нейропередачи под действием этанола [3]. Одним из подходов к выявлению этого вопроса может быть проведение исследований в модельной системе. Сходство путей биосинтеза, процессинга и высвобождения мет-энкефалина в мозге и хромаффинной ткани надпочечников [9, 12–14] позволяет с известной осторожностью использовать в качестве такой модели систему надпочечники—кровь. Важно отметить, что такие характеристики этой системы, как анатомическое разделение места биосинтеза мет-энкефалина и места циркуляции пептида после его высвобождения во внеклеточное пространство, поддержание плазменного пула мет-энкефалина преимущественно за счет поступления из надпочечников [6, 11] и относительно низкая скорость ферментной инактивации пептида в крови [10], существенно упрощают оценку изменений отдельных звеньев метаболизма мет-энкефалина.

В связи с этим в экспериментах на крысах нами изучено влияние острой алкогольной интоксикации на содержание мет-энкефалина в плазме крови и надпочечниках, а также на активность ферментных систем катаболизма мет-энкефалина в сыворотке крови.

**Методика.** В работе использовали беспородных белых крыс-самцов массой 200–250 г. Однократное введение 20 % раствора этанола в 0,9 % NaCl проводили внутривенно в дозе 4 г/кг. Контрольным животным вводили эквивалентный объем 0,9 % NaCl. Крыс забивали декапитированием немедленно после введения растворов, а также через 15, 60 или 120 мин после инъекции. Для получения плазмы 5 мл цельной крови быстро смешивали в полипропиленовой пробирке с 0,1 мл 0,2 М Na<sub>2</sub>-ЭДТА pH 7,5 и центрифугировали при 700g (15 мин, 4 °C). Экскрецию мет-энкефалина из плазмы крови проводили по методу [8]. Экстракты частично упаривали в токе воздуха, лиофилизовали и хранили при –80 °C.

Для получения сыворотки крови цельную кровь инкубировали 40 мин при 37 °C и центрифугировали при 700g (15 мин, 4 °C). Сыворотку разводили в 100 раз 10 mM трис-HCl-буфером pH 7,7.

Надпочечники немедленно по извлечении замораживали и хранили при –80 °C. Экстракцию энкефалиноподобных пептидов проводили, как описано в работе [3], для отделов мозга; нейтрализованные экстракты лиофилизовали.

Содержание мет-энкефалина в экстрактах плазмы крови и надпочечников определяли методом радиоиммуннологического анализа, используя наборы фирмы «Inestar» (США); лиофилизованные экстракты перед опытом растворяли в 0,5 мл БСА-фосфатного буфера, прилагаемого к наборам.

Суммарную скорость ферментативного расщепления [3,5-

<sup>3</sup>H]-тир-лей<sup>5</sup>-энкефалина в сыворотке крови определяли по скорости убывания этого пептида, одновременно контролируя скорость образования [<sup>3</sup>H]-тирсодержащих продуктов его гидролиза. Реакционная смесь (объем 50 мкл) содержала исследуемый образец, преинкубированный 15 мин при 30 °C, и [3,5-<sup>3</sup>H]-тир-лей<sup>5</sup>-энкефалин (37 Ки/ммоль, фирма «Amersham», Великобритания), конечная концентрация 600 нМ в 10 mM трис-HCl-буфере pH 7,7. После инкубации (15 мин, 30 °C) реакцию останавливали добавлением 5 мкл 2 н. HCl. В контрольные пробы HCl вносили перед добавлением раствора субстрата. Тонкослойную хроматографию реакционной смеси, определение радиоактивно-меченных продуктов и расчет скорости гидролиза пептида проводили, как описано ранее [2].

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

**Результаты и обсуждение.** Как видно из таблицы, инъекция этанола уже через 15 мин приводила к снижению содержания мет-энкефалина в надпочечниках. Однако через 1 ч после введения этанола величина этого показателя существенно превышала контрольный уровень, а к моменту окончания наблюдений соответствовала контрольным значениям. В плазме крови животных опытной группы сразу же после инъекции этанола обнаружено некоторое повышение концентрации мет-энкефалина, однако, начиная с 15-й минуты эксперимента, была отмечена противоположная тенденция, которая через 2 ч с момента введения этанола достигала уровня статистической значимости. Вместе с тем скорость гидролиза [<sup>3</sup>H]-тир-лей-энкефалина в препаратах сыворотки крови животных опытной и контрольной групп практически не различалась между собой. Следует отметить, что не было выявлено различий и в скорости образования отдельных продуктов гидролиза [<sup>3</sup>H]-тир-лей-энкефалина — тирозина, тир-гли и тир-гли-гли (в контрольной группе эти величины составляли в среднем 1006±95, 80,1±10,2, 63,2±8,8 пмоль/мин на 1 мл сыворотки соответственно).

Предварительно проведенное нами сравнительное исследование гидролиза <sup>3</sup>H-тир-лей-энкефалина в плазме и сыворотке крови крыс (данные не приводятся) показало, что деградация энкефалина в этих биологических жидкостях протекает практически идентично и с одинаковой скоростью. Этот факт хорошо согласуется с имеющимися в литературе сведениями о ключевой роли сывороточных ферментов (в первую очередь аминоклонидазы, отщепляющей остаток тирозина) в катаболизме энкефалинов в крови [7, 15]. По-видимому, отмеченное нами снижение уровня мет-энкефалина в плазме крови вызвано не ускорением его ферментного расщепления, а уменьшением поступления пептида в кровяное русло. Анализируя полученные данные, можно предположить, что в первые минуты после инъекции этанола происходит выброс мет-энкефалина из надпочечников в кровяное русло, который приводит к уменьшению пула мет-энкефалина в надпочечниках и к некоторому снижению поступления пептида в кровяное русло через 15 мин после начала эксперимента. Увеличение концентрации пептида в надпочечниках на фоне тенденции к понижению его содержания в плазме крови, выявленное через 60 мин после введения этанола, по-видимому, вызвано ускорением образования мет-энкефалина в надпочечниках с одновременным торможением его высвобождения в кровь, в пользу чего свидетельствует дальнейшее пони-

Скорость гидролиза [ $^3\text{H}$ ]-тир-лей-энкефалина сывороткой крови (III), содержание мет-энкефалина в плазме крови (II) и надпочечниках (I) крыс после однократного введения этанола ( $M \pm m$ ,  $n=4$ )

Время после введения, мин	I		II		III	
	пг на 1 мг ткани		пг на 1 мл плазмы		пмоль/мин на 1 мл сыворотки	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
0	11,4 $\pm$ 4,4	14,5 $\pm$ 5,1	60,1 $\pm$ 15,6	98,0 $\pm$ 19,3	—	—
15	16,2 $\pm$ 2,7	8,7 $\pm$ 0,8*	67,9 $\pm$ 2,8	49,1 $\pm$ 10,3	1113 $\pm$ 47	1108 $\pm$ 18
60	11,0 $\pm$ 3,5	22,7 $\pm$ 1,0*	77,8 $\pm$ 10,2	55,6 $\pm$ 4,4	1265 $\pm$ 70	1165 $\pm$ 25
120	16,6 $\pm$ 1,5	15,4 $\pm$ 3,3	83,6 $\pm$ 13,1	47,4 $\pm$ 6,4*	1041 $\pm$ 30	1080 $\pm$ 11

Примечание. Звездочка —  $p < 0,05$  относительно контроля.

жение концентрации пептида в плазме крови. Как следует из полученных данных, стимулирующее влияние этанола на образование мет-энкефалина не является постоянным: через 120 мин после начала эксперимента содержание пептида в надпочечниках возвращается к контрольному уровню, а его концентрация в плазме крови еще более понижается. Вероятно, в период между 60-й и 120-й минутами с момента введения этанола происходит угнетение образования мет-энкефалина на фоне пониженной скорости высвобождения пептида в кровяное русло.

Таким образом, анализ полученных результатов позволяет выделить 2 фазы в действии этанола на метаболизм энкефалинов в системе надпочечники — кровь: фазу активации и фазу угнетения поступления пептида в кровяное русло. Первая из них характеризуется усиленным высвобождением мет-энкефалина из надпочечников в кровь на фоне неизменной скорости образования пептида. Вторая — угнетением высвобождения мет-энкефалина на фоне сначала усиленного, а затем пониженного его образования в ткани надпочечников. Процессы, происходящие во второй фазе, могут быть как следствием прямого влияния этанола, так и результатом действия компенсаторных механизмов, направленных на нормализацию функционального состояния энкефалиновой системы надпочечников в плазме крови.

Ранее нами было показано, что этанол активирует энкефалиновую систему мозга, увеличивая скорость поступления пептидов к их рецепторам [3]. Сходство путей образования и высвобождения мет-энкефалина в надпочечниках и мозге [9, 12—14] позволяет предположить, что основной причиной такого действия этанола является увеличение высвобождения пептида из пресинаптических нервных окончаний. Вместе с тем по аналогии с реакцией энкефалиновой системы надпочечников на однократное воздействие этанола следует заключить, что стимуляция энкефалиновой системы мозга, по-видимому, также сменяется ее угнетением вследствие торможения процесса высвобождения пептидов из энкефалинергических нейронов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Анохина И. П., Маньковская И. В., Машиллов К. В., Кудинова Е. В. // Фармакология нейропептидов. — М., 1982. — С. 42—54.
2. Беляев Н. А., Брусов О. С., Панченко Л. Ф. // Вопр. мед. химии. — 1983. — № 1. — С. 102—107.
3. Беляев Н. А., Балакирева Н. Н., Брусов О. С., Панченко Л. Ф. // Биохимия. — 1984. — № 9. — С. 1425—1430.
4. Панченко Л. Ф., Беляев Н. А. // Современные проблемы нейронсифармакологии, принципы патогенетического лечения больных нервными и психическими заболеваниями. — М., 1984. — С. 147—150.
5. Панченко Л. Ф., Беляев Н. А. // Всесоюзный съезд невропатологов, психиатров и наркологов, 8-й: Тезисы докладов. — М., 1988. — Т. 1. — С. 410—412.
6. Clement-Jones V., Corder R., Smith R. // *Advanc. Biochem. Psychopharmacol.* — 1982. — Vol. 33. — P. 379—387.
7. Coletti-Previero M. A., Mattras H., Descomps B. et al. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1981. — Vol. 657. — P. 122—127.
8. Govoni S., Bosio A., Di Monda E. et al. // *Life Sci.* — 1983. — Vol. 33. — P. 1581—1586.
9. Fricker L. D., Suppatapone S., Snyder S. H. // *Ibid.* — 1982. — Vol. 31. — P. 1841—1844.
10. Hambrook J. M., Morgan B. G., Rance M. J. et al. // *Nature.* — 1976. — Vol. 262. — P. 782—783.
11. Hexum T. D., Hanbauer L., Govoni S. et al. // *Neuropeptides.* — 1980. — Vol. 1. — P. 137—142.
12. Höllt V. // *Trends Neurosci.* — 1983. — Vol. 6. — P. 24—26.
13. Hughes J. // *Brit. med. Bull.* — 1983. — Vol. 39. — P. 17—24.
14. Udenfriens S., Kilpatrick D. L. // *Arch. Biochem.* — 1983. — Vol. 221. — P. 309—323.
15. Venturelli F., Roscetti G., Possenti R. et al. // *Neurochem. Res.* — 1985. — Vol. 10. — P. 333—342.

Поступила 25.04.89

## DYNAMICS OF MET-ENCEPHALINE CONTENT IN RAT ADRENAL GLANDS AND BLOOD PLASMA IN ACUTE ALCOHOL INTOXICATION

N. A. Belyaev, E. F. Kolesanova

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

Content of Met-enkephaline in rat adrenal glands and blood plasma as well as activity of the enzymatic systems catalyzing the enkephalines catabolism in blood serum were studied after a single administration of ethanol into rats. Dynamics of Met-enkephaline alterations studied suggest that phases of activation and inhibition occur in the secretion of the peptide from adrenal gland into circulation.



© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.74-008.931:577.152.321]-074-092.9

Г. А. Соловьева, С. Ю. Сундуков, Г. Н. Филиппова

## ТУРБИДИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ГЛИКОГЕНСИНТАЗЫ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ КРОЛИКА

Кафедра биохимии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова

Гликогенсинтаза (УДФГ:  $\alpha$ -1,4-глюкан- $\alpha$ -4-глюкозилтрансфераза, КФ 2.4.1.11) — важный регуляторный фермент метаболизма гликогена — катализирует синтез гликогена путем переноса глюкозильного остатка уридиндифосфатглюкозы (УДФГ) на передупуцирующий конец одной из цепей синтезируемой молекулы гликогена.

Для определения активности гликогенсинтазы предложено несколько методов. Наибольшее распространение получил метод, основанный на измерении радиоактивности после включения гликозильных остатков УДФ- ( $^{14}\text{C}$ )-глюкозы в гликоген [26]. Другой метод основан на определении количества УДФ, образовавшегося в процессе гликогенсинтазной реакции, которую проводят в безбелковом центрифугате после остановки реакции кипячением. Затем УДФ определяют спектрофотометрически в сопряженной системе с пируваткиназой и лактатдегидрогеназой [16] или в реакции с пируваткиназой с последующим колориметрическим определением пирувата с динитрофенилгидразином [15].

Однако эти методы не дают возможности непосредственно наблюдать за ходом гликогенсинтазной реакции. Использование сопряженной системы ферментов для непрерывной регистрации гликогенсинтазной активности [21] также связано с рядом ограничений, в частности возможно влияние изучаемых факторов на компоненты сопряженной системы.

Нами был предложен метод непрерывной регистрации активности гликогенсинтазы I, основанный на потенциометрии [7]. Недостатками метода являются необходимость использования дополнительной аппаратуры, трудоемкость, невозможность применения веществ, изменяющих буферную емкость системы.

При синтезе или распаде гликогена происходит соответственно увеличение или уменьшение его молекулярной массы, что сопровождается изменением интенсивности светорассеяния реакционной смеси [17]. На основе этого явления был разработан турбидиметрический метод определения активности гликогенфосфорилазы, связанный с непрерывной регистрацией мутности раствора гликогена в области длин волн выше 300 нм [11, 25]. Использование этого метода при исследовании мышечной гликогенфосфорилазы позволило получить ряд важных результатов [2, 3, 12].

В данной работе проведено сравнение турбидиметрического метода определения активности гликогенсинтазы скелетных мышц кролика со

спектрофотометрическим методом непрерывной регистрации гликогенсинтазной реакции на примере ингибирования фермента адениловыми нуклеотидами и уридиндифосфатом (УДФ).

**Методика.** Гликогенсинтазу I и D в комплексе с гликогеном выделяли из скелетных мышц кролика по методу [22] с некоторыми модификациями [6]. Фермент хранили при  $-20^\circ\text{C}$ , для его стабилизации использовали глицерин [10].

При разработке турбидиметрического метода активность гликогенсинтазы определяли спектрофотометрически в сопряженной системе с пируваткиназой и лактатдегидрогеназой, определяя уменьшение концентрации НАД $\cdot$ H по поглощению при 340 нм. Состав реакционной среды: 10 мМ трис-HCl-буфер pH 7,8, 10 мМ KCl, 10 мМ  $\text{Mg}_2\text{Cl}_2$ , 0,2 мМ НАД $\cdot$ H, 1 мМ фосфоэнолпируват, 3 мМ УДФГ, пируваткиназа 10 ед., лактатдегидрогеназа 10 ед. При определении гликогенсинтазной активности турбидиметрическим методом реакцию проводили в кювете с длиной оптического пути 1 см в 50 мМ трис-HCl-буфере pH 7,8 в присутствии 10 мМ KCl при различных концентрациях фермента, гликогена и УДФГ. В качестве активаторов использовали глюкозо-6-фосфат в концентрации 0,04, 0,8 и 8 мМ (для обеих форм фермента), а также 5 мМ  $\text{Mg}_2\text{Cl}_2$  и 10 мМ  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (для гликогенсинтазы I). Непрерывную регистрацию мутности смеси осуществляли при 360 и 400 нм. Для определения количества образовавшегося УДФ гликогенсинтазную реакцию останавливали, добавляя трихлоруксусную кислоту до конечной концентрации 5 %; белок удаляли центрифугированием при 1000g в течение 15 мин; супернатант нейтрализовали KOH (обработка трихлоруксусной кислотой и KOH не приводила к потере УДФ). Состав реакционной смеси: 50 мМ трис-HCl-буфер pH 7,8, 10 мМ KCl, 5 мМ  $\text{Mg}_2\text{Cl}_2$ , 0,2 мМ НАД $\cdot$ H, 1 мМ фосфоэнолпируват, пируваткиназа 10 ед., лактатдегидрогеназа 10 ед. Реакцию начинали с добавления 10 мкл раствора, содержащего УДФ, к 1 мл реакционной смеси; регистрацию оптической плотности проводили при 340 нм. В работе применяли регистрирующий спектрофотометр «Hitachi 200-20» (Япония). Все измерения проводили при  $25^\circ\text{C}$ . Все выделенные препараты были гомогенны по данным электрофореза в 7,5 % полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, проводимого по методу [27]. Содержание белка определяли по методу [23].

При изучении обратимого ингибирования гликогенсинтазы адениловые нуклеотиды и УДФ вносили непосредственно в пробу для определения ферментативной активности.

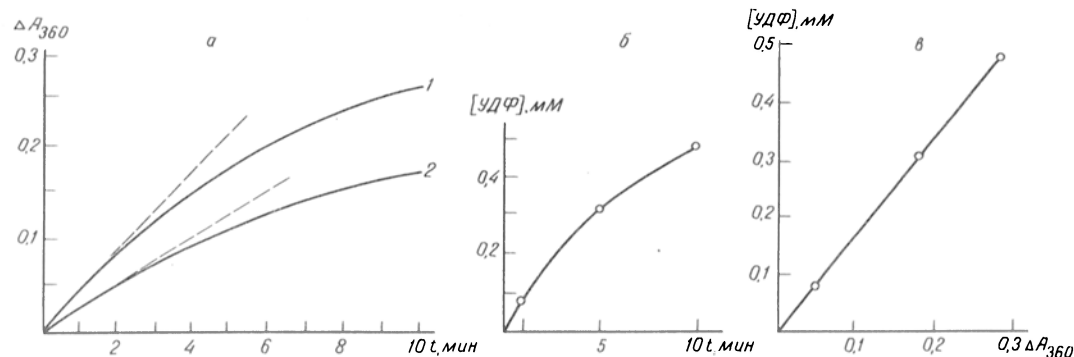
В работе использовали следующие реактивы: УДФ, УДФГ, АДФ, АТФ и глюкозо-6-фосфат, динатриевую соль («Reanal», Венгрия), трис («Sigma», США);  $\beta$ -меркаптоэтанол («Loba-Chemie», Австрия); ДЭАЭ-целлюлозу DE-52 («Whatman», Англия), остальные реактивы отечественного производства марки х.ч. и ос.ч.

**Результаты и их обсуждение.** На рис. 1 представлены типичные кривые регистрации гликогенсинтазной реакции турбидиметрическим методом. В присутствии  $5\text{ мМ Mg}^{2+}$  — ионов, которые, как было показано в работе [21], устраняют ингибирующее действие продукта реакции УДФ, ход гликогенсинтазной реакции в течение 2 мин был линейным. Повышение концентрации нуклеотидного субстрата УДФГ приводит к увеличению начальной скорости реакции. В качестве фермента использовали препарат комплекса гликогенсинтаза I — гликоген, который характеризуется адсорбционной емкостью  $(1,89 \pm 0,40) \times 10^{-6}$  моль фермента в расчете на тетрамер и является насыщенным по углеводному субстрату [4, 8].

Как следует из табл. 1, начальная скорость гликогенсинтазной реакции не зависит от концентрации добавленного гликогена в интервале 0—1 мг/мл; следовательно, комплекс гликоген-

Рис. 1. Турбидиметрическое определение активности гликогенсинтазы скелетных мышц кролика.

[E] — 20 мкг/мл, [УДФГ] — 1 мМ (1) и 0,3 мМ (2), без добавления гликогена. а — увеличение оптической плотности реакционной смеси при 360 нм; б — накопление УДФ; в — соотношение между увеличением оптической плотности и накоплением УДФ.



синтаза I — гликоген действительно характеризуется насыщением по углеводному субстрату. В дальнейшем при измерении активности гликогенсинтазы турбидиметрическим методом гликоген в реакционную среду не добавляли.

Внесение в пробу различного количества белка, а также веществ, подлежащих испытанию, приводит к изменению буферной емкости реакционной среды, что может оказать влияние на активность фермента. В наших исследованиях зависимости активности гликогенсинтазы от буферной емкости среды было показано, что начальная скорость ферментативной реакции не зависит от концентрации трис-НСI-буфера pH 7,8 в пределах 10—100 мМ. Все последующие измерения проводили в 50 мМ трис-НСI-буфере pH 7,8.

Зависимость скорости гликогенсинтазной реакции от концентрации белка в интервале от 5 до 50 мкг/мл линейна; при этом данные, полученные в разные дни, демонстрируют хорошую воспроизводимость результатов измерения активности гликогенсинтазы I турбидиметрическим методом (рис. 2). Ошибка измерения ферментативной активности, вычисленная по результатам 5 независимых экспериментов, колеблется от 7,5 до 3 % при концентрации белка от 5 до 30 мкг/мл соответственно. Далее определение активности фермента проводили при концентрации белка 20—30 мкг/мл.

Турбидиметрический метод позволяет выражать начальную скорость гликогенсинтазной реакции в единицах оптической плотности (в нашем случае при 360 и 400 нм) в минуту. Для определения коэффициентов пересчета [УДФ]/1 ед.  $A_{360}$  и [УДФ]/1 ед.  $A_{400}$  в двух сериях аналогичных проб для каждой длины волны проводили ферментативную реакцию в течение 1, 5 и 10 мин. В I серии проб регистрировали увеличение мутности гликогена в ходе гликогенсинтазной реакции (см. рис. 1), во II серии определяли количество образовавшегося УДФ (см. рис. 2) спектро-

фотометрическим методом в сопряженной системе с пируваткиназой и лактатдегидрогеназой.

Как видно на рис. 1, в ходе синтеза гликогена наблюдается линейное соотношение между концентрацией образовавшегося УДФ и увеличением оптической плотности реакционной смеси. Таким образом, действительно, увеличение оптической плотности при 300—400 нм во время ферментативной реакции обусловлено возрастанием концентрации гликогена. Коэффициенты пересчета, вычисленные по результатам 15 независимых экспериментов, составляют  $1,69 \pm 0,08$  мМ УДФ на 1 ед.  $A_{360}$  и  $2,03 \pm 0,01$  мМ УДФ на 1 ед.  $A_{400}$ . Использование этих величин позволяет выразить активность гликогенсинтазы, определенную турбидиметрическим методом, в стандартных единицах. Величины удельной активности гликогенсинтазы, полученные спектрофотометрическим и турбидиметрическим методами, совпадают.

Известно, что гликогенсинтаза характеризуется сложным кинетическим поведением [1, 10, 22]. По данным, полученным потенциометрическим методом, в отсутствие активаторов фермент обладает кооперативным эффектом по субстрату, УДФГ [5]. В присутствии 5 мМ  $Mg^{2+}$  кооперативный эффект исчезает и кривая насыщения гликогенсинтазы I УДФГ описывается уравнением Михаэлиса—Ментен.

Таблица 1

Влияние добавления гликогена на  $V_0$  гликогенсинтазной реакции

Концентрация УДФГ, мМ	Концентрация $MgCl_2$ , мМ	Содержание гликогена, мг/мл	$V_0$ гликогенсинтазной реакции, ед. $A_{360}/мин$
1,0	—	—	0,019
		0,03	0,022
		0,04	0,023
		0,05	0,020
		0,10	0,022
		0,20	0,019
		1,00	0,022
0,1	—	—	0,0045
		0,10	0,0050
		0,20	0,0045
		1,00	0,0049
1,0	5,0	—	0,056
	5,0	0,10	0,062
	5,0	0,20	0,060
	5,0	1,00	0,059
0,1	5,0	—	0,020
	5,0	0,10	0,016
	5,0	0,20	0,018
	5,0	1,00	0,019

$V_0$ , ед.  $A_{360}/мин$

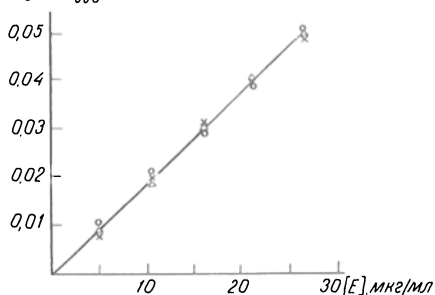


Рис. 2. Зависимость начальной скорости гликогенсинтазной реакции от концентрации фермента. [УДФГ] — 1 мМ. 0, А, X — экспериментальные данные, полученные в разные дни.

Характеристика 3 групп препаратов гликогенсинтазы

№	I/I+D, %	Форма фермента	$K_{UD\Phi}$ , мкМ	$K_{UD\Phi}$ , мкМ	$K_{AD\Phi}$ , мМ	$K_{AT\Phi}$ , мМ
1	>90	I	115—135	35—40	1,40—1,55	1,05—1,15
2	<30	D	210—240	25—30	0,57—0,60	0,40—0,45
3	60—70	I+D	190—200	32—36	—	—

Мы получили аналогичные результаты, используя турбидиметрический метод (рис. 3). В отсутствие активаторов в области концентраций УДФГ от 0,2 до 0,5 мМ наблюдается промежуточное плато; в присутствии 5 мМ  $Mg^{2+}$  кривая насыщения фермента УДФГ становится гиперболической, т. е.  $Mg^{2+}$  снимает кооперативный эффект, индуцируемый УДФГ.

Сходное действие на гликогенсинтазу I оказывают 10 мМ сульфат-анионы, а также глюкозо-6-фосфат в концентрации от 0,04 до 8 мМ; в последующей работе в качестве активатора использовали 10 мМ  $Na_2SO_4$  [22].

В присутствии 8,0 мМ глюкозо-6-фосфата гликогенсинтаза D также характеризуется гиперболической зависимостью  $V_0$  от концентрации УДФГ; в координатах  $[UD\Phi]/V_0([UD\Phi])$  эта зависимость преобразуется в прямую (рис. 4).

Препараты гликогенсинтазы принято характеризовать отношением I/I+D, где I — удельная активность, измеряемая в отсутствие глюкозо-6-фосфата (для D-формы в присутствии 0,8 мМ глюкозо-6-фосфата, так как она неактивна без этого активатора), I+D — в присутствии 8,0 мМ глюкозо-6-фосфата [20]. По этому параметру выделенные нами препараты гликогенсинтазы ске-

летных мышц кролика можно разделить на 3 группы (табл. 2): гликогенсинтазу I ( $I/I+D > 90\%$ ), гликогенсинтазу D ( $I/I+D < 30\%$ ) и смесь I и D форм фермента ( $I/I+D = 60—70\%$ ). В табл. 2 представлены также значения  $K_m$  для субстрата, УДФГ и  $K_i$  для УДФ, АДФ и АТФ.

Очевидно, что со снижением отношения I/I+D (следовательно, с увеличением степени фосфорилирования) закономерно изменяются кинетические свойства гликогенсинтазы: повышается чувствительность к ингибиторам и возрастает  $K_m$  для УДФГ. Таким образом, турбидиметрическим методом получено подтверждение того, что фосфорилирование-дефосфорилирование гликогенсинтазы, сопровождающееся переходом фермента из I- в D-форму и обратно, коррелирует с резким изменением его кинетических и аллостерических свойств [14, 20, 24].

Необходимо отметить, что значения  $K_m$  и  $K_i$  для каждой группы препаратов колеблются в относительно узких пределах и хорошо воспроизводятся для любого отдельного препарата. Это значит, что  $K_m$  для УДФГ и  $K_i$  для УДФ (соответственно субстрата и продукта реакции) могут использоваться в качестве характеристики гликогенсинтазы скелетных мышц кролика. Полученные нами значения  $K_m$  для УДФГ и  $K_i$  для УДФ соответствуют результатам, опубликованным ранее [9, 13, 18, 19].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Евстафьева О. Л., Новикова Л. А., Соловьева Г. А. // Докл. АН СССР.— 1977.— Т. 235.— С. 1199—1202.
2. Клинов С. В., Чеботарева Н. А., Курганов Б. И. и др. // Биоорг. химия.— 1984.— Т. 10, № 9.— С. 1161—1170.
3. Клинов С. В., Чеботарева Н. А., Курганов Б. И. и др. // Там же.— 1985.— Т. 11, № 2.— С. 196—204.
4. Кривокобыльская Я. И., Соловьева Г. А. // Биохимия.— 1984.— Т. 49, № 11.— С. 1819—1827.
5. Сахарова И. С. Особенности функционирования мышечной гликогенсинтазы I: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— М., 1983.
6. Соловьева Г. А., Евстафьева О. Л. // Науч. докл. высш. школы. Биол. науки.— 1978.— № 1.— С. 7—21.
7. Соловьева Г. А., Сахарова И. С. // Вопр. мед. химии.— 1981.— № 1.— С. 96—99.

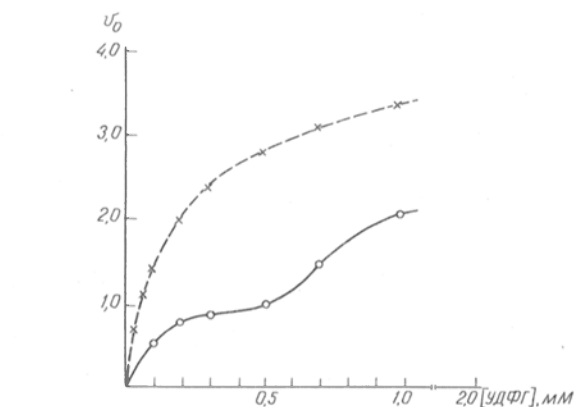


Рис. 3. Влияние  $Mg^{2+}$  на зависимость начальной скорости гликогенсинтазной реакции от концентрации УДФГ. [E] — 30 мкг/мл. о — без активатора, х — в присутствии 5 мМ  $Mg^{2+}$ .

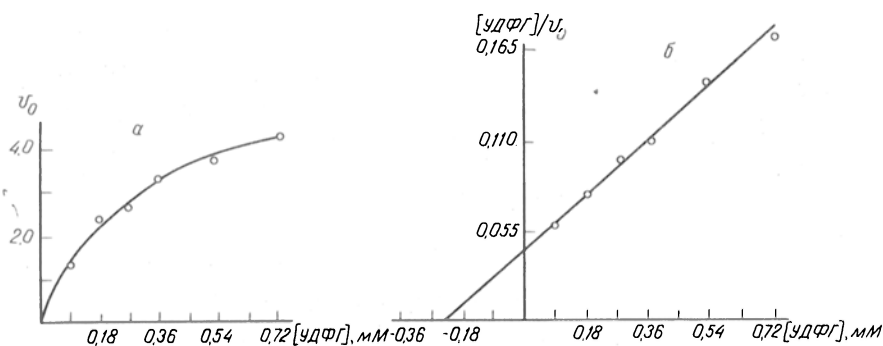


Рис. 4. Зависимость активности гликогенсинтазы D от концентрации УДФГ в присутствии глюкозо-6-фосфата.

[E] — 24 мкг/мл, 8 мМ глюкозо-6-фосфат. а — в прямых координатах; б — в координатах зависимости  $[UD\Phi]/V_0$  от УДФГ.

8. Соловьева Г. А., Сахарова И. С., Кривокобыльская Я. И. // Биохимия. — 1982. — Т. 47, № 9. — С. 1563—1569.
9. Соловьева Г. А., Сусце Б. М. // Там же. — 1985. — Т. 50, № 2. — С. 211—218.
10. Соловьева Г. А., Ягнятинская А. М. // Укр. біохім. журн. — 1972. — Т. 44, № 6. — С. 724—728.
11. Сугробова Н. П., Лисовская Н. П., Курганов Б. И. // Биохимия. — 1982. — Т. 47, № 11. — С. 1883—1888.
12. Chebotareva N. A., Kurganov B. I., Pekel N. D., Berzovskii V. M. // Biochem. int. — 1986. — Vol. 13, N 1. — P. 189—197.
13. Danforth W. H. // J. biol. Chem. — 1965. — Vol. 240, N 2. — P. 588—593.
14. DePaoli-Roach A. A., Roach P. J., Lerner J. // Ibid. — 1979. — Vol. 254, N 23. — P. 12062—12068.
15. Leloir L. F., Goldemberg S. H. // Ibid. — 1960. — Vol. 235, N 4. — P. 919—923.
16. Lin D. C., Segal H. L. // Ibid. — 1973. — Vol. 248, N 20. — P. 7007—7011.
17. Matro J., Fron L., Lamjanovich S. // Analyt. Biochem. — 1978. — Vol. 87, N 1. — P. 249—252.
18. Piras R., Rothman L. B., Cabib E. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1967. — Vol. 28, N 1. — P. 54—58.
19. Piras R., Rothman L. B., Cabib E. // Biochemistry (Wash.). — 1968. — Vol. 7, N 1. — P. 56—66.
20. Roach P. J., Lerner J. // Molec. Cell Biochem. — 1977. — Vol. 15, N 13. — P. 179—200.
21. Sakharova I. S., Solovyeva G. A. // Biochem. int. — 1982. — Vol. 5, N 1. — P. 111—119.
22. Schlender K. K., Lerner J. // Biochim. biophys. Acta. — 1973. — Vol. 293, N 1. — P. 73—83.
23. Spector F. // Analyt. Biochem. — 1978. — Vol. 86, N 1. — P. 142—146.
24. Stalmans W., Hers H. G. // The Enzymes / Ed. P. D. Boyer et al. — New York, 1973. — Vol. 9. — P. 309—361.
25. Sugrobova N. P., Lisovskaya N. P., Kurganov B. I. //

- J. biochem. biophys. Meth. — 1980. — Vol. 8. — P. 299—306.
26. Thomas J. A., Schlender K. K., Lerner J. // Analyt. Biochem. — 1968. — Vol. 25, N 3. — P. 486—499.
27. Weber K., Bringle J. R., Osborn M. // Meth. Enzymol. — 1972. — Vol. 26. — P. 3—27.

Поступила 17.02.89

## A TURBIDIMETRIC PROCEDURE FOR ESTIMATION OF RABBIT SKELETAL MUSCLE GLYCOGEN SYNTHASE ACTIVITY

G. A. Solovyeva, S. Yu. Sundukov, G. N. Filippova

Department of Biochemistry, M. V. Lomonosov State University, Moscow

A turbidimetric procedure is described, which involves the monitoring of changes in glycogen turbidity at wavelengths above 300 nm and continuous recording of rabbit skeletal muscle synthase activity. The recalculation coefficients were found to be equal to  $1.69 \pm 0.08$  mM UDP per unit of optical density at 360 nm and to  $2.03 \pm 0.01$  mM UDP per unit of optical density at 400 nm. The procedure allows a kinetic analysis of the enzyme within a broad range of concentrations and under various conditions. The glycogen synthase activity did not depend on the buffer capacity when 10–100 mM Tris-HCl buffer, pH 7.8, was used. The rate of the enzymatic reaction was correlated with the enzyme concentration within the range of 5 to 50  $\mu\text{g/ml}$ . The curve for glycogen synthase saturation with UDPG is described by the Michaelis-Menten equation, when either 0.04–0.08 mM glucose-6-phosphate for the I-form of the enzyme or 8.0 mM of glucose-6-phosphate for the D-form were used in mixtures containing 5 mM  $\text{MgCl}_2$  and 10 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . The turbidimetric and spectrophotometric procedures yielded similar results.

## ХРОНИКА

© Т. А. КОРОЛЕНКО, А. Б. ПУПЫШЕВ, 1990

УДК 616-008.931:577.152.361-018.11:576.311.3421-055.5/7:061.24.053

Т. А. Короленко, А. Б. Пупышев

## 7-Е РАБОЧЕЕ СОВЕЩАНИЕ ЕВРОПЕЙСКОЙ ГРУППЫ ПО ИССЛЕДОВАНИЮ ЛИЗОСОМНЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Институт физиологии Сибирского отделения АМН СССР, Новосибирский медицинский институт

Подобные встречи исследователей, работающих в области изучения механизма развития и разработки терапевтических подходов при лечении лизосомных болезней, проводятся 1 раз в 2 года.

В программу совещания вошли вопросы исследования лизосомных болезней (генетические нарушения и патогенез) и участия лизосом во внеклеточном переваривании внеклеточного матрикса, а также биогенеза митохондрий (транспорт белков) и пероксисомы в физиологии и патологии.

В совещании приняли участие более 70 специалистов (в основном из стран Западной Европы), в том числе такие известные исследователи, как д-р А. Хасилик (Институт физиологической химии и патофизиологии, Мюнстер, ФРГ), проф. К. Сандхофф (председатель группы, Институт органической химии и биохимии Боннского университета, ФРГ), проф. А. Ройзер (Роттердамский университет, Нидерланды), проф. Д. Таггер (Амстердамский университет, Нидерланды), д-р Ч. Уитли (Миннесотский университет, США), д-р И. Ольсен (Институт ревматологии, Лондон, Великобритания), проф. У. Висман (клиника Бернского университета, Швейцария).

Впервые в работе совещания приняли участие двое ученых из СССР (ранее приглашались представители из ГДР и ГДР). Основными вопросами, обсуждавшимися на совещании, были

биогенез лизосом и пересадка костного мозга (иммунологический базис для трансплантации костного мозга, трансплантация при генетических заболеваниях, успехи и неудачи при трансплантации костного мозга при лизосомных заболеваниях).

Работа совещания, разделенная на 5 заседаний, была интенсивной, напряженной. Важным ее результатом стал переход изучения болезней накопления на новый этап — молекулярно-биологический. В настоящее время проводятся генетическое картирование дефектов лизосомных ферментов, направленный мутагенез в отношении отдельных лизосомных ферментов (лаборатории К. Сандхоффа, А. Ройзера, А. Хасилика). Выявлено важное значение гликозилирования Asn518 и Thr516 для нормального процессинга  $\alpha$ -глюкозидазы и ее ферментативной активности.

Большой интерес ученых вызывает структурно-функциональная характеристика маннозо-6-фосфатного рецептора, его роль во внутриклеточном транспорте лизосомных ферментов. Как известно, направленный транспорт лизосомных ферментов от сайтов их синтеза в ШЭР до лизосом включает несколько этапов, в том числе опознавание лизосомных ферментов по углеводным компонентам. Обнаружено, что во многих типах клеток транспорт кислых гидролаз в лизосомы определяется маннозо-5-фосфатными специфическими рецепторами. В настоящее время изолированы 2 типа рецепторов — с мол. м. соответственно 215 и 46 кД. Последний тип рецептора требует для связывания лиганда дивалентные катионы. Более изучен рецептор с мол. м. 215 кД, который связывает новосинтезированные лизосомные ферменты в комплексе Гольджи, опосредует их транспорт в предлизосомный компартмент и участвует в эндоцитозе экзогенных лизосомных ферментов.

В сообщении д-ра Хилле (лаборатория фон Фигуры, ФРГ) представлены новые данные по физико-химическим свойствам другого мембранно-связанного гликопротеина — рецептора с мол. м. 46 кД. Обнаружено, что связывание лигандов этим маннозо-5-фосфатным рецептором зависит от образования гомоолигомеров, а диссоциация определяется pH,

температурой и наличием лиганда. Созревание маннозо-6-фосфатного рецептора требует гликозилирования контраплекционного кора, образования дисульфидных связей и конформационных изменений, благодаря чему осуществляются димеризация и связывание лиганда. Остается неясной причина существования двух различных рецепторов для транспорта лизосомных ферментов. Возможно, что они осуществляют доставку лизосомных ферментов в различные отделы клетки.

С другой стороны, успешно изучаются ошибки процессинга лизосомных ферментов. Обнаружено, что дефект фосфорилирования лизосомных ферментов ведет к недостаточности их внутриклеточной активности и может быть причиной патологии, в частности при муколипидозах II и III типов (С. Исидоро, А. Хасилик). Источником нарушения может быть этап образования фосфодиэфирной связи между маннозой и N-ацетил-глюкозамин-фосфатом с последующим отщеплением «экранирующего» углевода. При этом показано, что фосфодиэфирные производные катепсина D значительно легче освобождаются из клетки, чем нормальный фермент.

Значительный интерес в плане заместительной терапии недостаточности лизосомных ферментов представляют исследования прямого контакта и передачи лизосомных ферментов от лимфоцитов фибробластам (И. Ольсен.). Захват ферментов осуществляется посредством неокисленных пузырьков, их укрупнения и переноса в лизосомы. Передача лизосомных ферментов возможна и другим клеткам, например миоцеллам. Однако последствия такого взаимодействия клеток на тканевом уровне еще предстоит изучить.

Новый подход в лечении болезней накопления — пересадка костного мозга, осуществляемая, в частности, в Медицинской школе Миннесотского университета. В сообщении Ч. Б. Уитли представлены данные о зависимости успеха лечения от оптимальной гистосовместимости донора, от вида и стадии болезни, а также сведения о временном характере улучшения состояния больных.

В докладе Б. Д. Поортуса показана возможность моделирования болезней накопления у животных и изучения лечебной эффективности пересадки костного мозга.

Находят распространение экспериментальные попытки блокирования функций лизосомного аппарата с помощью лизосомотропных аминов в связи с изучением секреции лизосомных ферментов. Показано, что блок процессинга лизосомных ферментов ведет к базолатеральному освобождению их из клеток САСО-2, кроме  $\alpha$ -глюкозидазы, что связывают с нересепторным транспортом фермента.

Представлены данные о сходстве картин накопления липидов при сопоставлении болезни Нимана — Пика (тип А) с состоянием, вызываемым нарушением липидного обмена имидаминем (С. Родригес-Лафрасс). Показано накопление неэстерифицированного холестерина при действии препарата на внутриклеточный катаболизм липопротеидов низкой плотности; подобный результат получен при действии лизосомотропных аминов. На основании определения холестерина предложен подход для пренатальной диагностики заболевания.

В плане практического применения ценные результаты получены при исследовании лизосомного накопления ингибиторов цистеиновых протеиназ как средства подавления процессинга лизосомных ферментов и функций катепсина (Вилкоккс, Мэйсон). Обнаружено, что Е-64 и лейпептин слабо проникают в лизосомы (пассивный эндоцитоз), а Z-фен-фен, Z-фен-ала и Е-644 накапливаются по активному механизму.

На совещании представлены новые методические подходы к качественному выявлению отдельных болезней накопления,

в частности метод скрининга мукополисахаридов с помощью диметилметиленового синего (Д. Г. Н. Де Джонг), метод выявления недостаточности гексозаминидазы А с помощью центрифужного анализатора (А. Х. Фенсом), возможности и ограничения использования глюкозилцерамида для тестирования болезни Гоше (С. Ваш Вили).

Полезные обобщения исследований последних лет содержались в докладе Х. Аэртса (Нидерланды), рассмотревшем интегральные функции лизосом в связи с участием неферментативных компонентов органелл. Были приведены сведения о белках — протекторах ферментов (например, для  $\beta$ -галактозидазы), белках — активаторах ферментов (сапозины, активаторы ганглиозидазы), белковых системах переноса через лизосомную мембрану протонов, углеводов (глюкоза, сиаловая кислота, глюкуроновая кислота и др.), аминокислот (цистин, пролин, катионные аминокислоты и др.), кобаламина, холестерина и т. д. Нарушения функций неферментативных компонентов могут приводить к фенотипическим проявлениям болезней накопления (галактозидоз, ганглиозидоз, болезнь Нимана — Пика и др.).

Значительное место в рассмотрении лизосомной недостаточности было уделено внеклеточным функциям лизосомных ферментов (Г. Мэрфи, Р. Мейсон, Й. Икау). Среди секретируемых клетками протеиназ в функциональном отношении выделяют прежде всего металлопротеиназы, а также сериновые, аспартильные и цистеиновые протеиназы. Показана возможность кооперативного действия катепсина В и I на коллаген (но без участия катепсина D), активность катепсина В в деградации эластина. Обнаружены хорошая корреляция между активностью катепсина В и резорбцией кости остеокластами, торможение резорбции при действии ингибиторов цистеиновых катепсина.

В плане заместительной ферментотерапии представляло интерес изучение состояния лизосом при захвате  $\alpha$ -маннозидазы фибробластами, дефектными по этому ферменту (И. Кенчи де Белло, Б. Винчестер). Показано, что фермент идет в аномальные (более плотные) лизосомы и приближает их характеристики к нормальным за счет расщепления накопленных субстратов. Подобное накопление легких лизосом наблюдается и при действии свансонина, ингибитора лизосомного закисления.

Экспериментальные и теоретические результаты исследований д-ра Б. Винчестера (Институт педиатрии, Лондон) представляют интерес для исследователей, специализирующихся в области заместительной энзимотерапии и направленного транспорта лекарств, фармакоиндуцируемой патологии лизосом, моделировании лизосомного накопления и энзимодиагностики лизосомных болезней.

Моделирование лизосомных болезней накопления фармакологическими препаратами нашло отражение в докладе Т. А. Короленко и соавт. (СССР) «Лизосомотропные препараты и эндоцитоз клетками печени крысы, где были использованы соединения, применяемые в клинической медицине (ингибиторы протеолиза и протеиназ лизосом). Было представлено сообщение А. Б. Пупышева (СССР) «Дигитонин как инструмент в исследовании лизосом», в котором продемонстрирована возможность повышения специфичности экстракции лизосомных ферментов.

Участие в международных совещаниях способствует получению новейшей информации в данной области, совершенствованию исследований, повышению их методического уровня, выявлению наиболее перспективных подходов в изучении механизма развития лизосомных болезней у человека.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 577.1 (075.8) (049.32)

А. Я. Николаев. **Биологическая химия: Учебник для медицинских специальностей вузов.**— М.: Высшая школа, 1989.— 495 с.: ил.

В наше время полный курс биологической химии с описанием всех аспектов современной науки на уровне, удовлетворяющем требованиям вузовской программы, может быть представлен только в виде многотомного издания. Такой многотомный учебник создавал бы определенные трудности для студентов в связи с большим объемом заключенной в нем информации. Выходом из сложившейся ситуации может явиться лишь создание профилированных учебников для студентов определенных специальностей. Особое внимание при этом следует уделить изложению материала в ясной и доходчивой форме, но вместе с тем на высоком научном уровне. Эту задачу, по нашему мнению, удалось решить А. Я. Николаеву, написавшему учебник для студентов медицинских специальностей вузов.

Книга А. Я. Николаева представляет собой изложение современных достижений мировой науки в различных областях биологической химии. Автору удалось систематизировать знания из областей энзимологии, обмена веществ и энергии, молекулярной генетики, молекулярной эндокринологии и других областей биохимии. Для облегчения усвоения студентом биологического смысла и значения биохимических процессов автором допущены значительные отступления от традиционной структуры учебников биохимии. Кроме сведений о биохимии человека, в него включены материалы о молекулярных механизмах биологической эволюции, биохимии фотосинтеза. Четкие, ясные формулировки, логичность и последовательность изложения материала позволили автору создать учебник, отвечающий всем современным требованиям.

Учебник состоит из введения и четырех частей. Во «Введении» рассмотрены место биохимии среди других биологических наук и основные этапы развития биохимии. Часть I «Строение информационных молекул и матричные биосинтезы» состоит из 5 глав, в которых представлены строение, свойства и функции белков, среди которых выделены и обстоятельно рассмотрены ферменты; строение нуклеиновых кислот, биосинтез нуклеиновых кислот и белков; молекулярные механизмы генетической изменчивости.

Часть II «Обмен веществ и энергии» начинается с главы «Введение в обмен веществ», в которой изложены основы биохимии питания, представления о метаболизме и методах обмена веществ. В следующей главе даны современные представления о структуре, свойствах, функциях биологических мембран и трансмембранном транспорте веществ.

Глава «Энергетический обмен» логически связана с предыдущей, хорошо иллюстрирована и очень доступно раскрывает студентам механизмы биологического окисления, окислительного фосфорилирования, пероксидного и митохондриального окисления.

В последующих главах рассмотрены функции и обмен углеводов, липидов, аминокислот и нуклеотидов в условиях нормы и патологии.

Большой интерес представляет часть III «Гормональная регуляция обмена веществ и функций», в которой автор отошел от традиционного построения изучаемого материала. В главе «Общие аспекты регуляции» дана классификация гормонов по биологическим функциям, которая используется в дальнейшем.

В главе «Регуляция водно-солевого обмена» сосредоточен материал из различных отделов биохимии: водно-солевой обмен, гормоны, регулирующие его; биохимия почек и мочи, секреты пищеварительных соков. По такому же принципу построены главы «Регуляция обмена углеводов, жиров и аминокислот», «Регуляция обмена кальция и фосфатов».

Часть IV «Особенности биохимии отдельных органов и систем» тесно связана с предыдущей, дополняет ее и дает важнейшие сведения о биохимии межклеточного матрикса, биохимии печени, крови, мышц, нервной системы.

Каждая глава учебника сообщает о молекулярных механизмах патогенеза болезней. Эти сведения выполняют не только информативную, но и мотивационную роль, поскольку подчеркивают значение биохимии для изучения клинических дисциплин.

Можно согласиться с автором, что содержание данного учебника в значительной части близко к тому, что называют функциональной биохимией и медицинской биохимией.

В заключение как одно из достоинств этого учебника следует отметить, что он прекрасно иллюстрирован. Оригинальные рисунки, схемы, графики наряду с ясным, доходчивым, кратким изложением материала на высоком научном уровне позволяют считать учебник А. Я. Николаева «Биологическая химия» ценным пособием для студентов, аспирантов медицинских вузов. Вызывает сожаление тот факт, что учебник издан небольшим тиражом (50 000 экз.), не все библиотеки мединституты смогли его приобрести в достаточном количестве.

Доктор мед. наук проф. Ф. Х. Камилов,  
канд. мед. наук. Ф. А. Сагидуллин,  
канд. мед. наук. Э. Г. Давлетов (Уфа)

© Б. С. КАСАВИНА, 1990

УДК 612.751.2.015:577.1 (049.32)

В. Н. Павлова, Т. Н. Копьева, Л. И. Слущкий,  
Г. Г. Павлов. **Хрящ.**— М.: Медицина, 1988, 320 с.

Хрящевая ткань представляет особый интерес для биохимика. Дело в том, что она вовлечена в большое число широко распространенных патологических процессов. Достаточно упомянуть, например, о заболеваниях ревматической природы и о дегенеративных по своему характеру остеоартрозах, поражающих преимущественно суставные хрящи; об остеохондрозе, при котором из структур позвоночника более всего страдают хрящи межпозвоночных дисков; о рахите различного происхождения, влекущем за собой нарушения оссификации хрящей ростковых зон костей и приводящем вследствие этого к деформациям скелета; о ряде генетически обусловленных системных поражениях соединительной ткани, опять-таки сопровождающихся деформациями скелета и задержкой роста в результате изменения метаболических функций хрящей. Понимание патогенеза и разработка методов лечения всех этих тяжелых, нередко инвалидизирующих болезней основываются на изучении развивающихся в хрящевой ткани биохимических нарушений, и если в этих вопросах в последние годы был достигнут определенный прогресс, то это произошло благодаря активному участию биохимиков.

Но наряду с этими практическими вопросами еще больший интерес для биохимика представляют теоретические аспекты исследования хрящевой ткани, поскольку хрящ — объект во многих отношениях уникальный, открывающий возможности приблизиться к раскрытию некоторых общих биологических закономерностей.

Хрящевая ткань «предназначена» (мы не говорим сейчас о провизорных хрящах, функция которых заканчивается с завершением скелетогенеза) для осуществления сложных биомеханических задач в комплексе функций опорно-двигательного аппарата. Роль биомеханического субстрата выполняет мощный внеклеточный матрикс, казавшийся очень простым в световом микроскопе, но в действительности обладающий необычайно высоким уровнем надмолекулярной структурной организации.

Такая организация является продуктом жизнедеятельности единственной популяции клеток — хондроцитов. Хондроцит, обладающий (особенно на ранних стадиях онтогенеза) высокой биосинтетической активностью, отличается интересной особенностью — способностью к более легкой, в сравнении с другими клетками, изменчивости фенотипических свойств. Такая изменчивость проявляется в ответ на изменение условий существования клетки — при культивировании вне организма и нарушении под влиянием патологических процессов свойств межклеточного матрикса. При изменении фенотипа хондроцит переключается с биосинтеза типичных для хрящевого матрикса макромолекул — коллагена II типа, агрегирующих протеогликанов — на биосинтез других, менее специфических продуктов.

Таким образом, хрящевая ткань представляется особо благодарным объектом для исследований общих закономерностей взаимоотношений клеток и внеклеточного матрикса, в том числе регуляторных влияний клеток на матрикс и,



наоборот, матрикса на клетки, роли клеток в поддержании биомеханических свойств матрикса и роли биомеханических воздействий на матрикс в функционировании клеток.

В свете всего сказанного хотелось бы привлечь внимание биохимиков к монографии «Хрящ», выпущенной издательством «Медицина». Книга написана авторским коллективом в составе морфологов (В. Н. Павлова, Т. Н. Копьева, Г. Г. Павлов) и биохимика (Л. И. Слущкий). Такое сотрудничество обеспечило объединение биохимического и морфологического подходов к изучению хрящевой ткани и, следовательно, более глубокий уровень теоретического анализа. Этим единым подходом, характерным для всех глав рецензируемой монографии, последняя выгодно отличается от недавних зарубежных изданий, посвященных хрящу (под ред. В. А. Hall и под ред. К. Е. Kuettner и др.), которые фактически представляют собой сборники статей и лишены монографического характера.

В книге обобщены результаты оригинальных исследований авторов и обширные новейшие литературные материалы. Подробно рассмотрена биохимия специфического для хрящевой ткани коллагена II типа (напомним, кстати, что именно при исследовании хряща был впервые установлен факт молекулярной гетерогенности коллагенов), и изложены современные взгляды на механизмы биосинтеза и постсинтетических модификаций коллагенов. Обсуждаются данные последних лет о так называемых «малых» («минорных») коллагенах, играющих важную роль в морфогенезе и адаптационной пластичности хрящевой ткани и в минерализации провизорных хрящей. Не менее подробно обсуждаются строение и метаболические пути протеогликанов и их агрегатов, занимающих центральное место в обеспечении своеобразных биомеханических свойств хряща. Приведены мало освещенные пока в отечественной литературе сведения о структурах гликопротеинов хрящевого матрикса — фибронектине, хондронектине и др., принимающих участие в стабилизации надмолекулярной архитектоники матрикса, а также о строении и биосинтезе эластина. Представлены материалы о биохимических изменениях хрящевой ткани при старении и развитии различных патологических изменений.

Метаболическая деятельность хондроцитов, направленная на продуцирование внеклеточного матрикса и последующее поддержание его структурной целостности, протекает в условиях крайне недостаточного развития кровеносных сосудов или (в суставных хрящах) полной аваскулярности. Возникающие в связи с этим обстоятельством особенности энергетического обеспечения хрящевой ткани — интенсивность метаболизма хондроцитов в пересчете на одну клетку, вопреки распространенному мнению, вполне сопоставима с интенсивностью метаболизма других, «активных», клеток, например ткани печени — подвергнуты в книге детальному рассмотрению. Излагаются подробные данные о закономерностях метаболизма матрикса, о контроле и регуляции метаболических процессов в хряще, в частности о воздействии на хрящ гормонов, о механизмах кальцификации.

Хорошо известно, что научные монографии, как правило, в той или иной мере устаревают уже к моменту их выхода из печати. Не удалось избежать этой участи и биохимическим главам рецензируемой книги. Так, уже к концу 1988 г. были существенно уточнены и дополнены многие аспекты классификации «минорных» коллагенов хряща.

В подобных недостатках авторов трудно упрекнуть. Но

нельзя не отметить недостатки другого рода. Речь идет о непреодоленных внутренних противоречиях в изложении материала. Например, в главе, посвященной изменениям хряща при старении, приведены (в табл. 14) количественные данные о повышении с возрастом суммарной концентрации гликозаминогликанов и протеогликанов. Однако несколькими страницами раньше в той же главе содержится утверждение, основанное на результатах гистохимических исследований, об увеличении в старости толщины зоны суставного хряща с минимальным содержанием гликозаминогликанов. Авторы обходят молчанием возможные причины этих расхождений между биохимическими и гистологическими данными.

На стр. 59 один из «минорных» коллагенов (IX типа) почему-то обозначен арабской цифрой вместо римской.

Несмотря на отмеченные недостатки, думается, что рецензируемая книга будет полезной не только для специалистов, занятых изучением соединительной ткани, и для биохимиков, сотрудничающих с ревматологами или ортопедами, но и для значительно более широкого круга читателей-биохимиков.

Хотелось бы подчеркнуть высокий уровень полиграфического оформления монографии.

Доктор биол. наук проф. Б. С. Касавина

### ИНФОРМАЦИЯ О ВСЕСОЮЗНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ ПО КЛИНИЧЕСКОЙ ВИТАМИНОЛОГИИ

Академия медицинских наук СССР планирует провести в первой половине 1991 года Всесоюзную конференцию по проблемам клинической витаминологии.

Тематика конференции включает фундаментальные и прикладные аспекты рационального профилактического и лечебного применения витаминов, в том числе:

- обмен и механизм действия витаминов в норме и патологии;
- первичные и вторичные гипо- и авитаминозы;
- взаимодействие витаминов и лекарств;
- нарушение обмена и функции витаминов при различных заболеваниях и пути коррекции этих нарушений;
- рациональное применение витаминов и препаратов на их основе в различных областях медицины (сердечно-сосудистые заболевания, заболевания желудочно-кишечного тракта, гепатология, диабет, онкологические заболевания, пульмонология, психиатрия, хирургия, акушерство и гинекология, неонатология и др.);
- генетически обусловленные нарушения обмена и функции витаминов;
- новые витаминные и коферментные препараты и их применение.

Заявки на пленарные, секционные доклады и стендовые сообщения направлять до 1 августа 1990 года в адрес Проблемной Комиссии по витаминологии (адрес: Москва, 109240, Устьинский пр., 2/14, Институт питания АМН СССР, ученому секретарю Н. В. Блажесвич). В тот же адрес до 1 сентября 1990 года следует направить тезисы (объем тезисов докладов — 2,5—3 стр., стендовых сообщений — 0,5—1 стр.)

Оргкомитет