

ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ

ТОМ 36

ВЫПУСК 4

ИЮЛЬ -- АВГУСТ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

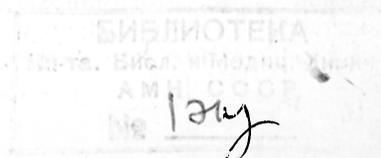
Главный редактор С. С. ДЕБОВ

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. ЗБАРСКИЙ,
В. Л. КОЗЕЛЬЦЕВ (ответственный секретарь), А. Н. КЛИМОВ, Б. Ф. КОРОВКИН,
Л. А. ЛОКШИНА, 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)



ЭТАНОЛ И БИОСИНТЕЗ БЕЛКОВ В ПЕЧЕНИ ЖИВОТНЫХ (ОБЗОР)

НИИ неврологии и психиатрии им. В. П. Протопопова, Харьков

Известно, что токсическое действие этанола связано с нарушением структуры и функции печени. Существенную роль при этом играет изменение процессов биосинтеза белков. По этой причине исследование синтеза белков печени представляет собой важный раздел в изучении патохимии интоксикации этанолом. Цель настоящего обзора заключалась в обобщении современных данных по этому вопросу.

Однократное воздействие. Результаты исследования кратковременного воздействия этанола на биосинтез и секрецию белков печени неоднозначны. При изучении суммарных белков печени крыс не удалось обнаружить влияния этанола на их синтез и секрецию [48]. Однако добавление в перфузат изолированной печени 50 мМ этанола приводило к ингибированию синтеза общих белков на 11, 17 и 38 % через 30, 60 и 120 мин соответственно [30]. Регистрация индивидуальных полипептидов при действии этанола *in vivo* и добавлении его в перфузат печени позволила установить быстрое снижение синтеза альбумина [43, 44]. Наличие в перфузате этанола (40—50 мМ) приводит к снижению на 25 % высвобождения альбумина. Такой же эффект на синтез белка проявлял циклогексимид (0,5 мМ). В этих условиях уменьшался внеклеточный объем печени. Полагают, что этанол в перфузируемой печени ингибирует синтез альбумина *de novo* и это первично связано с его гиперосмотическим действием [44]. Альбумин может играть роль детоксицирующего белка в организме животных, образуя комплексы с ксенобиотиками в просвете каналов эндоплазматического ретикулаума. Эти комплексы выводятся в кровь благодаря мембранной секреции, не соприкасаясь с внутриклеточным содержимым. При повреждении этой системы в результате введения большого количества ксенобиотиков продукты их окисления начинают поступать в матрикс клетки и оказывать токсическое действие [1].

В опытах со срезами печени крыс наблюдали концентрационную зависимость снижения величины включения меченых аминокислот в белки [41]. Однократное действие этанола ингибирует синтез белков в микросомах и особенно в митохондриях клеток печени. Возможно, это наряду с другими факторами обуславливает образование мегамитохондрий, наличие которых является характерным признаком алкогольного поражения печени [27]. Одна из причин нарушения синтеза белков в печени может заключаться в угнетении этанолом механизмов транспорта аминокислот в гепатоциты, на

что указывают данные, свидетельствующие, что у собак кратковременное воздействие этанолом приводит к почти двукратному снижению скорости захвата печенью некоторых аминокислот [21].

Существует мнение о дифференцированном действии этанола на синтез белков в печени. При исследовании однократного действия это мнение основывается преимущественно на данных об усилении этанолом формирования частиц липопротеинов на фоне угнетения общего синтеза белков. Действительно, у крыс при введении в желудок этанола в дозе 6 г/кг наблюдали возрастание синтеза белковых компонентов липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) [14]. Через 90 мин в аналогичных условиях экспериментов в гепатоцитах крыс выявляли секреторные везикулы, нагруженные ЛПОНП; спустя 4 ч эти частицы отсутствовали [22]. Добавление этанола (50—100 мкМ) к культуре гепатоцитов крыс увеличивало включение лейцина в секреторируемый культурой апоА-1 прямо пропорционально дозе этанола. Включение метки в секреторируемый альбумин в этих условиях еще не изменялось [39].

Данные о стимулировании новообразования одних белков печени и угнетении синтеза других могут привлекаться для объяснения того факта, что при однократном воздействии этанола отсутствует изменение общего количества белков плазмы крови, синтезируемых в гепатоцитах [12]. Вместе с тем дифференцированные эффекты этанола на синтез белков вряд ли могут быть обусловлены избирательным действием на геном, поскольку ни этанол, ни продукты его превращения не обладают признаками регуляторов активности генетического аппарата клеток.

Хроническое воздействие этанола. Влияние хронической интоксикации этанолом на синтез белков в печени изучено лучше, чем в других тканях. Рассмотрение этого вопроса непременно включается в обзоры литературы, посвященные обсуждению проблемы метаболических эффектов этанола [35]. Полученные результаты свидетельствуют, что разнообразные и многочисленные нарушения процессов биосинтеза белков могут быть связаны с прямым и опосредованным влиянием этанола и его метаболита ацетальдегида [5]. Установлено, что интегральный показатель интенсивности синтеза белков *in vivo* — общее их содержание — в условиях длительной интоксикации этанолом уменьшается [11]. Угнетение синтеза суммарных белков наблюдали *in vitro* в изолированной печени. В первичной культуре гепатоцитов, выделенных из печени взрослых крыс, в результате инкубации их на протяжении 6 дней в присутствии 100 мМ этанола синтез и секреция белка снижались на 25 и 30 % соответственно. Захват ¹⁴С-валина и α-аминоизомасляной кислоты гепатоцитами за 3 дня инкубации уменьшался на 40 %. Скорость катаболизма суммарных белков, а также активность катепсинов не изменялись. Этанол угнетал активность Na⁺, K⁺-АТФазы при отсутствии изменений содержания

макроэргов, адениновых моно- и динуклеотидов. Эти результаты позволяют сделать заключение, что угнетающее действие этанола на процессы биосинтеза и секреции белка в гепатоцитах не связано с влиянием на энергетический обмен, а, возможно, обусловлено воздействием этанола на плазматические мембраны [47]. У крыс обоего пола, получавших этанол в составе жидкого корма (36 % от общей калорийности) в течение 6—7 нед, включение ^3H -валина в общие белки печени также уменьшалось на 20—30 % [45].

Эффекты этанола неоднозначны в различных популяциях клеток печени. В культуре звездчатых клеток (перисинусоидальные липоциты) синтез общего белка и ДНК в присутствии 100 мМ этанола не изменялся [25]. Включение ^{14}C -валина в суммарный белок гепатоцитов угнеталось, в то время как в аналогичных условиях экспериментов (15 % раствор этанола в 12 % растворе сахарозы в течение 5—6 нед) в общей популяции непаренхиматозных клеток оно не изменялось. Этанол (80 мМ), добавленный в инкубационную среду, снижал интенсивность синтеза белка в гепатоцитах, полученных из печени интактных и алкоголизованных животных в равной степени (30—55 %), и не влиял на синтез белков в непаренхиматозных клетках. Если пища животных содержит эмульсию жира, гепатоциты можно фракционировать в градиенте концентрации солевого раствора, выделяя группы клеток высокой и низкой плотности. Существенно при этом, что этанол в большей степени подавлял синтез белков в гепатоцитах низкой плотности, т. е. в клетках, обогащенных липидами [19].

Длительное воздействие этанола ингибирует синтез цитоплазматических и ядерных белков клеток печени. Сочетание методов изоэлектрофокусировки и электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия позволяет разделять белки цитозоля печени на 500 фракций и более. У интактных крыс концентрация этих фракций относительно устойчива несколько недель. Однако, если животные в течение 3 мес употребляли рацион, содержащий 1—5 % этанола от общего объема корма, то в отдельных фракциях обнаруживались выраженные колебания содержания белка [50]. У морских свинок, которые получали в течение 3 мес 30 % раствор этанола (4 г/кг), при электрофорезе цитоплазматических белков в полиакриламидном геле с линейным градиентом концентрации акриламида наблюдали возрастание доли высокомолекулярных полипептидов и объединение отдельных фракций в одну полосу электрофореграммы. На основании этих результатов, принимая во внимание денатурирующий эффект этанола, сделали заключение, что количественное перераспределение растворимых белков печени при алкоголизации обусловлено их агрегацией. Удельная радиоактивность общих белков печени при введении меченых аминокислот понижалась на 51 %. Этому соответствовало уменьшение включения предшественников синтеза в белки 4 из 9 анализированных электрофоретических фракций. Радиоактивность свободных аминокислот в печени и сыворотке крови в этих экспериментах не изменялась [10].

Сравнение интенсивности синтеза хроматиновых белков при интоксикации этанолом и циклогексимидом позволяет заключить, что эффект этанола

подобен действию типичных ингибиторов белкового синтеза [5, 6]. При острой интоксикации происходит снижение синтеза гистонов и увеличение включения метки в негистоновые белки. Через сутки синтез гистонов нормализуется; включение метки в негистоновые белки уменьшается, но остается выше, чем в контроле. Длительная этаноловая интоксикация вызывает стойкое угнетение включения меченых аминокислот в белки всех фракций хроматина. В этих условиях синтез не восстанавливается через 24 ч после отмены этанола [3].

Результаты молекулярно-биологических исследований показывают, что этанол может оказывать негативное влияние на многих этапах биосинтеза белков. При моделировании физической зависимости от этанола у крыс синтез белков на мембраносвязанных полисомах из печени замедляется вследствие уменьшения скорости элонгации полипептидов [42]. Введение голодавшим в течение суток крысам относительно небольших количеств этанола (1,63 г/кг) в течение 2 нед обуславливает угнетение начального этапа биосинтеза белка, что выражается в снижении способности тРНК акцептировать ^{14}C -лейцин и другие аминокислоты из ^{14}C -гидролизата белка хлореллы. Это снижение связано в основном с изменением активности аминоацил-тРНК-синтетаз. В опытах *in vitro* установлено, что в присутствии этанола нарушается аминоацилирование не всех тРНК, поскольку акцептирование глицина и аспарагиновой кислоты достоверно не изменялось [13]. Для ингибирования лейцил-тРНК-синтетазы сытых крыс требуются высокие концентрации этанола [34]. В бесклеточной системе удалось показать, что механизмы подавления этанолом начального этапа трансляции заключаются в усилении фосфорилирования фактора инициации. Помимо этого, этанол ингибирует взаимодействие фактора инициации и фактора замены гуаниннуклеотидов [20].

Данные о влиянии этанола на процессы транскрипции немногочисленны. Опубликованные результаты позволяют судить о том, что этанол оказывает сложное влияние на синтез разных типов РНК, зависящее от дозы и времени интоксикации. Содержание мышей на рационе с 10 % этанолом в течение 2 мес вызывало стимуляцию в 1,5 раза включения ^3H -уридина в РНК полисом гепатоцитов. Эффект лишь отчасти может быть объяснен изменениями внутриклеточного фонда УТФ [18]. С этими данными согласуются результаты, свидетельствующие о ранней стимуляции этанолом РНК-полимеразы II, катализирующей синтез мРНК [2]. В изолированных ядрах из печени крыс, получавших этанол в дозе 3 г/кг в течение 15 дней, наблюдалось увеличение активности всех классов РНК-полимераз через 0,5 ч после отмены этанола. Повторные инъекции вызывали кратковременную и слабо выраженную стимуляцию РНК-полимераз на фоне повышенного уровня активности ферментов [4]. При более длительной интоксикации этанолом крыс (15 % раствор в условиях свободного выбора) в течение 45 дней в ядрах, выделенных из гепатоцитов, синтез РНК, катализируемый РНК-полимеразами I и II, уменьшался [7].

Влияние этанола на РНК-синтезирующую способность ядер клеток печени подобно действию ксенобиотиков, из которых некоторые представ-

ляют собой классические ингибиторы трансляции [6, 8]. Интересно, что такое сходство, как уже отмечалось, наблюдается при исследовании синтеза хроматиновых белков.

Нарушение процессов биосинтеза белков при действии этанола на клетки печени и других тканей может быть связано с изменением структуры генома, хроматинового комплекса, репликативного и репаративного синтеза ДНК, однако обсуждение этих вопросов преждевременно ввиду крайней малочисленности опубликованных данных.

Рассмотренные результаты позволяют заключить, что в механизмах токсического действия этанола на печень важную роль играет нарушение синтеза белков на уровне трансляции и транскрипции. В результате при хроническом введении этанола синтез глобулярных белков преимущественно угнетается, однако доказано увеличение синтеза коллагена [26]. У крыс, получавших на протяжении 1 мес жидкий корм, в котором 36 % калорийности замещали этанолом, скорость синтеза коллагена в печени увеличивалась на 40 %, а количество пролина белкового происхождения — на 36 %. Содержание свободного пролина и оксипролина не отличалось от контроля [29]. Убедительны данные, полученные при исследовании обезьян, получавших в течение 2—10 лет корм, в котором 50 % калорий приходилось на долю этанола. Животным проводили прижизненную биопсию печени. В такой постановке экспериментов удалось показать не только стимуляцию включения аминокислот в коллаген, но также увеличение образования специфических проколлагеновых мРНК, резкое возрастание количества «молодых» коллагеновых фибрилл [33, 52].

На ранних стадиях алкогольного фибриллогенеза повышается содержание фибронектина, который выступает в качестве хемотаксического фактора для коллагенпродуцирующих клеток [28]. У крыс, которые получали 10 % раствор этанола в качестве единственного источника жидкости, активность пролилгидроксилазы в печени увеличивалась по сравнению с контрольными значениями на 24 % через 1 мес алкоголизации и на 109 % через 6 мес [40]. Возрастание активности фибробластов, увеличение синтеза коллагена, образование прочно сшитых коллагеновых структур являются отчетливыми признаками нарушения этанолом структуры и функции печени, ведут к развитию фиброза и негативно сказываются в целом на жизнедеятельности организма [5]. Задержка секретируемых белков в баллонизированных гепатоцитах способствует прогрессированию фиброза [33].

Нарушения биосинтеза белков в печени в условиях хронической интоксикации этанолом сопряжены с изменением содержания, состава и функции белков сыворотки крови [5]. Этот эффект этанола воспроизводится даже у потомства алкоголизированных животных. Исследование белков печени и крови самок крыс, получавших этанол в течение 30 сут до спаривания и далее, во время беременности, показало, что у подопытных животных и плода количество альбуминов уменьшалось, уровень β - и γ -глобулинов также понижался, а содержание α -глобулинов увеличивалось [24].

Негативное влияние интоксикации этанолом на процессы биосинтеза белков может быть связано

с посттрансляционными модификациями молекул полипептидов. У крыс, которые получали в течение 22 нед этанол в составе жидкого корма (42 % от общей калорийности) в печени возрастала активность метилтрансфераз и угнеталась активность метионинсинтетаз (на 50 и 47 % соответственно). В результате нарушались пути транспорта метильных групп от S-аденозилметионина к S-аденозилметионинзависимым ферментам [36]. Этанол ингибирует метилгуанинтрансферазу, участвующую в репарации поврежденных ДНК от алкилирующих агентов [32]. Введение этанола (6 г/кг) крысам в течение 1 мес приводило к снижению уровня протеиновых SH-групп, что негативно отражается на функции SH-зависимых ферментов. Инактивация SH-групп тубулина нарушает его способность к полимеризации и образованию микротрубочек [33]. Уменьшение не связанных с белком SH-групп в печени способствует активации свободнорадикальных процессов [23]. Введение этанола (15 % раствор как единственный источник жидкости) крысам в течение 6 нед сопровождалось ускорением на 44 % реакций N-ацетилирования в изолированных гепатоцитах [38]. У крыс обнаружена связь между вызываемым этанолом уменьшением содержания катионов металлов в клетках печени и ингибированием синтеза белка [17]. В водной среде *in vitro* этанол и ацетальдегид вызывают резкие нарушения макромолекулярной структуры белков, которые приводят к деспирализации молекул [15].

Следует отметить, что множество неблагоприятных эффектов этанола на биосинтез белков в печени и других тканях опосредовано действием продукта его окисления — ацетальдегида, а также индукцией этанолом и ацетальдегидом процессов перекисного окисления липидов. В результате образования комплексов с ацетальдегидом наблюдаются глубокие структурно-функциональные изменения на уровне мембранных, цитоплазматических и ядерных структур гепатоцитов. Это вызывает нарушение механизмов синтеза и секреции белков [5, 32, 33]. Предполагается, что ацетальдегид способен индуцировать образование патогенных специфических для интоксикации этанолом белков. Продукт распада одного из них идентифицирован методом высокоэффективной жидкостной хроматографии как полярный пептид с мол. м. 1200 Д [46]. Модификация ацетальдегидом альбумина может быть связана с наличием цитотоксических свойств сыворотки крови, которые наблюдаются в условиях интоксикации этанолом [49].

В настоящее время весьма актуально изучение влияния этанола на синтез липопротеинов, поскольку возможные положительные качества этанола связывают с его антиатерогенными свойствами и защитным влиянием на сердечно-сосудистую систему. Решающее значение в этой проблеме имеет вопрос о синтезе белковых компонентов липопротеинов, так как изменение содержания липидных составляющих в значительной мере обусловлено перераспределением среди различных фондов крови и тканей. Синтез отдельных классов липопротеинов интенсивно исследуется, однако полученные результаты противоречивы. Отмечались негативные в отношении атерогенеза эффекты этанола, которые выражаются в стимулировании син-

теза атерогенных (апоВ) и подавлении антиатерогенных (апоА) фракций. Нередки случаи, когда при алкоголизации животных не удается обнаружить никаких изменений. Однако существует мнение, что продолжительное введение малых доз этанола, которые составляют около 0,2 г/кг, способствует увеличению содержания частиц липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) и холестерина в их составе [33]. На основании результатов опытов с обезьянами сделан вывод, что механизмы действия этанола включают повышение синтеза и снижение клиренса ЛПВП, изменение соотношения субфракций ЛПВП₂ и ЛПВП₃ путем одновременной индукции их синтеза микросомами печени и усиления липолиза с участием экстрапеченочной липопротеинлипазы [37, 51]. При обсуждении эффектов этанола на липопротеины следует принимать во внимание точку зрения, согласно которой ставится под сомнение наличие у ЛПВП антиатерогенных свойств [9]. Важно решить, существует ли дифференцированное его влияние на синтез апоА-1 и апоА-2 белков. Необходимо объяснить несоответствие между вполне убедительными данными о снижении общего уровня белкового синтеза в печени и стимулировании новообразования полипептидных компонентов ЛПВП.

Заключение. Рассмотренные в обзоре данные свидетельствуют о важной роли изменений биосинтеза белков печени в патогенезе интоксикации этанолом. Выявлены особенности однократного и длительного действия этанола, зависимость изменений синтеза от дозы и времени интоксикации, типа клеток печени и субклеточных структур. В гепатоцитах угнетается синтез цитоплазматических и ядерных белков. Наблюдаются существенные изменения процессов трансляции и транскрипции. Нарушения биосинтеза белков в печени в условиях хронической интоксикации сопряжены с изменением содержания, состава и функции белков сыворотки крови. Этанол и продукты его превращения оказывают негативное действие на процессы посттрансляционной модификации белков.

ЛИТЕРАТУРА

- Арчаков А. И. Микросомальное окисление.— М., 1975.
- Божко Г. Х., Хоменко Е. И. // Актуальные проблемы наркологии.— Харьков, 1987.— С. 52—54.
- Божко Г. Х., Хоменко Е. И. // Вопр. мед. химии.— 1988.— Т. 34, № 2.— С. 19—23.
- Божко Г. Х., Хоменко Е. И. // Укр. биохим. журн.— 1989.— Т. 61, № 1.— С. 48—52.
- Божко Г. Х., Волошин П. В. // Успехи совр. биол.— 1989.
- Бойков П. Я., Сидоренко Л. И., Шевченко Н. А., Тодоров И. Н. // Биохимия.— 1981.— Т. 46, № 8.— С. 1396—1410.
- Бояджиев С., Бояджиева Н., Пирончева Г. // Эксп. мед. морфол. (София).— 1988.— Т. 27, № 4.— С. 24—27.
- Калиман П. А., Нам Сун Фил // Укр. биохим. журн.— 1984.— Т. 56, № 6.— С. 619—624.
- Климов А. И. // Липопротеины высокой плотности и атерогенез.— М., 1983.— С. 16—24.
- Кулабухов В. М., Волошин П. В., Божко Г. Х. // Укр. биохим. журн.— 1987.— Т. 59, № 6.— С. 19—23.
- Островский Ю. М., Сатановская В. И., Садовник М. Н. Биологический компонент в генезе алкоголизма.— Минск, 1986.
- Панченко Л. Ф., Гильмиярова Ф. Н., Радомская В. М. Этанол и атеросклероз.— М., 1987.
- Сушкова В. В., Касьянова Н. Н., Васильева С. Н., Гуль М. В. // Вопр. мед. химии.— 1988.— Т. 34, № 4.— С. 21—24.
- Титов В. Н., Пицин Д. Г. // Биохимия.— 1978.— Т. 43, № 1.— С. 83—88.
- Троцкий Г. В., Багдасарян С. Н. // Вопр. мед. химии.— 1987.— Т. 33, № 2.— С. 38—41.
- Хоменко Е. И., Божко Г. Х. // Укр. биохим. журн.— 1984.— Т. 56, № 2.— С. 192—194.
- Aaseth J., Smith-Kielland A., Thomassen Y. // Ann. Clin. Res.— 1986.— Vol. 18, N 1.— P. 43—47.
- Bantle J., Edmisten G. E., D'Arcy D. M. // Biochem. Pharmacol.— 1980.— Vol. 29, N 21.— P. 2993—3001.
- Bengtsson G., Smith-Kielland A., Morland J. // Exp. molec. Path.— 1984.— Vol. 41, N 1.— P. 44—57.
- Cox S., Proud C. G. // Biochem. Pharmacol.— 1988.— Vol. 37, N 10.— P. 2045—2049.
- Cruz M. A., Bravo I., Rojas S., Gallardo V. // Pharmacology.— 1985.— Vol. 30, N 1.— P. 12—19.
- Falk M., Ahlberg J., Claumann H. // Virchows Arch.— 1985.— Bd B49-B, N 3.— S. 231—239.
- Farbiszewski R., Holownia A., Chwiecko M. // Drug Alcohol Depend.— 1987.— Vol. 20, N 2.— P. 129—133.
- Garban Z., Eremia I., Nemes R., Precob V. // Rev. roum. Morph.— 1986.— Vol. 32, N 3.— P. 165—174.
- Gressner A. M., Althaus M., Schafer S. // Z. Gastroent.— 1987.— Bd 25, N 1.— S. 56—57.
- Hoensch H. // Pharmacol. Ther.— 1987.— Vol. 33, N 1.— P. 121—128.
- Jonge J., Horn T., Christoffersen P. // Virchows Arch.— 1987.— Bd 410-A, N 6.— S. 553—558.
- Jonge J., Horn T., Christoffersen P. // Acta path. microbiol. scand.— 1988.— Vol. 96-C, N 1.— P. 56—61.
- Kato S., Murawaki Y., Hirayama C. // Res. Commun. chem. Path.— Pharmacol.— 1985.— Vol. 47, N 2.— P. 163—180.
- Lakshmanan M. R., Felver M. E., Veech R. L. // Alcoholism.— 1980.— Vol. 4, N 4.— P. 361—365.
- Lakshmanan M. R., Ezekiel M. // Ibid.— 1985.— Vol. 9, N 4.— P. 327—331.
- Lieber C. S., Baraona E., Leo M. A., Garro A. // Mutat. Res. Rev. Genet. Toxicol.— 1987.— Vol. 186, N 3.— P. 201—233.
- Lieber C. S. // Biochem. Soc. Trans.— 1988.— Vol. 16, N 3.— P. 241—247.
- Lindqvist L., Poso A. R. // Acta pharmacol. (Kbh).— 1984.— Vol. 55, Suppl. 1.— P. 26.
- Mezey E. // Fed. Proc.— 1985.— Vol. 44, N 1.— Pt 1.— P. 134—138.
- Molloy A. M., Scott J. M., Weir D. G. // Chem. Biol. Pteridines.— Berlin, 1986.— P. 505—508.
- Mulligan J. J., Cluette-Brown J. E., Noring R. // Res. Commun. chem. Path. Pharmacol.— 1985.— Vol. 47, N 2.— P. 181—202.
- Neis J. M., Brömmelstroet B. W., Henderson P. T. // Arch. Toxikol.— 1985.— Bd 57, N 4.— S. 217—221.
- Okamoto Y., Fujimori Y., Nakano H. // J. Lab. clin. Med.— 1988.— Vol. 111, N 4.— P. 482—485.
- Pawlicka E., Bankowski E., Markiewicz W. // Hepato-Gastroenterology.— 1987.— Bd 34, N 6.— S. 243—245.
- Perin A., Scalabrino G., Sessa A. // Biochim. Biophys. Acta.— 1974.— Vol. 336, N 1.— P. 101—108.
- Peters J., Steele W. // Biochem. Pharmacol.— 1982.— Vol. 31, N 11.— P. 2059—2063.
- Rothschild M. A. // Advanc. exp. Med. Biol.— 1975.— Vol. 56, N 1.— P. 179—194.
- Rothschild M. A., Oratz M., Schreiber S. S., Mongelli J. // Hepatology.— 1986.— Vol. 6, N 6.— P. 1382—1385.
- Smith-Kielland A., Aaseth J., Thomassen Y. // Acta pharmacol. (Kbh).— 1986.— Vol. 58, N 3.— P. 237—239.
- Tang B. K., Devenyi P., Teller D., Israel Y. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1986.— Vol. 140, N 3.— P. 924—927.
- Voci A., Gallo G., Balestrero F., Fugassa E. // Cell. Biol. int. Rep.— 1988.— Vol. 12, N 8.— P. 647—660.
- Wallin B., Bessesen A., Fikke A. // Alcoholism.— 1984.— Vol. 8, N 2.— P. 191—195.
- Wickramasinghe S. N., Cardner B., Barden G. // Lancet.— 1987.— N 8551.— P. 122—126.
- Wirth P. J., Vesterberg O. // Electrophoresis.— 1988.— Vol. 9, N 1.— P. 47—53.
- Witzgal S. K., Machony K. E., Deschenes R. N. // Atherosclerosis.— 1988.— Vol. 71, N 2—3.— P. 235—241.
- Zern M. A., Leo M. A., Giambrone M. A., Lieber C. S. // Gastroenterology.— 1985.— Vol. 89, N 5.— P. 1123—1131.

Protein biosynthesis was markedly altered in liver cells after acute and chronic administration of ethanol *in vivo* and *in vitro*. The effects were dose- and time-dependent. Synthesis of cytoplasmic and nuclear proteins was inhibited in hepatocytes. In chronic intoxication activity of fibroblasts and collagen synthesis were stimulated. The data obtained suggest that inhibition of amino acids activation, impairment of translation and transcription were involved in mechanisms of the ethanol toxic effects on liver tissue. At the same time, negative effects of ethanol and its metabolites appear to be related to posttranslational modification of polypeptides.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.36-008.931:577.152.261]-092.9-07

Ю. В. Галаев, В. И. Закревский, Л. В. Гончарова

ВЛИЯНИЕ ЛИПОСОМ НА ГОРМОНАЛЬНУЮ ИНДУКЦИЮ ТИРОЗИНАМИНОТРАНСФЕРАЗЫ ПЕЧЕНИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Волгоградский медицинский институт

Липосомы находят все более широкое применение в клинической практике, главным образом как способ доставки лекарственных препаратов. Основная масса введенных в организм липосом захватывается печенью и способна включаться в цитоплазматические мембраны [2, 15, 17]. Это позволяет в экспериментальных условиях целенаправленно изменять липидный состав клеточных мембран и изучать значение тех или иных липидов в норме и в условиях патологии (в нашем случае алкогольная интоксикация).

К настоящему времени получено большое количество данных относительно контроля синтеза ферментов глюкокортикоидными гормонами. Влияние гормонов реализуется чаще всего на уровне транскрипции белкового синтеза [18]. Обязательным условием проявления индуцирующего действия стероидных гормонов считается их проникновение внутрь клетки. Многие факты свидетельствуют о важной роли плазматических мембран в связывании и активном транспорте гормонов в клетки мишени [4, 5].

Показано, что для реализации действия стероидных гормонов имеет значение природа мембранных фосфолипидов. Особое значение придается содержанию в мембранах холестерина, увеличение которого способствует снижению поступления меченых гормонов внутрь клетки [6]. Можно предположить, что липосомы, отличающиеся

по своему липидному составу от мембран гепатоцитов, способны изменять действие гидрокортизона на индукцию тирозинаминотрансферазы (ТАТ) на уровне прохождения клеточных мембран.

Методика. Исследования проводили на 120 мышах линии СВА массой 20--22 г, полученных из питомника «Столбовая» АМН СССР.

В первой серии экспериментов изучали влияние однократного введения гидрокортизона, этанола и липосом на базальный уровень активности ТАТ. Во второй серии изучали сочетанное введение липосом и гидрокортизона или липосом и этанола на активность ТАТ. В третьей серии изучали сочетанное введение липосом, гидрокортизона и этанола. Во второй и третьей сериях липосомы вводили за 1 ч до введения последующих веществ; этанол и гидрокортизон вводили одновременно.

Все исследуемые вещества вводили из расчета на 1 кг массы тела однократно, внутривенно: этанол — 3 мл/кг в виде 40 % раствора, гидрокортизон (фирмы «Рихтер», Венгрия) — 100 мг/кг, липосомы — по 0,2 мл, что составляет 12 мкмоль на животное. Липосомы готовили «детергентным» методом [11]. Содержание липидов в препарате составило 60 мкмоль/мл при мольном соотношении меченый лецитин/холестерин/дидецилфосфат 7:2:1. Животных забивали декапитацией через 4, 6 и 8 ч после введения последнего препарата.

Активность ТАТ в печени определяли по методу [12], в модификации [3] и выражали в микрограммах *p*-гидрокси-фенилпировата, образующегося за 1 ч инкубации при температуре 37 °С, на 1 мг белка. Белок определяли спектрофотометрически при длине волны 220 нм [7]; статистическую обработку полученных данных проводили по Стьюденту.

Результаты и обсуждение. Результаты раздельного однократного введения гидрокортизона, этанола и липосом представлены в табл. 1. Гидрокортизон вызывал увеличение активности ТАТ через 4 ч после начала опыта более чем в 2 раза по сравнению с контролем. Через 6 и 8 ч активность фермента продолжала оставаться высокой.

Введение этанола также приводило к индукции ТАТ. Причем эффект этанола оказался более выраженным, чем у гидрокортизона. Активность фермента была максимальной через 6 ч после начала опыта, однако в последующем она быстро снижалась и через 8 ч приближалась к исходному уровню, что совпадает с результатами, полученными ранее [1]. При введении липосом активность ТАТ увеличивалась только через 6 ч и сохранялась на этом уровне спустя 8 ч.

Предварительное введение животным липосом с последующим введением гидрокортизона и этанола вызывало торможение индуцирующего эффекта препаратов и в том, и в другом случае на 38 % (табл. 2).

Одновременное введение этанола и гидрокортизона вызывало наиболее выраженное индуцирующее влияние на активность ТАТ.

В свою очередь предварительное введение липосом приводило к торможению сочетанного инду-

Таблица 1

Изменение активности ТАТ (в мкг *p*-гидроксифенилпировата на 1 мг белка за 1 ч) под влиянием однократного введения исследуемых веществ

Препараты	Контроль	Время опыта, ч		
		4	6	8
Гидрокортизон	124,95±5,77	269,54±20,33*	273,53±17,39*	280,53±19,07*
Этанол	124,95±5,77	162,71±25,24	310,03±31,63*	155,34±33,40
Липосомы	124,95±5,77	133,66±14,31	184,12±12,99*	200,84±13,35*

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 звездочка — достоверность изменений показателей ($p < 0,05$).

Влияние липосом на индукцию ТАТ гидрокортизоном и этанолом (в % от контроля)

Препараты	Контроль	Время опыта, ч		
		4	6	8
Липосомы + гидрокортизон	124,95 ± 5,77	149,37 ± 26,63*	170,64 ± 12,14*	153,46 ± 16,23*
Липосомы + этанол	124,95 ± 5,77	164,15 ± 13,57	192,4 ± 12,16*	122,47 ± 18,84

Таблица 3

Влияние липосом (в %) на индукцию ТАТ этанолом и гидрокортизоном

Препараты	Контроль	Время опыта, ч		
		4	6	8
Этанол + гидрокортизон	123,09 ± 5,01	249,07 ± 16,01*	410,61 ± 26,46*	481,07 ± 24,18*
Липосомы + этанол + гидрокортизон	124,95 ± 5,77	187,06 ± 21,18*	230,80 ± 10,70*	190,33 ± 11,04*

цирующего эффекта этанола и гидрокортизона примерно в 2 раза (табл. 3).

Таким образом, предварительное введение животным липосом во всех сериях опытов вызывало торможение индукции активности ТАТ, как отдельно гидрокортизоном и этанолом, так и их совместным введением. Липосомы, однако, обладают самостоятельным индуцирующим свойством в отношении данного фермента. Возможно, что этот эффект, развивающийся в более поздние сроки и менее выраженный, является результатом вторичной ответной реакции организма.

Этанол приводит к более выраженному нарастанию активности ТАТ, чем гидрокортизон. Этот эффект этанола в отношении ТАТ печени крыс отмечен в работах ряда авторов [8, 14, 16]. Указанное действие этанола трудно отнести только за счет дополнительного выброса гормонов, поскольку одновременное действие этанола и гидрокортизона приводило к значительно более выраженному нарастанию активности ТАТ, чем при введении гидрокортизона. Возможно, что в основе этого явления лежит солюбилизирующий эффект этанола в отношении мембран гепатоцитов, что в конечном счете ведет к усилению их проницаемости [9, 10, 13].

Предварительное введение липосом, по-видимому, оказывает стабилизирующее действие на липидный компонент мембраны и тем самым ведет к затруднению проникновения индукторов в клетку. Можно сделать предположение, что липосомы, введенные в организм животного, встраиваясь в структуру плазматических мембран гепатоцитов, изменяют их проницаемость для гидрокортизона.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гончарова Л. В. Гормональная индукция тирозинаминотрансферазы печени животных на фоне интоксикации: Дис. ... канд. мед. наук.— Челябинск, 1984.
2. Грегориадис Г., Аллисон А. // Липосомы в биологических системах.— М., 1983.— С. 183—208.
3. Левин Ф. Б. // Вопр. мед. химии.— 1969.— № 3.— С. 315—317.
4. Сергеев П. В. Стероидные гормоны.— М., 1984.
5. Сергеев П. В., Денисов Ю. П., Шутко Г. В. // Пробл. эндокринол.— 1982.— № 5.— С. 64—68.
6. Сергеев П. В., Сейфулла Р. Д., Майский А. И. Молекулярные аспекты действия стероидных гормонов.— М., 1971.
7. Храмов В. А., Пустовойтова Ф. И. // Лаб. дело.— 1967.— № 12.— С. 711—713.

8. Badawy A. A. B., Snape B. M., Ewans M. // Biochem. J.— 1980.— Vol. 186, N 10.— P. 755—761.
9. Chin J. H., Goldstein D. B. // Molec. Pharmacol.— 1977.— Vol. 13, N 3.— P. 435—441.
10. Chin J. H., Parsons L. M., Goldstein D. B. // Biochim. biophys. Acta.— 1978.— Vol. 513, N 3.— P. 358—363.
11. Enoch H. G., Strittmater P. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1979.— Vol. 76, N 1.— P. 145—149.
12. Ewald W., Hübner H. // Naturwissenschaften.— 1961.— Bd 48, N 23.— S. 720.
13. Goldstein D. B., Chin J. H. // Fed. Proc.— 1981.— Vol. 40.— P. 2073—2076.
14. Kenney F. T. et al. // Advanc. Enzyme Regul.— 1965.— Vol. 3.— P. 1—10.
15. Nozawa J. et al. // Medical Application of Liposomes.— Karger, 1986.— P. 55—66.
16. Ribiere C. et al. // FEBBS Lett.— 1979.— Vol. 105, N 2.— P. 205—208.
17. Scherphof G. L. et al. // Medical Application of Liposomes.— Karger, 1986.— P. 43—54.
18. Schmidt T. J., Litwack G. // Physiol. Rev.— 1982.— Vol. 62.— P. 1131—1192.

Поступила 05.10.89

EFFECT OF LIPOSOMES ON ACTIVITY OF TYROSINE AMINOTRANSFERASE IN ANIMAL LIVER TISSUE

Yu. V. Galaev, V. I. Zakrevsky, L. V. Goncharova

Medical School, Volgograd

Liposomes prevented the hydrocortisone-produced induction of tyrosine aminotransferase in animal liver tissue under conditions of normal state and of alcohol intoxication. The inhibitory effect of liposomes appears to be mainly based on their ability to incorporate into hepatocyte membranes, due to which the membrane permeability towards hydrocortisone was altered.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.127-005.4-07:616.127-008.939.6

Р. К. Масколюнас, А. В. Лекис, М. И. Коваленко, А. В. Ельская, Л. Ю. Лукошьявичюс

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ БЕЛОКСИНТЕЗИРУЮЩЕГО АППАРАТА МИОКАРДА ПРИ ТОТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

Институт молекулярной биологии и генетики АН УССР, Киев, Каунасский медицинский институт

При ишемии в сердечной мышце нарушаются различные биохимические процессы, в том числе и биосинтез белка [3]. Имеются данные о снижении включения меченых аминокислот в белки сердца, об изменении содержания ряда белков

в сердечной мышце при данной патологии [7]. Установлено, что ишемия миокарда сопровождается изменением биологической активности таких основных компонентов аппарата трансляции, как тРНК и аминоацил-тРНК-синтетазы (АРСазы) [2, 4], однако молекулярные механизмы нарушения биосинтеза белка окончательно не выяснены.

В настоящей работе изучены скорость и уровень биосинтеза белка в различных бесклеточных системах из сердечной мышцы, а также охарактеризован пул рибосом в норме и при тотальной ишемии сердца.

Методика. Работа проведена на кроликах-самцах массой 2,5—3,5 кг. Моделью тотальной ишемии служил аутолиз изолированного сердца согласно методу [9]. Продолжительность аутолиза составляла 15 и 30 мин, что соответствует времени развития обратимых и необратимых изменений в миокарде при данной патологии [10, 11]. Для изучения скорости и уровня биосинтеза белка были использованы бесклеточные белоксинтезирующие системы двух видов: первая содержала неочищенную фракцию S-30, вторая система включала пострибосомальный супернатант цитозол и препараты рибосом. Неочищенную фракцию S-30 получали путем гомогенизации сердечной мышцы в стеклянном гомогенизаторе в двойном объеме 30 мМ трис-НСI-буфера (рН 7,6), содержащего 100 мМ КСI, 5 мМ MgCl₂ и 0,25 М сахарозу, с последующим центрифугированием в течение 10 мин при 30 000 g. Цитозол получали, центрифугируя указанный гомогенат в течение 2 ч при 125 000 g и проводя гель-фильтрацию полученного супернатанта через сефадекс G-25. Для получения суммарных препаратов рибосом постмитохондриальный супернатант гомогената сердечной мышцы обрабатывали тритоном X-100 (конечная концентрация 2 %) в течение 20 мин, насливали на 1 М сахарозу и центрифугировали 2 ч при 125 000 g. Полученный осадок суспендировали в 50 мМ трис-НСI-буфере (рН 7,6), содержащем 100 мМ КСI, 5 мМ MgCl₂ и 2 мМ дитиотреитол (ДТТ). О скорости и уровне синтеза белка в бесклеточных системах судили по уровню включения меченой аминокислоты в трихлоруксусную кислоту (ТХУ) — нерастворимый продукт трансляции. Бесклеточная белоксинтезирующая система с неочищенной фракцией S-30 в объеме 50 мкл содержала 1 о. е. (A₂₆₀ — A₃₂₀) неочищенной фракции S-30, 50 мМ креатинфосфат (КФ), 2 мМ АТР, 50 мМ трис-НСI (рН 7,6), 100 мМ КСI, 5 мМ MgCl₂ и 0,1 мМ ¹⁴С-аргинина. Время инкубации составляло 15 мин в случае определения скорости и 60 мин при определении уровня биосинтеза. При определении скорости и уровня биосинтеза белка в бесклеточной системе, реконструированной из рибосом и цитозола, смесь инкубировали 15 и 120 мин. Инкубационная смесь в объеме 100 мкл содержала 50 мМ трис-НСI-буфер (рН 7,6), 10 мМ КФ, 3 мкг креатинфосфокиназы (КФК), 0,25 мМ АТР, 0,25 мМ ГТР, 100 мМ КСI, 5 мМ MgCl₂, 2 мМ ДТТ, 0,025 мМ ¹⁴С-лейцин, 0,025 мМ ¹⁹ меченых аминокислот (исключая лейцин), 0,25 о. е. (A₂₆₀ — A₃₂₀) рибосом и 0,1 о. е. (A₂₆₀ — A₃₂₀) цитозола. Реакцию останавливали добавлением 1 мл 10 % ТХУ и 5 мин прогревали при 90 °С на водяной бане для гидролиза аминоксил — тРНК. Радиоактивность проб определяли, как описано в работе [6].

Время синтеза «средней» полипептидной цепи в бесклеточной системе определяли по методу [5]. Препараты свободных и мембраносвязанных рибосом выделяли по методу [1]. Седиментационный анализ различных препаратов рибосом проводили в линейном градиенте плотности сахарозы

(10—40 %), центрифугируя их 3 ч при 125 000 g в центрифуге «Sorvall OTD-75» (ротор АН-627). Для определения относительного содержания полисом в общем пуле рибосом анализировали профили их распределения в градиенте плотности сахарозы и рассчитывали отношение площади под участком кривой, соответствующей полисомному материалу, к площади под всей кривой (полисомы+рибосомы).

Результаты обрабатывали статистически с использованием *t*-критерия Стьюдента в доверительном интервале 0,05.

Результаты и обсуждение. Изучение функционирования белоксинтезирующего аппарата миокарда при тотальной ишемии было проведено в двух различных бесклеточных белоксинтезирующих системах, каждая из которых позволяет изучать биосинтез белка в условиях, максимально приближенных к условиям *in vivo*.

Результаты определения скорости и максимального уровня биосинтеза белка в бесклеточной системе, содержащей неочищенную фракцию S-30, представлены в табл. 1. Согласно этим данным, уже при кратковременной ишемии миокарда (15-минутный аутолиз) скорость и уровень включения метки в ТХУ — нерастворимый продукт трансляции снижается на 38 и 33 % соответственно по сравнению с теми же показателями в норме. При увеличении времени аутолиза до 30 мин эти величины уменьшаются на 63 и 65 % соответственно по сравнению с нормой. Следует отметить, что в данную систему вносили оптимальное количество энергетических ресурсов (КФ и КФК), которое было установлено в предварительных экспериментах. Содержание ГТР также не лимитировало синтез полипептидов. Это позволяет сделать вывод, что обнаруженное снижение скорости и уровня биосинтеза белка при ишемии сердца не связано с недостатком макроэргических соединений, а определяется, по-видимому, снижением активности белоксинтезирующего аппарата. Это предположение подтверждают и результаты изучения кинетического параметра, характеризующего процесс трансляции, — время синтеза «средней» полипептидной цепи. Так, в норме оно составляет $1,61 \pm 0,12$ мин, а при 15- и 30-минутной ишемии увеличивается до $3,46 \pm 0,54$ и $4,06 \pm 0,64$ мин соответственно.

Дальнейшие исследования были направлены на характеристику компонентов миокардиальной клетки, в наибольшей степени ответственных за снижение уровня биосинтеза белка при ишемии. Для этой цели была использована реконструированная система, позволяющая отдельно исследовать активность рибосом и цитозола. Количество рибосомной фракции и цитозола в системах, соответствующих норме и патологии (30-минутный аутолиз), было одинаковое. Согласно табл. 2,

Таблица 1

Кинетика трансляции эндогенных мРНК миокарда в системе, содержащей неочищенную фракцию S-30 (в пмоль ¹⁴С-аргинина на 1 о. е. A₂₆₀—₃₂₀ фракции S-30; M±m; n=6—8; p<0,05)

Длительность аутолиза, мин	Время инкубации, мин				
	5	15	30	60	120
15	3,57±0,38	9,98±0,9	15,52±1,23	23,42±1,29	25,76±1,41
30	3,0±0,87	5,90±0,25	10,83±0,81	12,30±0,85	12,60±1,32
Контроль	5,75±1,3	16,03±0,62	26,0±0,49	35,07±1,92	35,3±1,81

Кинетика трансляции эндогенных мРНК миокарда в системе, реконструированной из рибосом и цитозола в норме и при 30-минутном аутолизе (в пмоль ^{14}C -лейцина на 1 мг рибосом; $M \pm m$, $n=6-8$; $p < 0,05$)

Вид системы	Время инкубации, мин			
	15	30	60	120
$P_{\text{н}} + Ц_{\text{н}}$	$351,2 \pm 17,6$	$443,2 \pm 20,8$	$601,6 \pm 28,8$	$924,0 \pm 34,4$
$P_{\text{и}} + Ц_{\text{н}}$	$332,8 \pm 30,4$	$396,8 \pm 8,0$	$508,0 \pm 6,4$	$818,4 \pm 75,2$
$P_{\text{н}} + Ц_{\text{и}}$	$152,0 \pm 21,6$	$181,6 \pm 5,6$	$257,6 \pm 28,0$	$495,2 \pm 37,6$
$P_{\text{и}} + Ц_{\text{и}}$	$144,0 \pm 23,2$	$177,6 \pm 22,4$	$233,6 \pm 40,8$	$461,6 \pm 60,0$

Примечание. $P_{\text{н}}$ — рибосомы из интактного миокарда, $P_{\text{и}}$ — рибосомы из ишемизированного миокарда, $C_{\text{н}}$ — цитозол из интактного миокарда, $C_{\text{и}}$ — цитозол из ишемизированного миокарда.

эффективность трансляции эндогенных мРНК миокарда гораздо выше при наличии в системе рибосомального материала из интактной ткани. Вместе с этим следует отметить, что активность цитозола, выделенного из ишемизированного миокарда, снижается незначительно. Анализ полученных результатов позволяет сделать вывод, что причина снижения уровня белкового синтеза при ишемии связана с функционированием рибосом. Поэтому последующие исследования были направлены на изучение структурно-функционального состояния рибосомальной фракции в норме и при данной патологии.

В первую очередь определяли распределение рибосом между классами свободных от мембран и мембраносвязанных рибосом. Результаты этих исследований свидетельствуют, что происходит перераспределение между свободными и мембраносвязанными рибосомами в общем пуле рибосом клетки. Так, если в интактном миокарде свободные от мембран рибосомы составляют $91,75 \pm \pm 2,01$ % всех рибосом, что согласуется с данными

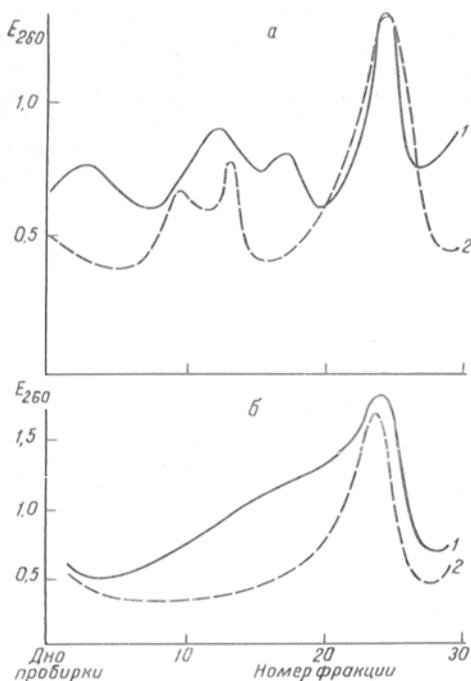
литературы [8], то после 30-минутного аутолиза их количество снижается до $59,38 \pm 5,2$ %, в то время как доля мембраносвязанных рибосом увеличивается от $8,25 \pm 2,02$ до $40,62 \pm 5,2$ %. Наряду с этим результаты анализа профилей распределения препаратов суммарных, свободных и мембраносвязанных рибосом в градиенте плотности сахарозы позволили обнаружить значительное изменение доли полисом в общем пуле рибосом разных классов при изучаемой патологии (см. рисунок). Так, после 30-минутного аутолиза доля полисом в суммарном препарате рибосом уменьшается на 14—20 %, а в препаратах свободных рибосом — на 13 %. В то же время выраженных изменений в полисомном составе мембраносвязанных рибосом, выделенных из ишемизированного миокарда, не установлено.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что ишемия миокарда сопровождается существенными структурно-функциональными изменениями в белок-синтезирующем аппарате миокарда. Для более глубокого понимания молекулярных механизмов нарушения процесса биосинтеза белка в сердце при данной патологии требуется проведение дополнительных исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берман А. Е. // Современные методы в биохимии. — М., 1977. — С. 300—303.
2. Иванов Л. Л., Тамулявичюс А.-А. И., Лукошявичюс Л. Ю. и др. // Молекул. биол. — 1984. — Т. 18, № 5. — С. 1326—1329.
3. Иргашев Ш. Б. // Актуальные вопросы кардиологии. — Ташкент, 1980. — С. 34—35.
4. Коваленко М. И., Родовичюс Г. А., Тамулявичюс А.-А. И. и др. // Молекулярная биология. — Киев, 1984. — Вып. 37. — С. 18—21.
5. Лейтин В. Л., Лерман М. И. // Современные методы в биохимии. — М., 1977. — С. 277—285.
6. Лекис А. В., Лукошявичюс Л. Ю., Коваленко М. И., Булдакова О. В. // Биополимеры и клетка. — 1985. — Т. 1, № 6. — С. 322—327.
7. Фетисова Т. В., Фролькис Р. А. Биохимия инфаркта миокарда. — Киев, 1976. — С. 87.
8. Явич М. П. // Успехи соврем. биол. — 1981. — Т. 91, № 3. — С. 334—349.
9. Armiger L. C., Seelye R. N., Carnell V. M. et al. // Lab. Invest. — 1976. — Vol. 34, N 4. — P. 357—362.
10. Borgers M., Shu L. G., Xhonneux R. // Amer. J. Path. — 1987. — Vol. 126, N 1. — P. 92—102.
11. Jennings R. B., Ganote C. E. // Circulat. Res. — 1974. — Vol. 34, N 1. — Suppl. 1. — P. 156—172.

Поступила 20.07.89



Результаты центрифугирования в линейном 10—40 % градиенте сахарозы препаратов суммарных (а) и свободных (б) рибосом из миокарда кроликов в норме и после 30-минутного аутолиза.

1 — рибосомы из интактного миокарда; 2 — рибосомы из ишемизированного миокарда.

SOME PROPERTIES OF THE MYOCARDIAL PROTEIN-SYNTHESIZING SYSTEM DURING TOTAL ISCHEMIA

A decrease in the rate of protein synthesis as well as an increase in the synthesis time of "medium-size" polypeptide chain were detected in total rabbit myocardium ischemia, which were evaluated using rabbit myocardium cell-free protein-synthesizing systems. The decrease in the synthesis rate of total myocardial proteins was shown to depend on the state of ribosomes function. Redistribution in the pools of membrane-bound and free ribosomes as well as a decrease of polyribosomes amount in total pool of myocardial ribosomes were observed under conditions of total myocardial ischemia.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.33/342-07:616.153.915-39

Л. М. Мажуль, К. К. Далидович, В. В. Гулько, О. В. Шаблинская, В. Е. Волыхина, Г. Г. Гацко

НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА У БОЛЬНЫХ С ГАСТРОДУОДЕНАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ

Институт радиобиологии АН БССР, Минск, Минский медицинский институт

В последнее время в патогенезе ряда заболеваний придается важное значение активации перекисного окисления липидов (ПОЛ). Перекиси липидов являются метаболитами нормально функционирующей клетки и постоянно присутствуют в организме в концентрации $(0,1—0,8) \cdot 10^{-6}$ М на 1 г тканевых липидов. Свободнорадикальный липидный интермедиат, являясь реакционноспособным, участвует в сопряжении окисления и фосфорилирования [1], в синтезе ряда гормонов, простагландинов и т. д. В то же время радикалы липидной природы являются неспецифическим токсическим фактором, действующим в течение всей жизни [2]. Наличие в организме мощной антиоксидантной системы препятствует активации процесса ПОЛ и реализации его повреждающего действия. Истощение антиоксидантной системы приводит к активации липопероксидации и к развитию патологических состояний. Согласно имеющимся данным, активация ПОЛ имеет место при острой сердечной недостаточности [3], атеросклерозе [2, 4], сахарном диабете [5, 6], хроническом бронхите [7], язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки [8]. Систематические стрессорные раздражители усиливают повреждающее действие липидных радикалов. Защитно-приспособительная реакция организма

в этом случае выражается снижением содержания легко окисляемых липидов и относительным увеличением более инертной фракции холестерина [9], т. е. атерогенно направленными изменениями. Поэтому при лечении ряда заболеваний, сопровождающихся активацией ПОЛ, необходимо уделять должное внимание антиатерогенным препаратам.

В связи с изложенным выше целью нашего исследования явилось изучение состояния системы ПОЛ и липопротеидного спектра сыворотки крови у больных с желудочно-кишечной патологией — язвенной болезнью и гастродуоденитами.

Методика. Под наблюдением находилось 15 больных с гастродуоденитами и язвенной болезнью. Контрольную группу составили 7 практически здоровых лиц. Содержание в сыворотке крови малонового диальдегида (МДА) определяли по методу [10], активность Zn-Cu-содержащей супероксиддисмутазы (СОД) в гемолизате эритроцитов — по методу [11], холестерина (ХС) и триглицеридов (ТГ) — с помощью наборов «Био-Ла-Тест» (ЧССР). ХС липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) исследовали после предварительного удаления из сыворотки липопротеидов очень низкой (ЛПОНП) и низкой плотности (ЛПНП) гепарин-марганцевой преципитацией [12]. Содержание ХС ЛПОНП и ЛПНП вычисляли по формулам: $ХС_{ЛПОНП} = ТГ/5$; $ХС_{ЛПНП} = ХС_{общ} - (ХС_{ЛПВП} + ХС_{ЛПОНП})$.

Результаты и обсуждение. Как показали проведенные исследования, у больных с гастродуоденальной патологией увеличено содержание в крови продуктов ПОЛ (табл. 1). Наблюдались также изменения со стороны липидного обмена, имеющие атерогенную направленность: повышалось содержание общего ХС и ХС ЛПНП. В то же время эти изменения можно рассматривать как компенсаторную реакцию организма, выражающуюся в повышении содержания более устойчивой к окислению фракции ХС и направленной на снижение интенсивности ПОЛ. Отмечаемая у больных с гастродуоденальной патологией активация СОД также является приспособительной реакцией организма, направленной на защиту организма от повреждающего действия свободных радикалов, инициирующих ПОЛ.

На этом фоне больным было проведено симптоматическое и патогенетическое лечение в соответствии с установленным диагнозом (основное лечение, 1-я группа). Части больных в дополнение к основному лечению была назначена антиоксидантная и ангиопротекторная терапия (линетол + витамин Е, 2-я группа). Все больные были выписаны по окончании курса лечения в удовлетворительном состоянии. Однако проведенное при выписке биохимическое исследование выявило некоторые различия в состоянии больных и прогнозе заболевания. Так, у больных 1-й груп-

Таблица 1

Некоторые показатели ПОЛ и липидного обмена у больных с гастродуоденальной патологией до лечения

Обследованные	МДА, Е ₃₃₂ /мл	Общие липиды, г/л	СОД, ед. акт. на 1 мл крови	ХС, ммоль/л				ТГ, ммоль/л
				общий	ЛПОНП	ЛПНП	ЛПВП	
Здоровые	0,17 ± 0,012 (7)	5,28 ± 0,51 (7)	2597,0 ± 130,8 (11)	3,77 ± 0,3 (6)	0,51 ± 0,1 (6)	0,65 ± 0,1 (6)	2,61 ± 0,6 (6)	2,58 ± 0,6 (6)
Больные	0,25 ± 0,013* (15)	6,86 ± 0,44 (15)	3082,0 ± 175,0* (22)	6,48 ± 0,5* (16)	0,36 ± 0,07 (16)	2,83 ± 0,5* (16)	3,26 ± 0,2 (16)	1,81 ± 0,2 (16)

Примечание. В скобках число обследованных. Здесь и в табл. 2 и 3 звездочка — $p < 0,05—0,01$.

Некоторые показатели ПОЛ и липидного обмена у больных с гастродуоденитами в процессе лечения

Группа больных	МДА, Е _{к32} /мл	Общие липиды, г/л	СОД, ед. акт. на 1 мл крови	ХС, ммоль/л				ТГ, ммоль/л
				общий	ЛПОНП	ЛПНП	ЛПВП	
1-я								
M ₁	0,225	5,78	2766	6,410	0,297	3,228	2,924	1,486
M ₂	0,212	10,0*	2522	6,330	0,612	3,916	1,814*	3,062
2-я								
M ₁	0,276	7,41	3460	6,648	0,443	2,384	3,778	2,219
M ₂	0,222*	9,34	2670	6,133	0,611	2,878	2,472*	3,057

Примечание. M₁ и M₂ — средние арифметические величины показателя соответственно до и после лечения.

пы (табл. 2) при выписке не было отмечено нормализации содержания продуктов ПОЛ в сыворотке крови и активности СОД в гемолизате эритроцитов по сравнению с величиной этих показателей при поступлении (статистическую обработку результатов в данном случае производили методом парных сравнений). У пациентов этой группы были также выявлены значительные сдвиги в липидном обмене: повышено содержание общих липидов, ТГ, ХС ЛПОНП, снижено количество ХС ЛПВП, т. е. имелись изменения, предрасполагающие к атеросклеротическому поражению сосудистой стенки. У больных 2-й группы по окончании курса лечения было достоверно снижено содержание МДА и ХС ЛПВП.

Любая патология, сопровождающаяся активацией процесса ПОЛ, как отмечалось ранее, создает атерогенную ситуацию в организме. В данном случае дополнительным отрицательным фактором может явиться и состояние гиподинамии, которому подвержены, как правило, все больные в клинике. С этих позиций назначение больным, в данном случае больным с гастродуоденальной патологией, антиоксидантных и ангиопротекторных препаратов является важным моментом в терапии указанных заболеваний. Проведенные исследования позволяют считать, что больные, получавшие дополнительно к основному лечению витамин Е и линол, имеют более благоприятный прогноз в отношении возможного развития сосудистых осложнений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Давлетшина Л. П., Дмитриев Л. Ф., Иванов И. И. // Биол. науки.— 1984.— № 9.— С. 25—30.
2. Журавлев А. И. // Биоантиокислители и регуляция окислительных процессов в клетке.— М., 1972.— С. 37—38.
3. Меерсон Ф. З., Салтыкова В. А., Диденко В. В., Савов В. М. и др. // Кардиология.— 1984.— Т. 24, № 5.— С. 61—68.
4. Неустрова П. С. // Проблемы общей патологии, хронических процессов в клинике и эксперименте.— Новосибирск, 1977.— С. 73—78.
5. Ефимов А. С., Науменко В. Т. // Пробл. эндокринологии.— 1985.— Т. 31, № 1.— С. 6—9.
6. Старосельцева Л. К., Косилова Е. С., Смурова Т. Ф., Паравлянская С. Е., Кравцова И. В. // Пробл. эндокринологии.— 1986.— Т. 32, № 1.— С. 19—22.
7. Грубников Г. В., Рыбальченко О. С. // Тер. арх.— 1985.— Т. 57, № 10.— С. 61—65.
8. Куликов В. Ю., Ермолаева В. В., Колесникова Л. И., Молчанова Л. В., Косованова Л. В. // Вопр. мед. химии.— 1979.— № 3.— С. 289—292.
9. Бурдакова Е. Б. // Свободнорадикальное окисление липидов в норме и патологии.— М., 1976.— С. 18—19.
10. Гаврилов В. Б., Мажуль Л. М., Гацко Г. Г., Конев С. В. Способ количественного определения продуктов перекисного окисления в сыворотке крови. А. с. 1179225, СССР.

кисного окисления в сыворотке крови. А. с. 1179225, СССР.

11. Чумаков В. П., Осинская Л. Ф. // Вопр. мед. химии.— 1979.— № 3.— С. 261—266.
12. Кирыков А., Тингерова З. // Лаб. дело.— 1979.— № 7.— С. 398—402.
13. Рокицкий П. Ф. // Биологическая статистика.— М., 1973.

Поступила 01.08.88

SOME PATTERNS OF LIPID METABOLISM IN PATIENTS WITH IMPAIRMENTS OF GASTRODUODENAL TRACT

L. M. Mazhul, K. K. Dalidovich, V. V. Gulko, O. V. Shablinskaya, V. E. Volykhina, G. G. Gatsko

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

Lipid metabolism was studied in patients with impairments of gastroduodenal tract before and after treatment. The data obtained suggest that the treatment of these patients should involve both antioxidants and angioprotective drugs in order to prevent vascular deteriorations.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616-006.6-085.277.3-06:616.15-008.6-085.38.015.2:615.246.2]-036.8:577.2

Р. И. Якубовская, М. М. Уткин, Е. Р. Немцова, Н. И. Казачкина, Г. И. Авдеев, В. И. Борисов, А. С. Мамонтов

К ВОПРОСУ О МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМАХ ДЕЙСТВИЯ ГЕМОСОРБЦИИ

Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П. А. Герцена

Развитие онкологического заболевания сопровождается комплексом нейроэндокринных, энзимопатических, иммунных нарушений, вызывающих общую ослабленность, эндотоксикоз, повышенную чувствительность к бактериальным инфекциям. Именно поэтому традиционные способы лечения онкологических больных — хирургический, лучевой, химиотерапевтический — нередко приводят к осложнениям того или иного рода. Так, у онкологических больных оперативное вмешательство чаще, чем у других контингентов больных, приводит к гнойным осложнениям, трудно купируемым общепринятыми методами [1]. Применение антибластомных лекарственных препаратов в терапевтических дозах вызывает усиление токсикоза в виде таких осложнений, как нефро-, гепато-, желудочно-кишечная токсичность, депрессия кроветворения, не позволяющих нередко довести курс лечения до конца и добиться тем самым клинического эффекта [1]. Лучевая терапия подобно химиотерапевтической также нередко со-

провождается токсическими явлениями. Однако вопросы профилактики токсичности химиотерапии, лучевого лечения, а также послеоперационных осложнений у онкологических больных разработаны мало.

В качестве наиболее эффективного средства профилактики перечисленных осложнений у больных раком различных локализаций все большее внимание привлекают методы экстракорпоральной детоксикации организма, в частности гемосорбция (ГС) на угольных сорбентах. Применение ГС на фоне химиотерапии у 25—30 % онкологических больных позволяет не только снижать токсические реакции на противоопухолевые препараты [5], но и повышать чувствительность злокачественных новообразований к цитостатикам [2]. Представляет интерес тот факт, что ГС, применяемая перед курсом химиотерапии (превентивная ГС), оказывает также сильное детоксикационное действие. По мнению ряда авторов, эта методика является максимально эффективной при эндогенных отравлениях, всех видах гемолиза, печеночной недостаточности, гепатозах и других заболеваниях [4, 7]. В клинике Московского научно-исследовательского онкологического института им. П. А. Герцена накоплен положительный опыт по эффективному купированию гнойных послеоперационных осложнений при включении в схему лечения ГС, что хорошо согласуется с данными литературы о применении этой процедуры у неонкологических больных при перитонитах, сепсисе [4].

Несмотря на достаточно широкое и эффективное использование ГС при лечении ряда патологических состояний, до сих пор не сложились представления о механизме лечебного действия этой процедуры. К настоящему моменту имеется несколько точек зрения на данную проблему. Одна из них состоит в том, что эффект ГС обусловлен главным образом извлечением из крови токсических метаболитов с помощью сорбции на колонке [4], другая точка зрения заключается в том, что при ГС на сорбенте удаляются не только конечные метаболиты, но и вещества, связанные с транспортными белками, в частности с альбумином, и препятствующие их нормальному функционированию [7]. Однако эти представления не позволяют полностью объяснить ни механизм превентивной ГС, ни ее антибактериальное действие.

Для выяснения некоторых аспектов механизма действия ГС мы изучили ряд показателей гомеостаза у больных раком пищевода, леченных по схеме превентивная ГС+химиотерапия. Анализировали как гуморальные, так и внутриклеточные компоненты, а также поведение нейтрофилов при ГС.

Методика. Обследовано 80 больных раком пищевода III и IV стадий, леченных по схеме: превентивная ГС+химиотерапия, а также 15 больных с гнойными осложнениями после хирургического вмешательства, леченных с применением ГС, в динамике: до ГС, после введения гепарина, сразу после окончания ГС, а также через 3 ч, 1, 3 и 7 сут. После ГС исследовали кровь, оттекающую с колонки и циркулирующую в русле. ГС осуществляли веновенозным доступом на сорбенте марки СКН-1К.

Кровь для анализа гуморальных факторов забирали из вены, сыворотку замораживали и хранили до использования при -20°C . Анализ клеточных элементов проводили

в крови, взятой из пальца. В пробах подсчитывали общее количество лейкоцитов, формулу крови на мазках, окрашенных по Гимзе — Романовскому, оценивали иммуноцитохимическую реакцию на лактоферрин (ЛФ) по методике, предложенной нами ранее [6].

Уровни IgG, IgA, IgM и α_1 -антитрипсина (α_1 -АТ) определяли методом радиальной иммунодиффузии по Манчини [17].

Общую антитриптическую активность (АТА) и БАЭЭ-эстеразную активность сыворотки крови определяли по методу [9].

Общее содержание белка в крови выявляли рефрактометрически, белковый состав крови исследовали методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях [18].

Концентрацию ЛФ определяли двумя способами: модифицированным методом радиальной иммунодиффузии по Манчини [17] и с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Для повышения чувствительности метода радиальной иммунодиффузии ввели дополнительную стадию инкубации с антисывороткой осла к IgG кролика.

ИФА проводили в «сэндвич»-варианте следующим образом: 96-луночные плашки (Москва) активировали инкубацией с фракцией иммуноглобулинов кролика к ЛФ в течение 18 ч при 4°C . Антиген (ЛФ) наслаивали в течение 2 ч при комнатной температуре, затем плашки инкубировали с антителами кролика к ЛФ, конъюгированными с пероксидазой. После каждой стадии проводили 3-кратную отмывку по 3 мин $0,01\text{ M}$ трис-НСl-буфером (pH 7,3) с $0,15\text{ M}$ NaCl и $0,5\%$ твин-40. Комплекс антитела — антиген — антитела — пероксидаза выявляли 5-аминосалициловой кислотой ($3,8\text{ mM}$, pH 5,5, $0,01\%$ H_2O_2) в течение 45 мин при комнатной температуре в темноте, реакцию останавливали 1 н. NaOH и измеряли поглощение при длине волны 510 нм на спектрофотометре «Minireader II Dynatech». Калибровочную кривую строили по референс-препарату ЛФ, выделенному аффинной хроматографией на антительном сорбенте.

Результаты и обсуждение. Клинические данные свидетельствуют о том, что превентивная ГС у онкологических больных приводит к снижению ракового эндотоксикоза. Поэтому нами в первую очередь было изучено влияние этой процедуры на ряд биохимических изменений, развивающихся вследствие токсикоза.

Для этого анализировали показатели эстеразной и антитриптической активности сыворотки крови, характеризующие степень координации систем фибринолиза, свертывания, кининообразования, некоторые компоненты специфической и неспецифической защиты организма: α_1 -АТ, IgG, IgM, IgA, один из характерных показателей эндогенной интоксикации — среднемoleкулярные токсины, или «средние молекулы» (СМ). В таблице представлены данные определения перечисленных факторов в плазме крови обследованных больных в различные сроки наблюдения. Как видно из таблицы, сразу после ГС происходит незначительное (статистически недостоверное) снижение уровня общего белка, который к 7-м суткам восстанавливается. Эти данные коррелируют с тем, что на электрофореграммах в 50 % случаев наблюдается лишь незначительное уменьшение интенсивности полосы в зоне постальбуминов, однако к 7-м суткам эти изменения уже не определяются. Из этого следует, что процедура ГС не увеличивает риск развития гипо- и диспротеинемий у онкологических больных, что согласуется с данными других авторов [4, 7].

Раковый токсикоз характеризуется широким диапазоном биохимических изменений, в том числе касающихся коагуляционных свойств крови. Мы оценивали влияние ГС на дисферментемии плазмы крови онкологических больных по общей аргининэстеразной активности, отражающей пре-

Показатель	Норма	Срок наблюдения			
		до ГС	после ГС	1-е сутки	7-е сутки
Общий белок, г/л	80 ± 10	69,8 ± 5,5	64,7 ± 3,0	65,7 ± 3,3	66,9 ± 2,9
БАЭЭ-активность, мкмоль/мин	0,31 ± 0,03	0,15 ± 0,02	0,32 ± 0,06	0,32 ± 0,06	0,19 ± 0,03
АТА, ИЕ/мл	25 ± 5	47,7 ± 3,4	45,9 ± 3,1	47,7 ± 2,7	47,7 ± 2,7
α_1 -АТ, мг/мл	3,3 ± 0,8	10,2 ± 0,4	10,6 ± 0,3	9,9 ± 0,7	10,1 ± 0,5
IgG } мг %	11 ± 5	11,94 ± 0,75	11,88 ± 0,56	12,11 ± 0,3	12,25 ± 1,23
IgM }	1,15 ± 0,65	2,39 ± 0,19	2,33 ± 0,19	2,32 ± 0,27	2,24 ± 0,22
IgA }	3 ± 2	2,59 ± 0,19	2,79 ± 0,26	2,49 ± 0,63	3,22 ± 1,19

имущественно интегральную активность ряда трипсиноподобных протеиназ (тромбина, плазмина, калликреина, факторов Ха, XIa, XIIa и др.) [9], а также ингибиторный потенциал крови.

Как видно из таблицы, в среднем величина БАЭЭ-эстеразной активности в 2 раза ниже нормы. После проведения ГС этот показатель возрастает до нормальных величин и остается таковым к 1-м суткам. Однако к концу курса химиотерапии (к 7-м суткам) опять наблюдается снижение БАЭЭ-эстеразной активности, которое тем не менее не достигает исходных низких величин.

Поскольку перед ГС больным вводят гепарин, следовало выяснить его влияние на БАЭЭ-эстеразную активность. Для этого в отдельных опытах измеряли этот показатель до и после введения антикоагулянта. Выявлено, что гепарин не оказывает заметного влияния на БАЭЭ-эстеразную активность.

Каковы же возможные механизмы нормализации эстеразной активности в процессе ГС? Их несколько: 1) запуск каскада ферментативных реакций путем активации фактора Хагемана на поверхности гемосорбента, а также путем контакта с внутриклеточными компонентами из разрушенных клеток; 2) выброс в русло крови протеиназ, обладающих БАЭЭ-эстеразной активностью, из клеток крови, претерпевших разрушение на гемосорбенте; 3) снижение в плазме крови больных содержания регуляторов активности протеолитических ферментов-ингибиторов, в частности α_1 -АТ.

Проведенные исследования не позволяют дифференцированно оценить вклад протеолитических ферментов плазмы крови и внутриклеточных протеиназ в БАЭЭ-эстеразную активность, так как для этого требуется проведение специальных измерений с применением специфических субстратов протеиназ и биологических тестов. Вклад антипротеолитической активности в показателе БАЭЭ-эстеразы, оцененный по уровню как α_1 -АТ,

так и общей АТА, отражающей в основном наличие не связанной в комплекс с протеиназами формы α_1 -АТ [9], практически не изменяется.

Таким образом, следует принять, что основным механизмом увеличения БАЭЭ-эстеразной активности является изменение собственно протеолитической активности.

Раковый токсикоз сопровождается изменениями в системе иммунитета и нередко проявляется дисгаммаглобулинемией, вызванной различными причинами. Поэтому мы исследовали влияние ГС на уровни IgG, IgM, IgA (см. таблицу). Оказалось, что у обследованных больных и до ГС имеется дисгаммаглобулинемия: уровни IgG и IgA колеблются в пределах нормы, а содержание IgM повышено. После проведения ГС во все сроки наблюдения не происходит статистически достоверных сдвигов в концентрации гуморальных компонентов иммунитета.

В последние годы важное значение в развитии интоксикации придается увеличению в крови больного количества токсинов среднемoleкулярной массы (300—1500 Д). Считается, что эффективность ГС во многом обусловлена снижением уровня этих токсинов [3, 8]. Данные, характеризующие изменения этого показателя под влиянием ГС и последующей химиотерапии, приведены на рис. 1. Они свидетельствуют о том, что снижение уровня СМ в крови онкологических больных является одним из звеньев детоксикационного процесса при ГС, что подтверждает данные, полученные другими исследователями.

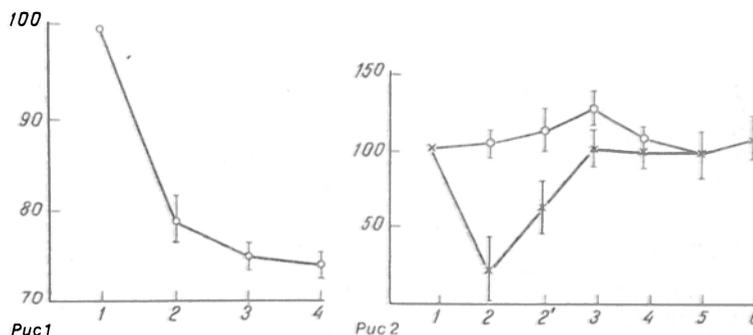
Таким образом, ГС у онкологических больных, не увеличивая риска развития гипо- и диспротеинемий, а также гипо- и дисгаммаглобулинемий, нормализует ряд биохимических показателей крови, способствуя тем самым снижению эндотоксикоза. Однако эти данные, так же как и результаты других авторов об изменении содержания гуморальных компонентов гомеостаза [4, 5, 7], не позволяют в полной мере объяснить ме-

Рис. 1. Динамика изменений уровня СМ (в % от исходного) в сыворотке крови больных раком пищевода.

1 — до ГС; 2 — сразу после ГС; 3 — 1-е сутки; 4 — 7-е сутки.

Рис. 2. Динамика содержания полиморфноядерных лейкоцитов (ПМЯЛ) (в % от исходного) в крови больных раком пищевода.

1 — до ГС; 2 — с колонки в конце ГС; 2' — из русла крови в конце ГС; 3 — через 3 ч; 4, 5, 6 — соответственно через 1, 3 и 7 сут. Точки — ПМЯЛ, окрашенные по Гимзе—Романовскому; звездочки — ПМЯЛ, окрашенные с помощью антител к ЛФ.



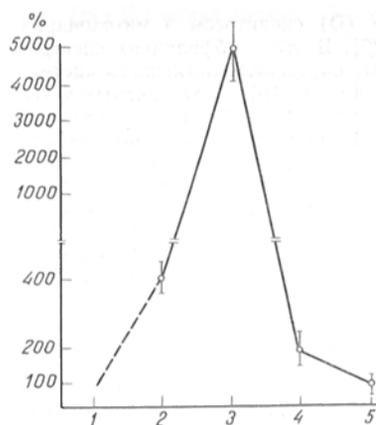


Рис. 3. Динамика изменений уровня ЛФ (в % от исходного) в сыворотке крови больных раком пищевода.
1 — до ГС; 2 — после введения гепарина; 3 — по окончании ГС; 4 — через 5 ч; 5 — через 1 сут.

ханизм мощного модифицирующего воздействия ГС на организм больного.

Определение общего количества лейкоцитов в динамике выявило тенденцию к его нормализации: при исходно сниженном уровне лейкоцитов их количество увеличивалось в первые сутки после ГС, а при повышенном снижалось до нормальных величин.

Изучение форменных элементов крови, окрашенных по Гимзе — Романовскому, показало, что подобная окраска не выявляет изменения морфологии клеток, происходящего на колонке. Однако специфическая окраска нейтрофилов с помощью антител к ЛФ-маркеру вторичных гранул обнаруживает значительную дегрануляцию этих клеток при протекании крови через сорбент. Не менее 75 % нейтрофилов в крови, оттекающей с сорбента, оказываются негативными по ЛФ, т. е. дегранулированными, а к моменту завершения процедуры в русле крови находится 40—50 % таких функционально неполноценных клеток. Через 3 ч после ГС в крови остается не более 10 % разрушенных клеток, а через 1 сут практически все нейтрофилы ЛФ-положительны (рис. 2).

Явление дегрануляции нейтрофилов при ГС сопровождается резким увеличением концентрации ЛФ в плазме крови больных — в 100—200 раз по сравнению с исходным уровнем (рис. 3). Одновременно в плазму крови больного поступают также другие компоненты секреторных гранул нейтрофилов — миелопероксидаза и лизоцим [15]. Разрушение других клеток крови, по-видимому, также приводит к появлению в плазме крови значительного количества внутриклеточных биологически активных соединений широкого спектра действия, способствующих нормализации ряда биохимических процессов [15].

Таким образом, анализ собственных данных и данных литературы позволяет предположить, что одним из механизмов модифицирующего действия ГС является резкий выброс в плазму крови внутриклеточных компонентов. Полученные нами результаты не исключают того, что именно выброс ЛФ является основным моментом при ГС, так как количественно он составляет значительную часть внутриклеточных соединений. Функции ЛФ как регулятора гемопоэза [14], антибактериального агента [10], адсорбента низкомолекулярных соединений [12] и ионов тяжелых металлов [13] позволяют отнести его к детоксикационным агентам широкого спектра действия. Отмеченное другими авторами [11] явление

адсорбции циркулирующего в русле крови ЛФ клетками печени и почек на длительное время (до 3 нед) позволяет объяснить механизм защиты этих органов от действия антибластомных средств при проведении превентивной ГС. На основании предлагаемого механизма ГС увеличение БАЭЭ-активности может быть обусловлено выходом внутриклеточных протеиназ, а инактивация и элиминация среднемолекулярных токсинов могут происходить вследствие их комплексообразования с ЛФ. Так как ЛФ оказывает самостоятельное бактерицидное действие на различные патогенные микроорганизмы [10], а также усиливает микробицидность клеток крови [16], можно предполагать, что «наводнение» им крови при ГС является одним из механизмов, реально объясняющих отмеченный нами и другими авторами феномен постгемосорбционного повышения чувствительности организма больного к лекарственной терапии антибиотиками при гнойных осложнениях. Выход в плазму крови других антибактериальных агентов — миелопероксидазы и лизоцима [15], по-видимому, усиливает этот эффект.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гершанович М. Л. // Осложнения при химио- и гормонотерапии злокачественных опухолей. — М., 1982. — С. 223.
2. Глинский Г. В. // Экспер. онкол. — 1982. — № 6. — С. 49 — 51.
3. Жаков И. Г., Фрадкин С. З., Жаврид Э. А. и др. // Международный симпозиум по гемосорбции, 7-й: Тезисы докладов. — Киев, 1986. — С. 140.
4. Лопухин Ю. М., Молоденков М. П. Гемосорбция. — М., 1985.
5. Нахимов Е. И., Лебедев В. Н., Лапин Б. А. // Вопр. онкол. — 1986. — № 5. — С. 9—15.
6. Немцова Е. Р., Якубовская Р. И. // Гематол. и трансфузиол. — 1988. — № 3. — С. 56—58.
7. Сазонов А. М., Эндлер Л. А., Лехтман А. М. Гемосорбция при механической желтухе. — М., 1986.
8. Тушикова Э. А. // Вопр. мед. химии. — 1983. — № 1. — С. 2—10.
9. Якубовская Р. И., Насхина Т. С., Мальшев Н. А., Фарбер Н. А. // Там же. — № 6. — С. 804—811.
10. Arnold R. R., Russell J. E., Champion W. J. et al. // Infect. Immun. — 1982. — Vol. 35. — P. 792—799.
11. Bennett R. M., Konocinski T. // Clin. Sci. — 1979. — Vol. 57. — P. 453—460.
12. Bläckberg L., Hornell O. // FEBS Lett. — 1980. — Vol. 109, N 2. — P. 180—184.
13. Brock J. H. // Arch. Dis. Child. — 1980. — Vol. 55. — P. 413—421.
14. Broxmeyer H. E., Smilhyman A., Eger R. R. et al. // J. exp. Med. — 1978. — Vol. 148. — P. 1052—1067.
15. Hallgren R., Venge P., Wilkstrom B. // Nephron. — 1981. — Vol. 29, N 2. — P. 233—238.
16. Lima M., Kierzenbaum F. // J. Immunol. — 1987. — Vol. 139, N 5. — P. 1647—1651.
17. Mancini G., Carbonara A., Heremans J. // Immunochemistry. — 1965. — Vol. 2. — P. 235—254.
18. Weber K., Osborn M. // J. biol. Chem. — 1969. — Vol. 224. — P. 4406—4410.

Поступила 08.08.88

ON MOLECULAR MECHANISMS OF HEMOSORPTION EFFECTS

R. I. Yakubovskaya, M. M. Utkin, E. R. Nemtsova, N. I. Kazachkina, G. I. Avdeev, V. I. Borisov, A. S. Mamontov

P. A. Herten Institute of Oncology, Ministry of Public Health of the RSFSR, Moscow

Several humoral and intracellular components of blood were investigated in patients with esophageal carcinoma treated with preventive hemosorption+chemotherapy, and also in patients with purulent complications after surgery before

hemosorption, during hemosorption and 3 hrs, 1, 3 and 7 days after hemosorption. It was demonstrated that during hemosorption and in the first days following it no significant changes occurred either in blood count or in protein content, protein composition, levels of α_1 -AT, IgG, IgA and IgM in blood plasma. Preventive hemosorption did not cause hypoproteinemia in these patients. Hemosorption led to normalization of certain biochemical indices of blood: increase in BAEE activity and decrease in the level of middle molecular toxins, which indicated the reduction of endotoxemia in patients. During hemosorption there was a marked (100-200 times) increase in blood plasma of lactoferrin, which is a component of specific granules in neutrophils. It is assumed that the leading modifying mechanism of action of hemosorption is an output of physiologically active components the main of which is lactoferrin.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 612.822.11.014.46:615.275.4

Л. М. Герштейн, Е. Л. Доведова, А. С. Камышева, А. В. Сергутина, Т. Л. Чеботарева

ВЛИЯНИЕ ТАФЦИНА НА НЕКОТОРЫЕ СТОРОНЫ ОБМЕНА В ДВИГАТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ МОЗГА ЖИВОТНЫХ

Институт мозга ВНЦПЗ АМН СССР, Москва

Тетрапептид тафцин стимулирует неспецифический иммунитет, влияет на двигательную активность животных, оказывает стресспротективное и антидепрессивное действие [2, 4, 5, 9—11]. Одноразовое введение тафцина интактным животным уже через 5—15 мин стимулировало двигательную активность, а через 60 мин после введения проявлялось седативное действие препарата [2].

Механизм центрального действия тафцина не раскрыт. Полагают, что эффект этого препарата опосредован воздействием на катехоламинергическую систему. Установлено его влияние на активность тирозингидроксилазы гипоталамуса и стриатума [4] и на обратный захват биогенных аминов синапсами мозга крыс. Имеются также данные о влиянии тафцина на систему ГАМК [12].

В настоящем сообщении обобщены экспериментальные данные по выяснению действия тафцина на обмен нейромедиаторов и белков на клеточном и субклеточном уровнях в функционально различных образованиях двигательной системы мозга кроликов и крыс — сенсомоторная область коры больших полушарий и хвостатое ядро, которые можно рассматривать как единую морфофункциональную систему, обеспечивающую двигательные функции и принимающую участие в формировании когнитивных процессов [1].

Методика. В работе использовали 40 половозрелых крыс-самцов линии Вистар и 30 кроликов породы шиншилла. Животным опытной группы вводили тафцин (Thr-Lys-Pro-Arg) («Serva», ФРГ) внутривенно в физиологическом растворе из расчета 300 мкг на 1 кг массы. Контрольным животным вводили физиологический раствор. Животных декапитировали под легким эфирным наркозом. Для исследования были взяты вышеназванные образования мозга кроликов и крыс через 30 и 75 мин после введения тафцина.

Из указанных образований мозга кроликов методом дифференциального центрифугирования выделяли неочищенные митохондриальные фракции. При последующем высокоскоростном центрифугировании в прерывистом градиенте сахарозы (0,8—1,4 М) эти фракции разделяли на субфракции

«легких» (С) и «тяжелых» (D) синапсом и митохондрией тел нервных клеток (E) [20]. В этих субфракциях спектрофотометрически (Gillford-250) определяли активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) при 540 нм [15], молекулярных форм моноаминоксидазы (MAO) типа А (субстрат — серотонин) при 250 нм [19] и типа Б (субстрат — паранитрофенилэтиламин) при 450 нм [8] и удельную активность ферментов выражали в единицах оптической плотности (АЕ) при соответствующей длине волны на 1 мг белка каждой субфракции. Активность аминопептидазы (субстрат — лейцил- β -нафтиламид) оценивали на флуориметре МРФ-4 фирмы «Hitachi» $\lambda_{возб}$ = 360 нм; $\lambda_{исп}$ = 450 нм [18]. Содержание белка в пробах определяли по методу [17].

Цитохимически активность аминопептидазы (субстрат — аланил- β -нафтиламид) [6], АХЭ [16] и MAO (субстрат — триптами) [14] выявляли на криостатных срезах толщиной 20 мкм, и уровень активности ферментов оценивали в условных единицах на люминесцентном микроскопе ЛЮМАМ-ИЗ при длинах волн 550, 486 и 589 нм соответственно. Методом интерферометрии на микроскопе БИНАМ-Л212 в нейронах слоев III и V сенсомоторной коры и нейронах хвостатого ядра определяли сухую массу плотных веществ, которые на фиксированном материале отражают содержание структурированных белков [3]. Определение плотных веществ проводили в монохроматическом свете при длине волны 535 нм с использованием поворотного анализатора Сенармона (об. 40, ок. 10).

Одновременно измеряли площадь профилей полей цитоплазмы клеток и их ядер с помощью окуляр-микрометра МОВ 1-15. При заданной толщине среза (7 мкм) концентрацию выражали отношением содержания к площади профильного поля цитоплазмы.

Полученные результаты выражали в процентах по отношению к величине контроля, принимаемой за 100 %.

Результаты и обсуждение. Цитохимическое определение показало, что через 30 мин после однократного введения тафцина каких-либо достоверных различий активности АХЭ и MAO не отмечается. Однако при дифференцированном биохимическом определении MAO (типы А и Б) в субфракциях мозга было обнаружено статистически значимое снижение активности MAO типа А (на 20 %) с одновременным увеличением активности MAO типа Б (на 37 %) (рис. 1, 2).

Через 75 мин после введения тафцина при гистохимическом выявлении MAO ее активность достоверно снижена в слое V коры и не отличается от уровня контроля в слое III и хвостатом ядре. Активность MAO типов А и Б также

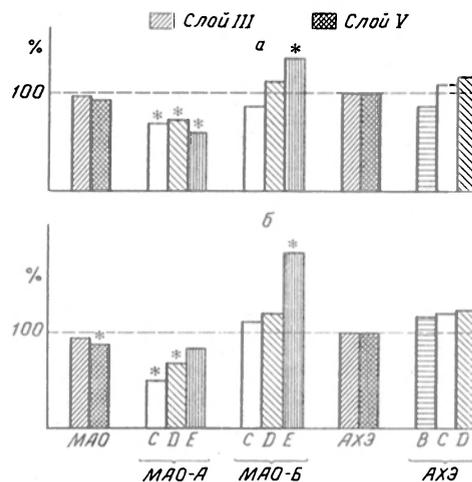


Рис. 1. Изменение активности MAO и АХЭ в субклеточных фракциях сенсомоторной коры через 30 мин (а) и 75 мин (б) после введения тафцина (в % к контролю).

Здесь и на рис. 2 и 3: В, С, D, E — соответственно субфракции синаптических мембран, легких, тяжелых синапсом, свободных митохондрий нейронов; звездочка — $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

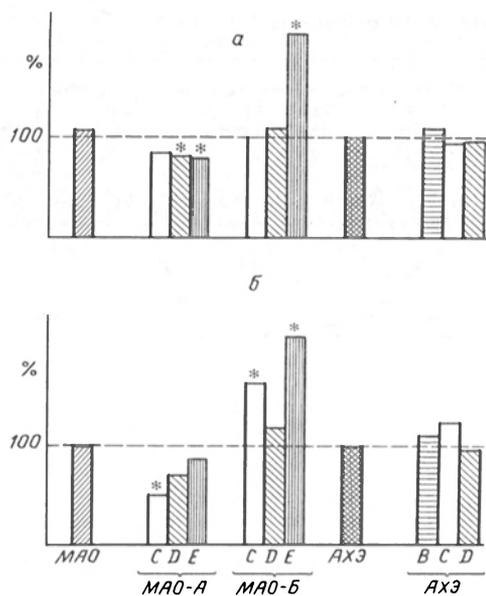


Рис. 2. Изменение активности MAO и АХЭ в субклеточных фракциях хвостатого ядра под действием тафцина через 30 мин (а) и 75 мин (б) (в % к контролю).

остается измененной. При этом в наибольшей степени в процесс вовлекаются субфракции «легких» синапсом и свободных митохондрий нейронов хвостатого ядра, в которых MAO типа Б возрастает на 68 и 116 %, а MAO типа А снижается на 50 и 21 % соответственно.

Во всех исследованных структурах на клеточном и субклеточном уровнях активность АХЭ достоверно не отличается от уровня контроля.

Одновременно с изменениями показателей обмена нейромедиаторов в нейронах исследованных образований двигательной системы изменяются и показатели обмена белков. Интерферометрически через 30 мин обнаружено достоверное увеличение содержания структурированных белков в цитоплазме тел нейронов сенсомоторной коры (слой III+40 % и V+36 %) и хвостатого ядра (+39 %). При этом отмечается и изменение активности ферментов, расщепляющих белковые молекулы с N-конца. Уровень активности аланинаминопептидазы, определяемой гистохимически, возрастает в сенсомоторной коре (слой III+27 % и слой V+30 %) и снижается в хвостатом ядре (-14 %) по сравнению с таковым в контроле. При субклеточном определении установлено снижение активности аминопептидазы в «легких» (на 50 %), «тяжелых» (на 40 %) синапсосамах и клеточных митохондриях (на 30 %). При субсинаптическом фракционировании наибольшее снижение отмечается в мембранах синапсом (на 60—70 %) (рис. 3).

Через 75 мин после введения тафцина содержание структурированных белков в нейронах исследованных образований оставалось достоверно повышенным. Гистохимически определяемая аланинаминопептидаза в коре достигала контрольных величин, а в хвостатом ядре оставалась сниженной. Некоторая нормализация уровня активности аминопептидазы отмечается в синапсосамах и их мембранах, но он не достигает контрольного уровня. При этом активность ее в субфракциях еще остается более низкой, чем

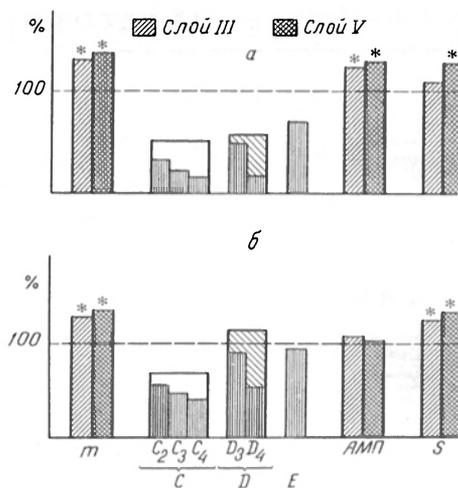


Рис. 3. Изменение содержания белка, активности аминопептидазы и размеров нейронов в структурах сенсомоторной коры через 30 мин (а) и 75 мин (б) после введения тафцина.

m — содержание белка, AMII — аминопептидаза, S — площадь нейронов. C₂, C₃, C₄ — субфракции мембран легких синапсом; D₃, D₄ — субфракции мембран тяжелых синапсом.

в синапсосамах. В клеточных митохондриях активность аминопептидазы достигает контрольного уровня.

Через 3 сут после однократного введения тафцина все исследуемые показатели практически нормализуются, за исключением активности MAO типа Б в субфракции клеточных митохондрий хвостатого ядра (-15 %). Это позволяет высказать предположение, что и в такой отдаленный срок еще сохраняется некоторая избирательная активация катехоламинергической системы на уровне субклеточных компонентов.

Анализ полученного экспериментального материала показал, что период действия тафцина, приводящий к изменению двигательной активности животных (до 30 мин), сопровождается активацией катехоламинергической и подавлением серотонинергической системы с одновременным изменением и показателей обмена белков. При этом сопоставление ответной реакции исследованных образований по изученным показателям позволяет высказать мнение о большей вовлеченности в этот процесс структур хвостатого ядра.

Исследование временной динамики действия тафцина показало отсутствие у него пролонгированного эффекта на обмен веществ в ЦНС в отличие от ранее изученного нами [7] синтетического аналога опиоидных пептидов тетрапептидамида (Tyr-D-Ala-Gly-Phe-NH₂), одна из физиологических фаз действия которого также связана с влиянием на двигательную систему.

Таким образом, полученные экспериментальные данные позволили выявить как общность, так и избирательность действия тафцина на структуры двигательной системы мозга, которые обусловлены, по нашему мнению, прежде всего различиями обмена веществ в морфофункциональных типах нейронов (эфферентные, ассоциативные, афферентные) и их субклеточных компонентах (синапсосомы, митохондрии, мембраны) на корково-подкорковом уровнях.

Эти экспериментальные данные подтверждают ранее высказанное нами положение о функцио-

нально обусловленной биохимической гетерогенности нейронов и их субклеточных компонентов как одной из возможных закономерностей биохимической организации мозга, которая проявляется при изменении функционального состояния ЦНС [13].

Основываясь на известных из литературы данных о способности тафцина регулировать и улучшать целенаправленное поведение животных, способствовать оптимизации их эмоциональной реактивности, можно сделать заключение, что эти физиологические проявления сопровождаются изменениями обмена нейромедиаторов и белков в исследованных нами структурах, связанных с двигательной активностью, и подтверждают представление о том, что механизм действия тафцина реализуется в первую очередь через дофаминергическую систему мозга.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адрианов О. С., Молодкина Л. П., Ямщикова Н. Г. Ассоциативные системы мозга и экстраполяционное поведение.— М., 1987.
2. Андреев С. О., Анохин К. В., Антонова Л. В. и др. // Докл. АН СССР.— 1980.— Т. 253, № 2.— С. 498—500.
3. Бродский В. Я. Трофика клетки.— М., 1966.
4. Вальдман А. В., Козловская М. М., Лшмарин И. П. и др. // Бюл. exper. биол.— 1981.— № 7.— С. 31—33.
5. Вальдман А. В., Бондаренко Н. А., Козловская М. М. и др. // Там же.— 1982.— № 4.— С. 49—52.
6. Герштейн Л. М. // Цитология.— 1965.— Т. 7, № 6.— С. 769—773.
7. Герштейн Л. М., Доведова Е. Л., Узбеков М. Г. и др. // Нейрохимия.— 1984.— Т. 3, № 3.— С. 236—237.
8. Горкин В. З., Веревкина И. В., Гриднева Л. И. и др. // Современные методы в биохимии.— М., 1968.— Т. 2.— С. 155.
9. Каменский А. А., Антонова Л. В., Самойлова Н. А. и др. // Бюл. exper. биол.— 1980.— № 7.— С. 43.
10. Козловская М. М., Клуша В. Е., Бондаренко Н. А. // Нейрохимические основы психотропного эффекта.— М., 1982.— С. 95—105.
11. Лаврецкая Э. Ф., Лшмарин И. П., Қалихевич В. П. и др. // Фармакол. и токсикол.— 1981.— № 3.— С. 275—279.
12. Пикигина Э. С., Сыгинский И. А. // Нейрохимия.— 1984.— Т. 3, № 3.— С. 276—279.
13. Пигарева Э. Д., Буснюк М. М., Герштейн Л. М., Доведова Е. Л. // Современные аспекты учения о локализации и организации церебральных функций.— М., 1980.— С. 103—120.
14. Glenner G. G., Burlner H. J., Brown G. W. // J. Histochem. Cytochem.— 1957.— Vol. 5, N 6.— P. 591—600.
15. Hestrin S. // J. biol. Chem.— 1949.— Vol. 180.— P. 249—261.
16. Karnovsky M. J., Roots L. A. // J. Histochem. Cytochem.— 1964.— Vol. 12, N 3.— P. 219—221.
17. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem.— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
18. Niedle A., Lajtha A. // Вопросы биохимии мозга.— Ереван, 1976.— С. 48—58.
19. Popov V., Rosler V., Thlemann C., Molthen H. // Acta biol. med. germ.— 1971.— Bd 26.— 239—245.
20. Robertis de E., Pellegrino de Hardi P. A., Rodrigues de Lopes Arnais R., Salganicoff L. J. // J. Neurochem.— 1962.— Vol. 9.— P. 23—25.

Поступила 05.10.89

EFFECT OF TUFTSIN ON SOME PATTERNS OF METABOLISM IN ANIMAL BRAIN LOCOMOTORY SYSTEM

L. M. Gershtein, E. L. Dovedova, A. S. Kamysheva, A. V. Sergulina, T. L. Chebotareva

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

Rates of synthesis and degradation of monoamines, acetyl choline and protein were distinctly altered in cortex-subcortex structures of the brain locomotory system after

a single administration of tetrapeptide tuftsин Thr-Lys-Pro-Arg during the period 15-30 min of its pronounced effect on the animal motor activity. Correlation between the functional and morphological alterations in cellular and subcellular brain structures, caused by the peptide administration, is discussed.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.61-008.64-036.12-085.356:577.161.22]-036.8-07:[612.017.1+612.015.31:546.41

И. Н. Сергеев, К. Д. Плещитый, Ф. И. Руснак, В. Б. Спиричев

ВЛИЯНИЕ 24,25-ДИГИДРОКСИВИТАМИНА D₃ (ДИОКСИВИТА) НА ОБМЕН Ca И ИММУННЫЙ СТАТУС ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Институт питания АМН СССР, Москва

Витамин D реализует свои функции в организме только после биоактивации в печени и почках с образованием гормонально-активной формы 1,25-дигидроксивитамина D₃ (1,25(OH)₂D₃). Механизм действия 1,25(OH)₂D₃ аналогичен таковому других стероидных гормонов, а рецепторы 1,25(OH)₂D₃ обнаружены в большинстве тканей [4, 8]. Этот гормон контролирует не только вне- и внутриклеточный обмен Ca, но и участвует (на генном уровне и/или модулируя сигналы Ca²⁺) в регуляции пролиферации и дифференцировки клеток, иммунного ответа, продукции и секреции гормонов [1, 4, 7].

В то же время у здорового человека в почках синтезируется преимущественно альтернативный метаболит — 24,25-дигидроксивитамин D₃ (24,25(OH)₂D₃) [8]. Интенсивное изучение его биологической активности и функционального значения продолжается более 10 лет, однако до конца этот вопрос неясен. В частности, до сих пор ряд исследователей придерживаются давнего предположения о том, что этот метаболит является продуктом инактивации витамина D и не выполняет каких-либо специфических функций [5]. В то же время показано [8], в том числе в нашей лаборатории [16], что 24,25(OH)₂D₃ обладает выраженной, но отличающейся от 1,25(OH)₂D₃ антирахитической активностью, а полная нормализация показателей обмена Ca и состояния костной ткани у лишенных витамина D животных происходит только после совместного введения 1,25(OH)₂D₃ и 24,25(OH)₂D₃. Кроме того, 24,25(OH)₂D₃, особенно в сочетании с 1,25(OH)₂D₃, высокоэффективен при профилактике и лечении ряда экспериментальных патологий (хроническая почечная недостаточность — ХПН, гипокинезия, гиперкортицизм, переломы костей, остеопороз после овариоэктомии и др.) [16].

В последние годы получены данные о возможном механизме действия 24,25(OH)₂D₃. Показано наличие специфических рецепторов этого метаболита в некоторых тканях, в первую очередь эмбриональных, изменение транскрипции генов и продукции белков (креатинкиназа) под действием 24,25(OH)₂D₃; установлено модулирующее действие 24,25(OH)₂D₃ на рецепторное связыва-

ние 1,25(OH)₂D₃ [увеличение концентрации рецепторов, но уменьшение положительной кооперативности при взаимодействии 1,25(OH)₂D₃ с рецепторами] [4, 6, 16]. Эти данные дают основание рассматривать 24,25(OH)₂D₃ как потенциальное лекарственное средство, которое может найти применение [отдельно и в сочетании с 1,25(OH)₂D₃] при состояниях, сопровождающихся нарушением обмена Са, а возможно, и при более широком круге заболеваний. Препарат 24R,25-дигидроксивитамин D₃, получивший коммерческое название «Диоксивит», синтезирован в НПО «Витамины» Минмедпрома СССР Н. А. Богословским и разрешен для клинических испытаний.

В этом сообщении представлены данные о результатах клинического применения диоксивита у детей с тубулоинтерстициальными заболеваниями почек и гломерулонефритом в стадии тотальной ХПН. Биохимическая оценка эффективности диоксивита проводилась по показателям, характеризующим обмен Са и его регуляцию, а также иммунный статус.

Методика. В апреле — мае 1988 г. обследовали 8 детей 7—12 лет с заболеваниями почек в стадии ХПН (6 детей с тубулоинтерстициальными заболеваниями почек и 2 — с хроническим гломерулонефритом), находившихся на лечении в отделении нефрологии НИИ педиатрии АМН СССР. Больные в период обследования не получали кортикостероиды, цитостатики, гепарин, препараты Са и витамина D, диуретики. В течение месячного курса лечения в стационаре пациентам назначали диоксивит в дозе 100 мкг (4000 МЕ) в день. Контрольную группу составили 11 практически здоровых детей того же возраста.

Для оценки состояния обмена Са и его регуляции у больных определяли концентрацию в сыворотке крови общего [3] и ионизированного (на анализаторе «Space-Stat 20», LKB Са, 25-гидроксивитамина D (25-OHD; методом радиокурентного белкового связывания наборами «Vitamin D-screening kit», Buhlmann Lab.), паратгормона (ПТГ; методом РИА наборами «Ria-mat PTH», Mallinckrodt Diagnostica) и остеокальцина (методом РИА наборами «OSTK-PR», CIS).

Иммунный статус оценивали по изменению популяционного состава лимфоцитов периферической крови [3]. Содержание Т- и В-лимфоцитов определяли путем совместного розеткообразования клеток лимфоцитарной фракции с эритроцитами барана и зимозаном. При этом также выявляли число D-лимфоцитов (клеток, экспрессирующих как рецепторы эритроцитов барана, так и зимозана) и 0-лимфоцитов (клеток, лишенных фенотипических характеристик Т- и В-лимфоцитов).

Поскольку в активированных *in vitro* лимфоцитах крови человека [12], а также, как было показано нами ранее [3, 13], в лимфоцитах больных гломерулонефритом обнаружены рецепторы 1,25(OH)₂D₃, измеряли концентрацию ре-

цепторов этого гормона в указанных клетках. Лимфоциты выделяли центрифугированием свежей гепаринизированной крови в фикал — верографине (1,077 г/мл), ресуспендировали в среде RPMI-1640 и немедленно использовали для оценки рецепторного связывания 1,25(OH)₂D₃. С этой целью к 200 мкл суспензии лимфоцитов (0,2 мг белка) добавляли 1,25(OH)₂ [26,27-³H] витамин D₃ в насыщающей концентрации 0,5 нМ + 500-кратный избыток немеченого 1,25(OH)₂D₃. Инкубацию проводили в пробирках из боросиликатного стекла при 37 °С и постоянном встряхивании в течение 45 мин. Затем пробы охлаждали 15 мин при 0—4 °С, дважды отмывали холодным раствором Хенкса. Клетки растворяли в тканевом солилизаторе и измеряли радиоактивность в жидкостном сцинтилляционном счетчике. Количество специфически связанного ³H-1,25(OH)₂D₃ рассчитывали по разности между общим неспецифическим связыванием, которое составляло 20—30 %.

Как показано нами ранее [3], специфическое связывание ³H-1,25(OH)₂D₃ фракцией мононуклеаров после удаления моноцитов достоверно не отличается от исходного.

Результаты и обсуждение. При обследовании детей с тубулоинтерстициальными болезнями почек и хроническим гломерулонефритом в стадии ХПН выявлены выраженные нарушения обмена Са и витамина D (табл. 1). Концентрация ионизированного Са в сыворотке крови этих детей была снижена на 12 %, а уровень ПТГ повышен в 8,6 раза. Концентрация 25-OHD, основного метаболита витамина D, у этих детей была ниже, чем у здоровых, на 42 %; концентрация остеокальцина, циркулирующего в крови белка и характеризующего уровень обмена костной ткани, повышена в 7,7 раза. Таким образом, у больных в стадии ХПН наблюдались характерные нарушения обмена Са, состояния костной ткани, содержания в крови кальцийрегулирующих гормонов — ПТГ и витамина D.

Иммунологические показатели у детей с ХПН также ухудшались (табл. 2). Это выражалось в снижении содержания Т-лимфоцитов в периферической крови и резком падении уровня 0-лимфоцитов, не несущих основных маркеров Т- и В-клеток. Уровень В- и D-лимфоцитов был в пределах нормы.

Концентрация рецепторов гормональной формы 1,25(OH)₂D₃ в лимфоцитах детей с тубулоинтерстициальными болезнями почек составила 3,92 ± ±0,76 фмоль на 1 мг белка, т. е. была несколько выше, чем в контроле (в 73 % случаев она составляла менее 1,5 фмоль/мг); у 2 детей с хроническим гломерулонефритом уровень рецепторов 1,25(OH)₂D₃ достигал 6,72 и 7,98 фмоль/мг. Эти данные согласуются с результатами наших предыдущих исследований, продемонстрировавших наличие рецепторов 1,25(OH)₂D₃ в лимфоцитах у больных гломерулонефритом [14]; одновременно они указывают на отсутствие достоверной

Т а б л и ц а 1

Показатели обмена кальция в сыворотке крови у детей с ХПН (M ± m)

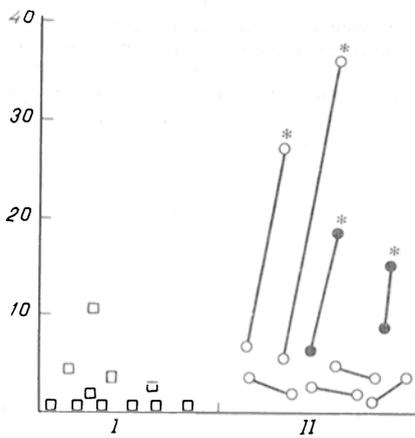
Показатель	Контрольная группа	Больные ХПН	
		до лечения	через 2--3 нед лечения
Са, ммоль/л	2,25 ± 0,03	2,20 ± 0,05	2,53 ± 0,12*,**
Са ²⁺ , ммоль/л	1,14 ± 0,01	1,01 ± 0,03*	1,22 ± 0,05**
ПТГ, нг/мл	0,18 ± 0,08	1,56 ± 0,37*	0,74 ± 0,23*
25-OHD, нг/мл	13,7 ± 1,9	8,0 ± 1,8*	30,8 ± 5,5*,**
Остеокальцин, нг/мл	3,10 ± 0,63	23,8 ± 3,1*	11,5 ± 0,5*,**

Примечание. Здесь и в табл. 2: одна звездочка — достоверные различия (p < 0,05) по сравнению с контролем, две звездочки — по сравнению с показателями до лечения.

Т а б л и ц а 2

Содержание Т-, В-, D и 0-лимфоцитов (в %) в периферической крови при ХПН (M ± m)

Лимфоциты	Контрольная группа	Больные ХПН	
		до лечения	через 2--3 нед лечения
T	51,0 ± 4,8	34,2 ± 3,6*	48,6 ± 4,2**
B	10,8 ± 1,3	10,1 ± 1,1	13,0 ± 1,1
D	1,2 ± 0,4	1,4 ± 0,4	1,0 ± 0,4
0	37,0 ± 5,4	54,3 ± 6,8*	37,4 ± 2,7**



Концентрация рецепторов 1,25(OH)₂D₃ (в фмоль/мл) в лимфоцитах в норме (I) и при ХПН (II).

Квадраты обозначают концентрацию рецепторов 1,25(OH)₂D₃ в лимфоцитах у детей контрольной группы, светлые кружки — у детей с тубулоинтерстициальными болезнями почек, заштрихованные — у детей с хроническим гломерулонефритом соответственно до и после лечения диоксивитом; звездочка — достоверные различия по сравнению с показателями до лечения.

экспрессии этих рецепторов при тубулоинтерстициальных заболеваниях почек.

Применение препарата активного метаболита витамина D₃ — 24,25(OH)₂D₃ (диоксивита) — в комплексной терапии ХПН оказывало выраженное нормализующее действие на показатели обмена Ca (см. табл. 1). В этом случае происходила полная нормализация концентрации общего и ионизированного Ca, достоверное снижение уровней ПТГ и остеокальцина в крови. Важно подчеркнуть, что применение достаточно высокой дозы 24,25(OH)₂D₃ не вызывало в отличие от 1,25(OH)₂D₃ [16] гиперкальциемии. При использовании диоксивита также наблюдался значительный рост концентрации 25-ОНD, уровень которого превысил значения контроля в 2,25 раза. Здесь необходимо отметить, что такое увеличение, очевидно, происходило за счет 24,25(OH)₂D₃, поскольку мы определяли 25-ОНD без предварительного выделения этого метаболита, а витамин-D-связывающий белок, используемый в наборах фирмы «Bulhmann», имеет высокую перекрестную реактивность с 24,25(OH)₂D₃ [по приблизительным расчетам введение детям 100 мкг 24,25(OH)₂D₃ в день может увеличить его концентрацию в крови до 20 нг/мл].

Концентрация рецепторов 1,25(OH)₂D₃ в лимфоцитах достоверно увеличивалась только у больных гломерулонефритом, при тубулоинтерстициальных болезнях почек повышение их концентрации наблюдалось в 33 % случаев (см. рисунок).

Под влиянием комплексной терапии с использованием диоксивита происходила полная нормализация иммунологических показателей: уровень Т-лимфоцитов в крови увеличивался практически до нормы, а число 0-клеток значительно снижалось, также достигая контрольных значений (см. табл. 2).

Таким образом, результаты исследования позволяют выделить два принципиальных аспекта применения диоксивита при ХПН: нормализующее действие на обмен Ca и иммунный статус.

При ХПН, особенно в терминальной стадии, синтез активных метаболитов витамина D₃ — 1,25(OH)₂D₃ и 24,25(OH)₂D₃ — в почках резко

снижен [8], очевидно, вследствие этого заместительная терапия диоксивитом является эффективной. Ведущее значение в нормализации кальциемии под воздействием 24,25(OH)₂D₃ принадлежит стимулированию всасывания Ca в кишечнике и отчасти снижению его экскреции с мочой без какого-либо усиления резорбции кости [9, 16].

Кроме того, при лечении экспериментальной ренальной остеодистрофии этот препарат увеличивает плотность, минеральную насыщенность костной ткани и в меньшей степени содержание в ней коллагена [16]. Наши данные также указывают на то, что препарат нормализует функцию остеобластов при ХПН, о чем свидетельствует снижение концентрации в крови маркерного белка этих клеток — остеокальцина [11]. Важно отметить, что 24,25(OH)₂D₃ не ухудшает функцию почек при ХПН (в наших исследованиях клиренс креатинина у больных детей при лечении диоксивитом даже несколько возрастал — с 35,8 ± 9,2 до 5,9 ± 16,3 мл/мин).

Отдельного упоминания заслуживает факт снижения концентрации ПТГ в крови у больных с ХПН под воздействием диоксивита. Это может быть опосредовано не только нормализацией концентрации Ca, но и взаимодействием 24,25(OH)₂D₃ с паратиреоцитами, в которых показано рецепторное связывание этого метаболита [4].

Отсутствие значимых изменений концентрации рецепторов 1,25(OH)₂D₃ в лимфоцитах в результате применения диоксивита позволяет предположить, что эффект 24,25(OH)₂D₃, по крайней мере при тубулоинтерстициальных болезнях почек, реализуется не на уровне его взаимодействия с рецепторами гормональной формы 1,25(OH)₂D₃. Диоксивит не индуцирует увеличения концентрации рецепторов 1,25(OH)₂D₃ при ХПН, хотя в опытах *in vitro* показано стимулирующее действие 24,25(OH)₂D₃ в высоких концентрациях на уровень рецепторов 1,25(OH)₂D₃ в культуре фибробластов [6]. По-видимому, эти эффекты не реализуются *in vitro* при использованной нами дозе диоксивита или, что более вероятно, неактивированные при тубулоинтерстициальных болезнях почек лимфоциты не отвечают на действие этого метаболита.

При анализе механизмов, лежащих в основе иммунорегуляторного действия диоксивита, следует обратиться к полученным нами ранее данным о влиянии на иммунный статус больных гломерулонефритом оксидевиата — препарата, превращающегося в организме в 1,25(OH)₂D₃ [3]. Оксидевит, как и в данном наблюдении диоксивит, полностью нормализовал иммунный статус у детей с гломерулонефритом, что коррелировало с нормализацией D-витаминной обеспеченности организма и было связано, по нашим предположениям, с восстановлением способности лимфоцитов продуцировать иммунорегуляторный цитокин интерлейкин-2, ослабление чего имеет место при дефиците витамина D [2]. Вероятно, в данном случае диоксивит также опосредует свои эффекты через нормализацию обеспеченности витамином D.

Интересно отметить, что введение 24,25(OH)₂D₃ ускоряет метаболический клиренс 1,25(OH)₂D₃ и подавляет его синтез в почках у крыс с гипо-

кальциемией [10]. Если такая же ситуация имеет место при ХПН, то следует допустить возможность специфической реализации эффектов 24,25(OH)₂D₃. В то же время следует учитывать то обстоятельство, что 24,25(OH)₂D₃ превращается в организме, в том числе в результате экстраренального синтеза, в 1,24,25(OH)₂D₃, который имеет сродство к рецепторам 1,25(OH)₂D₃, только в несколько раз ниже, чем сам гормон [4].

Таким образом, полученные нами данные демонстрируют высокую эффективность активного метаболита витамина D — диоксивита — в лечении нарушений обмена Ca и иммунитета при заболеваниях почек в стадии ХПН, обусловленную, очевидно, специфическим кальцитропным действием препарата и коррекцией дефицита витамина D.

ЛИТЕРАТУРА

1. Плецитый К. Д. // *Вопр. мед. химии.*— 1988.— № 5.— С. 9—14.
2. Сергеев И. Н., Плецитый К. Д., Руснак Ф. И., Спиричев В. Б. // *Вопр. питания.*— 1989.— № 6.
3. Сергеев И. Н., Плецитый К. Д., Руснак Ф. И., Спиричев В. Б. // *Вопр. мед. химии.*— 1989.— № 6.— С. 117—121.
4. Сергеев И. Н. // Там же.— № 1.— С. 2—11.
5. Brommage R., DeLuca H. F. // *Endocr. Rev.*— 1986.— Vol. 6.— P. 491—511.
6. Costa E., Hirst M. A., Feldman D. // *Endocrinology.*— 1985.— Vol. 117.— P. 2203—2210.
7. Haussler M. R. // *Ibid.*— 1986.— Vol. 6.— P. 527—562.
8. Henry H. L., Norman A. W. // *Ann. Rev. Nutr.*— 1984.— Vol. 4.— P. 493—520.
9. Kanis J. A., Cundy T., Bartlett M. et al. // *Brit. med. J.*— 1978.— Vol. 1.— P. 1382—1386.
10. Matsumoto T., Ikeda K., Yamamoto H. et al. // *Biochem. J.*— 1988.— Vol. 250.— P. 671—677.
11. Price P. A. // *Triangle.*— 1988.— Vol. 27.— P. 21—26.
12. Rigby W. // *Vitamin D: Molecular, Cellular and Clinical Endocrinology* / Eds. A. W. Norman et al.— Berlin, 1988.— P. 276—281.
13. Sergeev I. N., Novikov P. V., Rusnak F. I., Spirichev V. B. // *International Symposium "Calcium 89"*, 2nd: Abstracts.— Prague, 1989.— P. 110.
14. Sergeev I. N., Pletsitiiy K. D., Rusnak F. I. et al. // *International Congress of IPNA.*— Toronto, 1989.— P. 1099.
15. Somjen D., Earon J., Harell S. et al. // *J. Steroid Biochem.*— 1987.— Vol. 27.— P. 807—813.
16. Spirichev V. B., Sergeev I. N. // *Wld Rev. Nutr. Diet.*— 1988.— Vol. 56.— P. 173—216.

Поступила 31.10.89

EFFECT OF 24,25(OH)₂D₃ (DIOXYVIT) ON CALCIUM METABOLISM AND THE IMMUNITY STATUS IN CHRONIC KIDNEY INSUFFICIENCY

I. N. Sergeev, K. D. Plecity, F. I. Rusnak, V. B. Spirichev
Institute of Nutrition, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Active metabolite of vitamin D₃, 24R,25(OH)₂D₃ (dioxyvit) was used at a daily dose of 100 µg in treatment of children affected with tubulointerstitial disease of kidney and with chronic glomerulonephritis under conditions of kidney insufficiency. The drug exhibited distinct normalizing effect on patterns of calcium metabolism: increase of total and ionized Ca²⁺ and of 25-OHD, decrease in concentration of parath hormone and osteocalcine in blood serum as well as on immunological parameters: restoration of decreased content of T- and 0-lymphocytes. Concentration of receptors of hormonal form of 1,25(OH)₂D₃ was found to be minimal in lymphocytes under conditions of chronic kidney insufficiency, while their expression, after the dioxyvit action, was detected only in patients with glomerulonephritis. Specific calcitropic effect of dioxyvit with simultaneous correction of vitamin D deficiency were apparently responsible for high efficacy of the drug in treatment of calcium metabolism and immunity impairments in children with renal deteriorations at the step of chronic kidney insufficiency.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.379-008.64-07:616.155.25-008.1

Ю. Ю. Чирков, И. А. Тыщук, И. С. Северина,
Л. К. Старосельцева

АДФ-ИНДУЦИРУЕМАЯ АГРЕГАЦИЯ ТРОМБОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

НИИ медицинской энзимологии АМН СССР, Институт экспериментальной эндокринологии и химии гормонов АМН СССР, Москва

При сахарном диабете обычно отмечается повышенная способность тромбоцитов к агрегации, что является одной из основных причин развития диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС-синдром) и возникновения диабетических ангиопатий [2, 6, 8, 11]. Процесс агрегации — дезагрегации тромбоцитов находится под контролем системы циклических нуклеотидов — цАМФ и цГМФ [9, 10]. Предполагается, что избыточная агрегация является сигналом для внутритромбоцитарной системы цГМФ к подавлению агрегации [7, 9, 10], однако механизм подобной регуляции изучен еще недостаточно.

Ранее мы показали, что активность тромбоцитарной гуанилатциклазы и ее способность к активации понижены при сахарном диабете, особенно при II типе этого заболевания [3]. В настоящей работе мы предприняли попытку сравнительного изучения агрегационной способности тромбоцитов здоровых людей и больных сахарным диабетом I и II типа. В качестве индуктора агрегации мы применяли АДФ, поскольку это позволяет вычленить обратимую фазу агрегации [1, 4, 5, 11], на которой мы и сконцентрировали наше внимание.

Методика. Обследованы 12 больных обоего пола с нормальной массой тела в возрасте от 20 до 45 лет, I и II типа сахарного диабета (соответственно 7 и 5 человек) с различной длительностью заболевания в стадии компенсации. Контрольную группу (7 человек) составляли здоровые люди обоего пола в возрасте от 20 до 45 лет.

У всех обследуемых кровь брали натощак из локтевой вены в количестве 10 мл; в качестве антикоагулянта использовали 3,8 % трехзамещенный цитрат натрия (рН 7,4) в соотношении с кровью 1:10 по объему. Кровь центрифугировали 10 мин при 450 g и полученную плазму, богатую тромбоцитами, разводили бестромбоцитной плазмой до необходимого уровня содержания тромбоцитов. Бестромбоцитную плазму получали после центрифугирования богатой тромбоцитами плазмы в течение 30 мин при 650 g.

Агрегацию тромбоцитов индуцировали добавлением к 1 мл плазмы 25 мкл раствора АДФ в 0,9 % NaCl. О протекании процесса агрегации судили по увеличению коэффициента пропускания (при зеленом свете, 540 нм) в исследуемой плазме при постоянном ее перемешивании (1000 об/мин). [4]. Для фотометрии использовали двухлучевой фотозлектроколориметр ФЭК-56М, соединенный с самописцем КСП-4. В качестве образца сравнения использовали бестромбоцитную плазму, ее коэффициент пропускания принимали за уровень 100 % агрегации.

Результаты и обсуждение. Проводимое нами исследование связано с изучением роли системы цГМФ в регуляции процессов агрегации и дезагрегации тромбоцитов, поэтому наибольший интерес для нас представляла обратимая агрегация, т. е. агрегация, сопро-

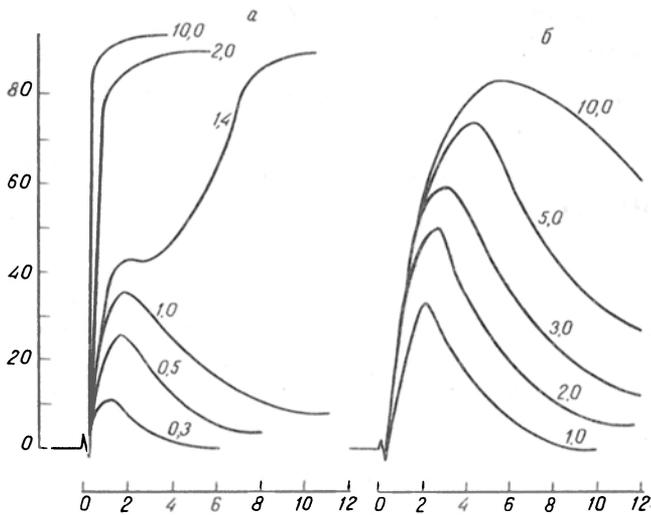


Рис. 1. АДФ-индуцируемая агрегация в плазме, содержащей $4,5 \cdot 10^8$ (а) и $2,5 \cdot 10^8$ (б) тромбоцитов в 1 мл.

По осям абсцисс — время после добавления АДФ, мин; по оси ординат — степень агрегации тромбоцитов, %. Конечные концентрации АДФ (в мкМ) указаны возле соответствующих агрегатограмм.

обладающая дезагрегацией и возвращением тромбоцитов в исходное состояние. Наблюдать обратимую агрегацию *in vitro* можно при использовании АДФ в качестве индуктора агрегации. Агрегация тромбоцитов человека под действием АДФ может быть как обратимой, так и необратимой. Это зависит от концентрации АДФ и от степени обогащенности плазмы тромбоцитами [6, 11]. В экспериментах с плазмой от здоровых доноров, содержащей в 1 мл $4,5 \cdot 10^8$ тромбоцитов (рис. 1, а), было установлено, что добавление АДФ до конечных концентраций 0,3–1 мкМ вызывает обратимую агрегацию; степень агрегации не превосходила 35 %. При более высоких концентрациях АДФ проявлялась необратимая агрегация.

Известно, что необратимая фаза АДФ-индуцируемой агрегации обусловлена комплексом эндогенных факторов, экскретируемых из тромбоцитов в процессе реакции высвобождения [1, 5, 11]. Очевидно, что концентрация этих факторов в исследуемой плазме зависит от содержания в ней тромбоцитов. При разбавлении богатой тромбоцитами плазмы бестромбоцитной плазмой можно ожидать ослабления проявления необратимой фазы агрегации при сохранении обратимой. Действительно, в экспериментах с разбавленной плазмой ($2,5 \cdot 10^8$ тромбоцитов/мл) мы обнаружили, что АДФ в концентрациях до 10 мкМ включительно вызывает только обратимую агрегацию; агрегация всегда сопровождалась дезагрегацией (рис. 1, б). Степень агрегации была пропорциональна используемой концентрации АДФ и достигала 85–90 %.

Таким образом, использование разбавленной плазмы ($2,5 \cdot 10^8$ тромбоцитов/мл) дало нам возможность изучать обратимую агрегацию в широком диапазоне концентраций АДФ и оперировать более высокими значениями степени агрегации.

Если максимальные значения агрегации, определяемые для каждой агрегатограммы (рис. 1, б), соотносить с использованной концентрацией АДФ, то можно построить концентрационную зависи-

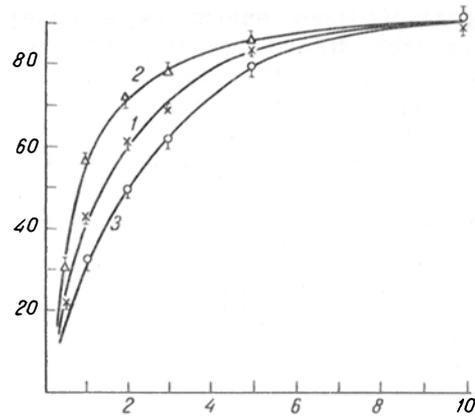


Рис. 2. Степень АДФ-индуцируемой агрегации тромбоцитов здоровых людей (V_3) и больных сахарным диабетом I и II типа (соответственно 1 и 2) при различных концентрациях АДФ.

По оси абсцисс — конечная концентрация АДФ, мкМ; по оси ординат — степень агрегации тромбоцитов, %.

мость, выражающую способность тромбоцитов к АДФ-агрегации. Такая зависимость представлена на рис. 2 (кривая 3), на котором представлены результаты, полученные при использовании плазмы от 7 доноров; следует отметить высокую повторяемость результатов в независимых экспериментах. Достижение 50 % уровня агрегации тромбоцитов доноров наблюдалось после применения 2–2,1 мкМ АДФ. Тромбоциты больных сахарным диабетом проявляли более высокую способность к АДФ-агрегации (см. рис. 2). В этих экспериментах содержание тромбоцитов в плазме также доводили до $2,5 \cdot 10^8$ в 1 мл, что обеспечивало регистрацию обратимой агрегации в интервале концентраций АДФ до 0,5 до 10 мкМ.

50 % агрегация тромбоцитов в плазме, полученной от больных сахарным диабетом I типа, наблюдалась при использовании 1,3 мкМ АДФ, а в плазме от больных сахарным диабетом II типа при 0,9 мкМ АДФ. Концентрационные кривые, характеризующие свойства тромбоцитов больных сахарным диабетом I и II типа, достоверно отличаются от таковых в норме и достоверно различаются между собой. Наиболее выражено эти различия проявляются в интервале концентраций АДФ от 1 до 3 мкМ ($p < 0,01$). В расчете на 50 % уровень агрегации тромбоциты больных сахарным диабетом I и II типа в 1,6 и 2,23 раза соответственно более чувствительны к действию АДФ, чем тромбоциты здоровых людей.

Повышенная способность к агрегации *in vitro* у тромбоцитов крови больных сахарным диабетом отмечалась ранее [6, 8], однако эти наблюдения были основаны на регистрации необратимой агрегации в плазме, содержащей $4 \cdot 10^8$ тромбоцитов/мл. Изучение обратимой агрегации в разбавленной плазме является, по нашему мнению, более информативным подходом, поскольку при этом проявляется способность тромбоцитов не только к агрегации, но и к дезагрегации. Такой подход позволил нам выявить различия в агрегационной активности тромбоцитов больных сахарным диабетом I и II типа.

Ранее мы показали [3], что активность тромбоцитной гуанилатциклазы и ее стимулирует

мость нитропруссидом натрия снижены при сахарном диабете; отклонения от нормы были более выражены при II типе этого заболевания, чем при I типе. Сопоставление способности тромбоцитов к агрегации с функциональными свойствами гуанилатциклазы позволяет предположить, что уменьшение активности и стимулируемости тромбоцитарной гуанилатциклазы при сахарном диабете затрудняет контроль системы цГМФ над процессом агрегации. Это может обусловить гиперагрегацию тромбоцитов и соответственно развитие ДВС-синдрома и диабетических ангиопатий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гаврилов О. К., Козинец Г. И., Черняк Н. Б. Клетки костного мозга и периферической крови.— М., 1985.
2. Диагностика и патогенетическая терапия диабетических ангиопатий / Ефимов А. С., Зубкова С. Т., Данилова А. И. и др.— Киев, 1986.
3. Чирков Ю. Ю., Тыщук И. А., Северина И. С., Старосельцева Л. К. // Бюл. экспер. биол.— 1989.— № 3.— С. 342—345.
4. Born G. V. R. // Nature.— 1962.— Vol. 194.— P. 927—929.
5. Born G. V. R. // Circulation.— 1985.— Vol. 72.— P. 741—746.
6. Colwell I. A., Halushka P. V., Sarji K. E., Sagel I. // Med. Clin. N. Amer.— 1978.— Vol. 62.— P. 753—766.
7. Karrenbrock B., Grewé R., Loeschke K., Gerzer R. // Path. Biol.— 1987.— Vol. 35.— P. 251—254.
8. Kwann H. C., Colwell I. A., Cruz S. et al. // J. Lab. clin. Med.— 1972.— Vol. 80.— P. 236—246.
9. Mellion B. T., Ignarro L. J., Ohlstein E. H. et al. // Blood.— 1981.— Vol. 57.— P. 946—955.
10. Nishikawa M., Kanamori M., Hidaka H. // J. Pharmacol. exp. Ther.— 1982.— Vol. 220.— P. 183—190.
11. Schafer A. I., Handin R. I. // Progr. cardiovasc. Dis.— 1979.— Vol. 22.— P. 31—52.

Поступила 05.10.89

ADP-INDUCED AGGREGATION OF HUMAN THROMBOCYTES IN DIABETES MELLITUS

Yu. Yu. Chirkov, I. A. Tyschuk, I. S. Severina, L. K. Starosel'tseva

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

Dilution of thrombocyte-rich blood plasma (down to $2.5 \cdot 10^8$ thrombocytes/ml) enabled to avoid an irreversible phase of the ADP-induced thrombocyte aggregation; the reversible phase of aggregation was followed by deaggregation. The reversible aggregation of thrombocytes was studied in healthy persons and patients with diabetes mellitus within wide ranges of ADP concentrations (including $10 \mu\text{M}$) using the diluted blood plasma. Thrombocytes of the patients with diabetes mellitus of the I and II types were found to be 1.6- and 2.33-fold more sensitive to the ADP aggregating effect as compared with thrombocytes of healthy persons. The elevated rate of thrombocytes aggregation in diabetes mellitus appears to be related to early decrease in activity of thrombocyte guanylate cyclase and to its ability to be activated.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 612.616.2.015.348

А. А. Николаев, Н. И. Аншакова, С. А. Алтухов

ОБРАЗОВАНИЕ ИНТЕРПОЛИМЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ БЕЛКАМИ СЕМЕННОЙ ПЛАЗМЫ ЧЕЛОВЕКА

Медицинский институт, Астрахань

Известно, что многие так называемые растворимые белки способны существовать в виде комплексов с мембранами, элементами цитоскелета, рибосомами, а также в виде надмолекулярных белковых комплексов [5, 6, 9].

В нашей работе были исследованы полимерные эффекты трех белков семенной плазмы — простатической кислой фосфатазы, простатического бета-глобулина и лактоферрина.

Методика. Препараты лактоферрина, кислой фосфатазы и простатического бета-глобулина получали из семенной плазмы человека ранее описанными способами [2, 3, 8]. В работе использованы агароза I (LKB, Швеция), сефадексы G-75, G-100, ДЭАЭ-сефадекс А-50, СМ-сефадекс С-50 («Pharmacia», Швеция), гепарин, декстран-сульфат, гиалуронид Na («Serva», ФРГ), поли (Lys)₁₆ («Sigma», США), протамина сульфат, желатин («Srofa», ЧССР), альбумин человека («Reanal», ВНР), гемоглобин лошади («Serva», ФРГ).

Иммуноэлектрофорез и двухмерный иммуноэлектрофорез проводили по общепринятым методикам [1]. Получение иммунных сывороток к изучаемым белкам осуществляли путем иммунизации кроликов очищенными препаратами соответствующих антигенов.

Результаты и обсуждение. Методом регистрации образования комплексов белков с полимерами и другими эффекторами нами был избран иммуноэлектрофорез. В качестве эффекторов выбраны полисахариды (гепарин, декстран-сульфат, гиалуроновая кислота), а также белки, полиаминокислоты и амины (альбумин человека, гемоглобин лошади, протамин, желатин, иолилизин-16, спермидин).

Как было показано ранее [5, 6], зависимость изменений свойств белка от концентрации

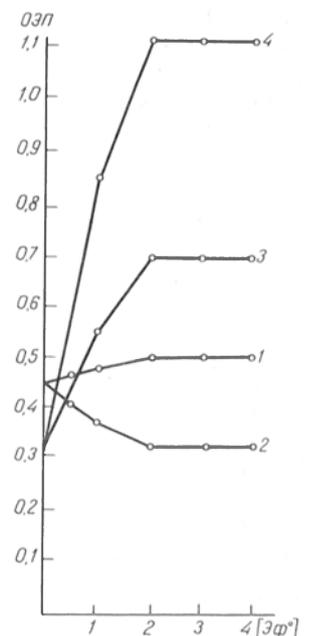


Рис. 1. Изменение относительной электрофоретической подвижности (ОЭП) белков семенной плазмы в зависимости от концентрации эффекторов.

1 — смесь простатического бета-глобулина (ПБГ) и нарастающих концентраций гепарина; 2 — смесь ПБГ и нарастающих концентраций декстран-сульфата; 3 — смесь лактоферрина и нарастающих концентраций гепарина; 4 — смесь лактоферрина и нарастающих концентраций декстран-сульфата. За 1 принята электрофоретическая подвижность альбумина человека (здесь и на рис. 2).

Изменение электрофоретической подвижности белков семенной плазмы в зависимости от природы полимерного эффектора

Эффектор	Электрофоретическая подвижность		
	лактоферрина	простатического бета-глобулина	кислой фосфатазы
Гепарин (2 %)	2,12±0,04	1,12±0,03	1,0±0,01
Декстран-сульфат (2 %)	3,75±0,06	0,7±0,04	0,95±0,02
Гиалуроновая кислота (2 %)	1,58±0,03	1,0±0,03	1,00±0,02
Поли (Lys) ₁₆ (0,25 М)	0,41±0,05	0,64±0,02	1,00±0,03
Спермидин (0,2 М)	0,8±0,03	0,71±0,03	0,95±0,02
Протамина-сульфат	0,33±0,04	0,76±0,02	0,87±0,04
Желатин	1,0±0,02	0,82±0,03	0,95±0,03
Альбумин человека	1,3±0,04	1,05±0,05	1,0±0,01
Гемоглобин лошади	1,2±0,05	1,00±0,03	1,0±0,01

Примечание. За 1 принята электрофоретическая подвижность очищенного препарата соответствующего белка в веронал-медианоловом буфере (рН 8,6).

полимерных эффекторов характеризуется кривыми с насыщением, что наблюдали и мы (рис. 1). В последующих экспериментах использовали насыщающие концентрации всех эффекторов.

Изменение электрофоретической подвижности белков семенной плазмы зависит от характера эффекторов и природы белка (см. таблицу). Сочетание лактоферрина с гепарином увеличивает электрофоретическую подвижность лактоферрина более чем в 2 раза, а кислая фосфатаза не реагирует изменением электрофоретической подвижности на добавление гепарина. Комплекс лактоферрина с декстран-сульфатом обладает резкой анодной подвижностью, почти в 4 раза превышающей подвижность лактоферрина, но комплекс простатического бета-глобулина с декстран-сульфатом движется медленнее чистого простатического бета-глобулина. Гиалуроновая кислота изменяет подвижность только лактоферрина, но эффект ее выражен значительно слабее, чем декстран-сульфата или гепарина.

Лактоферрин человека является железосодержащим белком [3]. Представляло интерес выяснить зависимость полимерных эффектов от присутствия в молекуле лактоферрина ионов железа. Аполактоферрин получали диализом раствора лактоферрина против 0,1 М раствора цитрата натрия. На рис. 2 представлены данные иммуноэлектрофореза аполактоферрина и лактоферрина в условиях сочетания с гепарином и

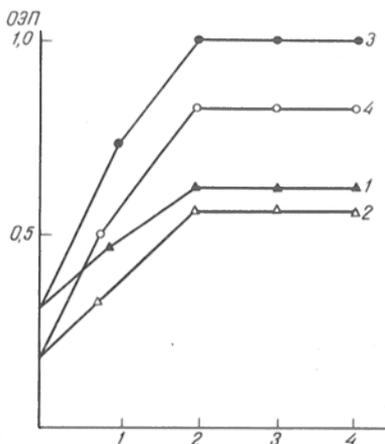


Рис. 2. Изменение ОЭП лактоферрина и аполактоферрина в присутствии полимеров.

1 и 3 — электрофоретическая подвижность лактоферрина в присутствии гепарина и декстран-сульфата соответственно; 2 и 4 — электрофоретическая подвижность аполактоферрина в присутствии гепарина и декстран-сульфата соответственно.

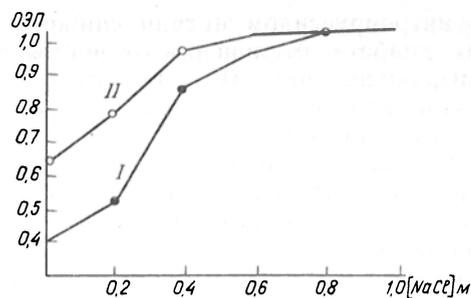


Рис. 3. Влияние ионной силы растворов на проявление интерполимерных эффекторов.

I — изменение ОЭП лактоферрина; II — изменение ОЭП простатического бета-глобулина. За 1 принята исходная электрофоретическая подвижность препаратов лактоферрина и простатического бета-глобулина без эффектора полилизина-16 (0,25 М).

декстран-сульфатом. Видно, что электрофоретическая подвижность молекулы аполактоферрина ниже, чем при насыщении ее железом, но полимерные эффекты не зависят от присутствия ионов железа, так как электрофоретическая подвижность белка изменяется в обоих случаях пропорционально исходной.

Известно [6], что полимерные эффекты обусловлены ионными и гидрофобными взаимодействиями. Нами исследовано влияние ионной силы и детергентов на электрофоретическую подвижность лактоферрина в присутствии гепарина. Отмечено отсутствие зависимости подвижности комплекса гепарин — лактоферрин от ионной силы раствора (до 1 М хлорида натрия) и присутствия тритона X-100 (0,3 %).

На рис. 3 показана зависимость изменения электрофоретической подвижности комплекса лак-

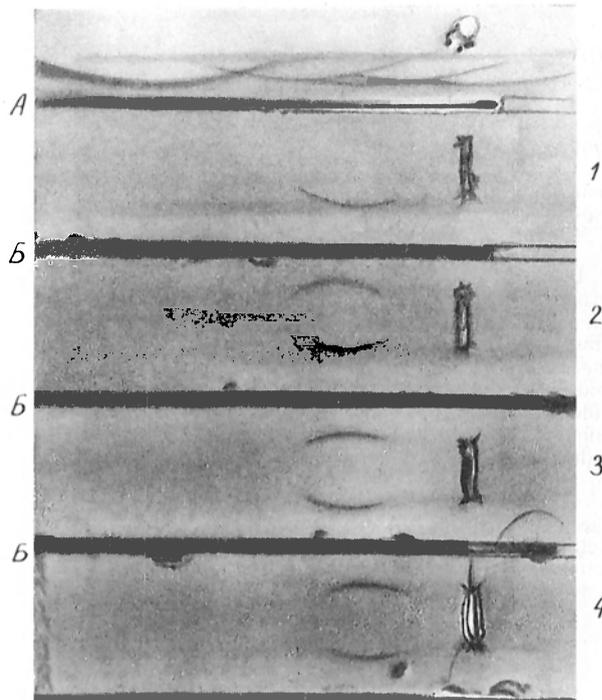


Рис. 4. Интерполимерные эффекты при взаимодействии с белками.

Иммуноэлектрофорез в 1 % агарозе (рН 8,6). 1 — препарат лактоферрина; 2 — раствор лактоферрина, содержащий 0,5 % альбумина человека; 3 — раствор лактоферрина, содержащий 0,5 % гемоглобина лошади; 4 — раствор лактоферрина, содержащий 0,5 % альбумина человека и 0,2 % тритона X-100; А — антисыворотка к белкам сыворотки крови человека; Б — антисыворотка к лактоферрину.

тоферрин --- полилизин-16 от ионной силы раствора. Те же электростатические взаимодействия определяют и характер комплексообразования лактоферрина и простатического бета-глобулина с протамином сульфатом.

Присутствие в смеси 0,21 % тритона X-100 снимает эффекторное действие альбумина человека (рис. 4), гемоглобина лошади и желатина. Лактоферрин и простатический бета-глобулин обладают высокой гидрофобностью, а кислая фосфатаза, напротив, гидрофильна [8]. Соответственно лактоферрин и простатический бета-глобулин способны образовывать комплексы с молекулами белка, имеющими гидрофобные участки. Образование комплексов кислой фосфатазы с биополимерами на основе гидрофобных связей нами не обнаружено (см. таблицу). Изменение электрофоретической подвижности этого белка происходит только в присутствии протамина.

Известно [7, 10], что реализация функции оплодотворения сопряжена с рядом биохимических процессов, происходящих в семенной плазме (рис. 5). Очевидно, образование комплек-

сов белков с полиэлектролитами (в частности, полиаминами) в физиологических условиях может способствовать проявлению таких функциональных характеристик, которые не регистрируются на очищенных препаратах белков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иммунологические методы / Под ред. Х. Фримеля: Пер. с нем.— М., 1979.— С. 9—37.
2. Николаев А. А. // Изобретательство и рационализация в медицине.— М., 1980.
3. Николаев А. А., Аншаклова Н. И. // Вопр. мед. химии.— 1985.— № 3.— С. 128—132.
4. Сугрובה Н. П., Ерохина Т. Б., Чебогарева Н. А. и др. // Молекул. биол.— 1985.— Т. 13, № 2.— С. 430—435.
5. Цыганков А. Ю., Гладиллин К. П. // Биоорг. химия.— 1985.— Т. 11, № 4.— С. 471—478.
6. Цыганков А. Ю., Мотерин Ю. А., Добрушкин А. Е. и др. // Биохимия.— 1986.— Т. 51, № 4.— С. 590—595.
7. Bruno V., Francovilla S., Properzi G. et al. // Andrologia.— 1986.— Vol. 18, N 6.— P. 595—600.
8. Choe B. K., Pontes E., McDonald J., Rose H. // Preparat. Biochem.— 1978.— Vol. 8, N 1.— P. 73—79.
9. Fridrich P. // Supramolecular Enzyme Organization.— Oxford, 1984.— P. 300.
10. Molnar J. // Allgemeine Spermatologie.— Budapest, 1969.— S. 40—119.

Поступила 05.10.89

FORMATION OF INTERPOLYMERIC COMPLEXES CONTAINING HUMAN SEMINAL AND BLOOD PLASMA PROTEINS

A. A. Nikolaev, N. I. Anshakova, S. A. Altukhov

Medical School, Astrakhan

Formation of interpolymeric complexes was studied involving human lactoferrin, prostate β -globulin, specific acid phosphatase and polymers of various nature: polysaccharides — heparin, dextran sulfate; polylysine-16; proteins — human albumin, equine hemoglobin, gelatin, protamine. Immunoelectrophoresis proved to be a sensitive procedure to register the interpolymeric complexes formed. Electrophoretic mobility of lactoferrin and prostatic β -globulin was most distinctly altered. Mechanisms of the complexes formation, including ionic and hydrophobic interactions, are discussed.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.12-009.72-021.3+616.12-036.12]-07:616.153.915+616.155.25-008.939.15

Л. А. Суворова, А. Б. Королев, С. В. Шалаев, Н. В. Перова

ЛИПИДЫ ПЛАЗМЫ КРОВИ И ТРОМБОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ С ВПЕРВЫЕ ВОЗНИКШЕЙ СТЕНОКАРДИЕЙ И ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА

Всесоюзный научно-исследовательский центр профилактической медицины Минздрава СССР, Москва

Функциональные свойства клеток, в частности тромбоцитов, определяются во многом структурой их плазматической мембраны, основными липидными компонентами которой являются холестерин (ХС) и фосфолипиды (ФЛ). Поэтому все большее внимание уделяется изучению роли липидов в свойствах мембран и изысканию пути к направленному изменению их состава [2].

В тромбоцитах ФЛ синтезируются *de novo*, но могут также образовываться через деацелирование — реацилирование лизоФЛ [8, 14]. ФЛ внешнего поверхностного слоя мембраны клеток

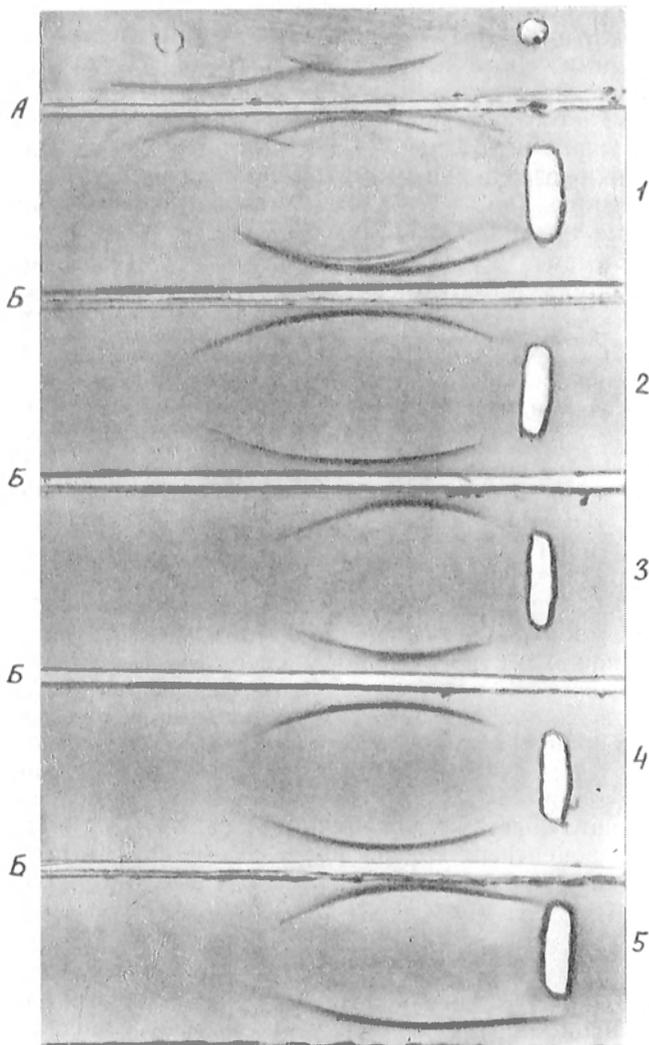


Рис. 5. Изменение электрофоретической подвижности простатического бета-глобулина в присутствии различных эффекторов.

1 — семенная плазма; 2 — раствор ПБГ, содержащий 2 % гепарина; 3 — препарат ПБГ, содержащий 2 % декстран-сульфата; 4 — препарат ПБГ без эффекторов; 5 — препарат ПБГ, содержащий 1 % протамина сульфата; А — антисыворотка к белкам сыворотки крови человека; В — антисыворотка к семенной плазме человека.

способны обмениваться с ФЛ липопротеидов (ЛП) плазмы крови; данный процесс энергетически независим и протекает медленно [12]: за 12 ч обменивается 9 % фосфатидилхолина и 4 % сфингомиелина. Основная часть фосфолипидного пула обновляется за счет ФЛ ЛП плазмы крови, что имеет важное значение в восстановлении фосфолипидного состава клеток [12]. Тромбоциты не синтезируют ХС и изменения в содержании его обусловлены обменом с ХС ЛП плазмы крови [10, 17]. ЛП низкой и очень низкой плотности (ЛПНП и ЛПОНП) осуществляют приток ХС в клетки, а ЛП высокой плотности (ЛПВП) акцентируют ХС с клеточных мембран и переносят его в печень для дальнейшего катаболизма [13, 15]. Таким образом, несмотря на синтез ФЛ в тромбоцитах, фосфолипидный состав и изменения содержания ХС плазматической мембраны связаны с составом ЛП плазмы крови. Нарушение спектра ЛП в плазме крови является одним из факторов, способствующих развитию атеросклероза и ишемической болезни сердца (ИБС).

Целью настоящей работы было изучение соотношений концентрации и состава липидов плазмы крови с клеточными липидами на примере тромбоцитов у больных ИБС с документированным ангиографически коронарным атеросклерозом в разные периоды развития заболевания.

Методика. Исследование проведено на 35 мужчинах 32–56 лет (средний возраст 43 года). Из них 1-ю (контрольную) группу составили 10 человек без признаков ИБС и стенозирующего коронарного атеросклероза; все больные страдали стабильной стенокардией напряжения (с документированным ангиографически коронарным атеросклерозом). Во 2-ю группу вошли 10 пациентов, страдающих хронической ИБС (ХИБС). Еще 2 группы составили больные в раннем периоде клинических проявлений ИБС: лица с впервые возникшей стенокардией — ВВС (8 человек, 3-я группа) и перенесшие инфаркт миокарда за 1–3 мес до обследования (ВВС с ИМ) — 4-я группа (7 человек).

Кровь для исследования брали утром натощак в пробирки с 3,8 % раствором цитрата натрия в соотношении 9:1, центрифугировали при 1200 об/мин в течение 10 мин, полученную плазму центрифугировали при 3000 об/мин в течение 30 мин. Плазму крови отбирали для определения липидов, а осадок тромбоцитов дважды промывали физиологическим раствором и гомогенизировали. Концентрацию общего ХС и триглицеридов (ТГ) в плазме крови, ХС ЛПВП после освобождения плазмы от ЛП, содержащих апопротеин В, гепаринном и хлоридом марганца [7], а также содержание ХС в тромбоцитах измеряли на автоанализаторе АА-П фирмы «Техникон». Концентрацию ХС ЛПОНП и ЛПНП, коэффициент атерогенности (К) рассчитывали по следующим формулам:

$$\text{ХС ЛПОНП} = \frac{\text{ТГ}}{5},$$

$$\text{ХС ЛПНП} = \text{ХС}_{\text{общ}} - \frac{\text{ТГ}}{5} - \text{ХС ЛПВП},$$

$$K = \frac{\text{ХС}_{\text{общ}} - \text{ХС ЛПВП}}{\text{ХС ЛПВП}}.$$

В плазме крови и тромбоцитах определяли концентрацию общих ФЛ [19] и фосфолипидный состав после экстракции ФЛ [11] и двухмерной тонкослойной хроматографией в следующих системах растворителей [3]: хлороформ — метанол — вода (65:25:4), хлороформ — метанол — аммиак водный (14:6:1) с измерением содержания фосфора в каждом пятне [20]. Разделяли следующие основные ФЛ: полиглицериды (ПГ), фосфатидилэтаноламин (ФЭ), фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилсерин с фосфатидилинозитом (ФС+ФИ), сфингомиелин (СФ) и лизофосфатидилхолин (ЛФХ). Относительную долю каждого класса ФЛ выражали в про-

центах от суммы всех ФЛ, принимаемой за 100 %. Содержание ХС и ФЛ тромбоцитов пересчитывали в миллиграммах на 1 мг белка, определяемого методом Лоури. Полученные данные были обработаны методом вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента и проведением корреляционного анализа.

Результаты и их обсуждение. Данные о липидном спектре плазмы крови у обследованных лиц представлены в табл. 1. Учитывая границы нормы концентраций ХС, ТГ и ХС ЛПВП в плазме крови мужчин Москвы [5], можно заключить, что среди 10 человек контрольной группы и 25 больных ИБС при нормальном содержании ХС и ТГ соответственно 4 и 11 человек имели низкие значения ХС ЛПВП, 1 больной — высокую концентрацию ТГ. На ранних стадиях развития ИБС у больных ВВС по сравнению с лицами 1-й группы в плазме крови обнаружено статистически значимое повышенное содержание ХС ЛПНП и коэффициента атерогенности при отсутствии различий средних значений концентраций ХС ЛПВП и ЛПОНП, ТГ, ФЛ и по фосфолипидному составу, а у больных с ВВС с ИМ, кроме этого, повышено содержание общего ХС. У больных 2-й группы по сравнению с лицами контрольной группы наблюдали более существенные нарушения липидного спектра плазмы крови: снижение концентрации ХС ЛПВП и процентного содержания ФХ, более высокие концентрации ХС ЛПОНП и ЛПНП, коэффициента атерогенности и относительной доли СФ.

Во всех группах выявлена отрицательная корреляционная зависимость между содержанием ХС ЛПВП в плазме крови и коэффициентом атерогенности ($p < 0,05$), положительная связь между концентрациями общего ХС и ХС ЛПНП ($p < 0,05$). У больных с ранним клиническим проявлением ИБС (3-я группа) обнаружена положительная корреляционная зависимость между концентрациями ХС ЛПНП и ФЛ в плазме крови ($r = 0,669$, $p < 0,05$), с более тяжелым течением болезни (4-я группа) — между концентрациями ХС ЛПОНП и ФЛ ($r = 0,658$, $p < 0,05$), а на поздних сроках заболевания (2-я группа) проявились обе эти корреляционные зависимости ($r = 0,940$, $p < 0,001$ и $r = 0,618$, $p < 0,05$ соответственно). Зависимости между содержанием общих ФЛ в плазме крови и относительной долей таких значимых классов ФЛ, как ФХ и СФ, составляющих 90 % от всех ФЛ [21], мы не выявили. Поэтому можно предположить, что изменения процентного содержания ФХ и СФ не зависят от концентрации ФЛ в плазме крови. Нами отмечена отрицательная корреляционная зависимость между процентным содержанием ФХ и ФЭ во всех группах соответственно ($r_1 = -0,683$, $p < 0,05$; $r_2 = -0,555$, $r_3 = -0,681$, $r_4 = -0,691$, $0,05 < p < 0,1$), между ФХ и СФ в контрольной группе и больных ХИБС ($r_1 = -0,734$, $r_2 = -0,659$, $p < 0,05$). У больных ВВС при наличии отрицательной корреляции между процентным содержанием ФХ и ФЭ отсутствовала корреляционная зависимость между процентным содержанием ФХ и СФ. Можно полагать, что имеет место снижение синтеза ФХ с использованием цитидиндифосфатхолина у больных ВВС и преобладает синтез ФХ путем метилирования ФЭ под действием S-аденозилметионинтрансферазы.

Таблица 1

Липиды плазмы крови обследованных лиц ($M \pm m$)

Группа	ХС ЛПВП	ХС _{Общ}	ТГ	ХС ЛПОНП	ХС ЛПНП	К	ФЛ, мг/дл	ФХ	СФ
	мг/дл							%	
1-я — контрольная (n=10)	45±4,9	175±12,4	122±14,2	25±2,9	105±9,7	3,04±0,45	293±12,7	66,6±1,21	20,2±0,72
2-я — ХИБС (n=10)	35±1,8	200±8,8	155±14,2	33±2,4	133±7,0	4,80±0,30	281±11,6	63,2±1,25	23,2±0,68
p_{1-2}	<0,05			<0,05	<0,05	<0,001		0,05<p<0,1	<0,01
3-я — ВВС без ИМ (n=8)	36±2,0	194±7,4	125±18,8	25±3,8	133±6,3	4,58±0,31	288±11,0	65,0±1,24	19,6±0,46
p_{1-3}					<0,05	<0,001			
4-я — ВВС с ИМ (n=7)	39±2,4	216±16,4	110±20,5	20±3,4	153±13,8	4,62±0,55	261±18,9	64,7±1,28	20,4±0,86
p_{1-4}		0,05<p<0,1			<0,001	<0,001			

Таблица 2

Липиды тромбоцитов обследованных лиц ($M \pm m$)

Группа	ХС	ФЛ	ХС/ФЛ (молярное отношение)	Фосфолипидный состав, %					
	мг на 1 мг белка, ·10 ⁻²			ПГ	ФЭ	ФХ	СФ	ФС+ФИ	ЛФХ
1-я — контрольная (n=10)	5±0,5	30±3,8	0,33±0,06	4,7±0,80	21,8±1,33	36,5±1,02	19,6±0,84	8,5±0,76	7,3±0,97
2-я — ХИБС (n=10)	9±2,9	27±2,7	0,67±0,13	8,2±1,50	16,6±1,50	36,9±2,10	19,6±1,41	8,7±1,34	9,9±0,82
p_{1-2}			<0,02	<0,05	<0,05				<0,05
3-я — ВВС без ИМ (n=8)	7±1,0	25±3,8	0,78±0,25	10,3±0,92	17,3±0,90	31,3±1,60	19,2±1,44	11,9±0,87	10,1±0,41
p_{1-3}			<0,05	<0,01	0,05<p<0,1	0,05<p<0,1		<0,01	<0,01
4-я — ВВС с ИМ (n=7)	6±0,9	24±2,3	0,56±0,05	6,1±1,61	19,1±1,60	38,9±2,87	22,1±2,04	6,3±1,80	6,4±1,78
p_{1-4}			<0,001						
p_{3-4}				<0,05		<0,05		<0,02	<0,05

Результаты определения липидного состава тромбоцитов в этих же группах людей представлены в табл. 2. У всех больных ИБС по сравнению с лицами контрольной группы при отсутствии статистически значимых различий в концентрации ХС и ФЛ наблюдали статистически значимое повышение молярного соотношения ХС/ФЛ. У больных как в ранний период развития ИБС (3-я группа), так и более поздние сроки заболевания (2-я группа) отмечены существенные изменения фосфолипидного состава тромбоцитов. В этих группах по сравнению с лицами 1-й обнаружены различия по средним величинам процентного содержания индивидуальных ФЛ: уменьшение доли ФЭ и увеличение доли ЛФХ; кроме того, у больных 3-й группы процентное содержание ФС+ФИ было повышено, а ФХ — снижено. У больных 4-й группы по сравнению с лицами 1-й группы изменений фосфолипидного состава не выявлено.

Проведенный корреляционный анализ выявил нарушения связей между липидами плазмы крови и тромбоцитов при патологии. Обнаружена положительная корреляционная связь между уровнями ФЛ плазмы крови и тромбоцитов, между содержанием суммарных ФЛ плазмы крови и отдельными классами ФЛ тромбоцитов у лиц 1, 3 и 4-й групп; такая зависимость отсутствовала у больных 2-й группы (табл. 3). На основании выявленных различий можно полагать, что изменения концентрации ФЛ в тромбоцитах за-

висят от состава общего пула ФЛ плазмы крови у лиц контрольной группы и у больных в ранние сроки проявления ИБС. Когда же заболевание принимает хроническую форму, концентрационные соотношения между ФЛ плазмы крови и тромбоцитов становятся более сложными и корреляционных зависимостей не обнаруживается.

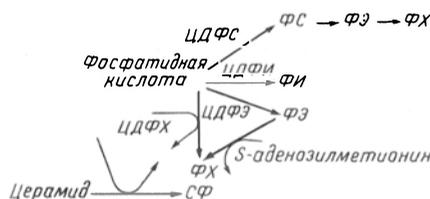
У лиц контрольной группы полученные коэффициенты корреляции между концентрациями ФЛ суммарных и индивидуальных классов в тромбоцитах демонстрируют значимую положительную связь между этими параметрами, указывая на возможную взаимосвязь путей синтеза данных классов ФЛ (см. рисунок). У всех больных наблюдали положительную корреляцию между концентрациями ФЭ и ФХ в ранние сроки ИБС (3-я и 4-я группы). Сохранялась положительная связь и между уровнями СФ и ФХ, а при ВВС с ИМ между концентрациями СФ и ФС+ФИ обнаружена отрицательная корреляция. Если у лиц контрольной группы выявлены концентрационные зависимости отдельных классов ФЛ тромбоцитов, что связано как с общим пулом ФЛ плазмы крови (см. табл. 3), так и с синтезом ФЛ de novo в клеточных мембранах, то при патологии эти связи нарушаются и при трансформации одного класса ФЛ в другой [4] может происходить усиление синтеза какого-либо ФЛ. Поэтому наблюдаемое повышение относительного содержания ФС+ФИ в тромбоцитах больных ВВС без ИМ возможно за счет усиленного синтеза из ФХ и ФЭ.

Известно [9], что ФХ и СФ локализованы главным образом на внешней стороне бислойной мембраны тромбоцитов, а ФС, ФИ и ФЭ — на внутренней. Такая асимметрия распределения ФЛ, в частности ФС и ФИ (основных ФЛ тромбоцитарного фактора, участвующих в образовании тромбина), имеет значение в уменьшении вероятности образования тромбов. ФХ, СФ и ЛФХ обмениваются с ФЛ плазмы крови; ФЛ внутренней стороны в прямой обмен вступать не могут, но может происходить перемещение ФЛ с внутренней стороны мембраны на внешнюю [8]. Движение ФС к внешней стороне мембраны наблюдали при стимуляции тромбоцитов, и это перемещение ФС обеспечивало прокоагулянтную поверхность клеток [16, 18]. У больных ИМ и ХИБС свертывающая активность плазмы крови усилена [1], а ангиографические исследования подтвер-

Таблица 3

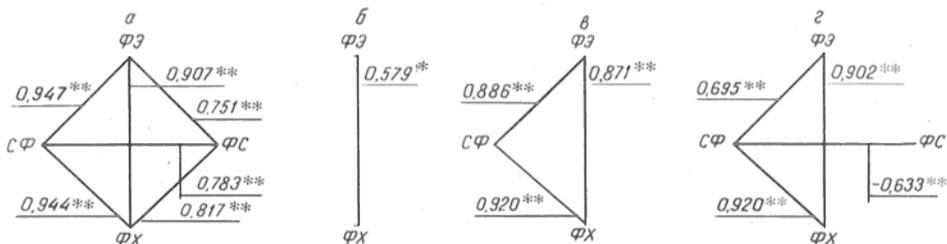
Коэффициенты корреляции (статистически значимые, $r < 0,05$) содержания ФЛ плазмы крови и тромбоцитов, концентраций суммарных ФЛ в плазме крови и индивидуальных классов ФЛ тромбоцитов

Показатели	1-я группа (контроль)	2-я группа	3-я группа	4-я группа
ФЛ плазмы крови с ФЛ тромбоцитов	0,733	—	0,754	—
ФЭ »	0,753	—	0,686	0,885
ФХ »	0,641	—	0,650	0,943
СФ »	0,754	—	—	0,879
ФС+ФИ	0,607	—	0,710	—
ЛФХ	0,593	—	0,757	—
ФЛ тромбоцитов с ФЭ тромбоцитов	0,925	—	0,974	0,885
ФХ »	0,971	0,837	0,919	0,943
СФ »	0,949	0,874	0,857	0,879
ФС+ФИ	0,858	—	0,645	—



Схематическое изображение синтеза фосфолипидов и корреляционные зависимости между отдельными классами фосфолипидов в тромбоцитах.

а, б, в, г — соответственно 1, 2, 3 и 4-я группы больных. ЦДФХ — цитидиндифосфатхолин, ЦДФС — цитидиндифосфатсерин, ЦДФИ — цитидиндифосфатинозит, ЦДФЭ — цитидиндифосфатэтаноламин. Звездочки — достоверность коэффициентов корреляции: одна — $0,05 < r < 0,1$, две — $r < 0,05$.



дили причинную роль нарастающего тромбирования коронарных артерий при инфаркте миокарда [6].

Можно предположить, что у больных ВВС по сравнению с лицами контрольной группы отличия фосфолипидного спектра тромбоцитов вызваны изменениями путей метаболизма ФЛ в тромбоцитах; увеличенное процентное содержание ФС+ФИ у больных 3-й группы может приводить к повышению прокоагулянтной активности плазмы крови. У больных ВВС с ИМ и ХИБС, когда наблюдается дисфункция системы гемостаза [1], не отличающееся от нормальных значений процентное содержание ФС+ФИ при отсутствии корреляционной зависимости концентрации ФС+ФИ от общего уровня ФЛ в тромбоцитах при измененных путях его метаболизма свидетельствует о том, что ФС+ФИ уже использованы для активации факторов свертывания крови на поверхности тромбоцитов и тромботические свойства плазмы крови повышены. Уже при первом проявлении ИБС у больных ВВС обнаружены не только атерогенные нарушения в липидном спектре плазмы крови и тромбоцитов, но и различия во взаимосвязи липидов плазмы крови с липидами тромбоцитов, отличия в метаболизме ФЛ тромбоцитов, что в свою очередь может привести к повышению прокоагулянтной активности плазмы крови и тромбообразованию, а развивающийся или присоединившийся коронарный тромбоз служит ключевым механизмом в патогенезе ИМ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреевко Г. В., Бессолицына Л. А., Саргин К. Е. Клини. мед., 1976, № 5, с. 33.
2. Андреевко Г. В., Суворова Л. А. Успехи современ. биологии, 1986, вып. 3, с. 436.
3. Кейтс М. В. в кн.: Техника липидологии. М., 1975, с. 138.
4. Мецлер Д. Биохимия. М., Мир, 1985, с. 554.
5. Никольцева Н. Г., Перова Н. В. в кн.: Дислипидопротеидемии и ИБС. М., 1980, с. 179.
6. Чазов Е. И., Пыда М. Я. Кардиология, 1987, № 2, с. 5.
7. Burnstein M., Scholnick H., Morfin R. // J. Lipid Res.— 1970.— Vol. 11.— P. 583.
8. Chap H., Mauco G., Perret B. // Agents and Action.— 1981.— Vol. 11.— P. 538.
9. Chap H., Zwaal R., van Deenen L. // Biochim. biophys. Acta.— 1977.— Vol. 467.— P. 146.
10. Derksen A., Cohen P. // J. Biol. Chem.— 1973.— Vol. 248.— P. 7396.
11. Folch J., Lees M. // J. Biol. Chem.— 1957.— Vol. 225.— P. 497.
12. Kader J. // Dynamic aspects of cell surface organization. Cell surface reviews / Eds. G. Poste, G. Nicolson.— New York, 1977.— Vol. 3.— P. 127.
13. Mahley R., Ihnerarity T. L. // Biochim. biophys. Acta.— 1983.— Vol. 737.— P. 197.
14. Mckean M., Smith J., Silver M. // J. Biol. Chem.— 1982.— Vol. 257.— P. 11278.
15. Miller N. E., La Ville A., Crook D. // Nature.— 1985.— Vol. 314.— P. 109.
16. Schwartz R., Tanaka V., Fildler J., Chin D., Lubin B., Schroit A. // J. Clin. Invest.— 1985.— Vol. 75.— P. 1965.
17. Shattil S., Anaya-Galindo R., Bennett J., Colman R., Cooper R. // J. Clin. Invest.— 1975.— Vol. 55.— P. 636.
18. Spangenberg P., Heller R., Wagner C., Till U. // Biochim. biophys. Acta.— 1977.— Vol. 467.— P. 146.
19. Swanborg A., Svennerholm L. // Acta med. Scand.— 1961.— Vol. 169.— P. 43.
20. Vaskovsky Y., Kostetsky E., Vasendin J. // J. Chromatogr.— 1975.— Vol. 114.— P. 129.
21. William H. // J. Clin. Invest.— 1961.— Vol. 40.— P. 1202.

Поступила 05.10.89

BLOOD PLASMA AND THROMBOCYTE LIPIDS IN PATIENTS WITH PRIMARY STENOCARDIA AND WITH CHRONIC HEART DISEASE

L. A. Suvorova, A. B. Korolev, S. V. Shalaev, N. V. Perova

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

In patients with ischemic heart disease impairments in blood plasma lipid spectrum were more distinct in the chronic form of the disease. At the same time, the phospholipid composition was altered in thrombocytes as compared with that of persons free of ischemic heart disease and of stenosing coronary atherosclerosis.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.153.922-055.1-092:616.12-005.4-07

Н. А. Никитина, Н. В. Перова, И. А. Щербакова, А. М. Калинина, Е. Д. Айнгорн, Т. А. Бондарь, В. В. Тертов, А. Н. Орехов

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ СРЕДИ МУЖЧИН АТЕРОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА СЫВОРОТКИ КРОВИ, ВЫЯВЛЯЕМОГО В КУЛЬТУРЕ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ МЫШИ

Всесоюзный научно-исследовательский центр профилактической медицины Минздрава СССР, ВКНЦ АМН СССР, Москва

Недавно было показано [7], что при инкубации образцов сыворотки крови больных ишемической болезнью сердца (ИБС) с ангиографически документированным коронарным атеросклерозом в культуре субэндотелиальных клеток аорты в последних происходит 2—5-кратное накопление холестерина (ХС). Этим свойством, которое условно можно считать атерогенным потенциалом сыворотки крови (АПСК), обладала сыворотка более 90 % обследованных больных с коронарным атеросклерозом, в том числе лиц с нормальным уровнем сывороточных липидов, и только 20 % практически здоровых людей.

Задача настоящего исследования — получить сведения о распространенности АПСК среди произвольно отобранной группы населения, его связи с проявлением ИБС, наличием факторов риска последней, а также липидным и аполипопротеиновым составом сыворотки крови у обследованных лиц. Изучение АПСК обследованной группы мужчин было проведено на первичной культуре перитонеальных макрофагов мыши, которые, как было показано ранее [1], подобно субэндотелиальным клеткам аорты, обладают способностью накапливать внутриклеточный ХС с последующим превращением в пенные клетки. Использование перитонеальных макрофагов имело ряд преимуществ, таких, как простота и доступность получения клеток, короткий срок их культивирования.

Методика. Исследовали образцы сыворотки крови 191 мужчины, произвольно отобранного из неорганизованной популяции одного из районов Москвы, в возрасте 25—64 лет, проходившего эпидемиологическое обследование в Институте профилактической кардиологии ВКНЦ АМН СССР. В результате клинического обследования у 22 мужчин выявлены признаки «определенной» ИБС, согласно эпидемиологическим критериям, — положительный опросник ВОЗ на выявление болей в грудной клетке, ЭКГ покоя в 12 стандарт-

Таблица 1

Накопление ХС субэндотелиальными клетками интимы аорты человека и перитонеальными макрофагами мыши при инкубации с сывороткой крови мужчин без признаков ИБС и больных ИБС с ангиографически документированным коронарным атеросклерозом

Обследованные	Содержание ХС, % от контроля	
	в субэндотелиальных клетках	в макрофагах
Без признаков ИБС (n=11)	115±4,1	112±6,1
Больные ИБС (n=10)	203±20,2	212±16,7

Примечание. Содержание внутриклеточного ХС при инкубации контрольной делипидированной сыворотки с субэндотелиальными клетками интимы аорты человека 0,069±0,0054 мкг на 1 мкг белка; с перитонеальными макрофагами мыши — 0,091±0,0071 мкг на 1 мкг белка.

ных отведениях с последующим кодированием по Миннесотскому коду [2]. Дислипидемия у обследованных лиц определяли с помощью следующих критериев: гиперхолестеринемию диагностировали при уровне ХС плазмы крови >260 мг/дл, гипертриглицеридемию — при уровне триглицеридов (ТГ) >200 мг/дл, гипо-α-холестеринемию — при уровне α-ХС <40 мг/дл плазмы. Такие факторы риска, как повышенное артериальное давление [систолическое и (или) диастолическое], курение, избыточная масса тела, недостаточная физическая активность, выявляли согласно схеме, рекомендованной для первичного обследования неорганизованного населения в рамках интегральной программы профилактики хронических неспецифических заболеваний [3].

Кровь для исследования брали из локтевой вены натощак. Сыворотку получали центрифугированием крови при 2000 об/мин в течение 20 мин (1500 g). Полученные образцы сыворотки исследовали на способность накапливать ХС при инкубации в первичных культурах клеток — перитонеальных макрофагах мыши и субэндотелиальных клетках интимы аорты человека.

Для получения перитонеальных макрофагов были использованы нестимулированные мыши-самцы линии BALB/c массой 15–25 г. Перитонеальные макрофаги выделяли по Adams [4]. Субэндотелиальные клетки интимы получали из внешне не пораженной интимы аорты человека, взятой спустя 1,5–3 ч после внезапной смерти (основная причина — инфаркт миокарда). Клеточный материал выделяли диспергированием эластазой и коллагеназой, как описано ранее [18]. Полученные клетки культивировали в среде 199, содержащей 2 Мм глутамин, 100 мг/дл канамицина, 2,5 мкг/мл фунгицида и 10 % фетальной эмбриональной сыворотки теленка (фирма «Gibco», Великобритания), при 37 °С в атмосфере 95 % воздуха, 5 % CO₂ в насыщенном водяными парами инкубаторе в течение 4 ч — для перитонеальных макрофагов, в течение 7 сут — для субэндотелиальных клеток интимы аорты человека.

Исследуемые образцы сыворотки крови добавляли в культивируемую среду в концентрации 20 % и инкубировали с клетками в течение 18 ч. В качестве контроля использовали делипидированную сыворотку крови человека в той же концентрации. В дополнение к контрольной делипидированной сыворотке в каждом эксперименте использовали стандартные сыворотки с высоким и низким атерогенным потенциалом (АП). Стандартная сыворотка с высоким АП увеличивала содержание внутриклеточного ХС до 198–236 % по сравнению с принятым за 100 % ХС клеток, инкубированных с контрольной делипидированной сывороткой. Сыворотка с низким АП не вызывала накопления ХС (92–115 %).

После инкубации с образцами сыворотки крови клетки интенсивно промывали изотоническим фосфатным буфером рН 7,2–7,4 и суспендировали 0,25 % трипсином с ЭДТА. Клеточный материал разрушали озвучиванием. В полученных пробах проводили измерение содержания экстрагированного смеси гексан — изопропанол [13] суммарного ХС с помощью наборов фирмы «Boehringer — Mannheim» (ФРГ) [19] и белка [16]. Содержание внутриклеточного ХС (в мкг/мкг белка) подсчитывали в пробе как среднее значение трех параллельных определений. Результаты представляли в процентах от внутриклеточного ХС контрольных клеток, принятого за 100 %. Уровень ХС клеток после их инкубации с сывороткой крови считали повышенным, если его среднее значение достоверно отличалось от среднего уровня ХС контрольных клеток, инкубированных с делипидированной сывороткой.

Содержание ХС, ТГ и α-ХС в образцах сыворотки крови измеряли на автоанализаторе АА-11 (фирма «Tech-picon», США). Уровни апопротеинов В (apoB) и А-1 (apo А-1) определяли по Сиггу [9, 8].

Результаты и обсуждение. В предва-

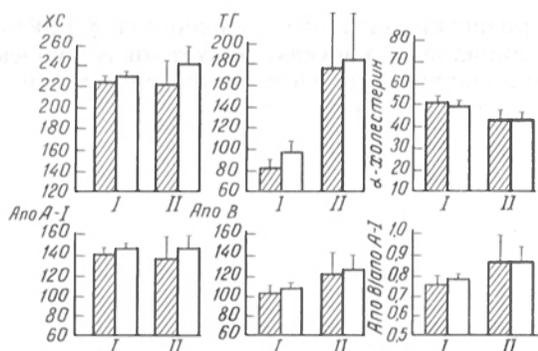
дительной части исследования был проведен параллельный эксперимент по аналогичной схеме на первичных культурах субэндотелиальных клеток интимы непораженной аорты человека и перитонеальных макрофагов мыши (табл. 1). АП образцов сыворотки крови 10 больных с ангиографически документированным коронарным атеросклерозом при использовании двух типов клеток составил соответственно 203±20,3 и 212±16,7 % от контроля. У 11 мужчин без признаков ИБС из группы, непреднамеренно отобранной из популяции, АПСК составил 114±4,2 и 112±6,1 %. При этом был выявлен высокий коэффициент корреляции уровней АП образцов сыворотки крови в культуре субэндотелиальных клеток аорты человека и перитонеальных макрофагов мыши — $r=0,85$, $p<0,001$. Эти сходные результаты, с одной стороны, свидетельствовали о близости механизмов, ответственных за накопление ХС в клетках субэндотелия аорты и макрофагах, с другой — позволили использовать перитонеальные макрофаги как тест-модель для изучения способности сыворотки крови вызывать накопление внутриклеточного ХС при относительно большом числе обследуемых лиц.

При распределении обследованного контингента произвольно отобранных из популяции мужчин (n=191) по способности сыворотки крови вызывать накопление ХС в перитонеальных макрофагах мыши АПСК в верхней терциле ряда был в 1,3–4 раза выше, чем в контроле, и составил в среднем 186±7,8 %. В средней и нижней терциле этот показатель не отличался достоверно от контроля и для всех остальных 128 обследованных мужчин составил 103±1,2 %. Значение АП, разграничивающее верхнюю терциль от двух нижних (130 %), было принято за критерий, согласно которому исследуемые об-

Таблица 2

АП и белково-липидный состав сыворотки крови мужчин без признаков ИБС и больных ИБС из популяции

Обследованные	n	АП, % от контроля	Липиды, мг/дл			Аполипопротеины, мг/дл		
			ХС	ТГ	α-ХС	apoA-1	apoB	apoB/apoA-1
Мужчины без ИБС	169	128±4,2	225±3,8	89±4,6	48±1,0	142±1,6	104±2,7	0,76±0,020
Больные ИБС	22	124±6,5	235±12,6	180±37,5	42±2,2	145±3,7	124±8,7	0,90±0,60
p		>0,05	>0,05	<0,01	<0,02	>0,05	<0,001	<0,05



Содержание ЛП и апопротеинов (в мг/дл) в сыворотке крови мужчин с высоким и низким АП без признаков ИБС (I) и с признаками ИБС (II).

Заштрихованные столбики — лица с высоким АПСК (I — n=54, II — n=10), незаштрихованные — лица с низким АПСК (I — n=155, II — n=12).

разцы сыворотки условно относили к имеющим высокий или низкий АП.

Используя этот критерий, мы обнаружили высокий АПСК у 54 из 169 обследованных мужчин без признаков ИБС — 32 %, что согласуется с данными, полученными ранее при изучении АПСК у небольшого числа практически здоровых доноров на культуре субэндотелиальных клеток аорты человека [7]. В группе из 22 мужчин с признаками ИБС, выявленной по эпидемиологическим критериям, высокий АПСК был обнаружен у 10 (46 %). Меньший процент высокого АПСК у этих лиц, чем выявленный ранее (92 %) у больных ИБС с ангиографически документированным коронарным атеросклерозом [7], вероятно, обусловлен другими критериями подбора больных ИБС. В настоящем исследовании признаки ИБС регистрировались только на основании данных ЭКГ и опросника ВОЗ, без ангиографической документации степени поражения сосудов.

Изучение АПСК обследованных мужчин не выявило достоверных его различий в разных возрастных группах, что позволило возраст обследованных лиц в дальнейшем анализе не учитывать.

Как видно из табл. 2, группа мужчин с признаками ИБС отличалась от всех остальных мужчин более высоким уровнем ТГ, апоВ и сниженным уровнем α -ХС, но средней уровень содержания липидов и апопротеинов сыворотки крови в группах с высоким и низким накоплением ХС в макрофагах не различался как среди мужчин без признаков, так и с признаками ИБС (рисунок).

У мужчин с дислипидемиями (гиперхолестеринемией, гипертриглицеридемией, гипо- α -холестеринемией) не было обнаружено отклонений сред-

него показателя АП от такового в группе лиц без дислипидемии. Однако при распределении обследованных мужчин по уровням апоА-I, апоВ и соотношению апоВ/апоА-I было обнаружено, что АП имеет тенденцию быть выше в нижней терциле распределения по уровню апоА-I, чем в оставшихся $2/3$ обследованных. Был выявлен достоверно более высокий средний АПСК в верхней терциле распределения по соотношению апоВ/апоА-I (табл. 3).

Полученные данные показали, что АПСК имеет тенденцию быть взаимосвязанным с дисбалансом основных функциональных апопротеинов липопротеинов (ЛП) низкой и высокой плотности, но не с нарушением содержания липидов в сыворотке крови. К такому же заключению мы пришли ранее при исследовании АПСК у больных с ангиографически документированным коронарным атеросклерозом [7]. Однако АПСК, по-видимому, определяется не только изменением соотношения сывороточных ЛП, поскольку в ряде случаев сыворотки с высоким АП имели нормальное соотношение апопротеинов и, кроме того, нормальный липидный спектр.

Поскольку у курящих и лиц с повышенным артериальным давлением, избыточной массой тела, недостаточной физической активностью увеличен риск заболевания и смерти от болезней, связанных с атеросклерозом, для выяснения зависимости перечисленных факторов риска ИБС и АПСК мы определили процент таких лиц с факторами риска ИБС в группах с высоким и низким АП (табл. 4). Только повышенное артериальное давление было обнаружено у относительно большего числа лиц с высоким АП (25 %), чем у лиц с низким АПСК (15 %; $p < 0,05$). У мужчин без признаков ИБС число лиц с повышенным артериальным давлением в группе с высоким АПСК было в 2,2 раза больше, чем в группе с низким (22 и 10 % соответственно; $p < 0,05$). Возможные механизмы обнаруженной взаимосвязи между уровнем артериального дав-

Таблица 4

Факторы риска ИБС у обследованных мужчин с высоким и низким накоплением ХС в перитонеальных макрофагах мыши

Сыворотка крови	Число лиц с факторами риска ИБС			
	повышенное артериальное давление	курение	избыточная масса тела	недостаточная физическая активность
С высоким АП (n=63)	16 (25 %)	26 (41 %)	6 (10 %)	7 (11 %)
С низким АП (n=128)	19 (15 %)	60 (47 %)	18 (14 %)	17 (13 %)

Таблица 3

АП сыворотки крови обследованных мужчин с дислипо- и дисаполипопротеидемиями

	Нормодислипидемия: ХС \leq 260 мг/дл ТГ \leq 200 мг/дл α -ХС $>$ 40 мг/дл (n=110)		Дислипидемия: ХС \geq 260 мг/дл ТГ \geq 200 мг/дл α -ХС \leq 40 мг/дл (n=81)		апоА-I		апоВ		апоВ/апоА-I	
					$<$ 134 мг/дл (n=64)	\geq 134 мг/дл (n=127)	$>$ 120 мг/дл (n=64)	\leq 120 мг/дл (n=127)	$>$ 0,86 мг/дл (n=64)	\leq 0,86 мг/дл (n=127)
Содержание внутриклеточного ХС, % от контроля p	133 \pm 11,2	120 \pm 9,1	142 \pm 8,3	124 \pm 4,4	132 \pm 7,4	128 \pm 4,8	144 \pm 8,7	122 \pm 4,3	$>$ 0,05 $>$ 0,05 $<$ 0,05	

ления и АПСК неясны. Однако можно полагать, что зависимость между повышением артериального давления и способностью сыворотки крови вызывать накопление внутриклеточного ХС является одной из причин взаимосвязи повышенного артериального давления с развитием атеросклероза. Эта связь может быть сопряжена с реализацией повышенного артериального давления через механизмы, влияющие на способность сыворотки крови вызывать накопление липидов в клетках, например через модификацию ЛП, ведущую к их нерегулируемому захвату макрофагальными клетками [10, 12]. Такая модификация может происходить в организме при нарушении каких-либо физиологических механизмов обмена ЛП, приводящем к изменению их свойств.

Из литературных данных известно, что для присутствующих в артериальной стенке, а также в атеросклеротической бляшке макрофагов моноцитарного происхождения [17], так же как и для клеток сосудистой стенки, характерно поглощение сывороточных ЛП, приводящее при определенных метаболических нарушениях к их трансформации в пенные клетки [6]. Показано, что макрофаги обладают уникальной способностью интенсивно захватывать с помощью специальных «scavenger»-рецепторов химически модифицированные ЛП, тогда как инкубация с нативными ЛП, даже в очень больших концентрациях, не приводит к трансформации макрофагов в пенные клетки [10, 12]. В организме человека обнаружены формы ЛП, которые могут быть отнесены к модифицированным (например, β -ЛП очень низкой плотности, аутоиммунные комплексы ЛП с γ -глобулинами, гликозилированные ЛП). Модифицированные ЛП найдены в атеросклеротических бляшках сосудов; при инкубации ЛП с культурой эндотелиальных клеток аорты также образуются модифицированные ЛП, которые интенсивно захватываются макрофагами [11, 14, 15].

Активность макрофагов по отношению к модифицированным ЛП, по-видимому, направлена на очищение внеклеточного пространства от частично деградированных и измененных ЛП. Этому процессу в последнее время придается особая роль в атерогенезе [5, 20]. Не исключена возможность, что высокий АПСК, обнаруженный нами у части обследованных лиц, может быть связан с модификацией ЛП в результате нарушения их метаболизма в организме под воздействием каких-либо факторов.

Таким образом, в проведенном исследовании у $1/3$ обследованных мужчин из популяции выявлена способность сыворотки крови вызывать 1, 3—4-кратное накопление ХС в перитонеальных макрофагах мыши, связанная с нарушением соотношения в ней уровней апопротеинов А-I и В (но не липидов) и с одним из факторов риска ИБС — повышенным артериальным давлением. Связь выявленных особенностей с АПСК может отражать ее свойство способствовать развитию атеросклеротического процесса в организме человека. Особый интерес с точки зрения оценки возможного возникновения ИБС представляет $1/3$ обследованных мужчин, не имеющих признаков ИБС, сыворотка крови которых обладала высоким АП. Вопрос о самостоятельной значимости АПСК в прогнозировании ИБС и его ро-

ли в развитии патологии, связанной с накоплением липидов в клетках, может быть решен в запланированном проспективном наблюдении за обследованным контингентом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тергов В. В., Качарова А. Г., Лякишев А. А. и др. // Кардиология.— 1988.— № 2.— С. 50—61.
2. Чазова Л. В., Глазунов И. С., Олейников С. П. и др. // Профилактика ишемической болезни сердца.— М., 1983.— С. 15.
3. Чазова Л. В., Иванов В. М., Рожанец Р. В. и др. // Мед. реф. журн. XVI.— 1986.— № 10.— публ. 2820.
4. Adams D. O. // Meth. Enzymol.— 1979.— Vol. 58.— P. 501—506.
5. Avogaro P., Bittolo Bon G., Cazzolato G. // Arteriosclerosis.— 1988.— Vol. 8.— P. 79—87.
6. Brown M. S., Goldstein J. L. // Ann. Rev. Biochem.— 1983.— Vol. 52.— P. 223—261.
7. Chazov E. I., Smirnov V. N., Orechov A. N. // Lancet.— 1986.— N 13.— P. 595—598.
8. Curry M. D., Alaupovic P., Suernam C. A. // Clin. Chem.— 1976.— Vol. 22.— P. 315—332.
9. Curry M. D., Alaupovic P., Suernam C. A. // Ibid.— 1978.— Vol. 24.— P. 1280—1286.
10. Fogelman A. H., Schechter I., Scager J. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1980.— Vol. 77.— P. 2214—2218.
11. Gleividence B. A., Morton R. E., West G. // Arteriosclerosis.— 1984.— Vol. 4.— P. 196—207.
12. Goldstein J. L., Ho Y. K., Basu S. K. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1979.— Vol. 76.— P. 333—337.
13. Hara A., Randin N. S. // Analyt. Biochem.— 1978.— Vol. 90.— P. 420—426.
14. Henriksen T., Mahoney E. M., Steinberg D. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1981.— Vol. 78.— P. 6499—6503.
15. Henriksen T., Mahoney E. M., Steinberg D. // Arteriosclerosis.— 1983.— Vol. 3.— P. 149—159.
16. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem.— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
17. Ross R. // Arteriosclerosis.— 1981.— Vol. 1.— P. 293—311.
18. Shen I., Krauss R. M., Lindgren F. T. // J. Lipid Res.— 1981.— Vol. 22.— P. 236—244.
19. Siedel J., Hegle E. O., Ziegenhorn J. // Clin. Chem.— 1983.— Vol. 29.— P. 1075—1080.
20. Watanabe I., Hirata M., Joshikawa Y. // Lab. Invest.— 1985.— Vol. 53.— P. 80—90.

Поступила 05.10.89

DISTRIBUTION AMONG MEN OF BLOOD SERUM ATHEROGENOUS POTENTIAL, DETECTED IN A CULTURE OF MICE PERITONEAL MACROPHAGES

N. A. Nikitina, N. V. Perova, I. A. Scherbakova, A. M. Kalinina, E. D. Ingorn, T. A. Bondar, V. V. Tertov, A. N. Orekhov

All-Union Research Centre of Prophylactic Medicine, Ministry of Public Health of the USSR, All-Union Cardiological Research Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Blood serum of 63 persons out of 191 men examined, randomly selected among non-organized population, caused in primary culture of mice peritoneal macrophages the 1.3-4-fold increased accumulation of intercellular cholesterol. Blood serum of other 128 men studied did not exhibit any atherogenous properties in the culture. The atherogenous potential of blood serum did not correlate with content of blood serum lipids, apolipoproteins B and A-I, while it correlated with the ratio apo B/apo A-I in blood serum and with one of ischemic heart disease risk factors — increased arterial pressure. Blood serum atherogenous potential, detected in experimental model, appears to be involved in development of human atherosclerosis.

И. С. Челнакова, Н. Д. Тронько, А. С. Микоша

ВЛИЯНИЕ АСКОРБАТА, NADPH И ХЛОДИТАНА НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В НАДПОЧЕЧНИКАХ СОБАК И МОРСКИХ СВИНОК IN VITRO

Киевский НИИ эндокринологии и обмена веществ Минздрава УССР

Высокое содержание ненасыщенных жирных кислот и присутствие ряда очень активных электронтранспортных систем в ткани коры надпочечных желез создают возможность активного перекисного окисления липидов (ПОЛ). Очевидно, с этим связано присутствие в надпочечниках большого количества восстановленного глутатиона [19], глутатионредуктазы [2], глутатион-S-трансферазы [8] и глутатионпероксидазы [20], способных обезвреживать перекиси. Роль цитохрома P-450 в образовании и разрушении перекисей в стероидпродуцирующих железах пока неясна. Ингибиторы цитохрома P-450 метопирон и аминоклутетимид тормозят ПОЛ в митохондриях надпочечников [14]. Процесс ПОЛ, определяемый по накоплению малонового диальдегида (МДА), приводит к аутоинаktivации цитохрома P-450, а ингибитор цитохрома P-450 подавляет ПОЛ и защищает фермент от аутораза разрушения [15]. Характер воздействия метопирона, аминоклутетимида и хлодитана (о,п'-дихлордифенилдихлорэтан — о,п' ДДД) на железу различен. Метопирон и аминоклутетимид не вызывают разрушения корковой ткани. При введении о,п'-ДДД собакам происходит выраженное повреждение корковой ткани надпочечников [1, 16]. Этот эффект лежит в основе терапевтического применения хлодитана у людей, страдающих болезнью Иценко — Кушинга. Поэтому представляется весьма вероятным влияние о,п'-ДДД на ПОЛ в ткани коры надпочечных желез.

В связи с изложенным настоящая работа посвящена изучению процесса ПОЛ в гомогенате коры надпочечников собак и морских свинок и влияния на этот процесс о,п'-ДДД in vitro.

Методика. ПОЛ изучали в постядерной фракции гомогенатов надпочечников собак и морских свинок. 1 % гомогенат надпочечников готовили в 50 мМ трис-НСI-буфере pH 7,4, содержащем 154 мМ KCl. При изучении спонтанного ПОЛ постядерную фракцию гомогената инкубировали в 50 мМ трис-НСI-буфере pH 7,4, содержащем 154 мМ KCl. Инкубационная смесь для определения NADPH-зависимого ПОЛ содержала: 50 мМ трис-НСI-буфер pH 7,4, 154 мМ KCl, 1 мМ NADPH, 6 мкМ соль Мора, 4 мМ ADP. При аскорбатзависимом ПОЛ в инкубационную смесь входили: 50 мМ трис-НСI-буфер pH 7,4, 154 мМ KCl, 0,5 мМ аскорбат, 6 мкМ соль Мора [4]. В пробы вносили 0,25—0,3 мг белка на 1 мл. Реакция прослеживалась на протяжении 60 мин при 37 °С в атмосфере воздуха при постоянном встряхивании. В инкубационную среду (10 мл) добавляли 0,05 мл раствора хлодитана в этаноле так, чтобы концентрация о,п'-ДДД в среде составляла 15,6 и 156 мкМ. В контрольные пробы вносили равные количества этанола. Содержание МДА определяли по реакции с 0,8 % тиобарбитуровой кислотой [10]. Измерение проводили при 532 нм, количество МДА рассчитывали, используя коэффициент молярной экстинкции $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Уровень МДА, измеренный до начала инкубации (нулевое время), соответствовал исходному содержанию МДА в гомогенате надпочечников.

Белок определяли методом [8]. Статистическая обработка данных проводилась методом дисперсионного анализа неравномерных двухфакторных комплексов [7]. Анализировали силу и достоверность влияния о,п'-ДДД, а также времени инкубации и рассчитывали критерий Фишера. Влияния факторов достоверны при $F > F_{0,05-0,01-0,001}$.

Результаты и обсуждение. Накопление МДА в гомогенате надпочечников собак и морских свинок на протяжении 1 ч инкубации представлено в таблице. Спонтанное ПОЛ в надпочечниках собак является довольно медленным процессом, за 1 ч инкубации уровень МДА возрастает в 1,6 раза. В присутствии NADPH накопление МДА замедляется ($F > F_{0,5}$). Вероятно, это является следствием восстановления глутатиона в глутатионредуктазной реакции в присутствии NADPH. Восстановленный глутатион может быть использован для разрушения перекисей липидов в глутатионпероксидазной [20, 21] и глутатион-S-трансферазной реакциях [22], а также путями, еще недостаточно исследованными [11, 12]. Значительная активация ПОЛ наблюдается в присутствии аскорбата + Fe^{2+} : за 1 ч инкубации уровень МДА в пробах возрастает почти в 7 раз.

Внесение в инкубационную среду о,п'-ДДД снижало уровень МДА при спонтанном ПОЛ (рис. 1, а). Снижение уровня МДА в этих условиях может быть обусловлено обнаруженной нами ра-

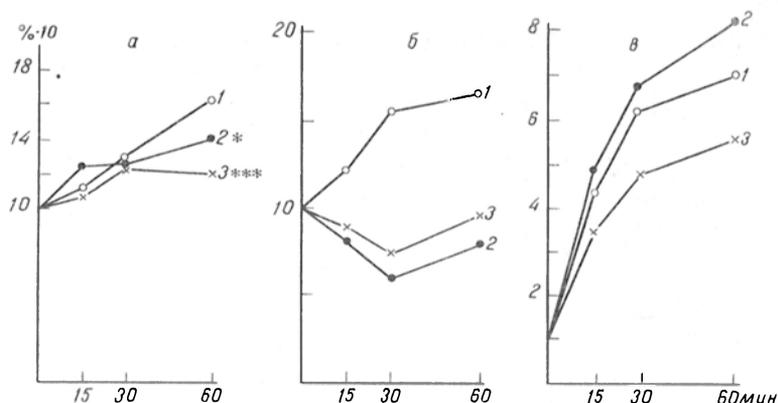
Накопление МДА (в н моль на 1 мг белка) в гомогенате надпочечников собак и морских свинок при спонтанном, NADPH- и аскорбатзависимом ПОЛ ($M \pm m$)

ПОЛ	Время инкубации, мин			
	0	15	30	60
Надпочечники собак				
Спонтанное	0,57 ± 0,08 (5)	0,64 ± 0,09 (5)	0,67 ± 0,08 (4)	0,89 ± 0,16 (5)
NADPH-зависимое	0,50 ± 0,08 (6)	0,49 ± 0,05 (6)	0,60 ± 0,09 (6)	0,66 ± 0,08 (6)
Аскорбатзависимое	0,32 ± 0,01 (3)	1,33 ± 0,27 (3)	1,93 ± 0,59 (3)	2,15 ± 0,71 (3)
Надпочечники морских свинок				
Спонтанное	1,87 ± 0,22 (4)	7,17 ± 1,40 (4)	13,44 ± 1,55 (4)	19,51 ± 1,31 (4)
NADPH-зависимое	7,22 ± 1,08 (4)	5,75 ± 0,70 (4)	9,58 ± 2,24 (4)	12,58 ± 4,86 (4)
Аскорбатзависимое	2,59 ± 0,60 (7)	8,62 ± 2,09 (7)	11,60 ± 2,15 (7)	17,57 ± 2,88 (7)

Примечание. В скобках — количество определений.

Рис. 1. Накопление МДА гомогенатами коры надпочечников собак при спонтанном (а), NADPH-зависимом (б) и аскорбатзависимом (в) ПОЛ.

1 — контроль; 2 — хлоритан 15,6 мкМ; 3 — хлоритан 156 мкМ. Каждая кривая получена путем усреднения результатов 3–7 опытов. Достоверность влияния хлоритана установлена с помощью F-критерия Фишера. *— $F > F_{0,5}$, **— $F > F_{0,1}$, ***— $F > F_{0,01}$. По оси абсцисс — продолжительность инкубации (в мин); по оси ординат — накопление МДА (в %) к нулевому времени инкубации.



нее активацией глутатионредуктазы под влиянием о,п'-ДДД [2, 3]. Активация фермента, восстанавливающего за счет NADPH окисленный глутатион, повысит разрушение перекисей, снизив тем самым уровень МДА. Этот эффект хорошо виден на рис. 1, б. В среде, содержащей NADPH, влияние о,п'-ДДД особенно демонстративно, хотя из-за варибельности процессов ПОЛ различие между контрольными и о,п'-ДДД-содержащими пробами не достигало уровня статистической значимости.

В присутствии аскорбата (рис. 1, в) о,п'-ДДД не вызывал достоверных изменений уровня МДА. Мы склонны считать, что это связано с недостаточностью механизма разрушения перекисей в условиях значительной активации ПОЛ. Система NADPH — глутатионредуктаза — восстановленный глутатион, функционирующая только за счет эндогенных глутатиона и NADPH, в этих условиях не может влиять на конечный уровень МДА.

Значение NADPH-зависимых процессов для разрушения перекисей проявляется и на ткани надпочечников морских свинок (см. таблицу). Накопление МДА в присутствии NADPH ниже, чем без него.

Спонтанное ПОЛ в гомогенате надпочечников морских свинок протекало весьма интенсивно (рис. 2, а). У этих животных в отличие от собак о,п'-ДДД повышал скорость спонтанного ПОЛ ($F > F_{0,1}$ для 156 мкМ о,п'-ДДД). В то же время о,п'-ДДД значительно уменьшал ПОЛ в среде, содержащей аскорбат (рис. 2, в), хотя сам по себе аскорбат активно индуцирует ПОЛ (см. таблицу).

Различие ответа ПОЛ на о,п'-ДДД в зависимости от наличия аскорбата в среде позволяет высказать предположение, что аскорбат снижает образование МДА, активируемое о,п'-ДДД. Показано, например, что аскорбат снижал скорость перекисного окисления фосфатидилхолина, заключенного в липосомы [18]. Торможение аскорбатом ПОЛ, индуцированного триэтилтетрамином + Fe^{3+} , особенно эффективно в присутствии α -токоферола и наблюдается пока в среде, где присутствуют радикалы аскорбата с g-фактором 2,005 [14]. Можно предположить, что активация ПОЛ о,п'-ДДД *in vitro* осуществляется путем, контролируемым аскорбатом.

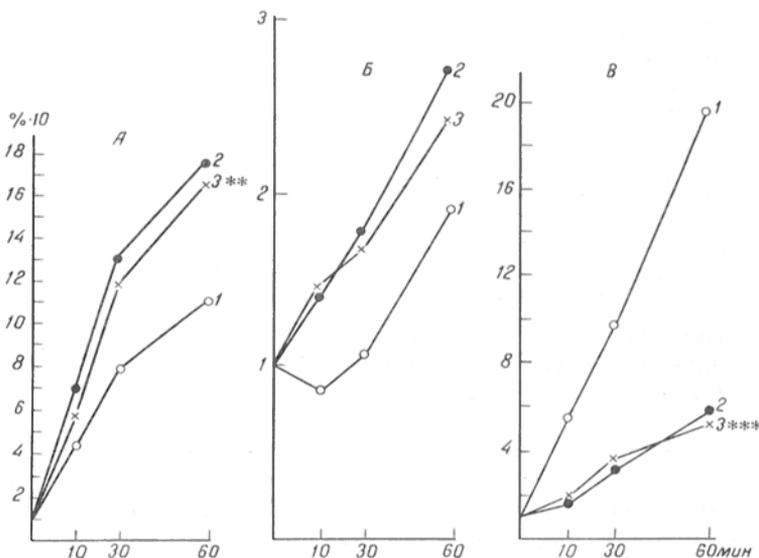
Известно, что процессы ПОЛ часто индуцируют набухание митохондрий или связаны с набуханием. Показана индукция набухания митохондрий надпочечников в присутствии о,п'-ДДД [5]. Неоднократно описаны набухание митохондрий, изменение структуры мембран при введении о,п'-ДДД собакам [1, 13, 17]. У собак, которым однократно скармливали о,п'-ДДД, через 24 ч наблюдалось снижение сигнала ЭПР с g-фактором 2,00 [6]. Снижение амплитуды сигнала ЭПР, возможно, явилось следствием расходования аскорбата в детоксикации перекисей, повреждающих митохондрии надпочечников у собак, получавших о,п'-ДДД.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гордиенко В. М., Козырицкий В. Г. // Архив. анат.— 1973.— Т. 65, № 7.— С. 90—95.

Рис. 2. Накопление МДА гомогенатами надпочечников морских свинок.

Обозначения те же, что на рис. 1.



2. Комиссаренко В. П., Местечкина А. Я., Микоша А. С. // Бюл. exper. биол.— 1974.— Т. 78, № 7.— С. 44—46.
3. Комиссаренко В. П., Челнакова И. С., Микоша А. С. // Там же.— 1978.— № 2.— С. 159—161.
4. Лемешко В. В., Қалиман П. А., Пикитченко Ю. В. // Биохимия.— 1981.— Т. 46, № 4.— С. 620—627.
5. Микоша А. С. // Докл. АН УССР. Сер. Б.— 1984.— № 7.— С. 68—70.
6. Микоша А. С., Береговская Н. Н. // Пробл. эндокринол.— 1983.— Т. 29, № 5.— С. 62—65.
7. Плохинский Н. А. // Алгоритмы биометрии.— М., 1980.
8. Челнакова И. С., Микоша А. С., Тодор И. Н. // Фармакол. и токсикол.— 1985.— № 6.— С. 104—106.
9. Bramhall S., Noak N., Wu A., Loewenberg J. R. // *Analyt. Biochem.*— 1969.— Vol. 31, N 1.— P. 146—148.
10. Brogan W. C., Miles P. R., Colby H. D. // *Biochim. biophys. Acta.*— 1981.— Vol. 663, N 1.— P. 230—238.
11. Burk R. F. // *Ibid.*— 1983.— Vol. 757.— P. 21—28.
12. Comporti M. // *Chem. Phys. Lipids.*— 1987.— Vol. 45, N 2—4.— P. 143—169.
13. Hart M. M., Reagan R. L., Adamson R. H. // *Toxicol. and Appl. Pharmacol.*— 1973.— Vol. 24, N 1.— P. 101—113.
14. Klimek J., Schaap A. P., Kimura T. // *Biochim. biophys. Acta.*— 1983.— Vol. 752, N 1.— P. 127—136.
15. Klimek J., Schaap A. P., Kimura T. // *Biochem. biophys. Res. Commun.*— 1983.— Vol. 110, N 2.— P. 559—566.
16. Peterson M. E. // *J. Amer. Vet. Med. Ass.*— 1983.— Vol. 182, N 5.— P. 527—528.
17. Powers J. M., Hennig G. R., Grooms G., Nichols J. // *Amer. J. Pathol.*— 1974.— Vol. 75, N 1.— P. 181—194.
18. Scarpa M., Rigo A., Maiorino M. et al. // *Biochim. biophys. Acta.*— 1984.— Vol. 801.— P. 215—219.
19. Sedlak J. // *Endocrinol. Experim.*— 1970.— Vol. 4, N 1.— P. 3—11.
20. Timcenko-Youssef L., Yamazaki R. K., Kimura T. // *J. Biol. Chem.*— 1985.— Vol. 260, N 24.— P. 13 355—13 359.
21. Tirmenstein M. A., Reed D. J. // *Arch. Biochem. Biophys.*— 1988.— Vol. 261, N 1.— P. 1—11.
22. Yonaha M., Tampo Y. // *Chem. Pharm. Bull.*— 1986.— Vol. 34, N 10.— P. 4195—4201.

Поступила 29.11.89

EFFECT OF ASCORBATE, NADPH AND CHLORIDITANE ON LIPID PEROXIDATION IN ADRENAL GLANDS OF DOG AND GUINEA PIGS *IN VITRO*

I. S. Chelnakova, N. D. Tron'ko, A. S. Mikosha

Institute of Endocrinology and Metabolism, Ministry of Public Health of the Ukrainian SSR, Kiev

Lipid peroxidation was studied in dog and guinea pig adrenal cortex homogenates *in vitro* in presence of ascorbate, NADPH and 1-(*o*-chlorophenyl)-1-(*p*-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane (*o,p'*-DDD, chloditane) the substance exhibiting the specific impairing effect on human and dog adrenal gland cortex. The higher rate of spontaneous lipid peroxidation was detected in adrenal gland homogenates of guinea pig. NADPH inhibited accumulation of hydroperoxides in dog adrenal gland homogenates, while ascorbate-Fe²⁺ — activated lipid peroxidation. Chloditane at concentrations 15.6 and 156 μ M decreased the rate of spontaneous lipid peroxidation in dog adrenal gland homogenates and increased — in guinea pig preparations. Chloditane decreased distinctly the rate of lipid peroxidation in guinea pig adrenal gland homogenates, which was stimulated by ascorbate.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.383-005.4-001.36-07:616.36-008.93:577.121.7

Г. С. Левин, Г. Я. Трemasова, С. А. Губаев

МИТОХОНДРИАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ В ПЕЧЕНИ ПРИ ВИСЦЕРАЛЬНО-ИШЕМИЧЕСКОМ ШОКЕ

НИИ гематологии и переливания крови Минздрава Узбекской ССР, Ташкент

Высокая смертность больных с острыми нарушениями кровообращения в системе мезентериаль-

ных сосудов, достигающая 70—95 % [1, 3, 16], в значительной степени обусловлена недостаточной изученностью патогенеза развивающегося при этом процессе висцерально-ишемического шока (ВИШ). Хотя восстановление кровотока в мезентериальных сосудах часто не обеспечивает выживаемости, в большинстве работ, посвященных острым нарушениям брыжеечного кровообращения, основное внимание уделено изменениям в ишемизированном органе [2, 14].

Развитие «необратимости» при ВИШ, так же как и при других видах шока, является одним из наиболее неблагоприятных исходов патологического процесса. Из многих гипотез «необратимости» [12, 15, 18, 19, 22] в последние годы отдается предпочтение тем, которые признают главенствующую роль энергетического дефицита в патогенезе этой стадии процесса. Согласно разработанной нами гипотезе [7], основным механизмом патогенеза «необратимой» фазы шока являются нарушения функции дыхательной цепи митохондрий. Предполагается, что ведущим фактором, приводящим к повреждениям митохондрий, является накопление токсических продуктов метаболизма, хотя исследования на моделях шока, сопровождающегося выраженным токсикозом (так называемый эндотоксический шок) немногочисленны [21, 24]. Кроме того, использованный для воспроизведения данного шока способ введения эндотоксина кишечной палочки не воспроизводит всех механизмов эндотоксикоза, в частности действия продуктов протеолиза ишемизированных тканей.

Целью настоящей работы явилось исследование характера нарушений митохондриального окисления в печени и их роли в патогенезе «необратимости» при ВИШ.

Методика. Опыты проведены на 39 кроликах-самцах массой 2,5±0,25 кг, содержащихся в условиях вивария и не принимавших пищу в течение 15 ч до опыта. ВИШ воспроизводили по способу, описанному ранее [8]. С целью увеличения срока воздействия токсинов, всасывающихся из ишемизированного кишечника, реваскуляризацию верхней брыжеечной артерии (ВБА) производили в 2 этапа. Одновременно с пережатием ВБА накладывали турникет на одну из ее крупных ветвей: частичное восстановление кровотока осуществляли через 1 ч после окклюзии ВБА (I этап), полное — по истечении 2-го часа снятием турникета с ее ветви (II этап).

Из показателей системной гемодинамики определяли артериальное давление (АД) манометрически, минутный объем кровообращения (МОК) [5], объем циркулирующей крови (ОЦК) [4], общее периферическое сопротивление (ОПС) [11], pH артериальной крови на аппарате АЗИВ-2, токсичность сыворотки крови [10].

Митохондрии из печени выделяли дифференциальным центрифугированием [23]. Среда выделения содержала 0,25 М сахарозу, 0,01 М трис-НСl, 0,001 М ЭДТА, pH 7,4. Полученные митохондрии ресуспендировали в среде, не содержащей ЭДТА, до концентрации белка 80—100 мг/мл. Уровень белка определяли биуретовым методом [17].

Потребление кислорода митохондриями регистрировали полярографически с помощью вращающегося платинового электрода [6]. Скорость дыхания выражали в нанogramмах атомов кислорода, потребленного за 1 мин на 1 мг белка митохондрий. Среда инкубации содержала 0,25 М сахарозу, 0,01 М трис-НСl, 0,02 М КСl, 0,02 М КН₂РO₄, 0,001 М ЭДТА, pH 7,4. Параллельно проводили опыты в среде инкубации, не содержащей ЭДТА. Субстратами служили натрия сукцинат и натрия глутамат, которые добавляли непосредственно в ячейку (конечные концентрации по 10 мМ). Добавка АДФ составляла 200 мкМ, 2,4-ДНФ — 30 мкМ. Белок в пробе составлял 5 мг. Метаболические состояния митохондрий обозначены следующими символами: V₂ — ско-

Показатели митохондриального окисления в печени кроликов в динамике ВИШ (субстрат — сукцинат), $M \pm m$

Группа животных	Скорость дыхания, нг-атома O_2 /мин/мг белка				t, с
	V_2	V_3	V_4	V_5	
Интактные ($n=12$)	$9,6 \pm 0,6$	$29,7 \pm 1,4$	$7,1 \pm 0,5$	$22,8 \pm 1,8$	$42,1 \pm 1,7$
Шок, воспроизведенный по [20] ($n=6$)	$8,5 \pm 0,7$	$28,2 \pm 3,6$	$6,2 \pm 0,7$	$25,6 \pm 1,4$	$55,1 \pm 7,3$
Шок, воспроизведенный по [8]:					
I этап:					
группа 1 ($n=8$)	$10,6 \pm 0,8$	$33,6 \pm 4,1$	$7,6 \pm 1,6$	$22,5 \pm 2,3$	$40,0 \pm 5,3$
группа 2 ($n=4$)	$7,5 \pm 0,36^*$	$16,7 \pm 0,65^*$	$4,7 \pm 0,65^*$	$15,0 \pm 2,5^*$	$77,5 \pm 11,7^*$
II этап:					
группа 1 ($n=9$)	$9,8 \pm 1,0$	$31,6 \pm 5,2$	$7,6 \pm 1,2$	$25,6 \pm 3,0$	$42,7 \pm 4,2$
группа 2 ($n=18$)	$7,1 \pm 0,27^*$	$12,9 \pm 0,8^*$	$3,7 \pm 0,33^*$	$10,5 \pm 0,78^*$	$100,8 \pm 6,6^*$

Примечание. Здесь и в табл. 2—3 звездочка — достоверность ($p < 0,05$) различия по сравнению с данными у интактных кроликов.

Таблица 2

Показатели митохондриального окисления в печени кроликов в динамике ВИШ (субстрат — глутамат), $M \pm m$

Группа животных	Скорость дыхания, нг-атома O_2 /мин/мг белка				t, с
	V_2	V_3	V_4	V_5	
Интактные ($n=12$)	$6,2 \pm 0,4$	$19,2 \pm 1,2$	$4,0 \pm 0,4$	$13,3 \pm 1,2$	$47,1 \pm 2,2$
Шок, воспроизведенный по [20] ($n=6$)	$6,8 \pm 0,65$	$19,0 \pm 3,5$	$4,2 \pm 0,3$	$15,2 \pm 2,5$	$45,8 \pm 1,8$
Шок, воспроизведенный по [8]:					
I этап:					
группа 1 ($n=4$)	$6,7 \pm 0,3$	$25,0 \pm 1,8$	$3,5 \pm 0,45$	$14,0 \pm 1,8$	$32,5 \pm 1,8^*$
группа 2 ($n=8$)	$5,6 \pm 0,3$	$13,0 \pm 0,7^*$	$2,7 \pm 0,34^*$	$9,4 \pm 0,9^*$	$67,5 \pm 5,0^*$
II этап:					
группа 1 ($n=8$)	$6,4 \pm 0,6$	$19,1 \pm 1,8$	$4,1 \pm 0,65$	$14,4 \pm 1,1$	$52,4 \pm 7,7$
группа 2 ($n=19$)	$5,3 \pm 0,27$	$9,3 \pm 0,68^*$	$2,3 \pm 0,14^*$	$6,7 \pm 0,68^*$	$100,5 \pm 8,8^*$

рость дыхания на экзогенном субстрате; V_3 — скорость дыхания после добавки АДФ; V_4 — скорость дыхания в «отрегулированном» состоянии; V_5 — скорость дыхания после разобщения 2,4-ДФНФ; t — время фосфорилирования (в с);

ДК_н — дыхательный контроль по Чансу ($\frac{V_3}{V_4}$); ДК_л — дыха-

тельный контроль по Ларди-Велману ($\frac{V_3}{V_2}$). Об активности

цитохромоксидазы судили по скорости окисления митохондриями 5 мМ аскорбата в присутствии 200 мкМ тетраметил-п-фенилендиамина (ТМФД). Добавка цитохрома составляла 20 мкМ. Все цифровые данные подвергнуты статистической обработке методом непрямых разностей [9].

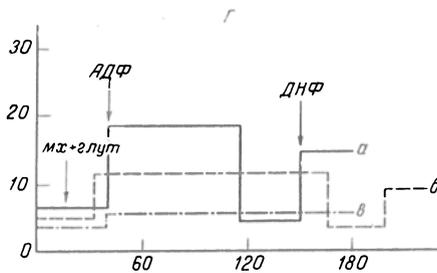
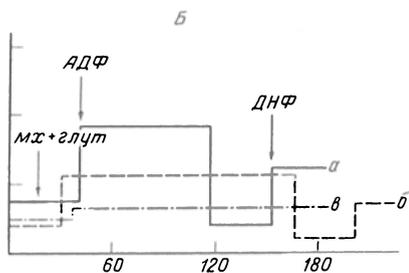
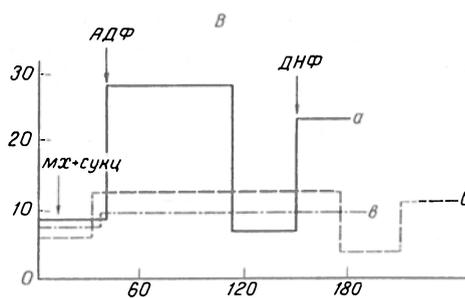
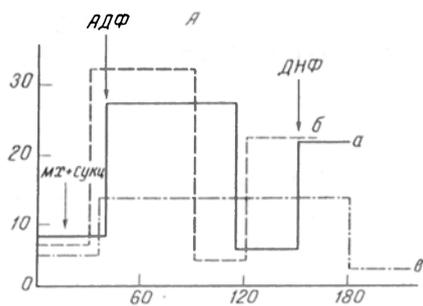
Результаты и их обсуждение. В эксперименте ВИШ, как правило, моделируют пережатием ВБА сроком на 2 ч с последующей одномоментной реваскуляризацией [20]. Этот способ достаточно полно воспроизводит клиническую картину шока, характеризующуюся резким снижением АД, МОК, ОЦК, температуры тела, развитием метаболического ацидоза и токсемии. Однако, как показали наши исследования, существенным недостатком этого способа является то, что при восстановлении кровотока образовавшиеся в ишемизированном кишечнике токсины быстро и в большом количестве поступают в общий кровоток. В результате резкого перераспределения ОЦК и возникающей сердечно-сосудистой недостаточности длительность жизни животных составляет лишь $11,0 \pm 1,5$ мин. За это время метаболические изменения в клетках, свойственные «необратимой» стадии шока, не успевают развиваться. В частности, отсутствуют заметные изменения в митохондриальном окислении (табл. 1—2), нарушение которого считают

[7, 13] важнейшим признаком «шоковой клетки».

При двухэтапной реваскуляризации ВБА в условиях продолжающейся ишемии части кишечника частичное восстановление кровотока (I этап) сопровождалось снижением АД на 53 %, МОК на 75 %, ОЦК на 30 % от исходного уровня. Параллельно повышалось ОПС (на 50 %). рН артериальной крови снизился с $7,45 \pm 0,08$ до $7,15 \pm 0,03$, а уровень токсичности сыворотки крови повысился более чем в 3 раза. При этом функциональная активность митохондрий печени в среднем мало отличалась от результатов, полученных у интактных кроликов. Однако анализ каждого эксперимента в отдельности позволил уже на этой стадии процесса установить у части животных (у 4 из 12 при окислении сукцината и у 8 из 12 при окислении глутамата) типичные для шока признаки нарушения митохондриального окисления. В табл. 1 и 2 они выделены в специальную группу (группа 2) в отличие от животных, митохондрии которых не отличались от нормы или имели даже более высокую скорость фосфорилирования (группа 1).

При окислении обоих субстратов митохондрии печени кроликов группы 2 наблюдалось снижение скорости переноса электронов в состояниях 2, 3, 4 и 5 (на 22, 44, 33 и 34 % соответственно) и увеличение (на 84 %) времени фосфорилирования.

Исследования этих же митохондрий, проведенные в среде инкубации без ЭДТА (для исключения сопрягающего эффекта комплексона), выявили выраженные нарушения в первом пункте



Показатели дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий печени в динамике ВИШ.

А, Б — I этап шока, В, Г — II этап шока. а — исходное состояние, б — группа 1, в — группа 2. А и В — субстрат сукцинат, Б и Г — глутамат. По осям ординат — скорость поглощения кислорода (в нг-атома/мин/мг белка); по осям абсцисс — время, с.

сопряжения редокс-цепи. Так, при окислении глутамата снижение показателей V_2 , V_3 , V_4 , V_5 (на 33, 41, 49 и 50 % соответственно) и увеличение (на 76 %) времени фосфорилирования наблюдалось у 50 % животных (см. рисунок). У 20 % кроликов стимуляция дыхания добавленным АДФ была очень низкой, ДК по Чансу не определялся, а разобщающий эффект 2,4-ДНФ отсутствовал. В то же время степень изменений при окислении сукцината оставалась той же, что в среде с ЭДТА.

Активность цитохромоксидазы, измеренная в системах с аскорбатом и ТМФД, оказалась подавленной (на 32 %) у тех кроликов, у которых на этой стадии ВИШ был снижен перенос электронов. В присутствии экзогенного цитохрома с этот показатель был на 38 % ниже уровня нормы. Можно предположить, что после окклюзии и частичной реваскуляризации ВБА у большинства кроликов торможение транспорта электронов происходит преимущественно в первом пункте сопряжения.

Более выраженные нарушения функций организма и митохондриального окисления в печени животных наблюдали после полной реваскуляризации ВБА. Через 30—90 мин после восстановления кровотока в ней АД снизилось на 80 %, МОК — на 82 %, ОЦК — на 51 %, ОПС увеличилось в 2,5 раза по сравнению с исходными показателями. Повышение в 6,5 раза токсичности крови и снижение рН артериальной крови до критических величин ($6,97 \pm 0,1$) свидетельствовали о высокой степени токсемии и метаболического ацидоза.

В этот период в митохондриях печени большинства животных наблюдалось резкое замедление переноса электронов по всей дыхательной цепи, включая и сукцинатный путь. Так, при окислении сукцината снижение показателей V_2 , V_3 , V_4 , V_5 (на 26, 57, 48 и 54 % соответственно) и увеличение (на 139 %) времени фосфорилирования отмечалось уже у 67 % (18 из 27) кроликов (см. табл. 1). Низкие скорости дыхания и увеличение времени фосфорилирования

характерны и для митохондрий, окисляющих НАД-зависимый субстрат (см. табл. 2).

Исследования, проведенные в среде, не содержащей ЭДТА, выявили нарушение фосфорилирующей способности митохондрий. При окислении сукцината из 20 животных с резко сниженным переносом электронов у 4 стимуляции дыхания добавленным АДФ не наблюдалось; при окислении глутамата фосфорилирующая способность отсутствовала у 10 кроликов из 27 (см. рисунок).

В терминальной стадии ВИШ наблюдалось более резкое (на 50 %), чем после I этапа, снижение активности цитохромоксидазы, которое уже не удавалось восстановить до исходных величин с помощью экзогенного цитохрома с. Этот факт может быть обусловлен не только разрыхлением митохондриальной мембраны и вымыванием цитохрома с, но и повреждением самого фермента. На глубину повреждений и малую их обратимость в терминальной стадии ВИШ указывает также то обстоятельство, что добавление к среде ЭДТА практически не улучшает окислительной способности митохондрий.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что при ВИШ, индуцированном общепринятым способом [20], кратковременный контакт токсинов с клеткой, даже при условии высокой концентрации их, не приводит к заметным нарушениям окислительных реакций митохондрий гепатоцитов. Использование модели, при которой благодаря двухэтапной реваскуляризации ВБА происходит постепенное поступление в кровоток всасывающихся в кишечнике токсических веществ, позволило выяснить динамику повреждения функций митохондрий печени. Характерными изменениями в начальном периоде ВИШ являются нарушение окисления митохондриями глутамата и снижение активности цитохромоксидазы. По мере прогрессирования процесса и увеличения продолжительности интоксикации происходит нарушение транспорта электронов по всей дыхательной цепи и резкое снижение фосфорилирующей способности митохонд-

Таблица 3

Количественный состав суспензии митохондрий печени при ВИШ ($M \pm m$)

Группа животных	Сухой остаток, %	Объем митохондриальной суспензии, мл/г сухой ткани	Концентрация митохондриального белка, мг/г сухой ткани
Интактные ($n=12$)	$29,5 \pm 0,5$	$0,48 \pm 0,06$	$66,7 \pm 7,5$
ВИШ, воспроизведенный по [8]:			
I этап ($n=12$)	$25,6 \pm 0,8^*$	$0,24 \pm 0,04^*$	$51,9 \pm 5,4$
II этап ($n=27$)	$24,5 \pm 0,6^*$	$0,18 \pm 0,02^*$	$62,8 \pm 4,1$

рий вплоть до ее исчезновения. Факт неодинаковой степени расстройств у разных животных можно скорее связать с индивидуальностью организма, чем с особенностями течения патологического процесса, поскольку какой-либо заметной корреляции со степенью изменений показателей гемодинамики и ацидоза у животных этих групп установить не удалось. Лишь в терминальной стадии процесса у кроликов с резко выраженными нарушениями митохондриальных функций токсичность сыворотки крови была на 21 % выше ($p < 0,05$), чем в группе, где нарушения митохондриального окисления были менее выражены.

Кроме уже приводившихся фактов значительного повреждения митохондрий при ВИШ, заслуживает внимания следующее обстоятельство. При незначительно изменяющемся показателе сухого остатка печени наблюдается резкое по сравнению с интактными животными снижение количества митохондриальной суспензии — на 51 % после I этапа и на 63 % в терминальной стадии шока (табл. 3). Поскольку при полярографических исследованиях объем пробы определяется концентрацией белка (которая практически остается в пределах нормы), дыхательная и фосфорилирующая функции при ВИШ осуществляются в 2—3 раза меньшим количеством митохондрий, чем у интактных животных.

Таким образом, ВИШ, сопровождающийся длительной эндотоксемией, протекает с характерными изменениями функции митохондрий. Начальному периоду процесса свойственны преимущественное нарушение первого пункта окисления НАД-зависимого субстрата и обратимое снижение активности цитохромоксидазы. В терминальной стадии шока развиваются типичные для «шоковой клетки» метаболические расстройства, проявляющиеся торможением переноса электронов по всей редокс-цепи и резкое снижение фосфорилирующей способности митохондрий вплоть до полного отсутствия реакции на АДФ. Угнетение цитохромоксидазы, наблюдаемое у большей части животных, в этой стадии процесса не удается восстановить экзогенным цитохромом *c*, что свидетельствует о глубоком повреждении дистального отрезка дыхательной цепи. Приведенные данные указывают на значительную роль эндогенной интоксикации в повреждении митохондрий при шоке.

ЛИТЕРАТУРА

1. Август В. К. // Вестн. хир.— 1981.— № 11.— С. 24—26.
2. Воробьева Е. А., Комарова О. А., Долгош С. С.,

- Полевой Д. А. // Адаптивные и компенсаторные механизмы системы микроциркуляции.— М., 1984.— С. 98—103.
3. Гагарин В. В. // Хирургия.— 1984.— № 5.— С. 35—37.
4. Гуревич М. И. Основы гемодинамики.— Киев, 1979.
5. Джурко Б. И. Патогенез нарушений системной гемодинамики и механизмы их компенсации при травматическом шоке и кровопотере: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— Ростов-н/Д., 1981.
6. Кондрашова М. П., Николаева Л. В., Чистяков В. В., Калинин Л. П. // Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом.— М., 1973.— С. 50—59.
7. Левин Г. С. // Пат. физиол.— 1987.— № 2.— С. 10—15.
8. Левин Г. С., Губаев С. А., Тремасова Г. Я., Камеичкая Ц. Л. Способ моделирования висцерально-ишемического шока. А. с. 1368910 СССР // Открытия.— 1982.— № 14.
9. Монцайцго-Эрингене Е. В. // Пат. физиол.— 1964.— № 4.— С. 71—78.
10. Пафомов Г. А., Ширинова М. П., Бурдыга Ф. А. // Сов. мед.— 1980.— № 1.— С. 42—45.
11. Селезнев С. А., Вашетина С. М., Мазуркевич Г. С. Комплексная оценка кровообращения в экспериментальной патологии.— Л., 1975.
12. Сиверцева В. Н. // Травматический шок.— Л., 1975.— С. 69—71.
13. Шок: Терминология и классификация: Шоковая клетка. Патофизиология и лечение / Шутеу Ю., Бендилэ Т., Кафрице А. и др.— Бухарест, 1981.
14. Cooperman M., Martin E. W., Carey L. C. // Ann. Surg.— 1980.— Vol. 191, N 1.— P. 57—58.
15. Downing S. E. // Tex. Rep. Biol. Med.— 1979.— Vol. 39, N 2.— P. 157—172.
16. Gulla P., Caiello M. // Minerva chir.— 1985.— Vol. 40, N 9.— P. 649—652.
17. Gornall A. G., Bardawill C. J., David M. M. // J. biol. Chem.— 1949.— Vol. 177, N 3.— P. 751—766.
18. Haglund V. // Z. med. Lab. Diagn.— 1985.— Bd 4.— S. 183—186.
19. Haglund V., Gundgren O. // Brit. J. Surg.— 1979.— Vol. 66, N 3.— P. 155—158.
20. Manohar M., Tyagi R. P. S. // Amer. J. Physiol.— 1973.— Vol. 225, N 4.— P. 887—892.
21. Mela L., Bacalzo L. V., Miller G. D. // Ibid.— 1971.— Vol. 220, N 2.— P. 256—266.
22. Okuda M., Fukui T. // Jap. Circulat. J.— 1974.— Vol. 38.— P. 497—508.
23. Schneider W. C. // J. biol. Chem.— 1948.— Vol. 176, N 1.— P. 256—266.
24. White R. R., Mela L., Bacalzo L. V. et al. // Surgery.— 1973.— Vol. 73, N 4.— P. 525—534.

Поступила 05.10.89

MITOCHONDRIAL OXIDATION IN LIVER TISSUE UNDER CONDITIONS OF VISCERAL-ISCHEMIC SHOCK

G. S. Levin, G. Ya. Tremasova, S. A. Gubaev

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

Distinct decrease in respiratory and phosphorylating functions of liver mitochondria was found under conditions of visceral-ischemic shock induced in rabbits after 2 hrs occlusion of superior mesenteric artery and the subsequent step-by-step revascularization. Endogenous intoxication was mainly responsible for inhibition of electron transport through respiratory chain. Impairment of mitochondrial oxidation is one of important factors related to development of the shock "irreversible" phase.

А. В. Долгов, М. И. Душкин, Е. В. Мандрикова

ВЛИЯНИЕ ПРОГЕСТЕРОНА НА МЕТАБОЛИЗМ ЭФИРОВ ХОЛЕСТЕРИНА В МАКРОФАГАХ, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ С АЦЕТИЛИРОВАННЫМИ ЛИПОПРОТЕИДАМИ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ

Институт терапии Сибирского отделения АМН СССР, Новосибирск

Образование в сосудистой ткани пенных клеток является характерным и обязательным показателем атеросклеротического процесса [6]. Интенсивное образование пенных клеток из моноцитов крови и макрофагов (МФ) и последующий их распад тесно связаны с формированием фиброзной бляшки [6, 18].

МФ, культивируемые в присутствии модифицированных липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), накапливают большие количества эфиров холестерина (ЭХС) и трансформируются в типичные пенные клетки [6, 10]. При этом в МФ значительно возрастает скорость эстерификации свободного холестерина (СХС), катализируемой ацил-КоА-холестерол-О-ацилтрансферазой (АХАТ), и снижается экскреция холестерина (ХС) из клеток [5, 10]. Известно, что прогестерон в фармакологических концентрациях обратимо ингибирует активность АХАТ в микросомальной фракции клеток [21], и его добавление к культивируемым МФ снижает скорость эстерификации СХС [5].

Настоящая работа посвящена исследованию влияния прогестерона на эстерификацию СХС, содержание СХС и ЭХС в МФ, культивируемых с ацелированными ЛПНП, и мобилизацию ХС из МФ, культивируемых в отсутствие и в присутствии ЛП высокой плотности (ЛПВП).

Методика. ЛПНП (1,019—1,055 г/мл) и ЛПВП (1,08—1,21 г/мл) выделяли из плазмы доноров методом ультрацентрифугирования [2]. Ацелирование ЛПНП проводили с использованием уксусного ангидрида [10]. Связывание ($1-^{14}\text{C}$)-уксусного ангидрида с ЛПНП проводили тем же способом, инкубируя в течение 1 ч при 0°C 100 мкКи уксусного ангидрида с удельной радиоактивностью 19,9 мКи/ммоль в 1 мл раствора, содержащего 2 мг белка ЛПНП. Удаление несвязанного уксусного ангидрида осуществляли хроматографией на сефадексе G-25 с последующим диализом [10]. Удельная радиоактивность ($1-^{14}\text{C}$)-ацелированных ЛПНП составляла 9000 имп/мин на 1 мкг белка ЛПНП. Связывание ($1-^{14}\text{C}$)-олеата («Amersham», Англия) удельной радиоактивностью 56 мКи/ммоль со свободным от жирных кислот бычьим сывороточным альбумином (БСА) («Sigma», США) осуществляли, добавляя по каплям раствор меченой олеиновой кислоты в 30 мкл ацетона к 10 % раствору БСА на 0,05 М фосфатном буфере pH 7,4 и 0,15 М NaCl (ФБС) [11]. Раствор продували азотом при 37°C до исчезновения запаха ацетона. Удельная радиоактивность связанного ($1-^{14}\text{C}$)-олеата составляла 4200—8600 имп/мин на 1 нмоль БСА. Включение ($4-^{14}\text{C}$)-СХС с удельной радиоактивностью 55 мКи/ммоль в ацелированные ЛПНП осуществляли, инкубируя 100 мкКи ($4-^{14}\text{C}$)-СХС в 5 мл ФБС, содержащего 2 мг белка ацелированных ЛПНП в 1 мл, при 37°C в течение 4 ч при мягком перемешивании [17]. До 20 % радиоактивного СХС связывалось с ЛПНП. Удельная радиоактивность ($4-^{14}\text{C}$)-СХС составляла 825—1025 имп/мин на 1 нмоль общего ХС в ЛПНП. Все растворы стерилизовали фильтрацией (диаметром пор 0,22 мкм фильтра).

Резидентные МФ получали из перитонеальной жидкости 40 крыс-самцов Вистар [8]. Крысам под эфирным наркозом внутрибрюшинно вводили 25 мл среды А: среда 199, 20 ммоль 2-гидроксиэтилпиперазинэтансульфоновая кислота (ГЭПЭС) («Serva», ФРГ) (pH 7,38), гентамицин и пенициллин (100 ЕД в 1 мл). Перитонеальные клетки собирали центрифугированием (400 г, 10 мин) и ресуспендировали в среде А, содержащей 10 % сыворотку крыс, до плотности $(2-3) \cdot 10^6$ клеток в 1 мл. По 2 мл суспензии вносили в пластиковые чашки Петри диаметром 35 мм («Falcon») и инкубировали при 37°C в течение 2 ч. Клеточный монослой отмывали 7 раз по 3 мл среды А и МФ использовали в эксперименте.

Прогестерон вводили в среду в виде 0,2 % раствора в этаноле в количестве не более 5 мкл на 1 мл среды. Скорость синтеза ЭХС и триглицеридов (ТГ) в МФ оценивали по включению ($1-^{14}\text{C}$)-олеата в липиды [11]. Для этого МФ культивировали в среде А, содержащей 10 % сыворотку крупного рогатого скота (КРС) и 0,2 ммоль ($1-^{14}\text{C}$)-олеата, связанного с БСА, в течение 18 ч. Клеточный монослой отмывали дважды 10 % раствором БСА на ФБС и 5 раз раствором ФБС. Экстракцию липидов проводили смесью гексана и изопропанола в объемном соотношении 3:2 [5], и отдельные классы липидов получали методом тонкослойной хроматографии на силикагеле Н [1]. Липидные пятна, соответствующие ЭХС и ТГ, переносили в сцинтилляционные сосуды и подсчитывали радиоактивность в сцинтилляторе на основе толуола (4 г ППО, 0,3 г ПОПОН в 1 л толуола) в жидкостном сцинтилляционном счетчике («Marsk-3», США). Результаты выражали в наномолях эстерифицированного олеата на 1 мг клеточного белка.

Для обогащения ($4-^{14}\text{C}$)-ХС МФ клеточный монослой инкубировали в среде А, содержащей 50 мкг белка ацелированных ЛПНП в 1 мл, которые включали в себя $(16-21) \times 10^6$ имп/мин ($4-^{14}\text{C}$)-СХС на 1 мг белка. После инкубации в течение 24 ч при 37°C клеточный монослой промывали средой 199, содержащей 5 % БСА, и вновь инкубировали 12 ч в среде А, не содержащей ЛПНП [5]. Клетки промывали тем же способом, заливали свежей средой А и инкубировали при 37°C в течение 24 ч в среде, не содержащей и содержащей ЛПВП (100 мкг белка на 1 мл среды). Экскрецию ($4-^{14}\text{C}$)-ХС из МФ оценивали по радиоактивности в среде инкубации [5]. Для этого из 1,5 мл среды экстрагировали ($4-^{14}\text{C}$)-ХС методом [4], органический растворитель переносили в сцинтилляционные сосуды и выпаривали под вакуумом. Радиоактивность подсчитывали в описанных выше условиях. Результаты выражали в наномолях ХС на 1 мг клеточного белка.

Содержание ($4-^{14}\text{C}$)-ХС в ЭХС и СХС МФ определяли в липидном экстракте клеток [5] после разделения СХС и ЭХС тонкослойной хроматографией на силикагеле [1]. Липидные пятна, соответствующие СХС и ЭХС, переносили в сцинтилляционные сосуды и подсчитывали радиоактивность в сцинтиляторе на основе толуола в описанных выше условиях. Результаты выражали в наномолях ХС на 1 мг клеточного белка.

Определение общего и свободного ХС в МФ осуществляли стандартным энзиматическим методом, используя реактивы фирмы «Boehringer Mannheim» (ФРГ). После экстракции липида указанным выше методом [5] органический растворитель удаляли в токе азота при температуре 60°C , предварительно добавляя в каждую пробирку 15 мкл 20 % раствора тритона X-100 в метаноле [3]. К сухому остатку добавляли 0,6 мл энзиматического реагента для определения общего или свободного ХС, пробы встряхивали, инкубировали 15 мин при 37°C и фотометрировали при 500 нм в спектрофотометре «Голохром» (Франция). Результаты выражали в микрограммах ХС на 1 мг клеточного белка, в качестве стандарта используя СХС («Sigma», США). Белок в МФ определяли после экстракции липидов. Для этого в каждую чашку Петри вносили 0,6 мл 0,2 М раствора и через 2 ч брали аликвоты для определения белка [15].

Данные обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 представлены данные о скорости включения ($1-^{14}\text{C}$)-олеата в ЭХС МФ, культивируемых в присутствии модифицированных ацелированным ЛПНП (50 мкг белка ЛПНП в 1 мл среды). При этом скорость образования ЭХС в МФ

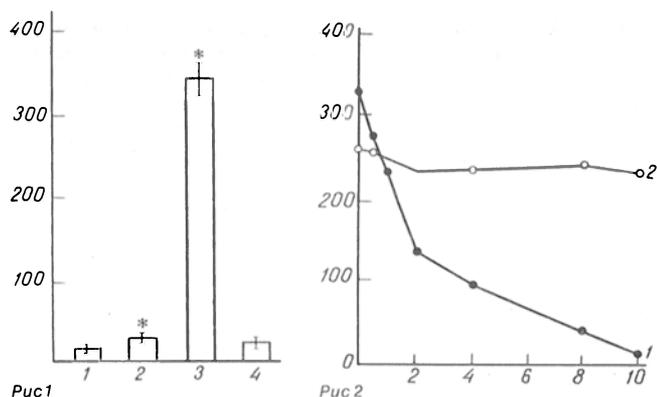


Рис. 1. Включение ($1-^{14}\text{C}$)-олеата в ЭХС МФ, культивируемых с ацетилированными и нативными ЛПНП.

По оси абсцисс: 1—среда 199; 2—среда 199 с нативными ЛПНП (50 мкг белка в 1 мл), 3—среда 199 с ацетилированными ЛПНП (50 мкг белка в 1 мл), 4—среда 199 с ацетилированными ЛПНП (150 мкг белка в 1 мл) и декстран-сульфатом (5 мкг в 1 мл); по оси ординат — скорость включения ($1-^{14}\text{C}$)-олеата в ЭХС МФ (в имоль олеата на 1 мг клеточного белка за 18 ч инкубации). Звездочка — достоверные различия с контролем (1) ($p < 0,05$). Число измерений 5.

Рис. 2. Влияние прогестерона на включение ($1-^{14}\text{C}$)-олеата в ЭХС (1) и ТГ (2) МФ, культивируемых с ацетилированными ЛПНП (50 мкг белка в 1 мл).

По оси абсцисс — содержание прогестерона в среде (в мкг в 1 мл), по оси ординат — скорость включения ($1-^{14}\text{C}$)-олеата в ЭХС и ТГ МФ (в имоль олеата на 1 мг клеточного белка за 18 ч инкубации). Число измерений 5.

возрастает в 17—20 раз, в то время как инкубация МФ с нативными ЛПНП (50 мкг белка ЛПНП в 1 мл среды) сопровождается повышением этого показателя только в 2—2,5 раза. Конкурентный ингибитор захвата модифицированных ЛПНП — декстран-сульфат [11], добавленный в концентрации 5 мкг в 1 мл среды, препятствует увеличению скорости включения ($1-^{14}\text{C}$)-олеата в ЭХС МФ в условиях их инкубации с ацетилированными ЛПНП. Полученные данные свидетельствуют, что усиление образования ЭХС в МФ в присутствии ацетилированных ЛПНП происходит в результате захвата модифицированных ЛПНП.

(Прогестерон, добавленный в среду (от 0,5 до 10 мкг в 1 мл), вызывал дозозависимое снижение скорости включения ($1-^{14}\text{C}$)-олеата в ЭХС МФ (рис. 2). При этом в концентрации 10 мкг/мл среды прогестерон почти полностью ингибировал образование ЭХС в МФ, культивируемых с ацетилированными ЛПНП (50 мкг белка ЛПНП в 1 мл среды). В то же время в исследуемых концентрациях прогестерон не оказывал влияния на скорость включения ($1-^{14}\text{C}$)-олеата в ТГ (см. рис. 2). Полученные нами данные, а также данные литературы [5] свидетельствуют об относительной специфичности ингибирования реэстерификации СХС прогестероном в МФ.

Результаты исследований, представленные на рис. 3, свидетельствуют, что ингибирующие эстерификации СХС прогестероном в МФ, культивируемых с ацетилированными ЛПНП, сопровождается повышением концентрации СХС в клетках. Так, если инкубация МФ с ацетилированными ЛПНП в отсутствие прогестерона приводит к повышению уровня СХС на 20 %, а общего ХС на 220 % от контрольного уровня, то в присутствии гормона (10 мкг/мл) наблюдается повышение общего ХС в МФ на 45 % в основном за счет повышения уровня СХС. Добавление в среду ЛПВП (100 мкг белка ЛПВП в 1 мл) препят-

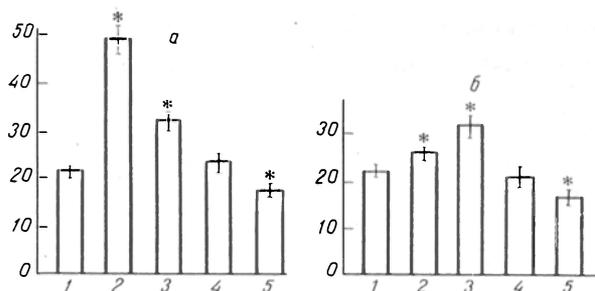


Рис. 3. Влияние прогестерона на содержание общего (а) и свободного (б) ХС в МФ, культивируемых в присутствии ацетилированных ЛПНП (50 мкг на 1 мл) и ЛПВП (100 мкг на 1 мл) в течение 10 ч.

По осм ординат — содержание ХС в МФ (в мкг на 1 мг клеточного белка); по осм абсцисс 1—среда 199, 2—среда 199, содержащая ацетилированные ЛПНП, 3—среда 199, содержащая прогестерон (10 мкг в 1 мл) и ацетилированные ЛПНП, 4—среда 199, содержащая ацетилированные ЛПНП и ЛПВП, 5—среда 199, содержащая прогестерон (10 мкг в 1 мл), ацетилированные ЛПНП и ЛПВП. Звездочка — достоверные различия с контролем (1); ($p < 0,05$). Число опытов 4.

ствует повышению концентрации общего и свободного ХС в МФ при их культивировании с ацетилированными ЛПНП. При культивировании МФ в среде, содержащей одновременно ацетилированные ЛПНП, ЛПВП и прогестерон, содержание общего и свободного ХС в клетках снижается на 20 % от контрольного уровня.

Снижение концентрации общего ХС в МФ при воздействии прогестерона (см. рис. 3) нельзя объяснить только ингибированием эстерификации СХС в клетках. Поэтому мы исследовали накопление ($1-^{14}\text{C}$)-ацетилированных ЛПНП в МФ при инкубации в присутствии прогестерона в течение 10 ч. Содержание ассоциированных с клетками ($1-^{14}\text{C}$)-ацетилированных ЛПНП в отсутствие прогестерона составило $500,07 \pm 42,88$ нг белка ЛПНП на 1 мг клеточного белка в час. В присутствии 10 мкг прогестерона в 1 мл среды захват ($1-^{14}\text{C}$)-ацетилированных ЛПНП достоверно снижался на 22 % ($p < 0,05$, $n=6$), составляя $391,13 \pm 35,83$ нг белка ЛПНП на 1 мг клеточного белка в час. Можно полагать, что прогестерон (10 мкг в 1 мл среды) почти полностью ингибирует реэстерификацию СХС, частично снижает захват ацетилированных ЛПНП и вызывает повышение уровня СХС в МФ, культивируемых в отсутствие ЛПВП.

Как известно, концентрация ЭХС в МФ является результирующей динамического равновесия процессов эстерификации СХС с участием АХАТ и гидролиза ЭХС с участием цитоплазматической холестеролэстеразы [5]. В то же время остается неизученным характер изменения экскреции ХС из МФ, обогащенных ЭХС, в условиях ингибирования АХАТ. Для изучения этого вопроса МФ обогащали ХС, инкубируя клеточный монослой в течение 24 ч с ацетилированными ЛПНП, содержащими ($4-^{14}\text{C}$)-СХС. После преинкубации клеток в течение 10 ч в среде 199 для стабилизации уровня СХС и ЭХС в МФ среду заменяли свежей и исследовали влияние прогестерона (10 мкг в 1 мл) на экскрецию ($4-^{14}\text{C}$)-ХС из МФ в культуральную среду. При этом было обнаружено, что в отсутствие внешних акценторов ХС гормон не оказывает влияния на экскрецию ($4-^{14}\text{C}$)-СХС из МФ (рис. 4). В то же время при добавлении в среду к МФ ЛПВП (100 мкг в 1 мл), существенно повышающих выход ХС из

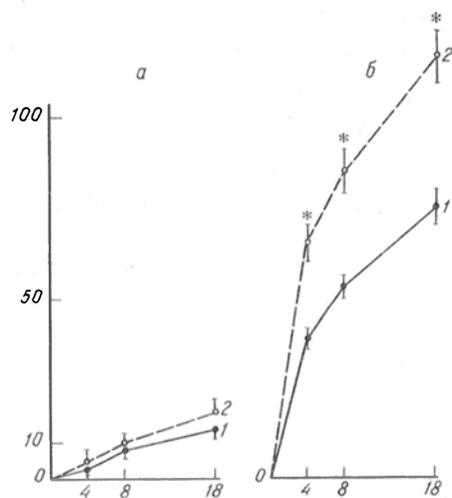


Рис. 4. Влияние прогестерона на экскрецию (4—¹⁴С)-ХС из МФ, культивируемых в отсутствие (а) и в присутствии ЛПВП (б).

1 — среда 199, 2 — среда 199, содержащая прогестерон (10 мкг в 1 мл). По осям абсцисс — продолжительность инкубации, ч; по оси ординат — содержание (4—¹⁴С)-ХС в среде инкубации (в имоль ХС на 1 мг белка клеток в 1 мл). Звездочка — достоверные отличия от контроля (1); ($p < 0,05$). Число измерений 4.

клеток, прогестерон вызывает повышение этого показателя в 1,5—1,6 раза на протяжении 18 ч инкубации. Следующий эксперимент, результаты которого представлены в таблице, демонстрирует влияние прогестерона на изменение содержания (4—¹⁴С)-ХС в ЭХС и СХС в МФ и культуральной среде после 24 ч инкубации клеток. Как видно из таблицы, в отсутствие ЛПВП, акцептирующих клеточный ХС, прогестерон снижал концентрацию ЭХС в МФ, одновременно повышая концентрацию СХС. В условиях инкубации клеток с ЛПВП содержание СХС и ЭХС в МФ уменьшалось параллельно увеличению содержания (4—¹⁴С)-ХС в среде инкубации. Прогестерон в присутствии ЛПВП вызывал еще более значимое снижение ЭХС в МФ, повышая его выход из клеток.

Известно, что прогестины, включенные в состав контрацептивов, могут вызывать существенные нарушения холестеринового обмена, приводящие к повышению содержания ХС, снижению ЛПВП в плазме крови [7], повышению концентрации ХС в мононуклеарных лимфоцитах крови [12] и в желчи [14]. Поэтому длительный прием контрацептивов, содержащих прогестины, рассматривается как фактор риска развития атеросклероза [7, 14] и желчекаменной болезни

Влияние прогестерона на содержание включенного (4—¹⁴С)-холестерина в СХС и ЭХС макрофагов и экскрецию (4—¹⁴С)-холестерина из клеток, культивируемых в присутствии (100 мкг белка в 1 мл) и в отсутствие ЛПВП в течение 24 ч

Условия культивирования МФ	Содержание (4— ¹⁴ С)-ХС в МФ, имоль на 1 мг белка клеток		Содержание (4— ¹⁴ С)-СХС в среде, имоль на 1 мг белка клеток
	СХС	ЭХС	
Среда А	101,5±9,3	178±11,2	16±2,3
Среда А+прогестерон	140,2±18*	135±12*	22±4
Среда А+ЛПВП	55,2±8,2*	120,4±14,3*	117,3±12*
Среда А+ЛПВП+ +прогестерон	53,4±8,4*	94,5±11,6*	155,4±23,4*

Примечание. Звездочка — достоверность различия показателей с таковыми, полученными при культивировании клеток в среде А ($p < 0,05$). Число экспериментов 4.

[14]. В экспериментах на крысах показано, что введение прогестерона (25—30 мг на 1 кг массы) вызывает ингибирование АХАТ в печени, сопряженное с повышением концентрации СХС в желчи [19]. Заслуживают внимания также данные о нарушении лизосомного гидролиза ЭХС в клетках печени при введении крысам прогестерона [9]. В экспериментах с мембранами микросом клеток печени, кишечника, плаценты и с культивируемыми клетками (в частности, с МФ [20]) установлено, что прогестерон ингибирует эстерификацию СХС, хотя сам при этом не эстерифицируется [21]. Механизм ингибирования АХАТ не связан с неспецифическим воздействием прогестерона на мембрану и его конкуренцией за субстратный пул фермента [21]. Полученные в настоящей работе данные о дозозависимом ингибировании эстерификации СХС прогестероном в МФ находятся в соответствии с результатами исследований других авторов [5, 20]. Необходимо отметить, что использованные в экспериментах концентрации прогестерона (от 0,5 до 10 мкг в 1 мл среды) превышают физиологические концентрации и могут иметь значение лишь при применении высоких доз прогестерона или его аналогов.

В условиях поступления ХС в МФ путем нерегулируемого захвата модифицированных ЛПНП повышение скорости эстерификации СХС является ведущим механизмом, обеспечивающим постоянство содержания СХС в мембранах, от чего зависит состояние многих клеточных процессов [6, 18]. В условиях эксперимента с ацетилированными ЛПНП получены данные о значительном увеличении СХС в МФ при воздействии прогестерона. При этом инкубация МФ с гормоном в течение 10 ч вызывала нарушение процесса захвата ацетилированных ЛПНП клетками. Некоторые авторы [13] предлагают использовать ингибиторы АХАТ для снижения ЭХС в пенных клетках. Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют, что ингибирование эстерификации СХС прогестероном в МФ, предвительно обогащенных ЭХС, не оказывает существенного влияния на экскрецию ХС из клеток и содержание общего ХС, но приводит к значительному повышению концентрации СХС в МФ. Снижение содержания ХС в клетках при ингибировании АХАТ прогестероном может быть достигнуто только в условиях сохранения акцепторной функции ЛПВП, которая, как известно, значительно нарушается в условиях формирования атеросклеротического процесса [18]. Таким образом, на основании данных литературы и результатов настоящего исследования можно заключить, что воздействие высоких концентраций прогестерона, а также, вероятно, других препаратов, ингибирующих АХАТ в пенных клетках, может приводить к значительному повышению уровня СХС в мембранах, способствовать нарушению функций МФ (по утилизации модифицированных ЛПНП) и развитию патологического процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Душкин М. И., Долгов А. В. // Вопр. мед. химии — 1986. — № 3. — С. 98—101.

2. Современные методы в биохимии / Под ред. В. П. Ореховича.— М., 1977.— С. 248—253.
3. Aouidet A., De Graeve J., Thiers J. C. et al. // Clin. Chem.— 1983.— Vol. 29, N 11.— P. 2001—2002.
4. Bligh E. G., Dyer W. J. // Canad. J. Biochem. Physiol.— 1959.— Vol. 37.— P. 911—917.
5. Brown M. S., Ho Y. K., Goldstein J. L. // J. biol. Chem.— 1980.— Vol. 255, N 19.— P. 9344—9352.
6. Brown M. S., Goldstein J. L. // Ann. Rev. Biochem.— 1983.— Vol. 52.— P. 223—261.
7. Farish E., Parkin D. E., Fletcher C. D. et al. // Clin. chim. Acta.— 1986.— Vol. 159, N 2.— P. 147—151.
8. Fukuga S., Takahashi K., Horinchi S. // Acta histochem. cytochem.— 1986.— Vol. 19, N 1.— P. 145—152.
9. Gandarias J. M., Lacont M., Martinier M. S. // Biochem. Med. Metab. Biol.— 1986.— Vol. 36, N 1.— P. 14—24.
10. Goldstein J. L., Ho Y. K., Basu S. K., Brown M. S. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1979.— Vol. 76.— P. 333—337.
11. Gianturco S. H., Bradley W. A., Gotto A. M. et al. // J. clin. Invest.— 1982.— Vol. 70.— P. 168—178.
12. Hagemenes F. C., Yatsu F. M., Manaugh L. C. // Lipids.— 1980.— Vol. 15, N 1.— P. 39—43.
13. Kelly J. L., Suenram C. A., Rozek M. M. et al. // Biochim. biophys. Acta.— 1988.— Vol. 260.— P. 83—90.
14. Kern F., Everson G. T. Jr., De Mark B. et al. // J. Lab. clin. Med.— 1982.— Vol. 99, N 6.— P. 798—805.
15. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem.— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
16. Matur S. N., Field F. J., Magan M. B., Armstrong M. L. // Biochim. biophys. Acta.— 1985.— Vol. 834.— P. 48—57.
17. Shireman R. B., Remsen J. F. // Biochim. biophys. Acta.— 1982.— Vol. 711.— P. 281—289.
18. Steinberg D. // Circulation.— 1987.— Vol. 76, N 3.— P. 508—514.
19. Stone B. G., Erikson S. K., Craig W. Y., Cooper A. D. // J. clin. Invest.— 1985.— Vol. 76, N 5.— P. 1773—1781.
20. Suckling K. E., Stange E. F. // J. Lipid Res.— 1985.— Vol. 26, N 6.— P. 647—671.
21. Synouri-Vrettakou S., Mitropoulos K. A. // Biochem. J.— 1983.— Vol. 215.— P. 191—199.

Поступила 05.10.89

EFFECT OF PROGESTERONE ON METABOLISM OF CHOLESTEROL ESTERS IN MACROPHAGES CULTIVATED IN PRESENCE OF ACETYL-DERIVATIVES OF LOW DENSITY LIPOPROTEINS

A. V. Dolgov, M. I. Dushkin, E. V. Mandrikova

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

Effect of progesterone on esterification of free cholesterol, on content of free cholesterol and its esters was studied in rat macrophages, cultivated in presence of acetyl-derivatives of low density lipoproteins (Ac-LDL), as well as on mobilization of cholesterol from macrophages. Progesterone at a dose of 0.5-10 µg per 1 ml of cultivating medium caused dose-dependent inhibition of $1\text{-}^{14}\text{C}$ -oleate incorporation into cholesterol esters of macrophages cultivated with Ac-LDL ($< 50\text{ }\mu\text{g}$ of protein/ml). In the medium free of LDL progesterone caused an increase of cholesterol in macrophages by 45%, while addition of 100 µg/ml LDL led to a decrease of free cholesterol by 20% of the initial level. If macrophages pre-enriched with 4-C^{14} -cholesterol were cultivated in LDL-containing medium, progesterone increased the 4-C^{14} -cholesterol liberation into medium and decreased the cholesterol content in macrophages. Under conditions of macrophages incubation in the LDL-free medium, progesterone increased the free cholesterol content in these cells but did not affect the 4-C^{14} -cholesterol liberation into medium. The data obtained suggest that the progesterone-induced inhibition of free cholesterol esterification may increase its mobilization from macrophages only if the LDL acceptory function is unaltered.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 615.285.7.099.07:[616-008.939.6+616-008.93:577.113+616.153.1:577.152.311

О. Ю. Абакумова, Н. Г. Куценко, Л. Б. Троенкина, В. Т. Мазаев, В. А. Гуляев, Р. А. Бродский, Ц. С. Хугиев, М. К. Каримова

ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ БУТИФОСОМ НА СИНТЕЗ БЕЛКА И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНАХ КРЫС И АКТИВНОСТЬ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ КРОВИ

І ММИ им. И. М. Сеченова, Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Метаболизму пестицидов, избирательной токсичности, канцерогенности и мутагенности реакционноспособных промежуточных продуктов их метаболизма в настоящее время уделяется большое внимание [5, 16]. Пестицид бутифос — эфир трифосфорной кислоты — используется в качестве дефолианта хлопчатника. Хотя он считается среднетоксичным препаратом [6], при его длительном применении наблюдается значительное токсико-химическое поражение печени с выраженными патоморфологическими и структурными изменениями в тканях печени и почек [4], патологические изменения кожи [11].

В настоящее время имеется достаточно экспериментальных данных, чтобы считать практически любой пестицид потенциальным мутагеном, канцерогеном [19, 31] и тератогеном [8, 20], последнее особенно относится к фосфорорганическим пестицидам. Показано [18], что пестицид токсафен может индуцировать развитие гепатоцеллюлярных опухолей. Поскольку развитие подобных патологических состояний связано с изменением пролиферативной активности клеток и матричной активности ДНК, представляет интерес изучение действия бутифоса на синтез нуклеиновых кислот и белка в печени и других органах.

Ранее мы [3] показали, что хроническая интоксикация бутифосом крыс в течение 3 мес привела к значительным изменениям в синтезе нуклеиновых кислот и белка в печени крыс. Задачей настоящего исследования было сравнительное исследование действия бутифоса на синтез ДНК и белка в клетках печени, селезенки и почек и на активность холинэстеразы крови в зависимости от длительности интоксикации бутифосом.

Методика. Действие бутифоса изучали на 300 беспородных белых крысах-самцах массой 180—200 г. В каждой опытной и контрольной группе было 4—5 животных. Для исследования синтеза белка использовали ^{14}C -гидролизат белка (ЧССР), синтеза ДНК — ^3H -тимидин (СССР) в дозе 40 и 100 мкКи на крысу соответственно. Затравку крыс бутифосом проводили в течение 6 мес через зонд двумя дозами препарата — $1/10$ и $1/50$ от DL_{50} (DL_{50} для крыс составляет 170—250 мг/кг). Выделение ядерной и митохондриальной фракций гомогената печени описано ранее [1]. Количество радиоактивности в кислоторастворимой и кислотонерастворимой фракциях гомогената и его фракций измеряли по методу, описанному ранее [2]. Активность холинэстеразы крови измеряли по методу [22]. Содержание РНК и ДНК в печени, почках и селезенке измеряли по модифицированному методу [17]. Была проведена обычная электронная микроскопия клеток печени и почек. При обычной микроскопии клетки окрашивали гематоксилин-эозинном.

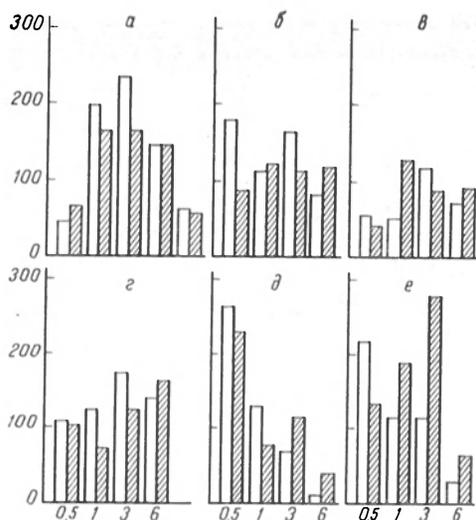


Рис. 1. Включение ^3H -тимидина (а, б, в) и ^{14}C -аминокислот (z, d, e) в ДНК или белки клеток печени (а, z), селезенки (б, d) и почек (в, e) крыс при хронической интоксикации бутифосом в дозах $1/10$ (светлый столбец) и $1/50$ от DL_{50} (заштрихованный столбец).

По оси абсцисс — продолжительность интоксикации, мес; по оси ординат — включение ^3H -тимидина и ^{14}C -аминокислот.

Результаты и обсуждение. При интоксикации крыс бутифосом уже через 2 нед наблюдали крайне низкий синтез ДНК в печени

и почках (рис. 1), сопровождающийся значительным снижением содержания РНК и ДНК в исследованных органах к концу 1-го месяца (табл. 1 и 2), что свидетельствует о токсическом повреждении клеток печени на уровне генома. Гистологическая картина препаратов печени и почек свидетельствует о некродистрофических изменениях: токсическом гепатозе в печени и фибропластическом гломерулонефрите в почках (рис. 2).

К 3 мес интоксикации наблюдается значительное увеличение включения ^3H -тимидина в ДНК клеток печени по сравнению с контролем, более выраженное при дозе $1/10$ от DL_{50} (см. рис. 1). К этому же времени повышается содержание нуклеиновых кислот в печени. Эти факты можно объяснить тем, что в печени появляются резистентные клетки, в которых был восстановлен синтез ДНК после длительной обработки бутифосом. В результате деления указанных клеток печень восстанавливает свой клеточный пул, частично погибший из-за цитотоксического действия бутифоса. Аналогичную картину мы наблюдали ранее при действии метилнитрозомочевины [2]. Можно также предположить, что в полиплоидных клетках печени в данном случае повреждается только часть генома и неповрежденная часть вовлекается в репликацию. К 6 мес интоксикации доля неповрежденного генома уменьшается и соответственно снижается уровень включения

Таблица 1

Содержание РНК, ДНК (в мг на 1 г печени) и соотношение РНК/ДНК в печени крыс после обработки различными дозами бутифоса

Условия эксперимента	РНК		ДНК		РНК/ДНК	
	1/10 от DL_{50}	1/50 от DL_{50}	1/10 от DL_{50}	1/50 от DL_{50}	1/10 от DL_{50}	1/50 от DL_{50}
Затравка, нед:						
2	$9,11 \pm 3,31$	$10,24 \pm 1,30$	$2,78 \pm 0,26$	$3,08 \pm 0,63$	3,40	3,50
4	$8,65 \pm 0,07$	$9,89 \pm 0,98$	$2,11 \pm 0,26$	$2,84 \pm 0,49$	4,15	3,65
12	$13,10 \pm 0,62$	$11,20 \pm 0,26$	$3,47 \pm 0,18$	$3,96 \pm 0,03$	3,80	3,49
24	$7,73 \pm 1,53$	$9,30 \pm 0,52$	$2,31 \pm 1,13$	$2,40 \pm 0,84$	3,34	3,88
Через 4 нед после окончания затравки	$8,83 \pm 0,78$	$8,41 \pm 0,56$	$2,63 \pm 0,18$	$2,11 \pm 0,27$	3,36	3,98
Контроль	$9,35 \pm 0,30$		$2,78 \pm 0,42$		3,36	

Таблица 2

Содержание РНК и ДНК (в мг на 1 г ткани) и соотношение РНК/ДНК в почках и селезенке крыс после обработки различными дозами бутифоса

Длительность затравки, нед	РНК		ДНК		РНК/ДНК	
	1/10 от DL_{50}	1/50 от DL_{50}	1/10 от DL_{50}	1/50 от DL_{50}	1/10 от DL_{50}	1/50 от DL_{50}
Почки						
2	$3,12 \pm 1,34$	$3,09 \pm 1,19$	$2,15 \pm 0,96$	$3,56 \pm 0,22$	1,45	0,87
4	$1,19 \pm 0,33$	$1,25 \pm 0,28$	$0,95 \pm 0,18$	$0,94 \pm 0,23$	1,26	1,33
12	$4,29 \pm 0,49$	$3,51 \pm 1,10$	$3,92 \pm 0,14$	$2,87 \pm 0,97$	1,10	1,22
24	$2,28 \pm 0,42$	$1,34 \pm 0,42$	$1,96 \pm 0,27$	$1,51 \pm 0,35$	0,86	1,13
Контроль	$4,15 \pm 0,66$		$3,12 \pm 0,52$		1,33	
Селезенка						
2	$9,12 \pm 1,56$	$13,42 \pm 0,52$	$10,27 \pm 1,04$	$11,86 \pm 1,64$	0,89	1,13
4	$8,41 \pm 0,09$	$8,25 \pm 1,92$	$5,61 \pm 1,68$	$9,41 \pm 4,6$	1,50	0,88
12	$5,66 \pm 2,74$	$5,68 \pm 1,86$	$5,91 \pm 3,69$	$5,64 \pm 1,10$	0,96	1,01
24	$4,50 \pm 0,33$	$2,34 \pm 0,41$	$4,45 \pm 1,25$	$4,63 \pm 1,56$	0,39	0,51
Контроль	$8,68 \pm 2,89$		$11,52 \pm 3,19$		0,75	

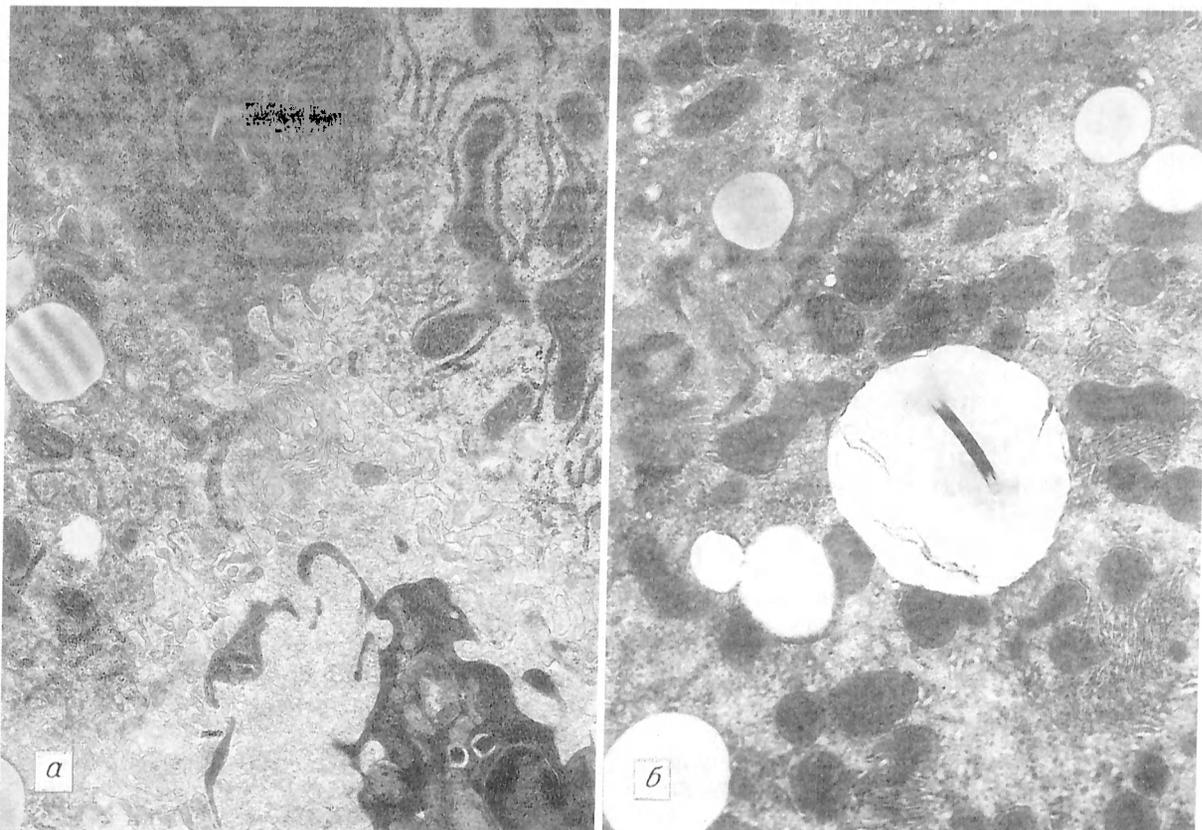


Рис. 2. Электронная микроскопия печени крыс, затравленных бутифосом в дозе $1/10$ от DL_{50} в течение 3 мес (а, ув. 17 000) и в дозе $1/50$ от DL_{50} в течение 6 мес (б, ув. 13 600).

3H -тимидина в ДНК клеток печени. Резкое подавление синтеза ДНК наблюдается через месяц после прекращения обработки крыс бутифосом; это можно объяснить значительным повреждением клеток печени, что подтверждают и электронно-микроскопические исследования. На рис. 2 видны жировое перерождение клеток печени, набухание митохондрий, деградация эндоплазматического ретикулула и гибель гепатоцитов.

Хроническая интоксикация бутифосом приводит к значительному снижению содержания ДНК и РНК в почках и селезенке (см. табл. 2). Это может свидетельствовать либо о значительном повреждении процессов синтеза нуклеиновых кислот, либо о повышении скорости их деградации. Вероятнее всего последнее, так как наблюдаемый уровень включения 3H -тимидина в ДНК клеток почек и селезенки нельзя полностью отнести

к процессам репарации ДНК (см. рис. 1).

На гистологических препаратах почек к 6 мес интоксикации обнаружены некродистрофические изменения, склероз сосудов клубочков, расширение просвета извитых канальцев с деструкцией эпителиоцитов и очаговый склероз стромы корковой части. Уже к 3 мес интоксикации наблюдали значительные количества погибших уплотненных клеток.

При фракционировании гомогената печени крыс было проанализировано включение 3H -тимидина в ДНК митохондрий и цитоплазмы (табл. 3). Синтез митохондриальной ДНК, несколько сниженный при дозе $1/10$ от DL_{50} через 2 нед интоксикации, затем повышается при действии обеих доз, и особенно значительно к 6 мес при дозе $1/10$ от DL_{50} . При этом в митохондриях наблюдаются структурные изменения (см. рис. 2). Такая гипертрофия митохондрий при различных повреждениях тканей обычно сопровождается усилением синтеза нуклеиновых кислот [7].

Увеличение количества меченой ДНК в цитоплазме печени, особенно к 3 мес интоксикации, возможно, связано с повышением хрупкости ядер под влиянием бутифоса и их разрушением при гомогенизации клеток.

Анализ радиоактивности кислоторастворимого пула клеток печени, почек и селезенки показал увеличение примерно на 30% проницаемости мембран клеток для 3H -тимидина; доза $1/10$ от DL_{50} была при этом более эффективна (табл. 4). В то же время поступление меченых аминокислот в клетки всех исследуемых органов было снижено на 10—20%.

Таблица 3

Включение 3H -тимидина (в % к контролю) в ДНК ядерной, митохондриальной и цитоплазматической фракций гомогената печени крыс, затравленных различными дозами бутифоса

Длительность затравки, нед	Ядра		Митохондрии		Цитоплазма	
	$1/10$ от DL_{50}	$1/50$ от DL_{50}	$1/10$ от DL_{50}	$1/50$ от DL_{50}	$1/10$ от DL_{50}	$1/150$ от DL_{50}
2	56	60	70	107	45	73
4	202	171	133	153	348	184
12	239	156	144	155	1733	924
24	172	164	279	184	217	223
Через 4 нед после окончания затравки	37	34	91	88	132	95

Содержание радиоактивности (в имп/мин на 1 г ткани) в кислоторастворимой фракции гомогената различных органов крыс, затравленных в течение 3 мес бутифосом, после введения ^3H -тимидина или ^{14}C -гидролизата белка

Условия эксперимента	Печень			Почки			Селезенка		
	1/10 от DL ₅₀	1/50 от DL ₅₀	контроль	1/10 от DL ₅₀	1/50 от DL ₅₀	контроль	1/10 от DL ₅₀	1/50 от DL ₅₀	контроль
^3H -тимидин	135 020	124 159	97 998	92 891	81 323	72 125	68 278	61 801	46 059
^{14}C -гидролизат белка	186 312	171 199	202 842	405 547	401 110	495 577	202 418	215 615	230 669

Синтез белка в печени повышается к 3 и 6 мес интоксикации, коррелируя с увеличением синтеза ДНК (см. рис. 1). Синтез белка в селезенке, резко повышенный к 2 нед, снижается к 6 мес, особенно при дозе $1/10$ от DL₅₀. Снижается также уровень синтеза белка к этому же сроку и в почках, хотя доза $1/50$ от DL₅₀ оказывает стимулирующее действие на синтез белка в этом органе в ранние сроки интоксикации. Полученные данные подтверждают значительную цитотоксичность бутифоса для клеток селезенки и почек, свидетельствуют о большой степени повреждения белок-синтезирующей системы клеток селезенки и почек при длительной хронической интоксикации бутифосом.

Активность холинэстеразы крови крыс была снижена к 9—11-й неделе интоксикации на 50—60 и 90—95 % по сравнению с таковой в контроле при дозах $1/50$ и $1/10$ от DL₅₀ соответственно. Затем при продолжении обработки животных бутифосом активность фермента в крови несколько повышалась, что коррелировало с повышением уровня синтеза белка в печени (рис. 3). С 17-й недели эксперимента активность холинэстеразы крови у крыс, получавших $1/50$ от DL₅₀ бутифоса, была практически на уровне контроля, но при дозе $1/10$ от DL₅₀ она оставалась на 40 % ниже контрольного уровня.

В литературе описаны аналогичные данные, полученные при действии фосфорорганических пестицидов и, в частности, бутифоса на активность холинэстеразы [6, 17, 23, 27, 29]. С подавлением активности холинэстеразы связывают как острый, так и хронический эффект фосфорорганических соединений [13]. Вероятный механизм действия заключается в образовании фосфорилированного ковалентно связанного и необратимо блокированного «эстеразного» участка

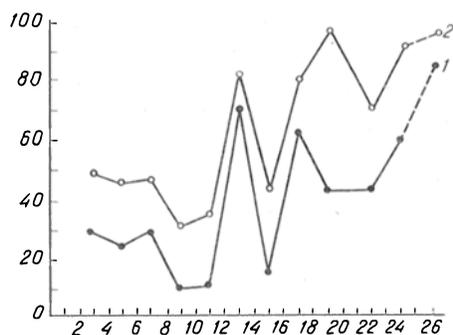


Рис. 3. Активность холинэстеразы крови крыс при хронической интоксикации бутифосом в дозе $1/10$ DL₅₀ (1) и $1/50$ от DL₅₀ (2). По оси абсцисс — время интоксикации, нед; по оси ординат — процент к контролю. С 24-й по 26-ю неделю затравку крыс бутифосом не проводили.

на молекуле фермента «нейротоксической эстеразы» [14].

Обнаруженные изменения содержания и биосинтеза нуклеиновых кислот при хронической интоксикации бутифосом свидетельствуют о его непосредственном действии на генетический аппарат клеток. Активным веществом здесь может быть сам пестицид и (или) его метаболиты, образующиеся в микросомах клеток печени с участием микросомальных оксидаз со смешанной функцией [9, 12, 25] или при неферментативных превращениях. Возможно, при биотрансформации бутифоса образуются токсичные соединения типа меркаптанов.

Цитотоксическое, мутагенное и канцерогенное действие фосфорорганических пестицидов [26, 30, 31], возможно, обусловлено их способностью связываться с нуклеофильными центрами белков, нуклеиновых кислот. Известно, что образование ДНК аддуктов может быть использовано при анализе основных путей появления канцерогенных метаболитов [28]. В связи с многообразием воздействия пестицидов есть все основания предположить возможность их значимого вклада в повышение в последнее время частоты развития онкологических заболеваний и генетических отклонений в районах интенсивного применения пестицидов [15]. Нами также обнаружено повышение более чем в 4 раза заболеваемости первичным раком печени, совпадающее с началом периода интенсивного применения пестицидов в хлопкосеющих районах Узбекистана.

В настоящее время представляется достаточно обоснованным, что заключение о токсичности пестицидов должно основываться не только на анализе активности холинэстеразы, карбоксиэстеразы или оксидазы со смешанной функцией [15], но и на анализе молекулярных механизмов действия на процессы синтеза белка, РНК и ДНК, их влияния на кинетику клеточной пролиферации, как в опытах *in vivo*, так и с применением тест-системы *in vitro* для человека [21]. В качестве одной из таких тест-систем уже предложено использовать трансформированные лимфоциты и культуру клеток HeLa [24].

ЛИТЕРАТУРА

1. Абакумова О. Ю. // Современные методы в биохимии. — М., 1977. — С. 338—343.
2. Абакумова О. Ю., Куценко Н. Г. // Биохимия. — 1981. — Т. 46, вып. 2. — С. 1049—1056.
3. Абакумова О. Ю., Куценко Н. Г., Троевникова Л. Б. и др. // Всесоюзный биохим. съезд, 5-й: Тезисы докладов. — М., 1986. — Т. 3. — С. 240.
4. Ахмедова Р. А. Токсикология бутифоса и гигиена труда при его применении в хлопководстве: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Ташкент, 1966.

5. Казан Ю. С. // Токсикология фосфорорганических пестицидов.— М., 1977.
6. Вредные вещества в промышленности / Под ред. Н. В. Лазарева, И. Д. Гадаскиной.— Л., 1977.— С. 199—200.
7. Мотлох Н. Н. // Радиобиология.— 1981.— Т. 21, вып. 5.— С. 666—670.
8. Николаев Д. А., Лурье И. В. // Генетические последствия использования химических средств защиты растений, 4-й: Тезисы докладов.— Рига, 1984.— С. 39—41.
9. Туцков Л. А. // Токсикология.— М., 1981.— Т. 12.— С. 5—64.
10. Трудолобова М. Г. // Современные методы в биохимии.— М., 1977.— С. 313—316.
11. Юсупов Б. Ю. // Мед. журн. Узбекистана.— 1983.— № 7.— С. 42—43.
12. Abbas M. // J. Environ. Sci. Health.— 1980.— Bd 15, N 6. S. 907—927.
13. Aldridge W. N. // Sci. Progr.— 1981.— Vol. 67, N 265.— P. 131—147.
14. Baron R. L. // Ann. Rev. Entomol.— 1981.— Vol. 26.— P. 29—48.
15. Brooks G. T. // Xenobiotica.— 1986.— Vol. 16, N 10—11.— P. 989—1009.
16. Caldwell J., Gibson G. G., Gorrod J. W., Parke D. W. // Xenobiotica.— 1986.— Vol. 16, N 10—11.— P. 883—1078.
17. Chemnitz J. M., Hasselmeyer K. H., Zech R. // Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.— 1980.— Bd 361, N 9.— S. 1274—1275.
18. Chu K. C., Cueto C., Ward J. M. // J. Toxicol. Environ. Hlth.— 1981.— Vol. 8.— P. 251—280.
19. Crosby D. G. // Ann. Rev. Entomol.— 1981.— Vol. 26.— P. 201—218.
20. Dobbins P. // J. Florida med. Ass.— 1967.— Vol. 54.— P. 452.
21. Esser H. O. // Xenobiotica.— 1986.— Vol. 16, N 10—11.— P. 1031—1045.
22. Fleicher J. M., Pope E. G. // Arch. industr. Hlth.— 1955.— Vol. 11.— P. 332—334.
23. Fleming W. J. // Arch. environ. Contam. Toxicol.— 1981.— Vol. 10, N 2.— P. 215—229.
24. Fricker S. P., Mundy G. R. // Biochem. Soc. Trans.— 1986.— Vol. 14, N 4.— P. 693.
25. Hodgson E., Kulkarni A. P., Fabacher D. L., Robacker K. M. // J. environ. Sci. Hlth.— 1980.— Vol. 15, N 6.— P. 723—754.
26. Kilgore W. W., Li-Ming-yu // Residue Rev.— 1973.— Vol. 48.— P. 141—161.
27. Kisielinski T., Gajewski D., Gidyńska T., Owczarczyk H. // Acta physiol. pol.— 1980.— Vol. 31, N 3.— P. 279—288.
28. Laib R. J., Kreiling R., Vangala R. R. // J. Cancer Res.— 1987.— Vol. 113, Suppl.— P. 18.
29. Rajendran N. K. // Pesticides.— 1973.— Vol. 7, N 10.— P. 31—32.
30. Waters M. D., Simmon V. E., Mitchell A. D. et al. // J. environ. Sci. Hlth.— 1980.— Vol. B-15, N 6.— P. 867—906.
31. Waters M. D., Sandhu S. S., Simmon V. E. et al. // Basic Life Sci.— 1982.— Vol 21.— P. 275—326.

Поступила 31.12.88

EFFECT OF CHRONIC INTOXICATION WITH BUTIPHOS ON PROTEIN AND NUCLEIC ACIDS SYNTHESIS IN VARIOUS RAT TISSUES AND ON ACTIVITY OF CHOLINESTERASE IN BLOOD

O. Yu. Abakumova, N. G. Kutsenko, L. B. Trojenkina, V. T. Mazaeov, V. A. Guljaev, R. A. Brodsky, Ts. S. Khuliev, M. K. Karimova

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

Two doses of butiphos ($1/10$ and $1/50$ LD₅₀) were administered into rats within 6 months. Content of DNA was distinctly decreased in liver and kidney tissues within the first 2 weeks of the pesticide administration. Then DNA synthesis was increased 2-fold in liver tissue and remained high during all the 6 months of intoxication. Protein synthesis was increased in liver tissue within 3 months of the administration and remained elevated up to the end of experiment. High rate of protein synthesis, found in kidney and spleen tissues at the initial steps, was markedly

decreased within 6 months. Content of DNA and RNA was decreased in the tissues studied within 1 month of the intoxication and restored within 3 months, while it remained at considerably lower level in liver and spleen tissues as compared with control values. Cholinesterase activity was lowered by 90 % in blood within 11 weeks with the subsequent increase; but in the experimental group intoxicated with butiphos at $1/10$ LD₅₀ the enzymatic activity constituted only 60 % of control values within 6 months. Histological study showed development of necrodystrophy in liver tissue and of fibroplastic glomerulonephritis in kidney. The deteriorating effect of butiphos on cellular genome functions appears to relate not only to its cytotoxicity but also to the cancerogenic and mutagenic properties of the pesticide.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 612.015.1:577.152.31.06:612.391

А. В. Васильев, Н. С. Брегадзе, В. А. Тутельян

ЛИЗОСОМАЛЬНЫЕ ГИДРОЛАЗЫ РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНОВ КРЫС В ПРОЦЕССАХ КЛЕТОЧНОГО ПИТАНИЯ

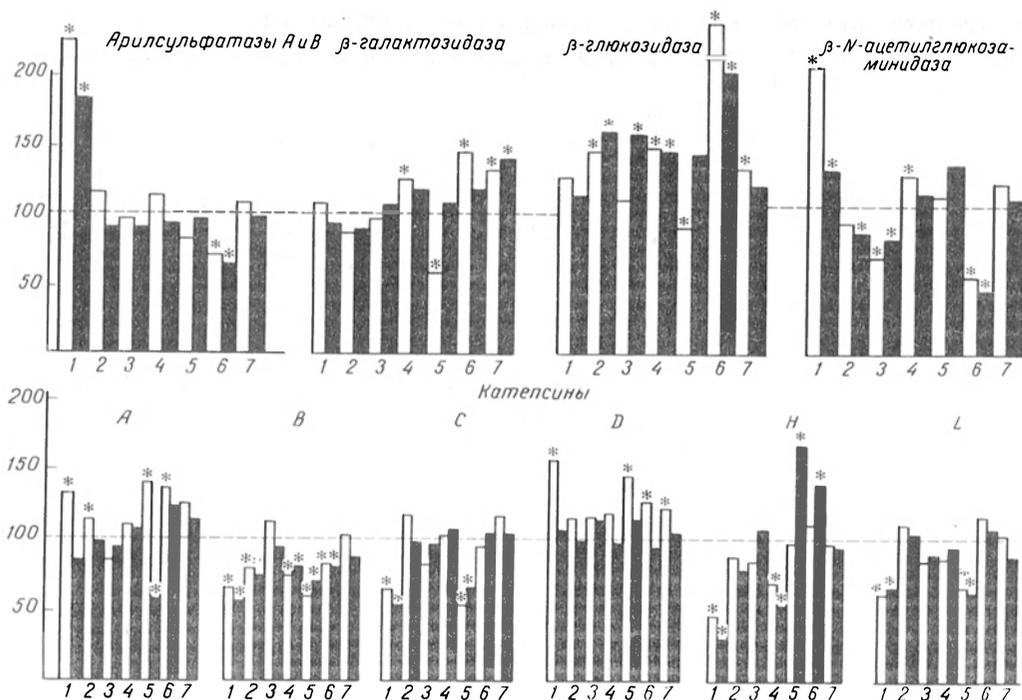
Институт питания АМН СССР, Москва

В условиях белкового или полного голодания происходит активация процессов клеточного питания, обеспечиваемых реализацией реконструктивной функции лизосом, что характеризуется интенсификацией аутофагоцитоза и увеличением активности ряда лизосомальных гидролаз в печени, сердце и скелетных мышцах [4—6, 16, 20, 21]. Подобная активация лизосомальных гидролаз при белковой недостаточности и голодании рассматривается как адаптивная реакция лизосомального аппарата, направленная на деструкцию наименее необходимых для жизнедеятельности клеток структурных макромолекул с последующей реутилизацией соответствующих мономеров на биосинтетические нужды [8, 10, 12, 13]. В этом аспекте особый интерес представляет специфичный характер изменения активности комплекса протеолитических ферментов лизосом. Было показано, что в печени и скелетных мышцах крыс при белковой недостаточности и голодании имеют место реципрокные отношения между катепсинами А, Д и В, С, L, проявляющиеся в данных условиях активацией ферментов первой группы и снижением активности ферментов группы тиоловых протеиназ [2, 11, 14, 15]. Последнее может быть связано с дефицитом SH-групп, вызванным недостатком метионина и цистеина и изменением пула свободных аминокислот, что может определять интенсивность внутрилизосомального протеолиза [13—15].

Цель работы — сравнительное исследование активности лизосомальных протеиназ — катепсинов А (КФ 3.4.12A.1), В (КФ 3.4.22.1), С (КФ 3.4.14.1), Д (КФ 3.4.23.5), Н (КФ 3.4.22) и L (КФ 3.4.22.15), а также арилсульфатаз А и В (КФ 3.1.6.1), β-галактозидазы (КФ 3.2.1.23), β-глюкозидазы (КФ 3.2.1.21) и β-N-ацетилглюкозаминидазы (КФ 3.2.1.30) в разных органах крыс при белковом голодании и введении на этом фоне метионина.

Методика

Эксперименты проводили на крысах-самцах Вистар с исходной массой 190—200 г. Животные в течение 10 дней



Активность лизосомальных гидролаз в разных органах крыс при белковом голодании.

По оси ординат — активность ферментов (% от контроля); по оси абсцисс: 1 — печень, 2 — почки, 3 — селезенка, 4 — тимус, 5 — сердце, 6 — скелетные мышцы, 7 — мозг. Светлые столбики — безбелковый рацион; темные — безбелковый рацион + метионин. Звездочка — $p < 0,05$ относительно контроля.

получали рацион с 18 % содержанием белка (контроль); изокалорийный безбелковый и безбелковый рацион, обогащенный L-метионином (1 г на 100 г сухой массы рациона). Спустя 10 дней животных декапитировали и в гомогенатах печени, почек, селезенки, тимуса, сердца, скелетных мышцах и мозга, приготовленных по стандартной методике с использованием 0,25 М сахарозы рН 7,4, содержащей 1 мМ ЭДТА [7], определяли активность катепсинов А, В, С, D, Н и L, используя в качестве субстратов соответственно КБЗ-глу-L-тир; бензоил-арг-арг-метокси-β-нафтиламид, гли-фен-β-нафтиламид, гемоглобин, N-арг-7-амидо-4-метилкумарин и N-КБЗ-фен-арг-7-амидо-4-метилкумарин («Sigma», США) с помощью спектрофлуориметрических и спектрофотометрических методов [1, 3, 17], а также активность арилсульфатаз А и В, β-галактозидазы, β-глюкозидазы и β-N-ацетилглюкозаминидазы спектрофотометрическими методами, основанными на применении ультрамикросистемы биохимического анализа, разработанной А. А. Покровским и соавт. [7, 9]. Содержание белка в исследованном материале определяли методом Лоури [18].

Результаты и обсуждение

К концу экспериментального периода масса тела животных обеих опытных групп была ниже на 30 %, чем у контрольных крыс. Относительная масса печени, почек и сердца была практически одинаковой во всех группах, тогда как относительная масса селезенки и тимуса у животных, получавших безбелковые рационы как с метионином, так и без него, уменьшилась по сравнению с контролем на 27—30 и 37—58 % соответственно, а относительная масса мозга в этих условиях возросла на 45 %.

Результаты ферментного анализа, представленные на рисунке, свидетельствуют, что наиболее выраженные изменения в активности лизосомальных гликозидаз и арилсульфатаз А и В были выявлены в печени и скелетных мышцах. При этом если в печени животных обеих экспериментальных групп обнаружена достоверная активация арилсульфатаз А и В и β-N-ацетилглюкозаминидазы на 23—130 %, то активность этих ферментов в скелетных мышцах составляла лишь 36—71 % от контрольного уровня. Напротив, активность β-глюкозидазы в скелетных мышцах у

животных, потреблявших как безбелковый рацион, так и безбелковый рацион, обогащенный метионином, резко увеличивалась по сравнению с контролем — в 2,5 и 1,9 раза соответственно. Оценивая реакцию лизосомальных гидролаз данной группы, следует отметить, что, поскольку изокалорийность безбелковых рационов обеспечивалась дополнительным включением в его состав углеводного компонента, возрастание в печени активности арилсульфатаз А и В и β-N-ацетилглюкозаминидазы можно рассматривать как адекватный ответ на увеличение интенсивности обмена гликолипидов, в том числе и сульфогликолипидов [1, 8]. В свою очередь есть основание расценивать изменение активности β-галактозидазы в скелетных мышцах и мозге как реакцию на избыточное и направленное в условиях белкового дефицита поступление в эти ткани глюкозы [6].

Особый интерес представляют данные исследования функционального состояния протеолитической системы лизосом. В этом случае можно отметить выраженные (прежде всего в печени и мышечной ткани) различия в изменении активности между группой тиоловых протеиназ — катепсинов В, С, Н, L, с одной стороны, и катепсинов А и D, с другой. В подавляющем большинстве случаев активность тиоловых протеиназ лизосом при потреблении животными как безбелкового, так и безбелкового рациона, обогащенного метионином, существенно снижается. Напротив, активность эндопептидазы — катепсина D и катепсина А — возрастала в среднем на 20—50 % при дефиците белка и снижалась при добавлении в безбелковый рацион метионина. Можно сказать, что в случае дефицита белка реакция протеиназ лизосом является типичной и согласуется с результатами, полученными ранее [2, 11, 15]. Вместе с тем, поскольку практически не было выявлено различий между активностью тиоловых протеиназ в исследованных органах у животных, получавших безбелковый рацион и рацион,

обогащенный метионином, следует признать неправомерным предположение, что снижение активности тиоловых протеиназ лизосом при голодании и белковой недостаточности обусловлено дефицитом SH-групп [2, 11]. В связи с этим нельзя исключать определяющую роль тканевых ингибиторов тиоловых протеиназ в регуляции активности катепсинов В, Н и L в условиях перехода на эндогенное питание [19].

ЛИТЕРАТУРА

1. Баррет А. Дж., Хит М. // Лизосомы: Методы исследования / Под ред. Дж. Дингла: Пер. с англ.— М., 1980.— С. 25—156.
2. Васильев А. В., Звягина О. П. // Вопр. питания.— 1978.— № 5.— С. 31—33.
3. Васильев А. В., Капелевич Т. А., Тутельян В. А. // Вопр. мед. химии.— 1983.— № 3.— С. 127—130.
4. Дин Р. Процессы распада в клетке: Пер. с англ.— М., 1981.
5. Панин Л. Е., Маянская Н. П. Лизосомы: Роль в адаптации и восстановлении.— Новосибирск, 1987.
6. Покровский А. А. Роль биохимии в развитии науки о питании.— М., 1974.
7. Покровский А. А., Арчаков А. И. // Современные методы в биохимии.— М., 1968.— Т. 2.— С. 5—41.
8. Покровский А. А., Тутельян В. А. Лизосомы.— М., 1976.
9. Покровский А. А., Тутельян В. А., Кравченко Л. В. // Биохимия.— 1975.— Т. 40.— С. 545—552.
10. Порядков Л. Ф., Васильев А. В., Авреньева Л. И. и др. // Пат. физиол.— 1983.— № 2.— С. 52—55.
11. Сого С. Х., Звягина О. П., Васильев А. В. и др. // Вопр. питания.— 1987.— № 4.— С. 36—40.
12. Тутельян В. А. // Там же.— 1980.— № 5.— С. 56—61.
13. Тутельян В. А., Васильев А. В. // Вопр. мед. химии.— 1987.— № 5.— С. 65—74.
14. Hayase K., Yonekawa G., Yoshida A. // Nutr. Rep. int.— 1983.— Vol. 27, N 2.— P. 431—438.
15. Hayase K., Hiramatsu J., Miwa S. et al. // Ibid.— 1984.— Vol. 29, N 6.— P. 1323—1336.
16. Iodice A. A., Chin J., Perker S., Weinstock I. M. // Arch. Biochem.— 1972.— Vol. 152.— P. 166—174.
17. Kirschke H. // Proteinases in Mammalian Tissues and Cells.— Halle, 1982.— P. 125—128.
18. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem.— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
19. Turk V., Brzin J., Lenarcic B. et al. // Intracellular Protein Catabolism / Eds E. A. Khairallah et al.— New York, 1985.— P. 91—103.
20. Wildenthal K. // Lysosomes in Biology and Pathology / Eds J. T. Dingle, R. T. Dean.— Amsterdam, 1975.— P. 167—192.
21. Wildenthal K., Poole A. R., Dingle J. T. // J. molec. Cell Cardiol.— 1975.— Vol. 7.— P. 841—855.

Поступила 07.05.89

ACTIVITY OF LYSOSOMAL HYDROLASES IN VARIOUS TISSUES OF RATS UNDER CONDITIONS OF PROTEIN STARVATION

A. V. Vasil'ev, N. S. Bregvadze, V. A. Tutel'yan

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

Activity of lysosomal proteinases cathepsins A, B, C, D, H and L was studied in liver, kidney, spleen, thymus, heart, skeletal muscle and brain tissues of rats, maintained on full value diet, on a diet free of proteins and on the diet enriched with methionine. Distinctly dissimilar reactions of thiol-dependent proteinases was detected in liver, heart tissues and skeletal muscles as compared with the reaction of cathepsins A and D; activity of cathepsins B, H and L was decreased 1.5-2-fold in the animal groups maintained on diets both free of proteins and enriched with methionine. The data obtained suggest that concentration of endogenous inhibitors of lysosomal thiol-dependent proteinases rather than content of SH-groups in tissues was responsible for alterations of their activity under conditions of protein starvation.

© Ю. Н. Сидельников, Г. Г. Обухова, 1990

УДК 616.98:578.833.291-06:616.61-002.151]-07:[616.154:577.175.823].824+616.153.1:577.152.34]-074

Ю. Н. Сидельников, Г. Г. Обухова

КОМПОНЕНТЫ КИНИНОВОЙ СИСТЕМЫ, ГИСТАМИН И СЕРОТОНИН КРОВИ У БОЛЬНЫХ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКОЙ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ

Хабаровский медицинский институт

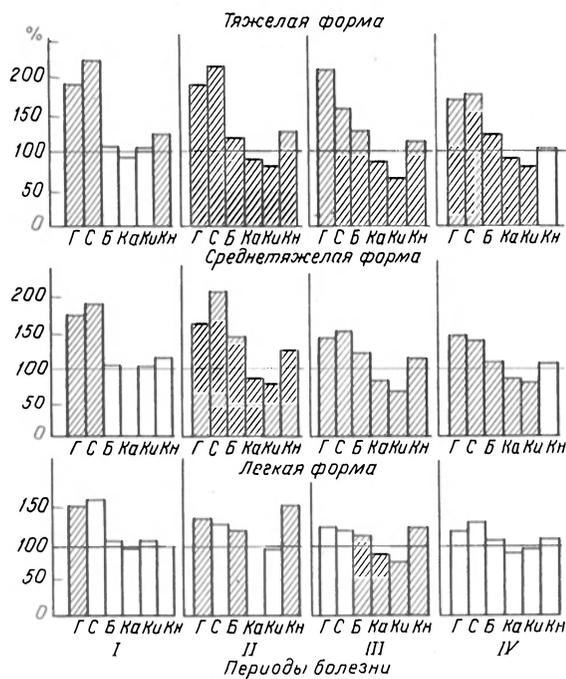
Кининовая система — одна из важных физиологических систем организма, характеризующаяся широким спектром биологического действия. Образование свободных кининов происходит при отщеплении их от неактивного предшественника кининогена под действием специфических ферментов плазмы крови и тканей калликреинов, а также под влиянием плазмина, трипсина и др. Характерным свойством калликреинов является биологическая активность, аналогичная активности свободных кининов [6]. Основная часть калликреинов плазмы находится в виде неактивных предшественников — калликреиногенов (прекалликреинов), а их активация происходит главным образом под влиянием фактора Хагемана. Физиологический контроль уровня кининов в плазме и тканях зависит от активности кининаз. Гистамин, серотонин и другие биологически активные вещества способствуют активации кининообразующих ферментов [1, 2, 4].

Основная роль кининов, гистамина и серотонина в патологии человека связана в первую очередь с процессами, в патогенезе и клинических проявлениях которых имеют место гемодинамические расстройства и нарушения сосудистой проницаемости. Такие симптомы, как гипотония вплоть до коллапса, гиперемия лица и верхней половины туловища, инъекция сосудов склер и конъюнктив, повышение сосудистой проницаемости нередко связывают с повышенным кининообразованием и увеличением содержания в крови гистамина и серотонина [3, 7, 13]. Мы изучили состояние кининовой системы и содержание в крови гистамина и серотонина у больных одной из наиболее распространенных на территории РСФСР природно-очаговой инфекцией — геморрагической лихорадкой с почечным синдромом (ГЛПС), для которой перечисленные выше симптомы принято считать характерными.

Методика. В настоящей работе представлены результаты обследования 86 больных ГЛПС, основную массу которых составляли молодые мужчины в возрасте от 20 до 40 лет. Легкая форма заболевания установилась у 21, средняя — у 42, тяжелая — у 23 человек. В течении болезни выделяли 4 основных периода: I — лихорадочный (доолигурический), II — ранней апирекии (олигурический), III — ранней реконвалесценции (полиурический), IV — поздней реконвалесценции.

Свободный гистамин и серотонин в плазме крови определяли флюоресцентным методом [12], БАЭЭ-эстеразную активность сыворотки крови и активность кининазы I (карбоксипептидазы-N) измеряли по методу [9]. Определенные калликреина и калликреиногена проводили упрощенным методом [10], кининогена — по методу [8].

Содержание указанных веществ изучали также у 30 добровольцев, концентрация гистамина в плазме крови которых бы-



Динамика содержания гистамина, серотонина и компонентов кининовой системы в крови у больных ГЛПС в зависимости от тяжести и периода болезни (в % по отношению к контролю).

I — лихорадочный период, II — период ранней апирекии, III — период ранней реконвалесценции, IV — период поздней реконвалесценции. К — контроль, Г — гистамин, С — серотонин, Б — БАЭЭ-эстеразная активность, Ка — калликреиноген, Ки — кининоген, Км — кининаза. Штриховка — достоверные различия ($p < 0,05$).

ла $0,36 \pm 0,04$ мкмоль/л, серотонина — $0,68 \pm 0,6$ мкмоль/л, БАЭЭ-эстеразная активность сыворотки крови — $300,70 \pm 10,61$ мЕ/мл, активность калликреина — $2,61 \pm 0,51$ мЕ/мл, калликреиногена — $433,47 \pm 8,55$ мЕ/мл, кининогена — $3,91 \pm 0,15$ мкг бр./мл, кининазы — $0,12 \pm 0,07$ Е/мл.

Принимая во внимание белковую природу компонентов кининовой системы, некоторые авторы [5, 11] рекомендуют производить расчет активности кининов не только в 1 мл сыворотки крови, но и относить полученные величины к 1 мг белка сыворотки. Динамика «удельной активности» компонентов кининовой системы в наших исследованиях в основном соответствовала таковой в 1 мл сыворотки. По этой причине, а также для корреляционного анализа между содержанием гистамина, серотонина и компонентами кининовой системы мы сочли целесообразным воздержаться от пересчета.

Результаты и их обсуждение. Полученные данные, выраженные в процентах по отношению к контролю (см. рисунок), свидетельствуют о наличии гипергистаминемии на всем протяжении болезни у больных с тяжелой и среднетяжелой формами ГЛПС. Наибольшие изменения найдены в разгаре болезни — они превышали норму в 1,8–2,1 раза. Даже перед выпиской больных из стационара концентрация этого амина в плазме крови реконвалесцентов превышала показатели контрольной группы. У больных с легкой формой болезни умеренное кратковременное увеличение содержания гистамина в плазме отмечено лишь в начале болезни. Чем тяжелее протекало заболевание, тем выше был уровень свободного биологически активного гистамина в плазме крови.

Содержание свободного серотонина было достоверно повышено во все периоды болезни у больных с тяжелой и среднетяжелой формами ГЛПС. Самые высокие показатели выявлены в лихорадочном периоде (в 2,2 раза выше

контроля) и в периоде ранней апирекии (в 2,1 раза выше контроля) у больных с тяжелой формой болезни. У больных с легкой формой ГЛПС в лихорадочном периоде наблюдалась тенденция к увеличению содержания серотонина в плазме, но статистически достоверного изменения уровня этого амина не обнаружено ни в одном периоде болезни.

БАЭЭ-эстеразная активность сыворотки крови, представляющая собой суммарную активность протеаз трипсиназного типа — в основном калликреина, а также пламина, тромбина и ряда других ферментов, возрастала у больных в разгаре болезни начиная с периода ранней апирекии. Клиническое выздоровление только у больных с легкой формой ГЛПС сопровождалось нормализацией этого показателя.

Активность калликреина была повышена на всем протяжении болезни у всех больных. Наибольшие показатели найдены в конце периода ранней апирекии — начале реконвалесценции: у больных с легкой формой болезни они превышали контроль в 8 раз, со среднетяжелой — в 10 раз, а у больных с тяжелой формой — почти в 12 раз. Даже перед выпиской из стационара (в периоде поздней реконвалесценции) у большинства больных активность этого основного кининообразующего фермента сыворотки крови была значительно выше контроля — в 3 раза у больных с легкой формой, в 5 — среднетяжелой и почти в 8 раз — у больных с тяжелой формой ГЛПС. Между БАЭЭ-эстеразной активностью и активностью калликреина найдена прямая связь средней степени тесноты ($\rho = +0,69$, $p < 0,02$).

В периоды резкой активации калликреина (разгар болезни) наблюдалось достоверное снижение активности его предшественника — калликреиногена, связанное, по-видимому, с повышенным переходом его в активную форму. Между активностью калликреина и калликреиногена найдена обратная связь высокой степени тесноты ($\rho = -0,83$, $p < 0,001$).

Выраженное кининообразование, вызванное активацией калликреина, по нашему мнению, является также причиной снижения уровня кининогена, наблюдавшееся у больных с тяжелой и среднетяжелой формами ГЛПС. Из рисунка видно, что изменения содержания в крови кининогена происходили параллельно с изменениями уровня калликреиногена. Между содержанием в крови калликреина и кининогена установлена обратная связь высокой степени тесноты ($\rho = -0,73$, $p < 0,002$).

Уровень кининазы в сыворотке крови повышался, начиная с первых дней болезни, и достигал наибольших показателей в разгаре ее, что носило, по всей вероятности, компенсаторный характер в ответ на активацию кининовой системы. В этой связи интересно отметить, что наибольшая активность кининазы найдена у больных с легкой формой ГЛПС при минимальной выраженности активности кининовой системы. Складывается впечатление, что срыв процессов компенсации, обусловленный тяжестью болезни, является одной из причин чрезмерного накопления биологически активных компонентов кининовой системы в крови.

Оценка результатов корреляционного анализа,

проведенного между содержанием в крови гистамина, серотонина и компонентами кининовой системы, выявила, что между этими показателями статистически достоверной связи нет.

Таким образом, проведенные нами исследования позволили установить, что у больных ГЛПС возникают значительные нарушения содержания гистамина, серотонина и компонентов кининовой системы в крови. Изменение концентрации названных биологически активных веществ в физиологических жидкостях организма может иметь значение в генезе ряда ведущих симптомов этого тяжелого заболевания. Определение содержания в крови гистамина, серотонина и калликрина, по нашему мнению, является необходимым лабораторным исследованием в комплексном обследовании больных ГЛПС и может быть использовано для суждения о тяжести состояния больных, имеет значение для проведения патогенетической терапии и для оценки ее эффективности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Богадельников И. В., Проценко В. А., Спицин И. Ф. и др. // Пат. физиол.— 1979.— № 1.— С. 51—54.
2. Гапонок П. Я., Уклонская Л. И. // Там же.— 1973.— № 2.— С. 3—10.
3. Громова Е. А. Серотонин.— М., 1966.
4. Дзидзинский А. А., Гомазков О. А. Кинины в физиологии и патологии сердечно-сосудистой системы.— Новосибирск, 1976.
5. Кузнецов В. А. // Лаб. дело.— 1981.— № 3.— С. 133—138.
6. Пасхина Т. С. // Молекулярные основы патологии.— М., 1966.— С. 123—179.
7. Пасхина Т. С. // Химические факторы регуляции и биосинтеза ферментов.— М., 1969.— С. 317—359.
8. Пасхина Т. С., Гуликова О. М., Егорова Т. П. и др. // Современные методы в биохимии.— М., 1968.— Т. 8.— С. 205—232.
9. Пасхина Т. С., Егорова Т. П., Зыкина В. П. и др. // Там же.— С. 232—261.
10. Пасхина Т. С., Кринская А. В. // Вопр. мед. химии.— 1974.— № 6.— С. 660—663.
11. Пасхина Т. С., Полянцева Л. Р., Кринская А. В. и др. // Там же.— 1977.— № 2.— С. 241—251.
12. Соминский В. И., Кузнецова В. А., Санжура Т. С. и др. // Лаб. дело.— 1982.— № 2.— С. 104—106.
13. Чернух А. М., Александров П. И., Алексеев О. В. Микроциркуляция.— М., 1975.

Поступила 25.04.89

THE KININ SYSTEM COMPONENTS, HISTAMINE AND SEROTONIN IN BLOOD OF PATIENTS WITH HEMORRHAGIC FEVER AND RENAL SYNDROME

Yu. N. Sidel'nikov, G. G. Obukhova

Medical School, Khabarovsk

Hyperhistaminemia, hyperserotoninemia and activation of the kinin system followed by a decrease in the system reverse capacities and inadequate compensatory reactions were detected in 86 patients with various forms of hemorrhagic fever and renal syndrome. The data obtained suggest that these biologically active substances are of importance in pathogenesis of the disease.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 615.212.7+615.212.7.015.23].015.4:[612.82.015.1:577.123.3

Г. С. Вартамян, Р. А. Бурназян, М. И. Агаджанов

ВЛИЯНИЕ НАРКОТИЧЕСКОГО АНАЛЬГЕТИКА ФЕНАРИДИНА И АНТАГОНИСТА НАРКОТИЧЕСКИХ АНАЛЬГЕТИКОВ Φ_1 НА СОДЕРЖАНИЕ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ БЕЛЫХ КРЫС

Ереванский медицинский институт

Препарат фенаридин, принадлежащий по химической структуре к ряду 4-аминопиперидинов, относится к наркотическим анальгетикам мощного типа действия [1]. Результаты фармакологических исследований [2] продемонстрировали превосходство его по активности над морфином, промедолом, фентанилом и (по продолжительности действия) над фентанилом. Введение фенаридина животным, получавшим другие виды наркотических анальгетиков, приостанавливает развитие толерантности к ним.

Представитель ряда 4-аминопиперидинов соединение Φ_1 относится к числу чистых антагонистов наркотических анальгетиков типа налоксона; Φ_1 обладает в 2—3 раза большей аффинностью к местам специфического связывания, чем налоксон [2].

Показано участие системы циклических нуклеотидов в связывании опиатов с их мембранными рецепторами [4—6, 7]. Участие сАМР-аденилатциклазной системы в формировании клеточного ответа связывают, в частности, с механизмами фосфорилирования и дефосфорилирования белков посредством активации соответствующих протеинкиназ и изменениями концентрации внутриклеточного Ca^{2+} . сGMP в ряде биологических систем имеет противоположный сАМР эффект. Интерес представляют, в частности, сведения о периферическом анальгетическом эффекте сGMP [8].

В настоящей работе изучено влияние фенаридина и Φ_1 на содержание циклических нуклеотидов сАМР и сGMP в полосатом теле (corpus striatum) белых крыс. Мы сочли целесообразным исследование именно этой области мозга, так как нейрональные связи ее хорошо изучены и в ней установлена относительно высокая плотность опиатных рецепторов.

Методика. Эксперименты проводили на беспородных крысах массой 120—150 г. Исследуемые вещества вводили внутривентриально. Животным контрольной группы вводили аналогичные объемы изотонического раствора. Животных забивали через 15 и 30 мин после введения различных доз фенаридина (0,05; 0,5; 5 мг/кг). В последней серии исследований вводили Φ_1 (2 мг/кг) на фоне введения фенаридина и только Φ_1 (2 мг/кг).

Содержание сАМР и сGMP определяли радиоиммунологическим методом [3, 11, 12] с помощью наборов «Chemapol» (ЧССР). Для оценки эффективности экстракции использовали [3H]сАМР и [3H]сGMP. Радиоактивность образцов определяли с помощью γ -сцинтилляционного счетчика «Трасоф Еurore RIA 300» (Голландия). Результаты экспериментов обрабатывали статистически с помощью микрокомпьютера «Apple-2 plus» (США).

Результаты и обсуждение. Как показали результаты проведенных исследований

Влияние фенаридина и антагониста наркотических анальгетиков Φ_1 на содержание сАМР и сGMP (в нмоль на 1 г ткани) в полостом теле головного мозга белых крыс

Доза препарата	сGMP		сАМР	
	время после введения препарата, мин			
	15	30	15	30
Фенаридин, мг/кг:				
0,05	1,57±0,13	0,87±0,05*	16,85±0,75*	9,87±1,27
0,5	2,08±0,15*	1,05±0,15	15,05±2,23**	19,10±1,39*
5,0	1,61±0,17	1,46±0,12	67,30±10,26*	39,08±3,98*
Фенаридин (0,05 мг/кг) + Φ_1 (2 мг/кг)		1,51±0,08		64,85±18,39*
Φ_1 (2 мг/кг)		2,68±0,06*		103,30±11,26*
Контроль	1,09±0,12		7,92±1,39	

Примечание. Одна звездочка — $p < 0,01$; две звездочки — $p < 0,05$; в остальных случаях $p > 0,05$.

(см. таблицу), через 15 мин после введения фенаридина в дозе 0,05 мг/кг наблюдали примерно двукратное повышение концентрации сАМР, величина которой приближалась к контрольным значениям через 30 мин после введения препарата. Примерно такой же эффект наблюдали через 15 мин после введения препарата в дозе 0,5 мг/кг, однако концентрация сАМР через 30 мин не только не понижалась, но и имела тенденцию к повышению. Введение фенаридина в дозе 5 мг/кг сопровождалось наиболее выраженным повышением концентрации сАМР, которая понижалась через 30 мин после введения препарата, продолжая оставаться на уровне, значительно превышающем контрольные значения. Полученные результаты могут быть связаны либо с повышением скорости биосинтеза сАМР, либо с подавлением скорости его утилизации и свидетельствуют об участии сАМР в биохимических механизмах анальгетического действия изученного соединения. Следует отметить, что степень выраженности описанных сдвигов, а также их продолжительность в значительной степени зависят от дозы вводимого соединения.

Аналогичные, но менее выраженные изменения в концентрации сАМР, исходя из данных литературы [4], имеют место в том же анатомическом образовании мозга крысы под влиянием морфина, однако они характеризуются несколько меньшей выраженностью и большей продолжительностью и развиваются под действием значительно больших доз препарата (60 мг/кг), под влиянием меньших доз (10 мг/кг) подобные изменения не имеют места.

Надо отметить, что антагонист Φ_1 , введенный на фоне анальгетика в дозе 2 мг/кг, значительно повышает концентрацию сАМР; сам по себе Φ_1 вызывал более чем десятикратное увеличение концентрации сАМР.

При изучении влияния отмеченных соединений на концентрацию сGMP выяснилось, что антагонист также повышает концентрацию сGMP (примерно в 2 раза по сравнению с контролем). Под влиянием же различных доз исследуемого анальгетика существенных изменений в содержании сGMP не наблюдали. Через 15 мин после введения всех испытанных доз фенаридина содержание сGMP несколько повышалось; на 30-й минуте наблюдали тенденцию к восстановлению содержания сGMP.

Согласно современным представлениям [9—11], несмотря на существенные различия в мембранных рецепторных механизмах различных тканей, в регуляции разнообразных клеточных функций принимают участие 2 основные группы рецепторов: 1-я непосредственно связана с активацией аденилатциклазы и стимулирует продукцию сАМР, в то время как функционирование 2-й группы рецепторов связывается с обменом фосфоинозитидов, мобилизацией Ca^{2+} , высвобождением арахидоновой кислоты и сGMP.

Полученные результаты относительно повышения концентрации сАМР как под влиянием агониста, так и под действием антагониста позволяют предположить, что в случае обоих соединений имеет место связывание вещества с аналогичными рецепторами; это может быть следствием структурного сходства исследуемых соединений. Направленность же фармакологического эффекта, возможно, в зависимости от степени связывания вещества с рецептором может иметь противоположный характер.

Роль сGMP и механизм повышения его содержания в клетке на сегодняшний день являются предметом дискуссий [11]. Интерес представляют данные о повышении концентрации сGMP под действием продуктов гидролиза фосфоинозитидов, а также сведения об образовании сGMP одновременно с активацией фосфоинозитидного пути передачи клеточного сигнала.

Полученные данные о повышении концентрации сGMP под влиянием антагониста Φ_1 позволяют предположить участие в реализации фармакологического эффекта каскадной рецепторной системы, связанной с продуктами деградации фосфоинозитидов, Ca^{2+} , арахидоновой кислотой и сGMP.

Авторы выражают благодарность зав. лабораторией синтеза анальгетиков ИТОХ АН Армянской ССР им. А. Л. Миджояна проф. Р. С. Вартагяну за предоставление исследуемых соединений, синтезированных согласно разработанным им методам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вартагян Р. С. Синтез и биологическая активность неконденсированных бигетероциклов на основе производных тетрагидропиррана, тетрагидротиопиррана и пиперидина: Дис. ... д-ра хим. наук.— Ереван, 1985.

2. Власенко Э. В. Создание новых фармакологических средств для анестезиологии на основе производных молекул морфина.— М., 1985.
3. Brooks B. A., Wood J. A., Diaz U. // Neurobiol. Cerebrospinal Fluid.— 1980.— Vol. 1.— P. 113.
4. Clouet D. H. // Advances in Pharmacological Research and Practice.— Budapest, 1979.
5. Cyclic Nucleotides in Disease / Ed. B. Weiss.— Baltimore, 1975.
6. Dhaliwal D. // FEBS Lett.— 1982.— Vol. 144.— P. 89—92.
7. Eskelson C. D. // Life Sci.— 1988.— Vol. 42.— P. 1455—1464.
8. Ferreira S. H., Nakamura M. // Prostaglandins.— 1979.— Vol. 18.— P. 179—190.
9. Nishizuka Y. // Nature.— 1984.— Vol. 308.— P. 693—698.
10. Nishizuka Y. // Science.— 1984.— Vol. 225.— P. 1365—1371.
11. Nishizuka Y. // Ibid.— 1986.— Vol. 233.— P. 305—312.
12. Weller M., Rodnigt R., Carrera F. // Biochem. J.— 1972.— Vol. 129.— P. 113—121.

Поступила 23.05.89

CONTENT OF CYCLIC NUCLEOTIDES IN RAT BRAIN TISSUE FOLLOWED BY EFFECTS OF NARCOTIC ANALGETIC DRUG FENARIDIN AND ANTAGONIST OF NARCOTIC ANALGETICS F₁.

G. S. Vartanian, R. A. Burnazian, M. I. Agadjanov

Medical School, Yerevan

Content of cAMP and cGMP was estimated in rat brain *corpus striatum* after treatment with narcotic analgetic fenaridin and antagonist of narcotic analgetics F₁ which are similar chemically. Various concentrations of fenaridin increased the cAMP content, whereas that of cGMP was not altered. At the same time, administration of the antagonist of narcotic analgetics F₁ led to an increase in content of cGMP and to a distinct elevation of cAMP content.

питания, поскольку обеспечивает физиологические потребности организма в основных пищевых веществах и в то же время предопределяет их утилизацию непосредственно на клеточном уровне. В этой связи существенный интерес представляет исследование в этих условиях функционального состояния протеолитической системы лизосом, так как ранее полученные сведения свидетельствуют о специфичной реакции лизосомальных эндо- и экзопептидаз при переходе организма на эндогенное питание, обусловленное голоданием или белковой недостаточностью [9, 11].

Методика. В работе использовали крыс-самцов линии Вистар массой 200—220 г. Животным одной группы канюлировали желудок, крысам другой канюлю вводили в заднюю полую вену. Разработанная в лаборатории ИП Института питания АМН СССР методика внутрижелудочного и внутривенного канюлирования [7] позволила осуществить полное ПП в хроническом опыте. Крысам обеих групп (по 8 животных в каждой) круглосуточно в течение 10 дней вводили одинаковую смесь пищевых веществ (56 мл/сут), содержащую дрожжевой белковый гидролизат «Аутолизин» и глюкозу в соотношении 1:9 по калорийности, а также водорастворимые витамины; жирорастворимые витамины вводили подкожно. По окончании опыта крыс декапитировали. Извлекали печень, селезенку и почки, промывали их охлажденным физиологическим раствором, измельчали и гомогенизировали в течение 90 с при 1200 об/мин. В качестве суспендирующей среды использовали 0,25 % сахарозу рН 7,4, содержащую 0,001 М ЭДТА. Конечное разведение гомогената 1:9. Все процедуры проводили при температуре 0—2 °С. Общую активность ферментов определяли в гомогенатах, предварительно обработанных тритоном X-100 (конечная концентрация 0,1 %). В гомогенате тканей определяли общий белок и активность лизосомальных ферментов: β-глюкуронидазы, β-галактозидазы, β-N-ацетилглюкозаминидазы, арилсульфатаз А и В, катепсинов А, В, С и D [1, 2]. Неседиментируемую активность лизосомальных гидролаз определяли в надосадочной жидкости, полученной после центрифугирования гомогенатов при 105 000 g в течение 60 мин, и выражали в процентах от общей активности.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 615.874.2.032.14.015.4: [612.014:376.311.344].076.9

А. В. Васильев, Н. С. Бреговдзе, Л. Ф. Порядков, В. А. Тутьельян

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЛИЗОСОМ В РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНАХ КРЫС В УСЛОВИЯХ ПОЛНОГО ПАРЕНТЕРАЛЬНОГО ПИТАНИЯ

Институт питания АМН СССР, Москва

Экспериментальная модель полного парентерального питания (ПП) является адекватной для изучения роли лизосом в процессах клеточного

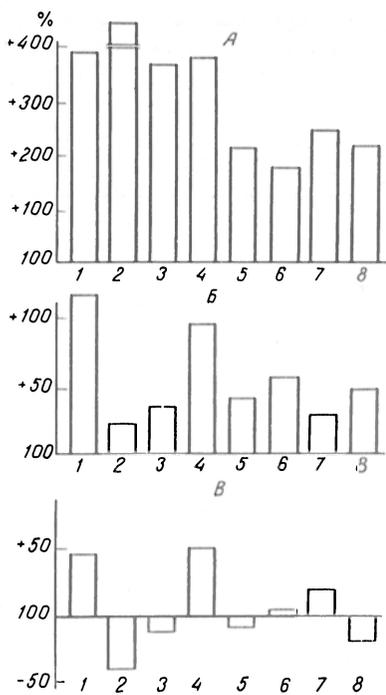
Результаты и обсуждение. К концу экспериментального периода масса тела животных, находившихся в условиях ПП и внутрижелудочного питания (ВЖП), была практически одинаковой (204±3 и 217±5 г соответственно), равно как увеличение массы за экспериментальный период, которое составило в обеих группах 9,5 г. Вместе с тем относительная масса печени и почек крыс, получавших ПП, была достоверно выше на 24 и 36 % соответственно, а относительная масса селезенки возрастала в 4,2 раза. Однако, несмотря на различия в массе указанных органов, концентрация белка в них была практически одинакова (табл. 1).

Таблица 1

Общая активность лизосомальных ферментов в печени, почках и селезенке крыс в условиях полного ПП (в мкмоль/мин на 1 г белка)

Исследуемые параметры	Печень		Почки		Селезенка	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
Катепсин А	4,81±0,71	8,09±0,62	5,74±0,44	6,29±0,67	5,98±0,47	6,75±0,60
Катепсин В	19,8±2,03	18,9±0,72	1,68±0,047	0,700±0,131*	14,5±1,61	23,0±1,60*
Катепсин С	32,9±1,48	34,6±1,67	6,98±0,273	4,53±0,398*	22,2±3,1	24,4±3,08
Катепсин D	8,07±0,297	12,5±0,573*	8,53±0,312	9,79±0,318	15,9±1,61	18,0±0,297
Арилсульфатазы А и В	7,37±0,247	8,22±0,239*	22,0±1,01	15,0±0,875*	15,8±0,298	11,9±0,178*
β-Галактозидаза	9,75±0,198	12,2±0,334*	24,2±0,663	18,9±0,676*	21,7±1,01	14,6±1,01*
β-Глюкуронидаза	6,93±0,495	7,07±0,239	1,21±0,039	1,15±0,04	8,41±0,119	7,01±0,238*
β-N-ацетилглюкозаминидаза	10,3±0,346	12,1±0,334*	43,6±0,818	26,8±1,67*	10,4±0,179	7,90±0,356*

Примечание. Здесь и в табл. 2 представлены средние данные (M±m) из 8 опытов. Звездочка — p<0,05.



Суммарная активность лизосомальных гидролаз в селезенке (А), печени (В) и почках (В) крыс, получавших парентеральное питание (в мкмоль/мин на 1 г сырой ткани X относительная масса тела).

1—4 — катепсин А, В, С, D; 5 — арилсульфатазы А и В; 6 — β-галактозидаза; 7 — β-глюкуронидаза; 8 — β-N-ацетилглюкозаминидаза. По оси ординат — активность ферментов (в %) относительно животных в ВЖСП.

Результаты проведенного энзимологического анализа свидетельствуют, что в печени крыс, получавших ПП, существенно возрастала удельная активность катепсинов А (на 68 %) и D (на 55 %), тогда как активность тиоловых протеиназ не менялась, а активность других лизосомальных гидролаз увеличивалась незначительно (на 12—25 %). В почках отмечено достоверное снижение удельной активности катепсинов В и С, а также β-галактозидазы и β-N-ацетилглюкозаминидазы. В отличие от печени активность катепсинов А и D в почках крыс, получавших ПП, не изменялась. В селезенке не выявлено значительных изменений в функциональном состоянии протеолитической системы лизосом. Исключение составлял катепсин В, удельная активность которого в условиях ПП возросла на 59 %. Наряду с этим активность лизосомальных гликозидаз и арилсульфатаз А и В снижалась на 17—34 %.

Поскольку относительная масса исследуемых органов крыс, находившихся в различных условиях питания, существенно различалась между собой, представлялось целесообразным провести сравнительную оценку суммарной активности лизосомальных гидролаз в расчете на относительную массу органа. Как видно из рисунка, в печени крыс, получавших ПП, наиболее значимо (в 2 раза) возросла суммарная активность катепсинов А и D.

Это в равной мере относится и к реакции катепсинов А и D в почках, где суммарная активность данных ферментов возросла на 45 и 53 % соответственно, тогда как суммарная активность тиоловых протеиназ, напротив, снижалась на 13—44 %. При подобной оценке влияния ПП на активность лизосомальных гидролаз привлекает внимание факт резкого (в 2,9—6,7 раза) увеличения суммарной активности исследованных ферментов в селезенке. При этом в отличие от печени и почек наибольшее увеличение активности (в 6,7 раза) обнаружено для катепсина В.

Для более полной оценки структурно-функционального состояния лизосомального аппарата клеток печени и почек исследовали характер изменения уровня неседиментируемой активности лизосомальных гидролаз в этих органах (табл. 2). Как видно из представленных результатов, при ПП в печени имеет место резкое увеличение неседиментируемой активности всех лизосомальных гидролаз, что может быть расценено как результат интенсивного процесса гетерофагоцитоза или нарушения структурной целостности мембран лизосом гепатоцитов [6]. Последнее представляется нам более вероятным, поскольку предыдущие гистологические исследования выявили нарушение общей дольчатой структуры печени и жировую инфильтрацию гепатоцитов у крыс при длительном ПП [8]. В свою очередь увеличение неседиментируемой активности катепсина В в почках согласуется с данными о гипертрофии почечных клеток, дистрофическом изменении клубочков и возрастании активности катепсина В при гломерулонефрите [5].

Таким образом, переход организма на полное парентеральное питание сопровождается значительной функциональной перестройкой лизосомального аппарата, специфичной в зависимости от клеточной принадлежности. Можно полагать, что в условиях активации процесса клеточного питания наиболее значимым является изменение активности катепсинов А и D в печени и почках, тогда как изменение активности катепсина В в селезенке отражает особенность участия тиоловых протеиназ лизосом в метаболизме при различных физиологических состояниях [3, 4, 10, 12].

ЛИТЕРАТУРА

1. Баррет А. Д., Хиг М. Ф. // Лизосомы: Методы исследования / Под ред. Дж. Динтла; Пер. с англ.— М., 1980.— С. 25—156.
2. Васильев А. В., Каплевич Т. А., Тутельян В. А. // Вопр. мед. химии.— 1983.— № 3.— С. 127—130.

Таблица 2

Неседиментируемая активность ферментов лизосом в печени и почках крыс в условиях полного ПП (в % от общей)

Исследуемые параметры	Печень		Почки	
	контроль	опыт	контроль	опыт
Катепсин А	9,7±1,2	14,8±2,0*	6,9±0,8	9,8±1,3
Катепсин В	10,3±1,8	20,0±1,7*	12,5±1,1	24,4±7,1
Катепсин С	17,2±1,7	27,6±2,3*	3,20±0,21	2,72±0,19
Катепсин D	28,4±10,1	40,9±4,5	28,4±1,2	21,5±3,3
Арилсульфатазы А и В	1,27±0,13	3,14±0,23*	11,5±0,7	9,0±0,5*
β-Галактозидаза	11,7±0,5	16,0±1,2*	37,5±2,1	30,9±3,4
β-Глюкуронидаза	6,07±0,5	10,4±0,6*	22,6±1,6	8,62±0,68*
β-N-ацетилглюкозаминидаза	1,57±0,14	3,87±0,35*	12,4±1,5	9,64±1,03

3. Васильев А. В., Коновалова Л. С., Плецкий К. Д. и др. // Бюл. экспер. биол.— 1988.— № 2.— С. 181—184.
4. Васильев А. В., Коновалова Л. С., Плецкий К. Д. и др. // Вопр. мед. химии.— 1989.— № 1.— С. 92—95.
5. Плоткин В. Я., Жлоба А. А., Ходов Л. В. // Проблемы клинической энзимологии.— М., 1989.— С. 114.
6. Покровский А. А., Тугельян В. А. Лизосомы.— М., 1976.
7. Порядков Л. Ф. // Теоретические и клинические аспекты науки о питании.— М., 1986.— С. 121—131.
8. Порядков Л. Ф., Васильев А. В., Авреньева Л. И. и др. // Пат. физиол.— 1983.— № 2.— С. 52—55.
9. Тугельян В. А., Васильев А. В. // Вопр. мед. химии.— 1987.— № 5.— С. 65—74.
10. Baricos W. H., Zhou Y., Mason R. W., Barrett A. J. // Biochem. J.— 1988.— Vol. 252.— P. 301—304.
11. Nagase K., Hiramatsu J., Miwa S. et al. // Nutr. Rep. int.— 1984.— Vol. 6.— P. 1323—1335.
12. Wall E. J., Vreeling-Sindelarova H., Schellens J. P. M. et al. // Cell Tissue Res.— 1986.— Vol. 243.— P. 641—648.

Поступила 05.10.89

PROTEOLYTIC ACTIVITY IN LYSOSOMES OF VARIOUS RAT TISSUES UNDER CONDITIONS OF COMPLETE PARENTERAL NUTRITION

A. V. Vasil'ev, N. S. Bregvadze, L. F. Poryadkov, V. A. Tutel'yan

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

Specific, total and nonsedimented activities of cathepsins A, B, C and D as well as of aryl sulfatases A and B, β -galactosidase, β -glucuronidase and N-acetyl- β -D-glucosaminidase were studied in liver, kidney and spleen tissues of rats under conditions of artificial intragastric and parenteral nutrition. Activity of cathepsins A and D in liver tissue as well as total activity of all the lysosomal hydrolases studied in spleen was distinctly increased in parenteral nutrition. These data suggest elevation in the functional activity of lysosomal apparatus under conditions of parenteral nutrition.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.712-007.24-053.2-07:616.5-008.939.629-02: [615.356:577.164.2

Т. А. Цветкова, Т. А. Горохова, А. А. Дельвиц

ВЛИЯНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА СИНТЕЗ КОЛЛАГЕНА ФИБРОБЛАСТАМИ ИЗ КОЖИ ДЕТЕЙ С ВОРОНКООБРАЗНОЙ ДЕФОРМАЦИЕЙ ГРУДНОЙ КЛЕТКИ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Одним из заболеваний, связанных с поражением соединительной ткани, является воронкообразная деформация грудной клетки (ВДГК), которая в разной степени выявляется у 0,6 % детей. ВДГК представляет собой различное по глубине и конфигурации западение грудины и передних отделов ребер и приводит к тяжелым нарушениям функций органов грудной полости [1, 2]. Нередко ВДГК развивается на фоне синдромов Элерса — Данло, Марфана и др. Определенные экскреции с мочой продуктов деградации коллагена — свободного и пептидно-связанного оксипролина — выявило снижение содержания этих компонентов в моче больных с изолированной и синдромальной формами ВДКГ [3]. Это позволило предположить, что нарушение метаболизма коллагена в тканях больных является если не основной, то одной из причин разви-

тия ВДГК. Если ВДКГ является проявлением общего диспластического процесса, в основе которого лежит нарушение метаболизма коллагена, то следует ожидать, что фибробласты, выделенные из кожи больных, будут отличаться от фибробластов, выделенных из кожи здоровых детей, количественными и (или) качественными характеристиками синтеза и обмена коллагена. Для проверки этого предположения были определены продукция коллагена фибробластами у больных и здоровых детей и влияние на этот процесс аскорбиновой кислоты.

Методика. Для культивирования клеток использовали среду Игла, содержащую 10 % сыворотки крупного рогатого скота и 5 % сыворотки пушовой крови новорожденных. Клетки рассевали на чашках Петри (10—15 тыс. клеток на 1 см²) и помещали в СО₂-инкубатор с подачей 5 % СО₂. Смену питательной среды проводили на 3-й день субкультивирования. На 5-й день, когда клетки достигали стационарной стадии роста, вводили аскорбиновую кислоту (50 мкг/мл). На следующий день осуществляли замену питательной среды на бессывороточную, вводили ¹⁴C-пролин (2 мкКи/мл) и аскорбиновую кислоту (50 мкг/мл). Клетки помещали на сутки в СО₂-инкубатор. При исследовании синтеза коллагена в логарифмической стадии роста перевод клеток на бессывороточную среду и внесение ¹⁴C-пролина проводили на 3-й день субкультивирования.

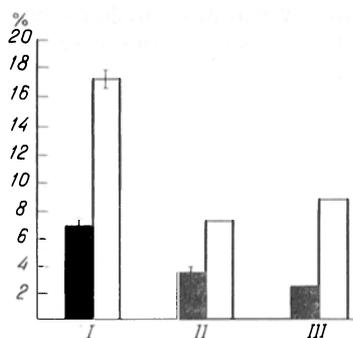
При исследовании синтеза коллагена культуральную среду сливали, клетки с чашек Петри снимали скребком и разрушали путем встряхивания в течение 30 с в 0,5 % растворе додецилсульфата натрия. Клетки объединяли со средой, прогревали 5 мин при 90 °С для инактивации протеаз и диализовали против 0,5 М уксусной кислоты. Отдиализованный материал подвергали гидролизу в запаянных ампулах в 6 н. соляной кислоте при 105 °С в течение 20 ч. Гидролизаты высушивали в вакууме над КОН и растворяли сухой остаток в 0,1 н. соляной кислоте. Для разделения аминокислот использовали колонку (0,9-30 см) с ионообменной смолой Aminex Q-150S. Элюцию осуществляли 0,2 М Na-цитратным буфером pH 3,2 со скоростью 1 мл/мин. Собирали фракции по 2 мл и определяли радиоактивность на жидкостном сцинтилляционном счетчике. Содержание коллагена в процентах рассчитывали по формуле:

$$\text{Кол} = \frac{\text{Оксипро имп/мин} \cdot 2 \cdot 100}{(\text{Про имп/мин} - \text{Оксипро имп/мин}) \cdot 5 + \text{Оксипро имп/мин}}$$

Формула основана на том, что коллаген содержит почти равные количества пролина и оксипролина и что в коллагене содержится в 5 раз больше аминокислот (пролина и оксипролина), чем в неколлагеновых белках [11].

При определении степени гидроксирования вновь синтезированного коллагена по соотношению ¹⁴C-пролин/¹⁴C-оксипролин клетки метили ¹⁴C-пролином, как описано выше. Среду сливали, добавляли к ней в качестве ингибитора протеаз ЭДТА (конечная концентрация 10 мМ) и диализовали против 0,5 М уксусной кислоты 24 ч. Далее для разрушения неколлагеновых белков материал обрабатывали кристаллическим пепсином (300 мкг/мл; «Sigma») 6 ч при 22 °С. Коллаген осаждали добавлением NaCl (конечная концентрация 2 М), осадок отделяли центрифугированием, растворяли в 0,5 М уксусной кислоте и диализовали против того же раствора. Кислотный гидролиз и разделение оксипролина и пролина проводили, как описано ранее.

Результаты и обсуждение. Объектом исследования служили фибробласты из кожи детей, страдающих ВДГК. Биоптаты кожи были получены во время хирургической коррекции ВДГК. В качестве контроля использовали фибробласты из кожи здоровых детей того же возраста. Количество коллагена, синтезированного фибробластами в логарифмической и стационарной стадиях роста, представлено на рисунке. Полученные данные показывают, что продукция кол-



Относительный синтез коллагена в логарифмической (темные столбики) и стационарной (светлые столбики) стадиях роста кожных фибробластов у здоровых детей (I; $n=4$), детей с ВДГК (II; $n=3$) и синдромом Элерса — Данло (III, $n=2$). По оси ординат — содержание коллагена (%).

лагена в фибробластах детей с изолированной формой ВДГК и синдромом Элерса — Данло значительно снижена по сравнению с нормой как в логарифмической, так и в стационарной стадии роста. Влияние аскорбиновой кислоты на синтез коллагена исследовали в условиях логарифмической стадии роста фибробластов (табл. 1). Если фибробласты здоровых детей увеличивали продукцию коллагена в ответ на добавление аскорбиновой кислоты в 3 раза, то фибробласты детей с ВДГК — только в 1,7—2 раза. В отсутствие аскорбиновой кислоты продукция коллагена фибробластами больных детей несколько ниже, чем в норме.

Аскорбиновая кислота наряду с ионами Fe^{+2} и O_2 является кофактором двух ферментов: пролил [КФ 1.14.1.2]- и лизил- [КФ 1.14.1.4] гидроксилаз, катализирующих образование оксипролина и оксилизина в коллагене [5, 8, 9]. Эта реакция является одной из важных ступеней посттрансляционной модификации коллагена [6, 10]. Имеются данные об активации пролилгидроксилазы аскорбиновой кислотой. При исследовании фибробластов кожи человека наблюдали увеличение количества синтезированного коллагена в присутствии аскорбиновой кислоты в культуральной среде [4, 7].

Отмеченное нами снижение продукции коллагена фибробластами кожи больных детей не может быть объяснено недостаточным гидроксилированием остатков пролина в молекуле коллагена. Анализ выделенного из среды вновь синтезированного коллагена показал, что степень гидроксилирования коллагена в норме и при патологии практически одинакова (табл. 2).

Полученные нами данные показывают, что фибробласты, выделенные из кожи больных детей,

Таблица 1

Влияние аскорбиновой кислоты на синтез коллагена фибробластами кожи детей (логарифмическая стадия; $M \pm m$)

Штамм фибробластов	Синтезированный коллаген, %	
	без аскорбиновой кислоты	50 мкг/мл аскорбиновой кислоты
Норма (3)	$2,5 \pm 0,36$	$6,8 \pm 0,52$
ВДГК (2)	$1,8 \pm 0,07$	$3,4 \pm 0,28$
ВДГК+синдром Элерса — Данло (1)	1,6	4,1
Синдром Элерса — Данло (1)	0,67	1,3

Примечание. Здесь и в табл. 2 в скобках указано число тестированных штаммов фибробластов.

Таблица 2
Степень гидроксилирования вновь синтезированного коллагена ($M \pm m$)

Штамм фибробластов	Продукция имп/мин	
	Пролин	Оксипролин
Норма (3)	$1,19 \pm 0,21$	$1,19 \pm 0,13$
ВДГК (2)	$1,19 \pm 0,13$	0,99
ВДГК+синдром Марфана (1)		

продуцируют меньше коллагена, что подтверждает высказанное предположение об общем характере ВДГК, несмотря на то что диспластический процесс затрагивает хрящевую ткань. Можно предположить, что снижение продукции коллагена является одним из этиологических факторов этой дисплазии.

Полученные результаты позволяют использовать выделенные фибробласты в качестве модели для исследования молекулярных причин возникновения данной дисплазии.

ЛИТЕРАТУРА

- Исаков Ю. Ф., Долецкий С. Я. Детская хирургия. — 2-е изд. — М., 1978.
- Лазюк Г. И., Лурье И. В., Чертовой Е. Д. Наследственные синдромы множественных пороков развития. — М., 1983.
- Прозоровская Н. Н., Глиняная С. В., Рудаков С. С., Дельвиц А. А. // Вопр. мед. химии. — 1987. — № 3. — С. 59—61.
- Berg R. A., Kao W. W., Prockop D. J. // Biochim. biophys. Acta. — 1976. — Vol. 444. — P. 756—764.
- Berg R. A., Steinmann B., Ronnard S. I., Cristal R. G. // Arch. Biochem. — 1983. — Vol. 226. — P. 681—686.
- Kivirikko K. I., Risteli L. // Med. Biol. — 1976. — Vol. 54. — P. 159—186.
- Murad S., Sivarajah A., Pinnel S. R. // J. invest. Derm. — 1980. — Vol. 75. — P. 404—407.
- Murad S., Tajima S., Johnson G. R. // Ibid. — 1983. — Vol. 81. — P. 158—162.
- Peterkofski B. // Arch. Biochem. — 1972. — Vol. 152. — P. 318—328.
- Prockop D. J., Kivirikko K. I., Tuderman L. // Med. Progr. — 1977. — Vol. 301. — P. 13—23.
- Westner M., Krieg T., Horlein D., Glanville W. // J. Biol. Chem. — 1979. — Vol. 254. — P. 7016—7023.

Поступила 10.01.89

INFLUENCE OF ASCORBIC ACID ON COLLAGEN SYNTHESIS IN SKIN FIBROBLASTS OF CHILDREN WITH FUNNEL CHEST

T. A. Tsvetkova, T. A. Gorokhova, A. A. Deloig

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

Relative synthesis of collagen was studied in skin fibroblasts of children with funnel chest and of corresponding age children (control) in presence of ascorbic acid. In presence of ascorbic acid the rate of collagen synthesis was 2-2.4-fold lower than in corresponding controls both in proliferating and stationary cultures. At the same time, relative synthesis of collagen was quite similar both in the patient and control fibroblasts in presence of ascorbic acid. Estimation of the ^{14}C -Hypro/ ^{14}C -Pro ratio in collagens isolated from cultural media showed that there was no difference in the hydroxylation rate of collagens in control and patient fibroblasts. These data suggest that funnel chest is one of the forms of systemic connective tissue diseases, which impaired mainly the cartilages.

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

КОМПЛЕКСНОЕ СОЕДИНЕНИЕ ГЕПАРИНА С ГИСТАМИНОМ, ЕГО ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

МГУ им. М. В. Ломоносова

В тучных клетках печени происходит синтез гистамина и гепарина [11]. Полиэлектролит гепарин соединен с биогенным амином гистамином гранул тучных клеток электростатически [7]. Гистамин является одним из химических факторов, участвующих в регуляции жизненных функций, в частности через специфические гистаминовые рецепторы. В обычных же физиологических условиях гистамин находится преимущественно в неактивном связанном состоянии [5]. Физиологический уровень гистамина в плазме и тканевых жидкостях организма составляет 10^{-6} М [7], но этот уровень может увеличиваться вследствие высвобождения гистамина из комплекса с гепарином, что может являться показателем возникновения ряда патологических состояний организма [11]. Свободный гистамин вызывает спазм гладкой мускулатуры, расширение капилляров и понижение АД, увеличение проницаемости стенок капилляров, усиление секреции желудочного сока [5].

Комплексообразование между гепарином и гистамином было установлено методами микрокалориметрии, видимой и инфракрасной спектрофотометрии. Показано, что комплекс может существовать в области значений pH 2,1—9,5 и при ионной силе 0,01—0,15 раствора. Высказано предположение [2] о наличии гидрофобных взаимодействий в комплексе и участии в его образовании слабых молекулярных сил, что создает лабильность комплекса.

Ранее установлено [4], что комплексные соединения гепарина с белками крови и аминами участвуют в регуляции жидкого состояния кро-

ви в кровеносном русле, создавая неферментативным путем высокий антикоагулянтный и фибринолитический фон.

Представляло интерес выяснить участие комплексного соединения гепарина с гистамином в реакциях системы гемостаза. Поэтому целью настоящей работы было разработать способ получения комплекса гепарина с гистамином и изучить некоторые его физико-химические и физиологические свойства.

Методика. Для получения комплекса гепарина с гистамином использовали препараты гистамина («Fluka», Швейцария) и гепарина («Richter», Венгрия и «Srofa», Чехословакия).

Комплексообразование между гепарином и гистамином контролировали методом пересекающегося электрофореза [12] в 0,05 М фосфатном буфере pH 7,2 при градиенте напряжения 15 В/см. Исследовали электрофоретические свойства комплекса и его составных частей.

Разработали метод получения комплекса гепарина с гистамином при различных массовых соотношениях гепарина и гистамина, заключающийся в осаждении комплекса при изменении концентрации водородных ионов (pH 5,0—5,2) с последующим центрифугированием, двукратным промыванием осадка дистиллированной водой с pH 5,0. Полученный осадок, который представлял собой комплекс гепарина с гистамином, высушивали при комнатной температуре в струе воздуха и хранили в эксикаторе над хлоридом кальция.

В экспериментах *in vitro* определяли антикоагулянтную активность комплексов и их составных частей в дозах, эквивалентных их содержанию в комплексах, по методу [6], неферментативную фибринолитическую активность по методу [3], антиполимеризационные свойства по отношению к фибрин-мономеру по методу [4].

В экспериментах *in vivo* использовано 80 белых крыс-самцов массой тела 180—200 г. 1-й подопытной группе животных вводили 0,1 % раствор комплекса гепарин—гистамин (соотношение 10:1) в объеме 0,5 мл, а контрольным животным — гепарин (2-я группа), гистамин (3-я группа) в дозах, эквивалентных их содержанию в комплексе, а также растворитель — 0,85 % раствор хлорида натрия (4-я группа). Кровь у животных брали из яремной вены через 1 и 10 мин после введения препаратов в ту же вену, используя в качестве консерванта 3,8 % цитрат натрия при соотношении кровь : консервант как 9:1. Определяли суммарную фибринолитическую активность (СФА) плазмы, неферментативный фибринолиз (НФ) плазмы по методу [3], концентрацию фибриногена по методу [10] в модификации [11], уровень гепарина по методу [9]. Регистрировали показатели T_1 — начало свертывания, T_2 — конец свертывания, T — продолжительность свертывания

Таблица 1

Антикоагулянтные, антиполимеризационные и неферментативные фибринолитические свойства комплекса гепарин — гистамин ($M \pm m$)

Препарат	Антикоагулянтная активность (тромбиновое время, с)	Антиполимеризационная активность (количество оставшегося в сгустке белка, мг%)	НФ (зоны лизиса на нестабилизированном фибрине в присутствии ϵ -аминокапроновой кислоты, мм ²)
Комплекс гепарин — гистамин:			
1:3	178 ± 8,0	—	0
1:1	Более 5 мин*	—	0
3:1	Более 5 мин*	—	0
6:1	Более 5 мин*	220 ± 8,7*	84,7 ± 3,08*
10:1	Более 5 мин*	207 ± 9,0*	91,2 ± 4,9*
15:1	Более 5 мин*	200 ± 5,0*	101,3 ± 4,1*
Гепарин (контроль к комплексам при соотношениях 6:1, 10:1, 15:1)	Более 5 мин*	200 ± 7,0*	0
Гистамин (контроль к комплексам) при соотношениях:			
6:1	48 ± 2,5	313 ± 11,1	0
15:1	48 ± 4,1	321 ± 7,3	0
0,85 % раствор хлорида натрия	52 ± 3,9	305 ± 10,3	0

Примечание. Статистические показатели рассчитаны относительно соответствующих проб контроля с 0,85 % раствором хлорида натрия (здесь и в табл. 2). Звездочка — $p < 0,001$. Приведены средние данные 6 опытов в каждой группе.

по данным коагулограммы на коагулометре Н-334. В другой серии экспериментов определяли динамику неферментативного фибринолиза плазмы крыс после однократного внутривенного введения комплекса гепарин — гистамин.

Полученные данные обработаны статистически по методу Фишера — Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Комплексообразование между гепарином и гистамином подтверждено методом перекрестного электрофореза. В месте пересечения гепарина и гистамина наблюдали изгиб полосы (окраска электрофореграмм на кислые группы гепарина азуром II), что свидетельствовало о наличии взаимодействия между гепарином и гистамином. Отмечено, что электрофоретическая подвижность одного гепарина превышала таковую гепарина в комплексе с гистамином.

Как видно из табл. 1, полученные нами комплексные соединения гепарина с гистамином при соотношениях 6:1, 10:1, 15:1, 3:1, 1:1 обладали антикоагулянтной активностью, соответствующей той же активности, эквивалентной по отношению к комплексам дозы гепарина. При анализе активности неферментативного фибринолиза установлено, что оптимальное соотношение гепарина и гистамина, равное 6:1, 10:1, 15:1, приводит к образованию комплексов с фибринолитической активностью на нестабилизированный фибрин, проявляющейся даже в присутствии блокаторов ферментативного фибринолиза (ϵ -аминокапроновой кислоты или ингибитора трипсина из соевых бобов). Гепарин и гистамин в дозах, эквивалентных их содержанию в комплексе, не оказывали литического действия на нестабилизированный фибрин (см. табл. 1). Обнаружено, что комплекс гепарин — гистамин при соотношениях 10:1 и 15:1 оказывает антиполимеризационное действие по отношению к фибрин-мономеру. Видимо, это свойство комплекса обусловлено присутствующим в его составе гепарином, так как последний также проявляет антиполимеризационную активность в дозах, соответствующих его содержанию в комплексах.

В эксперименте *in vivo* мы использовали препараты комплекса гепарин — гистамин, получен-

ные при соотношении компонентов 10:1, поскольку при таком соотношении комплекс обладал высокой неферментативной фибринолитической активностью, антикоагулянтным и антиполимеризационным свойствами. Как видно из табл. 2, уже на 1-й минуте после внутривенного введения комплекса гепарин — гистамин достоверно увеличились неферментативный фибринолиз плазмы (в 1,5 раза), уровень гепарина (в 1,47 раза) по сравнению с теми же показателями у животных контрольной группы, получавших 0,85 % хлорид натрия. Подобные же изменения обнаружены и в группе животных, получавших эквивалентную по отношению к комплексу дозу гепарина. К 10-й минуте опыта этот эффект еще более усилился: в крови животных, получавших комплекс гепарин — гистамин, повысились СФА плазмы (в 2,1 раза), НФ плазмы (в 2,9 раза), уровень гепарина (в 2,8 раза), Т коагулограммы (в 1,7 раза) по сравнению с контрольными пробами после введения раствора хлорида натрия. В этот период опыта в крови животных, получавших гепарин, как и в опытных пробах, наблюдалось повышение НФ (в 2,3 раза), уровня гепарина (в 2,9 раза), Т коагулограммы (в 1,9 раза) по сравнению с 4-й контрольной группой животных. К 10-й минуте эксперимента в крови животных 1-й и 2-й групп отмечено снижение концентрации свертываемого тромбином фибриногена. На основании этого эксперимента можно предполагать, что введенный в кровотоки гепарин быстро (с 1-й минуты) взаимодействует с белками крови и аминами с образованием комплексов, обладающих антикоагулянтными и неферментативными фибринолитическими свойствами. Комплекс гепарин — гистамин при внутривенном введении способствует появлению антикоагулянтных и фибринолитических свойств, начиная с 1-й минуты после поступления в кровоток. Гистамин же в достаточно низких концентрациях, эквивалентных его содержанию в комплексе (100 мкг на 200 г массы тела), практически не оказывал никакого влияния на показатели свертывающей и противосвертывающей систем.

Таблица 2

СФА плазмы, ее НФ, концентрация фибриногена (Ф), уровень гепарина (Г), показатели Т₁, Т₂, Т коагулограммы плазмы крови животных через 1 и 10 мин после внутривенного введения комплекса гепарин — гистамин в соотношении 10:1 (M \pm m)

Препарат	СФА, мм ²	НФ, мм ²	Ф, мг%	Г, ед/мл	Т ₁ , с	Т ₂ , с	Т, с
Через 1 мин после введения							
Комплекс гепарин — гистамин (n=10)	62 \pm 2	39 \pm 4**	208 \pm 9	0,41 \pm 0,1*	—	—	—
Гепарин (n=10)	68 \pm 2*	45 \pm 3**	198 \pm 4	0,43 \pm 0,07*	—	—	—
Гистамин (n=10)	51 \pm 3	26 \pm 3	241 \pm 7	0,27 \pm 0,03	—	—	—
0,85 % раствор хлорида натрия (n=12)	54 \pm 3	26 \pm 2	234 \pm 6	0,28 \pm 0,02	—	—	—
Через 10 мин после введения							
Комплекс гепарин — гистамин (n=10)	117 \pm 12**	78 \pm 7**	146 \pm 16**	0,75 \pm 0,1**	205 \pm 42	322 \pm 59	117 \pm 18**
Гепарин (n=10)	87 \pm 10**	69 \pm 7**	131 \pm 16**	0,77 \pm 0,1**	206 \pm 45	339 \pm 55	133 \pm 32**
Гистамин (n=9)	54 \pm 6	23 \pm 7	196 \pm 12	0,8 \pm 0,05	260 \pm 45	361 \pm 70	101 \pm 8*
0,85 % раствор хлорида натрия (n=10)	53 \pm 4,4	27 \pm 3	232 \pm 17	0,27 \pm 0,03	155 \pm 30	224 \pm 41	69 \pm 9

Примечание. Использовали 0,1 % раствор комплекса. Одна звездочка — $p < 0,05$, две $p < 0,001$.

Динамика НФ плазмы крови крыс после однократного внутривенного введения комплекса гепарин — гистамин (соотношение 10:1) в дозе 1 мг на 200 г массы тела ($M \pm m$)

Время после введения, мин	Зона лизиса, мм ²	<i>p</i>
1	39 ± 4	<0,05
10	78 ± 7	<0,001
30	65 ± 11	<0,001
60	61 ± 3	<0,05
90	32 ± 5	>0,5
Контроль (до введения)	38 ± 4	

Примечание. Статистические показатели рассчитаны относительно исходного уровня. Зоны лизиса определены на нестабилизированном фибрине в присутствии ϵ -аминокапроновой кислоты.

Возник вопрос, как долго комплекс гепарин — гистамин может существовать в кровотоке и оказывать неферментативное фибринолитическое действие? Оказалось (табл. 3), что к 10-й минуте эксперимента комплекс проявляет максимальное неферментативное фибринолитическое действие, которое снижается к 60-й минуте опыта, однако превышает контрольный уровень. К 90-й минуте эксперимента комплекс гепарин — гистамин, видимо, диссоциирует и выводится из кровотока, так как в этот период НФ соответствует контрольному значению.

Представленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что гистамин вступает в реакцию комплексообразования с гепарином. В зависимости от количественных взаимоотношений того и другого компонента в реакционной среде возникают комплексы, обладающие разной степенью физиологической активности. Комплекс гепарин — гистамин, полученный при соотношениях компонентов 6:1, 10:1, 15:1, обладает антикоагулянтным, антиполимеризационным и неферментативным фибринолитическим свойствами. Этот комплекс менее прочен, чем комплексы гепарина с белками, о чем свидетельствовали данные электрофореза [12]. По-видимому, этим можно объяснить наличие у него такой же, как и у эквивалентной дозы гепарина, антикоагулянтной активности.

Указанные выше свойства комплекса гепарин — гистамин следует считать достаточно ценными вследствие того что ему присущи антикоагулянтное и неферментативное фибринолитическое действие, предохраняющее организм от тромботических осложнений. Поскольку и гепарин, и гистамин присутствуют в кровотоке, а следовательно, могут взаимодействовать с образованием активного комплексного соединения, то комплекс гепарин — гистамин, как и другие комплексы гепарина с белками крови, а также аминами (адреналином, норадrenalином, серотонином), может быть отнесен к регуляторам жидкого состояния крови в кровеносном русле. Не исключено, что этот комплекс появляется при активации функции противосвертывающей системы, а поэтому может быть отнесен к гуморальным агентам противосвертывающей системы.

1. Андреев Г. В. // Лаб. дело.— 1962.— № 5.— С. 3—7.
2. Ерзинкян К. Л., Алавердян К. Г., Нижний С. В., Пирузян Л. А. // Изв. АН СССР. Сер. биол.— 1977.— № 6.— С. 813—818.
3. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А. // Лаб. дело.— 1971.— № 6.— С. 326—329.
4. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А., Молчанова Л. В., Рустамова Б. А. // Вопр. мед. химии.— 1970.— № 2.— С. 161—167.
5. Машковский М. Д. Лекарственные средства.— М., 1986.— Т. 1.— С. 37.
6. Сирмаи Э. // Пробл. гематол.— 1957.— № 6.— С. 38—44.
7. Успенский В. Н. Гистамин.— М., 1962.
8. Чазов Е. И., Лакин К. М. // Антикоагулянты и фибринолитические средства.— М., 1977.— С. 311—319.
9. Шестаков В. А., Ильин В. Н. // Компл. об. изобрет. и рац. предл. мед. вузов и научно-исслед. ин-тов РСФСР.— Иваново, 1974.— С. 220—232.
10. Bidwell E. // Biochem. J.— 1953.— Vol. 55.— P. 497—506.
11. Jaques L. B. // Science.— 1979.— Vol. 206.— P. 528—530.
12. Nakamura S., Takeo K., Tanaka K., Ueta T. // Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.— 1960.— Bd 318, N 1.— S. 115—119.
13. Uonas B. // Heparin: Structure, Cellular Functions and Clinical Applications.— New York, 1979.— P. 243—247.

Поступила 10.02.89

COMPLEX FORMATION OF HEPARIN AND HISTAMINE: ITS PHYSICO-CHEMICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES

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

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

Complexes between heparin and histamine at various ratio exhibited various physiological activity. The complex containing heparin-histamine at the ratio of 6:1, 10:1 or 15:1 showed anticoagulation, antipolymerization and non-enzymatic fibrinolytic effects. The complex dissociated in circulation within 90 min after its administration. This complex effected also the rheologic properties of blood.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 612.111.7.06:612.111.7.015.1:577.152.633

Ю. Ю. Чирков, И. А. Тыщук, И. С. Северина

СВЯЗЬ МЕЖДУ АГРЕГАЦИЕЙ ТРОМБОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА И СПОСОБНОСТЬЮ РАСТВОРИМОЙ ТРОМБОЦИТАРНОЙ ГУАНИЛАТЦИКЛАЗЫ К АКТИВАЦИИ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

В регуляции процесса агрегации и дезагрегации тромбоцитов млекопитающих существенная, хотя до конца и не выясненная, роль принадлежит системе циклических нуклеотидов: цАМФ и цГМФ. Ранее считалось, что система цГМФ ответственна за инициацию, а система цАМФ — за подавление агрегации [8]. К настоящему времени сложилось представление о подавляющем действии на агрегацию и со стороны цГМФ [9, 13, 15]. В отличие от системы цАМФ, опосредующей внешний сигнал к ограничению интенсивности агрегации (простагландин, простагландин E_1), система цГМФ действует по принципу внутриклеточной отрицательной обратной связи. Предполагают [9, 13], что развитие процесса агрегации вызывает повышение актив-

ности гуанилатциклазы (ГЦ; КФ 4.6.1.2) тромбоцитов через посредство эндогенных активаторов, а следующее за этим накопление цГМФ приводит к подавлению агрегации и инициирует дезагрегацию. Если агрегация тромбоцитов, действительно, находится под негативным контролем со стороны системы цГМФ, то в случаях патологически повышенной способности тромбоцитов к агрегации, как это наблюдается при некоторых заболеваниях, правомерно ожидать нарушений функционирования ГЦ тромбоцитов: сниженной активности и реактивности фермента. В экспериментах на тромбоцитах крови больных сахарным диабетом (СД), сопровождающимся, как известно [1, 6], микроангиопатиями и усилением агрегационной способности тромбоцитов, мы показали [4, 5], что АДФ-индуцируемая агрегация тромбоцитов повышена, а активность тромбоцитарной ГЦ и ее активация нитропруссидом натрия (НН) понижены.

В настоящей работе мы решили более подробно изучить выявленный феномен ослабления реакции ГЦ на НН и исследовать влияние на ГЦ со стороны протеоинорфирина IX (ППИХ) как другого эндогенного стимулятора ГЦ, а также гемоглобина как гемсодержащего белка, способного модулировать активность ГЦ и ее активацию нитропруссидом.

Методика. Тромбоциты доноров или больных СД, описанных в наших предыдущих работах [4, 5], выделяли из венозной крови с использованием Ficoll-Raque («Pharmacia», Швеция) в соответствии с ранее опубликованным нами методом [2]. В качестве антикоагулянта применяли 0,1 М ЭДТА в соотношении с кровью 1:10 по объему. Суспензию отмытых тромбоцитов в 50 мМ трис-НСI-буфере (рН 7,6), содержащем 0,2 мМ дитиотрептола, озвучивали при 0 °С на ультразвуковом дезинтеграторе MSE 5-78 (Англия) в течение 20 с, а затем centrifугировали 1 ч при 105 000 g на ультрацентрифуге «Beckman L 5-65» (Австрия). Супернатант использовали в качестве препарата растворимой ГЦ.

Активность ГЦ определяли по описанному ранее методу [2] в присутствии 1 мМ ГТФ и 4 мМ MgCl₂. В экспериментах с НН проводили его преинкубацию с ГЦ в течение 50 мин при 0 °С [3]. Количество цГМФ, образовавшегося в ходе ферментативной реакции (10 мин при 37 °С), определяли радиоиммунологическим методом с помощью набора реактивов cGMP RIA kit («Amersham», Англия) по прилагаемой методике, но в нашей модификации [2]. Активность ГЦ выражали в пикомолях образовавшегося цГМФ на 1 мг ферментного препарата за 1 мин. Результаты экспериментов обрабатывали статистически, достоверность различий оценивали по критерию t Стьюдента.

Результаты и обсуждение. В предыдущих экспериментах, проведенных нами на тромбоцитах крови больных СД, мы обнаружили, что повышенная агрегационная способность тромбоцитов сопровождается пониженной активностью тромбоцитарной ГЦ и ослабленной ее НН-акти-

вацней; отклонения от нормы были более выраженными при II типе СД, чем при I [4, 5]. Результаты исследований, описанных в настоящей работе, полностью подтверждают это наблюдение: НН-активация ГЦ тромбоцитов больных СД I и II типов понижена по сравнению с нормой соответственно в 2 и 3 раза (табл. 1). Известно, что NO в водных растворах генерирует свободнорадикальную группу NO, которая нитрозилирует гем, входящий в молекулу ГЦ, вызывая в конечном счете повышение ее активности [12].

Применение НН в качестве активатора ГЦ является традиционным, но только в последнее время было показано, что этот методический подход физиологически правомерен. Оказалось, что NO является эндогенным стимулятором ГЦ тромбоцитов и клеток гладкой мышечной ткани кровеносных сосудов; NO легко проникает через клеточную мембрану и идентичен описанному ранее эндотелиальному фактору релаксации [14]. В предыдущих опытах мы определили оптимальную концентрацию НН, необходимую для активации ГЦ тромбоцитов человека (она составила 0,1 мМ), и показали, что степень активируемости ГЦ отражает функциональное состояние фермента [3]. Зарегистрированное нами (см. табл. 1) уменьшение НН-активации ГЦ из тромбоцитов крови больных СД могло бы свидетельствовать о гемдефицитности фермента, тем более что при СД отмечается нарушение в метаболизме гема [1]. Наличие гемдефицитности можно установить по увеличению способности ГЦ к НН-активации в присутствии гемсодержащего белка [7, 16]. Поэтому мы добавляли в инкубационную среду гемоглобин (20 мкг/мл [3, 7]), что привело к 2-кратному увеличению ГЦ-стимулирующего эффекта НН (рис. 1), но это увеличение оказалось одинаковым для препаратов ГЦ, полученных из тромбоцитов как здоровых людей, так и больных СД. Более того, известно, что гем (свободный или в составе гемсодержащего белка) подавляет активность ГЦ, причем тем в большей степени, чем сильнее выражена ее гемдефицитность [10, 12]. В наших экспериментах (см. рис. 1) гемоглобин вызывал одинаковое уменьшение базальной активности ГЦ из тромбоцитов здоровых людей и больных СД и практически не влиял на величину НН-стимулированной активности ГЦ.

Итак, гемдефицитность не является причиной обнаруженного нами снижения НН-активируемости ГЦ. Частичная гемдефицитность ГЦ в норме (см. рис. 1) регистрировалась нами ранее [3] и соответствует результатам, полученным другими авторами [7, 10]. Предполагают, что в клетке поддерживается определенное соотношение гем-

Таблица 1

Активирующее действие 0,1 мМ НН и 5 мкМ ППИХ на ГЦ тромбоцитов человека в норме и при СД

Условия исследования	Базальная активность ГЦ, пмоль на 1 мг белка в 1 мин	Кратность эффекта			(НН+ППИХ)
		НН	ППИХ	НН+ППИХ	(НН)+(ППИХ)
Норма	208±12 (12)	11,34±0,98 (12)	4,93±0,55 (5)	15,45±0,77 (5)	0,96±0,07 (5)
СД I типа	140±10* (8)	6,38±0,29** (8)	3,04±0,10* (4)	9,89±0,69* (4)	1,05±0,08 (4)
СД II типа	105±7* (6)	3,59±0,37* (5)	1,96±0,16* (4)	7,10±0,50* (4)	1,23±0,11 (4)

Примечание. Здесь и в табл. 2 в скобках — количество независимых экспериментов. Звездочка — $p < 0,05$.

Соотношение стимулирующих эффектов 0,1 мМ НН и 5 мкМ ППХ на ГЦ тромбоцитов человека в норме и при СД

Условия исследования	Доля эффекта, %	
	НН	ППХ
Норма	69±2 (5)	31±2 (5)
СД I типа	67±1 (4)	33±1 (4)
СД II типа	65±3 (4)	35±3 (4)

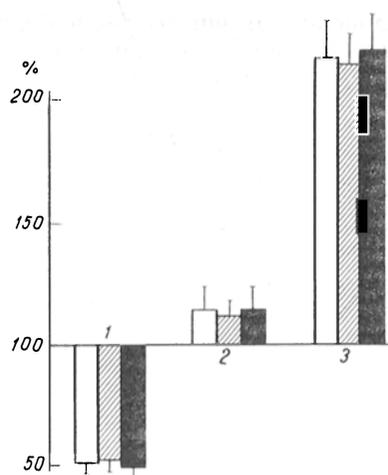


Рис. 1. Влияние гемоглобина (20 мкг/мл) на базальную (1) и НН-стимулированную (2) активности ГЦ тромбоцитов человека и на величину стимулирующего эффекта 0,1 мМ НН (3) в норме и при СД (в % от контроля).

Светлые столбики — норма (11 человек), заштрихованные — СД I типа (8 человек), темные — СД II типа (5 человек).

содержащей и гемдефицитной ГЦ, необходимое для регуляции чувствительности фермента к внутриклеточным активаторам [11, 12], в частности к NO [14].

В последующих экспериментах мы сопоставили эффекты НН с действием ППХ — специфичного эндогенного активатора ГЦ, действие которого на фермент не опосредуется в отличие от НН взаимодействием NO с гемом [11, 16]. В предварительных опытах мы определили, что максимальным стимулирующим действием на ГЦ ППХ обладает в концентрации 5 мкМ (рис. 2); накопление цГМФ при инкубации ГЦ в присутствии ППХ линейно во времени.

Мы обнаружили, что ППХ-активация ГЦ из тромбоцитов больных СД I и II типов понижена по сравнению с нормой соответственно на 25 и 50 % (см. табл. 1). Эффект совместного применения НН и ППХ равнялся сумме их эффектов при раздельном применении в экспериментах с препаратами ГЦ из тромбоцитов здоровых людей и больных СД I типа и практически не превышал эту сумму при СД II типа (см. табл. 1). Процентная доля эффектов активации НН и ППХ оставалась постоянной и в норме, и при СД (табл. 2). Таким образом, происходит одновременное уменьшение способности ГЦ тромбоцитов к активации обоими стимуляторами (НН и ППХ), которые действуют на фермент независимо друг от друга.

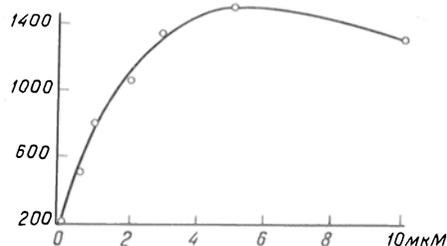


Рис. 2. Влияние ППХ на активность ГЦ тромбоцитов человека в норме.

По оси абсцисс — концентрация ППХ в инкубационной среде (в мкМ), по оси ординат — активность ГЦ (в нмоль цГМФ на 1 мг белка в 1 мин).

Обнаруженное ослабление реакции ГЦ на активаторы согласуется с ранее описанной нами [4] и другими авторами [1, 6] повышенной агрегационной способностью тромбоцитов крови больных СД. Поскольку в тромбоцитах при СД уменьшается также и базальная активность ГЦ (см. табл. 1), совокупность экспериментальных результатов позволяет предположить, что изменения в функционировании тромбоцитарной ГЦ могут реализоваться *in vivo* в виде нарушения регуляции процесса агрегации тромбоцитов и ослабления негативного контроля над этим процессом со стороны системы цГМФ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Диагностика и патогенетическая терапия диабетических ангиопатий / Ефимов А. С., Зубкова С. Т., Данилова А. И. и др. — Киев, 1986.
2. Чирков Ю. Ю., Тыщук И. А., Белушкина Н. П., Северина И. С. // Биохимия. — 1987. — Т. 52. — С. 956—963.
3. Чирков Ю. Ю., Тыщук И. А., Северина И. С. // Там же. — 1988. — Т. 53. — С. 1520—1527.
4. Чирков Ю. Ю., Тыщук И. А., Северина И. С. // Всесоюзный симпозиум по циклическим нуклеотидам, 6-й: Тезисы. — Петрозаводск, 1988. — С. 92—93.
5. Чирков Ю. Ю., Тыщук И. А., Северина И. С., Старосельцева Л. К. // Бюл. экпер. биол. — 1989. — № 3.
6. Cartwright I. J., Greaves M., Preston F. E. // Agents Actions. — 1987. — Vol. 22. — P. 364—365.
7. Craven P. A., De Rubertis F. R. // Biochim. biophys. Acta. — 1983. — Vol. 745. — P. 310—321.
8. Goldberg N. D., Haddox M. K., Nicol S. E. et al. // Advanc. Cyclic Nucl. Res. — 1975. — Vol. 5. — P. 307—330.
9. Karrenbrock B., Greve R., Loeschke K., Gerezer R. // Path. Biol. — 1987. — P. 251—254.
10. Ignarro L. J., Degnan J. N., Baricos W. H. et al. // Biochim. biophys. Acta. — 1982. — Vol. 718. — P. 49—59.
11. Ignarro L. J., Ballot B., Wood K. S. // J. biol. Chem. — 1984. — Vol. 259. — P. 6201—6207.
12. Ignarro L. J., Adams J. B., Horwitz P. M., Wood K. S. // Ibid. — 1986. — Vol. 261. — P. 4997—5002.
13. Mellion B. T., Ignarro L. J., Ohtstein E. H. et al. // Blood. — 1981. — Vol. 57. — P. 946—955.
14. Moncada S., Herman A. G., Vanhoutte P. // Trends pharmacol. Sci. — 1987. — Vol. 8. — P. 365—367.
15. Nishikawa M., Kanamori M., Hidaka H. // J. Pharmacol. exp. Ther. — 1982. — Vol. 220. — P. 183—190.
16. Tsai S. C., Adamik R., Manganiello V. C., Vaughan M. // Biochem. J. — 1983. — Vol. 215. — P. 447—455.

Поступила 10.02.89

CORRELATION BETWEEN RATES OF HUMAN THROMBOCYTES AGGREGATION AND ACTIVATION OF THE SOLUBLE GUANYLATE CYCLASE

Yu. Yu. Chirkov, I. A. Tyschuk, I. S. Severina

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

Guanylate cyclase from thrombocytes with elevated ability to aggregation (diabetes mellitus) exhibited a decreased rate of activity and low response to stimulation by sodium

nitroprusside and protoporphyrin IX. The phenomenon observed did not depend on hem-deficiency of guanylate cyclase and was manifested most distinctly in the II type of diabetes mellitus as compared with the I type of the disease. Experimental data as well as the previously obtained results about more elevated rate of thrombocytes aggregation in patients with the II type of diabetes mellitus demonstrated that regulating functions of the cGMP system in the cells aggregation were impaired and that aggregation of thrombocytes appears to depend on the guanylate cyclase activity.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.36-008.931:577.152.313+616.36-008.93:577.123.31-02:615.357.371-053.31-092.9

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

ВЛИЯНИЕ ИНСУЛИНА НА ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ КИСЛОЙ ФОСФАТАЗЫ И УРОВНЯ цАМФ В ПЕРВИЧНОЙ МОНОСЛОЙНОЙ КУЛЬТУРЕ ГЕПАТОЦИТОВ НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС В УСЛОВИЯХ АНОКСИИ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

В литературе имеются данные об участии инсулина в регуляции активности лизосомного аппарата. В культуре фибробластов инсулин ингибирует протеолиз [13], у взрослых крыс подавляет образование аутофагических вакуолей [25]. При диабете дефицит инсулина коррелирует с повышением активности кислых гидролаз [2].

Действие инсулина на лизосомы, по-видимому, может быть опосредовано через циклические нуклеотиды. Однако имеющиеся по этому поводу сведения противоречивы. Так, наблюдается повышение содержания циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) в ответ на действие инсулина за счет активации аденилатциклазного комплекса [14, 30] и, наоборот, снижение уровня цАМФ за счет активации фосфодиэстеразы цАМФ [10, 23, 31]. При введении инсулина изменение уровня цАМФ не было обнаружено [12].

В настоящей работе исследовали влияние инсулина на стабильность мембран лизосом в 4-дневных монослойных культурах гепатоцитов новорожденных крыс при моделировании аноксии. Одновременно определяли уровень цАМФ, чтобы найти корреляцию между тремя факторами — воздействием инсулина, состоянием мембран лизосом и уровнем цАМФ. Известно, что на мембране гепатоцитов имеются специфические рецепторы инсулина; гепатоциты используют для изучения систем регуляции, функционирующих при участии инсулина [15]. Гепатоциты новорожденных крыс при культивировании в монослое в течение 3—4 сут сохраняют характерные функциональные свойства, митотическую активность и реактивность в отношении различных гормонов [18, 26].

Методика. Для получения монослойной культуры гепатоцитов 2—3-дневных крыс декантитировали, в асептических условиях измельчали печень, измельчали и инкубировали ее в течение 1 ч при 37 °С в растворе коллагеназы

(0,5 мг/мл, «Sigma»), приготовленном на среде 199, содержащей 10 мМ HEPES, 200 ЕД/мл пенициллина и 5 мМ пирuvat натрия. Материал диспергировали, фильтровали и обогащали паренхиматозными клетками [5], затем его высевали в стеклянные чашки Петри диаметром 10 см, покрытые желатином [1]. Конечное разделение клеточной суспензии 1,5 млн клеток в 1 мл. Ростовая среда состояла из среды 199, содержащей 10 мМ HEPES, 200 ЕД/мл пенициллина, 5 % эмбриональной телячьей сыворотки и 2 мМ глутамина. В опытах использовали клеточные культуры на 4 сутки культивирования. Перед началом экспериментов ростовую среду культур заменили на бессывороточную. В работе использовали коммерческий водный раствор кристаллического инсулина активностью 40 МЕ/1 мл, конечная концентрация инсулина 10^{-7} М. Клеточные культуры инкубировали в присутствии инсулина в нормальной атмосфере с 5 % углекислого газа и в условиях аноксии в течение 2 или 20 мин. Использовали также предварительную инкубацию клеток с инсулином в течение 1 ч с последующим моделированием аноксии в течение 20 мин. Аноксию моделировали в газоплотной термостатированной камере, через которую непрерывно пропускали азот. Чашки Петри помещали в камеру без крышек. Контрольные культуры инкубировали в нормальной атмосфере с 5 % углекислого газа.

Для определения активности кислой фосфатазы культуру клеток споласкивали 0,25 М раствором сахарозы, содержащим 1 мМ ЭДТА, pH 7,4, и собирали скребком. Гомогенат подвергали дифференциальному центрифугированию. Осадок, содержащий фракцию, обогащенную лизосомами, ресуспендировали и обрабатывали тригоном X-100 в конечной концентрации 0,1 %, после чего определяли так называемую связанную активность кислой фосфатазы. В надосадочной жидкости после центрифугирования при 100 000 g измеряли свободную активность фермента. Определение активности проводили спектрофотометрически, в качестве субстрата использовали 4-нитрофенилфосфат [6] и выражали в микромолях продукта, образованного при гидролизе субстрата за 1 мин на 1 мг общего белка. Белок определяли по методу Лоури.

Содержание цАМФ измеряли стандартным радиоиммунологическим методом с использованием наборов «Cyclic AMP Immunoassay Kit [125 I]». цАМФ экстрагировали 0,1 н. HCl после разрушения клеток двукратным замораживанием — оттаиванием (от -70 до $+4$ °С).

Результаты и обсуждение. Под действием инсулина в концентрации 10^{-7} М [3] через 2 мин наблюдается повышение уровня цАМФ в культивируемых гепатоцитах более чем в 2 раза по сравнению с контролем (рис. 1). Уменьшение концентрации инсулина до 10^{-8} — 10^{-9} М практически не изменяет характер стимуляции. Удлинение срока воздействия инсулина до 20 мин приводит к снижению повышенного уровня цАМФ, однако последний остается выше контрольного. Обычная смена среды на среду без сыворотки и

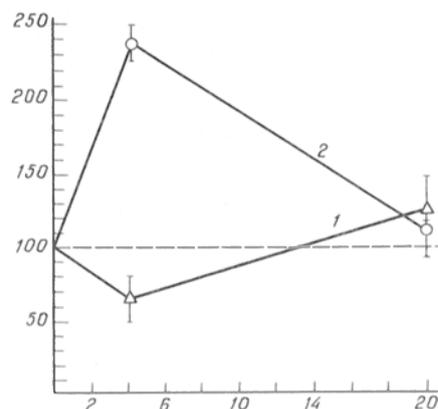


Рис. 1. Изменение содержания цАМФ в культуре гепатоцитов новорожденных крыс при смене среды на бессывороточную в отсутствие инсулина (1) и в его присутствии (2).

По оси абсцисс — время, мин; по оси ординат — содержание цАМФ, % от контроля.

инсулина через 2 мин приводит к незначительному снижению содержания цАМФ в клетках, а затем — к незначительному повышению его над исходным уровнем (см. рис. 1). Аналогичное изменение концентрации цАМФ в отсутствие сыворотки в среде инкубации наблюдали и на культуре кардиомиоцитов [16].

Резкое повышение уровня цАМФ через 2 мин после начала действия инсулина в культуре гепатоцитов новорожденных крыс, вероятно, вызывается неспецифическим (а возможно, и опосредованным) действием препарата на аденилатциклазный комплекс [7]. Повышение содержания цАМФ под действием инсулина в культуре гепатоцитов отмечали также и другие авторы [30].

При моделировании аноксии в течение 20 мин содержание цАМФ было в 1,4—1,5 раза выше исходного (рис. 2), но ниже, чем при 2-минутном воздействии гормона на клетки (см. рис. 1).

Таким образом, за 20 мин инкубации с инсулином в условиях нормоксии и аноксии стимулированный инсулином в первые 2 мин уровень цАМФ снижается. При этом в гепатоцитах он становится ниже исходного, если инсулин ввести в среду инкубации за 1 ч до моделирования аноксии и провести аноксию в присутствии его в той же среде (см. рис. 2).

Показана способность инсулина активировать фосфодиэстеразу цАМФ и снижать содержание цАМФ [17, 19, 23]. Установлено, что инсулин стимулирует фосфодиэстеразу с низким сродством к субстрату, в результате чего стимуляция нарастает во времени, достигая максимума через 10—15 мин. Этот эффект наблюдали при действии инсулина на интактную клетку и предполагали, что его влияние на фосфодиэстеразу опосредованно. Можно думать, что снижение стимулированного уровня цАМФ при длительном воздействии инсулина (см. рис. 2) также связано с активацией фосфодиэстеразы цАМФ, причем эта активация пролонгирована во времени.

При многих патологических состояниях имеет место изменение состояния мембран лизосом, что сопровождается повышением свободной активности лизосомных ферментов в гомогенатах ткани при одновременном снижении активности кислых гидролаз во фракции, обогащенной лизосомами [8], и, наоборот, стабилизация мембран лизосом сопровождается повышением активности кислых гидролаз во фракции, обогащенной лизосомами.

В наших экспериментах через 20 мин аноксии в присутствии инсулина наблюдается тенденция к снижению свободной и повышению связанной активности кислой фосфатазы (см. таблицу), что свидетельствует о некоторой стабилизации мем-

Изменение свободной и связанной активности кислой фосфатазы в культуре гепатоцитов новорожденных крыс при моделировании аноксии в присутствии 10^{-7} М инсулина ($M \pm m$)

Условия инкубации	Активность кислой фосфатазы, имоль на 1 мг общего белка за 1 мин	
	свободная	связанная
Исходная культура (контроль)	$7,16 \pm 0,75$ (6)	$9,45 \pm 1,41$ (6)
Аноксия в среде 199 с инсулином в течение 20 мин	$5,52 \pm 0,37$ (5)	$11,94 \pm 1,94$ (5)
Нормоксия в среде 199 с инсулином в течение 1 ч, затем аноксия 20 мин в той же среде	$11,44 \pm 1,25$ (5) $p < 0,05$	$14,98 \pm 1,85$ (5) $p < 0,05$

Примечание. В скобках — число опытов; p — достоверность различий по сравнению с контролем.

бран лизосом. Стабилизация происходит на фоне повышенного содержания цАМФ (см. рис. 2). Предварительная инкубация гепатоцитов с инсулином в течение 1 ч и последующая 20-минутная аноксия в его присутствии дают значительное усиление связанной активности кислой фосфатазы (см. таблицу), что свидетельствует о более выраженном стабилизирующем действии инсулина на лизосомный аппарат гепатоцитов при удлинении срока его воздействия. Уровень цАМФ в клетках в этом случае понижен (см. рис. 2). Следовательно, усиление эффекта стабилизации лизосомного аппарата гепатоцитов с помощью инсулина не связано с увеличением концентрации цАМФ в клетках в данный момент времени, а может быть следствием повышения уровня цАМФ в первые 2 мин воздействия инсулина на мембраны гепатоцитов.

Показано участие циклических нуклеотидов в регуляции стабильности мембран лизосом [8, 11]. Полагают, что цАМФ оказывает выраженное стабилизирующее действие. Если проанализировать взаимосвязь между уровнем цАМФ, измененным под действием инсулина, и состоянием мембран лизосом, то следует отметить, что кратковременное увеличение содержания цАМФ в клетках через 2 мин после введения инсулина меньше сказывается на состоянии мембран лизосом при 20-минутной аноксии, чем при введении инсулина за 1 ч до начала эксперимента. В данном случае повышение уровня цАМФ отдалено от процесса стабилизации более чем на 1 ч. Такая длительная скрытая фаза может свидетельствовать об опосредованном действии цАМФ не только на свойства мембран лизосом, но и на активацию образования и транспорта первичных лизосом.

Стабилизирующее действие инсулина непосредственно на мембранные структуры отмечалось неоднократно [3]. Чаще всего его связывают с изменением вязкости и текучести мембран в присутствии инсулина. Однако для того, чтобы инсулин мог непосредственно воздействовать на мембраны лизосом, он должен контактировать с этими мембранами. Известно, что после взаимодействия со специфическим рецептором на клеточной мембране инсулиновый комплекс активно интернализуется. Каким образом идет процесс интернализации, неизвестно. У клеток линии H411C3

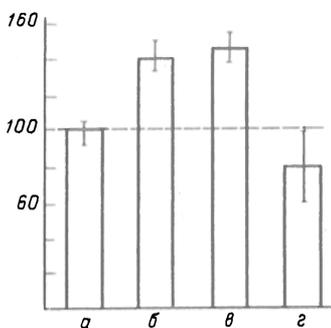


Рис. 2. Содержание цАМФ в культуре гепатоцитов.

а — исходная культура; б — моделирование аноксии в течение 20 мин в бесывороточной среде; в — моделирование аноксии в течение 20 мин в бесывороточной среде с добавлением инсулина; г — предварительная инкубация гепатоцитов с инсулином в среде без сыворотки в течение 1 ч и затем моделирование аноксии в течение 20 мин. По оси ординат — содержание цАМФ, % от контроля.

происходит интернализация инсулина без участия лизосом, инсулин рециркулирует в клетках в интактной форме [22, 28]. Если инсулин непосредственно не контактирует с мембраной лизосом, то трудно представить его участие в изменении вязкости этой мембраны.

Инсулин, так же как и цАМФ, может регулировать разнообразные клеточные процессы. Нередко действие инсулина, как и цАМФ, связано с фосфорилированием и дефосфорилированием некоторых клеточных белков за счет активации специфических цАМФ-зависимых протеинкиназ [21, 29]. Рецепторы инсулина обладают стимулируемой инсулином протеинкиназной активностью, как в отношении собственной β -субъединицы, так и относительно экзогенного субстрата [9, 20]. Эффект инсулина и цАМФ блокируется разными ингибиторами [27]. Первичный эффект инсулина в клетках печени может быть связан с изменением активности Na^+ , K^+ -АТФазы, что приводит к изменению ионного баланса клеток и, следовательно, к изменению активности ряда ферментов [24]. Именно с этим связывают опосредованное действие инсулина на мембранные процессы. С другой стороны, по всей вероятности, Na^+ , K^+ -АТФаза является ферментом, регуляция активности которого осуществляется и через цАМФ-зависимые протеинкиназы [4], а под влиянием инсулина в регуляцию мембран лизосом и функций лизосомного аппарата вовлекаются и другие механизмы, опосредованные цАМФ.

Таким образом, при воздействии на 4-дневную культуру гепатоцитов новорожденных крыс инсулин через 2 мин вызывает значительное повышение уровня цАМФ, а через отдаленный промежуток времени оказывает стабилизирующее действие на лизосомные мембраны. Можно полагать, что стабилизирующее действие инсулина на мембраны лизосом связано с повышением содержания цАМФ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков.— М., 1983.
2. Бабков В. Я. // *Здравоохранение Белоруссии*.— 1981.— № 11.— С. 28—30.
3. Бузурин И. М., Панов М. А. Итоги науки и техники. Общие проблемы физико-химической биологии. Механизмы формирования клеточного ответа.— М., 1987.
4. Ганелина Л. III. // *Цитология*.— 1985.— № 8.— С. 851—864.
5. Гепатоцит. Функционально-метаболические свойства.— М., 1983.
6. Дингл Д. Лизосомы: методы исследования.— М., 1980.
7. Иммунология. Т. 1.— М., 1987.
8. Коровкин Б. Ф. // *Вестн. АМН СССР*.— 1982.— № 9.— С. 69—74.
9. Кудльберг А. Я. Рецепторы клеточных мембран.— М., 1987.
10. Панин Л. Е., Маланская Н. П. Лизосомы: роль в адаптации и восстановлении.— Н., 1987.
11. Федоров Н. А. Биологическое и клиническое значение циклических нуклеотидов.— М., 1979.
12. Abbound H. E., Slab S. V., Dousa T. R. // *J. Lab. Clin. Med.*— 1979.— Vol. 94.— P. 708—717.
13. Amenta J. S., Brocher S. C. // *Acta Biol. Med. Germ.*— 1981.— Vol. 40.— P. 1225—1226.
14. De Asua L. J., Rosengurl E., Dulbecco R. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*— 1974.— Vol. 71.— P. 96—98.
15. Blake A. D., Heyes N. S., Slateu E. E., Strader C. D. // *Biochem. J.*— Vol. 245.— P. 357—364.
16. Clo C., Tantini B., Pignatti C., Caldarera C. M. // *J. Mol. Cell. Cardiol.*— 1983.— Vol. 15.— P. 139—143.
17. Corbin J. D., Beebe S. J., Blackmore P. F.— 1985.— Vol. 260.— P. 8731—8735.
18. Devoirgiliis L. C., Dini A., Pierro D. et al. // *Cell Mol. Biol.*— 1981.— Vol. 27.— P. 687.
19. Erheux C., Van Sande J., Miot F. et al. // *Mol. Cell. Endocrinol.*— 1987.— Vol. 43.— P. 123—134.
20. Fisher M., Dickson A. J., Pogson C. I. // *Biochem. Soc. Trans.*— 1986.— Vol. 14.— P. 310—311.
21. Hecht L. B., Straus D. S. // *J. Cell Biol.*— 1985.— Vol. 101, Pt 2.— P. 351.
22. Jarett L., Smith R. M. // *Ibid.*— P. 419.
23. Loten E. G. // *J. Biol. Chem.*— 1978.— Vol. 253.— P. 746—757.
24. Moore R. // *Biochem. Biophys. Acta.*— 1983.— Vol. 737.— P. 1—11.
25. Pfeiffer U. // *J. Cell Biol.*— 1978.— Vol. 79.— P. 152—167.
26. Romano F. C., Marchesini C., Paccagnella L., Ammato U. // *Cell. Biol. Int. Repts.*— 1986.— Vol. 10.— P. 797—811.
27. Shemer J., Raisada M., Le Roith D. // *Comp. Biochem. Physiol.*— 1987.— Vol. B86.— P. 55—61.
28. Smith R. M., Laudenslager N. H., Shah N., Jarett R. M. // *J. Cell Physiol.*— 1987.— Vol. 130.— P. 428—435.
29. Spach D. H., Nemenoff R. A., Blackshear P. J. // *J. Biol. Chem.*— 1986.— Vol. 261.— P. 12 750—12 753.
30. Tanigawa Y., Kitamura A., Kawamura M. et al. // *Physiol. Chem. Phys.*— 1978.— Vol. 10.— P. 443—448.
31. Zhang S., Xing X., Xue Q. et al. // *Acta Biochim. et Biophys. Sin.*— 1987.— Vol. 19.— P. 79—86.

Поступила 10.02.89

EFFECT OF INSULIN ON ACTIVITY OF ACID PHOSPHATASE AND CONTENT OF cAMP IN PRIMARY MONOLAYER HEPATOCYTE CULTURE OF NEW BORN RATS UNDER ANOXIC CONDITIONS

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

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

Effects of insulin was studied in the monolayer hepatocyte cultures of new born rats under anoxic conditions. Insulin 10^{-7} M stabilized lysosomal membranes obtained after 20 min anoxia. 1 hr incubation of hepatocytes with insulin in normal conditions, which was followed by anoxia, caused a significant increase of acid phosphatase activity in the fraction enriched with lysosomes. Insulin caused more distinct stabilization effect on lysosomal membranes when its action was prolonged. On the other hand, insulin caused more than 2-fold increase of cAMP content in hepatocytes within 2 min of exposition as compared with control cultures. When exposition of the cells with insulin exceeded 2 min, lowering of cAMP content was observed. These data appear to indicate that stabilizing effect of insulin was secondary towards cAMP level increase. Indirect connection between cAMP level, insulin stabilizing action and the state of lysosomal membranes were noted in the rat hepatocyte culture.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.611-002-07:1616.633.1:577.152.34+616.634:577.175.85

Т. С. Пасхина, Л. Р. Полянцова, Л. В. Платонова, Г. О. Левина

КОМПОНЕНТЫ КАЛЛИКРЕИН-КИНИНОВОЙ СИСТЕМЫ В МОЧЕ БОЛЬНЫХ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТОМ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва, проблемная лаборатория нефрологии I ММИ им. И. М. Сеченова

В патогенезе гломерулонефрита — заболевания почек иммуновоспалительной природы — существенная роль принадлежит системам, обуславливающим состояние микроциркуляции и повышен-

ной сосудистой проницаемости, прежде всего калликреин-кининовой системе (ККС), системам гемокоагуляции, фибринолиза, биогенных аминов. Исключительную выраженность нарушения микроциркуляции имеют при нефротической форме хронического гломерулонефрита (ХГН), т. е. при нефротическом синдроме (НС), которому свойственны массивная протеинурия, отеки (в том числе полостные), гипоальбуминемия, резкие изменения показателей белкового и липидного обменов [8].

В значительно меньшей степени указанные выше микроциркуляторные нарушения свойственны латентной форме ХГН (ЛГН), при которой отеки отсутствуют, протеинурия имеет умеренный характер; заболевание проявляется изолированными изменениями в анализате мочи при нормальных показателях в сыворотке крови [9].

Ранее нами показано, что в происхождении главных симптомов НС, таких как отеки, протеинурия, нарушения клубочковой фильтрации, артериальная гипертония, важную роль играют изменения в ККС, которые выявлены в плазме крови [6], в отечных жидкостях [7], а также, по нашим данным и данным литературы, в почке и моче [12, 25].

Исходя из представлений о том, что компоненты ККС мочи в определенной степени отражают состояние и активность этой системы в структуре нефрона и в почке в целом, в настоящей работе мы детально изучили состав компонентов ККС (тканевый и плазменный калликреины, тотальная киназная активность, киназазы I и II, свободные кинины) в моче больных с двумя формами ХГН — латентной и нефротической по сравнению с таковыми в моче здоровых лиц. В литературе эти вопросы практически не освещены.

Методика. Обследован 31 больной ХГН, из них у 13 была ЛГН, у 18 — НС. Контрольную группу составили 14 практически здоровых лиц. Среди больных было 10 женщин и 21 мужчина в возрасте от 17 до 57 лет. Показатели сыворотки крови изучали с помощью анализатора «Technicon», клубочковую фильтрацию определяли в пробе Реберга, белок в моче — спектрофотометрически с сульфосалициловой кислотой. В работе использовали DValLeuArgpNA·2HCl (S-2266) и соевый ингибитор трипсина (СИТ) фирмы «Seriva» (ФРГ), брадикинин-триацетат (БК) фирмы «Reanal» (Венгрия), амберлит IRC-50 фирмы «Rohm and Haas» (США), ингибитор калликреина из легких быка фирмы «Calbiochem» (США).

В качестве источника кининогена для измерения кининогеназной активности мочи использовали цитратную плазму крови человека (0,38 % цитрат натрия), прогретую 1 ч при 61 °С и диализованную в течение 20 ч против 0,9 % NaCl. Содержание тотального кининогена составляло 3,6—4,0 мкг-экв БК в 1 мл.

DPhePheArgCH₂Cl — селективный ингибитор калликреина плазмы крови синтезирован в лаборатории органической химии Института биологической и медицинской химии (ИБМХ) АМН СССР. Т. пл. 157—158 °С; чистота подтверждена данными элементного анализа, тонкослойной хроматографии и электрофореза.

Белковые ацетоновые осадки мочи получали в соответствии с рекомендациями, изложенными в работе [29]: к аликвоте суточной мочи (50—100 мл) добавляли 2 объема ацетона при 4 °С; растворы выдерживали 1 ч для формирования белкового осадка, центрифугировали при 2000 об/мин в течение 10 мин при 4 °С. Осадки растворяли в минимальном количестве дистиллированной воды, диализовали и лиофилизировали. Содержание белка, измеренное методом Лоури [21], в осадках из нормальной мочи составило 20—30 %, а в осадках из мочи больных ЛГН — 40—60 %, больных ХГН с НС — 80—95 % сухого веса препарата. Энзиматические

изменения проводили в растворах белковых осадков мочи в 0,05 М трис-НСI-буфере pH 7,0 (10 мг препарата в 1 мл).

Кининогеназную активность белковых осадков мочи оценивали по количеству кининов, освобожденных кининогеназами мочи из прогретой плазмы крови человека, использованной в качестве источника кининогена. Для инактивации киназаз в прогретой плазме крови человека и раствора белкового осадка мочи добавляли Na-ЭДТА и 8-оксихинолин (до конечной концентрации 1 мл на 1 мл) и растворы выдерживали 15 мин при 37 °С. Затем к 0,1—0,5 мл раствора белкового осадка мочи добавляли 0,05 М трис-НСI-буфер (pH 8,0), содержащий Na-ЭДТА и 8-оксихинолин, до объема 1 мл и 0,5 мл прогретой плазмы крови. Пробу инкубировали 10—30 мин при 37 °С; реакцию останавливали добавлением 0,3 мл 20 % ТХУ. Содержание кининов определяли на изолированном роге матки крысы, используя синтетический БК как стандарт [5].

Амидазную активность протеиназ мочи оценивали по скорости гидролиза S-2266 по [16] с некоторой модификацией: к 0,1—0,4 мл раствора белкового осадка мочи добавляли 0,05 М трис-НСI-буфер (pH 8,0) до объема 0,45 мл и 0,05 мл 0,001 М раствора субстрата в том же буфере. Оптическую плотность измеряли спектрофотометрически при 405 нм и 37 °С против 10⁻⁴ М раствора субстрата через 1—2 мин в течение 15 мин.

Влияние ингибиторов протеиназ — ингибитора калликреина из легких быка, СИТ и DPhePheArgCH₂Cl — на кининогеназную и амидазную активность белковых осадков мочи изучали, как указано выше в методиках измерения соответствующих ферментных активностей, но перед добавлением того или иного субстрата растворы белковых осадков мочи инкубировали с одним из ингибиторов протеиназ: 8,7 × 10⁻⁷ М апротинина, 10⁻⁵ М СИТ в течение 15 мин при 37 °С или 5,5 · 10⁻⁹ М DPhePheArgCH₂Cl 30 мин при 25 °С.

БК-инактивирующую активность белковых осадков мочи измеряли по скорости инактивации синтетического БК киназазами мочи [5]. К 0,2—0,9 мл раствора белкового осадка мочи добавляли 0,05 М трис-НСI-буфер (pH 8,0) до объема 0,95 мл и 0,05 мл раствора БК (20 мкг БК в 1 мл). Пробу инкубировали 10 мин при 37 °С; реакцию останавливали добавлением 0,1 мл о-фенантролина (1 мг в 1 мл).

Активность киназазы I определяли по скорости гидролиза гишпурил-L-лизина (BzGlyLys) [5]. К 0,3—0,5 мл раствора белкового осадка мочи добавляли 0,05 М трис-НСI-буфер (pH 7,4) до 1,5 мл и 1,5 мл 10⁻³ М BzGlyLys. Оптическую плотность при 254 нм регистрировали через 5 мин в течение 30 мин против 5 · 10⁻⁴ М BzGlyLys при 37 °С.

Активность киназазы II определяли флюориметрическим методом по расщеплению ZPheHisLeu [1]. К 1,8 мл 0,025 М медиального буфера (pH 7,4), содержащего 0,2 М NaCl, добавляли 0,1 мл раствора белкового осадка мочи и 0,1 мл 10⁻³ М раствора ZPheHisLeu в метаноле. Пробу инкубировали 20—40 мин при 37 °С, приливали 1 мл дистиллированной воды, 0,4 мл 2 н. NaOH, 0,1 мл 1 % раствора о-фталевого диальдегида в метаноле и 0,1 мл 6 н. HCl. Флюоресценцию измеряли на спектрофлюориметре «Opton» (возбуждение 370 нм, флюоресценция 500 нм).

Выделение кининов из мочи проводили по методу [17]. Мочу собирали в течение суток в пластиковую посуду, содержащую 20 мл 6 н. HCl (конечное значение pH мочи 2,0—3,0), разбавляли в 2 раза дистиллированной водой и добавляли 1 М NH₄OH до pH 4,0. Затем прибавляли амберлит IRC-50 в H⁺-форме из расчета 2 мг сорбента на 1 мл мочи и перемешивали 1 ч при комнатной температуре. Элюцию кининов с сорбента проводили 10 М уксусной кислотой из расчета 1 мл кислоты на 20 мг сорбента. Полученный экстракт кининов лиофильно высушивали. Сухой остаток растворяли в 0,04 М NH₄HCO₃ и содержание кининов определяли биотестом на изолированном роге матки крысы [5].

Разделение и идентификацию кининов, выделенных из мочи, проводили с помощью градиентной ионообменной хроматографии на колонке с SP-сефадексом С-25 [3]. Аликвоту кининов мочи в 0,04 М NH₄HCO₃ (pH 8,1), содержащую не менее 0,5 мкг-экв БК, вносили в пластиковую колонку (0,9 × 15 см, «Pharmacia») с SP-сефадексом С-25, уравновешенным 0,04 М NH₄HCO₃. Десорбцию кининов осуществляли путем создания линейного градиента концентрации NH₄HCO₃ от 0,04 до 0,40 М в объеме 72 мл. Кинины идентифицировали по объемам выхода с колонки, сравнивая их с таковыми для стандартных кининов (БК, Lys-БК и Met-Lys-БК).

Клинико-лабораторная характеристика обследованных лиц

Группа обследованных	Отеки	Сыворотка крови						Моча				АД (колебания), мм рт. ст.
		общий белок, г%	альбумин, г%	холестерин, мг%	α_2 -глобулин, %	креатинин, мг%	кальциевая Фальц-траница, мг/млн	суточная протеинурия, г/сут	суточная экскреция, г/сут		гематурия по Нечипоренко (в 1 мл)	
									К+	Na+		
1. Доноры (n=14)	—	8,1 ±0,4	4,4 ±0,7	148,3 ±26,3	8,7 ±0,1	1,0 ±0,1	98,7 ±16,4	0	1,6 ±0,5	1,9 ±0,6	—	120—110 80—70
2. Больные ЛГН (n=13)	—	7,0 ±0,5	4,3 ±0,3	207,4 ±28,4	9,9 ±0,9	1,2 ±0,2	100,5 ±35,0	1,9 ±0,7	1,9 ±0,1	2,7 ±0,5	2200 ±50	140—120 90—80
3. Больные ХГН с НС (n=18)	++ (в 100% случаев)	5,1 ±0,5	2,2 ±0,5	393,1 ±77,4	20,0 ±2,7	1,3 ±0,2	70,4 ±22,5	9,0 ±0,6	1,1 ±0,3	1,5 ±0,5	3800 ±33	140—110 90—80
P1—3 P2—3.		<0,001 <0,001	<0,001 <0,001	<0,01 <0,01	<0,001 <0,002	<0,001 <0,001	>0,05 >0,05	<0,001 <0,001	>0,05 <0,01	>0,05 <0,05	— <0,002	— —

Результаты и обсуждение. В табл. 1 представлена клинико-биохимическая характеристика групп больных с латентной и нефротической формами ХГН в сравнении со здоровыми лицами. У больных ЛГН проявления болезни выражались главным образом в изменениях состава мочи, при этом протеинурия носила умеренный характер; содержание белка и холестерина в плазме крови соответствовали норме. При ХГН с НС наряду с выраженными изменениями в крови и моче (массивная протеинурия, гипопротейнемия, гипоальбуминемия, гиперхолестеринемия и др.) больные имели отеки. Признаки НС у обследованных этой группы были классическими (см. табл. 1). У всех больных были нормальные уровни АД, нормальная клубочковая фильтрация.

Ранее при изучении суточной экскреции калликрина с мочой у больных нефропатиями различной этиологии и тяжести нами впервые были получены данные, указывающие на возможность проникновения через почечный фильтр не только активного калликрина плазмы крови, но и прекаликрина и факторов, необходимых для контактной активации последнего. Были высказаны предположения о возможности внутрипочечного активирования плазменного прекаликрина и компенсации калликрином плазмы крови недостаточной функции почечной ККС у больных с НС [2].

С целью дальнейшего развития этих представлений в настоящей работе дана детальная характеристика главных компонентов ККС мочи больных с латентной и нефротической формами ХГН по сравнению с таковыми у здоровых лиц.

Калликрины мочи. Исследования выполнены с помощью субстратно-ингибиторного анализа. Активность калликринов тканевого и плазменного происхождения измеряли по двум энзиматическим реакциям: высокоспецифичной кининогеназной и S-2266-амидазной, широко используемой для определения активности почечного (тканевого) калликрина в моче [16].

В модельных опытах с высокоочищенными препаратами калликрина из мочи человека и калликрина плазмы крови [4] было показано, что хромогенный трипептидный субстрат S-2266 не имеет избирательной специфичности и в равной степени эффективен для измерения активности калликринов тканевого и плазменного происхождения. Оба фермента гидролизуют S-2266 с одинаковой скоростью при $V_{max} = 10 \text{ мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$.

В качестве общего ингибитора калликринов тканевого и плазменного происхождения использовали апротинин (инактиватор калликрина), который в концентрации $8,6 \cdot 10^{-7} \text{ М}$ полностью ингибирует оба фермента. Для дифференцирования в моче тканевого и плазменного калликринов применяли СИТ (10^{-5} М), который является мощным ингибитором калликрина плазмы крови и ряда ферментов системы свертывания крови человека, а именно — факторов XIa, XIIa и др. [28], но не ингибирует тканевый калликреин [15].

Трипептидный хлорметилкетон DPhePheArgCH₂Cl использовали как высокоизбирательный необратимый инактиватор калликрина плазмы крови: при концентрации $5,5 \cdot 10^{-9} \text{ М}$ (преинкубация 30 мин при 25 °С) он не ингибирует

Кининогеназная и S-2266-амидазная активность мочи здоровых лиц и больных латентной и нефротической формами ХГН ($M \pm m$)

Группа обследованных	Активность					
	кининогеназная		ингибирование СИТ (10^{-5} М), %	S-2266-амидазная		
	мкг-экв БК за 1 ч			пмоль в 1 мин на 1 мл мочи	пкмоль в 1 мин за 1 сут	ингибирование СИТ (10^{-5} М), %
	на 1 мл мочи	за 1 сут				
1. Доноры ($n=14$)	0,72±0,14	799±147	0	0,12±0,03	0,14±0,03	4,2±1,3
2. Больные ЛГН ($n=13$)	1,43±0,20	1856±261	4—10	0,46±0,09	0,64±0,13	14,5±0,1
3. Больные ХГН с НС ($n=18$)	2,87±0,30	3488±456	64±8	6,8±2,2	8,1±3,1	91,3±3,6
P_{2-1}	<0,01		>0,05	<0,01		>0,05
P_{3-2}	<0,01		<0,01	<0,01		<0,01
P_{3-1}	<0,01		<0,01	<0,01		<0,01

калликреин мочи, а также факторы XIa и XIIa свертывания крови [28].

В табл. 2 представлены данные о кининогеназной и S-2266-амидазной активностям мочи доноров и больных ЛГН и ХГН с НС, а также о влиянии на них СИТ. Все энзиматические активности, представленные в табл. 2, ингибировались на 90—100 % апротинином в концентрации $8,6 \times 10^{-7}$ М. Кининогеназная и S-2266-амидазная активности нормальной мочи обусловлены в основном экскрецией тканевого (почечного) калликреина, поскольку обе энзиматические реакции не чувствительны к действию СИТ, но ингибируются в присутствии апротинина. При латентной форме ХГН отмечаются поступление в мочу протеиназ плазмы крови и возрастание в 2 раза кининогеназной и в 4 раза амидазной активностей. Огромное возрастание S-2266-амидазной активности мочи, в 56 и 14 раз превышающее таковую соответственно у здоровых лиц и у больных ЛГН, а также высокая степень ингибирования этой активности СИТ (91 %) выявлены нами при ХГН с НС, что обусловлено массивным поступлением в мочу трипсиноподобных протеиназ плазмы крови, в том числе калликреина и компонентов контактной фазы свертывания крови вследствие повышения проницаемости почечного фильтра.

В отличие от резкого возрастания S-2266-амидазной активности мочи больных ХГН с НС ее кининогеназная активность повышается по сравнению с нормой и ее величиной при ЛГН соответственно лишь в 4 и 2 раза, что определяется не только высокой избирательностью данной энзиматической реакции, но, вероятно, и неоптимальными условиями ее измерения.

Данные табл. 3 уточняют вклад протеиназ плазменного происхождения, в том числе калликреина плазмы крови, в S-2266-амидазную активность мочи больных ЛГН и ХГН с НС. Эти результаты получены при использовании высокоселективного ингибитора калликреина плазмы крови — DPhePheArgCH₂Cl, а также СИТ в низкой концентрации как ингибитора ферментов контактной фазы свертывания — XIa, XIIa и калликреина плазмы [28].

Как видно из табл. 3, моча здоровых лиц содержит лишь следовые количества протеиназ плазменного происхождения; калликреин плазмы отсутствует, S-2266-амидазная активность мочи от-

Таблица 3

Влияние СИТ и DPhePheArgCH₂Cl на S-2266-амидазную активность мочи здорового человека и больных ЛГН и ХГН с НС (в нкат/сут)

Группа обследованных	S-2266-амидазная активность		
	без ингибитора*	остаточная активность	
		СИТ, 10^{-5} М, 15 мин, 37 °С	DPhePheArgCH ₂ Cl, $6 \cdot 10^{-9}$ М, 30 мин, 25 °С
Доноры ($n=14$)	2,3	2,1	2,3
Больные ЛГН ($n=13$)	10,7	9,1	9,3
Больные ХГН с НС ($n=18$)	133,0	0	100,0

*S-2266-амидазная активность образцов мочи измерена в соответствии с рекомендациями, представленными в работе [11], против контрольной пробы, содержащей $8,6 \cdot 10^{-7}$ М апротинина. 1 нкат соответствует гидролизу ферментом 0,06 мкмоль субстрата в 1 мин.

ражает экскрецию почечного калликреина. При ЛГН повышается общая экскреция протеиназ плазменного происхождения, гидролизующих S-2266 (ингибирование СИТ 15 %); вклад в эту активность калликреина плазмы составляет около 10 % (ингибирование DPhePheArgCH₂Cl).

В моче больных ХГН с НС исключительно высокий уровень S-2266-амидазной активности обусловлен массивным поступлением трипсиноподобных протеиназ плазменного происхождения; из них протеиназы, ингибируемые DPhePheArgCH₂Cl, составляют 25 %.

В условиях обогащения мочи протеиназами плазменного происхождения, как это имеет место при ЛГН и особенно при ХГН с НС, определить размеры экскреции собственно почечного калликреина, используя метод [11], не представляется возможным. Полное торможение S-2266-амидазной активности мочи больных ХГН с НС низкими концентрациями СИТ является косвенным указанием на значительное снижение экскреции почечного калликреина при нефрите нефротического типа. Этот процесс в меньшей степени наблюдается уже у больных ЛГН.

Уменьшение экскреции активной формы тканевого калликреина с мочой больными ЛГН и особенно ХГН с НС может быть обусловлено снижением биосинтеза почечного калликреина в условиях иммунного воспаления непосредственно в почке или образованием неактивного комплекса

почечного калликреина с α_1 -протеиназным ингибитором (α_1 -ПИ). В литературе имеются указания на экскрецию с мочой при болезнях почек неактивного комплекса тканевого калликреина с α_1 -ПИ [14]. По нашим данным, экскреция активной формы α_1 -ПИ с мочой у больных ХГН с НС возрастает по сравнению с нормой в 5 раз и составляет соответственно 1,46 и 0,33 ИЕ в 1 мл мочи. Точные данные о размерах экскреции тканевого калликреина с мочой у больных ЛГН и ХГН с НС могут быть получены лишь при использовании иммунохимических методов исследования.

Кининазы мочи. Активность кининаз нормальной мочи является важным показателем состояния клубочкового аппарата почки и ее паренхимы, в частности сохранности сосудистого эндотелия почки и щеточной каймы эпителия проксимального отдела извитого канальца — места синтеза бифункционального фермента почки — кининазы II (ангиотензин I-превращающего фермента) и нейтральной эндопептидазы (энкефалиназы А, НЭП). Согласно современным представлениям, кининазная активность нормальной мочи человека определяется присутствием 3 ферментов: кининазы I (карбоксипептидазы N), кининазы II и НЭП, относительная БК-инактивирующая активность которых составляет соответственно 11, 29 и 59 % от общей кининазной активности мочи [24].

В данной работе кининазную активность мочи оценивали по 3 показателям: тотальной БК-инактивирующей активности, измеренной с помощью биотеста на кинины, и величинам активностей кининаз I и II, измеренных по гидролизу синтетических субстратов VzGlyLys и ZPheHisLeu. Результаты этих исследований представлены в табл. 4, из которой видно, что уровни всех 3 активностей в моче здоровых доноров довольно низки (например, общая БК-инактивирующая активность и активность кининазы I сравнимы с их уровнями в плазме крови [5]). При ЛГН суточная БК-инактивирующая активность и активность кининазы II возрастают соответственно в 2,1 и 2,5 раза, а кининазы I — в 7 раз по сравнению с нормой. В свете новых данных о присутствии всех компонентов тканевой ККС, в том числе кини-

назы I, в дистальном отделе извитого канальца [27] этот факт представляет определенный интерес для понимания патогенеза ЛГН. Резкое (скачкообразное) повышение всех 3 форм кининазной активности выявлено нами при анализе мочи больных ХГН с НС: по сравнению с уровнем этих ферментов в моче больных ЛГН БК-инактивирующая активность возрастает в 20 раз, активности кининаз I и II — соответственно в 6,2 и 15 раз; по сравнению с активностью 3 форм кининаз в моче здоровых доноров — соответственно в 40, 45 и 40 раз. Эти факты можно рассматривать как косвенное свидетельство повреждений при НС отдельных участков и клеток нефрона, слагающихся из повышения проницаемости капиллярного фильтра клубочков, дистрофии и некроза сосудистого эндотелия, а также дистрофии эпителия канальцевой части нефрона со слипчиванием щеточной каймы.

Свободные кинины мочи. Известно, что свободные кинины мочи имеют почечное происхождение [23]. Уровень свободных кининов мочи отражает как процессы их образования в почке, так и инактивацию кининазами при прохождении кининов через мочевыделительную систему.

Согласно современным данным, полученным радиоиммунологическим методом, здоровые люди экскретируют за сутки от 20 до 37 мкг-экв БК [10, 13, 26]. Не имея возможности применить радиоиммунологический метод, мы использовали сорбционный метод [12] для выделения кининов из суточной мочи здоровых и больных с последующим определением размеров суточной экскреции кининов с помощью биотеста. Поставленные нами контрольные эксперименты показали, что выходы БК из нормальной мочи составляют 75 %, из мочи больных ЛГН и ХГН с НС — соответственно 40 и 30 %.

Хроматография полученных фракций кининов на колонке с SP-сефадексом С-25 позволила разделить смесь кининов на индивидуальные компоненты, идентифицировать их и с помощью биотеста определить их количественное содержание. Как видно из рис. 1, в моче всех обследованных лиц, как здоровых, так и больных, обнаружены 3 кинина: БК, Lys-БК и Met-Lys-БК.

Таблица 4

БК-инактивирующая активность ($M \pm m$) и активности кининаз I и II (M) в моче здоровых лиц и больных латентной и нефротической формами ХГН

Группа обследованных	Общая кининазная активность			Активность кининазы I, нмоль/мин			Активность кининазы II, нмоль/мин		
	нг гидролизованного БК за 1 мин		мкг гидролизованного БК за 1 мин за 1 сут	на 1 мл мочи	на 1 мг белка	за 1 сут	на 1 мл мочи	на 1 мг белка	за 1 сут
	на 1 мл мочи	на 1 мг белка							
1. Доноры ($n=14$)	1,7 \pm 0,2	14,6 \pm 2,3	2,2 \pm 0,2	0,69	4,61	690	0,023	0,155	23,6
2. Больные ЛГН ($n=8$)	4,0 \pm 0,8	3,8 \pm 0,9	4,3 \pm 0,6	3,52	2,14	4920	0,040	0,024	56,6
3. Больные ХГН с НС ($n=8$)	71,2 \pm 17,1	8,1 \pm 1,5	81,1 \pm 27,6	27,63	2,25	31 330	0,720	0,084	858,0
P_{2-1}		<0,01							
P_{3-2}		<0,01							
P_{3-1}		<0,01							

Примечание. В скобках значения n для общей кининазной активности; для активности кининаз I и II в каждой группе $n=3$.

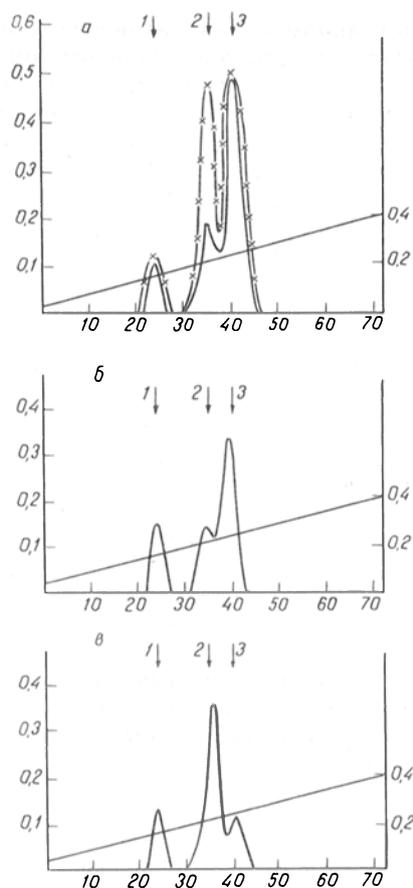


Рис. 1. Разделение и идентификация кининов суточной мочи человека на колонке с SP-сефадексом С-25.

Здесь и на рис. 3: колонка $0,9 \times 15$ см, 6°C ; скорость элюции 4 мл/ч; V_c кининов-стандартов указаны стрелками; 1 — BK, 2 — Met-Lys-BK, 3 — Lys-BK; по осям абсцисс — объем элюата (в мл); по осям ординат: слева — биологическая активность фракций элюата (в мкг-экв BK/мл), справа — концентрация NH_4HCO_3 в элюирующем буфере (в М). а: сплошная линия — кинины мочи здорового человека (донора), линия с крестиками — кинины мочи того же донора с добавлением внутреннего свидетеля Met-Lys-BK; б — кинины мочи больного ЛГН; в — кинины мочи больного ХГН с НС.

В табл. 5 приведены величины общей суточной экскреции кининов и экскреции каждого из них с мочой здоровыми лицами и больными с двумя формами ХГН. Найденная нами величина экскреции кининов с мочой здоровыми лицами оказалась равной $6,6 \pm 0,9$ мкг-экв BK. Суточная экскреция кининов больными ХГН резко снижена как при латентной, так и при нефритической форме нефрита и составляет соответственно 26 и 42 % от таковой для здоровых лиц. Снижение суточной экскреции кининов с мочой при заболеваниях

почек наблюдали и другие авторы: так, по их данным, больные ХГН экскретируют кинины в количестве от 2 до 5 мкг-экв BK в сутки [10], при хронической почечной недостаточности суточная экскреция кининов составляет лишь $0,9 \pm 0,4$ мкг-экв BK [31]. Данные о качественном составе кининов мочи при заболеваниях почек в литературе отсутствуют.

Как известно, основным кинином мочи здоровых людей является Lys-BK, который образуется при действии калликреина почек на кининоген почек; BK является продуктом действия аминопептидазы В мочи на Lys-BK. Met-Lys-BK образуется при действии уропепсина на урокининоген уже после экскреции мочи [17], чему способствует кислая среда в контейнере для сбора мочи, которую создают для инактивации киназаз мочи.

Соотношение кининов существенно различается в моче здоровых лиц и в моче больных с двумя формами ХГН (см. табл. 5, рис. 2). Уменьшение количества экскретируемых с мочой кининов при ЛГН и ХГН с НС определяется почти исключительно снижением абсолютного и относительного содержания Lys-BK. Это коррелирует со снижением экскреции с мочой тканевого калликреина при данных патологических состояниях, что, по-видимому, отражает дефицит биосинтеза в почке тканевого калликреина в условиях развивающегося иммунного воспаления или комплексирования его с α_1 -ПИ с образованием неактивного комплекса [14, 18]. Постоянство экскреции с мочой BK, несмотря на исключительно высокую киназазную активность мочи, особенно у больных ХГН с НС, позволяет предполагать неогенез BK в почке и моче в условиях возрастающей протеинурии за счет калликреина плазмы крови и его субстрата высокомолекулярного кининогена.

Недавно было сообщено об открытии в моче нового кинина — [Нурго]³Lys-BK, содержание которого в нормальной моче составляет 40 % [19]. Этот же кинин был найден и среди про-

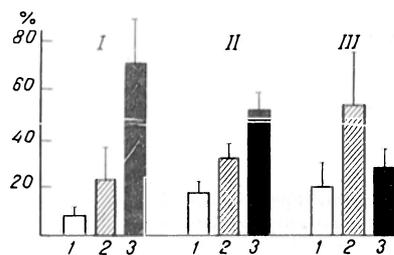


Рис. 2. Процентное содержание BK (1), Lys-BK (2) и Met-Lys-BK (3) в суточной моче:

I — здоровых лиц ($n=5$), II — больных ЛГН ($n=4$), III — больных ХГН с НС ($n=7$).

Таблица 5

Экскреция свободных кининов с мочой здоровыми лицами и больными латентной и нефритической формами ХГН (в мкг-экв BK за 1 сут)

Группа обследованных	Общая экскреция кининов		n	Экскреция отдельных кининов		
	n	(M ± m)		BK	M	
					Lys-BK	Met-Lys-BK
1. Доноры	16	$6,6 \pm 0,9$	5	0,53	4,62	1,45
2. Больные ЛГН	13	$1,7 \pm 0,3$	4	0,32	0,85	0,53
3. Больные ХГН с НС	18	$2,8 \pm 0,8$	5	0,54	0,75	1,50

$p_{2-1} < 0,01$
 $p_{3-1} < 0,01$
 $p_{3-2} > 0,05$

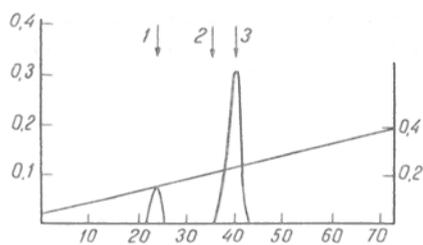


Рис. 3. Хроматография на колонке с SP-сефадексом С-25 кининов, образующихся при гидролизе НМК человека калликреином мочи человека.

Условия проведения enzymатической реакции: 0,04 М трис-НСl-буфер (рН 8,2), содержащий 2 мг/мл ЭДТА и насыщенный 8-оксихинолином, 37 °С, 25 мин, молярное соотношение фермент—субстрат 1:150.

дуктов гидролиза низкомолекулярного кининогена (НМК) человека калликреином мочи человека [22]. В обоих случаях разделение и идентификацию кининов проводили с помощью ВЭЖХ. Как видно на рис. 1 и 3, этот новый кинин не был обнаружен нами ни в проанализированных образцах мочи, ни в гидролизате частично очищенного НМК человека калликреином мочи человека, где основным кинином является Lys-БК, а небольшое количество БК образовалось в результате действия на Lys-БК аминопептидазы, присутствующей в препарате кининогена. По всей вероятности, в условиях разделения кининов на колонке с SP-сефадексом С-25 и Lys-БК и [Нурго]³Lys-БК не разрешаются. Не имея препарата синтетического [Нурго]³Lys-БК, мы не могли это проверить в своих экспериментах, поэтому вопрос о присутствии этого кинина в суточной моче больных с двумя формами ХГН остается открытым.

Таким образом, субстратно-ингибиторный анализ ферментов, экскретируемых с мочой больными ЛГН, не позволяет определенно высказаться о доле тканевого (почечного) калликреина в кининогеназной и амидазной активностях мочи этих больных. Можно лишь предположить, что экскреция тканевого калликреина снижена при ЛГН по сравнению с нормой, на что косвенно указывает снижение доли Lys-БК в общем количестве экскретируемых кининов. Снижение экскреции тканевого калликреина при ЛГН может быть обусловлено как разрушением клеточных структур нефрона, ответственных за синтез этого фермента в почке, так и связыванием тканевого калликреина ингибиторами протеиназ.

Анализируя данные об ингибировании enzymатических активностей СИТ и DPhePheArgCH₂Cl, можно судить о начинающейся экскреции плазменного калликреина в мочу больных ЛГН. В этих условиях снижение количества БК и общего содержания кининов может быть связано с обнаруженным нами уже значительным возрастанием тотальной кининазной активности и активностей киназаз I и II.

Обнаруженные в моче больных ЛГН изменения компонентов ККС мало сказываются на патогенезе основных симптомов нефрита и по данным корреляционного анализа имеют лишь отношение к протеинурии, гематурии, а также участвуют в нормализации АД.

НС в отличие от ЛГН характеризуется выраженной дисфункцией ККС, в том числе почечной. Несмотря на рост кининогеназной актив-

ности по сравнению с таковой в норме и при ЛГН, экскреция Lys-БК (продукта действия тканевого калликреина на кининоген) у больных с НС снижена в 7 раз по сравнению с нормой и ниже таковой при ЛГН. Это может быть объяснено высокой кининазной активностью, но нельзя исключить в этом роли дальнейшего снижения экскреции тканевого калликреина. Точное определение доли тканевого калликреина в общей массе экскретируемых протеиназ при НС применявшихся нами методами затруднительно в связи с усиленной экскрецией других протеиназ плазменного происхождения — факторов свертывания крови, плазмина и др.

Доля плазменного калликреина среди экскретируемых протеиназ при НС составляет около 30 % S-2266-амидазной активности мочи этих больных. Соответственно этому у больных с НС несколько возрастает экскреция БК по сравнению с таковой при ЛГН, достигая нормального уровня. Истинная экскреция кининов у больных с НС, несомненно, маскируется возрастающей в 40 раз активностью киназаз.

В условиях НС проникновение через капиллярные петли клубочка калликреина плазмы и образование в их просвете БК может реализоваться нарастанием протеинурии до массивной (30—50 г белка в сутки), усилением гематурии, отском самой почки, уменьшением диуреза и клубочковой фильтрации. Однако снижение Na⁺- и K⁺-уреза у больных с НС пока невозможно связать с изменениями компонентов ККС; можно предполагать, что они обусловлены активацией ренин-альдостероновой системы [20, 30].

В поисках новых путей обоснованной терапии ХГН с НС важно разграничить патогенетическую и компенсаторную роль выявленных нами изменений в компонентах ККС мочи. Полученные факты указывают на сочетание в условиях данной патологии и патогенетической, и компенсаторной роли плазменной ККС. Из подобной трактовки результатов не вытекает необходимость лекарственной коррекции этой системы у больных ХГН с НС. Исключением являются осложнения НС, такие как нефротический криз, гиповолемический шок с коллапсом, при которых происходит дополнительное кининообразование в системном сосудистом русле, в жидкостях интерстициального пространства и серозных полостях [8]. В этих случаях показано применение препаратов антикининового действия (продектин, пармидин) в сочетании с мерами по восполнению объема сосудистого русла.

Авторы выражают благодарность сотрудникам ИБМХ АМН СССР М. П. Филатовой за синтез селективного ингибитора калликреина плазмы крови DPhePheArgCH₂Cl, С. Э. Рабиновичу за определение кинетических параметров гидролиза синтетических субстратов калликреинами мочи и плазмы крови, Л. С. Лобаревой и В. Ф. Нартиковой за предоставление высокоочищенных препаратов калликреинов мочи и плазмы крови человека, Е. В. Кугаевской за флуориметрическое измерение активности киназазы II.

ЛИТЕРАТУРА

1. Елисева Ю. Е., Орехович В. Н., Павлюхина Л. В. // Вопр. мед. химии.— 1976.— Т. 22, № 1.— С. 81—89.

2. Кузнецов В. А., Полянцова Л. Р., Большакова Т. Д., Пасхина Т. С. // Сов. мед.— 1986.— № 2.— С. 44—48.
3. Макевнина Л. Г., Левина Г. О., Филагова М. П. и др. // Биоорг. химия.— 1982.— Т. 8, № 12.— С. 1606—1614.
4. Наргинова В. Ф., Егорова Т. П., Рец Е. З., Пасхина Т. С. // Биохимия.— 1986.— Т. 51, № 3.— С. 463—471.
5. Пасхина Т. С., Егорова Т. П., Зыкова В. П. и др. // Современные методы в биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича.— М., 1968.— С. 232—261.
6. Пасхина Т. С., Полянцова Л. Р., Кринская А. В. и др. // Вопр. мед. химии.— 1976.— Т. 22, № 2.— С. 241—251.
7. Пасхина Т. С., Полянцова Л. Р., Егорова Т. П. и др. // Там же.— 1979.— Т. 25.— С. 588—599.
8. Полянцова Л. Р. // Тер. арх.— 1985.— № 6.— С. 46—49.
9. Тареев Е. М. // Нефриты.— М., 1958.— С. 369—425.
10. Abe K., Sato M., Imai Y. et al. // Kidney Int.— 1981.— Vol. 19.— P. 869—880.
11. Amundsen E., Putler J., Friberger P. et al. // Advanc. exp. Med. Biol.— 1979.— Vol. 120A.— P. 83—95.
12. Cumming A. D., Robson J. S. // Nephron.— 1985.— Vol. 39, N 3.— P. 206—210.
13. del Canizo-Gomez F. J., Duran F., Lahera V. et al. // Hormone Res.— 1984.— Vol. 20.— P. 143—149.
14. Fink E., Schleuning M. // Advanc. exp. Med. Biol.— 1983.— Vol. 156B.— P. 939—947.
15. Geiger R., Stuckstedt U., Fritz H. // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.— 1980.— Bd 361.— S. 1003—1016.
16. Geiger R., Fritz H. // Methods Enzym.— 1981.— Vol. 80.— P. 466—493.
17. Hial V., Keiser H. R., Pisano J. J. // Biochem. Pharmacol.— 1976.— Vol. 25.— P. 2499—2503.
18. Hörl W. H., Schäfer R. M., Hort M., Heidland A. // Recent Progress in Kinins / Eds H. Fritz, G. Dietze, F. Fiedler, G. L. Haberland.— 1982.— Vol. 9.— P. 631—636.
19. Kato H., Matsumura Y., Maeda H. // FEBS Lett.— 1988.— Vol. 232, N 1.— P. 252—254.
20. Kayser G. A., Mayer D. D., Kouser J. G. et al. // Lab. Invest.— 1986.— Vol. 54, N 5.— P. 479—500.
21. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. Biol. Chem.— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
22. Mater M., Reissert G., Jerabek I. et al. // FEBS Lett.— 1988.— Vol. 232, N 2.— P. 395—398.
23. Nasjletti A., Colina-Churio J., McGiff J. C. // Circ. Res.— 1975.— Vol. 37.— P. 59—65.
24. Ogata H., Ura N., Shimamoto K. et al. // Abstracts of Kinin'87.— Tokyo, 1987.— P. 139.
25. Scicli A. G., Carretero O. A. // Kidney Int.— 1986.— Vol. 29.— P. 120—130.
26. Shimamoto K., Ando T., Nakao T. et al. // J. Lab. Clin. Med.— 1978.— Vol. 91.— N 5.— P. 721—728.
27. Shimamoto K., Imura O. // Abstracts of Kinin'87.— Tokyo, 1987.— P. 13.
28. Tans G., Janssen-Claessen T., Rosing J., Griffin J. H. // Europ. J. Biochem.— 1987.— Vol. 164, N 3.— P. 637—642.
29. Trautshold I., Werle E. // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.— 1961.— Bd 325.— S. 48—59.
30. Ueno M., Kawasaki T., Uezono K. // Metabolism.— 1983.— Vol. 32, N 5.— P. 433—437.
31. Weinberg M. S., Azar P., Trebbin W. M., Solomon R. J. // Kidney Int.— 1985.— Vol. 28, N 6.— P. 975—981.

Поступила 28.02.89

THE KALLIKREIN-KININ SYSTEM COMPONENTS IN URINE OF PATIENTS WITH GLOMERULONEPHRITIS

T. S. Paskhina, L. R. Polyantseva, L. V. Platonova, G. O. Levina

Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Laboratory of Nephrology Problems, I Medical School, Moscow

Activities of main components of the kallikrein-kinin system: tissue (renal) and blood plasma kallikreins, kininases I and II, bradikinin-activating activity as well as free kinins, were estimated in urine of patients with latent and nephrotic forms of glomerulonephritis as compared with those parameters in urine of healthy persons. Content of tissue kallikrein was decreased in urine of patients with nephrotic form of glomerulonephritis as distinct from the disease latent form and healthy persons. At the same time, urine of these patients

with nephrotic form contained elevated amount of blood plasma kallikrein and other proteinases of blood plasma origin. Bradikinin-inactivating activity as well as activities of kininase I and II were increased in urine of patients with the disease latent form 2-, 7- and 2,5-fold, respectively, and in urine of patients with nephrotic form — 40-, 45- and 40-fold, respectively as compared with normal state. Daily excretion of free kinins with urine of healthy persons constituted $6.6 \pm 0.9 \mu\text{g-eqv}$ of bradikinin (BK), in patients with latent and nephrotic forms of glomerulonephritis — 1.7 ± 0.3 and $2.8 \pm \mu\text{g-eqv}$ BK, respectively. Three kinins were found in all the examined persons when urine was collected in acid medium: BK, lysyl-BK and Met-Lys-BK; content of BK was minimal in urine of healthy persons and maximal — in urine of patients with nephrotic form of the disease. Clinical importance of the patterns studied and their role in correction of treatment course of patients with nephrotic form of glomerulonephritis are discussed.

© М. Б. ЧУВЫКИН, В. Л. ШЕСТАКОВ, 1990

УДК 616.155.392-036.11-053.2-07:[616.153+616.832.9-008.93]:577.164.13]-074

М. Б. Чувькин, В. Л. Шестаков

СОДЕРЖАНИЕ ВИТАМИНА В₆ В СПИННО-МОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ПРИ ОСТРОМ ЛЕЙКОЗЕ У ДЕТЕЙ

Минский медицинский институт

Витамин В₆ и его основная коферментная форма — пиридоксаль-5-фосфат (ПЛФ) являются коферментами аминотрансфераз, которые участвуют в окислении глюкозы в мозговой ткани и особенно в функционировании декарбоксилаз, играющих важную роль в образовании биогенных аминов — катехоламинов, 5-окситриптамина, γ-аминомасляной кислоты [6], необходимых для передачи нервного возбуждения [8]. Поражение ЦНС, осложняющее течение любого гемобластоза, часто встречается при остром лейкозе (ОЛ) у детей. Занос и фиксация бластных клеток в ЦНС могут происходить на самых ранних этапах ОЛ [4]. Поэтому определения содержания пиридоксаля (ПЛ) и ПЛФ в спинно-мозговой жидкости (СМЖ) и плазме крови были проведены не только у больных нейролейкозом (НЛ), но и у больных ОЛ в стадиях развернутых проявлений и ремиссии при отсутствии клинических и ликворологических признаков поражения ЦНС. Диагноз НЛ был верифицирован путем обнаружения в СМЖ цитоза выше 10 в 1 мкл и бластных клеток [4].

Методика. Содержание ПЛ и ПЛФ в плазме крови определяли у больных ОЛ детей в возрасте от 1,5 мес до 15 лет: у 30 — в стадии развернутых проявлений, у 37 — в стадии ремиссии и у 19 — при рецидиве заболевания. У части из них (у 21 — в стадии развернутых проявлений, у 14 — в стадии ремиссии и у 12 — при НЛ) исследовали и образцы СМЖ. В качестве контроля использованы образцы плазмы крови 39 здоровых детей аналогичного возраста и образцы СМЖ, полученные по клиническим показаниям у 8 детей, у которых воспалительные, опухолевые и сосудистые заболевания ЦНС не установлены.

Определение ПЛ и ПЛФ в плазме крови и СМЖ проводили разработанным нами методом, в основу которого положен принцип перевода ПЛ и ПЛФ в оксимы путем их обработки О-метилгидроксиламином (О-МГА) с последующим измерением интенсивности флуоресценции полученных соединений [1]. Использовали ПЛ фирмы «Fluka» (Швейцария), ПЛФ фирмы «Sigma» (США); О-МГА синтезирован в Институте молекулярной биологии АН СССР. Флуоресцентный анализ выполнен на флуоресцентном спектрофотометре «Hitachi 650-50» (Япония).

Содержание ПЛ и ПЛФ в плазме крови и СМЖ у больных ОЛ детей ($\bar{x} \pm S_x$)

Стадия ОЛ	Число детей	ПЛ		ПЛФ	
		нмоль/л	% к контролю	нмоль/л	% к контролю
Плазма крови					
Контроль	39	162,45±42,75	100	256,23±37,34	100
Развернутые проявления	30	80,66±17,96	49,7	167,02±12,91*	65,18
Ремиссия	37	157,07±27,54	96,7	253,97±28,00	99,1
Рецидив	19	137,01±32,99	84,3	218,56±18,29	85,3
СМЖ					
Контроль	8	1170,12±201,78	100	271,49±25,0	100
Развернутые	21	139,28±40,48*	11,9	226,21±33,01	83,3
Ремиссия	14	249,4±78,86*	21,3	126,76±20,43*	46,7
Нейролейкоз	12	29,58±13,83*	2,5	334,4±40,14	123,1

Примечание. Здесь и в табл. 2 звездочкой отмечены показатели, достоверно ($p < 0,05$) отличающиеся от контрольных.

В процессе определения использовали стеклянную посуду, подвергшуюся затемнению в результате облучения в дозе 2—2,5 Мрад на γ -установке РХМ-Гамма-20. В центрифужную мерную пробирку, содержащую 1 мл исследуемой биологической жидкости, добавляли 2 мл дистиллированной воды, затем 0,4 мл 50 % трихлоруксусной кислоты (ТХУ) при постоянном перемешивании, доводили до общего объема 6 мл дистиллированной водой. Осадок отделяли центрифугированием при 3000 g в течение 10 мин. К 2 мл надосадочной жидкости добавляли 10 мкл О-МГА с концентрацией 1,7 мг/мл в изотоническом растворе NaCl; доводили pH смеси 1 М HCl до 5,0. Пробирки хранили в темноте при комнатной температуре в течение 30—40 мин. По окончании реакции pH смеси доводили 1 М NaOH до 6,5, отбирали 1 мл жидкости в кювету спектрофлуориметра и определяли интенсивность флюоресценции при 455 нм, возбуждая ее при 355 нм. Измеренная интенсивность флюоресценции (I_1) включает свечение оксимированного ПЛФ ($I_{ПЛФ}$) и части оксимированного ПЛ ($I_{ПЛ}$), т. е.

$$I_1 = I_{ПЛФ} + \alpha I_{ПЛ}, \quad (1)$$

где $\alpha = 0,08$ — доля трансформированного ПЛ [1].

Для определения суммарной флюоресценции ПЛ и ПЛФ:

$$I_2 = I_{ПЛФ} + I_{ПЛ}, \quad (2)$$

в 2 мл супернатанта, полученного осаждением белков ТХУ, растворяли 1,7 мг кристаллического О-МГА. Дальнейшую обработку проб проводили, как описано выше, но пробы выдерживали в темноте в течение 3—3,5 ч.

Из уравнения (1) и (2) получаем:

$$I_{ПЛ} = \frac{I_2 - I_1}{1 - \alpha}, \quad (3)$$

$$I_{ПЛФ} = I_2 - \frac{I_2 - I_1}{1 - \alpha}. \quad (4)$$

Концентрацию ПЛ и ПЛФ определяли по калибровочному графику, построенному по стандартным растворам ПЛ и ПЛФ. Результаты обработаны статистически с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Как видно из табл. 1, статистически достоверное снижение

содержания ПЛФ в плазме крови отмечено лишь в развернутой стадии ОЛ. Содержание ПЛ в плазме крови при ОЛ не изменяется.

Напротив, в СМЖ резко снижается содержание ПЛ (см. табл. 1): в развернутой стадии его уровень составляет 11,9 %, в стадии ремиссии — 21,3 %, а при НЛ — лишь 2,5 % содержания в контроле ($p < 0,05$). У 6 больных с клиническими проявлениями НЛ уменьшение содержания ПЛ в СМЖ еще более выражено ($13,59 \pm 9,4$ нмоль/л; 1,2 % от контроля). При этом выраженного дефицита ПЛФ в СМЖ нет. Уменьшение его содержания до 46,7 % от контрольного уровня обнаружено лишь в стадии ремиссии ОЛ.

Из табл. 2 видно, что одновременно с уменьшением содержания ПЛ в СМЖ у больных ОЛ снижается соотношение ПЛ_{СМЖ}/ПЛ плазма крови и еще более значительно возрастает соотношение ПЛФ_{СМЖ}/ПЛ_{СМЖ}. Особенно значительные указанные различия по сравнению с контролем у больных НЛ.

Резко выраженное увеличение содержания ПЛ в СМЖ по сравнению с плазмой крови у лиц контрольной группы соответствует сведениям, имеющимся в литературе, о 25—50-кратном превышении концентрации витамина В₆ в мозге и сосудистом сплетении по сравнению с плазмой крови млекопитающих [13].

Из плазмы крови через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) проникают преимущественно нефосфорилированные формы витамина В₆ [14]. Следовательно, соотношение уровня ПЛ, основной транспортной формы витамина В₆ [9], в СМЖ и плазме крови может характеризовать транспорт этого витамина через ГЭБ. Соотношение же ПЛФ

Таблица 2

Соотношение ПЛ_{СМЖ}/ПЛ плазма крови и ПЛФ_{СМЖ}/ПЛ СМЖ при ОЛ у детей ($\bar{x} \pm S_x$)

Стадия ОЛ	ПЛ СМЖ/ПЛ плазма крови	% к контролю	ПЛФ СМЖ/ПЛ СМЖ	% к контролю
Контроль	7,203±2,143	100	0,232±0,077	100
Развернутые проявления	1,727±0,542*	24,0	1,624±0,528*	700
Ремиссия	1,578±0,929*	21,9	0,508±0,222	219
НЛ	0,216±0,120*	3,4	11,305±5,044*	48 728,4

и ПЛ в СМЖ может отражать активность фосфорилирования ПЛ в клетках ЦНС, если допустить, что уровень ПЛФ в СМЖ характеризует обеспеченность ЦНС витамином В₆, так же как уровень ПЛФ в плазме крови — обеспеченность других тканей организма [3].

Витамин В₆ преодолевает ГЭБ посредством насыщаемого процесса, причем сосудистое сплетение является локусом насыщающего механизма, транспортирующего витамин из крови в СМЖ [13]. Через мембраны клеток ЦНС транспортируются свободные витаминеры плазмы [14], очевидно, в большей степени ПЛ как основная транспортная форма витамина В₆. Кроме того, имеется четкая корреляция между накоплением и фосфорилированием витаминеров, что указывает на зависимость насыщающего механизма от пиридоксалькиназы [13]. Поэтому регуляция накопления нефосфорилированных витаминеров В₆ (в частности, ПЛ) — единственный механизм, посредством которого в ЦНС поддерживается гомеостатический уровень внутриклеточного витамина В₆ [9].

Уже эти факты делают маловероятным предположение, согласно которому уменьшение уровня ПЛ в СМЖ вызвано повышенной его утилизацией бластными клетками, количество которых при ОЛ резко возрастает, в силу чего происходит сдвиг равновесия витамина в сторону клеточных элементов крови. Показано [11], что у тех же больных в стадиях развернутых проявлений ОЛ и при рецидиве содержание ПЛФ в миелокардиоцитах и эритроцитах не возрастает, а напротив, уменьшается. Достоверного снижения содержания ПЛ в плазме крови при этом не происходит (см. табл. 1).

Следовательно, резко выраженное снижение содержания ПЛ в СМЖ и соотношения ПЛ_{СМЖ}/ПЛ плазма крови у больных ОЛ следует объяснять нарушением процессов транспорта витамина В₆ через ГЭБ. Отсутствие при этом достоверных изменений содержания ПЛФ в СМЖ (за исключением ремиссии ОЛ) по сравнению с контролем можно оценить, вероятно, как результат активации биосинтеза ПЛФ в клетках ЦНС в условиях нарушенного транспорта ПЛ.

При опухолевых процессах ЦНС в СМЖ обнаружено повышение содержания глутаминовой кислоты [5], субстрата биосинтеза γ-аминомасляной кислоты, осуществляемой ПЛФ-зависимой декарбоксилазой [2]. Этот фермент весьма чувствителен к дефициту ПЛФ [2]. Повышение содержания глутаминовой кислоты в СМЖ характерно для судорожных синдромов [10], тогда как дефицит ПЛФ в клетках ЦНС, возможно, является причиной нарушения биосинтеза γ-аминомасляной кислоты [7].

Однако в ЦНС имеется весьма чувствительный механизм, заключающийся в торможении активности пиридоксалькиназы избытком γ-аминомасляной кислоты [8]. Можно предположить, что при ОЛ в условиях уменьшения транспорта ПЛ в клетки ЦНС и снижения биосинтеза ПЛФ происходит нарушение биосинтеза γ-аминомасляной кислоты и повышение активности пиридоксалькиназы по механизму обратной связи. В результате содержание ПЛФ претерпевает значительно меньшие изменения, чем уровень ПЛ в СМЖ.

Если учесть, что ПЛФ является единственным веществом, активирующим декарбоксилирование ароматических аминокислот [7], ни чем иным, как отсутствием его дефицита, нельзя объяснить повышение уровня серотонина и его метаболитов в СМЖ при опухолевых заболеваниях ЦНС [5]. Косвенным подтверждением этого является отсутствие отклонений в содержании в СМЖ основного метаболита витамина В₆ — 4-пиридоксильной кислоты у больных с опухолями ЦНС по сравнению со здоровыми [12].

Таким образом, при ОЛ у детей имеет место нарушение транспорта витамина В₆ в ЦНС. Однако при этом включаются компенсаторные механизмы, при помощи которых содержание ПЛФ в клетках ЦНС поддерживается на гомеостатическом уровне.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бажулина Н. П., Полякова Л. А., Горяченкова Е. В. и др. // Люминесцентный анализ в медико-биологических исследованиях. — Рига, 1983. — С. 78—84.
2. Букин Ю. В. // Экспериментальная витаминология. — Минск, 1979. — С. 385—410.
3. Букин Ю. В. // Методы оценки и контроля витаминной обеспеченности населения. — М., 1984. — С. 78—84.
4. Воробьев А. И. Руководство по гематологии. — М., 1985. — Т. 1.
5. Макаров А. Ю. Клиническая ликворология. — Л., 1984.
6. Матлина Э. М. // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева. — 1976. — № 2. — С. 157—162.
7. Розанов В. А. // Вопр. мед. химии. — 1980. — № 1. — С. 42—46.
8. Турски Т. // Биохимия. — 1974. — № 6. — С. 38—45.
9. Халмурадов А. Г., Тоцкий В. П., Чаговец Р. В. Мембранный транспорт коферментных витаминов и коферментов. — Киев, 1982.
10. Цветанова Е. М. Ликворология. — Киев, 1986.
11. Чувькин М. Б. Изменения содержания витамина В₆ и некоторые пути их коррекции у детей, больных острым лейкозом: Дис. ... канд. мед. наук. — Минск, 1988.
12. Шевага В. П. // Врач. дело. — 1977. — № 11. — С. 112—114.
13. Spector R., Greenwald L. L. // J. Biol. Chem. — 1978. — Vol. 253, N 7. — P. 2373—2379.
14. Tiselius H. G. // J. Neurochem. — 1973. — Vol. 20, N 4. — P. 937—946.

Поступила 21.06.89

CONTENT OF VITAMIN В₆ DERIVATIVES IN CEREBROSPINAL FLUID AND BLOOD SERUM OF CHILDREN WITH ACUTE LEUKOSIS

M. B. Chuvykin, V. L. Shestakov

Medical School, Minsk

Content of pyridoxal in cerebrospinal fluid exceeded its level in blood plasma of healthy children. Transport of pyridoxal through hematoencephalic barrier was decreased in children with acute leukosis, especially, with neuroleukosis, while content of pyridoxal-5-phosphate was similar to normal values. Possible mechanisms are considered which are involved in stabilization of pyridoxal-5-phosphate content in cerebrospinal fluid of patients with acute leukosis, when transport of pyridoxal was impaired in central nervous system.

Е. Б. Бурлакова, Н. М. Сторожок, Н. Г. Храпова, В. В. Наумов, Е. Н. Кухтина

ИЗУЧЕНИЕ АДДИТИВНОГО АНТИОКСИЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ СУММЫ ПРИРОДНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ ЛИПИДОВ

Институт химической физики АН СССР, Москва, Тюменский медицинский институт

Как известно, многие виды патологии сопровождаются нарушением регуляции процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), в осуществлении которой, помимо ферментных систем, участвуют природные антиоксиданты (АО) [1—13]. К системе природных АО относят токоферол (ТФ), убихинон (Q), витамин К, каротиноиды [1, 9, 10].

В многочисленных исследованиях показана биохимическая и функциональная взаимосвязь между отдельными представителями данных биологически активных соединений. Так, при недостаточности ТФ установлена возможность изменений скорости биосинтеза Q и убихроменолола [7]. ТФ способен устранять ряд биохимических нарушений, свойственных K-витаминной недостаточности [6], при этом действие ТФ направлено на те проявления дефицита витамина K, которые не связаны непосредственно с его участием в биосинтезе протромбина.

Сведения о взаимодействии между различными компонентами системы природных АО в литературе отсутствуют. Между тем в процессе окисления отдельные составляющие природной смеси АО могут вступать между собой в синергические взаимодействия, быть антагонистами либо действовать независимо.

Целью настоящей работы явилось изучение физико-химических взаимосвязей между различными индивидуальными представителями природных АО на примере бипарных смесей, а также в составе естественных композиций АО, выделенных из природных липидов.

Природные АО имеют определенное сходство в химическом строении и образуют группы структурно родственных соединений, существующих в форме фенолов или хинонов. Установлено, что высокую антирадикальную активность (АРА), характеризующуюся скоростью взаимодействия АО с пероксидными радикалами (K_7), проявляют только фенольные формы АО, константа K_7 которых на 3—4 порядка выше, чем у соответствующих хинонных форм [1].

Методика. Для исследования использовали гомологи ТФ (α -, β -, γ -, δ -), аналоги ТФ, имеющие укороченные боковые алифатические цепи соответственно из 6 (C_6) и 11 углеродных атомов (C_{11}). Область изучаемых концентраций находилась в диапазоне 0,45—18 мкМ, соотношения компонентов составляли от 1:1,5 до 1:40. Исследовали смеси α -ТФ и гидрохинонной формы убихинона Q_9 — убихинола QH_2-9 в диапазоне концентраций 7—25 мкМ при соотношениях компонентов 1:1—1:3. Из природных липидов рыбы пелюди (липиды красных мышц) была выделена сумма природных АО, входящих в состав неомыляемой части липидов. Неомыляемые компоненты выделяли и разделяли с помощью препаративных методов [4].

Совместное действие природных АО изучали на двух

моделях: по изменению интенсивности свечения при иницированном окислении этилбензола хемоллюминесцентным методом [7], а также при иницированном окислении метилолеата (МО) в среде инертного растворителя хлорбензола (1:1) манометрическим методом [8].

В качестве инициатора использовали азобисизобутиронитрил (АИБИ), скорость иницирования (W_i) при окислении этилбензола и МО составляла соответственно $5 \cdot 10^{-8}$ и $13 \cdot 10^{-8} \text{ M} \cdot \text{c}^{-1}$ при температуре 60 °С.

В обеих моделях сопоставляли следующие кинетические параметры: τ_i — величину периода индукции в опытах с каждым из компонентов порознь; τ_{Σ} — значение периода индукции в опытах со смесями; $\Sigma\tau_i$ — показатель, получаемый путем сложения периодов индукции окисления модельного субстрата в присутствии индивидуальных соединений. Выполнение равенства $\Sigma\tau_i = \tau_{\Sigma}$ могло указывать, что действие всех компонентов, участвующих в ингибировании окисления субстрата, аддитивно; в случае синергизма или антагонизма между составляющими смеси соотношение соответственно должно было принимать вид: $\tau_{\Sigma} > \Sigma\tau_i$ либо $\tau_{\Sigma} < \Sigma\tau_i$.

Результаты и обсуждение. В литературе описано проявление синергизма при совместном действии смесей сильного и слабого ингибиторов, характеризующихся различной АРА [5]. Для исследуемых АО величина K_7 была установлена ранее [1]. В связи с изложенным выше целесообразно было изучить совместное действие бипарных смесей АО, значения K_7 которых отличаются в десятки раз, сопоставимы между собой либо оцениваются одними и теми же величинами.

В качестве смесей АО, АРА которых различается более чем на порядок [1], были изучены смеси циклической формы α -ТФ и гидрохинонной формы убихинона с боковой алифатической цепью из 9 углеродных атомов (QH_2-9). На рис. 1 приведены кинетические кривые хемоллюминесценции (ХЛ), полученные при введении в модельную систему индивидуальных АО или их смеси. Кинетические кривые имеют S-образную форму с периодами индукции, по окончании которых интенсивность ХЛ выходит на стационарный уровень I_0 , соответствующий интенсивности свечения в отсутствие АО. В опытах со смесями форма кинети-

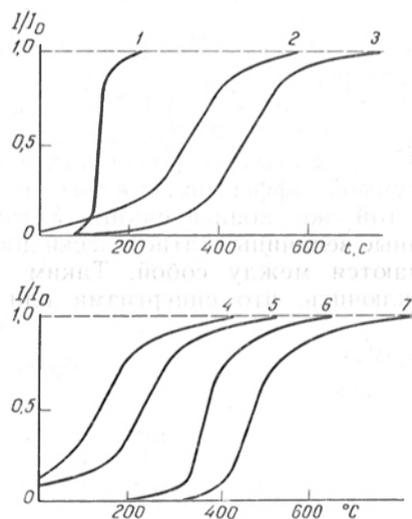


Рис. 1. Кинетические кривые окисления этилбензола в присутствии различных антиоксидантов.

1 — $6,8 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ α -ТФ; 2, 4, 5 — соответственно $24,3 \cdot 10^{-6}$, $8,1 \cdot 10^{-6}$ и $16,2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ убихинона QH_2-9 ; смеси указанных веществ в количествах, соответствующих концентрациям индивидуальных компонентов: 3 — (1+2); 6 — (1+4); 7 — (1+5).

ческих кривых свечения сохраняется, величина периода индукции превышает значение периодов индукции, наблюдаемых в присутствии каждого из компонентов в отдельности, т. е. введение в систему второго АО увеличивает эффект ингибирования. Количественно эффект ингибирования может быть охарактеризован величиной $W_i \int_0^{\infty} (1 - I/I_0) dt$ [7], пропорциональной периоду индукции.

В результате количественного анализа было доказано соответствие между эффектом совместного действия смесей QH₂-9 и α-ТФ и величиной, получаемой простым сложением эффектов ингибирования каждого из компонентов смеси. Следовательно, ингибирующее действие смеси убихинола QH₂-9 и α-ТФ аддитивно, синергизм между этими природными АО в изученном диапазоне концентраций отсутствует.

Было исследовано совместное действие циклических форм природных АО, имеющих достаточно близкую, хотя и различающуюся, активность (K₇). Примером таких смесей были выбраны смеси гомологов ТФ. Следует отметить, что в липидах природного происхождения присутствуют обычно смеси гомологов ТФ, отличающихся количеством и расположением метильных групп в 6-оксихромановом цикле и имеющих одинаковый заместитель из 16 углеродных атомов в положении 2. Поэтому было изучено действие смесей α-ТФ, β-ТФ, γ-ТФ, δ-ТФ, значения K₇ которых различаются более чем в 3 раза [1]. Для смесей данных высокоактивных АО было установлено, что независимо от количества и расположения заместителей эффект ингибирования для смесей гомологов ТФ аддитивен, т. е. действие смесей определяется суммарным действием отдельных составляющих.

В качестве смесей АО, проявляющих одинаковую активность в реакции с пероксидными радикалами, использованы смеси α-ТФ и его аналогов ТФ (C₆) и ТФ (C₁₁), имеющих укороченные по сравнению с α-ТФ (C₁₆) боковые алифатические цепи соответственно из 6 и 11 углеродных атомов. Изучение аналогов ТФ представляет определенный интерес в связи с возможностью подмены основного липидного АО. Было сопоставлено действие смеси α-ТФ (C₁₆) и его аналогов (C₆) и (C₁₁), взятых в различных соотношениях, с суммой эффектов каждого из компонентов в той же концентрации. Установлено, что указанные величины статистически достоверно не различаются между собой. Таким образом, можно заключить, что синергизма или антаго-

Кинетические параметры окисления МО в присутствии индивидуальных АО, выделенных из липидов пеляди ($W_i = 1,3 \times 10^{-7} \text{ M} \cdot \text{c}^{-1}$ при 60 °C)

Состав модельной смеси	Период индукции, $\cdot 10^{-2} \text{ c}$		Вклад компонента в период индукции, %	Скорость окисления, $\cdot 10^{-6} \text{ M} \cdot \text{c}^{-1}$
	$\tau_{\text{эксн}}$	$\tau_i = \tau_{\text{эксн}} - \tau_{\text{МО}}$		
МО	$\tau_{\text{МО}} = 7,8$	—	—	2,3
МО+липиды красных мышц	42,6	—	—	1,8
МО+α-ТФ (из липидов красных мышц)	12,0	4,2	12,5	2,3
МО+убихинон	9,6	1,8	5,0	2,2
МО+убихроменол	8,4	0,6	2,0	2,2
МО+витамин К	11,4	3,6	11,5	1,6
МО+группа витаминов А	7,8	0,0	0,0	2,4
МО+холестерин	9,0	1,2	4,0	2,3
МО+сумма неомыляемых компонентов липидов красных мышц	19,0	$\tau_{\Sigma} = 11,4$	33,0	1,4
		$\Sigma \tau_i = 11,4 \cdot 10^2 \text{ c}$		

низма в действии фенольных форм природных АО нет, ингибирующий эффект их смесей аддитивен и является простой суммой эффектов каждого из АО.

Для изучения совместного действия АО, присутствующих в смесях природного происхождения, были использованы сумма и индивидуальные неомыляемые компоненты, выделенные из рыбных липидов. Ранее было показано, что исследуемые липиды содержат АО двух типов, K₇ которых различаются более чем в 100 раз. В составе неомыляемой фракции липидов идентифицированы ТФ, убихинон, убихроменол, витамины К, А, холестерин, определено количество важнейших АО [2].

Было показано, что ингибирующее действие проявляют большинство компонентов суммы природных АО, исключение составила лишь группа витаминов А (см. таблицу). Сопоставление периодов индукции индивидуальных АО (τ_i) выявило существенные различия в их действии. Наиболее высокое действие проявляют ТФ и витамин К (рис. 2), эффективность которых составляет 50 % от эффекта совместного действия всей совокупности липидных АО (см. таблицу). С учетом количественных соотношений между отдельными составляющими природной системы АО вклад различных компонентов — ТФ, витамина К, убихинона, убихроменоло находится в соотношении 7:6:3:1.

Установлено, что и для смесей природного

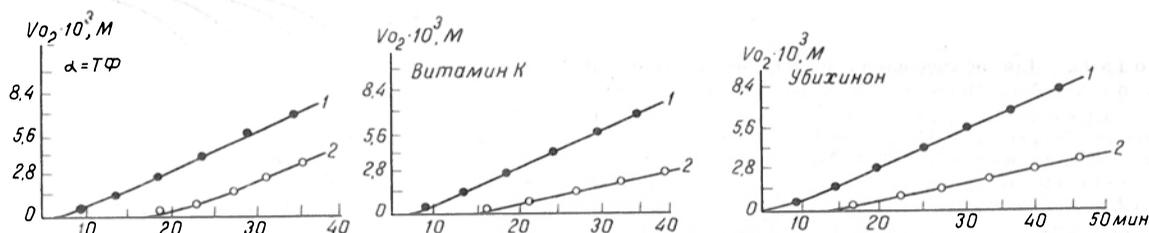


Рис. 2. Кинетические кривые поглощения кислорода при инициированном окислении МО.

1 — индивидуальные антиоксиданты; 2 — один из неомыляемых компонентов, выделенных из липидов красных мышц. По осям абсцисс — время (в мин).

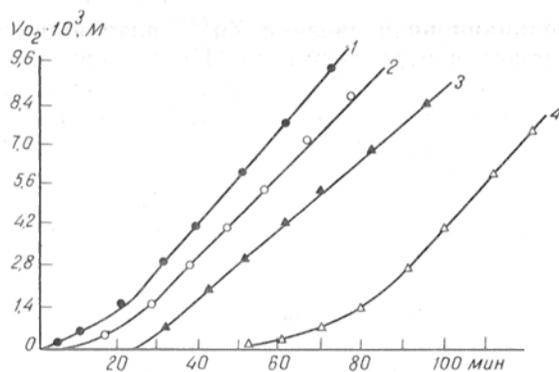


Рис. 3. Кинетические кривые поглощения кислорода при окислении МО в присутствии различных антиоксидантов. 1 — липиды красных мышц пеляди; 2 — сумма неомыляемых компонентов, выделенных из тех же липидов; 3 — α -ТФ ($8 \cdot 10^{-9}$ М). По оси абсцисс — время (в мин).

происхождения сумма ингибирующего действия различных индивидуальных АО ($\Sigma\tau_i$) соответствует совокупному ингибирующему эффекту их смеси. Таким образом, получено соотношение ($\Sigma\tau_i = \tau_{\Sigma}$), свидетельствующее об аддитивности действия АО в концентрациях, соответствующих составу природных смесей.

Наибольший вклад в действие суммы природных АО липидов вносит ТФ. Так, методом ХЛ показано, что среди наиболее активных липидных АО, K_7 которых оценивается величиной $(2,5 - 3,5) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, вклад ТФ составляет 60–85 % [2]. Следовательно, в системе защиты липидов от окисления ТФ является важнейшим АО, действие которого аддитивно с действием других природных АО липидов.

Немалый интерес представляет количественная оценка вклада суммы природных АО в антиокислительную активность общих липидов. Сравнение значений периодов индукции, получаемых при окислении МО в присутствии общих липидов, и периодов индукции при окислении этого же субстрата с суммой природных АО, выделенных из тех же липидов, показывает несопоставимость экспериментальных данных (см. таблицу, рис. 3). Полученные данные свидетельствуют о том, что в липидном субстрате действие природных АО усиливается в 2–2,5 раза. При этом вклад суммы липидных АО по отношению к общим липидам не превышает 40 %, а индивидуального ТФ — 25 %. Из этих данных следует, что сумма природных АО не исчерпывает антиокислительной активности общих липидов. Эффективность природных АО, действующих между собой аддитивно и взаимонезависимо, существенно возрастает под влиянием компонентов липидного субстрата. Объяснение этого факта является предметом самостоятельного исследования.

Результаты настоящей работы, полученные при изучении системы природных АО липидов, представляют теоретический и практический интерес, могут быть учтены при прогнозировании терапевтического эффекта комплексной коррекции ряда патологических состояний с помощью природных АО, определении сроков хранения фармакологических препаратов и продолжительности эффективного ингибирования пищевых жиров и масел,

содержащих АО, установлении антиоксидантной активности липидных систем, модифицированных ингибиторами природного происхождения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бурлакова Е. Б., Храпова Н. Г. // Успехи химии.— 1985.— Т. 54, № 9.— С. 1540–1558.
2. Бурлакова Е. Б., Сторожок П. М., Храпова Н. Г. // Биофизика.— 1988.— Т. 33.— С. 584–589.
3. Донченко Г. В., Чернухина Л. А., Золоташко О. М., Теплицкая Л. Ю. // Вопр. мед. химии.— 1976.— № 5.— С. 691–696.
4. Донченко Г. В., Чаговец Р. В., Чернухина Л. А., Золоташко О. М. // Биохимия.— 1978.— Т. 43, № 2.— С. 221–228.
5. Карпухина Г. В., Эмануэль И. М. // Докл. АН СССР.— 1984.— Т. 246, № 5.— С. 1163–1167.
6. Матусис И. И. // Витамины.— М., 1970.— С. 154–168.
7. Хемилюминесцентные методы исследования медленных химических процессов / Шляпнотх В. Я., Карпухин О. Н., Постников Л. М. и др.— М., 1966.
8. Эмануэль И. М., Денисов Е. Т., Майзус З. К. Ценные реакции окисления углеводородов в жидкой фазе.— М., 1965.
9. Burlon G. W., Pade V. L., Gabe E. J. et al. // J. Amer. Chem. Soc.— 1982.— Vol. 102.— P. 7792–7798.
10. Burlon G. W., Ingold K. U. // Science.— 1984.— Vol. 224, N 91842.— P. 569–673.
11. Folkers K. // Amer. J. clin. Nutr.— 1974.— Vol. 24.— P. 1026–1030.
12. Tappel A. L. // Ann. N. Y. Acad. Sci.— 1972.— Vol. 203.— P. 12–16.
13. Tappel A. L. // Fed. Proc.— 1973.— Vol. 32, N 8.— P. 1870–1873.

Поступила 13.03.89

ADDITIONAL ANTIOXIDIZING EFFECT OF TOTAL NATURAL LIPID ANTIOXIDANTS

E. B. Burlakova, N. M. Storozhok, N. G. Khrapova, V. V. Naumov, E. N. Kukhlina

Institute of Chemical Physics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow, Medical School, Tyumen

Kinetics of methyl oleate and ethylbenzene oxidation was studied in presence of tocopherol homologues α , β , γ , δ , tocopherol derivatives C_6 and C_{11} , ubiquinol QH₂-9, which were isolated from natural lipids. Effects of various natural antioxidants in mixtures were interdependent.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 615.225.2.017:615.357:577.175.852.042.21.015.4.076.9

В. В. Шумянцева, И. А. Гандурина, Т. И. Осипова, Е. В. Кугаевская

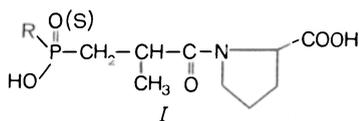
ИНГИБИРОВАНИЕ АНГИОТЕНЗИНПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА ИЗ ПОЧЕК БЫКА ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИМИ АНАЛОГАМИ АМИНОКИСЛОТ

Институт молекулярной биологии АН СССР, Институт медицинской и биологической химии АМН СССР, Москва

Одним из новых и результативных направлений поиска антигипертензивных средств является изучение соединений, ингибирующих ангиотензин I-превращающий фермент (дипептидилкарбокси-пептидаза, кининаза II, АПФ, КФ 3.4. 15.1). Этот фермент катализирует образование обладающего прессорными свойствами октапептида ангиотензина II и инактивацию депрессорного пептида брадикинина. В настоящее время известно большое число ингибиторов этого фермента. Сре-

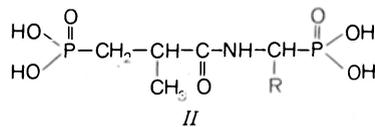
ди них найдены эффективные антигипертензивные вещества. Однако ряд из них обладает токсичностью, другие вещества весьма сложны по структуре и, следовательно, малодоступны или характеризуются весьма непродолжительным действием [8]. Поэтому поиск ингибиторов АПФ остается актуальной задачей.

Так как АПФ является металлозависимым ферментом, торможение его активности вызывают некоторые тиоловые соединения. К ним относятся L-цистеин, тиогликолевая кислота, D-пеницилламин [1], каптоприл [13]. Эти соединения содержат меркаптогруппу, способную к комплексообразованию с ионом цинка, находящимся в активном центре АПФ. Аминокислотные производные фосфонокислот также относятся к эффективным ингибиторам АПФ [9, 15]. Наибольшую активность проявляли структуры общей формулы I:



Соединения типа I являются, по-видимому, аналогами переходного состояния реакции расщепления пептидной связи, катализируемой АПФ; дополнительно происходит стабилизация комплекса фермент — ингибитор за счет образования

координационной связи с Zn^{2+} , находящимся в активном центре фермента. Продолжительность антигипертензивного действия соединений типа I невелика. В работе [2] высказано предположение, что структуры, содержащие остатки аминокислот, могут *in vivo* инактивироваться путем периферического декарбоксилирования. Использование в структуре общей формулы I остатков α -аминофосфоновых кислот вместо α -аминокарбоновых (структура II) позволила пролонгировать антигипертензивный эффект [14].



Пролонгирование антигипертензивного действия II по сравнению с I может быть связано с тем, что некоторые фосфорорганические аналоги аминокислот являются эффективными ингибиторами декарбоксилаз [5].

Мы исследовали в качестве ингибиторов АПФ из почек быка ряд фосфорорганических соединений — аналогов аминокислот, являющихся метаболически стабильными веществами и содержащими функциональные группы, способные к комплексообразованию с каталитически необходимым ионом цинка.

Ингибирование фосфорорганическими аналогами аминокислот активности АПФ из почек быка

№ п/п	Соединение	Формула	Ингибирование АПФ в концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ М, %
1	Каптоприл		$1 \cdot 10^{-9}$ * (2)
	Цистеин	$\text{HSCH}_2\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}$	90 (2)
3	D-пеницилламин	$\text{HS}-\underset{\text{CH}_3}{\overset{\text{CH}_3}{\text{C}}}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}$	65 (2)
4	1-Амино-2-меркаптоэтилфосфонистая кислота	$\text{HSCH}_2\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}$	52,6
5	1-Амино-2-фосфонопропионовая кислота	$(\text{HO})_2\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{P}}\text{CH}_2\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}$	20
6	2-Бензил-3-фосфонопропионовая кислота	$(\text{HO})_2\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{P}}\text{CH}_2\underset{\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5}{\text{CH}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}$	48,4
7	1-Амино-3-метилтиопропилфосфонистая кислота	$\text{CH}_2-\underset{\text{SCH}_3}{\text{CH}_2}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{P}}-\text{OH}$	28,4

* Концентрация, ингибирующая на 50 % активность фермента.

Методика. 1-Амино-2-меркаптоэтилфосфонистая кислота (соединение 4, фосфонистый аналог цистеина) и 1-амино-3-метилтиопропилфосфонистая кислота (соединение 7, фосфонистый аналог метионина) получены по [6]. ^{11}H и ^{31}P ЯМР-спектры, а также хроматографические данные соответствуют приведенным в работах [7, 10]. 1-Амино-2-фосфонопропионовая кислота (соединение 5, фосфонатный аналог аспарагиновой кислоты) получены по [11], 2-бензил-3-фосфонопропионовая кислота (соединение 6) — по [12].

Действие ингибиторов характеризовали по степени торможения реакции расщепления С-концевого трипептида (Z-Phe-His-Leu, Z-карбобензоксигруппа) ангиотензина I АПФ, выделенным из почек быка по [4]. Активность фермента определяли флуориметрическим методом по [3]. Количество фермента в опытах подбирали таким образом, чтобы степень гидролиза субстрата не превышала 10–15 %.

Результаты и обсуждение. В качестве ингибиторов АПФ из почек быка мы исследовали ряд соединений, представленных в таблице.

1-Амино-2-меркаптоэтилфосфонистая кислота (фосфонистый аналог цистеина, соединение 4) в концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ М ингибирует фермент на 52,6 %, L-цистеин в той же концентрации — на 90 %. Так как в соединении 4 имеется смесь изомеров, очевидно, замена карбоксильной группы фосфонистой группой не приводит к резкому снижению ингибирования АПФ. Фосфонитная группа представляет собой сильно искаженный тетраэдр, приближающийся по геометрии к карбоксильной группе, ионизационное состояние которой сходно с таковым моноэфиров фосфоновых кислот.

Замена меркаптогруппы фосфонатной группой в предполагаемом месте комплексообразования с каталитически необходимым ионом цинка (1-амино-2-фосфонопропионовая кислота, соединение 5, фосфонатный аналог аспарагиновой кислоты) приводит к снижению ингибирующего влияния. В концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ М соединение 5 ингибирует фермент на 20 %. Введение гидрофобного фрагмента (2-бензил-3-фосфонопропионовая кислота, соединение 6) улучшает комплементарность ингибитора к ферменту. Кроме того, соединение 6 является эффективным ингибитором карбокси-пептидазы А ($K_i = 2,2 \cdot 10^{-7}$ М) [12]. Замена меркаптогруппы — CH_2SCH_3 -группой (соединение 7, 1-амино-3-метилтиопропилфосфонистая кислота, фосфонистый аналог метионина), как и следовало ожидать, приводит к снижению активности в отношении АПФ по сравнению с цистеином и фосфонистым аналогом цистеина; для проявления активности тиоловых соединений нужна незамещенная SH-группа.

Полученные нами результаты приводят к выводу, что фосфорсодержащие аналоги аминокислот проявляют ингибирующие свойства в концентрациях, сравнимых с ингибирующей концентрацией аминокислот. Способность фосфорорганических аналогов аминокислот тормозить активность АПФ, позволяет рекомендовать их для испытания в системах *in vivo* в качестве антигипертензивных веществ. В связи с метаболической стабильностью фосфорорганических аналогов аминокислот можно надеяться на более пролонгированный эффект по сравнению с природными аминокислотами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Граник В. Г., Шварц Г. Я., Гризлик С. И., Тугушева Н. З. и др. // Хим.-фарм. журн.— 1987.— № 12.— С. 1428—1433.

2. Граник В. Г., Шварц Г. Я., Фаермарк И. Ф. // Там же.— 1985.— № 7.— С. 778—782.
3. Елисеева Ю. Е., Орехович В. Н., Павлихина Л. В. // Вопр. мед. химии.— 1976.— Т. 22, № 1.— С. 81—89.
4. Елисеева Ю. Е., Павлихина Л. В., Орехович В. Н. // Докл. АН СССР.— 1974.— Т. 217, № 4.— С. 953—956.
5. Сырку В. И., Завалова Л. Л., Хомутов Р. М. // Биоорг. химия.— 1986.— Т. 12, № 6.— С. 839—841.
6. Хомутов Р. М., Осипова Т. И. // Изв. АН СССР. Сер. хим.— 1978.— Т. 8.— С. 1951.
7. Хомутов Р. М., Осипова Т. И., Бирюков А. И., Хурс Е. Н. А. с. 717062, 1979.
8. Шварц Г. Я., Граник В. Г. // Хим.-фарм. журн.— 1984.— № 3.— С. 271—282.
9. Шумянцова В. В., Гандурина И. А., Хомутов Р. М. // Биоорг. химия.— 1986.— Т. 14.— С. 470—474.
10. Baylis E. K., Campbell C. D., Dingwall J. G. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1.— 1984.— N 12.— P. 2845—2853.
11. Chambers H. E., Isbell A. F. // J. Org. Chem.— 1964.— Vol. 29, N 4.— P. 832—836.
12. Globelny G., Goli U., Galardy R. // Biochem. J.— 1985.— Vol. 232, N 1.— P. 15—19.
13. Ondetti M., Condon M., Reid J. et al. // Biochemistry.— 1979.— Vol. 18, N 8.— P. 1427—1430.
14. Shumyantzeva V. V., Gandurina I. A., Khurs E. N. et al. // IX Symposium Biochemical Societies of USSR—GDR "Metabolic regulation on cellular levels".— Jena, 1987.— P. 129—130.
15. Thorsett E., Harris E., Peterson E. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1982.— Vol. 79, N 7.— P. 2176—2180.

Поступила 13.03.89

PHOSPHOORGANIC DERIVATIVES OF AMINO ACIDS AS INHIBITORS OF THE ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME FROM BOVINE KIDNEY

V. V. Shumyantzeva, I. A. Gandurina, T. I. Osipova, E. V. Kugaevskaya

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

Reactions of amino acid phosphoorganic derivatives with angiotensin-converting enzyme (dipeptidyl carboxypeptidase) were studied. Substitution of the amino acid carboxyl group by HS- or P(O)(OH)₂-groups did not cause the enzyme considerable inhibition. The enzymatic activity was inhibited by 20-50 % in presence of $1 \cdot 10^{-3}$ M Asp, Met and Cys phosphoorganic derivatives. These amino acid derivatives may be used as potential antihypertensive drugs because of their metabolic stability and inhibitory action on the enzyme.

© С. Н. ЛАВРОВСКИЙ, Т. Т. БЕРЕЗОВ, 1990

УДК 612.646.015.1:577.152.35].085.23.088.1

С. Н. Лавровский, Т. Т. Березов

ИММУНОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕЙРАМИНИДАЗ ВИБРИОНОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ АЭРИРОВАННЫХ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ФИЛЬТРАТОВ

Кафедра биохимии Университета дружбы народов им. Патриса Лумумбы, Москва

Нейраминидаза (мукополисахарид-N-ацетилнейраминилгликогидролаза, КФ 3.2.1.18) — широко распространенный в природе фермент, его продуцируют свыше 70 видов бактерий, вирусов и простейших, он открыт также в животных тканях [8, 9].

Получены экспериментальные доказательства неоднородности нейраминидаз, выделенных из разных источников, в частности по субстратной специфичности [3]. Известно, что наиболее полно

гидролизует концевые α-гликозидные связи, соединяющие сиаловую кислоту с агликоном, нейраминидаза холерных вибрионов [7]. Поэтому именно холерная нейраминидаза находит широкое применение в различных областях биологии и медицины в качестве диагностического и аналитического реагента [2, 10].

В большинстве стран для изготовления коммерческих препаратов нейраминидазы используются культуры холерных вибрионов, что не только осложняет, но приводит к удорожанию производства за счет режимных мероприятий. Однако промышленные препараты нейраминидазы могут быть получены и из непатогенных нехолерных НАГ-вибрионов по оригинальной отечественной технологии [4, 5].

Опубликованы единичные сообщения о близости по ряду параметров нейраминидаз холерных и нехолерных вибрионов из культур, выращенных в стационарных условиях [1]. Существенную информацию об антигенном сходстве нейраминидаз из холерных и нехолерных вибрионов, могут дать иммунохимические исследования.

С учетом изложенного целью настоящей работы было сравнительное изучение с помощью иммунохимического анализа антигенного состава нейраминидаз холерных и нехолерных вибрионов, выделенных из аэрированных культуральных фильтратов по отечественной технологии.

Методика. В работе использованы лиофилизированные препараты нейраминидазы нехолерных и холерных вибрионов, полученные в лабораторно-производственных условиях Горьковского НИИ эпидемиологии и микробиологии по разработанной ранее отечественной технологии [5]. Их сравнительные иммунохимические свойства были изучены методами иммуноэлектрофореза в агаровом геле [6], диффузионной преципитацией в агаре [11] и диск-иммуноэлектрофореза в ПААГ [12].

Для получения антинейраминидазной сыворотки были иммунизированы 3 кролика массой 2,5—3 кг по комбинированной схеме: 1 инъекция нейраминидазы нехолерных вибрионов в дозе 150 мкг внутримышечно с полным адьювантом (вакцина БЦЖ, лаполин, вазелиновое масло, твин-80) и 3 с интервалом 1 нед внутривенно и в лимфатические узлы конечностей также по 150 мкг. На курс иммунизации одного животного использовали 600 мкг фермента. Кровь для получения сыворотки забирали из краевой вены уха через 2 нед после окончания иммунизации. Полученную антинейраминидазную сыворотку использовали для проведения иммунохимических исследований.

Результаты и обсуждение. Результаты идентификации нейраминидазы холерных и нехолерных вибрионов в реакции диффузионной преципитации в агаре приведены на рис. 1. Как видно из представленных результатов, с антинейраминидазной сывороткой нейраминидазы холерных и

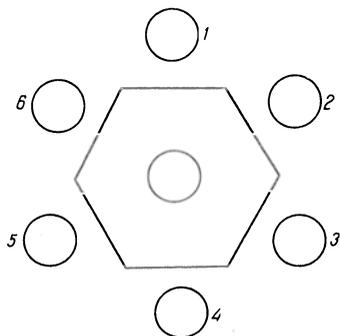


Рис. 1. Идентификация нейраминидазы холерных и нехолерных вибрионов в реакции преципитации в агаровом геле.

В центральной лунке — кроличья антинейраминидазная сыворотка. В периферических лунках — нейраминидаза, полученная из нехолерных вибрионов (1, 3, 5) и из холерных вибрионов (2, 4, 6).

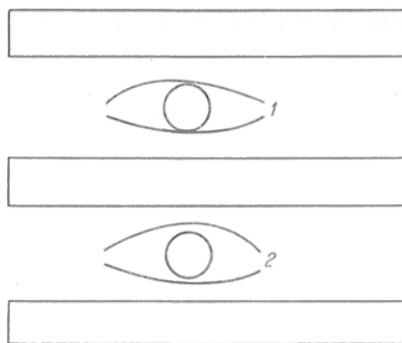


Рис. 2. Иммуноэлектрофоретический анализ нейраминидазы холерных и нехолерных вибрионов.

В траншеях — антинейраминидазная сыворотка. В лунке 1 — нейраминидаза нехолерных вибрионов; в лунке 2 — нейраминидаза холерных вибрионов.

нехолерных вибрионов дали одну сливающуюся линию преципитации. При иммуноэлектрофоретическом анализе в агаровом геле с этой сывороткой (рис. 2) также обнаружены идентичные зоны преципитации в нейтральной области электрофореграмм. Результаты, полученные двумя методами, свидетельствуют о сходстве антигенного состава, что указывает на иммунологическое родство нейраминидаз, выделенных из холерных и нехолерных вибрионов.

В заключительной серии опытов препараты нейраминидазы были подробно исследованы методом диск-электрофореза в ПААГ с последующим проведением реакции иммунопреципитации в агаре на стеклянных пластинах. В качестве антигена использовали нефиксированные и неокрашенные блоки ПААГ после электрофореза фермента, которые заливали 1% агаром на 0,15 М растворе NaCl, а в траншеи помещали антинейраминидазную сыворотку. Результаты, представленные на рис. 3, свидетельствуют о том, что образцы фермента мигрируют в ПААГ одной полосой, реагирующей со специфической антинейраминидазной сывороткой. Сочетание этих двух методов позволило иммунологически идентифицировать белковые зоны, полученные при диск-электрофорезе, как нейраминидазу, показать их гомогенность и отсутствие примесей других белков в препаратах фермента.

Таким образом, результаты, полученные при сравнительном иммунохимическом анализе тремя методами (диффузионная преципитация, иммуно-

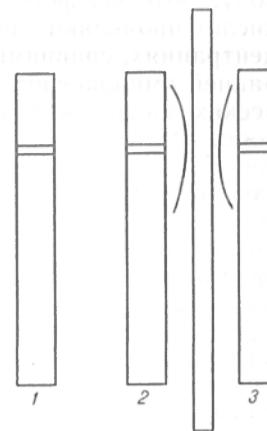


Рис. 3. Данные диск-иммунодиффузного анализа в ПААГ нейраминидазы холерных и нехолерных вибрионов.

В траншеях — кроличья антинейраминидазная сыворотка. Блоки ПААГ: 1 — окраска амидонварцем, нейраминидаза нехолерного вибриона; 2 — неокрашенный, нейраминидаза нехолерного вибриона; 3 — неокрашенный, нейраминидаза холерного вибриона.

электрофорез в агаре и диск-иммуноэлектрофорез в ПЛАГ) препаратов нейраминидазы, полученных из холерных и нехолерных вибрионов, свидетельствуют о сходстве их антигенного состава. Это представляется весьма существенным в плане обоснования возможности замены широко используемой в различных областях биологии и медицины холерной нейраминидазы на фермент, получаемый из нехолерных вибрионов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вертнев Ю. В. // Биоорг. химия.— 1975.— № 1.— С. 1639—1645.
2. Долматова Л. А., Голосеев Ю. А. // Журн. микробиол.— 1985.— № 9.— С. 35—37.
3. Езепчук Ю. В. Биомолекулярные основы патогенности бактерий.— М., 1977.
4. Лавровский С. Н., Таранюк З. Е., Наручева С. Я., Копылова Г. Е. // Новое в практике лабораторных исследований.— Горький, 1984.— С. 73—76.
5. Лавровский С. Н., Таранюк З. Е., Наручева С. Я., Рязанова С. Х. // Актуальные вопросы разработки препаратов медицинской биотехнологии.— Махачкала, 1988.— С. 244—245.
6. Цаев Ю. В. Иммунохимический анализ.— М., 1968.
7. Drzeniek R. // Histochem. J.— 1973.— Vol. 5.— P. 271—290.
8. Meyer D., Lemonnier M. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1981.— Vol. 103.— P. 1302.
9. Müller H., Nicolai H. // Z. Naturforsch.— 1975.— Bd 30.— S. 417—419.
10. Nowak J. // Immunol. Lett.— 1985.— Vol. 10.— P. 141—144.
11. Ouchterlony O. // Acta path. microbiol. scand.— 1948.— Vol. 25.— P. 186—191.
12. Seto J., Hokawa J. // Ann. N. Y. Acad. Sci.— 1964.— Vol. 121.— P. 640—650.

Поступила 28.09.89

IMMUNOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF VIBRIO NEURAMINIDASES ISOLATED FROM AERATED CULTURAL FILTRATES

S. N. Lavrovsky, T. T. Berezov

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

Immunochemical analysis of neuraminidases, isolated from choleraic and non-choleraic vibrios, was carried out. Antineuraminidase antiserum was used in procedures of immunoelectrophoresis, diffusion precipitation in agar gel and disc immunoelectrophoresis in polyacrylamide gel. Antigen composition of neuraminidases was shown to be similar both in choleraic and non-choleraic vibrios.

© Т. А. ДЕВЯТКИНА, Л. М. ТАРАСЕНКО, 1990

УДК 616.1/4-008.939.15-39-02:613.8631-02:615-217.24

Т. А. Девяткина, Л. М. Тарасенко

ОСОБЕННОСТИ СТРЕССОРНОЙ РЕАКЦИИ РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНОВ КРЫС В УСЛОВИЯХ БЛОКАДЫ АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ ИНДЕРАЛОМ

Медицинский стоматологический институт, Полтава

Учитывая современные представления об универсальном значении активации перекисного окисления липидов (ПОЛ) в механизме стрессорных повреждений [4, 6, 9], представлялось целесообразным сопоставить реакцию органов с различной чувствительностью к стрессу со степенью активации ПОЛ в них.

Адекватным подходом, на наш взгляд, для

оценки взаимосвязи особенностей стрессорной реакции органов с состоянием их антиоксидантной защиты является применение фармакологической блокады адренорецепторов, так как активация ПОЛ при стрессе имеет адренергическую природу [9]. Как известно, β-адреноблокатор индерал предотвращает стрессорные повреждения миокарда [9, 14] и широко используется для лечения сердечно-сосудистых заболеваний [13, 15].

Целью работы явилось изучение особенностей стрессорной реакции различных органов и тканей (кровь, сердце, печень, желудок и селезенка) крыс в условиях блокады β-адренорецепторов индералом.

Методика. Опыты проводили на 41 крысе-самце Вистар массой 100—150 г. Животные были разделены на 3 группы: 1-я — интактные животные, 2-я — животные, голодавшие в течение 24 ч, подвергались острому стрессу путем иммобилизации с погружением в воду (22 °С) на 3 ч [16], 3-я — крысы, которым вводили β-адреноблокатор индерал внутривентриально в дозе 20 мг/кг за 30 мин до воздействия стрессорного фактора.

Крыс забивали под гексеналовым наркозом через 2 ч после завершения стрессорного воздействия. Выраженность стресса определяли по ulcerогенному влиянию на слизистую оболочку желудка, учитывая частоту, множественность и тяжесть поражений [3], а также по относительной массе тимуса, надпочечников и селезенки.

Процессы ПОЛ оценивали по уровню ацилгидроперекисей в β- и пре-β-липопротеидах сыворотки крови [5], кинетике накопления продуктов взаимодействия с 2-тио-барбитуровой кислотой (ТБК-активных продуктов) в тканях [4], а также по активности важнейших антиоксидантных ферментов — супероксиддисмутазы (СОД) [2] и каталазы [8].

Результаты и обсуждение. Под влиянием стресса у 57,1% крыс развивались изъязвления слизистой оболочки желудка умеренной степени, что отражает показатели множественности и тяжести язвенных поражений. В этих условиях отмечались тенденции к снижению относительной массы тимуса и выраженная инволюция селезенки (табл. 1).

Наряду с соматическими нарушениями в условиях стресса изменялись антиоксидантный статус и процессы ПОЛ в тканях. В крови на фоне индуктивного повышения активности СОД — ведущего клеточного фермента антиоксидантной си-

Таблица 1

Влияние индерала на морфометрические показатели органов крыс, подвергшихся стрессу ($M \pm m$)

Показатель	Группа животных		
	1-я — интактные (n=17)	2-я — стресс (n=17)	3-я — индерал+стресс (n=7)
Относительная масса органов, г/100:			
тимус	0,17±0,01	0,14±0,008	0,11±0,01
надпочечники	0,02±0,001	0,02±0,001	0,02±0,001**
селезенка	0,49±0,04	0,34±0,2*	0,46±0,04**
Язвенные поражения желудка:			
множественность	0	0,57±0,25*	2,7±1,4
тяжесть, баллы	0	0,57±0,25*	2,4±1,2
частота, %	0	57,1*	57,1

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3 звездочками обозначена достоверность различий ($p < 0,05$) между показателями 1-й и 2-й групп (одна звездочка), а также 2-й и 3-й групп животных (две звездочки).

Влияние индерала на активность антиоксидантных ферментов в крови и органах крыс, подвергшихся острому стрессу ($M \pm m$)

Группа животных	Каталаза, мкат на 1 л крови	СОД, ед. акт.				
		кровь	сердце	печень	желудок	селезенка
1-я — интактные ($n=8$)	$112,0 \pm 13,2$	$1,78 \pm 0,2$	$0,86 \pm 0,09$	$2,06 \pm 0,3$	$0,45 \pm 0,07$	$0,83 \pm 0,1$
2-я — стресс ($n=7$)	$148,6 \pm 23,2$	$2,71 \pm 0,3^*$	$0,67 \pm 0,1$	$2,35 \pm 0,3$	$0,18 \pm 0,04^*$	$0,80 \pm 0,04$
3-я — индерал+стресс ($n=7$)	$91,1 \pm 10,2^{**}$	$1,20 \pm 0,2^{**}$	$1,02 \pm 0,1^{**}$	$1,29 \pm 0,2^{**}$	$0,39 \pm 0,17$	$0,63 \pm 0,06^{**}$

Таблица 3

Влияние индерала на динамику накопления ТБК-активных продуктов (в мкмоль/кг) в тканях крыс, подвергшихся острому стрессу ($M \pm m$)

Группа животных	Печень			Сердце		
	время инкубации, ч					
	0	1,5	3	0	1,5	3
1-я — интактные ($n=8$)	$15,6 \pm 3,01$	$34,0 \pm 6,0$	$29,3 \pm 6,2$	$17,5 \pm 5,6$	$28,4 \pm 2,4$	$24,0 \pm 1,2$
2-я — стресс ($n=7$)	$11,4 \pm 1,1$	$17,3 \pm 2,1^*$	$23,4 \pm 6,8$	$17,2 \pm 2,9$	$24,7 \pm 2,01$	$23,1 \pm 0,7$
3-я — индерал+стресс ($n=7$)	$21,6 \pm 4,0^{**}$	$39,6 \pm 8,1^{**}$	$39,1 \pm 6,7$	$16,5 \pm 2,2$	$25,5 \pm 1,7$	$27,3 \pm 1,1$

стемы увеличивался уровень ацилгидроперекисей β - и пре- β -липопротеидов сыворотки крови (в контроле — $9,5 \pm 0,45$ ед/мл, в опыте — $11,4 \pm 0,66$ ед/мл; $p < 0,05$). Активность же каталазы существенно не изменялась под влиянием стрессорного фактора (табл. 2).

Данные о деструктивных изменениях слизистой оболочки желудка крыс, подвергшихся стрессу, хорошо согласуются со снижением в тканях желудка активности СОД более чем в 2 раза по сравнению с контролем (см. табл. 1 и 2).

В этих условиях в печени аскорбатзависимое ПОЛ протекало менее интенсивно, чем у интактных животных, о чем свидетельствует низкое содержание вторичных продуктов ПОЛ в гомогенате ткани через 1,5 ч инкубации и отсутствие существенных изменений в активности СОД (табл. 3). В миокарде под влиянием стрессорного фактора выраженных изменений исследуемых показателей ПОЛ не наблюдали (см. табл. 2 и 3). Следовательно, стрессорная реакция отдельных органов различна.

После предварительного введения индерала крысам была отмечена тенденция к увеличению множественности и тяжести стрессорных язв слизистой оболочки желудка при неизменной их частоте (см. табл. 1). Отсутствие защитного влияния индерала на желудок в условиях стресса сопряжено со снижением активности СОД и каталазы в крови в 2,2 и 1,6 раза соответственно по сравнению с показателями у контрольных животных.

Таким образом, адренергическая блокада не предотвращала деструктивные изменения в слизистой оболочке желудка при стрессе.

В работе [10] индерал в значительной мере предупреждал развитие язвенных поражений желудка у крыс, вызванное острым эмоционально-болевым стрессом. Различные эффекты индерала можно полагать обусловлены использованием другой модели стресса и меньшей дозы препарата (0,1 мг/кг). В наших экспериментах индерал (20 мг/кг), по-видимому, вызывал десимпатизацию тканей желудка, что привело к наруше-

нию их трофики и потенцированию препаратом ulcerогенного влияния стресса. Известно, что индерал угнетает сопряженную с β_1 - и β_2 -адренорецепторами аденилатциклазу и приводит к снижению уровня цАМФ и процессов энергообразования. Наряду с этим индерал, являясь антагонистом β -адренорецепторов мышечных волокон желудка, ограничивает их релаксацию [1, 12], что может углублять развитие циркуляторной гипоксии тканей желудка.

Снижение активности СОД в печени под влиянием индерала сопровождалось активацией ПОЛ: исходное (до инкубации) содержание ТБК-активных продуктов в гомогенате ткани почти в 2 раза превышало их уровень у животных, подвергшихся стрессу без предварительной блокады адренорецепторов, нарастая к 1,5 ч инкубации (см. табл. 2).

Реакция миокарда на стрессорное воздействие после введения индерала отличалась от наблюдаемой в крови, а также в других органах (желудок, печень). Индерал нормализовал активность СОД в миокарде, повышая ее в 1,5 раза по сравнению с показателями у контрольных животных (см. табл. 2). Существенного накопления ТБК-активных продуктов в миокарде животных, получавших индерал, не происходило (см. табл. 3). Следовательно, индерал оказывает на миокард в отличие от желудка, печени и селезенки стресспротективное действие.

Известно, что введение индерала предотвращает при эмоционально-болевым стрессе ферментацию, являющуюся биохимическим свидетельством клеточных повреждений [9]. Можно полагать, что механизм защитного влияния индерала на миокард при стрессе и его положительный эффект при ишемической болезни сердца обусловлены наряду с ослаблением симпатической импульсации на β_1 -адренорецепторы также повышением активности ферментативного звена антиоксидантной системы. Результаты исследования согласуются с известным в клинической медицине кардиопротекторным эффектом индерала и

раскрывают один из возможных механизмов его действия.

Весьма высокая чувствительность к стрессорному воздействию, проявившаяся в инволюции органа, характерна для селезенки, что ставят в связь в основном с усилением миграции лимфоцитов. В исследованиях, выполненных на двух моделях стресса, выход лимфоцитов из селезенки возрастал в 7—8 раз [7]. Можно полагать, что торможение миграции лимфоидных элементов селезенки под влиянием индерала обусловило отсутствие снижения ее массы (см. табл. 1). Снижение активности СОД в селезенке, возможно, связано с активацией в ней процессов ПОЛ.

Таким образом, стрессорная реакция органов и тканей в обычных условиях и на фоне выключения адренорецепторов индералом неоднозначна и в значительной степени зависит от состояния антиоксидантной защиты, что обосновывает необходимость дифференцированного подхода к применению индерала с лечебной целью. Полученные данные обосновывают также ограничение к применению индерала в клинической практике при деструктивных процессах в желудке в периоды нейроэмоционального напряжения.

Особенности стрессорной реакции органов крыс после предварительного введения индерала, по-видимому, связаны не только с гетерогенностью адренорецепторов, но также с различным состоянием антиоксидантной системы отдельных органов, что необходимо учитывать при анализе реакций на уровне целостного организма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аничков С. В. Нейрофармакология.— Л., 1972.

2. Брусов О. С., Герасимов А. М. // Бюл. exper. биол.— 1976.— № 1.— С. 33—35.
3. Виноградов В. А., Полонский Б. М. // Пат. физиол.— 1983.— № 1.— С. 3—6.
4. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.— М., 1972.
5. Воскресенский О. П., Туманов В. А. Ангиопротекторы.— Киев, 1982.
6. Девяткина Т. А., Тарасенко Л. М., Бобырева Л. Е. и др. // Бюл. exper. биол.— 1985.— № 10.— С. 412—414.
7. Зимин Ю. И. // Там же.— 1971.— № 6.— С. 21—22.
8. Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г., Токарев В. Е. // Лаб. дело.— 1988.— № 1.— С. 16—19.
9. Меерсон Ф. З. Адаптация, стресс и профилактика.— М., 1981.
10. Меерсон Ф. З., Павлова В. И., Коробейникова Э. П. // Вопр. мед. химии.— 1980.— № 6.— С. 827—832.
11. Меерсон Ф. З., Васильев В. К. // Там же.— 1982.— № 2.— С. 115—118.
12. Сергеев П. В., Шимановский П. Л. Рецепторы физиологически активных веществ.— М., 1978.
13. Сидоренко Б. А., Касаткина Л. В., Лупанов В. П., Мазаев В. П. // Кардиология.— 1979.— № 8.— С. 70—73.
14. Устинов Е. Е. // Там же.— 1983.— № 7.— С. 90—93.
15. Эрина Е. В. // Вестн. АМН СССР.— 1981.— № 9.— С. 50—59.
16. Kuriyama K., Vonedo V., Kanmori K. // Neuropharmacology.— 1984.— Vol. 23, N 6.— P. 649—654.

Поступила 19.07.89

SPECIFICITY OF VARIOUS RAT TISSUES STRESS-REACTIONS UNDER CONDITIONS OF ADRENORECEPTORS BLOCKING BY MEANS OF INDERAL

T. A. Devyatkina, L. M. Tarasenko

Medical Stomatological School, Poltava

Dissimilar sensitivity to the stress-effects of various tissues exhibiting distinct levels of the antioxidant protection was found in rats. Stable activity of superoxide dismutase was found in myocardium under usual conditions of stress, while the enzymatic activity was increased during inderal effect as distinct from some other tissues — blood, stomach, liver and spleen tissues.

МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.1/4-07:616.152/.153-074:681.31

Т. Я. Кондратенко, О. И. Иваников, М. И. Кумсков

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ В ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ПАТОЛОГИИ ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ НА БАЗЕ АВТОМАТИЗИРОВАННОГО КОМПЛЕКСА АНАЛИЗИРУЮЩИЕ ПРИБОРЫ — ЭВМ

Институт прикладной молекулярной биологии Минздрава СССР, Москва

При существующих традиционных формах организации медицинской помощи предсимптомная фаза заболевания остается недостижимой для врача. Современные биохимические показатели и их комбинации являются наиболее информативными для оперативного распознавания предсимптомных форм болезни, тестирования групп населения с целью ранней диагностики заболеваний.

В настоящей работе поставлена задача разработки и внедрения автоматизированных методов лабораторной диагностики и предварительного компьютерного анализа с использованием широкого спектра современных биохимических тестов, позволяющих выявлять заболевания внутренних органов, на основе комплекса анализирующие приборы — ЭВМ.

Методика. В работе использовали данные литературы [1, 4—6], на основании которых была выявлена функциональная зависимость определенных патологических процессов от значений биохимических параметров крови и сформированы соответствующие этим процессам симптомокомплексы (табл. 1, 2). Как известно, комбинации нескольких параметров значительно повышают возможность постановки точного диагноза. Ниже представлен спектр биохимических параметров крови, используемый при обследовании пациентов (табл. 3). Группа обследуемых составила 250 человек.

Биохимические параметры крови, отражающие нарушения липидного, белкового, углеводного, пигментного и водно-солевого обменов, определяли по унифицированной методике [2] на современных приборах, способных работать в комплексе с ЭВМ: «Labsystems» (Финляндия), «Cogoпа» (Швеция), «Samag» (Швейцария), «Shimadzu» (Япония).

В работе использовали следующие реактивы: наборы для определения щелочной фосфатазы, гамма-глутамилтранс-

Симптомы (биохимические показатели и их комбинации), характерные для некоторых типов патологий

1. ↓ общего белка
2. ↓ альбуминов ↑ альфа 1 ↑ альфа 2 N бета ↑ гамма
3. ↓ альбуминов N альфа 1 ↑ альфа 2 N бета N гамма
4. ↓ альбуминов N альфа 1 ↓ альфа 2 N бета ↑ гамма
5. ↓ альбуминов ↑ альфа 1 ↑ альфа 2 N бета N гамма
6. ↓ альбуминов ↓ альфа 1 ↓ альфа 2 ↓ бета ↑ гамма
7. ↓ альбуминов ↓ альфа 1 ↑ альфа 2 ↓ бета ↓ гамма
8. ↑ мочевины
9. ↑ креатинина
10. ↑ мочевой кислоты
11. ↑ холестерина
12. ↓ холестерина
13. ↑ бета-липопротеидов
14. ↑ билирубина общего
15. ↑ билирубина прямого
16. ↑ щелочной фосфатазы
17. ↑ АЛТ
18. ↑ АСТ
19. ↑ ЛДГ
20. ↑ КФК
21. ↑ гамма-ГТ
22. ↑ альфа-ГБДГ
23. ↑ глюкозы
24. ↓ глюкозы
25. ↑ железа
26. ↓ железа
27. ↑ кальция
28. ↓ кальция
29. ↑ фосфора
30. ↓ фосфора
31. ↑ хлоридов
32. ↓ хлоридов
33. ↑ тимоловой пробы
34. ↑ триглицеридов
35. ↓ триглицеридов
36. ↓ холестерина ЛПВП
37. ↑ холестерина коэффициента атерогенности: $(X_{\text{общ}} - X_{\text{ЛПВП}}) / X_{\text{ЛПВП}}$ (более 4)
38. ↓ коэффициента Де-Ритиса: АСТ/АЛТ (менее 1)
39. ЛДГ-АСТ (более 12,5)
40. ЛДГ-АСТ (менее 12,5)
41. Гамма-ГТ/АСТ (менее 1)
42. Гамма-ГТ/АСТ (от 1 до 3)
43. Гамма-ГТ/АСТ (более 6)

Примечание. ↑ — повышение, ↓ — понижение, N — норма.

феразы (гамма-ГТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), альфа-гидроксибутиратдегидрогеназы (альфа-ГБДГ), креатинфосфокиназы (КФК), холестерина, глюкозы, креатинина, билирубина фирмы «Labsystems» (Финляндия); наборы для определения железа, тимоловой пробы, фосфора, хлоридов, мочевины, кальция фирмы «Lachema» (ЧССР); генарин фирмы «Gedeon Richter» (Венгрия), а также реактивы отечественного производства.

Совместное функционирование приборов и ЭВМ обеспечивало автоматизированный ввод, хранение и определение специфического для каждого пациента симптомокомплекса, позволяющего существенно сузить рассматриваемое множество патологий.

Классификацию симптомокомплексов проводили на основании статистической обработки накопленной информации о проявлении патологических процессов. Долговременное хранение результатов анализов на ЭВМ давало возможность выделять наиболее значимые параметры, уточнять и расширять ранее сформированные симптомокомплексы. Статистическая оценка имеющихся данных позволила получить распределение условных вероятностей появления у пациента того или иного симптомокомплекса, а также априорной вероят-

Вероятностные характеристики некоторых типов патологий и соответствующих им симптомов

Патологии	Априорная вероятность патологии	Вероятностные характеристики симптомов		
		А	Б	В
Нефротический синдром	0,004	8	0,9	0,1
		9	0,9	0,2
		7	0,8	0,1
Цирроз	0,005	31	0,8	0,1
		24	0,5	0,4
		33	0,9	0,3
Инфаркт миокарда	0,01	42	0,9	0,2
		17	0,8	0,6
		18	0,8	0,6
Гепатит	0,005	20	0,8	0,6
		22	0,9	0,1
		6	0,8	0,2
Атеросклероз	0,01	33	0,9	0,3
		16	0,8	0,7
		21	0,9	0,4
Острый воспалительный процесс	0,006	41	0,9	0,1
		38	0,8	0,25
		11	0,8	0,6
Хронический воспалительный процесс	0,025	13	0,9	0,1
		36	0,7	0,6
		37	0,8	0,6
Сахарный диабет	0,013	3	0,8	0,2
		17	0,8	0,3
		33	0,7	0,6
Ишемическая болезнь сердца	0,012	2	0,8	0,2
		5	0,8	0,25
		14	0,7	0,6
Злокачественные новообразования	0,023	16	0,6	0,5
		25	0,7	0,6
		14	0,6	0,5
Гемолитические заболевания	0,001	14	0,6	0,5
		25	0,7	0,6
		14	0,6	0,5
Желтуха паренхиматозная	0,012	15	0,8	0,4
		17	0,8	0,75
		18	0,8	0,6
Желтуха механическая	0,011	16	0,7	0,6
		40	0,9	0,1
		15	0,7	0,4
Желтуха гемолитическая	0,008	16	0,8	0,5
		21	0,8	0,5
		14	0,7	0,3
Эндокринные расстройства	0,002	39	0,9	0,1
		23	0,7	0,2
		30	0,7	0,4
Анемии	0,003	35	0,8	0,1
		26	0,8	0,4
		25	0,7	0,6
		14	0,7	0,5

Примечание. А — номер симптома из табл. 1; Б — вероятность наличия симптома при развитии патологии; В — вероятность наличия симптома при отсутствии патологии.

ности патологических процессов. Наличие этих вероятностных характеристик свело проблему распознавания патологических процессов к статистической задаче выбора гипотез на основе модифицированного метода Байеса [3, 7]. Достоверное отношение пациента к соответствующей группе риска определялось вероятностью гипотезы (патологического процесса), полученной в результате итерационной процедуры Байеса.

В отличие от традиционного метода Байеса, в котором принято последовательное рассмотрение симптомокомплексов, в модифицированном методе очередность такого рассмотрения устанавливается в зависимости от значимости («цены») симптомокомплексов: в первую очередь рассматриваются симптомокомплексы с максимальной «ценой». В процессе выбора гипотез «цены» симптомокомплексов постоянно изменяются в зависимости от новых вероятностей гипотез. Подобная взаимосвязь между гипотезами (патологическими процессами) и симптомокомплексами позволяет на каждом этапе рассмотрения выбирать симптомокомплексы, относящиеся к гипотезам с наибольшей (на данном этапе) вероятностью.

Таблица 3

Биохимические показатели крови

Показатели	Норма
Общий белок, г/л	64—84
Альбумины, %	56,3—66,8
Глобулины, %:	
α_1	3—5,6
α_2	6,9—10,5
β	7,5—12,5
γ	12,8—19
Мочевина, ммоль/л	2,5—8,3
Креатинин, мкмоль/л	70,6—132,4
Мочевая кислота, мкмоль/л	149—458
Холестерин общий, ммоль/л:	
взрослые	3,5—8,8
дети	3,6—3,9
β -Липопротеиды, усл. ед. экстинкции	30—80
Билирубин общий, мкмоль/л	8,5—20,5
Билирубин прямой, мкмоль/л	0—3,4
Щелочная фосфатаза, ед/л	80—295
АЛТ, ед/л	8—30
АСТ, ед/л	8—27
ЛДГ, ед/л	50—134
КФК, ед/л	15—110
Гамма-ГТ, ед/л:	
мужчины	5—50
женщины	5—30
Альфа-гидроксibuтиратдегидрогеназа, ед/л:	
взрослые	55—140
дети	92—183
Глюкоза, ммоль/л	3,3—5,5
Железо, мкмоль/л:	
мужчины	14,3—26
женщины	10,7—21,5
Протромбиновый индекс, %	90—100
Кальций, ммоль/л	2,25—2,75
Фосфор, ммоль/л	0,65—1,4
Хлориды, ммоль/л	95—110
Тимоловая проба, S—H ед.	0—5
Холестерин ЛПВП, ммоль/л	0,78—1,94
Триглицериды, ммоль/л	0,1—2,2

В силу того что реальные значения диапазонов норм биохимических параметров крови каждого пациента могут отличаться от средних значений, при рассмотрении симптомокомплексов вводится коэффициент неопределенности наличия (или отсутствия) симптомокомплекса у данного пациента. Введение такого коэффициента позволяет различать специфичные для пациента отклонения от нормы и реальные отклонения.

Результаты и их обсуждение. В табл. 1 приведены используемые в работе современные биохимические показатели крови и их комбинации, характерные для некоторых типов патологий. Особую диагностическую ценность представляет ферментный спектр крови для диагностики заболеваний сердца, легких, печени, мозга и др. Так, в диагностике острых и хронических заболеваний печени используются коэффициенты, характеризующие соотношения активностей различных ферментов (табл. 4).

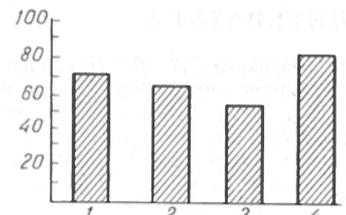
Таблица 4

Дифференциальная диагностика ряда заболеваний печени посредством оценки коэффициента

Патология	Гамма-ГТ/АСТ	ЛДГ/АСТ
Острый вирусный гепатит	<1	—
Хронический гепатит	От 1 до 3	—
Цирроз печени	>6	—
Первичный рак печени	—	—
Метастатический рак печени	От 3 до 6	—
Механическая желтуха	—	>12,5
Гемолитическая желтуха	—	<12,5
Печеночно-клеточная желтуха	—	<12,5

Совпадение результатов предварительной компьютерной диагностики с окончательным диагнозом.

1 — гепатит; 2 — атеросклероз; 3 — желтуха механическая; 4 — острый воспалительный процесс. По оси ординат — процент совпадений.



Исследование активностей гамма-ГТ и щелочной фосфатазы в сыворотке крови имеет большое значение в диагностике холестаза, метастазов в печени. Трансаминазный тест (АЛТ, АСТ) сыворотки крови используется при дифференциальной диагностике ряда заболеваний сердечно-сосудистой системы, патологий печени (вирусный гепатит). Важным лабораторным тестом при диагностике острого инфаркта миокарда является определение активностей альфа-ГБДГ и МВ-формы КФК.

В диагностике заболеваний сердечно-сосудистой системы, выявлении патологий липидного обмена большое значение придается определению соотношения между липопротеидными фракциями крови, а также уровню холестерина ЛПВП в крови. Для оценки вероятности развития ишемической болезни сердца используют холестериновый коэффициент атерогенности (см. табл. 1).

В настоящей работе были использованы средства вычислительной техники в комплексе с анализаторами, позволяющие автоматизировать не только считывание, учет и хранение данных с этих приборов, но и проводить первичную обработку поступающей информации. Применение методов теории вероятности и математической статистики к анализу результатов биохимических исследований крови обеспечивало постановку предварительного диагноза, соответствующего специфичному для данного пациента симптомокомплексу. Результаты предварительной компьютерной диагностики использовали при выборе дальнейшего направления обследования пациента для подтверждения (или опровержения) диагноза. Процент совпадения результатов компьютерной диагностики и окончательных диагнозов приведен на рисунке. Полученные данные свидетельствуют о том, что процент совпадения результатов предварительной компьютерной диагностики с окончательными диагнозами выше при тестировании патологий внутренних органов, чем при тестировании конкретных заболеваний.

Используемые математические методы не зависят от конкретных типов патологий и соответствующих им симптомов, что позволяет вносить изменения и дополнения в множество рассматриваемых патологий, а также формировать новые симптомокомплексы и модифицировать уже имеющиеся. Априорные значения вероятностных характеристик, уникальные для каждого географического региона, легко приводятся в соответствие со значениями, характерными для пациентов диагностируемого региона.

Мобильность средств предварительной компьютерной диагностики делает возможным ее использование на множестве патологий применительно к различным группам населения.

парат антител лиофилизировали и использовали для активации твердой фазы и приготовления конъюгата с пероксидазой.

Приготовление конъюгата антител с пероксидазой из хрена: сшивку антител с ферментом проводили методом перйодатного окисления [18] в соотношении 4 мг пероксидазы из корня хрена (марка А, акт. 659, Олайнский завод, СССР) на 8 мг антител к α_2 -М. Для стабилизации к конъюгату добавляли бычий сывороточный альбумин до конечной концентрации 1 %, глицерин — до 40 % и хранили при температуре $-18^\circ - 20^\circ\text{C}$.

Стандартизация метода иммуноферментного определения α_2 -М включала подбор концентрации антител (2,5; 5,0; 10,0; 20,0 мкг/мл) к α_2 -М для иммобилизации на твердую фазу, выбор разведения конъюгата (1:300, 1:400, 1:500, 1:600) и определение временных параметров инкубации (30, 60, 90 мин) на разных этапах постановки метода. Для построения калибровочной кривой подбирали определенные концентрации стандартного раствора α_2 -М человека. Для постановки иммуноферментного метода использовали стандартную схему [3].

Концентрацию белка в исследуемом материале определяли по Лоури [15].

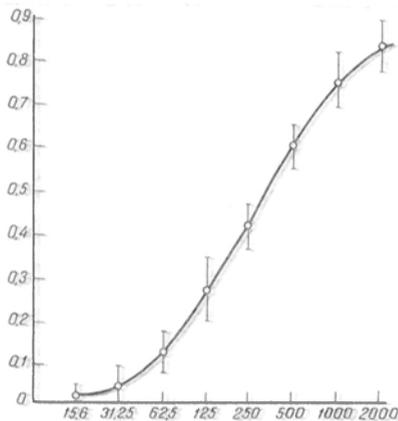
Результаты и обсуждение

Иммунохимический анализ и диск-электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) выявили высокую степень очистки препарата α_2 -М и отсутствие примесных белков, что позволило применять его для иммунизации и в качестве стандарта для постановки иммуноферментного метода. Антисыворотки после истощения амниотической жидкостью содержали антитела только к α_2 -М: при перекрестном иммуноэлектрофорезе в образцах плазмы крови доноров выявлялся один пик преципитации, идентичный чистому препарату α_2 -М. Титр моноспецифической антисыворотки в стандартной тест-системе составлял 1:16—1:32. Выделенные из антисыворотки антитела имели титр 1:32 при концентрации белка 5 мг/мл.

При оптимизации условий постановки иммуноферментного метода были найдены рабочая концентрация антител для иммобилизации на твердой фазе — 5 мкг/мл и рабочее разведение конъюгата — 1:500. Для построения калибровочной кривой использовали раствор α_2 -М с исходной концентрацией 2000 нг/мл и его последовательные двукратные разведения. Линейный участок калибровочной кривой соответствовал концентрациям α_2 -М от 62,5 до 1000 нг/мл (см. рисунок). Чувствительность разработанной тест-системы 31,25 нг/мл. Для определения α_2 -М в плазме (сыворотке) крови человека исследуемые образ-

цы разводят в 3000 раз: 1 мкл образца в 3 мл буфера (микрошприц МШ-1М, «Химвавтоматика», г. Дзержинск). Биологические жидкости с низкой концентрацией белка используют без разведения, а при выявлении высоких значений α_2 -М (более 1000 нг/мл) образцы разводят в 2 и 4 раза и проводят повторное определение.

Для постановки разработанного метода применяли гибкие планшеты («Titerteck», Англия). «Посадку» антител проводили в 0,01 М карбонатном буфере pH 9,6. В каждую лунку планшета вносили по 150 мкл антител к α_2 -М, планшет закрывали крышкой и инкубировали при $+4^\circ\text{C}$ в течение ночи, после чего проводили трехкратную отмывку — сначала водопроводной водой, затем фосфатно-солевым буфером pH 7,4, содержащим 0,05 % твин-20. После отмывки лунки планшета заполняли (по 150 мкл) следующим образом: лунки 1-го ряда (контрольный ряд для выведения базисной линии при проведении спектрофотометрии) — фосфатно-солевым буфером с твином-20, лунки 2-го и 12-го рядов — последовательными разведениями стандартного раствора α_2 -М (для построения калибровочной кривой), остальные лунки — исследуемыми образцами. Стандарт α_2 -М и образцы биологических жидкостей разводили фосфатно-солевым буфером с твином-20. Планшет инкубировали в термостате в течение 1 ч при 37°C , после чего отмывали, как описано выше, и во все лунки вносили по 150 мкл конъюгата, разведенного фосфатно-солевым буфером в 500 раз. Через 60 мин инкубации при 37°C планшет снова отмывали и в лунки вносили по 150 мкл субстратной смеси для выявления активности пероксидазы. [Приготовление субстратной смеси: 20 мг 5-аминосалициловой кислоты («Merck», ФРГ) растворяют при нагревании (80°C) в 25 мл дистиллированной воды, раствор охлаждают до комнатной температуры и доводят pH до 6,0 с помощью 1,0 М раствора NaOH (100 мкл), затем добавляют 10 мкл 30 % перекиси водорода и смесь сразу используют.] Планшет инкубировали 15 мин при комнатной температуре при постоянном встряхивании. Регистрацию данных проводили на многоканальном спектрофотометре («Titerteck Multiscan, Flow», Англия), при длине волны 450 нм. Концентра-



Калибровочная кривая для определения α_2 -М человека.

По оси ординат — оптическая плотность, (ΔE_{450}), по оси абсцисс — концентрация α_2 -М (в нг/мл).

Содержание α_2 -М в различных биологических жидкостях человека

Биологический материал	Число исследованных объектов	Уровень α_2 -М
Плазма крови, мг/мл:		
Здоровые люди	20	2.85 ± 0.29
Больные инфарктом миокарда	19	2.25 ± 0.30
Больные с непроходимостью толстой кишки	15	1.62 ± 0.25
Больные пневмонией	15	6.93 ± 0.58
Моча, нг/мл		
Здоровые люди	42	34.2 ± 3.9
Беременные здоровые	38	225.7 ± 24.5
Беременные с нефропатией II—III степени	14	2038.3 ± 230.6
Слезная жидкость, нг/мл		
Здоровые люди	20	1498.0 ± 160.0
Больные тромбозом ветвей центральной вены сетчатки глаза	30	5093.2 ± 588.5

цию α_2 -М в исследуемых образцах определяли по калибровочной кривой, которую строили для каждого планшета по средним значениям экстинкций разведенного стандарта во 2-м и 12-м рядах.

Разработанный иммуноферментный метод был использован для определения α_2 -М в плазме крови, моче и слезной жидкости (см. таблицу). В норме содержание α_2 -М в плазме крови здоровых людей составляет $2,85 \pm 0,29$ мг/мл. Достоверное (на 21,1 %) снижение ингибитора отмечено у больных с инфарктом миокарда в первые часы заболевания и у больных с непроходимостью толстой кишки опухолевого генеза (на 43,1 %); в группе больных с пневмонией содержание α_2 -М было повышено по сравнению с нормой в 2,4 раза. В моче здоровых людей концентрация α_2 -М в 80 % случаев была ниже оптимальной чувствительности метода и в среднем составляла $34,2 \pm 3,9$ нг/мл. Повышение его содержания в моче выявлено у здоровых беременных женщин в I триместре (в 6,6 раза) и у беременных с нефропатией II—III степени (в 59,6 раза) на всех стадиях беременности. В слезной жидкости в норме содержание α_2 -М составляло 1498 ± 160 нг/мл. У больных с тромбозом ветвей центральной вены сетчатки глаза концентрация ингибитора повышалась в 3,4 раза.

Таким образом, разработанный метод определения α_2 -М благодаря высокой чувствительности и специфичности позволяет определять содержание ингибитора как в жидкостях с высокой концентрацией белка, так и в биологическом материале с низкой концентрацией белка. Преимуществом данного метода является возможность использования незначительных количеств исследуемых образцов. Изучение содержания α_2 -М в различных биологических жидкостях организма человека может дать дополнительные критерии оценки патологических состояний, необходимые для диагностики и прогноза того или иного заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белова Т. А., Калашников В. В., Хватов В. Б. // Хроматография в биологии и медицине.— М., 1986.— С. 105—110.
2. Грбар П. // Биохимия.—1957.— № 1.— С. 49—54.
3. Ермолин Г. А., Ефремов Е. Е., Филимонова В. Э. и др. // Вопр. мед. химии.—1987.— № 6.— С. 123—126.
4. Кубышкин А. В. // Пат. физиол.—1987.— № 5.— С. 69—72.
5. Пасхина Т. С., Полянцова Л. Р., Кринская А. В. и др. // Вопр. мед. химии.—1977.— № 2.— С. 241—251.
6. Хватов В. Б., Белова Т. А. Ускоренный метод определения основных ингибиторов протеиназ в плазме крови человека: Метод. рекомендации.— М., 1981.
7. Храмова Н. И., Абедев Г. И. // Бюл. exper. биол.—1961.— № 12.— С. 107—110.
8. Aoki N., Harpel P. C. // Semin. Thrombos. Hemost.—1984.— Vol. 10, N 1.— P. 24—41.
9. Aoki Hiroshi, Kojima Minco // Seibutsu Butsuri Kagaku.—1969.— Vol. 14, N 2.— P. 149—155.
10. Avrameas S., Terryck T. // Immunochimistry.—1969.— Vol. 6.— P. 53—66.
11. Barret A. J., Sterkay // Biochem. J.—1973.— Vol. 133, N 4.— P. 709—724.
12. Engvall E., Perlman P. // Immunochimistry.—1971.— Vol. 8.— P. 871—874.
13. Laurell C. B. // Analyt. Biochem.—1965.— Vol. 10.— P. 358—361.
14. Lijnen H., Collen D. // Ric. clin. lab.—1984.— Vol. 14, N 3.— P. 499—505.
15. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem.—1951.— Vol. 193.— P. 265—275.

16. Ouchterlony O. // Progr. Allergy.—1958.— Vol. 5.— P. 1—8.
17. Takatsuka J., Kubotu K., Urita I. // Ketsuki to Myakkon.—1980.— Vol. 11, N 2.— P. 215—219.
18. Wilson M. B., Nakana P. K. // Immunofluorescence and Rela ted Staining Techniques/Ed. W. Knapp et al. — Amsterdam, 1978.— P. 215—225.

Поступила 12.09.88

IMMUNOENZYMATIC ASSAY FOR HUMAN α_2 -MACROGLOBULIN

V. V. Kalashnikov, T. K. Platonova, A. V. Svitschev

N. V. Sklifosovsky Institute of Urgent Medicine, Moscow.

Highly sensitive, specific immunoenzymatic assay for human α_2 -macroglobulin was developed using solid phase «sandwich» procedure. The immunoenzymatic assay developed involved the following steps: 1. preparation of highly purified α_2 -macroglobulin, 2. production of monospecific antiserum against the protein, 3. preparation of the immunoenzymatic assay system components — isolation of antibodies against α_2 -macroglobulin, conjugation of these antibodies with horseradish peroxidase, standardization of the assay. Sensitivity of the assay was 31,25 ng/ml, duration of the analysis — 3 hrs. The assay enabled to estimate the proteinase inhibitor in various human biological fluids. Content of α_2 -macroglobulin in blood plasma, urine and tears was estimated in normal and some pathological states.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616-006.6-092.9-07:[616.153:577.113]-02:[615.153:577.112]

Н. А. Новорадовская, А. Н. Котеров, И. В. Филиппович

ЭКСПРЕСС-МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА БЕЛКОВ, СВЯЗЫВАЮЩИХ ДНК, В СЫВОРОТКЕ КРОВИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Институт биофизики Минздрава СССР, Москва

Содержание белков, связывающих ДНК (БСД), ранее обнаруженных в сыворотке крови животных [20] и человека [6, 10], повышается при ряде заболеваний — системной красной волчанке [5], псориазе [21] и др. [3]. Продемонстрирована значимость определения БСД в сыворотке крови человека при развитии злокачественных новообразований [13, 14, 16, 17]. Однако существующие методы регистрации количества БСД достаточно сложны и основаны или на связывании этих белков с меченой ДНК [4], или на очистке БСД с помощью хроматографирования [11]. Это затрудняет применение таких методов в клинических исследованиях. В настоящей работе предложен простой экспресс-метод определения количества БСД в сыворотке крови млекопитающих, не требующий сложного оборудования и редких реактивов.

Методика. Эксперименты выполнены на беспородных белых мышах массой 20—24 г. Асцитию карциному Эрлиха (АКЭ) животным прививали внутрибрюшинным введением $0,4 \cdot 10^7$ клеток опухоли в 0,2 мл физиологического раствора. Контрольным животным вводили физиологический раствор. Мышей наркотизировали эфиром и забивали декапитацией. Кровь собирали в силиконизированные пробирки, помещенные в лед и содержащие $1/10$ от конечного объема крови 0,15 М раствора цитрата натрия (нельзя применять в качестве антикоагулянта гепарин, способный конкурировать с ДНК при связывании с БСД [6, 19]). Сыворотку крови, полученную после центрифугирования, разводили в 15 раз раствором 50 мМ NaCl в стандартном буфере С

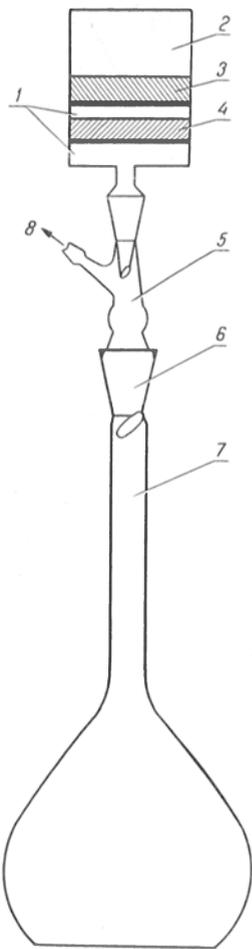


Рис. 1. Схема установки для фильтрации сыворотки крови через фильтр, содержащий ДНК.

1 — прокладка; 2 — ячейка; 3 — фильтр из ватмана; 4 — ДНК-фильтр; 5 — стеклянная трубка; 6 — шлиф; 7 — колба; 8 — к подоструйному насосу.

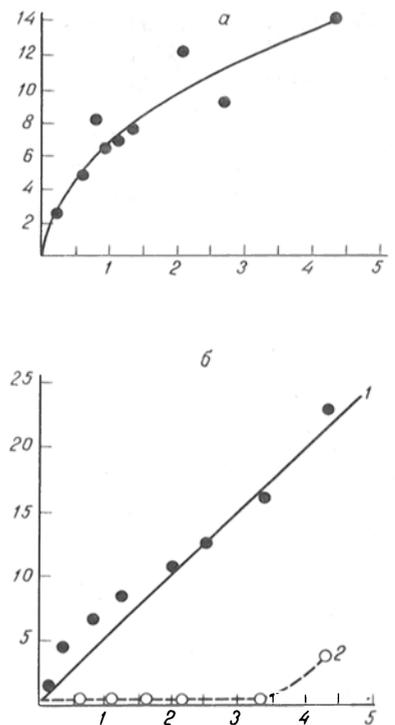
(20 мМ трис-НСl рН 7,8; 1 мМ ЭДТА; 12 мМ 2-меркапто-этанол).

Для приготовления фильтров, содержащих ДНК (ДНК-фильтров), использовали метод фиксации ДНК на целлюлозе с помощью УФ-света [15]. Лист ватманской бумаги (3 мм) (фирма «Whatmann», Великобритания; можно использовать любую толстую фильтровальную бумагу) заливали раствором ДНК (2 мг/мл в 10 мМ NaCl) из молок лососевых рыб, выделенной по методу, описанному в работе [1], так, чтобы слой раствора над бумагой составил 1–2 мм и сушили 3 сут на воздухе. Заливали ватман абсолютным этанолом в таком же количестве и облучали УФ-светом под лампой БУФ-1 в течение 1,5 ч на расстоянии 5 см. Из ватмана вырезали круглые фильтры (диаметр 10 мм) и промывали их 50 мл раствора 10 мМ NaCl на ячейке для фильтрации под вакуумом (см. ниже). Для определения содержания ДНК фильтр разрезали на кусочки, помещали их в 3 мл воды и кипятили на водяной бане в течение 20 мин. При этой процедуре ДНК, ковалентно связанная с целлюлозой (показано для целлюлозы в порошке [15]), отщепляется [8]. Содержание ДНК в растворе регистрировали по поглощению при 260 нм. Каждый фильтр связывал 1–5 мг ДНК на 1 г массы.

Ячейку для фильтрации присоединяли к стеклянной трубке с отростком, соединенным с водоструйным насосом (рис. 1). Противоположную часть трубки через шлиф присоединяли либо к колбе (при промывании фильтров), либо к пробирке на 5 мл (при отборе пробы). На ячейку помещали фильтры в следующем порядке (см. рис. 1): прокладка из фильтровальной бумаги, ДНК-фильтр (нижний фильтр), прокладка, фильтр из ватмана, не содержащий ДНК (верхний фильтр). Последний был необходим для удаления белков, неспецифически связывающихся с бумагой. Фильтры промывали 5 мл 2 М NaCl в буфере С и 30 мл 50 мМ NaCl в этом же буфере. Наносили разведенную сыворотку (0,1–2,5 мл, или 0,3–4,4 мг общего белка), промывали 15 мл 50 мМ NaCl в буфере С и разъединяли фильтры. Верхний фильтр, не содержащий ДНК, и прокладку удаляли, а ДНК-фильтр промывали 2 мл 0,1 М NaCl в буфере С для удаления белков, слабо связывающихся с ДНК. БСД

Рис. 2. Определение количества белка на фильтрах.

По оси абсцисс — количество общего белка (в мг) сыворотки, внесенной в ячейку; по оси ординат — содержание белка (в мкг): а — на верхнем фильтре (объяснение в тексте) из ватмана без ДНК; б — на ДНК-фильтре (кривая 1 — БСД) и на нижнем фильтре из ватмана без ДНК (кривая 2 — балластные белки).



элюировали 1 мл 0,6 М NaCl в буфере С и в элюате определяли количество белка с кумасси G-250 по методу [18]. Попытка дальнейшей элюции 1 мл 2 М NaCl продемонстрировала, что практически все БСД удаляются уже 0,6 М NaCl. Использованные фильтры помещали в раствор 2 М NaCl и хранили на холоде до следующего применения. Прокладки применяли однократно.

Результаты и обсуждение. На рис. 2 представлены результаты определения емкости фильтров для БСД и для белков, неспецифически сорбируемых бумагой. При нанесении разных количеств разведенной сыворотки (0,1–2,5 мл) на верхнем фильтре из ватмана без ДНК связывается большое количество белков (рис. 2, а). Таким образом, бумага ватман имеет значительную емкость для сорбции неидентифицированных балластных белков. Для выяснения возможности загрязнения ДНК-фильтра такими белками, отличающимися от БСД, в ячейку помещали 2 фильтра из ватмана без ДНК. Из рис. 2, б (кривая 2) видно, что нижний фильтр, помещенный вместо ДНК-фильтра, не содержит белка вплоть до внесения в ячейку 3,4 мг общего белка сыворотки (до 2 мл разведенной сыворотки). Таким образом, практически все балластные белки остаются на первом, верхнем фильтре. В то же время наблюдается линейная зависимость между объемом внесенной сыворотки и содержанием белка на ДНК-фильтре. Таким образом, метод определения количества БСД ограничивается 3,4 мг общего белка сыворотки, внесенной в ячейку. Все определение (включая получение сыворотки) занимает не более 30 мин.

Нами была сделана попытка выяснить природу БСД, сорбирующихся на ДНК-фильтре. Известно, что в состав БСД сыворотки крови млекопитающих могут входить белки системы комплемента [11, 12], антитела к ДНК [4] и другие, неидентифицированные белки [9]. Сыворотка крови может быть очищена от белков комплемента

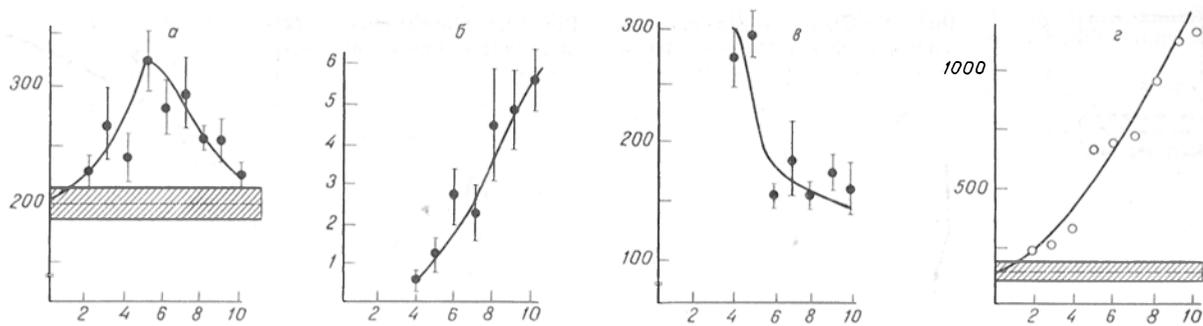


Рис. 3. Определение концентрации БСД в сыворотке крови и асцитной жидкости мышей с АКЭ.

а, б, в — на каждую точку приходилось не менее 4 мышей ($M \pm m$); г — рассчитанная кривая. По осям абсцисс — длительность роста АКЭ, дни; по осям ординат: а — БСД сыворотки крови, мкг/мл; б — объем асцитной жидкости, мл; в — БСД асцитной жидкости, мкг/мл; г — суммарное количество БСД, мкг на мышь.

Хроматографические свойства БСД

Хроматографический носитель	рН буфера нанесения и элюции	Содержание БСД, не связанного с носителем	% от исходного	
			Содержание БСД при элюции, 0,1 М, NaCl	Содержание БСД при элюции 0,5 М, NaCl
ДЭАЭ-целлюлоза	7,8	52	48	Не обнаружено
QAE-сефадекс А-25	6,8	52	Не обнаружено	48
КМ-сефадекс С-50	7,4	83	Не обнаружено	17

при прогревании (50 °С, 30 мин) с последующим центрифугированием [7]. Подобная обработка сыворотки мышей не привела к снижению количества БСД, определяемых на ДНК-фильтре. Таким образом, регистрируемые нами белки не являются белками комплемента. С другой стороны, после осаждения белков сыворотки 40 % сульфатом аммония и последующего определения на ДНК-фильтре не обнаружено БСД. Изученные хроматографические свойства БСД представлены в таблице (использовали носители фирмы «Pharmacia», Швеция).

По нашим данным, основную часть БСД составляют кислые белки, не связывающиеся с катионообменниками. В то же время, БСД слабо связываются с ДЭАЭ-целлюлозой. Поскольку известно, что гамма-глобулины осаждаются 40 % сульфатом аммония и непрочны связываются с ДЭАЭ-целлюлозой [2], можно предположить, что определяемые с помощью ДНК-фильтров БСД представляют собой одну из фракций гамма-глобулинов. Возможно, это антитела к ДНК, являющиеся кислыми белками [4].

Необходимо было проверить предлагаемый нами метод на исследованиях, близких к клиническим. Показано, что при росте опухолей в сыворотке крови увеличивается содержание БСД [13, 14, 16, 17]. Мы определили концентрацию БСД в сыворотке крови мышей с АКЭ. Из рис. 3, а видно, что концентрация БСД постепенно увеличивается, достигая максимума на 5-е сутки роста опухоли, а затем снижается. Это снижение может быть обусловлено разбавлением крови асцитной жидкостью, объем которой, начиная уже с 5-го дня, сравним с объемом сыворотки. Возможно также, часть БСД переходит из сыворотки крови в асцитную жидкость. Действительно, исследование асцитной жидкости выявляет в ней достаточно большое количество этих белков. Суммар-

ное количество всех БСД сыворотки (объем 1 мл/мышь) и асцитной жидкости в течение роста опухоли увеличивается. Видимо, более отчетливая картина повышения содержания БСД в сыворотке крови наблюдалась бы при росте солидной опухоли.

Таким образом, ДНК-фильтры могут быть использованы при клинических исследованиях заболеваний, связанных с повышением содержания в сыворотке крови БСД. Важно отметить, что для определения необходимо малое количество исходной сыворотки — 0,1–0,2 мл. Возможно применение метода для исследования БСД в клеточных экстрактах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Котеров А. И., Новорадовская И. А., Тронов В. А. и др. // Биохимия.— 1988.— Т. 53, № 7.— С. 1193–1202.
2. Кэбот Е., Мейер М. Экспериментальная иммунохимия / Под ред. Н. В. Холчева: Пер. с англ.— М., 1968.
3. Пурцева Г. Б., Подгородниченко В. К., Озеречковская И. И. // Мед. паразитол.— 1983.— № 5.— С. 18–21.
4. Поверенный А. М. // Итоги науки и техники: Иммунология.— М., 1986.— Т. 17.— С. 129–146.
5. Поверенный А. М., Леви М. И. // Вопр. мед. химии.— 1965.— Т. 11, № 2.— С. 95–97.
6. Подгородниченко В. К., Поверенный А. М., Джумаев Д. Б. и др. // Там же.— 1982.— Т. 28, № 5.— С. 63–67.
7. Трушко М., де Петрис С., Такач Б. Иммунология: методы исследования / Под ред. И. Лефковитца, Б. Пернуса: Пер. с англ.— М., 1983.
8. Alberts B. M., Herrick G. // Meth. Enzymol.— 1971.— Vol. 21, Pt D.— P. 198–217.
9. Amici D., Barra D., Hillar M. et al. // Mol. Biol. Rep.— 1982.— Vol. 8, N 4.— P. 217–223.
10. Brehm S. P., Hock S. O., Hock J. A. // Biochim. biophys. Res. Commun.— 1975.— Vol. 63, N 1.— P. 24–31.
11. Gardner W. D., Hasebly J. A., Hock S. O. // J. Immunol.— 1980.— Vol. 124, N 6.— P. 2800–2806.
12. Gardner W. D., White P. J., Hock S. O. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1980.— Vol. 94, N 1.— P. 61–67.
13. Hock S. O., Longmire R. L., Hock J. A. // Nature.— 1975.— Vol. 255, N 5509.— P. 560–562.
14. Katsunuma T., Tsuda M., Kusumi T., Tajima T. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1980.— Vol. 93, N 2.— P. 552–557.
15. Litman R. M. // J. biol. Chem.— 1968.— Vol. 243, N 23.— P. 6222–6233.
16. Parson R. G., Hock J. A. // Europ. J. Biochem.— 1976.— Vol. 71, N 1.— P. 1–8.
17. Reiner G. // Arch. Dermatol. Res.— 1979.— Vol. 264, N 3.— P. 265–273.
18. Spector T. // Anal. Biochem.— 1978.— Vol. 86, N 1.— P. 142–146.
19. Sternbach H., Engelhardt R., Cesius A. C. // Europ. J. Biochem.— 1975.— Vol. 60, N 1.— P. 51–57.
20. Thoburn R., Hurwitz A. I., Kunkel H. G. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1972.— Vol. 69, N 7.— P. 3327–3330.

QUICK TEST FOR ESTIMATION OF PROTEIN BOUND TO DNA IN MAMMALIAN BLOOD SERUM

N. A. Novoradovskaya, A. N. Koterov, I. V. Filippovich

Institute of Biophysics, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

Quick test for estimation of DNA-bound proteins (PBD) in mammalian blood serum involved filtration of blood serum through Wathman filters containing DNA. DNA was fixed in the Wathman filters by means of UV irradiation. Some physicochemical and chromatographic properties of PBD from mice blood serum were studied. The data obtained suggest that blood serum PBD constituted one of γ -globulin fractions. Applicability of the PBD test for studies of tumoral diseases was shown using mice with Ehrlich ascites carcinoma.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 615:355:577.152.1:582.282].012.8

Н. Ф. Лаугалене, В. С. Веса, Р. П. Янкявичене, С. П. Пуоджюте, О. Ф. Суджювене, И. И. Песлякас, С. Х. Хадуев, Т. Т. Березов

НОВЫЙ МЕТОД ОЧИСТКИ L-ЛИЗИН- α -ОКСИДАЗЫ ГРИБА TRICHODERMA

Научно-производственное объединение «Фермент», Вильнюс, кафедра биохимии Университета дружбы народов им. П. Лумбумбы, Москва

Фермент L-лизин- α -оксидаза гриба *Trichoderma* обладает очень высокой стереоспецифичностью и катализирует окислительное дезаминирование одной из незаменимых аминокислот L-лизина с образованием α -кето- ϵ -аминокапроновой кислоты, аммиака и перекиси водорода [13].

Практическое использование данного фермента связано с его возможной противоопухолевой активностью, он может служить в качестве основы для биосенсоров по определению концентрации L-лизина, а также для приготовления D-изомера лизина из рацемата и получения α -кетокислот [2, 3—5, 7, 10, 11].

В предыдущих работах нами были представлены данные об очистке L-лизин- α -оксидазы [2, 9] и о некоторых физико-химических и каталитических свойствах этого фермента [1, 6, 12].

Цель настоящей работы — создание более технологичной препаративной схемы получения L-лизин- α -оксидазы высокой степени чистоты с меньшим числом стадий очистки и использованием новых сорбентов.

В настоящее время очень часто для очистки ферментов с большой эффективностью используют биоспецифические сорбенты, а также сорбенты гидрофобного взаимодействия [8]. В нашем случае на основании полученных данных по успешному селективному фракционированию фермента путем осаждения сульфатом аммония, при использовании гидрофобного механизма взаимодействия белковых молекул [9] можно было предположить целесообразность переноса этого явления в гетерогенную фазу, т. е. использовать для очистки фермента сорбенты гидрофобного типа [8]. С другой стороны, на основании ярко выраженной стереоспецифичности фермента к L-изомеру можно было

надеяться на получение хороших результатов в случае использования сорбентов, содержащих в своих структурах в качестве лиганда L-лизин-специфический субстрат или его близкий аналог. Однако лизин может быть присоединен к матрице по α - или по ϵ -аминогруппам, и в зависимости от этого конечные сорбенты будут иметь соответствующие свойства. Следует отметить, что L-лизин- α -оксидаза гриба *Trichoderma* не катализирует окисление L-лизина, если ϵ -аминогруппа замещена [14]. На основании этого факта более подходящим сорбентом может быть тот, у которого ϵ -аминогруппа свободна. Однако практика показывает, что в случае биоспецифических сорбентов, содержащих в качестве лиганда низкомолекулярное соединение, это правило часто не подтверждается. Поэтому сочли целесообразным проверить сорбенты с разноразмещенными L-лизинами и аналогами этой аминокислоты, содержащими гексаметилендиамин (АН-сефарозу), поскольку данный сорбент содержит все структурные элементы лизиновых сорбентов за исключением карбоксильной группы.

Методика. В качестве сорбентов в работе использованы бутилсилохром С-80 (содержание бутиловых радикалов 80 мкмоль/г, размер частиц 0,1 мм) [4], гексаметилендиамин сефароза (АН-сефароза — “Pharmacia Fine Chemicals”, Швеция), ϵ -L-лизин-сефароза (“Pharmacia Fine Chemicals”, Швеция), α -L-лизин-сефароза (“Sigma”, США), в качестве реактивов — ортодианизидин («Биолар», СССР), L-лизин («Биолар», СССР), пероксидаза из хрена (“Reanal”, Венгрия), яичный альбумин (“Fluka”, Швейцария). Культуральная жидкость получена путем глубинного культивирования штамма *Trichoderma* sp. [2].

Активность L-лизин- α -оксидазы определяли по приросту концентрации перекиси водорода в реакционной среде [1] в присутствии субстрата L-лизина при оптимальных температурах и pH среды. Стандартные пробы (2 мл) содержали 1,7 мл раствора ортодианизидина ($1,9 \cdot 10^{-4}$ М) в 0,1 М натрий-фосфатном буфере pH 7,4; 0,2 мл раствора L-лизина ($9 \cdot 10^{-3}$ М); 0,05 мл раствора пероксидазы ($1 \cdot 10^{-5}$ М) и 0,05 мл раствора фермента L-лизин- α -оксидазы. Инкубация — 10 мин. За единицу ферментативной активности принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль перекиси водорода за 1 мин; ферментативную активность определяли спектрофотометрически при 460 нм (СФ-26, СССР). Белок определяли по Лоури, используя в качестве стандарта яичный альбумин. Удельную активность фермента выражали числом единиц активности на 1 мг белка.

Молекулярную массу и гомогенность фермента определяли гель-электрофорезом [15] в присутствии додецилсульфата (ДДС) натрия и меркаптоэтанола. Диссоциацию фермента на субъединицы проводили обработкой исходного раствора фермента 1 % раствором ДДС натрия, содержащим 1 % 2-меркаптоэтанола, при 100 °С в течение 5 мин. Белками-маркерами служили фосфоорилаза В (97,4 кД), альбумин бычий (66,2 кД), овальбумин куриный (43 кД), ингибитор трипсина (21,5 кД) и лизоцим яичного белка (14,4 кД) (все вещества фирмы “Pharmacia”, Швеция).

Результаты и обсуждение. Изучение зависимости сорбции-десорбции L-лизин- α -оксидазы на сорбентах гидрофобного типа фенол- и бутилсилохромах при различных условиях показало, что фенолсилохромы сорбируют фермент очень эффективно, но десорбировать его в активном состоянии не удастся. В то же время на бутилсилохромовых сорбентах как сорбция, так и десорбция осуществляются без заметных инактиваций фермента. Основываясь на этих данных, мы подобрали наиболее выгодные концентрации бутиловых лигандов на 1 г сорбента (около 80 мкмоль/г); были найдены оптимальные условия сорбции, отмывки от примесей с последующей десорбцией

Таблица 1

Хроматография L-лизин- α -оксидазы на бутилсилохроме С-80 (размер частиц 0,2 мм)

№ опыта	Условия сорбции — десорбции			Удельная активность, МЕ/мг	
	0,02 М натрий-фосфатный буфер + сульфат аммония			до сорбции	после сорбции
	сорбция, М	десорбция, М	pH		
1	0,6	0,6	5,6	0,17	1,66
2	0,8	0,8	5,6	0,17	4,11
			5,6	0,38	1,00
3	1,0	—	5,6	3,38	12,30
			7,4	0,12	4,06
5*	1,0	—	6,0	0,78	24,80

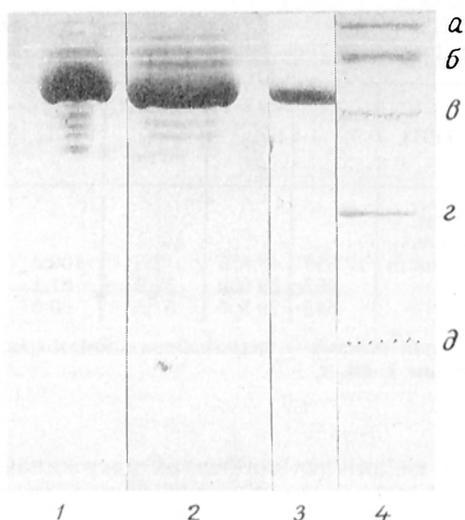
Примечание. * Размер частиц бутилсилохрома 0,1 мм, концентрация бутиловых радикалов около 80 мкмоль/г.

значительно очищенного фермента. В табл. 1 представлены данные по очистке фермента в зависимости от условий сорбции — десорбции. Наилучшие результаты достигаются в случае сорбции фермента из 1 М сульфата аммония в натрий-фосфатном буфере pH 5,6—6,0 с последующей десорбцией после отмывки 0,02 М натрий-фосфатным буфером pH 5,6—6,0. Большое значение имеет также размер частиц сорбента. Наиболее пригодными для наших целей были частицы размером 0,1 мм при концентрации бутиловых лигандов около 80 мкмоль на 1 г сорбента. При концентрации сульфата аммония в растворе меньше 1 М фермент взаимодействует с сорбентом слабо и вымывается этими же растворами, что не обеспечивает желаемой очистки. Лучше всего сорбцию и отмывку фермента от примесей на бутилсилохроме проводить 1,0—1,5 М раствором сульфата аммония в 0,02 М натрий-фосфатном буфере pH 5,6—6,0,

Таблица 2

Хроматография L-лизин- α -оксидазы на бутилсилохроме С-80 (колонка 50×700 мм; 100 г сорбента с размерами частиц 0,1 мм; скорость сорбции центрифугата, насыщенного до 25 % сульфатом аммония, 200 мл/ч, элюции мл/ч, pH 6,0)

№ опыта	Центрифугат			Отмывка примесей 0,02 М натрий-фосфатным буфером, 1,2 М сульфата аммония (1:1)	Элюент		
	объем, мл	содержание белка, мг	удельная активность, МЕ/мг		содержание белка, мг	удельная активность, МЕ/мг	выход по активности, %
1	1070	2 247	1,90	1600	117	34,2	93,8
2	1415	4 952	1,10	2500	191	23,4	80,0
3	3620	19 554	2,50	3500	997	39,8	81,1
4	8000	25 900	0,78	3000	1327	24,8	100,0
5	4420	39 338	1,60	3500	1207	48,7	92,0



Полиакриламид-гель-электрофорез L-лизин- α -оксидазы разных степеней очистки.

Образцы (1—5 мкг) инкубировали при 95 °С 12 мин в 1 % ДДС натрия и 2,5 мМ 2-меркаптоэтанола. Белки-маркеры: а — фосфорилаза (молекулярная масса 97,4 кД), б — альбумин бычий (66,2 кД), в — овалбумин куриный (43 кД), г — ингибитор трипсина (21,5 кД), д — лизоцим яичного белка (4,4 кД). 1 — после хроматографии на бутилсилохроме; 2 — после хроматографии на лизин-сефарозе; 3 — после хроматографии на АН-сефарозе и осаждении сульфатом аммония; 4 — маркерные белки.

а элюцию фермента осуществлять 0,02 М натрий-фосфатным буфером pH 5,8—6,0. В табл. 2 приведены данные, полученные на бутилсилохроме С-80 с использованием ферментных растворов, полученных из разных ферментаций, которые различаются по уровню исходных активностей, и, возможно, по содержанию примесей. Из данных табл. 2 следует, что во всех случаях выход фермента по активности высокий, а значения удельной активности десорбированного фермента практически не зависят от значений удельной активности в исходном растворе.

Электрофорез полученного после хроматографии на бутилсилохроме фермента в полиакриламидном геле в присутствии ДДС натрия и меркаптоэтанола свидетельствует о том, что кроме основной полосы белка с молекулярной массой 60 кД, имеются незначительные примеси с большей и меньшей молекулярной массой (см. рисунок).

Чтобы отделить от L-лизин- α -оксидазы оставшиеся примеси после хроматографии на бутилсилохроме С-80, были исследованы сорбенты, содержащие L-лизин- и гексаметилендиамин в качестве лигандов. Как следует из данных табл. 3, эти сорбенты позволяют получить фермент с высоким выходом и отделить примеси, но из более загрязненных образцов фермента не удается получить высокоочищенный препарат L-лизин- α -оксидазы. Этот вывод подтверждается еще и тем, что

Таблица 3

Сравнительные данные хроматографии L-лизин- α -оксидазы на сорбентах на основе сефарозной матрицы

Наименование сорбента	Характеристика фермента						Выход по активности, %
	до хроматографии			после хроматографии			
	содержание белка, мг	общая активность, МЕ	удельная активность, МЕ/мг	содержание белка, мг	общая активность, МЕ	удельная активность, МЕ/мг	
ε-Лизин-сефароза	32,5	672	20,6	14,4	530,5	36,7	95,6
α-Лизин-сефароза	7,1	70	9,8	2,3	75,1	32,6	100,0
АН-сефароза	18,9	346	18,3	4,1	207,6	50,0	60,0

Таблица 4

Схема очистки L-лизин- α -оксидазы из гриба *Trichoderma* sp.

Стадия очистки	Общий белок, мг	Общая активность, МЕ	Удельная активность, МЕ/мг	Выход по активности, %	Степень очистки
Центрифугат культуральной жидкости	19 554	48 885	2,5	100,0	0
I	997	39 600	39,8	81,1	15,7
II	515	29 300	57,3	60,0	22,7

I стадия очистки — гидрофобная хроматография на бутилсилихроме С-80.

фермент на данных сорбентах удерживается слабо. Нами был разработан метод препаративной очистки фермента (табл. 4). Исходным материалом для разработки препаративного метода получения фермента была культуральная жидкость глубинного культивирования гриба *Trichoderma* sp., которую после фильтрования насыщали до 25 % сульфатом аммония и центрифугировали. На этой стадии очистки отделяются балластные вещества, загрязняющие сорбенты, используемые для хроматографии. Кроме того, насыщенный до 25 % сульфатом аммония центрифугат культуральной жидкости можно использовать для сорбции на бутилсилихроме (I стадия очистки, см. табл. 4).

Центрифугат, насыщенный до 25 % сульфатом аммония (объем 3020 мл с удельной лизиноксидазной активностью 2,5 Е/мг), пропускали со скоростью 200 мл/ч через бутилсилихром С-80 (100 г сорбента, размеры колонки 50×700 мм), уравновешенный 1,2 М сульфатом аммония в 0,02 М натрий фосфатном буфере рН 6,0. После сорбции всего ферментного раствора и промывки колонки уравновешивающим буфером (3500 мл) его заменяли на 0,02 М натрий-фосфатный буфер рН 6,0, уменьшали скорость поступления раствора до 25 мл/ч и продолжали процесс до полного элюирования фермента (объем активных фракций составлял около 120 мл).

II стадия очистки — хроматография на АН-сефарозе. Поскольку при хроматографии на бутилсилихроме очистка фермента не была полной (см. рисунок), дальнейшую очистку продолжали на АН-сефарозе (можно использовать и ЛИС-сефарозы).

Полученный после I стадии очистки ферментный раствор объемом 120 мл диализовали против 0,01 М фосфатного буферного раствора рН 7,4 и наносили на АН-сефарозу (150 г сорбента, колонка 20×300 мм), предварительно уравновешенную 0,01 М фосфатным буферным раствором рН 7,4. После тщательного промывания колонки уравновешивающим буфером, а затем буферным раствором, содержащим нарастающие концентрации хлористого натрия (ОМ — 1,0 М), элюировали с колонки фермент. Фракции с лизин-оксидазной активностью объединяли, насыщали сульфатом аммония до 70 %, центрифугировали, осадок растворяли в 0,02 М натрий-фосфатном буфере, диализовали против того же буфера (рН 7,4) и лиофильно высушивали.

Полученный в результате проведенной очистки фермент L-лизин- α -оксидаза оказался гомоген-

ным по результатам дискэлектрофореза (см. рисунок).

Таким образом, нами был разработан новый препаративный метод выделения и очистки L-лизин- α -оксидазы из *Trichoderma* sp.

ЛИТЕРАТУРА

1. Березов Т. Т., Лукашева Е. В., Смирнова И. П. // Вопр. мед. химии.— 1987.— № 1.— С. 127—132.
2. Березов Т. Т., Хадиев С. Х., Веса В. С. и др. // Всесоюзная конф. «Биосинтез ферментов микроорганизмами», 4-я: Тезисы докладов.— Ташкент, 1988.— С. 39—40.
3. Березов Т. Т., Хадиев С. Х., Глазкова Т. Ю., Юрченко П. Я. // Всесоюзная конф. «Биохимия — медицина»: Тезисы докладов.— Л., 1988.— С. 36—37.
4. Краняускас В. И., Ралис Э. В. // Всесоюзный симпозиум «Инженерная энзимология», 6-я: Материалы.— Вильнюс, 1988.— Ч. 1.— С. 138—139.
5. Краняускас В. И., Ралис Э. В. // Там же.— С. 137—138.
6. Лукашева Е. В., Березов Т. Т. // Прикладная биохимия.— 1988.— № 4.— С. 459—465.
7. Песлякене М. В., Митялене Л. С., Циценене Р. А. // Всесоюзный симпозиум «Инженерная энзимология», 6-я: Материалы.— Вильнюс, 1988.— Ч. 1.— С. 149.
8. Скоупс Р. Методы очистки белков.— М., 1985.
9. Хадиев С. Х., Лукашева Е. В., Смирнова И. П., Березов Т. Т. // Вопр. мед. химии.— 1985.— № 5.— С. 130—134.
10. Хадиев С. Х., Березов Т. Т. // Вопр. питания.— 1987.— № 2.— С. 8—11.
11. Хадиев С. Х., Жукова О. С., Добрынин Я. В. и др. // Бюл. экпер. биол.— 1987.— № 4.— С. 458—460.
12. Хадиев С. Х., Лукашева Е. В., Смирнова И. П. и др. // Вопр. мед. химии.— 1988.— № 4.— С. 97—100.
13. Kusakabe H., Kodama K., Machida H. et al. // *Agricult. Biol. Chem.*— 1979.— Vol. 43, N 2.— P. 337—343.
14. Kusakabe H., Kodama K., Kuninaka A. et al. // *J. biol. Chem.*— 1980.— Vol. 255, N 3.— P. 976—981.
15. Westberg O., Swenson H. // *Acta chem. scand.*— 1966.— Vol. 200.— P. 820—834.

Поступила 23.01.89

A NEW PROCEDURE FOR PURIFICATION OF L-LYSYL- α -OXIDASE FROM *TRICHODERMA* SP

N. F. Laugalene, V. S. Vesa, R. P. Yankjavichene, S. P. Puodzhyle, O. F. Sudzhyvovene, I. I. Peslyakas, S. Kh. Khaduev, T. T. Berezov

Research Industrial Association "Enzyme", Vilnius, Chair of Biochemistry, P. Lumumba People' Friendship University, Moscow

A new procedure is developed for purification of the antitumoral enzyme L-lysyl- α -oxidase from *Trichoderma* sp. The procedure included two steps: hydrophobic chromatography on butyl silochrome C-80 and chromatography using biospecific sorbent AN-Sepharose. The simplified procedure enabled to increase distinctly the specific enzymatic activity from 30 to 50 IU/mg in the preparation obtained with a good yield.

© М. Ш. ПРОМЫСЛОВ, М. Л. ДЕМЧУК, 1990

УДК 616.153.915-39-092.19

М. Ш. Промыслов, М. Л. Демчук

МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММАРНОЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТКИ КРОВИ

Институт нейрохирургии им. Н. П. Бурденко АМН СССР, Москва

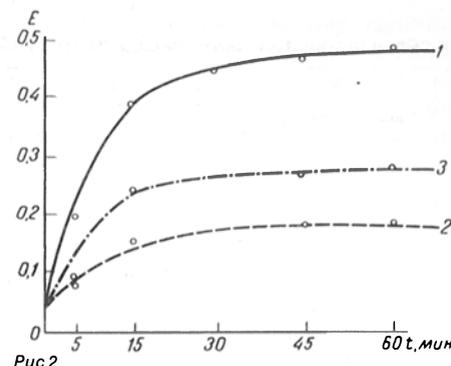
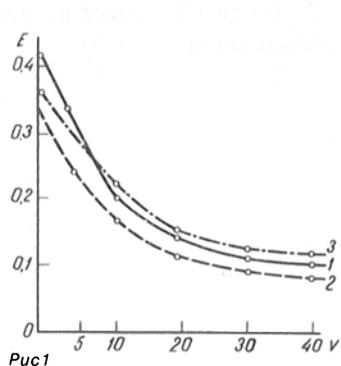
Известен факт активации процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) при различных патологических состояниях [2—5]. При этом общий уровень продуктов ПОЛ определяется соотноше-

Рис. 1. Зависимость торможения накопления ТБК-активных продуктов от объема сыворотки, добавленного в модельную систему.

1 — время инкубации 15 мин; 2 — 30 мин; 3 — 60 мин.

Рис. 2. Зависимость накопления ТБК-активных продуктов от времени инкубации.

1 — модельная система; 2 — модельная система + 20 мкл сыворотки донорской крови; 3 — модельная система + 20 мкл сыворотки крови больного с черепно-мозговой травмой.



нием процессов перекисидации липидов и состоянием систем антиоксидантной защиты организма. В систему антиоксидантной защиты организма входят вещества, различающиеся по механизму ингибирования ПОЛ. Вместе с тем важно оценить суммарную антиоксидантную активность (АОА) исследуемого биологического материала, т. е. способность организма противостоять активации ПОЛ.

Предложен ряд модельных систем для определения суммарной АОА, однако практически все они имеют определенные недостатки. Так, суспензию липосом [8], мембраны эритроцитов [6], гомогенат мозга [7] или суспензию желточных липопротеидов [1] трудно получить в стандартном виде, так как при хранении этих модельных систем начальный уровень продуктов ПОЛ и их собственная АОА постоянно изменяются. Кроме того, материал для модельной системы при каждом его приготовлении имеет разные исходные параметры.

На наш взгляд, наиболее соответствует требованиям опыта методика [7], где в качестве субстрата окисления взята линоленовая кислота. В то же время недостатком такой модельной системы являются неоднородность и малая устойчивость эмульсии этой кислоты в воде, в результате чего получается значительный разброс данных при определении продуктов ПОЛ даже в параллельных опытах.

Методика. Модифицировали указанную систему следующим образом: 10 мкл субстрата окисления (в нашем случае это линоленовая кислота, имеющая 3 сопряженные двойные связи и входящая в состав фосфолипидов мозговой ткани, что делает ее удобной для целей эксперимента) растворили в 1 мл 96 % этанола, и 400 мкл этого раствора по каплям приливали к 100 мл дистиллированной воды. В результате получали однородный опалесцирующий раствор, в котором визуально не определялось наличие капелек линоленовой кислоты. Полученный коллоидный раствор устойчив длительное время.

Эта модельная система использовалась нами в дальнейшем для определения суммарной АОА сыворотки крови. С этой целью в пробирку помещали 0,5 мл исходного раствора, 50 мкл раствора $FeSO_4$ и сыворотку крови в количестве 5—40 мкл. Инкубацию проб проводили при 37 °С при встряхивании 5—120 мин.

Для выбора оптимального режима работы с этой системой были построены кривые концентрационной (рис. 1) и временной (рис. 2) зависимости накопления ТБК-активных продуктов в самой модельной системе (раствор линоленовой кислоты) и в системе с добавлением сыворотки крови. Содержание ТБК-активных продуктов определяли по методу [9].

Результаты и обсуждение. Из анализа полученных данных можно сделать вывод, что время инкубации системы должно выбираться в той области, где кривые временной зависимости выхо-

дят на плато, т. е. АОА исследуемого материала становится постоянной (см. таблицу). Это подтверждается прямым расчетом АОА по формуле:

$$АОА = 1 - \frac{\Delta E_{оп}}{\Delta E_{ст}}$$

где $\Delta E_{оп} = E_{оп}^t - E_{оп}^0$, $\Delta E_{ст} = E_{ст}^t - E_{ст}^0$, $E_{ст}^0$ и $E_{оп}^0$ — экстинкция, измеренная соответственно в модельной системе и в модельной системе с сывороткой крови до инкубации, $E_{оп}^t$ и $E_{ст}^t$ — экстинкция, измеренная в тех же образцах спустя соответствующее время инкубации t .

Как видно из таблицы, время инкубации можно выбрать любое, начиная с 30 мин, после которого АОА исследуемого материала становится постоянной. Из этих же данных следует, что такая закономерность наблюдается при работе с кровью как донора, так и больного с черепно-мозговой травмой, однако АОА сыворотки крови больного существенно снижена по сравнению с таковой у донора.

При фиксированном времени мы определили оптимальное количество сыворотки в опытной пробе. Оказалось, что при работе с 5 мкл сыворотки ввиду большой погрешности в отборе такого малого объема получается определенный разброс величин АОА, а при работе с 30 и 40 мкл сыворотки происходит очень сильное ингибирование окислительного процесса в модельной системе (АОА составляет 80—99 %). По этой причине целесообразно работать с объемами сыворотки в интервале 10—20 мкл, когда показатель АОА достигает 50—80 %. В частности, данные таблицы получены при исследовании АОА в 20 мкл сыворотки крови.

Таким образом, предложенная нами модификация модельной системы имеет ряд преимуществ: для приготовления модельной системы необходимо очень малое количество линоленовой кислоты (10 мкл); кислота постоянно берется одна и та же, что позволяет считать систему стандартной; с помощью этой системы можно определять АОА раз-

АОА сыворотки крови донора и больного с черепно-мозговой травмой в зависимости от времени инкубации

Время инкубации, мин	АОА сыворотки крови, %	
	донора	больного
5	68	9
15	61	41
30	67	47
45	68	47
60	68	48
120	68	47

личных тканей организма. Так, при определении АОО в полушариях, стволе и мозжечке мозга кроликов нами получены следующие данные: полушария — 83,5 %, ствол — 81 %, мозжечок — 72 %; результаты параллельных опытов имеют высокое сходство.

ЛИТЕРАТУРА

1. Клебанов Г. И., Бабенкова И. В., Теселкин Ю. О. и др. // Лаб. дело.— 1988.— № 5.— С. 59—62.
2. Кучеряну В. Г., Атаджанов М. А., Никушкин Е. В. и др. // Бюл. exper. биол.— 1989.— № 1.— С. 39—41.
3. Логинов А. С., Джалалов К. Д., Ерин А. Н., Прилипка Л. Л. // Там же.— 1986.— № 1.— С. 26—28.
4. Никушкин Е. В., Крыжановский Г. Н. // Пат. физиол.— 1987.— № 6.— С. 19—24.
5. Осипович В. К., Тушикова З. А., Матвеевко А. В. и др. // Вопр. мед. химии.— 1988.— № 5.— С. 62—66.

6. Спектор Е. Б., Ананенко А. А., Политова Л. И. // Лаб. дело.— 1984.— № 1.— С. 26—28.
7. Al-Tinimi D. L., Dormandy T. L. // Biochem. J.— 1977.— Vol. 168, N 2.— P. 283—288.
8. Gutteridge J. M., Richmond R. // FEBS Lett.— 1980.— Vol. 112.— P. 269—272.
9. Omhawa H., Chishi N., Jagi K. // Analyt. Biochem.— 1979.— Vol. 95.— P. 351—358.

Поступила 11.07.89

A MODIFIED PROCEDURE FOR ESTIMATION OF TOTAL ANTIOXIDANT ACTIVITY OF BLOOD SERUM

M. Sh. Promyslov, M. L. Demtchuk

N. N. Burdenko Institute of Neurosurgery, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

A modified procedure is described for estimation of total antioxidant activity in blood serum; linolenic acid was used as a substrate of oxidation.

ЮБИЛЕЙ

В. Б. СПИРИЧЕВУ — 60 ЛЕТ



В 1990 г. исполняется 60 лет со дня рождения и 35 лет научно-исследовательской и общественной деятельности известного советского ученого в области витаминологии доктора биологических наук, профессора, руководителя отдела витаминологии и витаминизации пищевых продуктов Института питания АМН СССР Владимира Борисовича Спиричева.

Являясь признанным ведущим специалистом и руководителем исследований в витаминологии, В. Б. Спиричев всю свою энергию, талант и знания вкладывает в изучение биохимических механизмов действия витаминов. Основными направлениями научной и практической деятельности В. Б. Спиричева являются: изучение метаболической роли, обмена и механизма действия витаминов как основы их рационального профилактического и лечебного применения, развитие биохимических методов оценки витаминной обеспеченности человека и внедрение их в практику широких гигиенических исследований, обоснование и проведение крупномасштабных мероприятий по повышению обеспеченности витаминами различных групп населения СССР.

Исследования В. Б. Спиричева по раскрытию механизмов взаимодействия витаминов и минеральных веществ, в особенности витамина D и кальция, являются классическими и свидетельствуют о широте и многообразии интересов

В. Б. Спиричева как ученого. Им предложена оригинальная научная концепция о роли свободно-радикальных превращений витамина D и индуцированных им процессов перекисной деструкции мембранных липидов в патогенезе D-гипервитаминоза, обосновано использование антиоксидантов, витамина E и селена в комплексной терапии этой интоксикации, разработаны и внедрены в практику методы дифференциальной диагностики D-гипервитаминоза. В. Б. Спиричевым экспериментально доказано выдвинутое им предположение о важной роли в патогенезе рахита временной неполноценности ферментных и транспортных систем, участвующих в обмене витамина D и поддержании гомеостаза кальция.

Обширные исследования, выполненные В. Б. Спиричевым и его сотрудниками, по изучению действия и биологической активности витамина D и его метаболитов, привели к созданию двух новых отечественных и высокоактивных витаминных препаратов «Оксидевит» и «Диоксидевит» и обоснованию их применения для коррекции нарушений фосфорно-кальциевого обмена при врожденных рахитоподобных заболеваниях, хронической почечной недостаточности, гипокнезии и других патологиях.

В результате обобщения материалов собственных исследований и данных литературы В. Б. Спиричевым разработано представление о врожденных нарушениях обмена витаминов как особой группе генетически обусловленных болезней обмена веществ, им предложена классификация этих заболеваний, методов их диагностики и лечения. Результаты этих исследований нашли отражение в монографии «Врожденные нарушения обмена витаминов».

Весьма важный вклад внесен В. Б. Спиричевым в изучение биохимических механизмов всасывания кальция и фосфора и метаболических последствий их несбалансированного потребления. Результаты этих исследований, выполненных под руководством В. Б. Спиричева, легли в основу предложений по оптимизации соотношения указанных элементов в рационе, снижению рекомендуемых величин потребления фосфора, разработке и использованию рационов и продуктов питания со сниженным содержанием фосфора в профилактическом и лечебном питании при хронической почечной недостаточности, гиперкортицизме и ряде других заболеваний.

Широкое признание в нашей стране и за рубежом получили исследования В. Б. Спиричева о роли алиментарных факторов в регуляции процессов перекисного окисления липидов. На основании результатов исследований было сформулировано представление об антиоксидантном статусе организма как динамическом соотношении между факторами, усиливающими окисление липидов, и системой антиоксидантной защиты организма, высказано предположение о роли перекисного окисления липидов в атеросклерозе.

Постоянный интерес, проявляемый В. Б. Спиричевым к вопросам нутрициологии, прежде всего витаминологии, позволил ему превратить возглавляемый им отдел в Институте питания АМН СССР в своеобразный центр исследований