

ТОМ 36

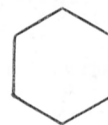
ВЫПУСК 5

СЕНТЯБРЬ — ОКТЯБРЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

# ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



## 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

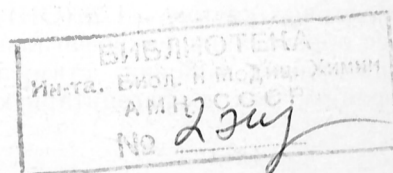
## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

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)



МОСКВА · МЕДИЦИНА · 1990



К. Д. Плещитый

**АКТИВНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ ВИТАМИНА D  
КАК РЕГУЛЯТОРЫ ПРОЦЕССОВ ПРОЛИФЕ-  
РАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК  
МОНОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО РЯДА  
(ОБЗОР)**Институт общей патологии и патологической физиологии  
АМН СССР, Москва

Вскоре после разработки в конце 70-х годов концепции о гормональной системе витамина D, опосредующего свои биологические эффекты с помощью активных метаболитов, стали накапливаться данные о том, что роль этих метаболитов не сводится к участию в регуляции кальциевого обмена. Наиболее активный метаболит витамина D<sub>3</sub> — 1,25-дигидроксивитамин D<sub>3</sub> [1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] является мощным регулятором функций активированных Т- и В-лимфоцитов [2]. Представляют интерес данные о влиянии метаболитов витамина D на пролиферацию, дифференцировку и функциональную активность клеток моноцитарно-макрофагального ряда, находящихся на разных стадиях созревания. Имеются сообщения о свойстве некоторых метаболитов витамина D, в первую очередь 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, оказывать нормализующее действие на фенотипические и функциональные особенности некоторых типов лейкозных клеток, что в перспективе могло бы иметь значение для терапии некоторых форм лейкозов [12, 16, 23]. В настоящем обзоре рассматриваются материалы о влиянии активных метаболитов витамина D на петрансформированные (интактные) зрелые клетки моноцитарно-макрофагального ряда и на их предшественники.

По современным представлениям к моноцитарно-макрофагальной системе относится линия костномозговых клеток, поступающих в кровь, а затем и в ткани. Эта система включает в себя монобласты, промоноциты и моноциты в костном мозге, моноциты в периферической крови и макрофаги в тканях. Моноциты/макрофаги являются ведущими клетками системы моноядерных фагоцитов.

В ряде исследований были использованы клетки костного мозга человека, крысы и мыши. Так, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> стимулировал рост и дифференцировку полипотентных костномозговых клеток человека, увеличивал число макрофагальных колоний и стимулировал дифференцировку клеток этого ряда, тогда как число гранулоцитарных колоний уменьшалось [26]. Сходные данные были получены при использовании крысиных костномозговых клеток — 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> усиливал процесс образования макрофагальных (но не гранулоцитарных) колоний, стимулируя как пролиферацию, так и фагоцитарную активность мо-

нонуклеаров [37]. Эти данные в основном были позднее подтверждены [14]. В работе [24] показано, что под влиянием 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> усиливались адгезивные свойства человеческих костномозговых моноцитов/макрофагов, более чем в 3 раза возрастало число клеток, дающих позитивную реакцию на α-нафтилацетатэстеразу, увеличивалось также количество клеток, несущих дифференцировочные моноцитарно-макрофагальные антигены. Некоторые фторированные аналоги 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> гораздо более интенсивно, чем сам 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> стимулируют процесс образования моноцитарно-макрофагальных колоний [21]. Имеются данные, что 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> тормозит колониюобразование костномозговых клеток мыши вне зависимости от присутствия в культуре колониестимулирующего фактора [9].

Определенный интерес представляют данные о влиянии 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> на клетки костного мозга в условиях дефицита витамина D, вызванного различными причинами. Так, клетки костного мозга детей с витамин D-зависимым рахитом типа II, как и следовало ожидать, оказались нечувствительными к действию 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> [25]. При воспроизведении дефицита витамина D у крыс в костях уменьшалось содержание макрофагоподобных клеток и остеокластов. Супернатант, полученный при культивировании костномозговых клеток D-авитаминозных крыс, не обладал свойствами способствовать дифференцировке костномозговых клеток как интактных крыс, так и тем более животных с дефицитом витамина D. Но супернатант костномозговых клеток интактных крыс активно стимулировал пролиферацию макрофагов [27].

Помимо костномозговых клеток, в экспериментах широко используют моноциты периферической крови и тканевые макрофаги. В экспериментах с использованием моноцитов показано, что при культивировании этих клеток в присутствии 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> происходит торможение их дифференцировки в зрелые макрофаги и дендритные клетки, что было установлено с применением моноклональных антител к соответствующим клеточным дифференцировочным антигенам [31]. Учитывая данные о совместном действии на клетки различных типов 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> и интерферона-γ (ИФН-γ), представляло интерес то обстоятельство, что ИФН-γ, подобно 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, уменьшал число макрофагов, но в 1,5 раза увеличивал число дендритных клеток. Непосредственное отношение к этим данным могут иметь материалы о том, что 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> вызывает *in vitro* пролиферацию моноцитов [28]. Вполне возможно, что выявленное в работе [31] уменьшение числа макрофагов и дендритных клеток под влиянием культивирования с 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> обусловлено тем, что моноциты активно пролиферируют. Это обстоятельство не способствует их одновременной дифференцировке в макрофаги и дендритные клетки.

Показано, что при использовании мышинных альвеолярных макрофагов под влиянием



1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> происходит их слияние в гигантские многоядерные клетки, причем 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> стимулирует этот процесс как прямо, будучи внесен в культуру макрофагов, так и опосредованно: слияние макрофагов стимулирует супернатант, полученный при культивировании интактных спленоцитов в присутствии 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> [5]. Прямое стимулирующее действие 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> на процесс слияния макрофагов не зависит от присутствия Т-лимфоцитов и связано с процессами синтеза РНК и белка, но не ДНК [38].

Помимо сведений о влиянии 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> на процессы пролиферации и дифференцировки моноцитов/макрофагов, следует обсудить и данные об изменениях различных функциональных свойств этих клеток под влиянием указанного метаболита. Человеческие моноциты реагируют на контакт с 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> усиленной продукцией перекиси водорода; аналогичным был эффект ИФН-γ, однако совместно эти агенты не оказывали на продукцию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> взаимопотенцирующего действия [10]. Аналогичное действие 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> оказывал на мышиные перитонеальные макрофаги [15]. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> стимулировал не только спонтанную секрецию перекиси водорода, но и потенцировал этот процесс, индуцированный форболмиристатацетатом [16]. Наряду с выбросом H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, применение 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> приводит к активации лизосомальных ферментов человеческих моноцитов [33]. Механизм этого явления становится ясным в свете данных о том, что витамин D является лабильзатором лизосомальных мембран [4]. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> повышает также адгезивные свойства человеческих моноцитов, причем этот эффект отменяется с помощью ингибиторов синтеза белков [29]. С помощью 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> удается оказывать модулирующее влияние на развитие так называемого «теплого шока» моноцитов, при котором моноциты на повышение температуры культуральной среды реагируют снижением синтеза собственных белков и активной продукцией специфического белка «теплого шока». Преинкубация клеток в этих условиях с 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> отчасти предотвращает снижение активности синтеза собственных белков и стимулирует синтез белка «теплого шока», причем этот эффект реализуется на уровне мРНК [30]. В опытах с использованием мышиных альвеолярных макрофагов под влиянием 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> происходило дозозависимое усиление экспрессии Fc-рецепторов, увеличение потребления клетками глюкозы и усиление цитотоксических свойств макрофагов в отношении опухолевых клеток-мишеней [6].

Было изучено влияние 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> на функционирование внутриклеточных бактерицидных механизмов моноцитов человека. Показано, что моноциты, прекультивированные с 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> и зараженные *Mycobacterium tuberculosis*, приобретали способность тормозить пролиферацию микобактерий. При этом ИФН-γ также подавлял процесс пролиферации и потенцировал этот эффект 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Оба агента стимулировали процесс восстановления нитросинего тетразолия (тест для определения бактерицидной активности), причем ИФН-γ усиливал действие метаболита витамина D [35]. Помимо этого, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> обладает свойством усиливать продукцию моноцитами фак-

тора некроза опухоли — агента, оказывающего токсическое действие в отношении некоторых видов простейших и бактерий [36]. Бактериостатический эффект 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> в отношении *M. tuberculosis* проявлялся также и в том случае, когда метаболит вносили в среду даже 3 дня спустя после заражения клеток микобактериями. В некоторых сериях экспериментов наблюдали полное торможение размножения микобактерий. При этом требовалась более высокая концентрация 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, чем та, которая в норме регистрируется в циркуляции у человека, но, по мнению авторов, выполнивших это исследование [11], подобное повышение уровня 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> *in vivo* при туберкулезе может быть достигнуто за счет превращения 25 гидроксивитамина D<sub>3</sub> (предшественника 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) в 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, происходящего в клетках туберкулезных гранул. В этой связи следует отметить, что в норме процесс гидроксирования 25-гидроксивитамина D<sub>3</sub> происходит в почках, однако при некоторых условиях способность реализовывать подобную реакцию приобретают клетки моноцитарно-макрофагальной системы. *In vitro* показано, что ИФН-γ способствует продукции 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> человеческими альвеолярными и костномозговыми макрофагами [22, 34]. В клинике подобные эффекты описаны при саркоидозе и перитоните [18, 20]. При перитоните способность продуцировать 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> приобретали перитонеальные макрофаги, т. е. клетки, находящиеся в очаге воспаления. При саркоидозе активированные Т-хелперы в легких продуцируют ИФН [7], стимулирующий выделение макрофагами 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> [22]. Таким образом, при некоторых ситуациях возможно локальное повышение концентрации 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, что может иметь выраженный защитный характер — при саркоидозе усиливать и ускорять дифференцировку клеток — предшественников моноцитов/макрофагов, при туберкулезе подавлять размножение микобактерий и также ускорять созревание альвеолярных макрофагов, при перитоните, активируя макрофаги, способствовать очистке очага воспаления и т. д.

Для понимания особенностей действия 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> на моноциты/макрофаги представляют интерес данные о том, что этот активный метаболит витамина D стимулирует продукцию моноцитами крови человека и мышиным макрофагоподобным клоном клеток интерлейкина-1 [8, 19], цитокина, который наряду с другими своими свойствами обладает способностью оказывать стимулирующее воздействие на стволовые клетки и активировать цитотоксические свойства моноцитов [1]. Таким образом, есть все основания предполагать, что подобные эффекты, возникающие под влиянием контакта с 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, могут быть опосредованы с помощью интерлейкина-1, продукция которого под влиянием 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> усиливается.

Очевидно, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> оказывает избирательное воздействие на клетки моноцитарно-макрофагальной системы на разных этапах их развития: способствует дифференцировке стволовых клеток и частично коммитированных клеток-предшественников в направлении моноцитов/макрофагов, активирует зрелые моноциты/макрофаги

и усиливает их эффекторные свойства. Механизмы реализации этих эффектов  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  до конца неясны, однако есть все основания предполагать вовлеченность в эти процессы клеточных рецепторов  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . В отличие от лимфоцитов, которые в норме лишены рецепторов и нечувствительны к действию  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , а приобретают чувствительность только после их активации, сопровождающейся экспрессией рецепторов [2], клетки моноцитарно-макрофагальной системы изначально обладают этими рецепторами [16, 32].  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  взаимодействует с клеточными рецепторами [3, 17]. Обнаруживаемые гормонрецепторные комплексы в клетке связаны с хроматином, следствием чего является избирательная стимуляция процесса транскрипции ДНК, приводящая к биосинтезу новых молекул мРНК и трансляции соответствующих белков, участвующих в гормональном ответе [17]. До сих пор в эту схему полностью укладывались пути реализации основных биологических эффектов  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  и нет никаких оснований считать, что в случае с моноцитами/макрофагами этот путь реализации действия  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  не является основным и ведущим. В то же время в условиях *in vivo* включаются дополнительные факторы, связанные с процессами взаимодействия между разными типами клеток, различные нейрогуморальные реакции (например, продуцируемый моноцитами/макрофагами под влиянием  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  интерлейкин-1 может оказывать непосредственное воздействие на гипоталамус [1]).

Что касается влияния других, отличающихся от  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , активных метаболитов витамина D на процессы пролиферации и дифференцировки моноцитов/макрофагов и на функциональную активность этих клеток, то такие работы единичны и результаты их, как правило, коррелируют с результатами исследований, выполненных на активированных лимфоцитах [2], — биологические эффекты метаболитов находятся в прямой зависимости от степени их родства к рецептору  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , и поэтому они на один или несколько порядков слабее соответствующих эффектов  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . [5, 19].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Козлов В. А., Громыкина Н. Ю. // Иммунология. — 1987. — № 4. — С. 24—30.
2. Плещинский К. Д. // Вопр. мед. химии. — 1988. — № 5. — С. 9—14.
3. Спиричев В. Б. // Вестн. АМН СССР. — 1986. — № 11. — С. 84—90.
4. Спиричев В. Б., Конь И. Я. // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева. — 1978. — Т. 23, № 4. — С. 425—434.
5. Abe E., Miyaura O., Tanaka H. et al. // Proc. natl. Acad. Sci. USA. — 1983. — Vol. 80. — P. 5583—5587.
6. Abe E., Shiina Y., Miyaura C. et al. // Ibid. — 1984. — Vol. 81. — P. 7112—7116.
7. Adams J. S., Sharma O. P., Gacad M. A. et al. // J. clin. Invest. — 1983. — Vol. 72. — P. 1856—1860.
8. Bhalla A. K., Amento E. P., Krane S. M. // Cell. Immunol. — 1986. — Vol. 98. — P. 311—322.
9. Clohisy D. R., Bar-Shavit Z., Chappel J. C. et al. // J. biol. Chem. — 1987. — Vol. 262. — P. 15922—15929.
10. Cohen M. S., Mesler D. E., Shipes R. G. et al. // J. Immunol. — 1986. — Vol. 136. — P. 1049—1053.
11. Crowle A. J., Ross E. J., May M. H. // Infect. Immun. — 1987. — Vol. 55. — P. 2945—2950.
12. Daniel C. P., Parreira A., Goldman J. M. et al. // Leuk. Res. — 1987. — Vol. 11. — P. 191—196.

13. Eriksen E. F., Nielsen H. K., Mosekilde L. et al. // Scand. J. Immunol. — 1986. — Vol. 24. — P. 171—177.
14. Fabian I., Kletter Y., Bleiberg I. // Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.). — 1987. — Vol. 185. — P. 434—440.
15. Gluck W. L., Weinberg J. B. // J. Leukocyte Biol. — 1987. — Vol. 42. — P. 498—503.
16. Gray T. K., Cohen M. S. // Surv. Immunol. Res. — 1985. — Vol. 4. — P. 200—212.
17. Haussler M. R. // Ann. Rev. Nutr. — 1986. — Vol. 6. — P. 527—562.
18. Hayes M. E., O'Donoghue D. J., Ballardie F. W. et al. // FEBS Lett. — 1987. — Vol. 220. — P. 307—310.
19. Hodler B., Evequoz V., Trechsel U. et al. // Immunobiology. — 1985. — Vol. 170. — P. 256—259.
20. Insogna K. L., Dreyer B. E., Mitnick M. et al. // J. clin. Endocr. Metab. — 1988. — Vol. 66. — P. 72—75.
21. Koefler H. P., Amatruda T., Ikekawa N. et al. // Cancer Res. — 1984. — Vol. 44. — P. 5624—5628.
22. Koefler H. P., Reichel H., Bishop J. E. et al. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1985. — Vol. 127. — P. 596—603.
23. Lee Y., Dunlap B. E., Mellon W. S. // Biochem. Pharmacol. — 1987. — Vol. 36. — P. 3893—3901.
24. McCarthy D. M., San Miguel J. F., Freake H. C. et al. // Leuk. Res. — 1983. — Vol. 7. — P. 51—55.
25. Nagler A., Merchav S., Fabian I. et al. // Brit. J. Haemat. — 1987. — Vol. 67. — P. 267—271.
26. Nagler A., Riklis I., Kletter Y. et al. // Exp. Hemat. — 1986. — Vol. 14. — P. 60—65.
27. Nakamura T., Araki K., Kanda S. et al. // Calcif. Tissue int. — 1986. — Vol. 38. — P. 33—37.
28. Ohta M., Okabe T., Ozawa K. et al. // FEBS Lett. — 1985. — Vol. 185. — P. 9—13.
29. Polla B. S., Healy A. M., Amento E. P. et al. // J. clin. Invest. — 1986. — Vol. 77. — P. 1332—1339.
30. Polla B. S., Healy A. M., Wojno W. C. et al. // Amer. J. Physiol. — 1987. — Vol. 252. — P. C640—C649.
31. Poulter L. W., Rook G. A., Steele J. et al. // Infect. Immunol. — 1987. — Vol. 55. — P. 2017—2020.
32. Provvedini D. M., Tsoukas C. D., Deftos L. J. et al. // Science. — 1983. — Vol. 221. — P. 1182—1183.
33. Provvedini D. M., Deftos L. J., Manolagas S. C. // Bone. — 1986. — Vol. 7. — P. 23—28.
34. Reichel H., Koefler H. P., Norman A. W. // J. biol. Chem. — 1989. — Vol. 262. — P. 10931—10937.
35. Rook G. A. W., Steele J., Fraher L. et al. // Immunology. — 1986. — Vol. 57. — P. 159—163.
36. Rook G. A. W., Taverne J., Levelon C. et al. // Ibid. — 1987. — Vol. 62. — P. 229—234.
37. Shezen E., Goldman R. // J. Leukocyte Biol. — 1987. — Vol. 41. — P. 264—272.
38. Tanaka H., Hayashi T., Shiina Y. et al. // FEBS Lett. — 1984. — Vol. 171. — P. 61—65.

Поступила 28.04.89

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 615.355:577.152.2].015.154].07

Л. К. Горячева, М. Л. Медведев, Г. В. Самсонов,  
Р. Б. Пономарева

## ГЕТЕРООЛИГОПРОТЕИНЫ, ВКЛЮЧАЮЩИЕ ПАНКРЕАТИЧЕСКУЮ РИБОНУКЛЕАЗУ, — ФЕРМЕНТНЫЕ КОНЬЮГАТЫ ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ

Институт высокомолекулярных соединений АН СССР, ВМА им. С. М. Кирова, Ленинград

Создание полимерных форм физиологически активных веществ, оказывающих существенно пролонгированное действие в организме человека и животных, встречает ряд затруднений. Водорастворимые полимеры-носители, а также полученные на их основе конъюгаты физиологически активных веществ выводятся из кровяного русла или в ограниченные периоды времени при молекулярной массе (ММ), не превышающей

$15 \cdot 10^3$ — $30 \cdot 10^3$ , или аккумулируются в организме и не выводятся длительное время при ММ препаратов больше  $10^5$ . Например, поливинилпирролидон с ММ меньше  $25 \cdot 10^3$  выводится из организма за несколько дней, с ММ  $25 \cdot 10^3$ — $110 \cdot 10^3$ —за несколько недель. При ММ больше  $110 \cdot 10^3$  этот полимер в основном откладывается в клетках ретикулоэндотелиальной системы [9]. Новый подход к синтезу биосовместимых, биodeградируемых полимеров пролонгированного действия состоит в получении продуктов поликонденсации белков [2, 3, 7] и синтезе гетероолигопротеинов на их основе путем совместной конденсации белков-носителей и ферментов [1, 8, 10, 11]. Вместе с тем массивное введение олигопротеина—продукта конденсации гемоглобина с высокой ММ—создает систему с временем полувыведения 16 ч [4]. Можно было предположить, что при введении ограниченного количества гетероолигопротеинов, содержащих ферменты, концентрация и терапевтическая активность полимерного конъюгата в организме может поддерживаться значительно более длительное время. В данной работе на основе синтеза гетероолигопротеина, включающего панкреатическую рибонуклеазу, была исследована продолжительность функционирования конъюгата сывороточного альбумина и панкреатической рибонуклеазы в кровяном русле животного при внутривенном введении.

**Методика.** Синтез конъюгата сывороточного альбумина и панкреатической рибонуклеазы осуществляли реакцией поликонденсации в присутствии сшивающего реагента—глутарового альдегида, предварительно очищенного перегонкой под вакуумом от обычных продуктов превращения. Использовали сывороточный альбумин человека производства ЛНИИЭМ им. Пастера (ММ 68 000) и панкреатическую рибонуклеазу Ленинградского завода медпрепаратов (ММ 13 700). При молярном соотношении сывороточный альбумин:рибонуклеаза: глутаровый альдегид 2:1:40 получили гетероконъюгат. Величины среднемассовой ( $M_w$ ) и среднечисленной ( $M_n$ ) ММ были рассчитаны по данным молекулярно-массового распределения, полученного методом гель-проникающей хроматографии на колонке с сефарозой 6В (рис. 1) по методу [2].  $M_w$  равна 175 000,  $M_n$ —115 000, степень полидисперсности продукта—1,5. Препарат вводили однократно в красную вену уха кролика в расчете на рибонуклеазу 0,5 мг на 1 кг массы животного (масса кролика ~3 кг, в опыте использовали 3 кроликов). Для сравне-

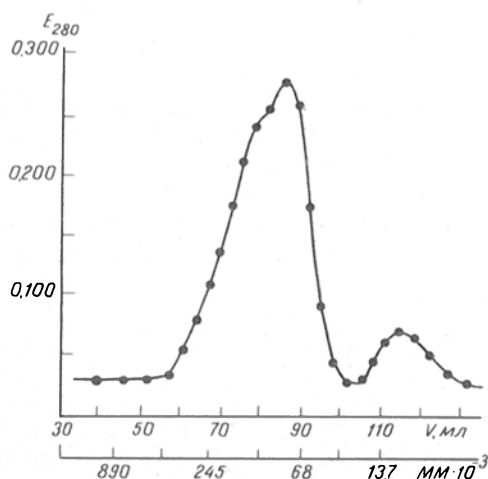


Рис. 1. Профиль элюирования с колонки (сефароза 6В) продуктов реакции конденсации рибонуклеазы с сывороточным альбумином.

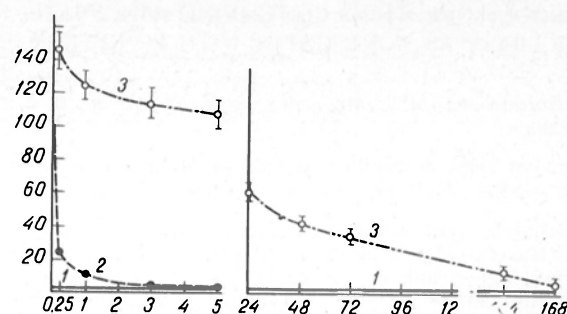


Рис. 2. Активность внутривенно введенной рибонуклеазы в сыворотке крови кролика.

1—активность рибонуклеазы до введения препаратов; 2—введение нативной рибонуклеазы; 3—введение рибонуклеазы, конъюгированной с сывороточным альбумином. По оси абсцисс—время после инъекции (в ч); по оси ординат—активность фермента (в % от активности введенной нативной рибонуклеазы).

ния продолжительности циркулирования модифицированной рибонуклеазы в кровяном русле исследовали выведение из крови животного нативного фермента, в такой же дозе вводимого внутривенно кролику (использовали 1 кролика). Изменение активности рибонуклеазы в сыворотке крови определяли в течение 7 сут методом [10].

**Результаты и обсуждение.** Кривая выведения конъюгата рибонуклеазы из кровяного русла приведена на рис. 2. Время полувыведения составляет примерно 36 ч, что соответствует увеличению времени полувыведения в 200 раз по сравнению с выведением нативной рибонуклеазы, для которой эта величина составляет 10 мин.

Интересным результатом является медленное падение активности рибонуклеазы в крови интактных животных после времени полувыведения. Однократное введение в начальный момент времени одной терапевтической дозы конъюгата (0,5 мг/кг) позволяет поддерживать в крови животного активность, соответствующую терапевтической, в течение 2—3 сут, в то время как введенная доза нативной рибонуклеазы создает необходимую активность в течение 1—2 ч [5].

Таким образом, установлено, что препарат рибонуклеазы, конъюгированной с сывороточным альбумином, характеризуется существенно пролонгированным действием *in vivo* в сравнении с нативным ферментом.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Кольцова С. В., Кузнецова Н. П., Илларионова Н. Г. и др. // Всесоюзный симпозиум «Синтетические полимеры медицинского назначения, 6-й: Тезисы докладов.— Алма-Ата, 1983.— С. 104.
2. Кузнецова Н. П., Самсонов Г. В. // Высокомолекул. соедин.— (А).— 1985.— Т. 27, № 12.— С. 2611—2614.
3. Кузнецова Н. П., Самсонов Г. В. // Там же.— 1986.— Т. 28, № 3.— С. 643—648.
4. Самсонов Г. В., Шерба М. М., Богомолова Л. Г. // Докл. АН СССР. 1979.— Т. 248, № 1.— С. 254—256.
5. Сичко Ж. В., Клиорин А. И. // Воен.-мед. журн.— 1983.— № 10.— С. 29—32.
6. Anfinsen C. B., Redfield R. R., Choate W. Z. et al. // J. biol. Chem.— 1954.— Vol. 207.— P. 201—210.
7. Bartholeyns Y., Moore S. // Science.— 1974.— Vol. 186, N 4162.— P. 444—445.
8. Paillot B., Remy M. H., Thomas D., Broun G. // Path. Biol.— 1974.— Vol. 22, N 6.— P. 491—495.
9. Pitha J. // Targeted Drugs / Ed. E. P. Goldberg.— New York, 1983.— P. 113—126.
10. Poznansky M. J. // Appl. Biochem. Biotechnol.— 1984.— Vol. 10.— P. 41—56.
11. Poznansky M. J., Bhardwaj D. // Biochem. J.— 1981.— Vol. 196, N 1.— P. 89—93.

Поступила 18.10.89

Conjugates containing blood serum albumin and pancreatic ribonuclease, produced by means of polycondensation reaction, exhibited higher half-life in rabbit circulation as compared with non-modified enzyme. Presence of the protein-carrier contributed to elevation of the ribonuclease therapeutic efficiency and enabled to decrease the quantity of injections.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.127-005.4-092.9-092-07

З. П. Мартинкус, Л. Л. Иванов, А. В. Лекис, Л. Ю. Лукошвичюс, А. К. Прашкявичюс

# ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ АМИНОАЦИЛ-тРНК-СИНТЕАЗ С ПОЛИРИБОСОМАМИ

Каунасский медицинский институт

В процессе биосинтеза белков исключительно важную функцию выполняют аминоксил-тРНК-синтетазы (АРСаза; КФ 6.1.1), катализирующие строго специфичное аминокислотирование тРНК [3]. Значительная часть АРСаз в экстрактах эукариотических клеток обнаруживается в ассоциированном с полирибосомами состоянии [7, 12, 13, 17]. Вопрос о биологическом значении взаимодействия АРСаз с рибосомами все еще окончательно не решен. Есть данные, что добавление рибосом стимулирует активность эукариотических АРСаз [10, 11]. Показано, что некоторые АРСазы в комплексе с рибосомами более устойчивы к тепловой инактивации, чем в свободном состоянии [8, 17].

Ранее мы установили, что при экспериментальной ишемии миокарда (ЭИМ) в печени кроликов снижается уровень биосинтеза белка [4]. Как оказалось, угнетение белоксинтезирующей функции печени при ЭИМ связано с уменьшением доли мембранно-связанных рибосом в общем пуле полирибосом печени [5], со снижением акцеп-

торной активности тРНК [6], а также с изменением активности некоторых цитоплазматических АРСаз [2, 6]. В данной работе проведено изучение свойств АРСаз, ассоциированных с полирибосомами, в норме и через 12 ч после воспроизведения ЭИМ.

**Методика.** Для экспериментов использовали кроликов-самцов массой 2,5—3,5 кг.

**Воспроизведение экспериментальной ишемии миокарда.** ЭИМ воспроизводили наложением лигатуры на переднюю нисходящую ветвь левой венечной артерии сердца кролика. Техника проведения операции описана ранее [15].

**Получение полирибосом.** Печень гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в двух объемах буфера А (0,02 М трис-НСl, рН 7,5, 0,03 М КСl, 0,002 М MgCl<sub>2</sub>, 0,25 М сахароза, 0,1 мМ дитиотреитол, 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторид). Гомогенат центрифугировали при 12 000 об/мин в течение 15 мин в роторе (6×25 мл) на центрифуге К-24 («Janetzki», ГДР) для удаления обрывков клеток, ядер и митохондрий. Надосадочную жидкость фильтровали через 4 слоя стерильной марли, в течение 20 мин обрабатывали раствором, содержащим тритон X-100 (конечная концентрация 2 %) и дезоксихолат натрия (1,3 %), насливали на 1 М сахарозу и центрифугировали при 47 000 об/мин в течение 2 ч в роторе Т-50 на центрифуге УЦП-65. Полученные осадки полирибосом суспендировали в буфере А, осветляли центрифугированием при 10 000 об/мин в течение 15 мин.

АРСаза отмывали от рибосом 0,05 М трис-НСl-буфером, (рН 7,6), содержащим 0,5 М КСl, 0,01 М MgCl<sub>2</sub> и 0,25 М сахарозу. Реассоциацию АРСаз и рибосом проводили после предварительного диализа в 0,05 М трис-НСl-буфере (рН 7,5), содержащем 0,01 М MgCl<sub>2</sub>, 0,25 М сахарозу, 0,1 мМ дитиотреитол, 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторид, инкубацией в течение 1 ч при 4 °С в соотношении по белку 1:6 соответственно.

**Определение активности АРСаз.** Активность АРСаз определяли по начальной скорости реакции аминокислотирования тРНК при насыщающих концентрациях субстратов. Состав реакционной смеси описан в работе [6]. Термоинактивацию АРСаз получали при 42 °С по методу, предложенному в работе [9].

**Результаты и обсуждение.** В табл. 1 приведены данные изучения аминоксил-тРНК-синтетазных активностей, обнаруженных во фракции полирибосом печени кроликов, в норме и через 12 ч после воспроизведения ЭИМ. Полученные результаты свидетельствуют об уменьшении при экспериментальной ишемии аргинил-, глутамил-, лизил-, и треонил-РНК-синтетазных активностей, ассоциированных с полирибосомами. Изолейцил-, лейцил-, фенилаланил- и валил-тРНК-синтетазные активности при ЭИМ практически не изменяются. Аналогичные изменения аминоксил-тРНК-синтетазных активностей наблюдаются во фракции бел-

Таблица 1

Аминоксил-тРНК-синтетазные активности, ассоциированные с полирибосомами печени кроликов и освобожденные от полирибосом, в норме (контроль) и при 12 ч ЭИМ ( $M \pm m$ ;  $n=6-8$ )

Аминокислотная специфичность АРСазы	Аминоксил-тРНК-синтетазные активности					
	в комплексе с полирибосомами, пмоль аминоксил-тРНК на 1 мг белка полирибосом за 1 мин		в комплексе с полирибосомами, пмоль аминоксил-тРНК на 1 мг белка АРСаз за 1 мин		освобожденные от полирибосом, пмоль аминоксил-тРНК на 1 мг белка АРСаз за 1 мин	
	контроль	ЭИМ	контроль	ЭИМ	контроль	ЭИМ
Аргинин	37,0±0,9	29,3±1,4	222,0±54	175,8±8,4	224,7±18,5	89,0±16,0
Глутаминовая кислота	14,3±1,2	8,5±0,5	85,8±7,2	51,0±3,0	27,4±2,9	9,3±1,2
Изолейцин	10,3±0,3	9,4±0,5*	61,8±1,8	56,4±3,0*	5,9±0,4	6,2±0,1*
Лейцин	10,0±1,0	10,2±1,8*	60,0±6,0	61,2±10,8*	26,1±2,0	20,5±1,8*
Лизин	34,8±1,2	22,4±1,4	208,8±7,2	134,4±8,4	215,4±8,0	123,2±6,9
Фенилаланин	36,7±4,0	35,3±3,0*	220,2±24,0	211,8±18,0*	233,6±6,3	192,2±5,1
Треонин	3,5±0,3	2,3±0,3	21,0±1,8	13,8±1,8	45,8±4,8	27,6±6,0
Валин	37,2±3,8	37,7±2,7*	223,2±22,8	226,2±16,2*	256,1±27,8	160,0±21,3

\* Изменения статистически недостоверны ( $p>0,05$ ).



Константы скорости термоинактивации ( $K_t$ ) аминоксил-тРНК-синтетаз, ассоциированных с полирибосомами печени кроликов и освобожденных от полирибосом, в норме (контроль) и при 12 ч ЭИМ ( $M \pm m$ ;  $n=4-6$ )

Условия эксперимента	$K_t, \text{мин}^{-1}$		
	ассоциированные с полирибосомами	освобожденные от полирибосом	реассоциированные с полирибосомами
<b>Аргинил-тРНК-синтетаза</b>			
Контроль	$0,09 \pm 0,01$	$0,35 \pm 0,03$	$0,26 \pm 0,02$
ЭИМ	$0,43 \pm 0,02$	$0,67 \pm 0,12$	$0,19 \pm 0,02$
<b>Лейцил-тРНК-синтетаза</b>			
Контроль	$0,08 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,02$
ЭИМ	$0,18 \pm 0,02$	$0,23 \pm 0,05$	$0,12 \pm 0,01$
<b>Лизил-тРНК-синтетаза</b>			
Контроль	$0,30 \pm 0,02$	$0,36 \pm 0,01$	$0,35 \pm 0,01$
ЭИМ	$0,30 \pm 0,01$	$0,39 \pm 0,06$	$0,19 \pm 0,02$
<b>Валил-тРНК-синтетаза</b>			
Контроль	$0,09 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,02$	$0,21 \pm 0,01$
ЭИМ	$0,10 \pm 0,01$	$0,21 \pm 0,01$	$0,19 \pm 0,03$

ков, освобожденных от полирибосом промыванием их буферным раствором, содержащим 0,5 М КСI (см. табл. 1). Исключение составляют фенилаланил- и валил-тРНК-синтетазы, активности которых в указанной фракции при ЭИМ несколько уменьшаются.

Наблюдаемое при экспериментальной ишемии уменьшение ряда аминоксил-тРНК-синтетазных активностей полирибосом печени связано либо со снижением молекулярной активности АРСаз, либо с уменьшением их содержания в исследуемой фракции. Первое предположение маловероятно, так как ранее на примере высокоочищенной лейцил-тРНК-синтетазы из цитозоля печени кроликов мы показали, что через 12 ч после воспроизведения ЭИМ ни молекулярная активность, ни кинетические характеристики АРСаз не изменяются [1]. Мы предполагаем, что установленное уменьшение аминоксил-тРНК-синтетазных активностей связано с частичной диссоциацией АРСаз из полирибосом и перераспределением их в цитоплазму. Это перераспределение может быть одной из причин увеличения аминоксил-тРНК-синтетазных активностей безрибосомного экстракта печени кроликов при 12 ч ЭИМ [2, 6]. Одним из возможных механизмов нарушения ассоциации АРСаз с полирибосомами может явиться модификация этих ферментов, в частности, путем фосфорилирования [16], что приведет к изменению их сродства к РНК [14] (посредством которой, по всей видимости, АРСазы связываются с полирибосомами [7]) и в конечном счете к их частичному освобождению из полирибосом.

На основании того, что промывание буферным раствором, содержащим 0,5 М КСI, приводит к освобождению  $1/6$  части общего белка полирибосом (в которой практически полностью содержатся АРСазы исследуемой фракции), был проведен пересчет аминоксил-тРНК-синтетазных активностей полирибосом на количество освобожденного белка (см. табл. 1). Сопоставление полученных результатов со значениями аминоксил-тРНК-синтетазных активностей освобожденных от полирибосом белков указало на значительную стимуляцию полирибосомами глутамил-, изолейцил- и лейцил-тРНК-синтетазных активностей печени кроликов. Таким образом, наши результаты согласуются с данными других авторов [10, 11], установивших усиление активности эукариотических АРСаз при добавлении рибосом. Однако этот регуляторный механизм, по-видимому, не является универсальным и зависит от аминокислотной специфичности исследуемых ферментов.

Следующий этап исследований был посвящен изучению влияния полирибосом в норме и через 12 ч после воспроизведения ЭИМ на термостабильность АРСаз, характеристикой которой являются константы скорости термоинактивации ( $K_t$ ). В табл. 2 приведены результаты определения степени термоинактивации аргинил-, лейцил-, лизил- и валил-тРНК-синтетаз, ассоциированных с полирибосомами, освобожденных от полирибосом и вновь реассоциированных в комплекс с полирибосомами. Данные табл. 2 свидетельствуют о том, что указанные АРСазы, выделенные в ассоциированном с полирибосомами состоянии, более устойчивы к тепловой инактивации, чем свободные ферменты. Реассоциация АРСаз и поли-

рибосом приводит к повышению термостабильности аргинил- и лизил-тРНК-синтетаз. Реассоциация лейцил- и валил-тРНК-синтетаз с полирибосомами не влияет на их термостабильность. В случае ЭИМ ассоциированные с полирибосомами аргинил-, лейцил- и лизил-тРНК-синтетазы лишь в незначительной степени термостабильнее свободных ферментов. Реассоциация с полирибосомами приводит к значительному увеличению их термостабильности. На стабильность валил-тРНК-синтетазы реассоциация с полирибосомами, как и в случае нормы, не оказывает заметного влияния, однако данный фермент, выделенный в комплексе с полирибосомами, значительно термостабильнее, чем в свободном состоянии. Анализ степени термоинактивации изученных препаратов АРСаз в норме и при ЭИМ (см. табл. 2) указал на следующие закономерности. Свободные и ассоциированные с полирибосомами аргинил- и лейцил-тРНК-синтетазы, выделенные из печени при ЭИМ, менее устойчивы к термоинактивации, чем в норме. Термостабильность лизил- и валил-тРНК-синтетаз в этих препаратах, а также всех изученных АРСаз, реассоциированных с полирибосомами, в норме и при ЭИМ практически одинакова.

Полученные результаты указывают на то, что ассоциация с полирибосомами АРСаз печени кроликов, так же как и АРСаз из других эукариотических объектов [8, 17], приводит к увеличению их стабильности. Можно предположить, что присутствие полирибосом предотвращает при термоинактивации конформационные изменения АРСаз, которые ведут к потере ферментативной активности. При ЭИМ (по-видимому, вследствие уменьшения взаимодействия АРСаз и полирибосом) происходит снижение стабильности этих ферментов.

Таким образом, приведенные в работе результаты исследований свидетельствуют о функциональном характере взаимодействия эукариотических АРСаз с полирибосомами: стимулирование активности ферментов, предохранение их от тепловой инактивации. Различия в этих параметрах АРСаз разных аминокислотных специфичностей, по-видимому, связаны с разнообразием их структуры [3]. Установленное нами при ЭИМ умень-

шение ряда аминоксил-тРНК-синтетазных активностей полирибосом может быть одной из причин нарушения биосинтеза белка при этой экспериментальной патологии [4]. Следовательно, наши результаты в определенной мере подтверждают предположение о возможной регуляции скорости биосинтеза белка в эукариотических клетках путем изменения компартиментализации АРСаз на рибосомах [7, 14].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Иванов Л. Л. Функциональные особенности аминоксил-тРНК-синтетаз печени кроликов при экспериментальном инфаркте миокарда: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Киев, 1985.
2. Иванов Л. Л., Тамулявичюс А.-А. И., Лукошявичюс Л. Ю. и др. // Молекулярная биол. — 1984. — Т. 18, № 5. — С. 1326—1329.
3. Киселев Л. Л., Фаворова О. О., Лаврик О. И. Биосинтез белков от аминокислот до аминоксил-тРНК. — М., 1984.
4. Лекис А. В., Буддакова О. В., Коваленко М. И. и др. // Бюл. экпер. биол. — 1985. — Т. 99, № 1. — С. 57—60.
5. Лекис А. В., Потапов А. П., Лукошявичюс Л. Ю. // Молекул. биол. — Киев, 1984. — Вып. 37. — С. 22—25.
6. Лукошявичюс Л. Ю., Родовичюс Г. А., Коваленко М. И. и др. // Вопр. мед. химии. — 1983. — Т. 29, № 4. — С. 65—69.
7. Федоров А. П., Альжанова А. Т., Овчинников Л. П. // Биохимия. — 1985. — Т. 50, № 10. — С. 1639—1645.
8. Carias J.-R., Mouricout M., Quintard B. et al. // Europ. J. Biochem. — 1978. — Vol. 87, N 3. — P. 583—590.
9. Chuang H. J. K., Bell F. E. // Arch. Biochem. Biophys. — 1972. — Vol. 152, N 2. — P. 502—514.
10. Graf H. // Biochim. biophys. Acta. — 1976. — Vol. 425, N 2. — P. 175—184.
11. Jakubowski H. // FEBS Lett. — 1979. — Vol. 103, N 1. — P. 71—76.
12. Moline G., Hampel A., Enger M. D. // Biochem. J. — 1974. — Vol. 143, N 1. — P. 191—195.
13. Roberts W. K., Olsen M. L. // Biochim. biophys. Acta. — 1976. — Vol. 454, N 3. — P. 180—192.
14. Ryazanov A. G., Ovchinnikov L. P., Spirin A. S. // Biosystems. — 1987. — Vol. 20, N 3. — P. 275—288.
15. Tolekis A., Dzeja P., Praškevičius A., Jasaitis A. // J. Moll. Cell. Cardiol. — 1979. — Vol. 11, N 1. — P. 55—76.
16. Traugh J. A., Pendergast A. M. // Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. — 1986. — Vol. 33. — P. 195—230.
17. Tscherne J. S., Weinstein J. B., Lanks K. W. et al. // Biochemistry. — 1973. — Vol. 12, N 20. — P. 3859—3863.

Поступила 02.03.89

#### INTERACTION BETWEEN AMINOACYL-tRNA SYNTHETASES AND POLYRIBOSOMES IN EUKARYOTES

Z. P. Martinkus, L. L. Ivanov, A. V. Lekis, L. Yu. Lukoshyavichus, A. K. Prashkevichus

Medical School, Kaunas

Properties of rabbit liver tissue aminoacyl-tRNA synthetases, associated with polyribosomes, were studied under conditions of normal state and within 12 hrs after simulation of myocardium infarction. Under conditions of myocardium infarction the activity of some forms of aminoacyl-tRNA synthetase was decreased in polyribosomes and protein fractions, liberated from polyribosomes by means of washing with buffer containing 0.5 M KCl. Polyribosomes stimulated the synthetases and protected them from heat inactivation. Deterioration of the synthetases interaction with polyribosomes appears to be among the factors responsible for impairment of protein biosynthesis under conditions of myocardium infarction.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 617-089-06:613.863]-07:[616.36 | 616.831-008.939.633.2

М. П. Явич, И. И. Рожицкая, Л. Ю. Голубева, Ф. З. Меерсон

#### ЭФФЕКТЫ ОПЕРАЦИОННОГО СТРЕССА НА СИНТЕЗ ДНК В КЛЕТКАХ ПЕЧЕНИ И МОЗГА

НИИ общей патологии и патофизиологии АМН СССР, Москва

При действии эмоционально-болевого стресса в ядрах клеток сердца и печени повреждается структура ДНК и происходит ускорение ее репаративного синтеза [1, 6]. Недавно было обнаружено, что скорость репарации ДНК повышается также в клетках сердца при хирургическом воздействии на организм, т. е. при операционном стрессе [7]. Представляло интерес исследовать эффект операционного стресса на синтез ДНК в других внутренних органах. В настоящей работе мы изучали скорость репарации и репликации ядерной ДНК в клетках печени и мозга, а также синтез ДНК в митохондриях клеток этих органов.

**Методика.** Опыты проводили на крысах линии Вистар массой 180—200 г. Операцию выполняли под неглубоким эфирным наркозом. По средней линии живота делали продольный разрез кожи и мышц длиной около 35 мм. Затем мышцы и кожу послойно зашивали. Животных исследовали в течение 24 ч после операции. О скорости синтеза ДНК судили по включению  $^3\text{H}$ -тимидина, введенного животным внутривенно из расчета 50 мкКи на 100 г массы. Время экспозиции составляло 2 ч. Для изучения репаративного синтеза ядерной ДНК крысам внутривенно вводили ингибитор репликации — оксимочевину — из расчета 50 мг на 100 г массы за 30 мин до введения  $^3\text{H}$ -тимидина [6].

Ядра клеток печени и мозга выделяли по методу [10]. Ткани отмывали от крови раствором 0.25 М сахарозы, содержащим 0.010 М трис-НСl-буфер (pH 7.5) и 0.003 М  $\text{MgCl}_2$ , и гомогенизировали в этом же буфере с добавлением тритона X-100 (конечная концентрация 0.5 %) в гомогенизаторе типа Даунса. Гомогенат центрифугировали при 2000 g в течение 10 мин. Митохондрии выделяли из надосадочной фракции при 12 000 g по общепринятой методике и отмывали в том же буфере [15].

Определение ДНК в ядрах и митохондриях проводили по методу [11]. Радиоактивность образцов ДНК, а также кислоторастворимой фракции, содержащей пул нуклеотидов, измеряли в жидкости Брея в сцинтилляционном счетчике и выражали числом распадов в 1 мин на 1 мг ДНК. В предварительных опытах было установлено, что радиоактивность кислоторастворимой фракции на протяжении всех серий эксперимента не изменялась.

**Результаты и обсуждение.** В I серии экспериментов мы исследовали скорость репарации ДНК в ядрах клеток печени и мозга. В предварительных опытах было установлено, что оксимочевина ингибирует синтез ядерной ДНК в клетках печени на 89 %, в клетках мозга на 91 %. Синтез ДНК, протекающий в ядрах в условиях блока оксимочевинной, отражает скорость репаративного процесса. Из табл. I видно, что скорость репарации ядерной ДНК в клетках печени более чем в 3 раза превышает таковую в клетках мозга; хирургическая операция в ядрах клеток печени и мозга вызывает ускорение репаративного синтеза. Так, увеличение скорости репарации в клетках печени через 8—10 ч после операции по сравнению с контролем составляет 40—50 %, а в клетках мозга — 31,5—35 %. Скорость репарации продолжает оставаться повышенной и через 22—24 ч

Таблица 1

Репаративный синтез ДНК в клетках печени и мозга в условиях операционного стресса ( $M \pm m$ )

Условия опыта	Включение $^3\text{H}$ -тимидина в ДНК, расп/мин на 1 мг ДНК	
	печень	мозг
Контроль (до операции)	3050 $\pm$ 25	1000 $\pm$ 15
После операции:		
через 8—10 ч	4600 $\pm$ 70	1350 $\pm$ 20
	4300 $\pm$ 80	1315 $\pm$ 40
через 22—24 ч	3450 $\pm$ 50	1200 $\pm$ 18
	3510 $\pm$ 40	1170 $\pm$ 18
<i>p</i>	<0,05	<0,05

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3 каждая цифра — данные 6—10 животных.

после операции. В ядрах клеток печени это увеличение по сравнению с контролем равно 13—15 %, в ядрах клеток мозга — 17—20 %.

Во II серии исследований мы изучали скорость репликации ядерной и митохондриальной ДНК в клетках печени и мозга. Из табл. 2 видно, что скорость репликации в ядрах клеток печени примерно в 3,7 раза превышает таковую в клетках мозга. Под влиянием операционного воздействия скорость репликации ядерной ДНК в клетках печени и мозга подавляется. Так, скорость репликации в клетках печени сразу после операции оказывается сниженной на 33—34 %, через 10—12 ч — на 25—28 %. Через 22—24 ч после операции скорость репликации в ядрах печени восстанавливается до исходных величин.

В клетках мозга подавление репликации ядерной ДНК также наблюдается сразу после операции. В этом случае скорость репликации снижается по сравнению с контролем на 49—51 %. Через 10—12 ч после операции скорость репликации ядерной ДНК в клетках мозга уменьшена на 40—42 %, а через 22—24 ч — на 30—32 %.

Данные об изменении скорости синтеза ДНК в митохондриях клеток печени и мозга представлены в табл. 3. В первые 12 ч после операции скорость синтеза ДНК в митохондриях печени снижается на 12—14 %, в митохондриях мозга — на 18—20 %. Через 24 ч после операции скорость синтеза ДНК в митохондриях клеток печени и мозга не отличается от контрольных величин.

Таким образом, полученные данные показывают, что под влиянием операционного стресса в ядрах клеток печени и мозга ускоряется репаративный синтез ДНК. Одновременно замедляется

Таблица 2

Скорость репликации в клетках печени и мозга при операционном стрессе

Условия опыта	Включение $^3\text{H}$ -тимидина в ДНК, расп/мин на 1 мг ДНК	
	печень	мозг
Контроль (до операции)	33 000 $\pm$ 100	9000 $\pm$ 80
После операции:		
сразу	22 100 $\pm$ 140	4410 $\pm$ 100
	21 800 $\pm$ 120	4590 $\pm$ 110
через 10—12 ч	24 750 $\pm$ 150	5400 $\pm$ 55
	23 760 $\pm$ 200	5320 $\pm$ 90
через 22—24 ч	32 000 $\pm$ 150	6300 $\pm$ 50
	31 000 $\pm$ 120	6120 $\pm$ 55
<i>p</i>	<0,05	<0,05

Таблица 3

Синтез митохондриальной ДНК в клетках печени и мозга в условиях операционного стресса ( $M \pm m$ )

Условия опыта	Включение $^3\text{H}$ -тимидина в ДНК, расп/мин/ на 1 мг ДНК	
	печень	мозг
Контроль (до операции)	90 000 $\pm$ 800	60 000 $\pm$ 700
После операции:		
сразу	77 500 $\pm$ 600	48 000 $\pm$ 500
	78 000 $\pm$ 500	49 000 $\pm$ 400
через 10—12 ч	79 000 $\pm$ 500	52 800 $\pm$ 600
	77 000 $\pm$ 700	52 000 $\pm$ 700
через 22—24 ч	88 000 $\pm$ 800	61 000 $\pm$ 800
	91 000 $\pm$ 700	59 500 $\pm$ 600
<i>p</i>	<0,05	<0,05

скорость ее репликации, причем более резко и длительно это изменение выражено в клетках мозга. Скорость репликации ДНК митохондрий в клетках печени и мозга также снижается, однако в значительно меньшей степени, чем в ядрах этих клеток.

Ускорение репаративного синтеза означает ответ клетки на повреждение структуры ДНК. Разрывы в молекуле ДНК сердечной мышцы были обнаружены при эмоционально-болевым стрессе, причем ионол — ингибитор перекисного окисления липидов (ПОЛ) предупреждает всплеск репаративного синтеза ДНК [3, 5]. Можно думать, что повреждение структуры ДНК вызвано действием свободных радикалов, образование которых увеличивается при стрессе за счет активации ПОЛ [4]. Известно, что репаративный синтез представляет собой защитный механизм, направленный на поддержание целостности структуры генома. В клетках эукариотов повреждения ДНК могут быть репарированы двумя способами: путем эксцизионной репарации и пострепликативной репарации, в ходе которой устраняются бреши во вновь синтезированной нити ДНК [8, 17]. Пострепликативная репарация ингибируется оксимочевинной [8]. Следовательно, в наших опытах мы изучали только эксцизионную репарацию. Установлено, что в клетках млекопитающих существуют два пути эксцизионной репарации — короткий и длинный. В первом случае из ДНК удаляются 3—7 нуклеотидов и процесс завершается в течение 1 ч. Во втором случае из ДНК элиминируется несколько десятков нуклеотидов и репарация длится 20 ч и более [7, 17]. При операционном стрессе в клетках печени и мозга ускорение репарации отмечается через 8—10 ч после операции и даже через 22—24 ч уровень этого процесса превышает контрольный. Можно сделать вывод, что при стрессе эксцизионная репарация повреждений реализуется по длинному пути.

В условиях операционного стресса в ядрах клеток печени и мозга подавляется скорость репликации. Восстановление скорости репликации ядерной ДНК в клетках мозга происходит позднее, чем в клетках печени, что, очевидно, связано с низкой активностью ферментов синтеза ДНК мозговой ткани [14]. Длительное и резкое снижение скорости репликации ядерной ДНК при одновременном ускорении ее репарации было обнаружено нами в клетках печени при эмоционально-болевым стрессе [6].

Временное и неполное подавление репликации наблюдается при действии различных физических

и химических ДНК-тропных факторов, повреждающих структуру ДНК [8, 9, 16, 17]. Доказано, что повреждения в ДНК блокируют ее репликацию [9, 16]. В частности, известно, что продвижению репликативной вилки препятствуют пиримидиновые димеры [16]. Очевидно, необходима полная репарация повреждений, прежде чем ДНК начнет реплицироваться. С этой точки зрения, временное и неполное подавление репликации можно рассматривать как процесс, способствующий нормальной жизнедеятельности клетки. В этой связи заслуживает внимания обнаруженный нами ранее факт снижения активности РНК-полимеразы I и II в клетках сердца и печени в первые часы после завершения иммобилизационного стресса [10]. Указанное явление можно также трактовать как защитный механизм, предохраняющий клетки от ошибок транскрипции на поврежденной матрице и ошибок последующей трансляции.

Важно выяснить, в каких именно клеточных популяциях печени и мозга происходят изменения синтеза ДНК. Установлено, что митотический индекс гепатоцитов очень низок [12]. Нейрональные клетки, очевидно, в постнатальный период теряют способность к репликации, так как в нейронах головного мозга взрослых животных активная  $\alpha$ -ДНК-полимераза не обнаружена [14, 19]. Следовательно, снижение при стрессе скорости репликации в печени отражает изменения, происходящие в непаренхиматозных клетках, а в мозге — в ядрах глиальных и соединительнотканых элементов.

Скорость репарации ДНК в пролиферирующих клетках значительно выше, чем в дифференцированных [2, 19]. Однако в гепатоцитах скорость репаративного синтеза при облучении и действии диметилнитрозомочевина была в 4—5 раз выше, чем в клетках Купфера и эндотелия [22, 24]. В нейронах млекопитающих на протяжении всего жизненного цикла сохраняются активная  $\beta$ -ДНК-полимераза и другие ферменты репарации [20]. При этом активность  $\beta$ -ДНК-полимеразы в ядрах нейронов головного мозга морской свинки в 2 раза выше, чем в клетках глии [18]. В нейрональных клетках грызунов скорость репарации ДНК очень низкая, значительно ниже, чем в клетках глии [19]. В то же время в ядрах нейронов мозжечка собаки описан активный репаративный синтез ДНК, индуцированный гамма-облучением [25]. Учитывая противоречивость данных литературы, трудно сделать вывод, какие именно клетки печени и мозга в условиях стресса в большей степени ответственны за ускорение репаративного синтеза ДНК.

Принципиальное значение имеет вопрос о надежности репаративного синтеза ДНК. Известно, что в пролиферирующих клетках система эксцизионной репарации в основном работает без ошибок. Однако в дифференцированных клетках репаративный синтез в меньшей степени способен к точному и адекватному восстановлению структуры ДНК, чем в пролиферирующих [19]. Нерепарированные повреждения в ДНК являются потенциально мутагенными событиями, которые считают иницирующей стадией канцерогенеза [9, 23]. Установлена связь стрессового воздействия с развитием злокачественных опухолей [1]. Неполная

репарация повреждений ДНК, вызванная сильным стрессовым воздействием, может явиться механизмом, ответственным за злокачественную трансформацию клеток.

Стресс-воздействие и, в частности, стресс, обусловленный хирургической операцией, подобно ряду физических и химических ДНК-тропных факторов в клетках печени и мозга, вызывает существенные изменения в системах репарации и репликации ДНК.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Балицкий К. П. Стресс и метастазирование злокачественных опухолей. — Киев, 1987.
2. Мазурик В. К. // Биологические системы репарации ДНК у эукариотов. — М., 1978. — С. 58—95.
3. Меерсон Ф. З., Васильев В. К. // Бюл. exper. биол. — 1981. — № 9. — С. 297—299.
4. Меерсон Ф. З., Каган В. Е. и др. // Кардиология. — 1981. — № 12. — С. 56—60.
5. Меерсон Ф. З., Васильев В. К. и др. // Бюл. exper. биол. — 1982. — № 6. — С. 57—60.
6. Меерсон Ф. З., Явич М. П., Рожицкая И. И. // Вopr. мед. химии. — 1988.
7. Меерсон Ф. З., Явич М. П. и др. // Бюл. exper. биол. — 1989. — № 5, 10.
8. Жестяников В. Д. Репарация ДНК и ее биологическое значение. Л., 1979.
9. Тарасов В. А. Молекулярные механизмы репарации и мутагенеза. — М., 1982.
10. Явич М. П., Меерсон Ф. З. // Бюл. exper. биол. — 1985. — № 9. — С. 277—279.
11. Blobel J., Potter V. R. // Biochim. biophys. Acta. — 1968. — Vol. 166. — P. 48—57.
12. Brodsky W. Y., Tsirelidse N. N. et al. // J. molec. cell. Cardiol. — 1985. — Vol. 17. — P. 445—455.
13. Claycomb W. C. // Exp. Cell Res. — 1979. — Vol. 118. — P. 111—114.
14. Craddock W. M., Henderson A. R., Gash S. // J. Cancer Res. — 1984. — Vol. 108. — P. 30—35.
15. Dubiel W., Müller M., Rappoport S. // Acta med. germ. — 1981. — Bd 40. — S. K25—K29.
16. Eberberg H. J. // Biophys. J. — 1976. — Vol. 17. — P. 849—860.
17. Friedberg E. C. DNA Repair. — New York, 1985.
18. Inoe N., Sazukio O., Kato T. // J. Neurochem. — 1976. — Vol. 27. — P. 113—118.
19. Kidson G. DNA Repair Mechanisms. — New York, 1978. — P. 761—767.
20. Kuenzle C. C. // Brain Res. Rev. — 1985. — Vol. 10. — P. 231—247.
21. Lampidis T., Schaiberger J. // Exp. Cell. Res. — 1975. — Vol. 96. — P. 412—416.
22. Planche-Martel G., Likhachev R. et al. // Cancer Res. — 1985. — Vol. 45. — P. 4768—4773.
23. Schmerold I., Wiestler O. D. // Ibid. — 1986. — Vol. 46. — P. 245—249.
24. Trosko J. E., Chang C. // Photochem. Photobiol. — 1979. — Vol. 28. — P. 157—168.
25. Wheeler K. T., Lett J. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1974. — Vol. 71. — P. 1862—1865.

Поступила 07.12.88

## EFFECTS OF SURGICAL STRESS ON DNA SYNTHESIS IN LIVER AND BRAIN CELLS

M. P. Yavich, I. I. Rozhitskaya, L. Yu. Golubeva, F. Z. Meerson

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

Distinct alterations in the rate of DNA synthesis (an increase in the rate of reparation and a decrease in the rate of replication in nuclei and mitochondria) were detected in liver and brain cells during the stress caused by surgical operation. Within 8-10 hrs after the operation the rate of DNA reparation was increased by 40-50 % in nuclei of liver cells and by 31-35 % in brain cell nuclei. Replication of nuclear DNA was decreased immediately after the operation — by 33 % in liver cells and by 50 % in brain cells. Within a day after the operation the rate



of replication was restored up to the control level in liver cells, while it was still decreased by 30 % in brain cells. The rate of mitochondrial DNA synthesis was slightly decreased within the first 12 hrs after the operation: by 12-14 % in liver cells and by 18-20 % in brain cells. The stress, and particularly postoperational stress, exhibited pronounced action on structure and various systems of DNA synthesis in cells of various tissues.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 612.392.84:577.112.825].017.3:612.322.4 + 613.287-056.3-02:613.295

И. В. Гмошинский, В. В. Кржечковская, С. Н. Зорин

## ИЗМЕНЕНИЕ ИММУНОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ $\beta$ -ЛАКТОГЛОБУЛИНА ПРИ ПРОТЕОЛИЗЕ И НЕКОТОРЫХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

Институт питания АМН СССР; Институт медико-биологических проблем Минздрава СССР, Москва

$\beta$ -Лактоглобулин ( $\beta$ -ЛГ) — один из наиболее активных аллергенов молока и молочных продуктов [2—4, 11, 12]. Будучи по своей функции

специфическим ретинолтранспортирующим белком молока копытных  $\beta$ -ЛГ весьма устойчив к протеолизу и кислотной денатурации в желудке [13, 20]. В работе [18] сообщалось об обнаружении белка — аналога  $\beta$ -ЛГ в грудном молоке, однако впоследствии эти данные не подтвердились [7]:  $\beta$ -ЛГ в женском молоке отсутствует, и поэтому организм новорожденного ребенка не приспособлен к ассимиляции этого важного компонента молочной сыворотки (доля  $\beta$ -ЛГ — 60 % от всех сывороточных белков коровьего молока [1]). Представляется актуальной задача элиминации этого антигена из специализированных молочных продуктов, предназначенных для питания детей и взрослых, страдающих непереносимостью белков коровьего молока [26]. В настоящей работе представлены результаты изучения изменений антигенных свойств  $\beta$ -ЛГ при его ферментативной обработке, денатурации и нагревании.

Методика. Использовали  $\beta$ -ЛГ и  $\alpha$ -лактальбумин ( $\alpha$ -ЛА) коровьего молока, выделенные из цельного молока по методу [6], бычий сывороточный альбумин (БСА; квалификация «для вирусологических исследований»), казеин (по Гаммерстену) и пепсин желудка свиньи (активность 0,9 ПЕ) производства Олайнского НПО «Биолар», трипсин и  $\alpha$ -химотрипсин крупного рогатого скота производства Ленинградского мясокомбината. Концентрат сывороточных белков

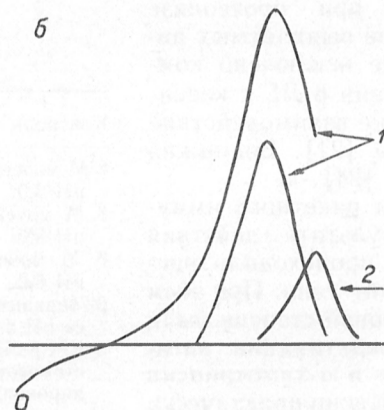
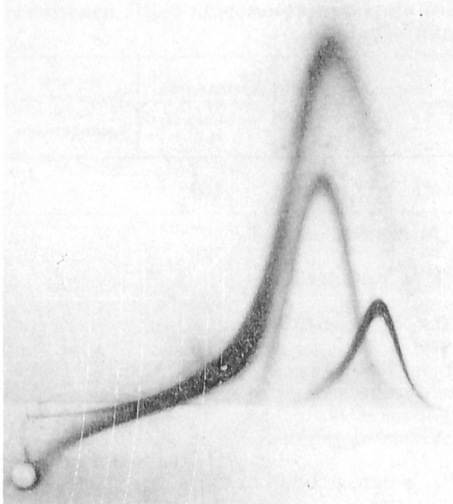
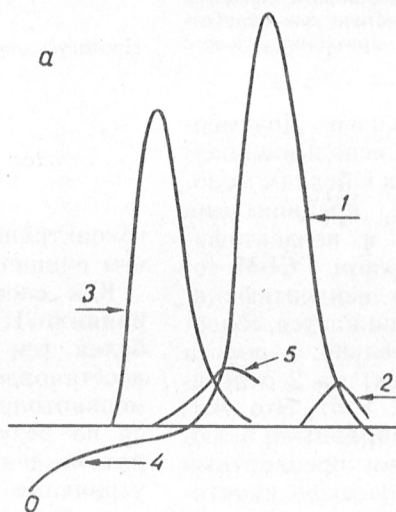
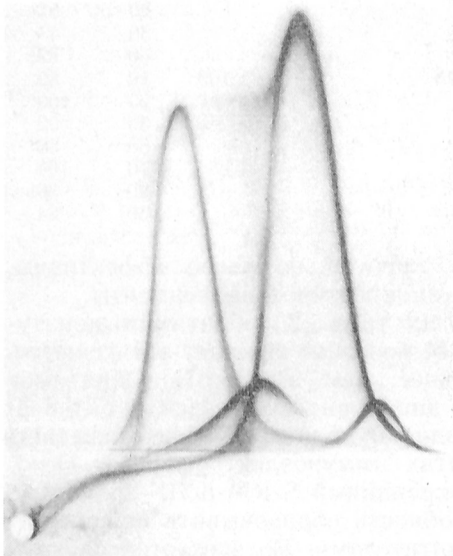


Рис. 1. Иммуноэлектрофорез [8] концентрата белков молочной сыворотки (а) и его гидролизата (б).

1 —  $\beta$ -ЛГ, 2 — БСА, 3 —  $\alpha$ -ЛА, 4 —  $\gamma$ -глобулин, 5 — неидентифицированный антиген.

Таблица 3

Реакция активного анафилактического шока у морских свинок, sensibilizированных внутрижелудочно белком молочной сыворотки, на внутривенное введение  $\beta$ -ЛГ и его модифицированных форм

№ п/п	Число животных	Сенсибилизация	Разрешение	Летальность, %	Судорожный синдром, %	Анафилактический индекс
1	24	КСБМ	$\beta$ -ЛГ	46	58	2,7
2	25	КСБМ	$\beta$ -ЛГ, прогретый 15 мин, 96 °С, pH 8,0	48	68	3,0
3	11	КСБМ	S-КМ- $\beta$ -ЛГ	64	64	2,8
4	5	Несенсибилизированные	S-КМ- $\beta$ -ЛГ	0*	0*	0,8*

Примечание: Звездочка — достоверное отличие от групп 1—3 ( $p < 0,01$ ).

ионной причиной гетерогенности антигенных структур  $\beta$ -ЛГ является, вероятно, его термическая агрегация по механизму межмолекулярного дисульфидного обмена [24].

В эксперименте на модели пищевой анафилаксии у морских свинок была предпринята попытка выяснить, как влияет термическая агрегация и денатурация  $\beta$ -ЛГ на его анафилактогенные свойства [2, 4]. Как видно из табл. 3, тяжесть реакции анафилактического шока по всем показателям у животных, sensibilizированных орально белками молочной сыворотки, достоверно не различается, независимо от того, был ли использован при разрешении  $\beta$ -ЛГ его термоагрегированная форма (15 мин, 96 °С, pH 8,0) или полностью денатурированный S-КМ- $\beta$ -ЛГ. Полученный результат согласуется с данными работы [14] и показывает, что анафилактические антитела, вырабатываемые против  $\beta$ -ЛГ при пероральной сенсибилизации, направлены, по-видимому, в основном против таких детерминант белка, которые не разрушаются ни при нагревании, ни при полной необратимой денатурации. Этому требованию удовлетворяют «последовательные» антигенные детерминанты белка, представляющие собой короткие аминокислотные последовательности полипептидной цепи, но не «конформационные» детерминанты, образованные стерически сближенными в нативной молекуле белки аминокислотными остатками. Вместе с тем результаты табл. 3 показывают, что термоагрегация  $\beta$ -ЛГ не повышает существенно его аллергенности.

Таким образом,  $\beta$ -ЛГ коровьего молока является аллергическим белком, элиминация которого из специализированных гипоаллергенных продуктов питания, содержащих компоненты коровьего молока, представляет собой сложную задачу. Термообработка ферментативных гидролизатов вызывает агрегацию нерасщепленного  $\beta$ -ЛГ, не сопровождающуюся снижением его анафилактогенных свойств. Частичный протеолиз с использованием коммерчески доступных препаратов протеаз не инактивирует в достаточной степени конформационные детерминанты  $\beta$ -ЛГ, ответственные за его преципитацию антителами кролика и тем более короткие «последовательные» детерминанты. Для устранения аллергенного дей-

ствия  $\beta$ -ЛГ его необходимо, по-видимому, расщепить на короткие (моновалентные) полипептидные фрагменты, неспособные вызывать агрегацию реактивных антител в плазматической мембране клосток-мишеней.

Авторы благодарят канд. техн. наук В. И. Круглика (Институт питания АМН СССР) за предоставленные препараты белков, а также его и руководителя лаборатории доктора биол. наук В. К. Мазо за полезное обсуждение результатов работы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеева И. Ю. // Молочн. пром-сть.— 1983.— № 4.— С. 27—31.
2. Бахна С., Хайнер Л. Аллергия к молоку: Пер. с англ.— М., 1980.
3. Погаллер А. М. Пищевая аллергия.— М., 1983.
4. Шатерников В. А. Биохимические и физиологические основы пищевой аллергии: Лекция.— М., 1980.
5. Шатерников В. А., Марокко И. Н., Пятницкий И. И. и др. // Вопр. питания.— 1982.— № 2.— С. 27—31.
6. Aschaffenburg R., Drewry J. // Biochem. J.— 1957.— Vol. 65, N 2.— P. 273—277.
7. Brignon C., Chlourou A., Ribadeau-Dumas B. // J. Dairy Res.— 1985.— Vol. 52, N 2.— P. 249—254.
8. Clarke M. H. G., Freeman T. // Clin. Sci.— 1968.— Vol. 35.— P. 403—410.
9. Doi H., Ibuki F., Kanamori M. // Agric. Biol. Chem.— 1981.— Vol. 45, N 10.— P. 2351—2353.
10. Elfagm A. A., Wheeloh J. W. // J. Dairy Res.— 1977.— Vol. 44, N 2.— P. 367—371.
11. Gjessing B., Østerhalla O., Schwartz B. et al. // Allergy.— 1986.— Vol. 41, N 1.— P. 51—56.
12. Gjessing B., Løwenstein H. // Ann. Allergy.— 1984.— Vol. 53, N 6.— Pt 2.— P. 602—608.
13. Godovac-Zimmermann J., Conti A., Liberatory J., Braunlitz G. // Biochem. J. Hoppe-Seyler.— 1985.— Vol. 366, N 6.— P. 601—608.
14. Huang Q., Coleman J. W., Stanworth D. R. // Int. Arch. Allergy.— 1985.— Vol. 78, N 4.— P. 337—344.
15. Kurisaki J., Nakamura S., Kaminogawa S., Yamauchi K. // Agric. Biol. Chem.— 1982.— Vol. 46, N 8.— P. 2069—2075.
16. Lapresle C., Goldstein G. // J. Immunol.— 1969.— Vol. 102, N 3.— P. 733—742.
17. Laurell C. B. // Analyt. Biochem.— 1966.— Vol. 15.— P. 45—52.
18. Liberatory J., Guidetti M. L., Conti A. // Boll. Soc. ital. Biol. sper.— 1979.— Vol. 55, N 9.— P. 822—825.
19. Otani H., Tokita F. // Jap. J. zootechnol. Sci.— 1979.— Vol. 50, N 9.— P. 623—629.
20. Otani H. // Ibid.— 1981.— Vol. 52, N 1.— P. 47—52.
21. Otani H., Tokita F. // Ibid.— 1982.— Vol. 53, N 5.— P. 344—350.
22. Otani H., Morita S., Tokita F. // Ibid.— 1984.— Vol. 55, N 4.— P. 287—289.
23. Ouchterlony Q. // Ark. Kemi.— 1949.— Vol. 1.— P. 439—500.
24. Sawyer W. H. // J. Dairy Sci.— 1968.— Vol. 51, N 3.— P. 323—329.
25. Schwartz H. R., Nerurkar L. S., Spies J. R. et al. // Ann. Allergy.— 1980.— Vol. 45, N 4.— P. 242—245.
26. Seban A., Konijn A. M., Freier M. B. // Amer. J. clin. Nutr.— 1977.— Vol. 30, N 6.— P. 840—846.

Поступила 17.02.89

#### ALTERATION OF IMMUNOCHEMICAL PROPERTIES OF $\beta$ -LACTOGLOBULIN AFTER PROTEOLYSIS OR SOME PHYSICO-CHEMICAL TREATMENTS

I. V. Gmshinsky, V. V. Krzhechkovskaya, S. N. Zorin

Institute of Nutrition, Academy of Medical Sciences of the USSR, Institute of Medico-Biological Problems, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

Heating of cow milk  $\beta$ -lactoglobulin at 96°, pH 8.0 led to the protein aggregation because of intermolecular disulfide

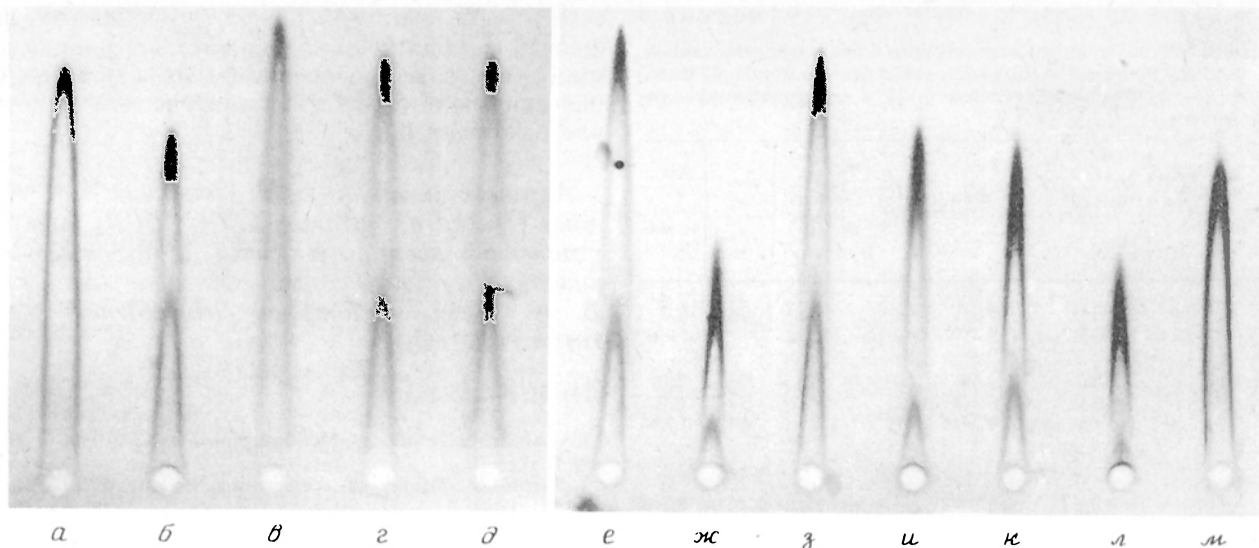


Рис. 2. Ракетный иммуноэлектрофорез [17]  $\beta$ -ЛГ после различных видов обработки.

а, м — интактный  $\beta$ -ЛГ; б, е — нагревание  $96^\circ\text{C}$ , 5 мин, pH 8,0; в — нагревание в присутствии 0,01 М N-фенилмалеимида,  $96^\circ\text{C}$ , 5 мин, pH 8,0; г —  $\beta$ -ЛГ, прогретый в присутствии глюкозы (6:1 по массе),  $96^\circ\text{C}$ , 5 мин, pH 8,0; д —  $\beta$ -ЛГ, прогретый с лактозой в тех же условиях; ж —  $\beta$ -ЛГ, прогретый  $96^\circ\text{C}$ , 30 мин, pH 8,0; з, и —  $\beta$ -ЛГ, прогретый с казеином (1:1 по массе),  $96^\circ\text{C}$ , pH 8,0, 5 и 30 мин соответственно; к, л —  $\beta$ -ЛГ, прогретый с БСА (1:1 по массе) в тех же условиях.

расщепления полосы преципитации  $\beta$ -ЛГ не наблюдали.

Термическая обработка  $\beta$ -ЛГ (нагревание до  $96^\circ\text{C}$ , 5 мин), проводимая при pH 3,0 и особенно при pH 5,1, приводила к столь интенсивной агрегации  $\beta$ -ЛГ, что он утрачивал растворимость. Напротив, после термообработки при pH 8,0 (0,1 М трис-HCl-буфер) раствор оставался совершенно прозрачным, даже если нагревание проводили 30 мин. На ракетной иммуноэлектрофореграмме термообработанного при pH 8,0  $\beta$ -ЛГ (рис. 2) видно расщепление его полосы

преципитации на две. Наличие в растворе наряду с  $\beta$ -ЛГ глюкозы, лактозы, БСА, казеинов (см. рис. 2), а также  $\alpha$ -ЛА (данные не показаны) незначительно изменяло вид иммуноэлектрофореграмм. Вместе с тем проведение термообработки в присутствии 0,01 М N-фенилмалеимида (блокатора свободных меркаптогрупп [19]) практически не сопровождалось расщеплением полосы преципитации  $\beta$ -ЛГ. Таким образом, процесс возникновения гетерогенности антигенных структур  $\beta$ -ЛГ опосредуется реакцией дисульфидного обмена, протекающей с повышенной скоростью при нагревании.

Как видно из результатов жидкостной хроматографии на колонке с гелем «Toyopearl HW-50F» (рис. 3), свежеприготовленный  $\beta$ -ЛГ элюируется с колонки одним пиком в области мол. м. 34 000 (димер). Уже при стоянии раствора белка на холоду ( $4^\circ\text{C}$ , 1 нед) на хроматограмме появляется второй пик (23,5 % общего белка), элюируемый в свободном объеме колонки и соответствующий полимеризованному  $\beta$ -ЛГ. Хроматограмма термически обработанного  $\beta$ -ЛГ демонстрирует возрастание этой фракции (вплоть до 57 % от всего белка препарата). Однако если термообработку проводить в присутствии 0,01 М N-фенилмалеимида, агрегированный пик составит всего 14 %. Иммуноэлектрофореграмма фракций белка, элюируемых с колонки при хроматографии прогретого  $\beta$ -ЛГ, полученная методом «слившихся ракет», демонстрирует, что две полосы преципитации, присутствующие в термообработанном белке, при хроматографии могут быть разделены: одна из них (внешняя) соответствует агрегированному белку, другая (внутренняя) — нативному (димеру) (данные не показаны).

Таким образом, диссоциация полосы преципитации  $\beta$ -ЛГ, наблюдаемая при иммуноэлектрофорезе гидролизатов молочного белка, не связана, по-видимому, с протеолизом белка, его денатурацией, комплексообразованием с другими молочными белками, а также реакцией Майара. Ос-

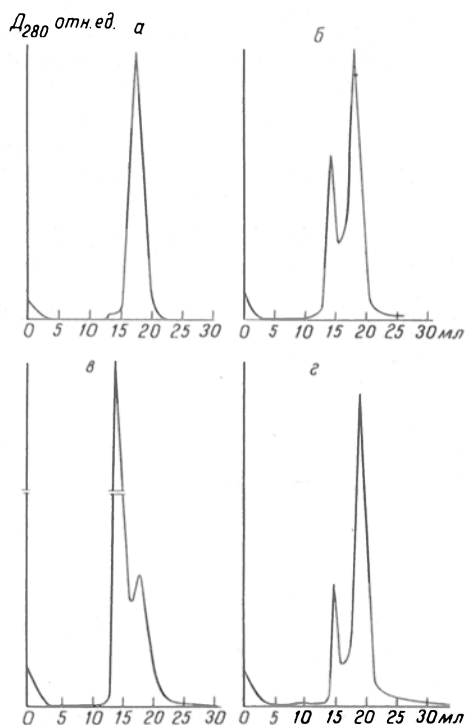


Рис. 3. Жидкостная хроматография  $\beta$ -ЛГ на колонке с гелем «TSK Gel Toyopearl HW-50F».

а — свежеприготовленный раствор  $\beta$ -ЛГ; б —  $\beta$ -ЛГ после стояния в растворе на воздухе, 7 сут,  $4^\circ\text{C}$ , pH 7,5; в — прогретый  $\beta$ -ЛГ,  $96^\circ\text{C}$ , pH 8,0, 5 мин; г — прогретый в тех же условиях  $\beta$ -ЛГ с 0,01 М N-фенилмалеимидом.

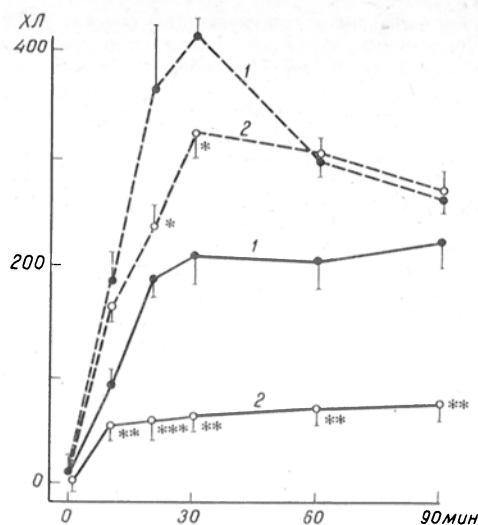


Рис. 2. Влияние этанола и аминотриазола на уровень Fe/АДФ-аскорбатзависимой ХЛ в «безъядерном» гомогенате печени.

Концентрация неразведенного гомогената (сплошные линии) во флаконах составляла 9—10 мг/мл; штриховые линии — результаты, полученные после разбавления гомогената средой инкубации в 8 раз. По оси абсцисс (здесь и на рис. 3 и 4) — время (в мин), прошедшее с момента запуска реакции добавлением в инкубационную смесь аскорбата. 1 — контроль, 2 — этанол+аминоотриазол. Каждая группа состояла из 3—4 животных. Одна звездочка —  $p < 0,05$ , две —  $p < 0,01$ , три —  $p < 0,001$ .

ХЛ линейно зависит от концентрации белка гомогената в пределах до 1 мг/мл. При более высоком содержании белка в среде инкубации этот показатель снижается. Сходные результаты были получены при определении скорости накопления ТБКП. Линейная зависимость от концентрации белка оказалась наиболее выраженной через 20 и 30 мин инкубации при 25 °С в случае регистрации накопления соответственно ТБКП и ХЛ. В митохондриальной и особенно в микросомальной фракциях зависимость, близкая к линейной, наблюдалась при более низком содержании белка в пробах (см. вставку на рис. 1).

При длительном введении как этанол, так и аминотриазол существенно снижали скорость пероксидативного ПОЛ в цельном, а также в «безъядерном» гомогенате печени (рис. 2, табл. 1). Эффект был особенно выраженным при совместном введении обоих веществ и наиболее ярко проявлялся в неразбавленных гомогенатах. При разведении гомогенатов средой инкубации различия становились менее заметными. В отличие от гомогената в митохондриальной и микросомальной фракциях этанол и аминотриазол не влияли на уровень

Таблица 2

Влияние этанола и аминотриазола на содержание диеновых конъюгатов и стационарную концентрацию МДА ( $M \pm m$ )

Группа животных	Содержание диеновых конъюгатов, нмоль гидроперекисей		Содержание МДА, нмоль на 1 г ткани
	митохондрии	микросомы	
1-я (контроль)	435±30	262±6	65,3±6,2
2-я	455±34	270±25	81,1±7,9
3-я	506±49	297±12	63,3±4,6
4-я	448±19	302±17	61,8±5,2

Примечание. Митохондрии и микросомы получали из 1 г печени. Представлено количество гидроперекисей в общих липидах, экстрагированных из осадка фракции субклеточных структур. Содержание МДА определяли в цельном гомогенате печени, гомогенизацию проводили в присутствии 2 мМ ЭДТА. Каждая группа состояла из 6 животных.

Fe/АДФ-аскорбатзависимой ХЛ (данные не представлены), а также на скорость накопления ТБКП (см. табл. 1). В митохондриальной фракции уровень ПОЛ не зависел от концентрации эндогенного глутатиона, которая в опытных группах по отношению к норме ( $13 \pm 2$  нмоль на 1 мг белка) возрастала: во 2-й группе — в 1,17 раза, в 3-й — в 1,39 раза, в 4-й — в 1,83 раза. В цельных гомогенатах печени животных опытных групп наблюдалось увеличение количества глутатиона, которое примерно соответствовало полученным ранее данным [4]: 1-я группа (контроль) —  $17 \pm 4$  нмоль на 1 мг белка, 2-я группа —  $24 \pm 5$  нмоль/мг, 3-я —  $31 \pm 4$  нмоль/мг, 4-я —  $29 \pm 6$  нмоль/мг.

Для определения влияния этанола и аминотриазола на скорость перекисных процессов *in vivo* во фракциях субклеточных частиц измеряли содержание диеновых конъюгатов, а в цельном гомогенате печени — стационарную концентрацию МДА. Как видно из табл. 2, оба параметра не изменялись при хронической алкогольной интоксикации или при введении ингибитора каталазы. В то же время под влиянием  $\text{CCl}_4$  содержание в микросомальной фракции диеновых конъюгатов возрастало в 2,1 раза ( $574 \pm 8$  нмоль гидроперекиси на 1 г ткани, контроль —  $274 \pm 34$  нмоль/г;  $p < 0,001$ ).

На рис. 3 представлены результаты изучения влияния цитозоля на скорость пероксидативного ПОЛ в суммарной фракции частиц, содержащей митохондрии и микросомы. При совместном воздействии этанола и аминотриазола наблюдалось существенное возрастание антиоксидантной способности растворимой фракции гомогената печени

Таблица 1

Влияние этанола и аминотриазола на скорость образования МДА (в нмоль/мин на 1 мг белка) при неэнзиматическом ПОЛ в гомогенате и субклеточных фракциях печени ( $M \pm m$ )

Гомогенат или субклеточные фракции	Группа животных			
	1-я (контроль)	2-я	3-я	4-я
Неразбавленный гомогенат (около 5 мг белка в 1 мл)	0,49±0,02 (n=4)	0,40±0,02*	—	0,35±0,03** (n=5)
Гомогенат после разведения (0,8—1,0 мг/мл)	1,46±0,06 (n=10)	1,40±0,07 (n=6)	1,36±0,05 (n=3)	1,22±0,09 (n=5)
Митохондрии (0,4—0,6 мг/мл)	1,50±0,10 (n=6)	1,41±0,08 (n=6)	1,55±0,10 (n=6)	1,48±0,08 (n=6)
Микросомы (около 0,2 мг в 1 мл)	2,54±0,16 (n=6)	2,56±0,34 (n=6)	2,61±0,07 (n=6)	2,35±0,13 (n=6)

Примечание. \*Пробы инкубировали в течение 20 мин при 25 °С. В скобках — число животных. Прочерк — данные отсутствуют. Одна звездочка —  $p < 0,05$ , две —  $p < 0,01$ .



exchange as shown by agarose gel immunoelectrophoresis, where additional precipitation strips were detected. At the same time, there was not observed dissociation of  $\beta$ -lactoglobulin into separate fractions after proteolysis or denaturation in 8 M urea.  $\beta$ -Lactoglobulin, its thermoaggregated and S-carboxymethyl denaturated forms exhibited similar anaphylactic effect on sensitized guinea pigs. Allergic properties of  $\beta$ -lactoglobulin appear to be unaltered in food hydrolyzates after thermal treatment and limited proteolysis.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.36-008.939.15-39-02: [615.31:547.262 + 615.355:577.152.53.042.2

В. Д. Антоненков, С. В. Пирожков, С. В. Попова, Л. Ф. Панченко

## ВЛИЯНИЕ ЭТАНОЛА И ИНГИБИТОРА КАТАЛАЗЫ 3-АМИНО-1,2,4-ТРИАЗОЛА НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В ГОМОГЕНАТЕ И СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЯХ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

Всесоюзный научный центр наркологии Минздрава СССР, Москва

Ранее нами было показано [4], что длительное совместное введение крысам этанола и 3-амино-1,2,4-триазола (аминотриазола) сопровождается существенным снижением в гомогенате печени животных активности ключевых ферментов перекисного обмена: каталазы, глутатионпероксидазы и супероксиддисмутазы. Основной функцией этих ферментов считается защита клетки от токсического действия перекиси водорода и супероксидного анион-радикала [2, 8]. Вместе с тем при воздействии этанола и аминотриазола в гепатоцитах наблюдается увеличение содержания восстановленного глутатиона и активности глутатион-S-трансферазы [4]. Можно было ожидать, что заметное нарушение баланса антиокислительных систем должно сопровождаться изменением скорости внутриклеточных перекисных процессов. В настоящей работе приведены результаты экспериментальной проверки высказанного предположения. Полученные данные указывают на то, что в ткани печени, кроме известных ферментов перекисного обмена, существует белковый фактор антиокислительной защиты, который способен эффективно нивелировать проокислительные эффекты этанола и аминотриазола.

**Методика.** Опыты проводили на крысах-самцах Вистар с начальной массой тела 160—180 г. Животных содержали в течение 1,5—2 мес на изокалорийном кормовом рационе, в состав которого входили витамины и минеральные вещества [1]. По условиям эксперимента крысы были разделены на 4 группы: 1-я — контроль, 2-я — этанол, 3-я — аминотриазол, 4-я — этанол + аминотриазол. Животные 2-й и 4-й групп в составе корма получали этанол в количестве 10—12 г на 1 кг массы тела в сутки (34—36 % от общей калорийности корма); крысы 1-й и 3-й групп — изокалорийное количество сахарозы. Аминотриазол в виде 10 % водного раствора вводили интраперитонеально в дозе 1 г/кг 3 раза в неделю. Крыс забивали декапитацией через 20—22 ч после раздачи корма и последней инъекции аминотриазола. В момент забоя концентрация алкоголя в крови животных была минимальной (менее 1 мМ), что исключало возможность непосредственного воздействия спирта на внутриклеточные перекисные процессы. Печень перфузировали охлажденной средой выделения (0,15 М KCl, 20 мМ трис-HCl-буфер pH 7,4), измельчали и гомогенизировали в той же среде в гомогенизаторе Даунса (стекло/тефлон). «Безъядерный» гомогенат печени получали центрифугированием проб при 600 g в течение 10 мин. Дифференциальное центрифугирование гомогената осуществляли, как описано ранее [3]. При изучении содержания диеновых

конъюгатов перфузию и гомогенизацию печени, а также получение субклеточных фракций проводили в среде выделения, содержащей 2 мМ ЭДТА. При изучении интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) гомогенаты и субклеточные фракции инкубировали при 25 °C в 0,15 М KCl, 50 мМ трис-HCl pH 7,4 (общий объем проб 1 мл, конечная концентрация белка указана в тексте). Инкубацию проводили в открытых флаконах в течение 20 мин при постоянном потряхивании. Для инициации неферментативного ПОЛ использовали 35 мкМ FeSO<sub>4</sub>, 1,5 мМ АДФ и 0,1 мМ аскорбиновую кислоту. Реакцию останавливали, добавляя в пробы антиоксидант дибунол в конечной концентрации 0,01 %. Образование продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБКП), определяли спектрофотометрически при 535—570 нм [7]. Скорость перекисного процесса выражали в наномолях малонового диальдегида (МДА), образованного за 1 мин, на 1 мг белка, используя молярный коэффициент экстинкции 156 мМ<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>. При определении уровня хемилюминесценции (ХЛ) [18] применяли стандартные стеклянные флаконы емкостью 22 мл. Через 25—30 мин инкубации в затемненном термостате при 30 °C измеряли спонтанную ХЛ (нулевой момент времени). Затем во флаконы добавляли инициаторы ПОЛ (FeSO<sub>4</sub>/АДФ и аскорбат) и через определенные промежутки времени регистрировали нарастание уровня ХЛ. В качестве контроля использовали флаконы, содержащие 5 мл среды выделения. Каждый флакон находился в режиме измерения не менее 30 с. Уровень ХЛ выражали в импульсах за 1 мин в 1 пробе. Работу проводили на жидкостном сцинтилляционном счетчике «Roche-Bioelectronique» (Франция) в режиме двухканального подсчета импульсов. При определении в субклеточных фракциях содержания диеновых конъюгатов липиды экстрагировали смесью изопропанол — гептан (1:1) в соответствии с методикой [18]. Растворитель удаляли с помощью вакуумного насоса, осадок липидов взвешивали и ресуспендировали в метаноле (около 1 мг/мл). Поглощение в УФ-области (220—300 нм) регистрировали на спектрофотометре «Gildford» модель 250 (США). Результаты выражали в наномолях гидроперекиси, применяя коэффициент молярной экстинкции (233 нм) — 24,4 мМ<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup> [7]. В качестве положительного контроля при определении диеновых конъюгатов использовали липиды микросом печени крыс, получавших CCl<sub>4</sub> [15]. Препарат вводили в дозе 0,25 мл на 100 г массы тела *per os* за 16 ч до декапитации. Стационарную концентрацию МДА определяли в гомогенате печени спектрофлуориметрическим методом [17]. Содержание восстановленного глутатиона измеряли по реакции с 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислотой [16]. Концентрацию белка определяли по Лоури и соавт. [12].

**Результаты и обсуждение.** Как видно на рис. 1, при неэнзиматическом ПОЛ уровень

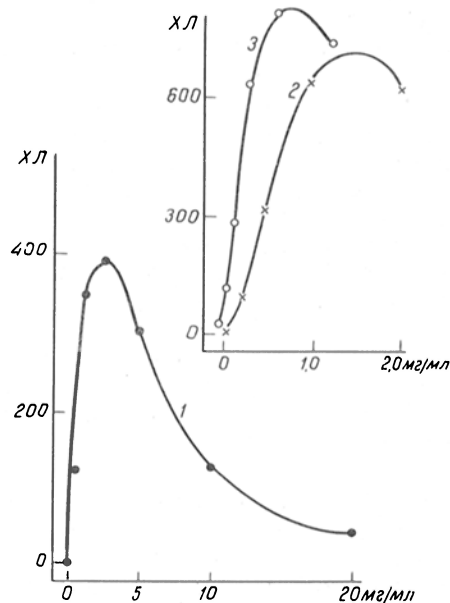


Рис. 1. Зависимость уровня ХЛ от концентрации белка «безъядерного» гомогената (1), митохондрий (2) и микросом (3).

По оси абсцисс — конечная концентрация белка в пробах (в мг/мл), по оси ординат (здесь и на рис. 2—4) — уровень ХЛ (в имп/мин · 10<sup>-3</sup> в 1 пробе). Интенсивность ХЛ регистрировали через 30 мин инкубации при 25 °C с инициаторами ПОЛ.

Таблица 1

Содержание антигенных структур  $\beta$ -ЛГ в гидролизатах, полученных при действии различных протеаз (определение методом ракетного иммуноэлектрофореза)

Фермент	pH	Е: : $\beta$ -ЛГ, по массе	Вре- мя гид- ро- лиза, мин	Содер- жание $\beta$ -ЛГ, % от конт- роля
Контроль без гидролиза	—	—	—	100
Пепсин	1,8	1:50	10 20 30 60	100 100 100 100
Пепсин	3,0	1:50	10 20 30 60	100 100 100 100
Трипсин	8,0	1:100	10 20 30	6 3 2
$\alpha$ -Химотрипсин	8,0	1:100	10 20 30 60	12,6 7 2 0,5
Панкреатин	8,0	1:100	10 20 30 60	92 72 67 46
		1:25	10 20 30 60	60 51 43 22
Протосубтилин Г20Х	8,0	1:100	10 20 30 60	89 100 92 88
		1:25	10 20 30	100 89 84

молока (КСБМ) и его гидролизат (ГСБМ), а также ферментные препараты панкреатин («высокоактивный») и протосубтилин Г20Х были предоставлены канд. техн. наук В. И. Кругликом (Институт питания АМН СССР). Остальные реактивы и материалы отечественного и импортного производства имели квалификацию х. ч. или ч. д. а., и их использовали без дополнительной очистки.

Иммунизацию кроликов  $\beta$ -ЛГ проводили по [16], а цельным коровьим молоком — по [12]. Титр антител определяли по реакции двойной иммунодиффузии [23]. Антисыворотки хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Ракетный иммуноэлектрофорез [17] и двухмерный иммуноэлектрофорез [8] проводили на приборе «Мультифор-2117» (Швеция) в 1 % геле агарозы-М pH 8,7. Гель-фильтрацию проводили на колонке  $50 \times 1$  см с гелем «TSK Gel Toyopearl HW-50F» (Япония), уравновешенной 0,01 М К-фосфатным буфером pH 7,4 с 0,15 М NaCl. В качестве детектора использовали ультрафиолетовый проточный абсорбциометр UV-1 («Pharmacia», Швеция, длина волны  $\lambda$ -280 нм). Регистрацию оптической плотности и обработку данных хроматографии проводили на интеграторе SP4270 («Spectra Physics», США).

Карбоксиметилированный по меркаптогруппам восстановленный  $\beta$ -ЛГ (S-КМ- $\beta$ -ЛГ) получали по методике [14]. Для этого 100 мг белка денатурировали в 10 М мочеvine в токе азота, добавляли 112 мг натриевой соли ЭДТА, 100 мг  $\beta$ -меркаптопропандиола и через 4 ч 300 мг йодацетамиды. Реакцию проводили еще 1 ч, а затем диализовали белок против 0,01 М Na-бикарбонатного буфера pH 9,0.

Сенсибилизацию морских свинок (самцы, массой 300–350 г) препаратом КСБМ проводили по методу [5] путем 3-кратного введения 100 мг белка в 3 мл 0,9 % NaCl внутривенно с суточными интервалами. Через 21 сут после последнего введения у животных вызывали активный анафилактический шок внутрисердечной инъекцией  $\beta$ -ЛГ или его модифицированных форм. Тяжесть пищевой анафилаксии оценивали по показателям летальности, судорожного синдрома и анафилактического индекса [5]. Статистическую обработку результатов проводили с помощью критерия углового преобразования Фишера.

**Результаты и обсуждение.** Двухмерный иммуноэлектрофорез КСБМ с использованием полиспецифической антисыворотки к белкам молока (рис. 1) выявил полосы преципитации  $\beta$ -ЛГ,  $\alpha$ -ЛА, БСА,  $\gamma$ -глобулина и неидентифицированного антигена. В полученном ГСБМ содержание  $\alpha$ -ЛА,  $\gamma$ -глобулина и неидентифицированного антигена значительно снижается, содержание БСА изменяется незначительно, а полоса  $\beta$ -ЛГ диссоциирует (расщепляется) на 2 отдельные дуги преципитации (см. рис. 1, б). Это указывает на возникновение в ходе обработки, включающей протеолиз коммерческими препаратами протеаз и их последующую термическую инактивацию, спектра гетерогенных антигенных структур  $\beta$ -ЛГ. Это может быть связано с частичной денатурацией белка при протеолизе с нарушением «конформационных» и демаскированием «последовательных» антигенных детерминант [15, 22]. Возможно также раскрытие при протеолизе «новых антигенов»  $\beta$ -ЛГ [25], не выявляемых антителами в нативном белке. Не исключено комплексообразование при нагревании  $\beta$ -ЛГ с казеинами,  $\alpha$ -ЛА, БСА [9, 10], а также взаимодействие с лактозой по реакции Майяра [21]. Возможна и термическая агрегация  $\beta$ -ЛГ [24].

Как было показано методом ракетного иммуноэлектрофореза [17], в результате действия протеаз на  $\beta$ -ЛГ (табл. 1) не происходило расщепление полос преципитации антигена. При этом различные протеазы в неодинаковой степени были эффективными в отношении инактивации антигенных структур  $\beta$ -ЛГ. Трипсин и  $\alpha$ -химотрипсин быстро инактивируют антиген, пепсин практически не влияет на  $\beta$ -ЛГ, коммерческие препараты протеаз — протосубтилин Г20Х и панкреатин («вы-

сокоактивный») значительно менее эффективны, чем очищенные панкреатические ферменты.

Как следует из табл. 2, обратимая денатурация  $\beta$ -ЛГ в 8 М мочеvine снижает антигенность белка тем сильнее, чем выше pH. Обратимое восстановление дисульфидных связей в белке  $\beta$ -меркаптопропандиолом существенно не сказывается на результатах иммуноэлектрофореза. Необратимо денатурированный S-КМ- $\beta$ -ЛГ полностью утрачивал способность образовывать преципитат с кроличьими антителами. Во всех этих случаях

Таблица 2

Результаты ракетного иммуноэлектрофореза  $\beta$ -ЛГ, подвергнутого различным видам обработки

Обработка	Содержание $\beta$ -ЛГ, % от контроля	Наличие расщепления полос преципитации
Контроль (интактный)	100	—
8 М мочеvine в 0,1 М Na-формате pH 3,0	88	—
8 М мочеvine в 0,1 М Na-ацетате pH 5,0	28	—
8 М мочеvine в 0,1 М трис-HCl pH 8,0	0	—
$\beta$ -Меркаптопропандиол, 10:1 по массе pH 5,1 (ацетатный буфер)	96	—
S-КМ- $\beta$ -ЛГ (денатурированный, восстановленный и S-карбоксиметилированный)	0	—
Нагревание до $96^{\circ}\text{C}$ , 5 мин, pH 8,0	52*	+

\* В расчете на внутреннюю, более интенсивную полосу.

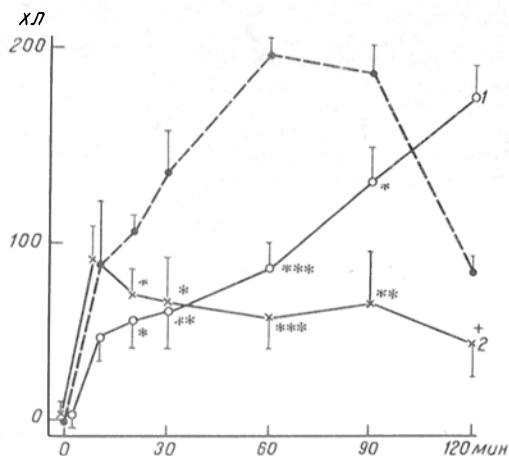


Рис. 3. Влияние этанола и аминотриазола на способность цитозоля предотвращать неэнзиматическое ПОЛ в суммарной фракции частиц.

Каждую пробу фракции цитозоля (конечная концентрация белка 0,8—0,9 мг/мл), полученную из гомогенатов печени крыс контрольной (1) или опытной (2, этанол+аминотриазол) группы смешивали в равных пропорциях с препаратом суммарной фракции частиц (0,6 мг белка в 1 мл). Через 30 мин инкубации при 25 °С добавляли инициаторы ПОЛ. Штриховая линия — интенсивность ХЛ в суммарной фракции частиц без добавления цитозоля. Одна звездочка —  $p < 0,05$ , две —  $p < 0,01$ , три —  $p < 0,001$  по отношению к уровню ПОЛ в контроле ( $n=3$ ).

крысы. Обнаруженное явление было особенно выражено при длительных сроках инкубации (60—120 мин). Увеличение антиоксидантной активности цитозоля было выявлено также в группах животных, которые получали либо этанол, либо аминотриазол. Однако заметной суммации эффектов обоих веществ при их совместном введении не наблюдалось. Денатурация белков цитозоля нагреванием (80 °С, 10 мин), хотя и сопровождалась уменьшением его антиокислительного потенциала, однако полностью не подавляла этой активности. Характерным было определенное сглаживание различий между эффектами в опытных и контрольных пробах. Добавление в сре у инкубации восстановленного глутатиона в конечной концентрации 0,2 мМ заметно снижало уровень Fe/АДФ-аскорбатзависимой ХЛ в суммарной фракции частиц. Последнее свидетельствует о возможном участии глутатиона в проявлении антиоксидантной способности цитозоля, подвергнутого температурной обработке. Существенное ингибирование ПОЛ в суммарной фракции частиц было получено в присутствии диализованного цитозоля (рис. 4). Диализ проводили с целью удаления низкомолекулярных компонентов. После этой процедуры концентрация глутатиона как в опытных, так и в контрольных пробах снижалась, составляя менее 0,001 мМ. В отличие от серии экспериментов по термальному воздействию в данном случае более выраженная антиоксидантная способность цитозолей опытных проб по сравнению с контролем практически полностью сохранялась, причем заметное подавление ПОЛ наблюдалось также в начальный период инкубации. Ингибирующее действие линейно зависело от количества белка диализованного цитозоля в инкубационной смеси. Результаты, полученные при измерении уровня ХЛ, были подтверждены при регистрации скорости накопления ТБКП.

Как было показано нами ранее [4], при совместном продолжительном воздействии этанола и ами-

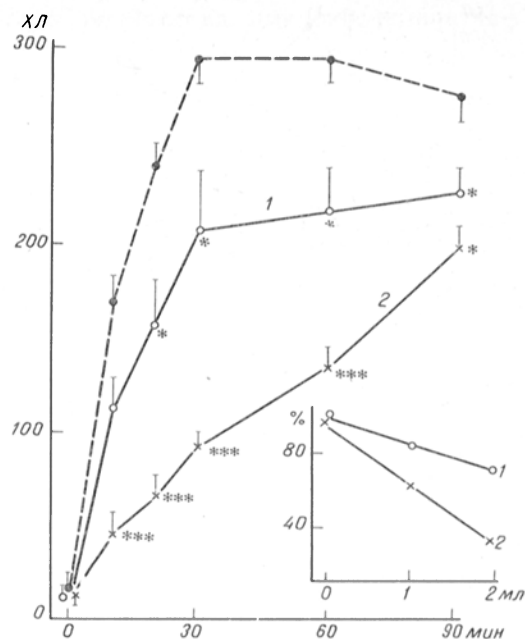


Рис. 4. Влияние диализованных цитозолей на уровень ХЛ в суммарной фракции частиц.

Фракции цитозоля диализовали в течение 20 ч против 100 объемов 10 мМ трис-НСl (рН 7,4). 2 мл полученного диализата (конечная концентрация белка во флаконах 3,5 мг/мл) смешивали с препаратом частиц (1,5 мг белка в 1 мл). Остальные обозначения см. рис. 3. На вставке — зависимость ингибирования ПОЛ от количества добавленного цитозоля (в мл): 1 — контроль, 2 — опыт (этанол+аминотриазол). За 100 % принят уровень ХЛ во фракции частиц (30 мин инкубации в присутствии инициаторов ПОЛ).

нотриазола в печени крыс происходит ингибирование ключевых ферментов перекисного обмена: каталазы, глутатионпероксидазы и супероксиддисмутазы. Учитывая данные, приведенные в настоящей работе, можно предположить, что уровень перекисных процессов, протекающих *in vivo*, а также скорость неэнзиматического ПОЛ не обязательно зависят от активности перечисленных выше ферментов антиокислительной защиты и могут, видимо, определяться другими клеточными факторами. В этой связи особый интерес представляют сведения о непричастности перекиси водорода, супероксидного анион-радикала и продукта их взаимодействия гидроксильного радикала к активации неэнзиматического ПОЛ в интактных мембранных структурах клетки. Так, например, было показано, что неэнзиматическое ПОЛ не ингибируется в присутствии каталазы, супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы, а также веществ — «ловушек» гидроксильного радикала (маннитол, этанол, бензоат и др.) [6, 10, 11]. Предполагается, что истинным инициатором ПОЛ в фосфолипидном бислое мембраны в случае неэнзиматического процесса служит пока не известное комплексное соединение ионов двух- и трехвалентного железа с кислородом [5]. Имеются отдельные указания на то, что цитозоль печени крысы содержит один или несколько белковых факторов антиокислительной защиты, эффективных по отношению к неэнзиматическому ПОЛ, однако природа их не изучена [9, 14, 19]. Таким образом, имеющиеся к настоящему времени сведения не позволяют идентифицировать фактор цитозоля, ответственный за снижение под влиянием этанола и аминотриазола уровня ПОЛ в гепатоцитах. Для более подробной характеристики

## ЛИТЕРАТУРА

1. Антоненков В. Д., Попова С. В., Панченко Л. Ф. // *Вопр. мед. химии.*— 1983.— № 6.— С. 79.
2. Панченко Л. Ф., Герасимов А. М., Антоненков В. Д. Роль пероксисом в патологии клетки.— М., 1981.
3. Antonenkov V. D., Pirozhkov S. V., Panchenko L. F. // *Europ. J. Biochem.*— 1985.— Vol. 149.— P. 159.
4. Antonenkov V. D., Panchenko L. F. // *Int. J. Biochem.*— 1988.— Vol. 20.— P. 823.
5. Aust S. D., Morehouse L. A., Thomas C. E. // *J. Free Rad. Biol. Med.*— 1985.— Vol. 1.— P. 3.
6. Belouqui O., Cederbaum A. I. // *Biochem. Pharmacol.*— 1986.— Vol. 35.— P. 2663.
7. Buege J. A., Aust S. D. // *Meth. Enzymol.*— 1978.— Vol. 52.— P. 302.
8. Chance B., Sies H., Boveris A. // *Physiol. Rev.*— 1979.— Vol. 59.— P. 527.
9. Gibson D. D., Hawrylko J., McCay P. B. // *Lipids.*— 1985.— Vol. 20.— P. 704.
10. Girotti A. W., Thomas J. P. // *Biochem. biophys. Res. Commun.*— 1984.— Vol. 118.— P. 474.
11. Gutteridge J. M. C. // *FEBS Lett.*— 1982.— Vol. 150.— P. 454.
12. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // *J. biol. Chem.*— 1951.— Vol. 193.— P. 265.
13. Placer Z. // *Nahrung.*— 1968.— Bd 12.— S. 679.
14. Ramasarma T., Muakkassah-Kelly S., Hochstein P. // *Biochim. biophys. Acta.*— 1984.— Vol. 796.— P. 243.
15. Recknagel R. O., Ghoshal A. K. // *Exp. molec. Path.*— 1966.— Vol. 5.— P. 108.
16. Sedlak J., Lindsay R. H. // *Analyt. Biochem.*— 1968.— Vol. 25.— P. 192.
17. Suematsu T., Abe H. *Lipid Peroxides in Biology and Medicine* / Ed. K. Yagi.— London, 1982.— P. 23—39.
18. Trush M. A., Wilson M. E., Van Dyke K. // *Meth. Enzymol.*— 1978.— Vol. 57.— P. 462.
19. Ursini F., Maiorino M., Gregolin C. // *Biochim. biophys. Acta.*— 1985.— Vol. 839.— P. 62.

Поступила 06.01.89

## INFLUENCE OF ETHANOL AND THE CATALASE INHIBITOR 3-AMINO-1,2,4-TRIAZOLE ON LIPID PEROXIDATION IN RAT LIVER HOMOGENATE AND SUBCELLULAR FRACTIONS

V. D. Antonenkov, S. V. Pirozhkov, S. V. Popova, L. F. Panchenko

All-Union Research Centre of Narcology, Moscow

Effects of repeated administration of ethanol and the catalase inhibitor 3-amino-1,2,4-triazole on the rate of  $\text{Fe}^{2+}$ /ADP-ascorbate induced (nonenzymatic) lipid peroxidation were studied in rat liver tissue homogenate and subcellular fractions using estimation of low-level chemiluminescence and malonic dialdehyde content. The rate of lipid peroxidation was decreased in whole and nuclear-free homogenates as a result of combined or individual ethanol and aminotriazole treatment. However, this pattern was unaltered in mitochondrial and microsomal fractions. Both these agents did not affect the content of conjugated dienes in lipid containing extracts of subcellular fractions as well as the total malonic dialdehyde concentration in whole liver tissue homogenate. The data obtained suggest that antioxidative protein factor, inhibiting nonenzymatic lipid peroxidation in biological membranes, was induced in liver cytosol of rats repeatedly administered with ethanol and/or amino-triazole.

А. Е. Медведев

## РЕГУЛЯЦИЯ БИОГЕННЫМИ АМИНАМИ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ МИТОХОНДРИЙ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Механизмы влияния биогенных аминов на функции митохондрий довольно разнообразны. Их целесообразно разделить на опосредованные и прямые. К первым относятся (а) рецепторные (исследованные главным образом для природных катехоламинов и синтетических агонистов адренорецепторов), когда взаимодействие аминов с рецепторами плазматических мембран приводит к повышению содержания внутри клетки вторых посредников ( $\text{цАМФ}$ , ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ), которые, действуя на митохондрии, в конечном счете изменяют активность их ферментных систем [9, 22]; (б) метаболические — когда в ходе дезаминирования (катализируемого митохондриальными моноаминоксидазами) биогенных аминов образуются биологически активные вещества (в частности биогенные альдегиды), влияющие на функции митохондрий [6, 8, 21]. К прямым механизмам относятся такие процессы, в ходе которых биогенные амины непосредственно взаимодействуют с митохондриями, изменяя характер их функционирования [4, 8, 18—19]. Данные о подобного рода регуляции аминами активности ферментов энергетического обмена противоречивы, а экспериментальные условия [18] не всегда исключают участие моноаминоксидазы в реализации этих эффектов. Между тем накопление моноаминов в организме при лекарственном торможении моноаминоксидаз нередко приводит к возникновению патологических состояний, механизмы развития которых еще окончательно не выяснены [5].

Цель настоящей работы — изучение механизма прямого влияния некоторых биогенных аминов на энергетические функции митохондрий в условиях ингибирования активности моноаминоксидаз.

**Методика.** Митохондрии из печени крысы выделяли методом дифференциального центрифугирования в среде, содержащей 0,25 М сахарозу, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ трис-НСl-буфер (рН 7,5) [17]. Выделенные митохондрии дважды промывали в гипотоничном 10 мМ калий-натрий фосфатном буфере (рН 7,4). Конечный осадок суспендировали в том же буфере (концентрация белка 20—30 мг/мл) и хранили до опыта при  $-20^\circ\text{C}$ .

Перед опытом пробы размораживали и 0,4—0,6 мг белка митохондриальных мембран инкубировали в 2,0—2,5 мл буферных растворов в течение 20—30 мин при  $37^\circ\text{C}$  в присутствии ингибиторов моноаминоксидазы: 1 мкМ хлоргиллина и 1 мкМ депренила. Растворы аминов (рН около 7,0) вносили за 5 мин до окончания инкубации, после чего добавляли необходимые для измерения активности ферментов компоненты.

Сукцинат-цитохром с-редуктазную активность определяли спектрофотометрически по восстановлению цитохрома с при 550 нм в 10 мМ фосфатном буфере рН 7,0 (конечный объем 3,0 мл), содержащем 10 мМ сукцинат (натриевую соль),  $8,3 \cdot 10^{-5}$  М цитохрома с и 5 мМ NaCN [15].

Активность сукцинатдегидрогеназы (сукцинат: феназинметосульфат-редуктазы) измеряли спектрофотометрически после преинкубации проб с 15 мМ сукцинатом в системе сопряженного восстановления 2,6-дихлорфенолиндофенола при 600 нм,



Условия инкубации	Без тритона X-100+0,1 %	Тритон X-100
Без добавок	100±3 (22)	97±4 (9)
1 мкМ хлоргиллина+1 мкМ депренила	95±7 (6)	—
То же+3 мМ серотонина	49±5 (6)	104±5 (6)
То же+3 мМ триптамина	67±6 (4)	110±18 (2)
То же+2,4 мМ феилэтиламина	86±7 (4)	—
То же+3 мМ тирамина	62±4 (3)	—
То же+3 мМ дофамина	48±3 (4)	100±22 (2)
30 мкМ спермина	75±2 (4)	98±23 (3)

Примечания. Результаты представлены в виде процента активности, оставшейся после инкубации мембран митохондрий с аминами или ингибиторами моноаминоксидазы. За 100 % принята активность сукцинатдегидрогеназы инкубированных без добавок проб:  $119 \pm 3,5$  нмоль/мин на 1 мг белка. Конечные концентрации аминов указаны в пересчете на основание. Спермин инкубировали без ингибиторов моноаминоксидазы. Тритон X-100 добавляли в среду инкубации за 3–5 мин перед добавлением аминов. В скобках — число опытов.

экстраполируя V к бесконечно большой концентрации феназинметосульфата [2]. Среда измерения (конечный объем 3,0 мл) содержала: 20 мМ фосфатный буфер, 0,1 мМ ЭДТА, 10 мМ сукцинат натрия, 5 мМ NaCN (pH 7,8) и акцепторы электронов: 0,05 мМ 2,6-дихлорфенолиндифенол и варьируемые от 0,2 до 2 мМ концентрации феназинметосульфата.

Ротенон-нечувствительную НАД·Н-цитохром с-редуктазную активность измеряли по восстановлению цитохрома с [7, 16] в среде (конечный объем 2,5 мл), содержащей 10 мМ фосфатный буфер (pH 7,0), 4 мкг ротенона, 0,25 мМ НАД·Н,  $3,3 \cdot 10^{-5}$  М цитохрома с, 5 мМ NaCN. Белок измеряли биуретовым методом [13] с бычьим кристаллическим сывороточным альбумином в качестве стандарта.

В работе использованы трис, цитохром с, ротенон («Serva», ФРГ), ЭДТА, гидрохлорид триптамина, креатининсульфат серотонина («Reanal», Венгрия), гидрохлорид дофамина, тритон X-100 («Ferak», Западный Берлин), феназинметосульфат, тетрагидрохлорид спермина, бычий кристаллический сывороточный альбумин («Calbiochem», США), НАД·Н («Sigma», США), тирамин (свободное основание) («Fluka», Швейцария), хлоргиллин («May and Baker», Англия), депренил предоставлен проф. Й. Киолем (Венгрия). Остальные реактивы были отечественного производства максимально доступной чистоты.

Результаты и обсуждение. Инкубация мембран митохондрий с аминами вызывает торможение ротенон-нечувствительной НАД·Н-цитохром с-редуктазы, сукцинат-цитохром с-редуктазы (рис. 1 и 2) и сукцинатдегидрогеназы (см. таб-

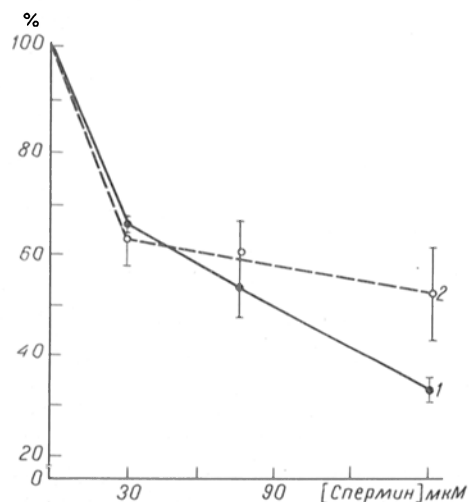


Рис. 1. Влияние спермина на активность ротенон-нечувствительной НАД·Н-цитохром с-редуктазы (1) и сукцинат-цитохром с-редуктазы (2).

Результаты представлены в виде процента активности, оставшейся после инкубации мембран митохондрий со спермином. За 100 % принята активность инкубированных без добавок проб: 1 —  $41,2 \pm 2,7$  нмоль/мин на 1 мг белка; 2 —  $44,0 \pm 2,8$  нмоль/мин на 1 мг белка.

лицу). Влияние полиамина спермина проявляется при более низких концентрациях по сравнению с моноаминами. Интенсивность торможения исследуемых активностей моноаминами возрастает в ряду феилэтиламин < тирамин < дофамин; влияние серотонина более выражено, чем триптамина. Ранее в нашей лаборатории было показано, что инкубация митохондриальных мембран, предварительно обработанных ингибиторами моноаминоксидазы, с теми же концентрациями феил- и индолилалкиламинов (2–3 мМ) оказывает гораздо меньший эффект на активность сукцинатдегидрогеназы [4] и цитохромоксидазы [8]. Основное различие заключается в разведении инкубационной среды во время измерения активности ферментов: в наших экспериментах оно составило не более 20–30 %, а в первоначальных постановках 4 [4] и 10 раз [8]. Естественно, что концентрация моноаминов снижалась до такого уровня, который, судя по нашим данным (см. рис. 2), оказывает незначительное влияние на ферменты

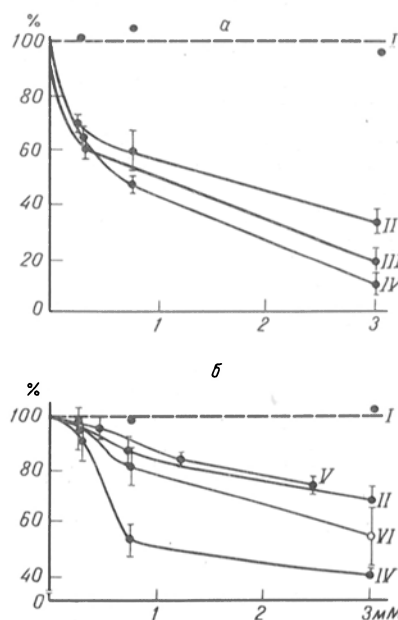


Рис. 2. Влияние аминов на активность ротенон-нечувствительной НАД·Н-цитохром с-редуктазы (а) и сукцинатцитохром с-редуктазы (б).

Результаты представлены в виде процента активности, оставшейся после инкубации мембран митохондрий с аминами: I — NaCl; II — триптамин; III — тирамин; IV — серотонин; V — феилэтиламин; VI — дофамин. В обоих случаях активность в присутствии хлоргиллина и депренила варьировала от 100 до 111 %.

внутренней мембраны митохондрий. Такая зависимость эффекта аминов от последующего разведения, очевидно, отражает обратимый характер взаимодействия аминов со структурами митохондриальных мембран.

Инкубация аминов с митохондриальными мембранами в присутствии тритона X-100 не изменяет активности сукцинатдегидрогеназы (см. таблицу). Поскольку детергенты ингибируют активность таких полиферментных комплексов, как сукцинат-цитохром с-редуктаза [10], эти исследования были ограничены только сукцинатдегидрогеназой.

В наших опытах активность сукцинатдегидрогеназы в 6—7 раз превышает активность сукцинат-цитохром с-редуктазы (если учесть, что дегидрирование сукцината сопровождается двухэлектронным восстановлением 2,6-дихлорфенолидофенола [2], но одноэлектронным — цитохрома с [10]). Это согласуется с представлениями о том, что сукцинатоксидаза обычно составляет около 30 % полной активности собственно сукцинатдегидрогеназы [1]. Поскольку в наших опытах преинкубация с сукцинатом повышает активность сукцинатдегидрогеназы не более чем в 1,5—2 раза (результаты не приведены), очевидно, что сукцинатдегидрогеназа не лимитирует активность сукцинат-цитохром с-редуктазы. Поэтому можно заключить, что амины вызывают торможение не только сукцинатдегидрогеназы, но и переноса электронов между цитохромами b и c.

Инкубация мембран митохондрий с 0,3—3 мМ NaCl не влияет на исследуемые активности (см. рис. 2). Это свидетельствует о том, что наблюдаемые изменения не обусловлены небольшими сдвигами ионной силы среды инкубации, вызванными внесением гидрохлоридов поли- и моноаминов. Известно, что активность мембранно-связанной и растворимой сукцинатдегидрогеназы тормозится сульфат-ионами в результате их взаимодействия с активным центром фермента [2]. Поскольку в наших экспериментах использовали креатининсульфат серотонина, было необходимо исключить возможное влияние сульфат-иона на активность сукцинатдегидрогеназы. Поэтому в ряде опытов мы использовали адипинат серотонина. Оказалось, что креатининсульфат и адипинат серотонина (3 мМ в пересчете на основание) вызывают одинаковое торможение сукцинатдегидрогеназы (на  $52 \pm 6$  и  $50 \pm 8$  % соответственно). Кроме того, влияние аминов исследовали в условиях преинкубации мембран с сукцинатом, защищающим, по-видимому, активный центр фермента от возможного влияния сульфат-иона. В аналогичных опытах не было выявлено различий в эффектах креатининсульфата и адипината серотонина и на сукцинат-цитохром с-редуктазу (ингибирование на  $57 \pm 1$  и  $59 \pm 2$  % соответственно). Поскольку сумма 1 мкМ хлоргиллина и 1 мкМ депренила вызывает полное ингибирование активности моноаминоксидаз [5], влияние моноаминов не обусловлено продуктами их возможного дезаминирования. Спермин в обычных условиях не является субстратом моноаминоксидаз [5].

Таким образом, полученные в настоящей работе результаты доказывают, что именно сами амины вызывают торможение активности ферментных систем как наружной (ротенон-нечувствительная НАД·Н-цитохром с-редуктаза), так и внут-

ренней (сукцинатдегидрогеназа и сукцинат-цитохром с-редуктаза) мембран митохондрий.

**Обсуждение.** Для уяснения механизма прямого влияния аминов на активность ферментных систем наружной и внутренней мембран митохондрий необходимо рассмотреть следующие данные, полученные в настоящей и других работах: 1) эффект полиамина спермина проявляется при более низких концентрациях, чем эффект моноаминов; 2) спермидин ингибирует ротенон-нечувствительную НАД·Н-цитохром с-редуктазу [7], но при больших по сравнению с использованными в наших опытах концентрациях спермина; 3) на выраженность эффекта моноаминов влияют свойства ароматического кольца: наличие в нем гидроксильной группы (или групп) усиливает торможение; 4) лизис биомембран тритоном X-100 предупреждает влияние поли- и моноаминов на сукцинатдегидрогеназу.

Первые 3 группы данных отражают зависимость эффекта от структуры молекул: соединения, имеющие большее число аминогрупп в молекуле, в большей мере тормозят активность исследуемых ферментов. Спермин имеет в своей молекуле 4 аминогруппы со значениями  $pK_a$  11,50, 10,95, 9,79 и 8,90; спермидин — 3 аминогруппы с  $pK_a$  11,56, 10,80 и 9,56 [20]. Очевидно, что при условиях, использованных в наших и упомянутых выше экспериментах [7], спермин несет большой положительный заряд по сравнению со спермидином и моноаминами,  $pK_a$  аминогрупп которых имеют те же значения, что и у полиаминов от 10,52 до 9,79 [14].

Зависимость торможения активности сукцинатдегидрогеназы биогенными аминами от целостности мембран митохондрий свидетельствует в пользу того, что влияние аминов не обусловлено их непосредственным взаимодействием с ферментом. Свойство заряженных молекул изменять активность мембранно-связанных ферментов, проявляющееся только при условии целостности мембран, ассоциируется с изменением их поверхностного заряда [12, 23, 24]. Обработка детергентом приводит к исчезновению эффекта [12, 23]. Первоначально было обнаружено, что изменения поверхностного заряда влияют преимущественно на сродство ферментов к субстратам [12, 23], однако позднее были получены данные и о влиянии на V, а также на сольubilизацию ферментов, адсорбированных на мембранах [24].

С учетом приведенных данных нам представляется, что прямое влияние биогенных аминов на активность исследуемых ферментов обусловлено изменением поверхностного заряда внешней и внутренней мембран митохондрий. По-видимому, спермин, имеющий больший положительный заряд, в большей мере изменяет поверхностный заряд биомембран по сравнению с моноаминами. Наличие у последних ионизируемых гидроксильных групп в кольцах бензола и индола с  $pK_a$  9,74—11,1 [14], возможно, способствует образованию водородных связей с отрицательно заряженными поляризованными функциональными группами мембран, что также должно вносить определенный вклад в изменение поверхностного заряда мембран.

Поскольку концентрация спермина в митохондриях (даже без учета его наличия во внешней

мембране) составляет 30 мкМ [19], обнаруженная регуляция ферментных систем спермином, по-видимому, имеет место *in situ*. Физиологические концентрации моноаминов намного меньше и в обычных условиях они прямо вряд ли влияют на функции митохондрий. Однако при патологических состояниях и особенно при лекарственном торможении моноаминоксидаз ситуация может измениться. В головном мозге, например, обнаружено повышение содержания некоторых моноаминоксидаз более чем на 2 порядка [11]. Прием во время лечения ингибиторами моноаминоксидаз в пищу сыра, содержащего большие количества тирамина, нередко сопровождается возникновением «сырного синдрома» [5]. Вполне возможно, что одним из патохимических элементов его развития является прямое торможение тирамином энергетических функций митохондрий.

Автор признателен проф. В. З. Горкину за полезные замечания и постоянный интерес к работе.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Виноградов А. Д., Гаврикова Э. В., Головешкина В. Г. // Биохимия. — 1976. — Т. 41, № 7. — С. 1155—1168.
2. Виноградов А. Д. // Реакции живых систем и состояние энергетического обмена. — Пушино, 1979. — С. 98—125.
3. Виноградов А. Д. // Успехи биол. химии. — 1985. — Т. 26. — С. 64—82.
4. Горкин В. З., Кривченкова Р. С. // Вопр. мед. химии. — 1971. — № 1. — С. 65—72.
5. Горкин В. З. Аминооксидазы и их значение в медицине. — М., 1981.
6. Каган В. Е., Смирнов А. В., Савов В. М. и др. // Вопр. мед. химии. — 1984. — № 1. — С. 112—118.
7. Кривицкене З. И., Вайткус П. А., Ясайтис А. А. // Биологические и структурные аспекты гомеостаза в изолированных системах и организме. — Красноярск, 1987. — С. 22—32.
8. Кривченкова Р. С. // Биохимия. — 1974. — Т. 39, № 1. — С. 79—85.
9. Кулинский В. И., Медведев А. Е., Воробьева Л. М. и др. // Молекулярные механизмы и регуляция энергетического обмена. — Пушино, 1987. — С. 161—174.
10. Ленинджер А. Митохондрия. — М., 1966.
11. Axelrod J., Saavedra J., Usdin E. // Trace Amines and the Brain. — New York, 1976. — P. 1—20.
12. Famulski K. S., Nalecz M. J., Wojtczak I. // FEBS Lett. — 1983. — Vol. 157, N 1. — P. 124—128.
13. Gornall A. G., Bardawill C. J., David M. M. // J. biol. Chem. — 1949. — Vol. 177, N 3. — P. 751—766.
14. McEwen Ch. M., Sasaki G., Jones D. C. // Biochemistry (Wash.). — 1969. — Vol. 18, N 10. — P. 3952—3962.
15. McMurchie E. J., Gibson R. A., Abeywardena M., Charnock J. S. // Biochim. biophys. Acta. — 1983. — Vol. 727, N 1. — P. 163—169.
16. Mokhova E. N., Skulachev V. P., Zhigacheva S. N. // Ibid. — 1977. — Vol. 501, N 2. — P. 415—423.
17. Pedersen P. L., Greenwall J. M., Reynafarje B. et al. // Meth. Cell. Biol. — 1978. — Vol. 20. — P. 411—481.
18. Sivaramakrishnan S., Panini S. R., Ramasarma T. // Indian J. Biochem. Biophys. — 1983. — Vol. 20, N 1. — P. 23—28.
19. Solani G., Tadolini B. // Biochem. J. — 1984. — Vol. 218, N 2. — P. 495—499.
20. Tabor C. W., Tabor H. // Ann. Rev. Biochem. — 1984. — Vol. 53. — P. 749—790.
21. Trevor A. J., Gastagnoli N., Caldera P. et al. // Life Sci. — 1987. — Vol. 40, N 8. — P. 713—719.
22. Williamson J. R., Cooper R. H., Hoek J. B. // Biochim. biophys. Acta. — 1981. — Vol. 639, N 3/4. — P. 243—295.
23. Wojtczak L., Nalez M. J. // Europ. J. Biochem. — 1979. — Vol. 94, N 1. — P. 99—107.
24. Wojtczak L., Adams V., Brdiczka D. // Molec. Cell. Biochem. — 1988. — Vol. 79, N 1. — P. 25—30.

Поступила 16.01.89

#### REGULATION OF ENERGY FUNCTIONS OF MITOCHONDRIA BY BIOGENIC AMINES

A. E. Medvedev

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

Biogenic amines (phenylethylamine, tyramine, dopamine, tryptamine, serotonin and spermine) decreased activities of the rotenone-insensitive NADH-cytochrome c reductase, the succinate cytochrome c reductase and the succinate dehydrogenase in incubation mixtures containing mitochondrial membranes and the monoamine oxidase inhibitors chlorgyline and deprenyl. Spermine exhibited its influences at lower concentrations as compared with other monoamines. The effect of monoamines depended on presence of hydroxyl group (or groups) in the aromatic ring which led to elevation of the inhibitory effects. Lysis of membranes by Triton X-100 prevented the inhibitory action of all the compounds studied on succinate dehydrogenase. Alterations in content of some biogenic amines under pathological conditions and especially in drug inhibition of the monoamine oxidases appear to influence the energy functions of mitochondria, possibly via changes in the surface charge of the membranes.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.24-002.5-07:616.155.25-008.931:577.152.633

И. К. Ряпосова, Е. Г. Иошина, И. С. Северина

#### ГУАНИЛАТЦИКЛАЗА ТРОМБОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Циклические нуклеотиды (цАМФ и цГМФ) регулируют практически все стороны метаболизма клетки как в норме, так и при патологии. цГМФ выполняет при этом самостоятельную, отличную от цАМФ роль мощного регулятора различных процессов в клетке, и изменение содержания цГМФ может способствовать превращению нормальной клетки в патологическую. Одним из основных ферментов обмена цГМФ является гуанилатциклаза — ГЦ (ГТФ-пирофосфат-лиаза циклизующая; КФ 4.6.1.2), катализирующая биосинтез цГМФ и в основном ответственная за содержание и накопление нуклеотида в тканях. В литературе неоднократно указывалось на изменение содержания цГМФ при ряде патологических состояний, однако роль ГЦ при патологии практически не исследована.

Известно, что изменение активности ГЦ происходит не только в органах и тканях, но и в форменных элементах крови, в том числе и в тромбоцитах. Последние характеризуются высокой активностью ГЦ, которая содержится в этих клетках в основном (95 %) в растворимой форме [9, 10, 12]. Ранее нами [4] выявлена аналогия в изменении активности растворимой ГЦ в сердце и тромбоцитах кролика в динамике развития экспериментального аллергического миокардита с наиболее резко выраженными изменениями в тромбоцитах. Таким образом, тромбоцитарная ГЦ оказалась весьма чувствительной к происходящим в миокарде изменениям в результате развития воспалительного процесса, характеризующегося усилением перекисного окисления липидов и свободнорадикальных реакций [2]. Последние, как из-

вестно, резко влияют на активность растворимой ГЦ и ее регуляцию [6].

В литературе мы не встретили работ о функционировании ГЦ при туберкулезе легких. Имеющиеся к настоящему времени исследования по циклическим нуклеотидам при данной патологии немногочисленны и посвящены только изменению уровня этих нуклеотидов в плазме крови [1, 5, 7]. Так, по данным [5], в плазме крови больных туберкулезом отмечается незначительное снижение уровня цАМФ и повышение уровня цГМФ. Через 6 мес антибактериального лечения (стрептомицин, изониазид, ПАСК) у 53 % снижается уровень цАМФ, а к 3-му месяцу повышается содержание цГМФ. Авторы отмечают зависимость между уровнем цАМФ и цГМФ и эффективностью лечения. У больных туберкулезом легких отмечено [7] повышение содержания цАМФ и снижение уровня цГМФ. В процессе лечения при некоторых формах туберкулеза (например, при деструктивной) изменения в уровнях циклических нуклеотидов к 3-му месяцу углублялись, однако к 6-му месяцу лечения достигали нормальных показателей [7]. Эти данные мало информативны и гораздо большее значение имеет исследование ферментных систем, ответственных за обмен этих нуклеотидов и, в частности, ГЦ.

Поэтому целью настоящей работы было исследование активности растворимой ГЦ и ее регуляции в тромбоцитах человека — у здоровых доноров и больных туберкулезом легких.

**Методика.** Обследовано 29 больных инфильтративным туберкулезом легких. Определение активности ГЦ тромбоцитов проводили при поступлении больных в клинику и в процессе лечения антибактериальными препаратами (стрептомицин, изониазид, ПАСК, бензилпенициллин). Всем больным при поступлении в стационар и в процессе лечения применяли обязательные методы диагностики туберкулеза (К-графия; клинические и биохимические анализы крови и др.). Контрольную группу составили 9 здоровых доноров. Тромбоциты выделяли из венозной крови при комнатной температуре по методу [8]. Суспензию отмытых тромбоцитов в 50 мМ трис-НСI-буфере (рН 7,6), содержащем 0,2 мМ дитиотреитол, разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе MSE-5-78 (Великобритания) в течение 20 с при 2—4 °С при амплитуде 16 мкм, а затем центрифугировали 1 ч при 105 000 g. Надосадочную жидкость использовали в качестве ферментного препарата ГЦ.

Определение активности ГЦ проводили в соответствии с рекомендациями работ [8, 11]. При исследовании эффекта нитропруссид натрия последний (в конечной концентрации в пробе 0,1 мМ) пренкубировали с ГЦ в течение 45 мин при 4 °С. Реакционная смесь (общий объем 150 мкл), приготовленная на холоде, содержала 50 мМ трис-НСI-буфер (рН 7,6), 1 мМ ГТФ, 4 мМ MgCl<sub>2</sub> или MnCl<sub>2</sub>, 4 мМ креатинфосфат, 100 мкг (50 ед/мг) креатинфосфокиназы («Reanal», ВНР), 10 мМ теофиллина, ферментный препарат (супернатант 105 000 g) — 10—15 мкг белка. Пробы инкубировали 10 мин в водном термостате при 37 °С. Реакцию останавливали перенесением проб на 2 мин в кипящую водяную баню с последующим охлаждением на ледяной бане. Образовавшийся цГМФ определяли при помощи наборов реактивов

«GMP RIA Kit» («Amersham», Великобритания). Активность ГЦ выражали в пикомолях образовавшегося цГМФ на 1 мг белка за 1 минуту. Содержание белка определяли по методу O. Lowry [13]. В работе использовали GTP-динатриевую соль («Fluka», Швейцария), дитиотреитол («Serva», ФРГ), нитропруссид натрия («Chemapol», ЧССР), остальные реактивы и соли фирмы «Sigma», США. Результаты экспериментов обрабатывали статистически, достоверность различий оценивали по критерию / Стьюдента [3].

**Результаты и их обсуждение.** Содержание тромбоцитов у всех больных при поступлении в стационар и в динамике лечения антибактериальными препаратами не изменялось и не отличалось от нормальных показателей (150 000—320 000 в 1 мкл крови). Активность растворимой ГЦ и активируемость фермента нитропруссидом натрия определяли в тромбоцитах больных инфильтративным туберкулезом легких до начала лечения (сразу при поступлении больных в стационар) и через определенные сроки антибактериальной терапии: в течение 1-го месяца (5—35 дней), 1,5—2 мес (40—70 дней), 2,5—3,5 мес (80—110 дней) и свыше 4 мес (125—148 дней). Исследованные нами больные инфильтративным туберкулезом легких различались по распространенности процесса в легких. Если было поражено более 2 сегментов органа, процесс считали распространенным, менее 2 — ограниченным. Поэтому сначала были сопоставлены величины активности растворимой ГЦ с Mg<sup>2+</sup> или Mn<sup>2+</sup> до начала лечения в зависимости от распространенности процесса в легких. Полученные данные не выявили существенных различий. Так, активность тромбоцитарной ГЦ до начала лечения при ограниченном и распространенном процессах инфильтративного туберкулеза легких составляла (в пмоль цГМФ на 1 мг белка за 1 мин) с Mg<sup>2+</sup> 147±0,5 и 159±5,3, а с Mn<sup>2+</sup> 340±45 и 331±31. Не было существенных различий в активности тромбоцитарного фермента в зависимости от распространенности процесса в легких и в процессе лечения (данные не приводятся). Поэтому в табл. 1 представлены величины активности растворимой ГЦ с Mg<sup>2+</sup> или Mn<sup>2+</sup> в качестве кофакторов фермента в норме, до начала лечения и в процессе терапии инфильтративного туберкулеза легких вне зависимости от распространенности процесса в органе. Как видно, активность ГЦ тромбоцитов больных до начала лечения практически не отличается от нормы, составляя для ГЦ с Mg<sup>2+</sup> 104 %, а с Mn<sup>2+</sup> 111 % от соответствующих величин активности тромбоцитарного фермента здоровых доноров.

В течение 1-го месяца лечения активность ГЦ с Mg<sup>2+</sup> слегка повышается (приблизительно до 132 %), а с Mn<sup>2+</sup> сохраняется на том же уровне, что и до начала лечения (составляя около 111 %

Таблица 1

Активность ГЦ (в пмоль цГМФ на 1 мг белка за 1 мин) в тромбоцитах доноров и больных инфильтративным туберкулезом легких до лечения и в процессе антибактериальной терапии ( $M \pm m$ )

Кофактор	Доноры	Больные				
		до лечения	продолжительность лечения, дни			
			5—35	40—70	80—110	125—148
Mg <sup>2+</sup>	147±14,4 (100)	154±5,3 (104)	194±8,1 (132)	234±25,8 (159)	197±21,2 (132)	142±6,4 (97)
Mn <sup>2+</sup>	290±46 (100)	331±31 (111)	328±21 (111)	388±47,8 (133)	356±6,9 (122)	321±35 (110)

Примечание. В скобках — процент от нормы.



Влияние туберкулиновой пробы на активность растворимой ГЦ тромбоцитов и активацию фермента нитропруссидом натрия, пмоль цГМФ на 1 мг белка за 1 мин ( $M \pm m$ )

Показатель	До введения туберкулина	Через 48 ч после введения туберкулина
ГЦ с $Mn^{2+}$	$355 \pm 64,5$	$300 \pm 28,2$
ГЦ с $Mg^{2+}$	$228 \pm 42,0$	$215 \pm 10,9$
Активация нитропруссидом натрия	$6,5 \pm 1,16$	$6,4 \pm 0,3$

от нормы). Через 2 мес антибактериальной терапии активность растворимой ГЦ в тромбоцитах больных инфильтративным туберкулезом продолжает повышаться, достигая для ГЦ с  $Mg^{2+}$  156 %, а с  $Mn^{2+}$  133 % от нормы. После 3-месячного лечения активность тромбоцитарной ГЦ как с  $Mg^{2+}$ , так и с  $Mn^{2+}$  имеет тенденцию к нормализации. При лечении в течение 4 мес и более активность ГЦ с  $Mg^{2+}$  возвращается к норме, а с  $Mn^{2+}$  составляет приблизительно 110 % от последней. Клинический анализ исследованных больных после 4-месячного лечения показал, что если и сохранялись деструктивные изменения в легких, указывающие на сохранение патологического процесса, то они носили ограниченный характер.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что при инфильтративном туберкулезе легких вне зависимости от распространенности процесса активность тромбоцитарной ГЦ до начала лечения не отличается от нормы. В процессе антибактериальной терапии наблюдается некоторое повышение активности фермента, наиболее отчетливо выраженное при использовании в качестве кофактора фермента  $Mg^{2+}$  и в основном через 2 мес лечения (приблизительно до 160 %) с последующим возвращением (через 4 мес после начала лечения) к величинам, характерным для нормы. Отмеченное повышение гуанилатциклазной активности может быть связано с наблюдаемой при данной патологии интенсификацией процессов перекисного окисления липидов (к которому чувствительна растворимая ГЦ). С другой стороны, в результате длительного приема больными изоиазида возможно накопление продукта его распада — гидразина, являющегося активатором растворимой ГЦ. Исследование активации растворимой ГЦ тромбоцитов нитропруссидом натрия (сосудорасширяющим препаратом, характеризующимся наличием в молекуле свободнорадикальной группы NO) представлено на рисунке, из которого видно, что у всех нелеченых больных степень активации ГЦ достоверно и значительно (в 4 раза) снижена. Причем степень снижения не зависела от глубины и распространенности исследованного патологического процесса в легких. В ходе антибактериальной терапии степень активации ГЦ нитропруссидом натрия постепенно нормализуется и после 4-месячного лечения остается сниженной только у больных, в легких которых сохраняются деструктивные изменения (при наличии деструктивных изменений активация снижена в  $7,8 \pm 0,46$  раза, при отсутствии последних — в  $13,9 \pm 1,75$  раза).

Таким образом, приведенные данные показывают, что процессы с преобладанием экссудатив-

ной фазы воспаления в легких, наличием распада сопровождаются снижением активируемости тромбоцитарной ГЦ нитропруссидом натрия на фоне практически неизменной (по сравнению с нормой) активности фермента. Обширность туберкулезного процесса и степень интоксикации не влияют на величину этих показателей.

Для подтверждения того, что обострение патологического процесса при инфильтративном туберкулезе легких не влияет на активность тромбоцитарной ГЦ и активируемость фермента нитропруссидом натрия, четверым больным была проведена проба с подкожным введением 20 ТЕ туберкулина. Через 48 ч у всех больных проба имела резко положительную реакцию. В табл. 2 представлены результаты определения активности ГЦ и активируемости фермента нитропруссидом натрия до введения туберкулина и через 48 ч после проведения туберкулиновой пробы.

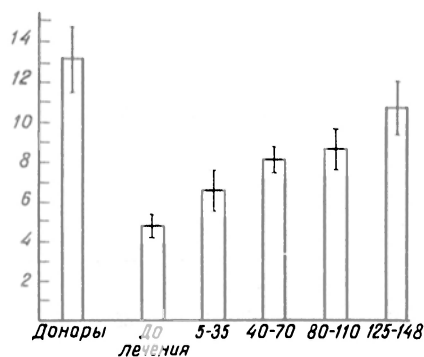
Из табл. 2 видно, что активность ГЦ (с  $Mg^{2+}$  или  $Mn^{2+}$ ) и активируемость фермента нитропруссидом натрия до введения туберкулина и через 48 ч после туберкулиновой пробы практически не различаются.

Таким образом, активность тромбоцитарной ГЦ не нарушена в тромбоцитах больных инфильтративным туберкулезом легких (вне зависимости от распространенности процесса). В то же время при этой патологии резко снижена способность фермента к активации нитропруссидом натрия. Изменение степени активируемости тромбоцитарной ГЦ указанным соединением в ходе антибактериальной терапии хорошо коррелирует с эффективностью лечения: чем успешнее лечение, тем быстрее нормализуется этот показатель.

Мы полагаем, что степень активации ГЦ тромбоцитов больных инфильтративным туберкулезом легких нитропруссидом натрия может быть одним из дополнительных показателей, подтверждающих эффективность проводимой терапии.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Березовский Б. А., Марчак В. В. // Пробл. туб.— 1980.— № 6.— С. 22—26.
- Бурлакова Е. Б. // Кардиология.— 1980.— № 7.— С. 48—52.
- Каминский Л. С. // Статистическая обработка лабораторных и клинических данных.— Л., 1964.
- Мирошник В. П., Рязанова И. К., Чарахьян И. А., Крюкова Г. В., Северина И. С. // Вопр. мед. химии.— 1988.— № 2.— С. 34—38.
- Примак А. А., Шестерина М. В., Горбачевская Л. В. и др. // Пробл. туб.— 1984.— № 1.— С. 38—41.
- Северина И. С. // Вестн. АМН СССР.— 1987.— № 7.— С. 48—52.
- Сокол Т. В. // Пробл. туб.— 1985.— № 10.— С. 46—49.



Активация нитропруссидом натрия активности ГЦ (с  $Mg^{2+}$ ) тромбоцитов больных инфильтративным туберкулезом легких в разные сроки лечения.

По оси абсцисс — сроки лечения, дни; по оси ординат — степень активации гуанилатциклазы нитропруссидом натрия.

8. Чирков Ю. Ю., Тышук И. А., Бедушкина Н. Н., Северина И. С. // Биохимия. — 1987. — Т. 52, вып. 6. — С. 956—963.
9. Bohme E., Jung R., Mechler J. // Methods in Enzymology N. Y. Acad. Press. — 1974. — Vol. 38. — P. 199—202.
10. Braughler J. M. // Biochim. Biophys. Acta. — 1980. — Vol. 616. — P. 94—104.
11. Garbers D. L., Murad F. // Advanc. Cycl. Nucl. Res. — 1979. — Vol. 10. — P. 57—67.
12. Glass D. B., Frey W., Carr D. W. et al. // J. Biol. Chem. — 1977. — Vol. 252. — P. 1279—1285.
13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.

Поступила 09.01.89

## HUMAN THROMBOCYTE GUANYLATE CYCLASE IN PULMONARY TUBERCULOSIS

I. K. Ryaposova, E. G. Ioshina, I. S. Severina

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

Activity of soluble guanylate cyclase and activating effect of sodium nitroprusside were studied in thrombocytes of patients with infiltrative form of pulmonary tuberculosis before treatment (as soon as patients entered the hospital) and within various periods of the antibacterial therapy course: during the first month, 1.5-2, 2.5-3.5 and more than 4 months of treatment. Before treatment activity of guanylate cyclase in the patients thrombocytes was similar to that of donors independently on severity of the process in lungs (impairment of more or less two lung segments). During the antibacterial therapy the enzyme activation was detected, which reached 160 % of the normal level within 2 months course and decreased down to the control rate within 4 months of treatment. The activating effect of sodium nitroprusside was distinctly decreased (by 70 %) in thrombocytes of patients with infiltrative form of pulmonary tuberculosis before the treatment course, while the pattern was restored to the normal level, comparable with control values in donors, within 4 months of the treatment. The stimulating effect of sodium nitroprusside on guanylate cyclase activity in thrombocytes of patients with infiltrative form of pulmonary tuberculosis may be used as an additional criterion for evaluation of the therapeutic course efficiency.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.127-005.4-092.9-07:616.155.25-008.931:577.152.634

О. Г. Бусыгина, Ю. Б. Колосков, Е. А. Демуров, И. С. Северина

## РАСТВОРИМАЯ ГУАНИЛАТЦИКЛАЗА ТРОМБОЦИТОВ КРЫСЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ МИОКАРДА

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Гуанилатциклаза — ГЦ (КФ 4.6.1.2) катализирует биосинтез циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) — мощного регулятора функциональной активности клетки. ГЦ ответственна в основном за содержание и накопление этого нуклеотида в клетке. Фермент существует в двух формах — растворимой и мембранно-связанной, которые, как теперь установлено, представляют собой не только разные белки, но и ферменты с различным механизмом регуляции [7, 10]. В литературе неоднократно указывалось на изменения содержания цГМФ при ряде патологических состояний, однако роль ГЦ при патологии практически не исследована. Характерным свойством растворимой ГЦ является способность фермента активироваться продуктами перекисного окисле-

ния липидов и свободными радикалами [9, 12]. Ранее [4] при исследовании активности растворимых форм ГЦ в сердце и тромбоцитах кролика в динамике экспериментального аллергического миокардита была выявлена аналогия в изменении активности фермента в сердце и тромбоцитах с наиболее резко выраженными изменениями в тромбоцитах.

Целью настоящей работы было исследование активности растворимой ГЦ и ее регуляции в тромбоцитах крысы при другой экспериментальной патологии — острой ишемии миокарда, также характеризующейся усилением перекисного окисления липидов и интенсификацией свободнорадикальных процессов [6].

**Методика.** В экспериментах использовали 26 беспородных крыс-самцов массой 200—250 г. Острую ишемию миокарда у крыс вызывали перевязкой нисходящей ветви левой коронарной артерии на границе верхней и средней трети под гексеналовым наркозом в условиях искусственной вентиляции легких [2]. О наличии ишемии судили по повышению на электрокардиограмме сегмента ST и появлению специфического ишемического комплекса Q—T. Растворимую форму ГЦ выделяли из тромбоцитов по ранее описанному методу [3].

При сборе крови в качестве антикоагулянта использовали 0,2 М этилендиаминтетраацетат (ЭДТА) в 0,9 % растворе NaCl pH 7,4 в соотношении с кровью 1:10. Цельную кровь разводили 20 мМ трис-HCl-буфером pH 7,4 в 0,9 % растворе NaCl (буфер А). Тромбоциты получали путем наслаивания обогащенной тромбоцитами плазмы на Ficoll-Paque («Pharmacia», Швеция) в соотношении 1:1. Все процедуры проводили при комнатной температуре. После промывания осадок тромбоцитов ресуспендировали в 20 мМ трис-HCl-буфере pH 7,6 при 4 °С. Тромбоциты разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе MSE 5-78 (Великобритания) в течение 20 с при амплитуде 16 мкм, при 4—6 °С. Полученную суспензию центрифугировали при 105 000 г 60 мин; супернатант использовали в качестве препарата ГЦ.

Активность фермента определяли по количеству цГМФ, образованного из гуанозинтрифосфата (ГТФ), по методу [3]. Пробы (общий объем 150 мкл) содержали 50 мМ трис-HCl-буфера (pH 7,6), 1 мМ ГТФ, 4 мМ MnCl<sub>2</sub> или 4 мМ MgCl<sub>2</sub>, 4 мМ креатинфосфат, 20 мкг (120—160 ед.) креатининфосфокиназы («Reanal», Венгрия), 10 мМ терфилин, 20 мкг препарата ГЦ (супернатант 105 000 г). Пробы инкубировали при 37 °С в течение 10 мин. Реакцию начинали с добавления субстрата, останавливали нагреванием проб в водяной бане при 92—94 °С в течение 2 мин с последующим охлаждением на ледяной бане. Денатурированный белок отделяли центрифугированием (10 мин при 1500 г). В полученном супернатанте определяли содержание образованного цГМФ с помощью набора реактивов «cGMP Ria kit» («Amersham», Великобритания) по прилагаемой методике. Литиотрейтол (ЛТТ) и нитропруссид натрия вносили в инкубационную среду в указанных концентрациях и преинкубировали с ферментом в течение 45 мин при 4 °С до добавления субстрата.

Содержание белка определяли по методу [11]. В работе использовали динатриевую соль ГТФ («Fluka», Швейцария), ЛТТ («Serva», ФРГ), натрия нитропруссид («Chemarol», Чехословакия), Ficoll-Paque («Pharmacia», Швеция), креатинфосфокиназу («Reanal», Венгрия). Остальные реактивы и соли фирмы «Sigma», США.

**Результаты и обсуждение.** Из таблицы видно, что уже через 15 мин после перевязки коронарной артерии, сопровождающейся развитием острой ишемии миокарда, наблюдается снижение активности растворимой ГЦ тромбоцитов крысы. Это снижение наиболее резко выражено при определении активности фермента с Mg<sup>2+</sup> (остаточная активность 19 %) и в меньшей степени при использовании Mn<sup>2+</sup> (остаточная активность 46 %). Через 24 ч после перевязки артерии активность ГЦ (с Mg<sup>2+</sup>) слегка повышается,

Intactные крысы		Крысы с ишемией миокарда			
Mn <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	через 15 мин после операции		через 24 ч после операции	
		Mn <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>
75,4±7,3	15,2±3,2	34,6±1,1 (45,8)	2,9±0,4 (18,1)	37,2±2,9 (49,3)	5,1±10,8 (33,5)

Примечание. В скобках — процент от нормы.

но продолжает оставаться намного ниже нормы (остаточная активность 33,5 %). Активность с Mn<sup>2+</sup> сохраняется на том же уровне, что и через 15 мин после операции. Снижение базальной активности растворимой ГЦ (с Mg<sup>2+</sup>) после перевязки коронарной артерии наблюдается и в ишемизированной зоне миокарда. Однако в этом случае остаточная активность ГЦ через 15 мин после операции составляет приблизительно 45 % (в тромбоцитах 19 %; данные не приводятся).

Ранее мы показали, что растворимые формы ГЦ могут находиться в разной степени окисленности фермента. Так, ДТТ, добавленный в пробу в конечной концентрации  $2 \cdot 10^{-3}$  М, стимулирует активность растворимой ГЦ крысы (до 450 %), но снижает активность фермента из тромбоцитов человека (до 80 %), что указывает на большую степень окисленности растворимой ГЦ тромбоцитов крысы. В результате перевязки коронарной артерии степень активации ГЦ тромбоцитов крысы ДТТ также резко возрастает. Из рисунка видно, что если в норме доза  $2 \cdot 10^{-4}$  М ДТТ стимулирует тромбоцитарную ГЦ до 288 %, то через 15 мин после перевязки коронарной артерии активация фермента в дозе  $2 \cdot 10^{-4}$  М ДТТ повышается до 790 %. Через 24 ч после операции стимуляция ГЦ снижается до 340 %, т. е. практически возвращается к величине, характерной для нормы (288 %). Известно, что растворимая форма ГЦ (за счет присутствия на молекуле фермента лабильных SH-групп) высокочувствительна к действию различных окислителей эндо- и экзогенной природы [6]. Определенная степень окисления этих SH-групп активирует фермент, более глубокое окисление — ингибирует. Известно, что при ишемии миокарда усилены перекисное окисление липидов и свободнорадикальные процессы,

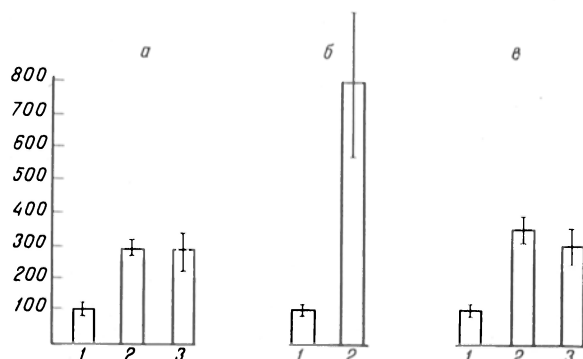
[1]. Следовательно, в зависимости от интенсивности этих процессов можно ожидать либо стимулирования активности растворимой ГЦ, либо ингибирования фермента. Резкое снижение активности тромбоцитарной ГЦ (с Mg<sup>2+</sup>) с одновременным повышением стимулируемости фермента ДТТ через 15 мин после операции (см. таблицу и рисунок) указывает на то, что интенсификация окислительных процессов при ишемии миокарда происходит на самых ранних стадиях развития патологии, и именно в этот период растворимая ГЦ тромбоцитов наиболее резко реагирует на происходящие в ткани миокарда патологические изменения. Изменения, менее выраженные в активности ГЦ с Mn<sup>2+</sup>, чем в таковой с Mg<sup>2+</sup>, в результате операции (см. таблицу), по-видимому, можно объяснить способностью Mn<sup>2+</sup> (как металла с переменной валентностью) оказывать дополнительное стимулирующее действие на ГЦ, и в тех случаях, когда фермент уже находится в более окисленном состоянии, влияние Mn<sup>2+</sup> проявляется слабее.

Характерной особенностью растворимой ГЦ является способность фермента активироваться нитросоединениями, содержащими или образующими свободнорадикальную группу NO, в том числе нитропруссидом натрия [8].

Как известно, молекулярный механизм такой активации обусловлен взаимодействием свободнорадикальной группы NO нитропрусида натрия с гемом ГЦ с образованием комплекса нитрозил-гем, являющегося истинным активатором фермента [13]. Однако в опытах с ГЦ тромбоцитов крысы нам не удалось обнаружить стимуляции фермента нитропруссидом натрия [3]. Попытка выявить эту стимуляцию варьированием концентраций ДТТ в пробе или добавлением гемоглобина [3], успешно повышающими активацию ГЦ нитропруссидом натрия в других случаях (ГЦ тромбоцитов человека [5] или сердца крысы [3]), не увенчалась успехом. Из рисунка видно, что нитропруссид натрия не активирует ГЦ тромбоцитов крысы и через 24 ч после операции. Эти данные могут указывать на изначальную гемдефицитность растворимой ГЦ тромбоцитов крысы.

Следует отметить, что наблюдаемые изменения в функционировании растворимой ГЦ тромбоцитов крысы при исследуемой патологии не связаны с хирургической операцией, поскольку выраженность наблюдаемых изменений зависит от глубины поражения миокарда. В опытах со слабо выраженным экспериментальным повреждением миокарда или при отсутствии его развития функционирование растворимой ГЦ как в сердце, так и в тромбоцитах не отличается от нормы (данные не приводятся).

Таким образом, обнаруженные нами резкие изменения в активности растворимой ГЦ и ее регу-



Влияние дитиотрейтола (ДТТ) и нитропрусида натрия на активность гуанилатциклазы (ГЦ) тромбоцитов intactных крыс (а) и при ишемии миокарда: через 15 мин (б) и через 24 ч после операции (в).

По оси абсцисс: 1 — базальная активность ГЦ, 2 — в присутствии ДТТ ( $2 \cdot 10^{-4}$  М); 3 — в присутствии ДТТ ( $2 \cdot 10^{-4}$  М) и нитропрусида натрия ( $1 \cdot 10^{-4}$  М); по оси ординат — кратность стимуляции ГЦ по отношению к базальной активности (измеренной в присутствии Mg<sup>2+</sup>), принятая за 100 %.

ляции в тромбоцитах крысы при ишемическом поражении сердца указывают на высокую чувствительность тромбоцитарного фермента к происходящим в миокарде патологическим изменениям и на возможность раннего выявления этих нарушений при помощи исследований указанного фермента.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бурлакова Е. Б. // Кардиология.— 1980.— № 7.— С. 48—52.
2. Литвицкий П. Ф. // Бюл. экспер. биол.— 1982.— Т.— № 8.— С. 120—121.
3. Мирошниченко В. П., Бусыгина О. Г., Северина И. С. // Вопр. мед. химии.— 1989.
4. Мирошниченко В. П., Рытосова И. К., Чарахчян И. А., Крюкова Г. В., Северина И. С. // Там же.— 1988.— № 2.— С. 34—39.
5. Чирков Ю. Ю., Тышук И. А., Северина И. С. // Биохимия.— 1988.— Т. 53.— № 9.— С. 1520—1526.
6. Braughler J. M. // Biochem. biophys. Acta.— 1980.— Vol. 616.— P. 94—104.
7. E. J. Deib M. R., Parker C. D., White A. A. // Ibid.— 1987.— Vol. 928.— P. 83—91.
8. Gerzer R., Hofmann F., Bohme E. // Advanc. Cycl. Nucl. Res.— 1983.— Vol. 14.— P. 255—261.
9. Hidaka H., Asano T. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1977.— Vol. 74.— P. 3657—3661.
10. Ignarro L. J. // Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.— 1985.— Vol. 25.— P. 171—195.
11. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem.— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
12. Mittal C. K., Murad F. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1977.— Vol. 74.— P. 4360—4364.
13. Ohlstein E. M., Wood K. S., Ignarro L. J. // Arch. Biochem. Biophys.— 1982.— Vol. 218.— P. 187—197.

Поступила 17.01.89

#### SOLUBLE GUANYLATE CYCLASE FROM RAT THROMBOCYTES IN EXPERIMENTAL MYOCARDIAL ISCHEMIA

O. G. Busygina, Yu. B. Koloskov, E. A. Demurov, I. S. Severina

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

Activity of soluble guanylate cyclase and regulation of the enzyme were studied in thrombocytes of intact rats and under conditions of acute myocardial ischemia caused by ligation of left coronary artery. Distinct decrease in the enzymatic activity was detected already within 15 min after the operation: down to 19 % and 46 %, in presence of  $Mg^{2+}$  and  $Mn^{2+}$ , respectively, as compared with control values. Within 24 hrs of the ischemia the guanylate cyclase activity was slightly increased up to 33.5 % in  $Mg^{2+}$ -containing mixture and was unaltered (46 %) in presence of  $Mn^{2+}$ . Considerable activation of the enzyme by  $2 \cdot 10^{-4}$  M dithiotreitol (from 288 % to 790 %, respectively) was observed after 15 min of myocardial ischemia with subsequent normalization (down to 340 %) within 24 hrs. The data obtained suggest elevation of free-radical reactions, specific for myocardial ischemia, as well as high sensitivity of guanylate cyclase in thrombocytes to these reactions beginning from the early steps of the disease. Absence of the sodium nitroprusside stimulating effect on rat thrombocyte guanylate cyclase, found under conditions of both normal state and myocardial ischemia, may be due to initial hemodeficiency of the enzyme.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616-099-02:[612.263:633.11:632.4]-07:616-008.924.1]-092.9

#### И. Н. Сергеев, Л. В. Кравченко, Н. М. Пиля, А. Б. Батуханов, В. С. Соболев, Е. Э. Кузьмина, Л. М. Якушина, В. Б. Спиричев, В. А. Тутельян ВЛИЯНИЕ ТРИХОТЕЦЕНОВОГО МИКОТОКСИНА ДЕЗОКСИНИВАЛЕНОЛА (ВОМИТОКСИНА) НА ГОМЕОСТАЗ КАЛЬЦИЯ, ОБМЕН И РЕЦЕПЦИЮ ВИТАМИНА D У КРЫС

Институт питания АМН СССР, Москва

Трихотеценовые микотоксины, в том числе дезоксиниваленол (ДОН), ниваленол и Т-2 токсин, относятся к особо опасным природным загрязнителям пищевых продуктов и кормов. Это определяется широким спектром их токсического действия и повсеместным распространением их продуцентов — микроскопических грибов рода *Fusarium* [6, 7]. Исследования, проведенные в нашей стране, показали, что за 1986—1988 гг. в некоторых регионах до 100 % изученных образцов пшеницы содержали ДОН, причем более половины из них — в количествах, превышающих установленные предельно допустимые концентрации (ПДК) [5].

Ранее нами было показано, что подострое действие одного из трихотеценовых микотоксинов — Т-2 токсина — вызывает у растущих крыс нарушение обмена кальция и состояния костной ткани [3]. Эти нарушения сопровождаются изменениями обмена и рецепции ключевого кальций-регулирующего гормона — витамина D. В соответствии с современными представлениями этот витамин последовательно гидроксилируется в печени и почках с образованием гормональной формы — 1,25-дигидроксивитамина  $D_3$  [ $1,25(OH)_2D_3$ ], имеющего механизм действия, аналогичный таковому других стероидных гормонов [1, 11].

В настоящем сообщении приводятся данные о влиянии ДОН на обмен кальция, состояние костной ткани, обмен и рецепцию витамина D при его подостром введении растущим крысам. Полученные результаты указывают, что ДОН оказывает сходное с таковым Т-2 токсина, но существенно менее выраженное действие на гомеостаз кальция и его регуляцию. Использование в рационе высокого уровня витамина D позволяет предупредить нарушение обмена кальция, вызванное ДОН.

Методика. В опыте использовали самцов крыс-отъемышей Вистар с исходной массой тела около 50 г. Животные получали полусинтетический рацион, содержащий 0,6 % Са и 0,6 % Р [3]. Крысы были разделены на 4 группы по 10—12 животных в каждой: две контрольные (1-я и 2-я) и две подопытные (3-я и 4-я). Крысы 1-й и 3-й групп получали рацион, содержащий 1000 МЕ (0,025 мг) витамина  $D_3$  на 1 кг корма, что обеспечивало физиологическую потребность в этом витамине. Рацион животных 2-й и 4-й групп содержал 10 000 МЕ (0,25 мг) витамина  $D_3$  на 1 кг корма. Животным 3-й и 4-й групп вводили ДОН (внутрижелудочно ежедневно в дозе 10 мг/кг в течение 7 дней). Раствор токсина в воде готовили непосредственно перед введением, предварительно растворяя навеску в этаноле (конечная концентрация этанола не превышала 0,5 %).

В работе использован препарат ДОН, выделенный из культуры *Fusarium gramineum* 588a, выращенной на рисе. Токсин экстрагировали смесью ацетонитрил — вода (4:1), экстракт фильтровали и очищали на колонке со смесью



активного нейтрального угля и оксида алюминия [12]. После добавления к элюату изопропилового спирта и силикагеля растворитель удаляли в вакууме. Суспензию силикагеля в гексане с адсорбированным на нем ДОН наносили на вакуумируемую колонку с силикагелем и последовательно элюировали гексаном, смесью гексан — эфир (1:1), эфиром и смесью эфир — ацетон (14:1 и 6:1). Фракции, содержащие ДОН (контроль по ТСХ), объединяли и упаривали в вакууме досуха. ДОН дважды кристаллизовали из этилацетата.

Чистота препарата ДОН составила 97 % по данным ВЭЖХ на обращенной фазе ОДС  $C_{18}$  (колонка «Ultrasphere ODS», 5 мкм) в системе растворителей вода — метанол (70:30) с УФ-детектированием при длине волны 218 нм. По данным ГЖХ, анализа триметилсилилового (ТМС) производного ДОН на капиллярной кварцевой колонке с жидкой фазой OV-101 с использованием пламенно-ионизационного детектора чистота ДОН также составила 97 %. Масс-спектрометрический анализ («Vagian» MAT-44S; ионизирующее напряжение 70 эВ) ТМС-производного ДОН показал присутствие фрагментарных ионов с  $M/Z$  512 ( $M^+$ ), 497, 422, 407 и др., характерных для ТМС-производного этого токсина [13].

Однократная  $LD_{50}$  ДОН для растущих крыс-самцов Вистар при введении внутрь составила 67,5 мг на 1 кг массы тела.

Ранее нами было показано, что характерной особенностью подострого Т-2 микотоксикоза у крыс является нарушение соотношения активности ферментов метаболизма ксенобиотиков [9]. В связи с этим для оценки токсического действия ДОН в микросомах печени и слизистой тонкой кишки определяли содержание цитохрома Р-450, активность 7-этоксикумариндеэтилазы [10], UDP-глюкуронозилтрансфераз, а в цитозоле — активность глутатионтрансфераз, как описано ранее [9].

Метаболизм витамина  $D_3$  и 25-гидроксивитамина  $D_3$  (25-ОН $D_3$ ) изучали *in vitro* с использованием срезов печени и почек по описанному ранее методу [2, 3] с некоторыми модификациями. Концентрация субстратов, витамина  $D_3$  и 25-ОН $D_3$  в пробах составляла 25 и 5 мкМ соответственно. Предварительную хроматографическую очистку ацетонитрильных экстрактов тканей осуществляли на мини-колонках «Сер-Пак  $C_{18}$ », последовательно элюируя через них воду, смесь метанол — вода (7:3) и ацетонитрил (последняя фракция содержит метаболиты витамина  $D_3$ ).  $^3H$ -метаболиты  $D_3$  разделяли методом ВЭЖХ с использованием колонки «Ultrasphere ODS», 5 мкм, элюирующая система — метанол — вода (90:10).

Раздельное количественное определение концентрации незанятых и общих рецепторов 1,25 (ОН) $_2D_3$  в хроматиновой фракции почек осуществляли ранее описанными методами [2, 4] с модификациями. При определении концентрации незанятых рецепторов 1,25 (ОН) $_2D_3$  аликвоты суспензии хроматина (100 мкл, 0,1 мг белка) в гипотоническом ТЭД-буфере (10 мМ трис-НСl, 1,5 мМ ЭДТА, 1,0 мМ ДТТ, 0,3 мМ фенилметилсульфонилфторид) инкубировали в течение 17 ч при 0—4 °С с  $^3H$ -1,25 (ОН) $_2D_3$  в насыщающей концентрации (2,5 нМ)  $\pm$  250-кратный избыток немеченого 1,25 (ОН) $_2D_3$ . Общую концентрацию рецепторов гормона измеряли после обработки суспензии хроматина L-тозиламид-2-фенилхлорметилкетон (200 мкМ), блокирующим незанятые рецепторы, и последующей инкубации при 37 °С с  $^3H$ -1,25 (ОН) $_2D_3$  в насыщающей концентрации в течение 30 мин.

Концентрацию общего кальция, неорганического фосфора, 25-ОН $D_3$ , белка, активность щелочной фосфатазы (ЩФ) в сыворотке крови, транспорт кальция в тонкой кишке *in vitro*, показатели состояния костной ткани (плотность, содержание кальция и фосфора) определяли ранее описанными методами [2, 3].

**Результаты и обсуждение.** При введении ДОН крысам-отъемышам в дозе 10 мг на 1 кг массы тела (что соответствует  $1/7$   $LD_{50}$ ) в течение 7 дней не наблюдали каких-либо характерных симптомов его токсического действия, снижения прироста массы тела, изменения относительной массы печени и содержания в ней белка.

Не обнаружено существенных изменений активности изученных ферментов печени и слизистой оболочки тонкой кишки, за исключением умеренного возрастания активности одной из форм (фенобарбиталиндуцируемой) UDP-глюкуронозилтрансферазы в печени крыс, получавших ДОН на фоне нормального обеспечения витамином D. Возможно, это возрастание активности фермента отражает его участие в образовании глюкуронидов ДОН, которые являются основными метаболитами ДОН у крыс [8].

В то же время ДОН вызывал нарушение гомеостаза кальция, что проявлялось в умеренной гипокальциемии и снижении активного транспорта кальция в тонкой кишке (табл. 1). Концентрация  $P_{II}$  в сыворотке крови также несколько уменьшалась. Кроме того, достоверно на 25—30 % падала активность ЩФ в крови и слизистой оболочке тонкой кишки, а также концентрация белка в крови. В костной ткани при введении ДОН не наблюдалось значимых изменений, за исключением тенденции к уменьшению содержания кальция в диафизах бедренных костей.

На фоне рациона с высоким содержанием витамина D, обеспечивающим 10-кратное превышение физиологической потребности крыс в этом витамине, нарушений обмена кальция, вызываемых введением ДОН, не наблюдалось. В этом случае гипокальциемия, снижение всасывания кальция в кишечнике и падение активности ЩФ в крови и слизистой оболочке кишечника не обнаруживались (см. табл. 1).

Нарушение обмена кальция при подостром введении ДОН сопровождалось некоторыми изменениями в эндокринной системе витамина D. Наиболее существенным представляется значительное (на 40 %) снижение концентрации основного метаболита витамина D — 25-ОН $D_3$  в сыворотке крови, что сопровождалось уменьшением (на 30 %) активности 25-гидроксилазы витамина  $D_3$  в печени (табл. 2). В то же время метаболизм 25-ОН $D_3$  в почках не был нарушен: активность 1- и 24-гидроксилазы 25-ОН $D_3$  не отличалась от таковой в контроле. Связывание гормональной формы витамина  $D_3$  — 1,25 (ОН) $_2D_3$  — в почках

Таблица 1

Показатели сыворотки крови, всасывание кальция и активность щелочной фосфатазы в кишечнике у крыс при подостром введении ДОН

Группа животных	Содержание витамина D в рационе, МЕ/кг	Ca, мг/дл	$P_{II}$ , мг/дл	ЩФ, Е/л	Транспорт Ca в тонкой кишке, нмоль/см <sup>2</sup> · 15 мин	Активность ЩФ в кишечнике, нмоль/мин · мг белка
1-я (контроль)	1 000	9,8 $\pm$ 0,05	12,6 $\pm$ 3,8	139 $\pm$ 4	286 $\pm$ 12	212 $\pm$ 4
2-я (контроль)	10 000	10,1 $\pm$ 0,1	13,8 $\pm$ 0,2	206 $\pm$ 2**	304 $\pm$ 14	196 $\pm$ 3
3-я	1 000	8,8 $\pm$ 0,2*	11,2 $\pm$ 0,1	105 $\pm$ 2*	238 $\pm$ 9*	157 $\pm$ 2*
4-я	10 000	9,4 $\pm$ 0,2***	12,1 $\pm$ 0,3	200 $\pm$ 1**	292 $\pm$ 15**	202 $\pm$ 5**

Примечание. Здесь и в табл. 2: одна звездочка — достоверное отличие ( $p < 0,05$ ) от соответствующей контрольной группы (1-й или 2-й), две звездочки — достоверное отличие между группами, получавшими рацион с содержанием витамина D 1000 или 10 000 МЕ/кг.

Активность гидроксилаз витамина D<sub>3</sub> и 25-ОНD<sub>3</sub> в печени и почках, концентрации рецепторов 1,25 (ОН)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> в почках и 25-ОНD<sub>3</sub> в сыворотке крови у крыс при подостром введении ДОН

Группа животных	Содержание витамина D в рационе, МЕ/кг	25-ОНD в крови, нг/мл	25-ОНD в печени, нмоль/30 мин·г	1-ОНD в почке	24-ОНD в почке	Рецепторы 1,25 (ОН) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> в почках, фмоль/мг <sup>2</sup> белка		
				пмоль/30 мин·г		общие	незанятые	% занятых
1-я (контроль)	1 000	20,3±1,8	10,4±1,9	256±36	334±58	118±13,0	99,1±8,6	16,0
2-я (контроль)	10 000	43,4±3,1**	14,5±2,3	345±58	387±67	130±3,4	88,8±4,2	31,7
3-я	1 000	12,3±1,8*	7,68±2,1	229±41	372±97	115±4,5	93,2±4,3	18,9
4-я	10 000	31,5±6,0**	14,9±4,3	329±59	596±98	139±3,4**	104±10,4	33,6

также не изменялось (см. табл. 2). Важно отметить, что ДОН не влиял на регуляторные изменения активности гидроксилаз витамина D<sub>3</sub> и 25-ОНD<sub>3</sub>, а также на уровень занятых рецепторов 1,25 (ОН)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, наблюдающиеся при увеличении потребления витамина D. Наиболее существенным представляется то обстоятельство, что при высоком уровне витамина D в рационе полностью восстанавливалась активность 25-гидроксилазы витамина D<sub>3</sub> в печени и значительно возрастала концентрация 25-ОНD в крови.

Полученные данные свидетельствуют о том, что пероральное введение ДОН растущим крысам в дозе, не вызывающей каких-либо характерных проявлений токсического действия, вызывает нарушение обмена кальция, которое выражается в умеренной гипокальцемии и снижении всасывания минерала в тонкой кишке. Значимых изменений плотности и минеральной насыщенности костной ткани в этом случае не наблюдается.

Сравнение этих результатов с полученными нами ранее данными [3] о действии другого представителя трихотетенов — Т-2 токсина — в эквивалентной по токсичности дозе ( $1/7$  LD<sub>50</sub>) показывает, что ДОН оказывает одностороннее, но существенно менее выраженное действие на обмен кальция, в частности при индуцировании гипокальцемии и ингибировании активного транспорта кальция в кишечнике.

Механизм действия этих микотоксинов в части, реализующейся через изменения в эндокринной системе витамина D, также сходен. Оба токсина в первую очередь подавляют активность 25-гидроксилазы D<sub>3</sub> в печени и вызывают снижение концентрации 25-ОНD в крови, что указывает на развитие недостаточности витамина D. Однако такое лимитирование образования 25-ОНD<sub>3</sub>, являющегося субстратом для образования гормональной формы витамина D<sub>3</sub> — 1,25(ОН)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, еще не приводит к снижению продукции гормона. В то же время ДОН в отличие от Т-2 токсина не нарушает рецепцию витамина D в тканях-мишенях и, следовательно, уровень гормонального ответа в этом случае должен быть сохранен. Очевидно, снижение всасывания кальция и активности ЦФ в кишечнике, отмечаемое при введении ДОН, реализуется вне рамок регуляторных воздействий эндокринной системы витамина D. Тем не менее необходимо отметить, что вызываемое ДОН столь быстрое и значительное снижение концентрации 25-ОНD в крови при подавлении активности 25-гидроксилазы D<sub>3</sub> может привести к развитию глубокого дефицита витамина D

с выраженным нарушением гомеостаза кальция.

Таким образом, нами впервые получены данные, свидетельствующие о том, что ДОН при подостром введении вызывает нарушение обмена кальция и витамина D. В то же время эти нарушения предупреждаются введением витамина в высокой дозе.

Обобщая данные об эффектах ДОН и Т-2 токсина, можно заключить, что одно из важных проявлений токсического действия трихотетеновых микотоксинов заключается в расстройстве гомеостаза кальция, частично обусловленном нарушением регуляции обмена этого минерала эндокринной системой витамина D.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Сергеев И. И. // Вопр. мед. химии. — 1989. — № 1. — С. 2—11.
2. Сергеев И. И., Арханчев Ю. П., Ким Р. Х. и др. // Биохимия. — 1987. — № 11. — С. 1867—1874.
3. Сергеев И. И., Арханчев Ю. П., Кравченко Л. В. и др. // Вопр. мед. химии. — 1988. — № 4. — С. 51—57.
4. Сергеев И. И., Спиричев В. Б. // Бюл. экспер. биол. — 1988. — № 12. — С. 695—698.
5. Соболев В. С., Эллер К. И., Пименова В. В. и др. // Вопр. питания. — 1989. — № 6. — С. 3.
6. Тутельян В. А. // Вести. АМН СССР. — 1986. — № 11. — С. 8—15.
7. Тутельян В. А., Кравченко Л. В. Микотоксины. — М., 1985.
8. Gareis M., Bauer J., Gedeck B. // Mycotoxin Res. — 1987. — Vol. 3. — P. 25—32.
9. Kravchenko L. V., Tutel'yan V. A., Vasilyev A. V. et al. // Toxicology. — 1986. — Vol. 42. — P. 77—83.
10. Lake B. G. // Biochemical Toxicology: a Practical Approach. — Oxford, 1987. — P. 183—215.
11. Spirichev V. B., Sergeev I. N. // Wld Rev. Nutr. Diet. — 1988. — Vol. 56. — P. 173—216.
12. Trucksess M. W., Nesheim S., Eppley R. M. // J. Ass. Off. analyt. Chem. — 1984. — Vol. 67. — P. 40—43.
13. Yoshisawa T., Cole L. M., Swanson S. P., Buck W. B. // Agricul. Biol. Chem. — 1986. — Vol. 50. — P. 227—229.

Поступила 28.02.89

#### EFFECT OF TRICHOTETSENE-RELATED MYCOTOXIN DEOXYNIVALENOL ON CALCIUM HOMEOSTASIS, METABOLISM AND RECEPTION OF VITAMIN D IN RATS

I. N. Sergeev, L. V. Kravchenko, N. M. Piliya, A. B. Batukhanov, V. S. Sobolev, E. E. Kuz'mina, L. M. Yakushina, V. B. Spirichev, V. A. Tutel'yan

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

Metabolism of calcium and vitamin D was studied in young rats administered with trichotetsene-related mycotoxin deoxynivalenol (vomytoxin) at a daily dose of 10 mg/kg perorally within 7 days. The vomytoxin treatment caused a moderate

hypocalcemia, a decreased absorption of calcium in small intestine as well as led to decrease of alkaline phosphatase activity in blood and small intestine mucosal membrane. Density and saturation of bone tissue with minerals were not altered. Concentration of 25-OHD in blood and activity of vitamin D<sub>3</sub> 25-hydroxylase in liver tissue were decreased by 40 % and 30 %, respectively. Development of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> as well as concentration of total and free 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> receptors were not altered in kidney. At the same time, these impairments of calcium and vitamin D metabolism were prevented by providing high content of vitamin D in the ration — 0.25 mg/kg of food. Impairments in calcium metabolism caused by vomitoxin may be partially related to development of a secondary deficiency in vitamin D.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 615.322:547.918:[015.4:612.351.11:577.152.199.2

М. А. Абдугафурова, В. С. Ли, М. П. Шерстнев, Т. Б. Атанаев, А. Ш. Исамухамедов, Г. И. Бачманова

## ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКИСЛИТЕЛЬНЫХ СВОЙСТВ СОЛЕЙ ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ИХ ВЛИЯНИЯ НА МИКРОСОМАЛЬНУЮ МОНООКСИГЕНАЗНУЮ СИСТЕМУ ПЕЧЕНИ

ИИИ физико-химической медицины Минздрава РСФСР, ИИ ММИ им. Н. И. Пирогова, Москва

Глицирризиновая кислота представляет собой тритерпеновый гликозид, образованный из 1 молекулы глицирретиновой кислоты и 2 молекул глюкокуроновой кислоты (рис. 1). Соли глицирризиновой кислоты являются одним из основных биологически активных компонентов корней солодки *Glycyrrhiza glabra*. Высокая биологическая активность глицирризиновой кислоты объясняется, во-первых, структурной близостью входящей в ее состав глицирретиновой кислоты к эндогенным физиологически активным веществам, таким как глюко- и минералокортикостероиды, а, во-вторых, наличием в ее составе двух молекул глюкокуроновой кислоты, обуславливающих антидотное действие, т. е. связывание токсичных метаболитов. Благодаря этому препараты глицирризиновой кислоты нормализуют водно-солевой обмен [7], оказывают противовоспалительное действие [8]. Будучи антагонистом ацетилхолина и гистамина, глицирризиновая кислота проявляет выра-

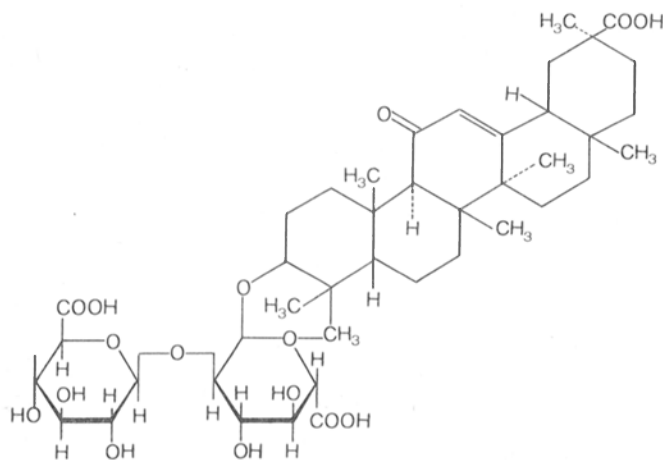


Рис. 1. Глицирризиновая кислота (β, β'-глюкуронидоглюкуронид глицирретиновой кислоты).

женную антиаллергическую активность [13]. Многочисленные исследования показали наличие у глицирризиновой кислоты антивирусной активности, в том числе против вируса иммунодефицита человека [10]. Препараты, содержащие глицирризиновую кислоту, широко применяются в Японии для лечения хронических гепатитов [9, 17]. Исследования, проведенные на модели токсического поражения культуры гепатоцитов четыреххлористым углеродом, показали, что глицирретиновая кислота оказывает антигепатотоксическое действие, которое в значительной степени может быть обусловлено ее антиокислительной активностью [12]. Несмотря на довольно широкое применение глицирризиновой кислоты в клинической практике, мы располагаем весьма ограниченными представлениями о взаимодействии ее с микросомальной монооксигеназной системой печени — основной детоксирующей системой организма. Целью настоящей работы явилось изучение с помощью хемилюминесцентного метода антиокислительной активности солей глицирризиновой кислоты, а также выяснение их влияния на цитохром P-450, являющийся ключевым ферментом микросомальной монооксигеназной системы печени.

**Методика.** Одно- и трехзамещенные натриевые и калиевые соли глицирризиновой кислоты (NaG, Na<sub>3</sub>G и KG, K<sub>3</sub>G соответственно) были получены из Института химии растительных веществ АН Узбекской ССР.

Антиокислительную активность солей глицирризиновой кислоты оценивали по тушению хемилюминесценции с использованием трех различных модельных систем. Одна из них позволяла исследовать люминолзависимую хемилюминесценцию лейкоцитов: к 1 мл буферного раствора, содержащего 15 мМ трис-HCl, pH 7.4, 165 мМ NaCl, 2.25 мМ CaCl<sub>2</sub> и 25 мМ BaSO<sub>4</sub>, добавляли 0,1 мл 1,41·10<sup>-4</sup> М люминола и 0,02 мл цельной крови; соли глицирризиновой кислоты добавляли в начале или по достижении максимума хемилюминесценции. Вторая система содержала 3 мл буферного раствора указанного выше состава, 0,2 мл раствора пероксидазы хрена, имеющего концентрацию 20 мг/мл, и соответствующую соль глицирризиновой кислоты; хемилюминесценцию инициировали добавлением в эту систему 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Третья система позволяла оценивать хемилюминесценцию липосом из яичного фосфатидилхолина или гепаринизированной плазмы крови кролика в присутствии ионов двухвалентного железа: в кювету помещали 0,05 мл плазмы крови или суспензии липосом, 0,1 мл 1 мМ родамина ж и 5 мл 20 мМ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4; хемилюминесценцию инициировали добавлением раствора FeSO<sub>4</sub> до конечной концентрации 2,5 мМ; соли глицирризиновой кислоты добавляли на максимуме хемилюминесценции. Конечная концентрация солей глицирризиновой кислоты во всех случаях составляла 70 мкМ. Все измерения проводили на хемилюминесцентре ИФХМВ-1 с ФЭУ-127 при температуре 37 °С.

В работе использовали беспородных белых крыс-самцов массой 100—120 г. Микросомальную фракцию из печени крыс выделяли с помощью метода дифференциального центрифугирования [1]. Цитохром P-450 (изоформа L.M.) выделяли из микросом печени кроликов, индуцированных фенobarбиталом [3]. Содержание цитохрома P-450 в препаратах микросом и изолированного фермента определяли методом [15] на спектрофотометре «Hitachi-557» (Япония). Инактивацию изолированного цитохрома P-450 исследовали путем регистрации изменений дифференциальных спектров гемопroteина [6]. Инкубационная смесь содержала 0,33 нмоль цитохрома P-450 в 1 мл трис-HCl-буфера, pH 7.4. После пропускания СО через опытную кювету в течение 1 мин и добавления в обе кюветы по 2 мг дитионита регистрировали дифференциальный спектр цитохрома P-450 при 30 °С в течение 20 мин. Для исследования влияния солей глицирризиновой кислоты на инактивацию цитохрома P-450 их добавляли в инкубационную смесь в конечной концентрации 20 мМ, инкубировали при 30 °С в течение 5 мин, после чего регистрировали инактивацию цитохрома P-450, как описано выше.

Спектры связывания цитохрома P-450 с  $\text{Na}_2\text{G}$  регистрировали на спектрофотометре с диодным полем «Hewlett Packard 8451A» (США), который был снабжен микрокомпьютером HP-85. При расчете спектральной константы связывания цитохрома P-450 с  $\text{Na}_2\text{G}$  пользовались программой, составленной сотрудником Института химической физики АН СССР Л. Р. Давыдовым.

Для изучения способности  $\text{Na}_2\text{G}$  вызывать индукцию цитохрома P-450 крысам вводили  $\text{Na}_2\text{G}$  внутривенно из расчета 2 мг на 100 г массы в течение 3 дней, после чего животных забивали и выделяли микросомальную фракцию, как описано выше. Активность НАДФ-Н-цитохром с-редуктазы и НАДФ-Н-феррицианид-редуктазы в микросомах определяли по методу [16]. Скорость НАДФ-Н-зависимого окисления анилина и аминопирина в микросомах измеряли, как описано ранее [2].

**Результаты и обсуждение.** Одна из четырех использованных в данной работе солей глицирризиновой кислоты,  $\text{KG}$ , оказалась мало пригодной для проведения экспериментов, так как при растворении ее в воде наблюдалось образование геля. Поэтому для изучения антиокислительных свойств солей глицирризиновой кислоты использовали  $\text{NaG}$ ,  $\text{Na}_3\text{G}$  и  $\text{K}_3\text{G}$ . В табл. 1 приведены результаты оценки их антиокислительной активности, полученные с помощью различных хемилюминесцентных методов. Видно, что добавление солей глицирризиновой кислоты к лейкоцитам цельной крови вызывало тушение хемилюминесценции клеток, причем эффективность тушения была приблизительно одинаковой при добавлении солей глицирризиновой кислоты в начале или на максимум хемилюминесценции. Тушение хемилюминесценции под действием солей глицирризиновой кислоты в той или иной степени отмечалось и в других модельных системах. Обращает на себя внимание то, что эффективность тушения хемилюминесценции при добавлении солей глицирризиновой кислоты уменьшалась при использовании липидсодержащих систем активации хемилюминесценции. По-видимому, это может объясняться тем, что соли глицирризиновой кислоты, будучи водорастворимыми соединениями, проявляют наибольшую активность в отношении водорастворимых свободных радикалов. Сравнение этих результатов с данными о тушении хемилюминесценции плазмы крови под действием известных антиоксидантов и перехватчиков свободных радикалов — водорастворимого маннитола и жирорастворимого ионола — позволяет сделать вывод о том, что антиокислительная активность солей глицирризиновой кислоты сравнима с активностью, проявляемой в аналогичных условиях этими антиоксидантами, более того,

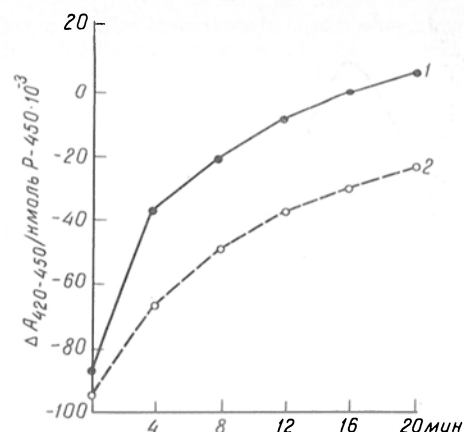


Рис. 2. Влияние  $\text{Na}_2\text{G}$  на инактивацию изолированного цитохрома P-450.

Инкубационная смесь содержала 0,33 мкмоль гемопротейна в 1 мл 100 мМ трис-НСl-буфера pH 7,4.  $\text{Na}_2\text{G}$  вносили в инкубационную смесь в конечной концентрации 20 мкМ. После 5 мин преинкубации регистрировали дифференциальные спектры поглощения восстановленных дитионитом натрия СО-комплексов цитохрома P-450 при 30 °C в течение 20 мин. 1 — P-450; 2 — P-450 +  $\text{Na}_2\text{G}$ .

она явно выше, чем у маннитола. Полученные результаты позволяют предполагать, что антигепатотоксическое действие глицирризиновой кислоты, наблюдавшееся ранее в экспериментах на культуре гепатоцитов, повреждаемых  $\text{CCl}_4$  [11], могло быть связано с ее антиокислительной активностью, поскольку известно, что начальным этапом в механизме цитотоксического действия  $\text{CCl}_4$  является его метаболическая активация цитохромом P-450 в эндоплазматическом ретикулуме клеток печени с образованием высокореакционноспособного  $\text{CCl}_3$  — радикала, индуцирующего перекисное окисление липидов [5].

Как было показано ранее, метаболическую активацию  $\text{CCl}_4$  в микросомах печени, приводящую к образованию  $\text{CCl}_3$ -радикала, осуществляет изоформа цитохрома P-450 с мол. массой 52 000 [14]. Поскольку анилингидроксилазную активность также проявляет изоформа цитохрома P-450 с мол. массой 52 000, то в плане выяснения возможных механизмов защитного действия глицирризиновой кислоты при отравлении  $\text{CCl}_4$  определенный интерес представляло изучение влияния глицирризинатов на анилингидроксилирующую активность микросом. В экспериментах *in vitro* было установлено, что скорость гидроксилирования анилина микросомами, выделенными из печени интактных крыс, в присутствии 1 мМ  $\text{Na}_3\text{G}$  снижается на 25 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем, не содержащим глицирризината.

Ранее было показано, что некоторые антиоксиданты оказывают защитное действие на цитохром P-450, замедляя инактивацию гемопротейна, восстановленного дитионитом натрия [4]. В связи с этим было исследовано влияние  $\text{Na}_3\text{G}$  на инактивацию изолированного цитохрома P-450 (изоформа  $\text{LM}_2$ ) — рис. 2. Скорость инактивации гемопротейна в присутствии  $\text{Na}_3\text{G}$  снижалась, что свидетельствует о стабилизирующем влиянии глицирризината на цитохром P-450.

При анализе связывания  $\text{Na}_3\text{G}$  с цитохромом P-450 микросом печени крыс было обнаружено, что глицирризинат образует с окисленным гемопротейном комплекс, характеризующийся дифференциальным спектром поглощения I типа

Таблица 1

Антиокислительная активность солей глицирризиновой кислоты

Соединение	Тушение хемилюминесценции (ХЛ), %			
	люминол-зависимая ХЛ		ХЛ в присутствии $\text{Fe}^{2+}$	
	пероксидаза, $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Cl}$	лейкоциты	плазма крови	липосомы
$\text{NaG}$ , 70 мкМ	$91 \pm 6$	$63 \pm 8$	$76 \pm 2$	—
$\text{Na}_3\text{G}$ , 70 мкМ	$94 \pm 4$	$96 \pm 2$	$74 \pm 1$	$50 \pm 7$
$\text{K}_3\text{G}$ , 70 мкМ	$92 \pm 5$	$82 \pm 1$	$82 \pm 2$	—
Ионол, 30 мкМ	—	—	$70 \pm 8$	—
Маннитол, 150 мкМ	—	—	$24 \pm 5$	—

Примечание. Все приведенные величины достоверны ( $p < 0,001$ ,  $n=5$ ) относительно исходной системы.



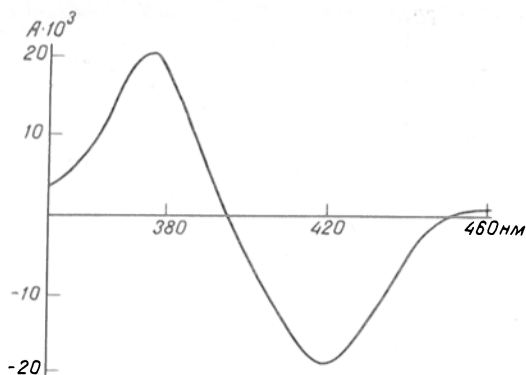


Рис. 3. Связывание цитохрома Р-450 микросом печени крыс с  $\text{Na}_3\text{G}$ .

Дифференциальные спектры поглощения комплексов гемопротенина с  $\text{Na}_3\text{G}$  регистрировали при 25°C. Инкубационная смесь содержала 0,5 нмоль гемопротенина в 1 мл 100 мМ калий-фосфатного буфера pH 7,4.  $\text{Na}_3\text{G}$  добавляли в опытную кювету в минимальном объеме растворителя (100 мМ калий-фосфатный буфер pH 7,4) до достижения насыщения. В контрольную кювету вносили соответствующее количество растворителя.

с  $\lambda_{\text{max}}=374$  нм и  $\lambda_{\text{min}}=418$  нм (рис. 3). Спектральная константа связывания цитохрома Р-450 с  $\text{Na}_3\text{G}$  соответствовала 0,32 М. Эти результаты согласуются с полученными ранее данными о том, что субстраты I типа способны замедлять инактивацию цитохрома Р-450 [4].

В табл. 2 представлены данные, полученные при изучении влияния на микросомальную монооксигеназную систему печени крыс внутрибрюшинного введения животным  $\text{Na}_3\text{G}$  из расчета 2 мг на 100 г в течение 3 дней. В микросомах, выделенных из печени крыс, получавших  $\text{Na}_3\text{G}$ , отмечалось некоторое увеличение скорости реакций гидроксилирования анилина и N-деметилирования аминопирина в расчете на 1 мг белка микросом по сравнению с микросомами, выделенными из печени intactных крыс. Как видно из табл. 2, это является следствием небольшой индукции цитохрома Р-450 под действием  $\text{Na}_3\text{G}$  (примерно на 35 %), благодаря которой в микросомах из печени крыс опытной группы возрастает удельное содержание цитохрома Р-450. Удельное содержание цитохрома  $b_5$  и активность НАДФ·Н-цитохром с-редуктазы и НАД·Н-феррицианидредуктазы не менялись.

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что соли глицирризиновой кислоты обладают антиокислительной активностью, связываются с цитохромом Р-450, образуя комплекс I типа, оказывают стабилизирующее действие на восстановленный гемопротенин и при введении крысам вызывают индукцию цитохрома Р-450. Все это подтверждает перспективность использования препаратов глицирризиновой кис-

лоты для лечения токсических поражений печени.

Авторы выражают признательность сотрудникам II ММИ им. Н. И. Пирогова Г. П. Кузнецовой и Ч. С. Джусеновой за предоставление препарата изолированного цитохрома Р-450, а также сотруднику НИИ ФХМ Минздрава РСФСР А. П. Пириазеву за проведение исследования хемилюминесценции клеток.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Арчаков А. И., Бачманова Г. И., Блиндер Л. В. и др. // Биохимия. — 1977. — Т. 42. — С. 100—112.
2. Канаева И. П., Шатина С. З., Бачманова Г. И. и др. // Там же. — 1981. — Т. 46. — С. 1622—1632.
3. Карузина И. И., Бачманова Г. И., Менгазетдинов Д. Э. и др. // Там же. — 1979. — Т. 44. — С. 1049—1057.
4. Мохосов И. М., Кузнецова Г. П., Альтерман М. А. и др. // Там же. — 1987. — Т. 52. — С. 1649—1658.
5. Albano E., Lott K. A. K., Slater T. F. et al. // Biochem. J. — 1982. — Vol. 204. — P. 593—603.
6. Archakov A. I., Bachmanova G. I. // Microsomes Drug Oxidation and Drug Toxicity. — Tokyo, 1982. — P. 67—74.
7. Catal E. E. // Brit. J. Pharmacol. — 1955. — Vol. 10. — P. 305—313.
8. Finney R. S. H., Somers G. F., Wilkinson J. H. // Pharm. Pharmacol. — 1958. — Vol. 10. — P. 687—695.
9. Fujisawa K., Watanabe Y., Kimura K. // Asian med. J. — 1980. — Vol. 23. — P. 745—756.
10. Ito M., Nakashima H., Baba M. et al. // Antiviral Res. — 1987. — Vol. 7. — P. 127—137.
11. Kiso Y., Tohkin M., Hikino H. // Planta Med. — 1983. — Vol. 49. — P. 223—225.
12. Kiso Y., Tohkin M., Hikino H. et al. // Ibid. — 1984. — Vol. 50. — P. 298—302.
13. Kuroyanagi T., Kurusu A., Sugiyama H., Saito M. // Jap. J. med. Progr. — 1962. — Vol. 49. — P. 458—563.
14. Noguchi T., Fong K.-L., Lai E. K. et al. // Biochem. Pharmacol. — 1982. — Vol. 31. — P. 615—624.
15. Omura T., Sato R. // J. biol. Chem. — 1964. — Vol. 239. — P. 2370—2385.
16. Phillips A. H., Langdon R. G. // Ibid. — 1962. — Vol. 237. — P. 2652—2660.
17. Suzuki H., Ohta Y., Takino T. et al. // Asian med. J. — 1983. — Vol. 26. — P. 423—438.

Поступила 01.03.89

#### ANTIOXIDATIVE PROPERTIES OF GLYCYRRHIZIC ACID SALTS AND THEIR EFFECT ON THE LIVER MICROSOMAL MONOOXYGENASE SYSTEM

M. A. Abdugafurova, V.S. Li, M. P. Sherstnev, T. B. Atanaev, A. Sh. Isamukhamedov, G. I. Bachmanova

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

Antioxidative activity of potassium- and sodium glycyrrhizins was detected by means of chemoluminescence procedure. As shown by the spectral studies the glycyrrhizin salts formed complex of the I type with cytochrome P-450 from rat liver microsomes, inhibited inactivation of isolated cytochrome P-450<sub>LM2</sub> and induced hemoprotein formation after administration into rats. The preparations of glycyrrhizic acid appear to be useful for treatment of toxic impairment of liver tissue.

Таблица 2

Влияние  $\text{Na}_3\text{G}$  на микросомальную монооксигеназную систему печени крыс при внутрибрюшинном введении его животным из расчета 2 мг на 100 г в течение 3 дней

Показатель	Контроль (без $\text{Na}_3\text{G}$ )	Опыт (+ $\text{Na}_3\text{G}$ )
Содержание Р-450, нмоль на 1 мг белка микросом	$0,96 \pm 0,06$	$1,30 \pm 0,04^*$
Содержание $b_5$ , нмоль на 1 мг белка микросом	$0,70 \pm 0,03$	$0,67 \pm 0,02$
Активность НАДФ·Н-цитохром-с-редуктазы, мкмоль/мин на 1 мг белка	$0,44 \pm 0,03$	$0,42 \pm 0,02$
Активность НАД·Н-феррицианидредуктазы, мкмоль/мин на 1 мг белка	$7,30 \pm 0,04$	$7,42 \pm 0,05$
Скорость гидроксилирования анилина, нмоль п-аминофенола/мин на 1 мг белка	$0,99 \pm 0,05$	$1,36 \pm 0,07^*$
Скорость N-деметилирования аминопирина, нмоль продукта/мин на 1 мг белка	$9,7 \pm 0,20$	$12,9 \pm 0,30^*$

Примечание. Звездочка —  $p < 0,01$ ,  $n=4$ .

*Н. С. Камышанская, В. З. Горкин, Н. Н. Войтенко*

## МНОЖЕСТВЕННЫЕ ФОРМЫ МОНОАМИНООКСИДАЗЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ КАТАТОНИИ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва, Институт цитологии и генетики Сибирского отделения АН СССР, Новосибирск

В настоящее время общепризнанным является существование двух основных типов моноаминоксидазы (МАО), катализирующей дезаминирование биогенных аминов [15]. По определению, к МАО типа А относят те аминоксидазы, активность которых блокирует низкие ( $10^{-6}$ — $10^{-7}$  М) концентрации ацетиленового амина хлоргилина [9]. Специфическими субстратами МАО-А являются серотонин, норадреналин и другие моноамины. Активность МАО-Б избирательно блокирует в низких концентрациях другой ацетиленовый амин депренил [10]. К числу специфических субстратов МАО-Б относятся бензиламин,  $\beta$ -фенилэтиламин, метилгистамин и другие соединения.

Однако изложенное представление («бинарная классификация») не исчерпывает всей сложности вопроса о множественности МАО [2]. Так, например, в тканях головного мозга быка [13], человека [3], лисицы [1] удалось обнаружить не 2, а 4 множественные формы МАО: МАО-I, МАО-II $\alpha$ , МАО-II $\beta$ , МАО-III, различающиеся по субстратной специфичности [6], чувствительности к действию избирательных ингибиторов [5] и не идентичные ни МАО-А, ни МАО-Б. Установлено, что соотношение этих множественных форм МАО закономерно изменялось в тканях мозга человека при шизофрении [2]; аналогичные изменения удалось обнаружить при исследовании множественных форм МАО мозга лисиц, селекционированных на отсутствие агрессивности и резко отличающихся от диких лисиц промышленной популяции по особенностям поведения [1].

Целью настоящего исследования было изучение множественных форм МАО головного мозга крысы, селекционированных на склонность к развитию кататонического синдрома, рассматриваемого в качестве экспериментальной модели кататонического синдрома, наблюдаемого при шизофрении [11].

**Методика.** Для исследований были использованы белые крысы-самцы линии Вистар, селекционированные на склонность к развитию кататонического синдрома, как описано ранее [11]. Контрольную группу составляли животные той же линии, близкие по массе тела к подопытным. Контрольных и подопытных животных декапитировали, как описано в методических рекомендациях Минздрава СССР (приложение к приказу № 755 от 12.08.77). Мозг крыс быстро извлекали из черепной коробки, промывали охлажденным 0,9 % раствором хлористого калия.

Солюбилизацию митохондриальных фракций гомогенатов стволовой части головного мозга крыс опытной и контрольной групп проводили, как было описано ранее [13]. Полученные в ходе дифференциального центрифугирования осадки митохондриальных мембран обрабатывали при pH 7,4 солюбилизирующей смесью, содержащей ионный детергент тритон X-100 и мочевины (конечные концентрации соответственно 1,3 % и 1,3 М). Пробы перемешивали 30 мин при 4 °С, а затем центрифугировали (40 000 g, 30 мин). Получаемый осадок отбрасывали, а надосадочную жидкость пропускали

через колонку с сефадексом G-50 (грубый), уравнишенную с 0,01 М калий-натрий-фосфатным буфером (pH 7,4). Полученный элюат концентрировали в 2—3 раза, используя ультрафильтры «Amicon PM-30».

Для разделения множественных форм МАО головного мозга крысы был использован метод биоспецифической хроматографии на сорбенте АН-сефароза 4 В (омега-гексаметилендиамин-сефароза, «Pharmacia», Швеция) [13] с применением ступенчатых и градиентных процедур элюции. Элюаты концентрировали, как указано выше, трижды промывали на ультрафильтре PM-30 буферным раствором, названным выше, и сохраняли до начала исследований при  $-20$  °С.

Измерения активности МАО в процессе солюбилизации биомембран и разделения множественных форм МАО проводили колориметрическим экспресс-методом с 4-нитрофенилэтиламином в качестве субстрата [4]. О дезаминировании других аминов судили по образованию соответствующих альдегидов, содержание которых определяли радиометрическими методами [7], используя меченные  $^{14}$ С амины с удельной радиоактивностью 5 Ки/моль («Amersham», Англия). В инкубационные пробы меченые амины вносили в следующих концентрациях (конечные концентрации): тирамин —  $10^{-4}$  М, серотонин —  $10^{-4}$  М, 2-фенилэтиламин —  $5 \cdot 10^{-5}$  М. Удельную активность МАО выражали в условных единицах, как указано в работе [7].

Содержание белка определяли по Лоури и соавт. [12] с бычьим сывороточным альбумином в качестве стандарта.

**Результаты и обсуждение.** Используя методику [13], разработанную ранее для солюбилизации биомембран митохондриальных фракций гомогенатов стволовой части головного мозга быка [13], человека [3], лисицы [1], удалось отделить от структурных элементов биомембран, осаждаемых при ультрацентрифугировании, до 32 % моноаминоксидазной активности головного мозга крысы (по данным исследований, проведенных с 4-нитрофенилэтиламином в качестве субстрата). Различий в каталитической активности солюбилизованных МАО мозга животных контрольной группы и крыс с кататоническим синдромом при этом не отмечено.

Методом биоаффинной хроматографии на АН-сефарозе 4 В солюбилизованные белки митохондрий стволовой части мозга крысы (как и других аналогичных биологических объектов, исследованных ранее [1, 3, 13]) были разделены на 4 белковые фракции (рис. 1).

Как видно на рис. 1, где представлены типичные примеры из серий, включавших по 4 параллельных опыта (в каждом из которых исследовали объединенный материал, полученный из мозга 5 животных), профили элюции белковых фракций из митохондриальных мембран крыс контрольной группы и крыс с кататоническим синдромом сходны между собой, хотя и не идентичны. Отмечается несколько менее интенсивная сорбция белков из мозга крыс-кататоников на АН-сефарозе 4 В по сравнению с аналогичными белками из мозга крыс контрольной группы. Это наблюдение может быть сопоставлено со сведениями о существовании определенных различий в физико-химических свойствах солюбилизованных белков митохондриальных фракций из стволовой части головного мозга людей, которые при жизни страдали шизофренией, по сравнению с соответствующими белковыми фракциями, полученными от людей, не болевших шизофренией [8].

Белковую фракцию, элюруемую 10 мМ калий-натрий-фосфатным буфером pH 7,4 (фракция под индексом 0 на рис. 1), как не содержащую аминоксидазной активности (подобно тому, что было отмечено в аналогичных опытах с мате-

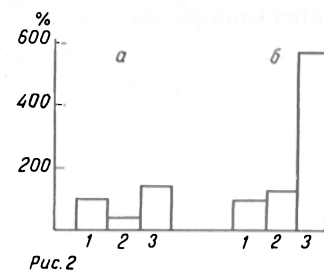
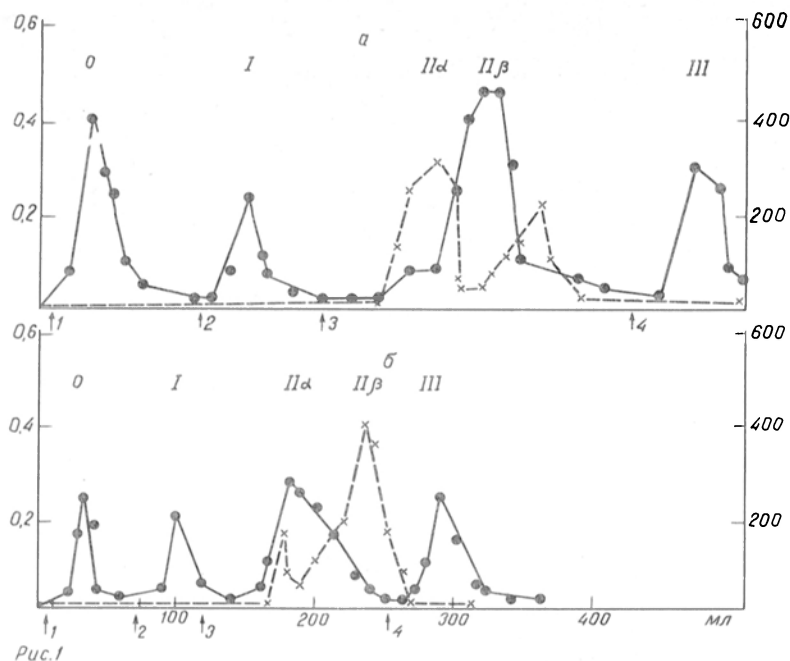


Рис. 1. Хроматографическое разделение на колонке с АН-сефарозой 4 В солибализированных белков митохондриальных мембран из стволовой части головного мозга крыс.

а — типичный пример опыта с материалом от крыс контрольной группы, б — то же для крыс с кататоническим синдромом. Римскими цифрами обозначены фракции, содержащие активность МАО. По осям абсцисс — объем элюата (в мл); по осям ординат: слева — содержание белка (в мг/мл), справа — активность МАО, измеренная с 4-нитрофенилэтиламином в качестве субстрата (в усл. ед. [13] на 1 мл за 1 ч); полученные результаты указаны крестиками, соединенными штриховой линией. Стрелки — моменты начала каждого из последовательных этапов элюции калий-натрий-фосфатными буферными растворами (рН 7,4) следующих концентраций: 1 — 10 мМ, 2 — 100 мМ, 3 — 100 мМ с градиентом концентрации детергента тритон X-100 от 0 до 0,25 %, 4 — 400 мМ, содержащим 0,25 % тритона X-100.

Рис. 2. Соотношения (в %) скоростей реакции дезаминирования моноаминов при их инкубации с препаратами МАО-III из мозга крыс контрольной группы (а) и крыс с кататоническим синдромом (б).

1 — максимальная скорость дезаминирования серотонина (100 %). 2 — то же для тирамина; 3 — для 2-фенилэтиламина.

риалом от животных других видов [1, 3, 13]), дальнейшему изучению в данной работе не подвергали. Белки всех остальных фракций, содержавшие аминоксидазную активность, определяемую в опытах с 4-нитрофенилэтиламином (см. рис. 1) и другими аминами в качестве субстратов, обозначали как МАО-I, МАО-IIα, МАО-IIβ и МАО-III, как показано на рис. 1.

Сопоставление величин выхода белка (в % от нанесенного на колонку) во фракциях препаративно разделенных множественных форм МАО из головного мозга крыс контрольной группы и крыс с кататоническим синдромом свидетельствовало об отсутствии статистически достоверных различий ( $p < 0,05$ ) между ними (табл. 1), хотя была отмечена некоторая тенденция к повышению выхода белка формы МАО-IIα у крыс-кататоников по сравнению с животными контрольной группы при противоположной тенденции в отношении МАО-III.

Исследование реакций окислительного дезаминирования моноаминов при их инкубации с препаратами множественных форм МАО из стволовой части головного мозга крыс контрольной группы и крыс с кататоническим синдромом (табл. 2) показали, что скорости дезаминирования серо-

тонина, тирамина, 2-фенилэтиламина в пробах с МАО-I или МАО-IIα в обеих группах не имели статистически достоверных различий, но в аналогичных опытах с МАО-IIβ величины скорости дезаминирования тирамина и 2-фенилэтиламина у крыс с кататоническим синдромом были статистически достоверно ( $p < 0,05$ ) выше, чем у крыс контрольной группы. В опытах с препаратами МАО-III также было отмечено статистически достоверное превышение скорости дезаминирования тирамина и особенно 2-фенилэтиламина в группе крыс с кататоническим синдромом по сравнению с крысами контрольной группы, однако в аналогичных опытах с серотином в качестве субстрата величины скорости дезаминирования, наоборот, были статистически достоверно ниже у крыс-кататоников по сравнению с животными контрольной группы.

Сопоставление относительных скоростей дезаминирования аминов при их инкубации с пре-

Таблица 2

Скорость дезаминирования моноаминов при их инкубации с препаратами множественных форм МАО из стволовой части головного мозга крыс ( $M \pm m$ )

Форма МАО	Моноамины		
	серотонин	тирамин	2-фенилэтиламин
I	$6,5 \pm 0,5$ (5)	$8,4 \pm 2,1$ (4)	$48,3 \pm 3,5$ (3)
	$7,6 \pm 0,5$ (5)	$8,7 \pm 1,2$ (5)	$52,2 \pm 2,3$ (5)
II α	$10,4 \pm 1,1$ (5)	$13,5 \pm 1,8$ (5)	$73,6 \pm 1,4$ (4)
	$9,6 \pm 0,7$ (5)	$14,0 \pm 2,0$ (5)	$70,0 \pm 2,1$ (4)
II β	$101,8 \pm 2,0$ (10)	$89,9 \pm 3,0$ (9)*	$382,3 \pm 3,7$ (9)*
	$108,0 \pm 2,8$ (9)	$106,9 \pm 2,8$ (10)	$421,8 \pm 8,9$ (9)
III	$27,4 \pm 4,3$ (4)*	$11,2 \pm 1,7$ (5)*	$39,7 \pm 6,4$ (4)*
	$13,3 \pm 1,0$ (4)	$15,05 \pm 1,8$ (4)	$74,8 \pm 4,0$ (5)

Примечание. Представлены средние значения удельной активности (в усл. ед., см. методику). В скобках — число определений. Над чертой — контрольные крысы, под чертой — крысы с кататоническим синдромом. Звездочка —  $p < 0,05$ .

Таблица 1

Величины выхода белка (в % от нанесенного на колонку) в препаратах множественных форм МАО из стволовой части головного мозга крыс ( $M \pm m$ )

Форма МАО	Контрольные крысы	Крысы с кататоническим синдромом
I	$5,7 \pm 0,7$	$6,1 \pm 3,2$
II α	$8,0 \pm 1,2$	$10,7 \pm 0,9$
II β	$14,0 \pm 1,5$	$15,1 \pm 0,45$
III	$10,4 \pm 2,0$	$8,7 \pm 1,9$

Примечание. Представлены средние данные 2—3 независимых параллельных исследований.

паратами МАО-III из стволовой части головного мозга крыс с кататоническим синдромом и крыс контрольной группы (рис. 2) выявило поразительное различие между животными этой группы, выражающееся, главным образом, в резком повышении относительной скорости дезаминирования 2-фенилэтиламина у крыс-кататоников.

Это наблюдение согласуется с рядом хорошо известных из литературы [14] фактов: 1) 2-фенилэтиламин представляет собой природное соединение, близкое по своим фармакологическим свойствам к амфетамину, введение которого в организм вызывает ряд нарушений, характерных для шизофрении, в частности кататонический синдром [11]; 2) нарушения метаболизма 2-фенилэтиламина имеют определенное патогенетическое значение при шизофрении; 3) продукт окислительного дезаминирования 2-фенилэтиламина — фенилуксусная кислота является биологически активным соединением, отличающимся по своим свойствам от исходного амина; 4) образование конъюгатов фенилуксусной кислоты с азотистыми соединениями нарушено при кататоническом синдроме. Можно предположить, что обнаруженное в настоящей работе повышение 2-фенилэтиламиндеаминазной активности МАО-III стволовой части мозга крыс может иметь патогенетическое значение при экспериментальной кататонии.

Следует отметить, что различия в свойствах МАО головного мозга у крыс с кататоническим синдромом и крыс контрольной группы удалось выявить только при исследовании множественных форм МАО головного мозга, что позволяет получать более информативные данные, чем при измерении суммарной активности МАО (без разделения множественных форм этого фермента). Так, например, именно при исследовании множественных форм МАО головного мозга человека при шизофрении удалось выявить различия в свойствах МАО стволовой части мозга в норме и при шизофрении [13]. Установлено, что при шизофрении в тканях мозга человека резко снижена по сравнению с нормой или вообще отсутствует МАО-III [2].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Войтенко И. И., Савинкова Л. К., Москвитина Т. А., Горкин В. З. // Нейрохимия. — 1988. — Т. 7, № 2. — С. 204—210.
2. Горкин В. З. // Там же. — 1985. — Т. 4, № 1. — С. 68—79.
3. Камышанская Н. С., Москвитина Т. А. // Вопр. мед. химии. — 1981. — № 2. — С. 261—266.
4. Москвитина Т. А., Камышанская Н. С., Каверина Л. П., Горкин В. З. // Там же. — 1977. — № 3. — С. 352—358.
5. Москвитина Т. А., Кучина Н. Е., Горкин В. З. // Биохимия. — 1983. — Т. 48, № 1. — С. 119—124.
6. Москвитина Т. А., Камышанская Н. С., Горкин В. З. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 1. — С. 98—102.
7. Пекель В. А., Аксенова Л. П., Боймиряев М. И. // Лаб. дело. — 1987. — № 7. — С. 491—496.
8. Gorkin V. Z., Moskvitina T. A., Kamyschanskaya N. S. et al. // Biogenic Amines. — 1985. — Vol. 3. — P. 229—239.
9. Johnston J. P. // Biochem. Pharmacol. — 1968. — Vol. 17. — P. 1285—1297.
10. Knoll J. // Acta neurol. scand. — 1983. — Vol. 95. — P. 57—80.
11. Kolkakov V. G., Barykina N. N., Chepkasov I. L. et al. // Methods in Biogenic Amines Research / Ed. S. Parvez et al. — Amsterdam, 1983. — P. 997—1020.

12. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265—275.
13. Moskvitina T. A., Kamyschanskaya N. S., Garishvili T. G., Gorkin V. Z. // Preparat. Biochem. — 1979. — Vol. 9. — P. 176—196.
14. Sandler M., Garter S. B., Goodwin B. L., Rutwen C. R. J. // Trace Amines and the Brain / Ed. E. Usdin, M. Sandler. — New York, 1976. — P. 233—281.
15. Structure and Functions of Amine Oxidases / Ed. B. Mondov. — Boca Raton, 1985.

Поступила 17.03.89

#### MULTIPLE FORMS OF RAT BRAIN MONOAMINE OXIDASE IN EXPERIMENTAL CATATONIA

N. S. Kamyschanskaya, V. Z. Gorkin, N. N. Voitenko

Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk

Catalytic properties of multiple forms (separated by affinity chromatography) of rats brain mitochondrial monoamine oxidase (MAO, MAO-I, MAO-II $\alpha$ , MAO-II $\beta$ , MAO-III) have been studied in the animals selected for propensity to development of catatonic syndrome considered as an experimental model of the catatonic syndrome occurring in schizophrenia. It was shown that in experimental catatonia (as compared with rats of the corresponding control group) there was a dramatic increase in the brain stem of the rate of oxidative deamination of  $\beta$ -phenylethylamine catalyzed by MAO-III; there was also a statistically significant (albeit less expressed than in the experiments with  $\beta$ -phenylethylamine) increase in the rate of deamination of tyramine and a decrease in the rate of deamination of serotonin. In the systems with MAO-II $\beta$  we detected statistically significant increase in the rates of deamination of tyramine and  $\beta$ -phenylethylamine in experimental catatonia as compared with corresponding control. Studies of multiple forms of brain MAO provide more informative data than estimation of "total" MAO activity (without separation of the multiple forms of this enzyme).

© А. В. ЗАМОТРИНСКИЙ, В. В. ЧЕСТКОВ, 1990

УДК 616.155.25-008.931:577.152.11-07

А. В. Замотринский, В. В. Честков

#### ПРИМЕНЕНИЕ ИММУНОБЛОТТИНГА ПОВЫШЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ФЕНИЛАЛАНИНГИДРОКСИЛАЗНОГО АНТИГЕНА В ТРОМБОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА

Институт медицинской генетики АМН СССР, Москва

Иммуноблоттинг белков является одним из распространенных методов белковой химии, широко применяемым для анализа дифференциальной экспрессии генов, позволяющим не только выявлять, но и характеризовать структуру исследуемого антигена. В сочетании с электрофорезом [5] этот метод позволяет оценить молекулярную массу антигена. Для повышения чувствительности иммуноблоттинга используют различные подходы, связанные с увеличением полноты переноса белка из геля, ренатурацией антигена, амплификацией сигнала и усилением окраски [6]. Для повышения ренатурации антигена варьируют режим переноса белков из геля [8] и состав буфера [6, 7], но мы не обнаружили сведений о целенаправленной отмывке от додецилсульфата натрия (ДСН), хотя данный детергент является основным денатурирующим агентом в этих условиях.



Задачей исследования являлось выяснение возможности повышения чувствительности иммуноблоттинга путем отмывки нитроцеллюлозных фильтров от ДСН после переноса на них белков. Эта задача возникла в связи с поиском антигена фенилаланингидроксилазы (КФ 1.14.16.1) в тромбоцитах человека. О наличии соответствующей ферментативной активности в этих клетках сообщалось ранее [10], однако оставалось неясным, каким ферментом она катализируется.

**Методика.** Экстракт печени человека готовили, как описано ранее [1]. Содержание фенилаланингидроксилазы в экстракте составляло около 1 % от количества суммарного белка.

Тромбоциты выделяли из цельной крови путем центрифугирования при 150 g и затем при 1500 g в течение 15 мин [2]. Осадок тромбоцитов ресуспендировали и осаждали дважды в 0,14 М NaCl, 15 мМ трис-HCl-буфера pH 7,5. Клетки лизировали гомогенизацией в 0,1 % ДСН, центрифугировали при 1500 g в течение 5 мин и в экстракте определяли концентрацию белка [3].

Электрофорез в 15 % полиакриламидном геле проводили в присутствии ДСН [5]. Перенос белков из геля на нитроцеллюлозные фильтры проводили в течение 18 ч при напряжении 12 В/см [9].

Иммуноблоттинг с использованием конъюгата иммуноглобулинов и пероксидазы описан ранее [1]. При использовании коммерческих конъюгатов антител к иммуноглобулинам кролика и пероксидазы иммуноблоттинг проводили по аналогичной схеме с отмывкой фильтров от антисыворотки к фенилаланингидроксилазе человека и конъюгата последовательно 1 % твина-80 и 1 М NaCl, содержащими 30 мМ трис-HCl-буфер pH 7,5.

Предлагаемая модификация основного метода иммуноблоттинга заключается в инкубации фильтра после переноса белков в растворе органического спирта, содержащего 0,195 М глицин, 0,02 М трис-буфер pH 8,3. Фильтр отмывали в физиологическом растворе и далее обрабатывали по описанной схеме.

**Результаты и обсуждение.** Оптимизацию условий отмывки фильтров органическими спиртами проводили с использованием дот-анализа. Изменение чувствительности оценивали по обнаружению антигена в ряду последовательных двукратных разведений экстракта печени. Пределом чувствительности для системы детекции с использованием «вторых» антител являлось содержание тотального белка в пятне 0,1 мкг, для системы с использованием конъюгата иммуноглобулинов к фенилаланингидроксилазе и пероксидазы — около 0,4 мкг. Сходные изменения чувстви-

тельности в результате инкубации в спиртах наблюдали в обеих системах обнаружения антигена.

Оптимизацию условий отмывки нитроцеллюлозных фильтров проводили по 3 параметрам: изменению природы спирта, длительности инкубации и концентрации спирта в буфере. Инкубацию фильтров осуществляли в 20 % растворах этанола, метанола и изопропанола в течение 2 ч. При инкубации в растворе этанола изменения чувствительности метода не наблюдали, при инкубации в метаноле чувствительность увеличивалась, но не более чем в 2 раза, в растворе изопропанола увеличивалась в 4 раза.

Чувствительность методов возрастала с увеличением времени инкубации фильтров в 20 % растворе изопропанола до 2 ч, но при более длительной инкубации (до 16 ч) не изменялась. Изменение концентрации изопропанола в инкубационном буфере от 0 до 100 % выявило наличие максимального эффекта для 30 % растворов. Дальнейшее увеличение концентрации изопропанола в растворе приводило к снижению чувствительности метода.

Специфичность достигаемого эффекта оценивали по данным иммуноблоттинга после одномерного электрофореза [5]. На рис. 1 показано, что усиление метки в модифицированном методе выявления антигена достигается за счет увеличения окраски компонента, соответствующего по электрофоретической подвижности субъединице фенилаланингидроксилазы печени. Сходное увеличение чувствительности обнаруживали при использовании модифицированного иммуноблоттинга для выявления альбумина среди белков плазмы крови человека с соответствующей антисывороткой.

Использование изопропанола для отмывки белков от ДСН описано ранее [3], однако данных о его применении в иммуноблоттинге не обнаружено. По-видимому, эффект, аналогичный описанному, получали при увеличении времени переноса белков на нитроцеллюлозный фильтр [8], но и в настоящей работе природа явления специально не изучалась. Преимущество предлагаемой модификации заключается не только в повышении чувствительности метода, но и в исключении использования высокотоксичного метанола. Так

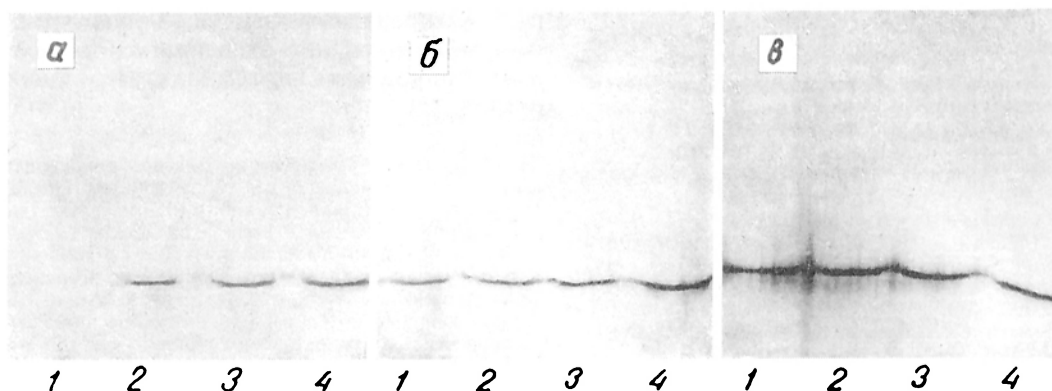


Рис. 1. Иммуноблоттинг экстракта печени человека с антисывороткой к фенилаланингидроксилазе человека.

На дорожки 1—4 — нанесено соответственно 1, 2, 4 и 8 мкг белка экстракта печени. а — иммуноблоттинг без отмывки нитроцеллюлозного фильтра растворами спиртов; б — фильтр, отмывтый 30 % раствором изопропанола в течение 2 ч; в — фильтр, отмывтый в 30 % растворе изопропанола и инкубированный с конъюгатом «вторых» антител и пероксидазы в растворе, содержащем 3 % бычий сывороточный альбумин и 0,15 М NaCl в 10 мМ карбонатном буфере (pH 9,2). Здесь и на рис. 2: стрелкой указана полоса, соответствующая по подвижности субъединице фенилаланингидроксилазы печени человека.

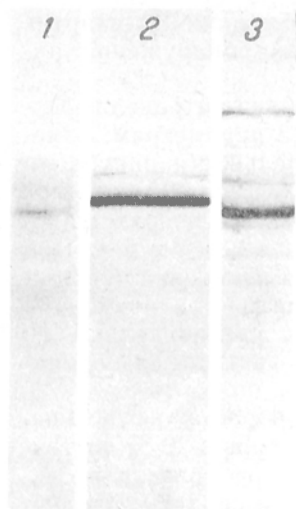


Рис. 2. Иммуноблоттинг экстракта тромбоцитов с антителом к фенилаланин-гидроксилазе печени человека.

На дорожку 1 нанесено 20 мкг белка экстракта тромбоцитов человека; на дорожку 2 нанесено 0,4 мкг очищенной на имунсорбенте фенилаланин-гидроксилазы печени человека; на дорожку 3 нанесено 20 мкг белка экстракта печени человека.

как существует метод усиления окраски при иммуноблоттинге путем инкубации фильтра в буфере, содержащем конъюгат иммуноглобулинов и пероксидазы при pH 9,2, мы проверили и подтвердили аддитивность этой и предложенной модификаций (см. рис. 1).

Иммуноблоттинг повышенной чувствительности использован для выявления антигена фенилаланин-гидроксилазы в экстракте тромбоцитов человека (рис. 2). При этом выявляется компонент, близкий по электрофоретической подвижности к фенилаланин-гидроксилазе печени человека и соответствующий по подвижности мол. м. 55 кДа. Это является убедительным, но не окончательным подтверждением наличия белка фенилаланин-гидроксилазы в тромбоцитах человека. Последующий структурный анализ выявляемого антигена позволит более надежно идентифицировать этот белок.

Необходимость использования модифицированного метода иммуноблоттинга для обнаружения иммунореактивного компонента в экстракте тромбоцитов человека определяется низким содержанием антигена в этих клетках, которое по результатам иммуноблоттинга составило менее 0,1 мкг на 1 мг белка экстракта тромбоцитов. Эти данные совпадают с данными литературы о наличии низкой фенилаланинокисляющей активности в тромбоцитах человека [10].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Честков В. В., Ланцев А. В. // Бюл. exper. биол. — 1988. — № 7. — С. 30—34.
2. Beanziger N. L., Brodie G. N., Majerus P. W. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1971. — Vol. 68. — P. 231—240.
3. Bradford M. M. // Analyt. Biochem. — 1976. — Vol. 72. — P. 248—254.
4. Fairbanks G., Steck T. L., Wallach D. H. // Biochemistry. (Wash.). — 1971. — Vol. 10. — P. 2606—2617.
5. Laemmli U. K. // Nature. — 1970. — Vol. 227. — P. 680—685.
6. Liu W., Kasamatsu H. // Analyt. Biochem. — 1983. — Vol. 128. — P. 302—311.
7. Schenkel I., Sekeris C., Alonso A. et al. // Europ. J. Biochem. — 1988. — Vol. 171. — P. 565—569.
8. Stahl I., Gross B., Knespel S. et al. // FEBS Lett. — 1987. — Vol. 220. — P. 126—128.
9. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1979. — Vol. 76. — P. 4350—4354.
10. Uebelhack R., Franke L., Kutter D. et al. // Biochem. Med. — 1985. — Vol. 34. — P. 376—379.

Поступила 13.03.89

#### DETECTION OF THE PHENYLALANINE HYDROXYLASE ANTIGEN IN HUMAN THROMBOCYTES BY MEANS OF HIGHLY SENSITIVE IMMUNOBLOTTING

A. V. Zamotrinsky, V. V. Chestkov

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

Incubation of nitrocellulose filters containing proteins in solutions of organic alcohols (ethanol, methanol, isopropanol) enabled to increase the immunoblotting sensitivity after denaturing electrophoresis in presence of SDS. Maximal elevation of the label sensitivity (4-6-fold) was observed after incubation of these filters in 30 % isopropanol within 2 hrs. The effect of sensitivity elevation appears to be caused by the antigen renaturation due to SDS washing off. The modified procedure of immunoblotting allowed to detect phenylalanine hydroxylase antigen in human thrombocytes. The antigen had electrophoretic mobility similar to that of phenylalanine hydroxylase from liver tissue; its concentration constituted less than 0.1 µg per 1 mg of protein in thrombocytes.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 546.23:615.9:577.15.04

Л. В. Кравченко, Е. Э. Кузьмина, Л. И. Авреньева, В. А. Тутельян

#### ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ СЕЛЕНА ПРИ ОСТРОМ Т-2-МИКОТОКСИКОЗЕ

Институт питания АМН СССР, Москва

В результате ряда экспериментальных и эпидемиологических наблюдений выявлены протекторные свойства селена по отношению к некоторым токсическим, в том числе канцерогенным соединениям, а также показана возможность его использования для терапии патологических состояний, связанных с накоплением гидросерекисей [6, 9, 14]. Защитные эффекты селена, по крайней мере для некоторых соединений, связывают с его влиянием на гомеостаз гема в печени или с его стабилизирующим действием на биологические мембраны, что в свою очередь обеспечивает оптимальные условия для функционирования ферментов, осуществляющих метаболизм и детоксикацию ксенобиотиков [8].

Целью настоящей работы явилось изучение влияния различных доз селена, потребляемых экспериментальными животными в составе рациона, на острую токсичность Т-2-токсина — одного из представителей 12,13-эпокситрихотененовых микотоксинов, относящихся к особо опасным природным контаминантам пищевых продуктов [2].

**Методика.** Крысы-самцы Вистар с исходной массой тела около 50 г в течение 6 нед. получали ad libitum полноценные полусинтетические рационы. В качестве дополнительного источника селена в рацион включали 1,1 % дрожжевой муки (А/О «Алко», Финляндия). Разное содержание селена в рационе получали за счет добавления в разных соотношениях дрожжевой муки с содержанием селена  $450 \pm 8$  мг/кг и дрожжевой муки с содержанием селена не более 0,04 мг/кг. Содержание селена в базовом рационе без добавления дрожжевой муки составляло 0,03 мг/кг сухой массы.

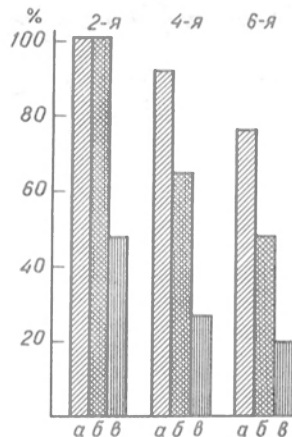
Авторы приносят благодарность доктору И. Т. Кумулайнену, руководителю центральной лаборатории сельскохозяйственного научного центра (г. Йокиинен, Финляндия) за проведение анализа.

Т-2-токсин был выделен из зерна, зараженного *Fusarium sporotrichiella*, чистота препарата по данным ГЖХ составляла более 98 % [13].

Животные были разделены на 6 групп по 15 крыс в каждой. Крысы 1-й и 2-й групп получали дополнительно к рациону не более 0,0004 мг селена на 1 кг рациона, крысы 3-й и 4-й групп получали дополнительно к базовому рациону не более 0,5 мг селена на 1 кг, крысы 5-й и 6-й групп получали рационы с дополнительным содержанием селена не более 2,5 мг на 1 кг рациона. В конце эксперимента животных 2, 4 и 6-й групп вводили однократно внутрь Т-2-токсин в 1 % водном растворе этанола в дозе 3,8 мг/кг массы тела. Животным 1, 3 и 5-й групп вводили равные количества растворителя.

Микросомы выделяли из печени по методу [7]; содержание цитохрома Р-450 и скорость деэтилирования 7-этоксикумарина определяли по [7]; активность эпиксидгидролазы (ЭГ) со стиленоксидом в качестве субстрата определяли с использованием ВЭЖХ [1]; активность UDP-глюкуронозилтрансферазы (UDP-ГТ) с п-нитрофенолом в качестве акцептора определяли в микросомах, обработанных 0,1 % тритоном Х-100 [3]. В цитозоле определяли активность глутатион-трансферазы (ГлТ) с 1-хлор-2,4-динитробензолом в качестве субстрата [4] и глутатионпероксидазы (ГП) с  $H_2O_2$  [5]. Также определяли содержание SH-глутатиона в гомогенатах печени [12] и активность ГП в сыворотке крови. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

**Результаты и обсуждение.** Содержание крыс в течение 6 нед. на рационах, обогащенных селеном, не оказывало какого-либо влияния на прирост массы тела, массу печени и содержание в ней общего, микросомального и цитозольного белка. В печени крыс, получавших рацион с добавлением селена в количестве 0,5 мг/кг (3-я группа), не обнаружено достоверных изменений активности ферментов и содержания глутатиона по сравнению с 1-й группой (табл. 1). Активность ГП в печени не отличалась от уровня у животных 1-й группы, но возрастала в сыворотке крови на 27 % (табл. 2). При дополнительном включении в рацион селена в количестве 2,5 мг/кг (5-я группа) в печени крыс обнаруживали возрастание на 41 % скорости деэтилирования 7-этоксикумарина и слабо выраженное (на 20 %) снижение активности ГлТ. Активность ГП в печени и



Частота обнаружения геморрагического экссудата (а), диареи (б) и уровень смертности (в) у крыс, получавших Т-2-токсин.

1 — рацион, не обогащенный селеном (2-я группа); II — рацион, обогащенный селеном в количестве 0,5 мг/кг (4-я группа); III — рацион, обогащенный селеном в количестве 2,5 мг/кг (6-я группа). По оси ординат — исследуемые показатели (в % от контроля).

сыворотке крови крыс 5-й группы не отличалась достоверно от активности фермента у животных 1-й группы.

При введении Т-2-токсина первые симптомы токсического действия — взъерошенность, понос, геморрагический экссудат вокруг носа появлялись у отдельных крыс уже через 3 ч и были в равной степени выражены у крыс 2, 4 и 6-й групп. Через 24 ч после введения токсина летальность составляла соответственно во 2, 4 и 6-й группах 47, 27 и 20 % (см. рисунок). С увеличением уровня селена в рационе уменьшалась степень выраженности токсических проявлений — понос и геморрагический экссудат отмечались у всех выживших крыс 2-й группы, в то время как в 6-й группе понос был у 42 % выживших, а геморрагический экссудат — у 72 %.

Данные о влиянии Т-2-токсина на ферменты, участвующие в метаболизме ксенобиотиков, в том числе самого Т-2-токсина, представлены в табл. 1. У крыс, получавших рацион с минимальным содержанием селена (2-я группа), через 24 ч после введения токсина незначительно снижался уро-

Таблица 1  
Активность ферментов метаболизма ксенобиотиков и содержание SH-глутатиона в печени крыс, получавших Т-2-токсин на фоне различного обеспечения рациона селеном ( $M \pm m$ )

Показатель	Группа животных					
	1-я	2-я	3-я	4-я	5-я	6-я
Цитохром Р-450, нмоль/мг белка	0,95±0,02	0,85±0,07	0,96±0,04	0,75±0,09	1,08±0,06	0,85±0,05
7-Этоксикумариндеэтилаза, нмоль/мин·мг белка	0,51±0,05	0,47±0,08	0,56±0,06	0,35±0,05	0,72±0,06	0,37±0,02
Эпиксидгидролаза, нмоль/мин·мг белка	9,9±0,5	11,6±1,8	9,2±0,7	$p_{3-4} < 0,05$ 12,8±0,8	$p_{1-5} < 0,05$ 10,7±1,0	$p_{5-6} < 0,05$ 17,2±2,3
UDP-глюкуронозилтрансфераза, нмоль/мин·мг белка	27,8±1,8	30,6±6,2	25,5±2,3	30,6±5,3	29,5±2,8	50,6±6,4
Глутатионтрансфераза, мкмоль/мин·мг белка	1,75±0,08	1,58±0,03	1,58±0,04	1,62±0,04	1,41±0,06	1,38±0,07
SH-глутатион мкмоль/г ткани	5,95±0,35	7,66±0,27 $p_{1-2} < 0,05$	6,78±0,24	7,71±0,40	$p_{1-5} < 0,05$ 6,33±0,25	7,05±0,70

Таблица 2  
Активность ГП в печени и сыворотке крови крыс, получавших Т-2-токсин на фоне различного содержания селена в рационе ( $M \pm m$ )

Объект исследования	Группы животных					
	1-я	2-я	3-я	4-я	5-я	6-я
Печень, мкмоль/мин·мг	0,62±0,07	0,51±0,05	0,58±0,05	0,55±0,05	0,57±0,03	0,53±0,05
Сыворотка крови, мкмоль/мин·мл	5,06±0,37	6,12±0,52	6,50±0,31 $p_{1-3} < 0,05$	6,17±0,17	5,69±0,08	5,52±0,43

вень цитохрома Р-450 и умеренно возрастала активность микросомальной ЭГ и содержание SH-глутатиона в печени. Активность ГлТ и ГП достоверно не изменялась. Введение Т-2-токсина крысам, получавшим рацион, обогащенный селеном 0,5 мг/кг (4-я группа), приводило к достоверному снижению уровня цитохрома Р-450 и скорости деэтилирования 7-этоксикумарина (до 78 и 62 % соответственно), а также возрастанию активности ЭГ — до 139 % от контроля (3-я группа). Следует отметить, что и в этом случае не было обнаружено изменения активности ГлТ и ГП. У крыс 6-й группы, получавших Т-2-токсин на фоне рациона с включением селена в количестве 2,5 мг/кг, содержание цитохрома Р-450 составляло 78 % от уровня, определяемого в 5-й группе, скорость деэтилирования 7-этоксикумарина снижалась до 51 %, в то время как активность ЭГ и UDP-ГТ возрастала соответственно до 161 и 172 %. Уровень SH-глутатиона не отличался достоверно от уровня у крыс 5-й группы так же, как и активность ГлТ и ГП.

Хотя пути метаболизма и детоксикации Т-2-токсина нельзя считать полностью выясненными, существуют доказательства, что у млекопитающих, в том числе у крыс, Т-2-токсин подвергается: 1) гидроксилированию в системе микросомальных цитохром Р-450-содержащих монооксигеназ; 2) деацетилированию при участии микросомальных карбоксилэстераз; 3) конъюгации с глюкуроновой кислотой, катализируемой UDP-ГТ. Важно отметить, что некоторые метаболиты, например 3'-гидрокси-Т-2-токсин, более токсичны, чем сам Т-2-токсин [15].

Рассматривая полученные результаты в связи с данными о путях биотрансформации Т-2-токсина, имеются основания считать, что у животных, получавших рацион, обогащенный селеном, снижается скорость гидроксилирования токсина и тем самым создаются предпосылки для уменьшения образования 3'-гидрокси-Т-2-токсина. В свою очередь обнаруженное возрастание активности UDP-ГТ позволяет предположить, что в данных экспериментальных условиях усиливается скорость конъюгации Т-2-токсина и его метаболитов с глюкуроновой кислотой и их выведение. Что касается обнаруженного нами возрастания активности ЭГ у животных, получавших Т-2-токсин на фоне обогащенного селеном рациона, оценить его значение в снижении токсичности Т-2 не представляется возможным, так как до настоящего времени не получено каких-либо доказательств участия микросомальной ЭГ в метаболизме Т-2-токсина.

Таким образом, можно полагать, что снижение острой токсичности Т-2-токсина у крыс, получавших обогащенный селеном рацион, связано с изменением соотношения различных путей биотрансформации токсина в пользу усиления процессов его конъюгации и выведения из организма. Механизмы обнаруженных изменений активности ферментов метаболизма ксенобиотиков, локализованных в мембранах эндоплазматического ретикула, не ясны. Физиологические функции селена изучены мало, фактически неоспоримо доказана только его связь с процессами антиоксидантной защиты, и, как следствие этого, — стабилизирующее действие на биологические мембраны. Мы не выявили существенных изменений

активности ГП в печени и сыворотке крови животных, получавших в течение 6 нед. рацион, обогащенный селеном. Кроме того, имеющиеся данные свидетельствуют об отсутствии изменения интенсивности свободнорадикального окисления и накопления гидроперекисей при Т-2-токсикозе [11]. Это позволяет заключить, что обнаруженные изменения активности микросомальных ферментов при Т-2-микотоксикозе на фоне обогащенного селеном рациона не связаны с изменением активности ГП и интенсивностью процессов перекисного окисления липидов. Заслуживает внимания предположение [10] об участии селена в ферментном катализе или в его регуляции, основанное на данных о достаточно высоком уровне селена в микросомах печени крыс и обнаружении в микросомах селеносодержащих белков, включающих селен более активно, чем ГП. По-видимому, защитный эффект селена при Т-2-микотоксикозе не связан с изменением антиоксидантной активности, а зависит от изменения соотношения активности ферментов, участвующих в метаболизме токсина.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Кравченко Л. В., Кузьмина Е. Э., Соболев В. С. // *Вопр. мед. химии.* — 1988. — № 6. — С. 122—123.
2. Тутельян В. А., Кравченко Л. В. *Микотоксины.* — М., 1985.
3. Burchell B., Weatherill P. *Methods in enzymology.* — Vol. 77. — New-York. — 1981. — P. 169—176.
4. Habig W. H., Pabst M. J., Jacoby W. B. // *J. Biol. Chem.* — 1974. — Vol. 249. — P. 7130—7139.
5. Igarashi T., Satou T., Ueno K., Kitagawa H. // *J. Pharm. Dyn.* — 1983. — Vol. 6. — P. 942—949.
6. Ip C. // *Annals of Clinical Res.* — 1986. — Vol. 18. — P. 22—29.
7. Lake B. G. *Biochemical toxicology: A practical approach.* — Oxford. — 1987. — P. 183—215.
8. Meydani M. *Nutrition Toxicology.* — Vol. 11. — Acad. Press. — 1987. — P. 1—39.
9. Parnham M. J., Graf E. // *Biochem. Pharmacol.* — 1987. — Vol. 36. — P. 3095—3102.
10. Reiter R., Wendel A. // *Biochem. Pharmacol.* — 1983. — Vol. 32. — P. 3063—3067.
11. Schuster A., Hunder G., Fichtl B., Forth W. // *Toxicon.* — 1987. — Vol. 25. — P. 1321—1328.
12. Sedlak J., Lindsay R. H. // *Anal. Biochem.* — 1968. — Vol. 25. — P. 192—205.
13. Tutelyan V. A., Kravchenko L. V., Eller K. I. *Toxigenic fungi — their toxins and health hazard.* — Elsevier. — 1984. — P. 282—292.
14. WHO. *Selenium. Environmental Health Criteria 58.* — Geneva. — 1987.
15. Yoshizawa T., Sakamoto T., Ayano Y., Mirocha C. J. // *Agric. Biol. Chem.* — 1982. — Vol. 46. — P. 2613—2615.

Получено 19.04.90

#### PROTECTIVE EFFECT OF SELENIUM AGAINST ACUTE T-2 MYCOTOXICOSIS

L. V. Kravchenko, E. E. Kuzmina, L. I. Avrenyeva, V. A. Tutelyan

Institute of Nutrition, USSR Academy of Medical Sciences

Male Wistar rats were fed diets supplemented with selenium (0,5 and 2,5 mg/kg) for 6 weeks. When T-2 toxin was administered at 3,8 mg/kg body weight, signs of intoxication were less distinct in rats fed selenium-supplemented diets. Mortality caused by T-2 toxin was two times lower if selenium content amounted to 2,5 mg/kg. The level of cytochrome P-450 and the rate of deethylation of 7-ethoxycoumarin were considerably decreased in the liver of rats that received T-2 toxin and fed a diet with high selenium content. At the same time the activity of epoxide hydrolase and UDP-glucuronosyltransferase was significantly higher (1,6 and 1,7 times more) as compared with unsupplemented group. The results obtained allow to assume that there is a relationship between the decrease of T-2 toxin toxicity and the change in its metabolism in rats fed selenium-supplemented diets.



И. И. Герасимова, Н. С. Столинская

# ВЛИЯНИЕ ПОЛИЭФИРНОГО АНТИБИОТИКА ОМОМИЦИНА НА АКТИВНОСТЬ СИСТЕМЫ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК СЕРДЦА НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Циклические нуклеотиды — цикло-3',5'-аденозинмонофосфат (цАМФ) и цикло-3',5'-гуанозинмонофосфат (цГМФ) — опосредуют реакцию клеток на самые разнообразные воздействия. Направленное изменение внутриклеточного уровня этих регуляторов можно использовать как инструмент при изучении участия цАМФ и цГМФ в механизмах адаптации.

Существенную роль в регуляции активности ферментов системы циклических нуклеотидов играет  $\text{Ca}^{2+}$  [5]. В свою очередь следует отметить, что для анализа и контроля функции клеток широкое распространение получили соединения, обладающие свойствами ионофоров, особенно кальцевых, в связи с ключевой ролью этого катиона в активации самых разнообразных метаболических процессов в клетке. На разных биологических объектах показано изменение содержания циклических нуклеотидов под влиянием кальцевого ионофора А23187 [6—9, 12, 13].

Полученный во ВНИИ антибиотиков полиэфирный антибиотик омомоцин (985-И, 16-деэтилин-даномоцин) [10] обладает свойствами ионофора с селективностью следующего характера  $\text{K}^+ \gg \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Na}^+$  [1].

Целью настоящей работы явилось изучение реакции циклических нуклеотидов культивируемых клеток сердца новорожденных крыс на изменение концентрации внутриклеточных ионов, и в частности  $\text{Ca}^{2+}$ , с помощью 985-И. Этот интерес обусловлен тем, что культура кардиомиоцитов новорожденных крыс используется в нашей лаборатории в качестве модели для изучения влияния гипоксии и ишемии на состояние лизосомного аппарата клетки и участия в этом процессе циклических нуклеотидов [3].

**Методика.** Клетки сердца новорожденных крыс получали и культивировали по методике, описанной нами ранее [4].

За 2 ч до начала эксперимента среду культивирования заменяли 5 мл среды Игла, не содержащей сыворотки. Раствор 985-И (200 мкг/мл) готовили на среде Игла, не содержащей сыворотку. 1-Метил-3-изобутилксантин (МИКС) растворяли в диметилсульфоксиде до концентрации  $10^{-2}$  М. Конечные концентрации 985-И и МИКС составляли 4 мкг/мл и  $10^{-4}$  М соответственно. Концентрацию диметилсульфоксида во всех культурах доводили до 1%. Исследуемые вещества вносили в культуральные флаконы в объеме 50 мкл. Инкубацию проводили при 37 °С. После инкубации жидкость быстро сливали, флаконы помещали на лед и заливали холодным 6% раствором  $\text{HClO}_4$ . Циклические нуклеотиды экстрагировали из клеток с помощью 2-кратного замораживания при  $-70$  °С и оттаивания при 4 °С. Кислые экстракты нейтрализовали насыщенным раствором  $\text{K}_2\text{CO}_3$ . Выпадающий осадок  $\text{KClO}_4$  отделяли центрифугированием при 3000 g. В надосадке определяли содержание цАМФ и цГМФ радиоиммунологическим методом с помощью наборов «Счетарол» (ЧССР).

Таблица 1

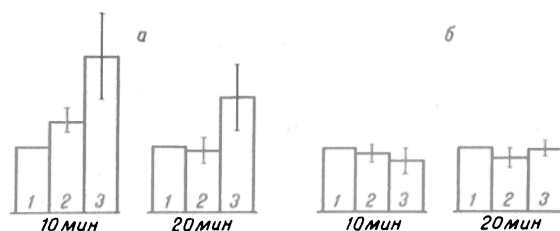
Влияние 985-И и МИКС на содержание циклических нуклеотидов в культуре клеток сердца новорожденных крыс ( $M \pm m$ )

Условия эксперимента	Время воздействия, мин	Уровень циклических нуклеотидов, пмоль на 1 мг белка	
		цГМФ	цАМФ
Контроль	10	$2,02 \pm 0,23$	$42,6 \pm 4,6$
985-И		$2,69 \pm 0,33$	$38,6 \pm 6,2$
985-И + МИКС		$4,41 \pm 1,04$	$40,6 \pm 1,4$
Контроль	20	$4,13 \pm 1,37$	$49,2 \pm 8,9$
985-И		$3,16 \pm 0,47$	$39,7 \pm 2,9$
985-И + МИКС		$6,10 \pm 1,50$	$52,2 \pm 12,3$

Концентрацию циклических нуклеотидов выражали в пиколях на 1 мг клеточного белка, содержание которого определяли методом Лоури [11] после растворения денатурированных клеток в 0,1 н. растворе NaOH.

**Результаты и их обсуждение.** Анализ средних значений (табл. 1) концентрации цГМФ показывает, что через 10 мин инкубации клеток с 985-И наблюдается некоторое повышение содержания в них этого нуклеотида, которое становится отчетливым в присутствии ингибитора фосфодиэстеразы (ФДЭ) циклических нуклеотидов МИКС. После 20 мин экспозиции клеток с 985-И содержание цГМФ не отличается от такового в контрольных культурах, однако в присутствии МИКС оно превышает контрольный уровень. Содержание цАМФ в клетках практически не изменяется. Отмечено наличие значительного разброса значений концентрации циклических нуклеотидов в контрольных культурах клеток, выделенных из сердца крысят различных пометов. Колебания концентрации цГМФ достигали особенно большого диапазона (1,5—9,9 пмоль на 1 мг белка). В несколько меньшей степени колебалось содержание цАМФ в этих культурах (от 21 до 67 пмоль на 1 мг белка). Этим, по-видимому, можно объяснить отсутствие достоверности различия концентраций цГМФ между группами по критерию *t* Стьюдента. Однако направленность изменения концентраций циклических нуклеотидов под влиянием использованных веществ в культурах одного выделения была одинаковой. В связи с этим мы выразили концентрацию циклических нуклеотидов в процентах от контроля в пределах культур одного выделения. Такое представление результатов даст более наглядную картину изменения концентрации циклических нуклеотидов во времени под действием 985-И и МИКС.

Как видно на рисунке, концентрация цАМФ в клетках в исследованный нами период не изме-



Изменение концентрации цГМФ (а) и цАМФ (б) в культуре клеток сердца новорожденных крыс под действием омомоцина и МИКС (в процентах от контроля).

1 — контроль; 2 — 985-И (4 мкг/мл); 3 — 985-И + МИКС ( $10^{-4}$  М).

Таблица 2

Влияние МИКС на базальную концентрацию цАМФ и цГМФ в культивируемых кардиомиоцитах новорожденных крыс ( $M \pm m$ )

Условия эксперимента	Уровень циклических нуклеотидов, пмоль на 1 мг белка	
	цГМФ	цАМФ
Контроль (11)	$1,19 \pm 0,83$	$12,6 \pm 5,4$
МИКС, 15 мин (6)	$2,16 \pm 0,27$	$21,5 \pm 3,9$
МИКС, 70 мин (6)	$5,86 \pm 1,10^*$	$22,4 \pm 5,0$

Примечание. Звездочка —  $p < 0,01$ . В скобках — число экспериментов.

нялась. Изучая динамику изменения концентрации цГМФ, можно прийти к выводу, что 985-И вызывает активацию гуанилатциклазы клеток сердца новорожденных крыс. Действие 985-И развивается быстро и продолжается недолго. Наиболее существенное увеличение концентрации цГМФ в клетках наблюдается при одновременном присутствии 985-И и МИКС. В то же время базальная концентрация цГМФ в кардиомиоцитах под действием МИКС достоверно повышалась только при более длительном воздействии (70 мин), тогда как достоверного увеличения базальной концентрации цАМФ не происходило (табл. 2). Аналогичные данные о медленном действии МИКС на неиндуцированную концентрацию цГМФ получены на культуре мышечных фибробластов линии 3Т6 [2]. Полученные результаты подтверждают, с одной стороны, ожидаемое действие 985-И как  $\text{Ca}^{2+}$ -ионофора, а с другой — свидетельствуют об интактности систем синтеза и метаболизма циклических нуклеотидов в используемой нами культуре кардиомиоцитов новорожденных крыс.

Можно предположить следующий ход развития событий в клетке. 985-И вызывает поступление ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в клетку. Они активируют гуанилатциклазу и усиливают синтез цГМФ [15]. Наличие в клетке повышенной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  и цГМФ вызывает увеличение активности обеих форм ФДЭ —  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой (ФДЭ-I) и циклонуклеотидзависимой (ФДЭ-II), что в свою очередь приводит к гидролизу и снижению концентрации цГМФ (преимущественное действие ФДЭ-I) и препятствует увеличению концентрации цАМФ, гидролизуемого ФДЭ-II [5]. Несмотря на то что в наших экспериментах не обнаружено признаков активации аденилатциклазы, полностью исключить такое действие 985-И нельзя, в связи с тем что имеются свидетельства стимулирующего влияния на этот фермент аналога 985-И по ионофорным свойствам — A23187 [6, 9].

МИКС, являясь ингибитором ФДЭ, в то же время вызывает мобилизацию  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо и транслокацию его в цитоплазму с последующим запуском активируемых  $\text{Ca}^{2+}$  процессов [14]. Это значит, что на определенном биологическом объекте и в конкретных условиях эксперимента результирующий эффект МИКС зависит от преобладания одного из двух противоположных действий этого соединения. В наших условиях на фоне массивированного по-

ступления внеклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазму под действием 985-И увеличение концентрации этого иона в цитоплазме за счет освобождения его из внутриклеточных депо, по-видимому, не оказывает значительного дополнительного эффекта. То обстоятельство, что при сочетанном воздействии 985-И и МИКС концентрация цГМФ оставалась повышенной и при 20-минутной инкубации, в то время как в отсутствие МИКС эффект 985-И не проявлялся, дает основание считать, что в данном случае МИКС действует преимущественно как ингибитор активности ФДЭ.

Нельзя, однако, исключить, что в случае действия МИКС на нестимулированные кардиомиоциты (см. табл. 2), отсутствие увеличения концентрации цГМФ на ранних сроках инкубации является результатом равновесия двух противоположно направленных процессов — синтеза цГМФ под влиянием гуанилатциклазы и его гидролиза ФДЭ, активированных  $\text{Ca}^{2+}$ , мобилизованным МИКС из внутриклеточных депо. С увеличением времени воздействия МИКС на клетки запас депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  истощается, активация ФДЭ затухает, начинает проявляться ингибирующее действие МИКС на фермент. Отсутствие повышения концентрации цАМФ в клетках при повышенном уровне цГМФ можно предположительно объяснить активирующим действием последнего на ФДЭ-II, гидролизующей цАМФ [15]. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования омомидина в качестве модулятора концентрации цГМФ в экспериментальных работах.

Выражаем искреннюю признательность Н. В. Муренцу (ВНИИ антибиотиков), предоставившему препарат омомидина.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Зебрев А. И., Антоненко Ю. И., Гуцин И. С. и др. // Биол. мембраны. — 1986. — Т. 3, № 12. — С. 1224—1231.
2. Корнилова Е. С., Кудрявцева Н. В., Никольский И. И. // Цитология. — 1985. — Т. 27, № 8. — С. 916—920.
3. Коровкин Б. Ф., Полякова Э. Д., Стволинская Н. С. и др. // Бюл. экпер. биол. мед. — 1988. — № 4. — С. 417—419.
4. Стволинская Н. С., Герасимова И. И., Коровкин Б. Ф. // Там же. — № 11. — С. 607—609.
5. Ткачук В. А. // Введение в молекулярную эндокринологию. — М., 1983. — С. 176—193.
6. Gerns D., Seitz M., Kramer W. et al. // Exp. Cell Res. — 1979. — Vol. 118. — P. 55—62.
7. Heisler S. // Life Sci. — 1976. — Vol. 19. — P. 233—242.
8. Hidaka H., Asano T. // J. Biol. Chem. — 1976. — Vol. 251. — P. 7508—7516.
9. Karl R. C., Zawulich W. C., Ferrendelli J. A. et al. // J. Biol. Chem. — 1975. — Vol. 250. — P. 4575—4579.
10. Larsen S. H., Boeck L. V. B., Mertz F. P. et al. // J. Antibiot. — 1988. — Vol. 41. — P. 1170—1177.
11. Lowry O. N., Rosebrough N. Y., Fars A. L. et al. // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
12. Pointier R. H., Butcher F. R., Fain J. N. // J. Biol. Chem. — 1976. — Vol. 251. — P. 2987—2992.
13. Prince W. T., Rasmussen H., Berridge M. Y. // Biochim. Biophys. Acta. — 1973. — Vol. 329. — P. 98—107.
14. Shalem Z., Izhar M., Shore L. S. et al. // J. Steroid Biochem. — 1988. — Vol. 31. — P. 835—838.
15. Waller U. Advances in cyclic nucleotides and protein phosphorylation research. — 1984. — Vol. 17. — P. 249—258.

Поступила 14.03.89

Content of cyclic nucleotides was studied in primary culture of newborn rat heart cells after administration of the polyether-containing antibiotic omomycin (985-1, 16-diethyl indanomycin). Level of cGMP was increased within 10 min of the cells exposition with 4 µg/ml of the antibiotic, while the nucleotide content elevation was more significant in presence of 1-methyl-3-isobutyl xanthine ( $10^{-4}$  M). When the exposition time was prolonged up to 20 min, content of cGMP returned to control values in absence of isobutyl xanthine and remained at the elevated level in presence of the drug. Content of cAMP was unaltered under these conditions. Omomycin may be used in experiments, where distinct increase of the cellular cGMP content is required.

градации белков до конца неясны. Один из нерешенных вопросов — соотношение цитозольного и лизосомального протеолиза.

Ранее нами было показано, что при переходе фибробластов в стационарную фазу роста скорость распада как долгоживущих, так и короткоживущих белков в клетках с трисомией по хромосоме 7 остается на уровне, характерном для логарифмической фазы роста, в то время как в диплоидных клетках распад белка ускоряется [2]. С целью выяснения причин нарушения регуляции распада белков при хромосомном дисбалансе мы оценили вклад лизосом в деградацию коротко- и долгоживущих белков фибробластов с нормальным и аномальным кариотипами в разных фазах роста, измеряя скорость распада белков в присутствии лизосомотропного агента  $\text{NH}_4\text{Cl}$  и определяя иротеолитическую активность лизата клеток при кислом и нейтральном значениях pH.

**Методика.** Объектом исследования служили эмбриональные фибробласты человека с нормальным кариотипом [штаммы ЛПЧ-814 (46, XY), 820 (46, XY), 821 (46, XX), 822 (46, XY), 845 (46, XY), 795 (46, XX), 1075 (46, XY)]; с трисомией по хромосоме 7 [штаммы ЛПЧ-522 (47, XY, +7)]; с трисомией по хромосоме 9 [штаммы ЛПЧ-400 (47, XY, +9)]; с трисомией по хромосоме 21 [штаммы ЛПЧ-1230 (47, XY, +21), 1241 (47, XY, +21), 1266 (47, XX, +21)]; с дуплицированным фрагментом хромосомы 1 [штаммы ЛПЧ-162 (46, XY)] и с триплоидией [штаммы ЛПЧ-478 (69, XXX), 707 (69, XXX), 1046 (69, XXX), 1062 (69, XXX)]. Штаммы исследовали в логарифмической и стационарной фазах роста в периоде между 14-м и 24-м пассажами. Клетки выращивали в пластиковых чашках Петри ( $d$  35 мм) на среде Игла с добавкой 2 мМ глутамин, 5 % бычьей сыворотки, 5 % пуловинной сыворотки человека, 50 ЕД/мл пенициллина. Для культивирования использовали контейнеры с подачей 5 %  $\text{CO}_2$ . За 1 сут до введения метки вводили аскорбиновую кислоту (50 мкг/мл, «Merck», ФРГ). Радиоактивный пролин вводили одновременно со сменой среды на бессывороточную. Для определения распада долгоживущих белков клетки метили  $^{14}\text{C}$ -пролином (0,2 мКи/мл, «Amersham», Англия) в течение 24 ч. Среду удаляли, клетки промывали средой Игла с добавкой 2 мМ глутамин, 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты, 20 мМ немеченого пролина (L-пролин, «Reanal», Венгрия) и инкубировали в той же среде 24 ч. Для определения распада короткоживущих белков клетки метили  $^{14}\text{C}$ -пролином (2 мКи/мл) в течение 3 ч, промывали, как описано выше, и инкубировали в среде с немеченым пролином 6 ч. В опытные чашки Петри на время инкубации с немеченым пролином добавляли  $\text{NH}_4\text{Cl}$  до конечной концентрации 20 мМ («Merck»). После инкубации среду сливали, клетки обрабатывали 0,25 % раствором трипсина в течение 10 мин, снимали с чашек Петри резиновым скребком и объединяли со средой. Полученный материал разрушали ультразвуком в дезинтеграторе MSE (Англия) (20 с, 2,3 А) на льду в 10 % трихлоруксусной кислоте (ТХУ). Осадок отделяли центрифугированием (10 мин, 5000 об/мин), дважды промывали 5 % ТХУ, 1 раз смесью хлороформ — метанол (1:1) и растворяли в 0,2 н. NaOH. Радиоактивность осадков и надосадочных жидкостей измеряли в жидкости Брера с учетом эффективности счета в ТХУ и NaOH.

Распад долгоживущих белков определяли по формуле:

$$D = \frac{P_n}{P_n + P_o}$$

где  $D$  — процент распада белков через 24 ч;  $P_n$  — радиоактивность в надосадочной жидкости (в имп/мин);  $P_o$  — радиоактивность в осадке (в имп/мин). Для выявления различий распада долгоживущих белков на фоне  $\text{NH}_4\text{Cl}$  и в его отсутствие определяли отношение:

$$\frac{D(-\text{NH}_4\text{Cl})}{D(+\text{NH}_4\text{Cl})}$$

Учитывая длительный срок инкубации на немеченой среде (24 ч), распадом белка в исходной точке пренебрегали. Для определения влияния  $\text{NH}_4\text{Cl}$  на распад короткоживущих белков сравнивали отношения:

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 618.33-008.939.6-055.5/.7:575.224.231-02:618.33-008.931:577.152.344

Н. В. Голубева, О. В. Подобед, В. И. Кухаренко, А. А. Дельвиц

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВКЛАДА ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ В ДЕГРАДАЦИЮ КОРОТКО- И ДОЛГОЖИВУЩИХ БЕЛКОВ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА С АНОМАЛЬНЫМ НАБОРОМ ХРОМОСОМ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Институт медицинской генетики АМН СССР, Москва

Содержание белков в клетке определяется соотношением скоростей их синтеза и распада. Установлено, что внутриклеточный распад белков не только регулирует концентрацию некоторых ферментов, тотальных внутриклеточных и секретируемых белков, но и позволяет поддерживать внутриклеточный и внеклеточный пул аминокислот, необходимый для синтеза белка [11]. Исследования, проведенные на многих типах клеток [4—6, 8—10, 12—16], а также на целых органах и тканях [5, 11], выявили, что интенсивность деградации зависит от возраста и фазы роста клеток в культуре [3, 16], наличия АТФ [6], условий питания клеток [4], природы субстрата [5, 8, 10, 14, 15]. Имеющиеся данные позволяют выделить 2 различающихся по локализации пути иротеолиза — цитозольный и лизосомальный. В постоянно протекающем так называемом базальном распаде белков принимают участие нейтральные протеиназы цитозоля и частично лизосомы [5]. При ускорении деградации белков в случае культивирования клеток в среде, не содержащей сыворотку, при дефиците аминокислот, а также при замедлении роста культуры в результате контактного ингибирования вклад лизосомальных ферментов в общий распад белков увеличивается [4, 5]. Путь деградации белка определяет время его жизни: короткоживущие белки разрушаются в цитозоле, а долгоживущие — в основном в лизосомах [8, 10, 14, 15]. Несмотря на наличие многочисленных работ в этой области, механизмы внутриклеточной де-

$$\frac{D}{D_0} (-NH_4Cl) \quad \frac{D}{D_0} (+NH_4Cl),$$

где  $D$  — процент распада белков через 6 ч;  $D_0$  — процент распада белков в исходной точке после промывки клеток.

Оценку разности выборочных средних выполняли по критерию Стьюдента.

Для определения протеолитической активности клетки, меченные в течение 24 ч смесью  $^3H$ -аминокислот («Amersham»), промывали 0,02 М К-фосфатным буфером (рН 7,4), содержащим 0,14 М NaCl, и разрушали ультразвуком в этом же буфере, содержащем 0,5 % Triton X-100. Гомогенат делили на две части, к одной добавляли равный объем смешанного 0,2 М ацетатного и фосфатного буфера рН 7,0, к другой — равный объем того же буфера с рН 4,2 и дитиотрейтол (ДТТ) до конечной концентрации 2 мМ. Каждая проба содержала 50 мкг белка. Контрольные пробы осаждали ТХУ. Остальные пробы инкубировали 24 ч при 37 °С, охлаждали во льду и осаждали ТХУ. Осадки дважды промывали 5 % ТХУ, растворяли в 0,2 н. NaOH и просчитывали радиоактивность в осадках и надосадочных жидкостях, как описано выше. Относительную протеолитическую активность определяли как отношение процента распада белков за 24 ч к проценту распада в исходной точке ( $\frac{D}{D_0}$ ). Величину этого отношения для каждого штамма определяли как среднее из 3—5 параллелей. Статистическую обработку данных проводили с помощью критерия Вилкоксона — Уайта [1].

**Результаты и обсуждение.** Исследовали распад коротко- и долгоживущих белков в логарифмической и стационарной фазах роста эмбриональных фибробластов человека с нормальным кариотипом, трисомией по хромосоме 7 или 9 и триплоидией. Чтобы разделить цитозольную и лизосомальную деградацию белков, применяли лизосомотропный агент  $NH_4Cl$ . Аутодеградацию белков изучали в клетках, инкубированных на бессывороточной среде, поскольку в отсутствие сыворотки лизосомальная система деградации белков активизируется [4]. Обнаружено, что отношение процента распада долгоживущих белков в отсутствие  $NH_4Cl$  к проценту распада в присутствии  $NH_4Cl$  в диплоидных фибробластах, находящихся в логарифмической фазе роста, близко к 1 (табл. 1). Эти данные свидетельствуют о том, что в логарифмической фазе роста диплоидных клеток лизосомальные ферменты либо совсем не принимают участие в деградации долгоживущих белков, либо их вклад незначителен. В клетках с аномальным кариотипом в логарифмической фазе роста это отношение достоверно повышено по сравнению с нормой (см. табл. 1). Можно предположить, что в трисомных и триплоидных фибробластах в логарифмической фазе роста деградация по крайней мере части долгоживущих белков

происходит под действием лизосомальных ферментов.

Подавление  $NH_4Cl$  распада долгоживущих белков в диплоидных фибробластах в стационарной фазе роста (см. табл. 1) при прекращении пролиферации свидетельствует о том, что вклад лизосомальной системы в распад долгоживущих белков в состоянии покоя увеличивается. Эффект повышения деградации долгоживущих белков за счет лизосомальных ферментов показан также в работе [4].

В отличие от нормы в стационарной фазе роста фибробластов с аномальным кариотипом лизосомальная деградация долгоживущих белков не повышается, а остается на уровне, характерном для логарифмической фазы роста (см. табл. 1).

Активация лизосом уже в логарифмической фазе роста фибробластов с аномальным кариотипом и отсутствие изменения лизосомальной активности при прекращении пролиферации могут быть связаны не только с изменением соотношения долгоживущих и короткоживущих белков в этих клетках, но и с нарушением созревания лизосом. Лизосомальные ферменты фибробластов кожи человека представлены двумя пиками энзиматической активности в зависимости от фазы роста клеток: в логарифмической фазе роста выражен пик «легких», в стационарной — пик «тяжелых» лизосом [7]. Возможно, в фибробластах с аномальным кариотипом снижена или отсутствует лизосомальная активность, характерная для стационарной фазы роста. Кроме того, в стационарной фазе роста в анеуплоидных фибробластах, возможно, накапливаются белки с различными структурными нарушениями, аномальной аминокислотной последовательностью, досрочно терминированные белки, которые, как было показано, в основном деградируют в цитозоле [14, 15].

В логарифмической фазе роста как диплоидных фибробластов, так и фибробластов с аномальным кариотипом  $NH_4Cl$  не влияет на распад короткоживущих белков (табл. 2). Необходимо отметить, что за 3 ч мечения синтезируются не только короткоживущие, но и долгоживущие белки и, следовательно, нельзя исключить возможность того, что часть их, представленная более стабильными белками, разрушается под действием лизосомальных ферментов. Однако, как показывают результаты, в целом лизосомальная система не играет ведущей роли в деградации коротко- и долгоживущих белков в логарифмической фазе роста фибробластов с нормальным кариотипом, что согласуется с данными литературы [3].

Отсутствие повышения лизосомальной деградации короткоживущих белков в стационарной фазе роста диплоидных фибробластов (см. табл. 2) еще раз подтверждает тот факт, что короткоживущие белки преимущественно разрушаются без участия лизосомальной системы. Такой же вывод можно сделать в отношении короткоживущих белков фибробластов с аномальным кариотипом. Несмотря на то что в логарифмической фазе роста лизосомальная активность анеуплоидных фибробластов повышена по сравнению с нормой, процент распада короткоживущих белков в присутствии  $NH_4Cl$  статистически не отличается от процента их распада без  $NH_4Cl$  (см. табл. 2).

Таблица 1

Распад долгоживущих белков в отсутствие и в присутствии  $NH_4Cl$  ( $M \pm m$ )

Фаза роста	Фибробласты $\frac{D(-NH_4Cl)}{D(+NH_4Cl)}$	
	диплоидные	триплоидные, с трисомией по хромосоме 7, 9, с дубликацией части хромосомы 1
Логарифмическая	$0,99 \pm 0,06^a$ ( $n=5$ )	$1,17 \pm 0,04^b$ ( $n=6$ )
Стационарная	$1,26 \pm 0,11^b$ ( $n=5$ )	$1,17 \pm 0,09^c$ ( $n=5$ )

Примечание.  $p < 0,05$  для а и б, а и в;  $p > 0,05$  для б и г, в и г. Здесь и в табл. 2  $n$  — число опытов.

Таблица 2

Распад короткоживущих белков в отсутствии и в присутствии  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $M \pm m$ )

Фаза роста	Фибробласты $\frac{D}{D_0}$	
	диплоидные	триплоидные, с трисомией по хромосомам 7, 9 с дупликацией части хромосомы 1
Логарифмическая:		
— $\text{NH}_4\text{Cl}$	$1,05 \pm 0,03^a$ ( $n=4$ )	$1,20 \pm 0,05^b$ ( $n=6$ )
+ $\text{NH}_4\text{Cl}$	$0,99 \pm 0,01^b$ ( $n=4$ )	$1,11 \pm 0,03^c$ ( $n=6$ )
Стационарная:		
— $\text{NH}_4\text{Cl}$	$1,06 \pm 0,03^d$ ( $n=4$ )	$1,09 \pm 0,03^e$ ( $n=6$ )
+ $\text{NH}_4\text{Cl}$	$0,99 \pm 0,02^e$ ( $n=4$ )	$1,05 \pm 0,01^f$ ( $n=6$ )

Примечание.  $p < 0,05$  для а и в, б и г, в и ж;  $p > 0,05$  для а и б, в и г, д и е, ж и з, с и з.

Поскольку полученные результаты продемонстрировали изменение соотношения лизосомального и цитозольного путей протеолиза в фибробластах с хромосомным дисбалансом, была определена эндогенная протеолитическая активность лизата клеток диплоидных и анеуплоидных штаммов в различные фазы роста. Установлено, что корреляция между повышенной активностью лизосомальной системы деградации в логарифмической фазе роста фибробластов с аномальным кариотипом и протеолитической активностью лизата клеток при pH 4,2 отсутствует: сравнение рядов значений относительной протеолитической активности разных штаммов диплоидных фибробластов и фибробластов с трисомией и триплоидией с использованием критерия Вилкоксона — Уайта [1] показало отсутствие статистически значимых различий (табл. 3). Эндогенная протеолитическая активность при pH 7,0 также одинакова в лизатах клеток нормальных штаммов и штаммов с аномальным кариотипом. Аналогичные результаты получены и для фибробластов в стационарной фазе роста (см. табл. 3).

Таблица 3

Относительная протеолитическая активность лизата фибробластов в различных фазах роста

Фаза роста	pH	Фибробласты $\frac{D}{D_0}$	
		диплоидные	триплоидные, трисомные по хромосомам 7, 9, 21 с дупликацией части хромосомы 1
Логарифмическая	4,2	$1,26 - 4,61$ ( $n=12$ )	$1,47 - 4,78$ ( $n=12$ )
	7,0	$1,03 - 2,58$ ( $n=11$ )	$0,88 - 2,83$ ( $n=14$ )
Стационарная	4,2	$2,84 - 5,0$ ( $n=5$ )	$2,22 - 4,34$ ( $n=6$ )
	7,0	$0,89 - 1,93$ ( $n=9$ )	$1,14 - 1,79$ ( $n=9$ )

Примечание. Относительную протеолитическую активность определяли как отношение процента распада белков

за 24 ч к проценту распада в исходной точке ( $\frac{D}{D_0}$ ). При-

ведены крайние значения ряда определений;  $n$  — число определений. Каждая величина представляет среднее значение 3—5 параллельных определений.

Таким образом, изменение соотношения лизосомального и цитозольного путей протеолиза в фибробластах с хромосомным дисбалансом не является следствием изменения активности кислых и нейтральных протеиназ. Возможно, нарушение регуляции распада белков при хромосомном дисбалансе затрагивает механизмы отбора белковых молекул, подвергающихся протеолизу.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Малюта Ю. С., Тарасов В. В. Математические методы статистического анализа в биологии и медицине. — М., 1981. — Кн. 2. — Табл. 8.1.
2. Подобед О. В., Голубев Н. В., Кухаренко В. И., Дельвиц А. А. // Молекулярная генет. — 1988. — № 5. — С. 41—45.
3. Amenta J., Sargus M. J., Brocher S. C. // J. Cell Physiol. — 1980. — Vol. 105. — P. 51—61.
4. Cockle S. M., Dean R. T. // Biochem. J. — 1982. — Vol. 208. — P. 795—800.
5. Dean R. T. // Fed. Proc. — 1980. — Vol. 39. — P. 15—19.
6. Gronostajski A., Pardee A., Goldberg J. // J. biol. Chem. — 1985. — Vol. 260. — P. 3344—3349.
7. Heyworth C., Wynn C. // Molec. Cell. Biochem. — 1985. — Vol. 67. — P. 25—30.
8. Knowles S., Bellard F. // Biochem. J. — 1976. — Vol. 156. — P. 609—617.
9. McKay M. J., Atkinson E. M., Werthington V. C., Hipkiss A. R. // Biochim. biophys. Acta. — 1983. — Vol. 759. — P. 42—48.
10. Neff N., DeMartino G., Goldberg A. // J. Cell Physiol. — 1979. — Vol. 101. — P. 439—458.
11. Scornik O. A. // Fed. Proc. — 1980. — Vol. 39. — P. 15—19.
12. Seglen P. O., Grinde B., Bolheim A. E. // Europ. J. Biochem. — 1979. — Vol. 95. — P. 215—225.
13. Speiser S., Etlinger J. D. // J. biol. Chem. — 1982. — Vol. 257. — P. 14122—14127.
14. Wharton S., Riley P. O. // Biochem. J. — 1983. — Vol. 212. — P. 345—353.
15. Wharton S., Hipkiss A. // FEBS Lett. — 1984. — Vol. 168. — P. 134—138.
16. Wharton S., Hipkiss A. // Ibid. — 1985. — Vol. 184, N 2. — P. 249—253.

Поступила 30.03.89

## CONTRIBUTION OF LYSOSOMAL ENZYMES TO DEGRADATION OF SHORT- AND LONG-LIFE PROTEINS IN HUMAN EMBRYONAL FIBROBLASTS WITH ANOMALOUS CHROMOSOMAL SET

N. V. Golubeva, O. V. Podobed, V. I. Kukharensko, A. A. Del'vig

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

Degradation of short- and long-life proteins was studied in human embryonal fibroblasts with normal karyotype, trisomy and triploidy. Degradation of both short- and long-life proteins by means of lysosomal enzymes was elevated in fibroblasts with anomalous karyotype at the logarithmic phase of growth as compared with normal state, when lysosomotropic agent  $\text{NH}_4\text{Cl}$  was used. In transition to stationary phase of growth participation of the lysosomal system in degradation of long-life proteins was increased in fibroblasts with normal karyotype, whereas degradation of these proteins in aneuploid fibroblasts maintained at the level found during the logarithmic phase of growth. Lysosomal enzymes did not participate apparently in degradation of short-life proteins in fibroblasts with normal and anomalous karyotype at both phases of growth. The data obtained suggest that chromosomal disbalance was related to impaired regulation of protein degradation as well as to possible alteration in the ratio of cytosol and lysosomal proteolysis.



П. П. Балгир, Ю. А. Корниенко, С. С. Шишкин

**ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ БЕЛКОВ ВОРСИН ХОРИОНА И ХОРИАЛЬНОЙ МЕМБРАНЫ ДВУМЕРНЫМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗОМ**

Институт медицинской генетики АМН СССР, Москва

Интенсивность исследований белков плацентарных клеток человека нарастает год от года [2—4]. Это обусловлено как важной ролью плацентарных белков, участвующих в обеспечении репродуктивной функции, так и биотехнологическими аспектами проблемы. Традиционными биохимическими и иммунологическими методами охарактеризованы многие плацентарные белки, что позволило предложить их рациональную классификацию [2]. С возникновением молекулярно-анатомического систематического подхода к изучению белков человека [5, 6] открылись новые возможности для анализа плацентарных белков. Двумерный электрофорез по О'Фареллу, используемый при указанном подходе, позволяет параллельно изучать сотни белков, синтезирующихся в определенном виде клеток или образцах ткани, выявлять новые белки, классифицировать белки по физико-химическим свойствам. Особый интерес в этом отношении представляют белки хориональных клеток, поскольку их изучение может найти применение в пренатальной диагностике наследственных болезней.

В данной работе представлены результаты анализа белков хориона в I триместре беременности модифицированным методом О'Фарелла, которые свидетельствуют о широких потенциальных возможностях указанного подхода.

**Методика.** Образцы плацентарных тканей получали в результате медицинских абортов, проводимых у женщин с нормально протекающей беременностью на сроках 7—8 нед ( $n=20$ ). Биоптаты препарировали и отделяли ворсинчатый хорион и хориальную мембрану от других тканей. Препараты промывали физиологическим раствором, замораживали при  $-70^{\circ}\text{C}$  и хранили до фракционирования при этой температуре не более 1 нед.

Перед фракционированием образцы тканей полностью солибилизовали в 9М растворе мочевины, содержащем 3 % тритона X-100; 5 % 2-меркаптоэтанол; 0,12 % 3[(3-хлорамидопропионил)диметиламмоний]-1 пропан сульфата (CHAPS); 0,4 % амфолинов pH 3,5—10,0; 1,6 % амфолинов pH 5,0—7,0, к которому добавляли фенилметилсульфонил-флуорид (PMSF) до 0,1 мМ концентрации. Двумерный электрофорез в ПААГ проводили по методу [7] с небольшими модификациями. При изоэлектрофокусировании (ИЭФ) образцы наносили с кислотного края гелей, продолжительность ИЭФ 11 кВ·ч. При фракционировании во втором направлении использовали пластины ПААГ с градиентом концентрации 5—25 %. Окрашивание проводили методом азотно-кислого серебрения по методу [8]. В качестве белков — маркеров молекулярной массы использовали коммерческие препараты и препараты мембранных белков эритроцитов человека, как описано ранее [1].

**Результаты и обсуждение.** На рис. 1 представлена фотография типичной электрофореграммы белков из препаратов ворсин хориона. Сравнение повторных электрофореграмм и электрофореграмм разных образцов показало хорошую воспроизводимость общей картины распределения белковых фракций на пластинках геля. Использованный метод детекции позволял выявлять 150—200 фракций, которые широко варьировали по количественной представленности. Большинство белков располагалось в диапазоне молекулярных масс от 100 до 15 кДа. Вместе с тем на полученных электрофореграммах присутствовали также фракции с мол. массой до 240 кДа, что, возможно, обусловлено улучшением растворимости этих белков за счет введения в солибилизирующий раствор дополнительного детергента (CHAPS). В литературе нам удалось найти только

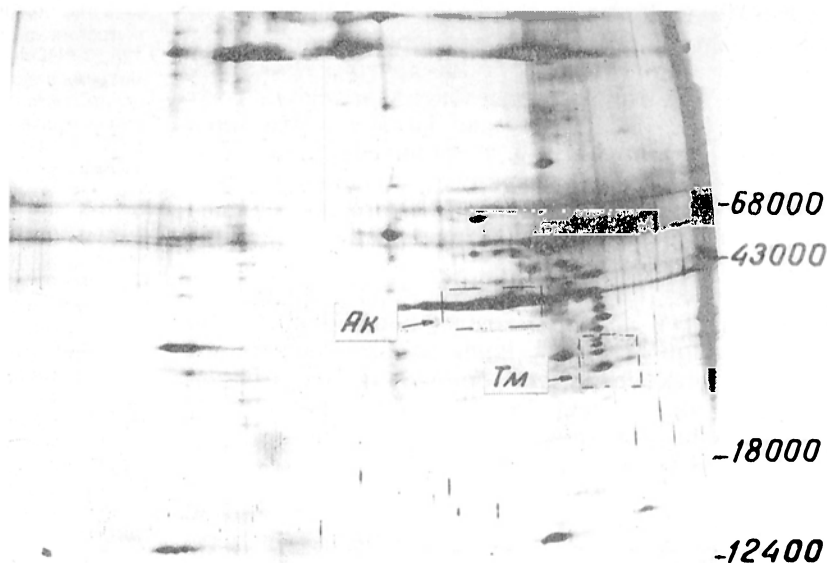


Рис. 1. Двумерная электрофореграмма белков ворсин хориона человека.

Окраска азотно-кислым серебром. Справа стрелками показано положение белков-маркеров молекулярной массы (мембранные белки эритроцитов человека [1]). Ак — актин; Тн — группа тропомиозиновых белков; 14, 15, 25 и 37 — белки, пронумерованные в соответствии с данными Р. Тринка и соавт. [3].

Рис. 2. Двумерная электрофореграмма белков хориальной мембраны человека.

Окраска азотнокислым серебром. Справа стрелками показано положение белков-маркеров (68 000 — альбумин; 43 000 — овалбумин; 18 000 — глобулин; 12 400 — цитохром C). Ак — актин; Тм — группа тропомиозиновых белков.



одну работу, в которой использовался двумерный электрофорез по О'Фареллу для анализа белков ворсин хориона [3]. Хотя из-за особенностей проведения анализа результаты трудно сравнимы в деталях, общие закономерности распределения фракций полностью согласуются. Исходя из значений молекулярной массы (определенным по белкам-маркерам), количественной представленности и особенностей взаиморасположения пятен, были предположительно определены фракции актина, тропомиозиновых белков, а также некоторых других белков, которые Р. Трнка и соавт. [7] обозначили соответствующими номерами (см. рис. 1).

Препараты хориальной мембраны обнаруживали существенно меньшее количество белковых фракций на электрофореграммах (рис. 2). Среди них доминирующее положение занимали актин и белки с подобными и несколько более кислыми значениями pI. Достаточно хорошо были представлены белки тропомиозиновой области. Вместе с тем имелись лишь единичные фракции с нейтральными значениями pI. Интересно отметить, что и в препаратах хориальной мембраны присутствовали белки с мол. массой около 100 кДа и выше. Общее количество детектируемых фракций в этих препаратах не превышало 50.

Представленные данные свидетельствуют о том, что двумерный электрофоретический анализ белков хориона обладает большими потенциальными возможностями и позволяет применять к указанному объекту стратегию систематического подхода [5, 6].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ковалев Л. И., Шишкин С. С., Иволгина Г. Л. и др. // Биохимия. — 1986. — Т. 51. № 6. — С. 896—908.
2. Anderson N., Anderson L. // Clin. Chem. — 1982. — Vol. 28. — P. 739—749.
3. Anderson N. L., Hoffman J. P., Gemmell A., Taylor J. // Ibid. — 1984. — Vol. 30. — P. 2031—2036.
4. Oakley B. R., Kirsch D. R., Morris N. R. // Analyt. Biochem. — 1980. — Vol. 105. — P. 361—363.
5. O'Farrel P. H. // J. biol. Chem. — 1975. — Vol. 250. — P. 4007—4021.
6. Proteins of the Placenta/Ed. P. Bischof, A. Klopfer. — Basel, 1985.
7. Trnka P., Pergament E., Anderson N. // Clin. Chem. — 1984. — Vol. 30. — P. 2040—2042.

8. Vanderpuye O., Smith C. H. // Placenta. — 1987. — Vol. 8. — P. 591—608.

Поступила 05.04.89

#### FRACTIONATION OF CHORIONIC VILLI AND CHORIO-MEMBRANE PROTEINS BY TWO-DIMENSIONAL ELECTROPHORESIS

P. P. Balgir, Y. A. Kornienko, S. S. Shishkin

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

Human chorionic villi and choriomembrane proteins were analyzed by two-dimensional electrophoresis. The samples were obtained during the first trimester of pregnancy and were solubilized in buffer containing Triton X-100 and CHAPS. High molecular weight proteins with  $M_r$  above 200 kDa and proteins with basic pI were found to be better resolved in this buffer system than in solution containing Triton X-100 only. Nearly 200 protein spots could be visualized on the silver stained gels.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.152.41-008.64-092.9-02:615.918:582.282]-06:616.154:577.161.2

И. Н. Сергеев, Н. М. Пилюя, В. А. Тютельян, В. Б. Спиричев

#### МЕХАНИЗМ НАРУШЕНИЙ ОБМЕНА КАЛЬЦИЯ ПРИ ДЕЙСТВИИ ТОКСИНА Т-2; РОЛЬ ЭНДОКРИННОЙ СИСТЕМЫ ВИТАМИНА D

Институт питания АМН СССР, Москва

Трихотеценовые микотоксины, к которым принадлежит токсин Т-2 (Т-2), относятся к природным загрязнителям продовольственного сырья и пищевых продуктов, представляющим значительную потенциальную опасность для здоровья человека [7]. Эти микотоксины отличаются широким спектром токсического действия и повсеместным распространением. Одним из наиболее изученных, «модельным» микотоксином, является Т-2, токсические свойства которого связывают с наличием в его структуре эпоксидного кольца [7, 8].

Как было впервые показано нами ранее [2, 4, 5], к числу биохимических проявлений токсического действия Т-2, а также другого трихотеценового микотоксина — дезоксиниваленола — относится нарушение обмена кальция. Эти микотоксины при подостром и хроническом введении вызывают у крыс умеренную гипокальциемию и снижение активного транспорта кальция в кишечнике, что сопровождается развитием вторичного дефицита витамина D.

Поскольку витамин D в настоящее время рассматривается как ключевой кальцийрегулирующий гормон [3], мы попытались оценить возможные изменения его обмена и рецепторного связывания при действии Т-2 на традиционно используемой для этой цели модели — крысах, лишенных витамина D.

**Методика.** В опыте использовали самцов крысят-отъемышей линии Вистар с исходной массой тела около 50 г. Животные в течение 4 нед получали полусинтетический, лишенный витамина D рацион, содержащий 0,6 % Са и 0,7 % Р [2]. Крысы были разделены на 7 групп по 5—7 животных в каждой: животных 1-й контрольной группы через день вводили витамин D<sub>3</sub> в дозе 1 мкг (40 МЕ), животные 2-й группы не получали витамин D<sub>3</sub>, крысы 3-й группы получали одну дозу витамина D<sub>3</sub> (1 мкг) за 24 ч до забоя, 4-й группы — витамин D<sub>3</sub> в течение 5 дней до забоя в ежедневной дозе 1 мкг; животные 5, 6 и 7-й групп по обеспеченности витамином D были аналогичны крысам 2, 3 и 4-й групп, но одновременно ежедневно в течение 5 дней до забоя им в/ж вводили Т-2 («Sigma») в дозе 0,54 мг/кг ( $1/7$  LD<sub>50</sub>).

Метаболизм витамина D изучали, определяя концентрацию в сыворотке крови его основной циркулирующей формы — 25-гидроксивитамина D (25-OHD) и активность ферментов почек, гидроксилирующих эту форму с образованием гормонально активных метаболитов — 1,25-дигидроксивитамина D<sub>3</sub> [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] и 24,25-дигидроксивитамина D<sub>3</sub> [24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>]. Концентрацию 25-OHD в крови определяли методом радиокооперентного белкового связывания наборами «Vitamin D — screening Kit» («Bühlmann Lab.»). Активность 1- и 24-гидроксилазы 25-OHD<sub>3</sub> (1-ОНаза и 24-ОНаза) измеряли с использованием срезов коры почек, как

описано нами ранее [1]. Концентрация субстрата 25-OHD<sub>3</sub> в пробах составляла 5 мкМ плюс 0,1 мкКи/мл 25-гидрокси-[26,27-<sup>3</sup>H]витамина D<sub>3</sub> («Amersham»). Предварительную хроматографическую очистку ацетонитрильных экстрактов ткани осуществляли на миниколонках «Sep-Pak C<sub>18</sub>» («Alltech»), последовательно пропуская через них воду, смесь метанол — вода (7:3) и ацетонитрил (последняя фракция содержит метаболиты витамина D<sub>3</sub>). Разделение <sup>3</sup>H-метаболитов D<sub>3</sub> осуществляли методом ВЭЖХ с использованием колонки «Ultrasphere ODS», 5 мкм («Beckman»), элюирующая система — метанол — вода (90:10). Содержание сАМР в коре почек определяли методом радиокооперентного белкового связывания наборами «Cyclin AMP assay Kit» («Amersham»), используя высокоскоростной супернатант, полученный после прогревания в течение 4 мин при 95 °С гомогената ткани в 50 мМ трис-НСl-буфере, содержащем 4 мМ ЭДТА.

Раздельное количественное определение концентрации незанятых и общих рецепторов в 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> в хроматиновой фракции почек осуществляли ранее описанным методом [6].

Концентрацию паратгормона (ПТГ) и остеокальцина в сыворотке крови определяли радиоиммунологическим методом с помощью наборов hPTH-C-K и OSTK-PR(CIS). Концентрацию общего Са, неорганического Р в сыворотке крови, активность щелочной фосфатазы (ЩФ), транспорт Са в тонкой кишке, показатели состояния костной ткани (бедренная кость) определяли по ранее описанным методам [2].

**Результаты и обсуждение.** При оценке вызываемых Т-2 нарушений обмена Са и витамина D мы использовали лишенных витамина D крыс, которым вводили этот витамин за 1 и 5 дней до забоя с целью определения динамики восстановления исследуемых параметров.

Недостаточность витамина D вызвала характерные изменения обмена Са, проявляющиеся гипокальциемией, гипофосфатемией, увеличением концентрации ПТГ и активности ЩФ в крови, снижением всасывания Са и активности ЩФ в кишечнике, а также уменьшением плотности костной ткани, содержания Са и Р в костях (табл. 1, 2). Концентрации основного метаболита витамина D — 25-OHD в крови, а также занятых *in vivo* рецепторов гормональной формы 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> в почках уменьшались до минимальных опреде-

Таблица 1

Показатели обмена Са у лишенных витамина D крыс при введении им Т-2

Группа животных	Сыворотка крови						Кишечник	
	Са, мг/дл	Рi, мг/дл	25-OHD, нг/мл	ПТГ, нг/мл	остеокальцин, нг/мл	ЩФ, Е/Л	ЩФ, нмоль/мин·мг	транспорт Са, нмоль/см <sup>2</sup> ·15 мин
1-я	9,4±0,2	8,1±0,1	21,2±2,3	14,5±2,5	6,97±1,11	135±13	111±5	231±21
2-я	5,9±0,2**	6,3±9,2**	0,9±0,1**	59,6±3,2**	4,61±0,43	211±14**	86±3**	105±7**
3-я	6,3±0,3**	6,5±0,3**	7,1±1,3**	61,0±2,8**	13,0±1,41**	168±10	92±2**	152±17**
4-я	8,1±0,2**	7,2±0,4**	14,1±1,2**	28,9±1,6**	7,34±1,26	134±14	99±3	226±9
5-я	6,4±0,1***	6,0±0,1**	1,0±0,7**	128±4,7***	4,30±1,45	184±10**	84±2**	91±12**
6-я	6,3±0,4**	6,6±0,2**	5,9±1,9**	167±5,8***	4,69±2,33	166±10	87±3**	158±4**
7-я	7,2±0,6**	6,9±0,3**	9,7±1,6***	185±4,9***	4,97±1,87	149±10	91±6**	146±13***

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3: одна звездочка —  $p < 0,05$  по сравнению с соответствующей группой животных, не получавших Т-2, две — по сравнению с 1-й группой.

Таблица 2

Показатели состояния костной ткани у лишенных витамина D крыс при введении им Т-2

Группа животных	Диафизы			Эпифизы	
	плотность, г/см <sup>3</sup>	Са, мг/см <sup>3</sup>	Р, мг/см <sup>3</sup>	Са, мг/г	Р, мг/г
1-я	1,39±0,03	346±20	169±13	263±6	115±9
2-я	1,29±0,03**	183±10**	99±9**	153±8**	72±4**
3-я	1,29±0,01**	218±18**	106±12**	162±7**	90±9
4-я	1,39±0,01	225±8**	127±7**	174±10**	92±9
5-я	1,26±0,02**	214±10**	124±12**	148±6**	94±10
6-я	1,27±0,02**	174±9***	94±14**	154±8**	85±10
7-я	1,29±0,02***	198±10**	98±6***	160±12**	96±9

Показатели эндокринной системы витамина D у лишенных витамина D крыс при введении им Т-2

Группа животных	Активность гидроксилаз 25-OHД <sub>3</sub> в почках, нмоль/20 мин·г		Концентрация сАМР в почках, нмоль/г	Концентрация рецепторов 1,25(OH) <sub>2</sub> Д <sub>3</sub> в почках, фмоль на 1 мг белка		
	1-ОНазы	24-ОНазы		общие	занятые абс.	%
1-я	97,3±5,0	213±6,7	337±47	80,9±1,5	30,3±0,8	37,5±0,5
2-я	155±7,8**	160±4,1**	658±63**	54,0±4,2**	1,7±1,5**	3,0±2,4
3-я	146±3,9**	115±19,9**	564±32**	58,0±5,0**	9,9±1,8**	17,2±0,8**
4-я	136±12,0**	159±6,4**	577±36	91,0±5,9	22,8±3,1**	25,0±1,7**
5-я	161±10,4**	150±4,5**	840±19,9***	56,0±2,9**	<0,5**	<1,0**
6-я	104±12,1*	138±8,4**	793±76***	68,7±10,2	12,4±3,6**	18,1±0,4**
7-я	96,2±14,6*	98,3±13,4***	624±13**	61,7±9,4	8,6±2,4***	13,5±1,9***

ляемых количеств (табл. 3). Активность гидроксилаз 25-OHД<sub>3</sub> в почках изменялась характерным для дефицита витамина D и гипокальциемии образом, т. е. активность 1-ОНазы возрастала, а 24-ОНазы снижалась (см. табл. 3). Кроме того, можно впервые отметить, что при недостаточности витамина D уменьшалась концентрация в крови остеокальцина, зависящего от этого витамина костного белка, и наблюдалась тенденция к увеличению содержания сАМР в почках (см. табл. 1 и 3).

Введение Т-2 в дозе  $1/7$  LD<sub>50</sub> крысам с развившимся дефицитом витамина D (животные в течение 3 нед получали лишенный витамина D рацион) не усугубляло выраженных проявлений недостаточности этого витамина, в частности степень гипокальциемии. В то же время у этих животных концентрации ПТГ в сыворотке крови, сАМР в почках были выше, а уровень занятых рецепторов 1,25(OH)<sub>2</sub>Д<sub>3</sub> ниже таковых у крыс, лишенных витамина D, не получавших Т-2. Увеличение секреции ПТГ при действии Т-2 отмечалось нами ранее [5]. Здесь важно подчеркнуть, что такой рост наблюдается на фоне индуцированной дефицитом витамина D гипокальциемии, что может указывать на уменьшение чувствительности тканей-мишеней, в том числе почек, к действию этого гормона.

Значимые изменения исследованных показателей обмена Са, которые можно трактовать как замедление их нормализации, выявлялись при введении витамина D крысам, лишенным этого витамина и получавшим Т-2. В первую очередь обращают на себя внимание неполное восстановление концентрации Са, 25-OHД, остеокальцина в крови, активного транспорта Са в тонкой кишке, содержания Са и Р в костной ткани и ее плотности, а также высокий уровень ПТГ в сыворотке крови и сАМР в почках. При этом активность гидроксилаз 25-OHД была более низкой, а концентрация занятых *in vivo* рецепторов гормональной формы 1,25(OH)<sub>2</sub>Д<sub>3</sub> — резко уменьшенной по сравнению с таковыми у крыс, не получавших Т-2.

Эти наблюдения позволяют предположить существование витамин D-опосредованного механизма, обуславливающего нарушение обмена Са при действии Т-2.

Можно полагать, что одним из этапов действия Т-2 на обмен витамина D, как мы показали это ранее [2, 5], является подавление гидроксилирования витамина Д<sub>3</sub> в печени с образованием 25-OHД<sub>3</sub>, что приводит к снижению концентрации этого метаболита в крови.

Образование гормональной формы 1,25(OH)<sub>2</sub>Д<sub>3</sub> у витамин D-дефицитных животных при действии Т-2 не уменьшается (см. табл. 2). В то же время при введении таким животным витамина D наблюдается более быстрое и глубокое, чем в контроле, снижение активности 1-ОНазы. Такая парадоксальная «нормализация» указывает на то, что 1-ОНаза остается рефрактерной к регуляторным воздействиям, т. е. этот фермент не отвечает увеличением активности на гипокальциемию, высокую концентрацию ПТГ в крови и сАМР в почках. Эти данные определенно свидетельствуют о расстройстве регуляции активности ключевого фермента метаболизма витамина D при действии Т-2.

Важным звеном в цепи нарушений эндокринной системы витамина D при действии Т-2, по-видимому, является возникновение выраженной резистентности тканей-мишеней к действию гормональной формы 1,25(OH)<sub>2</sub>Д<sub>3</sub>. На это указывает снижение концентрации занятых *in vivo* рецепторов 1,25(OH)<sub>2</sub>Д<sub>3</sub>, прямо обуславливающих уровень гормонального ответа. Механизм такой резистентности заключается, по-видимому, не столько в снижении общей концентрации рецепторов, сколько в подавлении взаимодействия гормон-рецепторных комплексов с ДНК и, очевидно, в нарушении транскрипции соответствующих генов. В частности, это может проявляться уменьшением синтеза витамин D-зависимого кальцийсвязывающего белка, остеокальцина, цитохрома Р-450, 24-ОНазы, ЦФ, увеличением образования препропаратгормона [3]. Схема нарушений в эндокринной системе витамина D при действии Т-2 представлена на рисунке.

Таким образом, нарушение регуляции обмена кальция эндокринной системой витамина D,

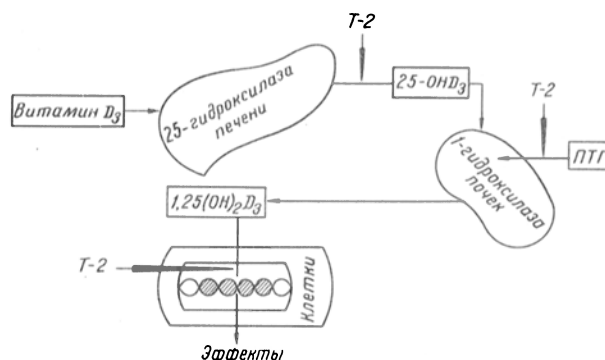


Схема действия Т-2 на эндокринную систему витамина D.

очевидно, является ключевым моментом для понимания механизмов токсического действия Т-2 на гомеостаз Са. Поскольку гормональная форма  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  регулирует пролиферацию и дифференцировку клеток, иммунный ответ, продукцию и секрецию гормонов [3], целесообразно учитывать функционирование эндокринной системы витамина D при комплексной оценке токсического действия трихостеновых микотоксинов. Принимая во внимание стероидную природу  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  и принадлежность его рецептора к семейству рецепторов стероидных, тиреоидных гормонов и витамина А, по-видимому, также целесообразны исследования с оценкой возможности реализации эффектов трихостеновых микотоксинов через изменения в обмене и рецепции этих гормонов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Сергеев И. И., Арханчев Ю. П., Ким Р. Х. и др. // Биохимия.— 1987.— № 11.— С. 1867—1874.
2. Сергеев И. И., Арханчев Ю. П., Кравченко Л. В. и др. // Вopr. мед. химии.— 1988.— № 4.— С. 51—57.
3. Сергеев И. И. // Там же.— 1989.— № 1.— С. 2—11.
4. Сергеев И. И., Кравченко Л. В., Пилия Н. М. и др. // Там же.— 1990, № 3.
5. Сергеев И. И., Пилия Н. М., Кузьмина Е. Э. и др. // Вopr. питания.— 1989.— № 6.
6. Сергеев И. И., Спиричев В. Б. // Биохимия.— 1989.— № 10.—
7. Тутельян В. А., Кравченко Л. В. Микотоксины.— М., 1985.
8. Тутельян В. А. // Вестн. АМН СССР.— 1986.— № 11.— С. 8—15.

Поступила 31.10.89

#### THE MECHANISM OF IMPAIRMENTS IN CALCIUM METABOLISM CAUSED BY T-2 TOXIN: ROLE OF THE VITAMIN D-DEPENDENT ENDOCRINE SYSTEM

I. N. Sergeev, N. M. Piliya, V. A. Tutel'yan, V. B. Spirichev  
Institute of Nutrition, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Functions of the vitamin D-dependent endocrine system were studied in rats deprived of the vitamin after administration of T-2 toxin. Impairments of calcium metabolism, alterations in the enzymatic activity related to vitamin  $\text{D}_3$  bioactivation and receptor binding of the hormonal form  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  were similar both in rats deprived of vitamin D, treated with T-2 toxin within 5 days at a dose of 0.54 mg/kg and in the corresponding controls. At the same time, reduction of the calcium metabolism patterns was retarded in rats obtaining vitamin  $\text{D}_3$  simultaneously with T-2 toxin. This effect was expressed as a decrease in normalization of 25-OHD concentration in blood, absence of renal 1-hydroxylase 25-OHD<sub>3</sub> activation, inspite of the higher content of parath hormone in blood and of cAMP in kidney, while concentration of bound  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  receptors was distinctly decreased in tissues-targets *in vivo*. Thus, the effects of T-2 toxin on the vitamin D-dependent endocrine system were manifested as development of the vitamin secondary deficiency, as resistance of 1-hydroxylase 25OHD<sub>3</sub> to regulating effect of parath hormone as well as inhibition of interaction between the complexes  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -receptor and chromatin.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.153.922-07:[616-008.93:577.112.856]-074

А. П. Сердюк, Ю. А. Шахов, В. В. Константинов,  
И. Н. Горшкова, М. А. Соколова

#### СУБФРАКЦИОННЫЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ ЛИПОПРОТЕИДОВ ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ФИБРОБЛАСТАМИ И ГЕПАТОМОЙ G-2 В УСЛОВИЯХ РАЗЛИЧНЫХ ДИСЛИПИДЕМИЙ

Всесоюзный научно-исследовательский центр профилактической медицины Минздрава СССР, Москва

Липопротеиды высокой плотности (ЛПВП) осуществляют в организме обратный транспорт холестерина, т. е. переносят его из периферических тканей в печень, где осуществляется его катаболизм [14]. Частицы ЛПВП гетерогенны по своим физико-химическим свойствам и размеру и состоят из двух основных подклассов — ЛПВП<sub>2</sub> и ЛПВП<sub>3</sub>, каждый из которых включает 2—3 подфракции частиц [9]. Установлено, что с периферическими клетками взаимодействуют преимущественно мелкие и обедненные по холестерину частицы подкласса ЛПВП<sub>3</sub>, которые в процессе акцепции клеточного холестерина и его этерификации превращаются в более крупные и богатые холестерином частицы ЛПВП<sub>2</sub> [25]. Последние обладают способностью передавать холестерин либо клеткам печени, либо липопротеидам низких плотностей, уменьшаясь при этом в размерах [11, 26]. Таким образом, аномальное обогащение общего пула частиц ЛПВП сыворотки крови крупными или мелкими частицами может свидетельствовать, в частности, о наличии нарушений на уровне ЛПВП-клеточных взаимодействий.

Известно, что при дислипидемиях — гиперхолестеринемии, гипертриглицеридемии, гипоальфахолестеринемии и гиперальфахолестеринемии, изменяется как белково-липидный состав липопротеидов [8], так и активность ферментов метаболизма липопротеидов в плазме крови [4, 26]. Не исключено, что это будет сказываться на ЛПВП-клеточных взаимодействиях и, в конечном итоге, на функции ЛПВП как доноров и акцепторов холестерина.

Для изучения субфракционного спектра ЛПВП и динамики субфракционных переходов ЛПВП при взаимодействии с клетками можно использовать метод градиентного гель-электрофореза, позволяющий разделять частицы ЛПВП по размеру [10]. В свою очередь, для исследования механизмов функционирования ЛПВП часто используют нагруженные холестерином фибробласты и клетки гепатомы G-2 как модели периферических тканей и клеток печени соответственно [13, 22].

С целью выявления нарушений во взаимодействии ЛПВП с клетками периферических тканей и печени при различных дислипидемиях в настоящей работе изучали динамику субфракционных переходов частиц ЛПВП в процессе инкубации сыворотки с культурами фибробластов и гепатомы G-2.

Методика. Кровь брали натощак из локтевой вены у мужчин 40—49 лет, проходивших обследование в НИИ



профилактики неинфекционных заболеваний ВНИЦ ПМ Минздрава СССР. Для получения сыворотки кровь центрифугировали (1000 g, 4 °C) в течение 15 мин. Определение содержания холестерина, триглицеридов и холестерина ЛПВП в исследуемых сыворотках осуществляли на автоанализаторе «Centrifichem» (Англия) с помощью ферментных наборов Baker (Англия). Формирование группы обследуемых с нормолипидемией ( $n=18$ ) и с изолированными гиперхолестеринемией (холестерин ЛПВП  $>270$  мг/дл,  $n=13$ ), гипертриглицеридемией (триглицериды  $>200$  мг/дл,  $n=10$ ), гипоальфахолестеринемией (холестерин ЛПВП  $<35$  мг/дл,  $n=12$ ) и гиперальфахолестеринемией (холестерин ЛПВП  $>73$  мг/дл,  $n=11$ ) проводили согласно критериям условно нормальных значений липидов сыворотки для мужчин 40–59 лет [24], основываясь на 90 % отрезных точках распределения по уровню холестерина, триглицеридов и 10 % и 90 % отрезных точках распределения по холестерину ЛПВП.

В работе использовали культуры человеческой гепатомы клеточной линии Hep G-2 и фибробластов кожи человека. Клетки выращивали в пластиковых флаконах с площадью 25 см<sup>2</sup> («Nunc», ФРГ) в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (5 % CO<sub>2</sub>, 80 % влажности, 37 °C) «Assab», Швеция). Средой выращивания служила среда ЕМЕМ («Flow», Англия) с добавлением L-глутамина (2 мМ), канамицина (100 мкг/мл), незаменимых аминокислот (1 % — только для клеток гепатомы) и 10 % эмбриональной сыворотки теленка («Flow», Англия). Жизнеспособность клеток определяли по окрашиванию трипановым синим, она составляла не менее 95 %. Перед добавлением исследуемых сывороток фибробласты насыщали холестерином, предварительно инкубируя их в течение суток с 25 % гиперхолестеринемической сывороткой (содержание общего холестерина в сыворотке составляло 350 мг/дл) в среде ЕМЕМ. Все сыворотки перед добавлением к клеткам фильтровали через фильтры с диаметром пор 0,45 мкм («Schleicher & Schuell», ФРГ).

Исследуемую сыворотку (конечная концентрация 2 %) добавляли к клеткам в составе среды выращивания (среда ЕМЕМ с добавками и без эмбриональной сыворотки теленка) и инкубировали в течение 24 ч в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. В идентичных условиях, но без клеток инкубировали другую аликвоту этой же сыворотки, которая служила контролем.

Липопротеиды концентрировали из 2 % сывороток после инкубации с клетками или без них на ультрацентрифуге L8-55 («Beckman», США) (ротор 40.3, 39 000 об/мин, 24 ч, 17 °C) по методу [19], предварительно доводя плотность сыворотки до 1,21 г/мл сухим NaBr. По окрашиванию центрифугирования пастеровской пипеткой с поверхности жидкости отбирали 0,5 мл концентрата липопротеидов.

Градиентный гель-электрофорез сконцентрированной фракции липопротеидов проводили в пластинах полиакриламидного геля с градиентом концентрации 4–30 % по методу, описанному в [10] с некоторыми модификациями [7, 8]. Для калибровки размеров частиц ЛПВП использовали коммерческую смесь белков с диаметром частиц от 7,1 до 17 нм (HMW Calibration Kit, «Pharmacia», Швеция). Границы диаметров частиц для каждой субфракции ЛПВП приняты в соответствии с данными, полученными в работе [10], и они составляли: для ЛПВП<sub>2b</sub> — 12,5–9,5 нм, для ЛПВП<sub>2a</sub> — 9,5–8,5 нм, для ЛПВП<sub>3a</sub> — 8,5–8 нм, для ЛПВП<sub>3b</sub> — 8–7,6 нм и для ЛПВП<sub>3c</sub> — 7,6–7,2 нм. Сканирование пластины проводили на лазерном денситометре (ЛКВ, Швеция). Вычленение пиков отдельных подфракций в денситограммах суммарного препарата ЛПВП проводили планметрически [8]. Рассчитывали долю каждой подфракции в общем пуле частиц ЛПВП, принимая общую площадь денситограммы ЛПВП за 100 %. Для подсчета площадей пиков использовали компьютер «Echo-comp» («Pikker», Австрия).

Поскольку экспозиция сыворотки крови при 37 °C приводит к перераспределению частиц по размеру (происходит так называемая конверсия) [6, 20], то для того, чтобы исключить влияние этого процесса на изменение субфракционного спектра ЛПВП при инкубации сыворотки с клетками рассчитывали разницу между содержанием каждой подфракции ЛПВП в сыворотке, инкубированной с клетками, и в контрольной сыворотке (инкубация без клеток).

Достоверность результатов оценивали на основании парного критерия Вилкоксона [1] и *t*-критерия Стьюдента.

Для ЭПР-спектроскопического исследования использовали нагруженные холестерином фибробласты до (контроль) и после инкубации с 10 % нормолипидемической сывороткой.

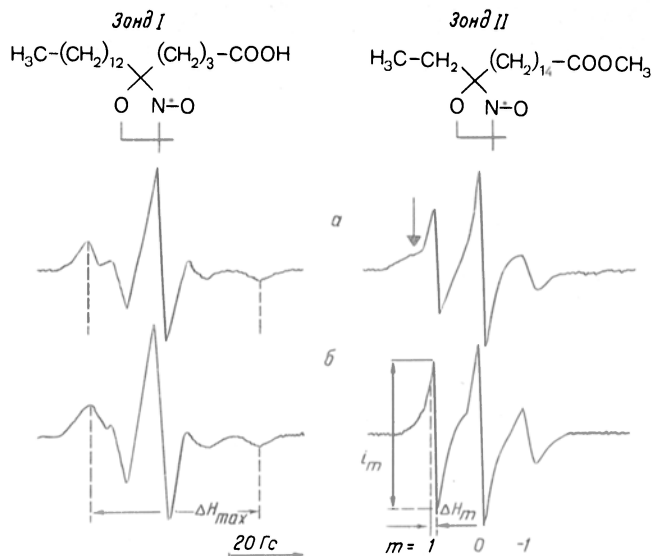


Рис. 1. Типичные спектры ЭПР спиновых зондов I и II в контроле (фибробласты без инкубации с исследуемой сывороткой — а) и опыте (инкубация с 10 % исследуемой сывороткой — б).

Параметры спектров в контроле  $\Delta H_{\max} = 52,0$  Гс,  $\tau = 1,86$  нс,  $\epsilon = 0,269$ ; в опыте:  $\Delta H_{\max} = 51,5$  Гс,  $\tau = 0,96$  нс,  $\epsilon = 0,168$ .

Клетки снимали смесью трипсин (0,05 %) — ЭДТА (0,02 %) («Flow», Англия). После 2-кратного переосаждения в фосфатном буфере около  $1 \cdot 10^6$  клеток суспендировали в 120 мкл того же буфера.

Использовали спиновые зонды (рис. 1): 5-ДОКСИЛ-стеарат (зонд I) и метил-15-ДОКСИЛ-стеарат (зонд II) («Aldrich», США). Спиновые зонды добавляли к суспензии фибробластов из концентрированных (20 мМ) спиртовых растворов до конечной концентрации  $5 \cdot 10^{-4}$  М. Спектры ЭПР регистрировали на спектрометре E-109E («Varian», США) при 37 °C. Измерения проводили при СВЧ-мощности 10–20 мВт, амплитуде модуляции — 1 Гс.

Для характеристики структурной упорядоченности окружения спиновых зондов в мембранах фибробластов применяли параметры [2], определяемые из спектров ЭПР (см. рис. 1): 1) расстояние между крайними экстремумами спектра  $\Delta H_{\max}$ , характеризующее упорядоченность окружения радикала; 2) время корреляции вращательной диффузии спиновых зондов  $\tau$ , пропорциональное вязкости локального окружения радикала. Значения  $\tau$  рассчитывали (в секундах) по формуле:

$$\tau = 6,65 \times 10^{-10} \Delta H_{+1} [(1 + I_{+1})^{1/2} - 1];$$

3) параметр  $\epsilon$ , характеризующий анизотропию окружения радикала, рассчитывали по формуле:

$$\epsilon = \sqrt{I_0/I_{+1}} - 1/\sqrt{I_0/I_{-1}} - 1.$$

Результаты и обсуждение. Особенности взаимодействия ЛПВП с клетками изучали, используя сыворотку крови мужчин с нормолипидемией (контрольная группа) и с различными дислипидемиями (гиперхолестеринемия, гипертриглицеридемия, гипоальфахолестеринемия, гиперальфахолестеринемия). В табл. 1 представлены средние значения липидов в сыворотке для исследуемых групп. Видно, что в ряде случаев показатели в группе лиц с дислипидемией отличаются от таковых в контрольной группе не только по уровню липида, характеризующего данную форму дислипидемии, но и по значениям других липидов сыворотки крови, которые, однако, находятся в границах нормы для мужчин 40–59 лет — жителей Москвы. Следовательно, принципиальным отличием показателей в группе лиц с дислипидемией от аналогичных данных в контроле является только уровень липида, на основе которого проводилось формирование данной группы.

Средний уровень липидов сыворотки крови (в мг/дл) у обследованных

Обследованные	Число обследованных	Холестерин	Триглицериды	Холестерин ЛПВП
Контроль	18	193,2±5,5	79,7±8,6	53,2±2,0
С гиперхолестеринемией	13	353,2±17,3*	109,1±8,7*	49,5±2,0
С гипертриглицеридемией	10	225,2±5,9*	276,0±24,0*	40,1±1,4*
С гипоальфахолестеринемией	12	220,8±11,9*	136,0±12,7*	30,0±0,9*
С гиперальфахолестеринемией	11	221,8±10,0*	63,1±5,9	83,4±3,0*
$P_{1-2}$		<0,01	<0,05	Недостаточно
$P_{1-3}$		<0,01	<0,01	<0,01
$P_{1-4}$		<0,05	<0,01	<0,01
$P_{1-5}$		<0,05	Недостаточно	<0,01

Для моделирования условий обратного транспорта холестерина была предпринята попытка использовать нагруженные холестерином фибробласты. Поскольку уменьшение содержания холестерина в мембранах увеличивает жидкость их липидных областей [3, 18], мы попытались выяснить, изменяется ли жидкость (структурная упорядоченность) мембран нагруженных холестерином фибробластов после инкубации их с сывороткой крови. С этой целью использовали метод ЭПР спиновых зондов. Параметры спектров ЭПР от зондов, иммобилизованных в мембране, дают информацию о структурной упорядоченности липидных областей мембран вблизи парамагнитного фрагмента зонда [2]. Были использованы спиновые зонды, которые при добавлении к суспензии клеток встраиваются в липидные области мембран таким образом, что парамагнитный фрагмент зонда I локализуется вблизи поверхности мембраны, а зонда II — в области терминальных звеньев углеводородных цепочек фосфолипидов, т. е. в глубине мембраны.

На рис. 1 приведены типичные спектры зондов в нагруженных холестерином фибробластах и вычисленные из них значения параметров  $\Delta H_{\max}$ ,  $\tau$  и  $\epsilon$ . Сниженная величина  $\Delta H_{\max}$  зонда I в спектре, полученном после инкубации клеток с сывороткой, в сравнении со спектром ЭПР контрольных клеток (см. рис. 1) свидетельствует о некотором уменьшении упорядоченности липидных областей вблизи поверхности мембраны. С другой стороны, в спектре зонда II, полученном при исследовании инкубированных с сывороткой фибробластов, исчезает сигнал от сильно иммобилизованных молекул зонда в сравнении со спектром от зонда II в контрольных клетках. Это означает, что при взаимодействии клеток с сывороткой и в глубине мембраны уменьшаются в размерах липидные области с высокой упорядоченностью. Кроме того, снижение значений параметров  $\tau$  и  $\epsilon$  (см. рис. 1), вычисленных из спектров слабо иммобилизованных молекул зонда II (узкие компоненты спектра), свидетельствует об уменьшении микровязкости и анизотропии областей с низкой упорядоченностью в глубине мембраны. Таким образом, увеличенную при 37 °C жидкость мембран фибробластов после инкубации с сывороткой (как вблизи поверхности клеток, так и в области терминальных звеньев углеводородных цепочек фосфолипидов) можно объяснить снижением содержания холестерина в мембранах.

Поскольку основным акцептором клеточного холестерина в сыворотке крови являются ЛПВП,

то можно думать, что снижение уровня холестерина в фибробластах будет сопровождаться превращением мелких частиц ЛПВП в крупные, что детектируется с помощью градиентного геле-электрофореза. На рис. 2 приведен типичный пример динамики субфракционного спектра ЛПВП при экспозиции нормолипидемической сыворотки с фибробластами. Видно, что инкубация приводила к снижению доли мелких частиц подкласса ЛПВП<sub>3</sub> и нарастанию доли частиц ЛПВП<sub>2</sub> в общем пуле ЛПВП. Аналогичные результаты были получены при анализе количественных изменений в субфракциях ЛПВП, характерных для всей группы лиц с нормолипидемией (табл. 2). Наблюдаемая динамика субфракционных переходов полностью соответствует представлениям о роли ЛПВП<sub>3</sub> как активных акцепторов холестерина из периферических тканей и переходе их в процессе акцепции в подкласс более крупных, обогащенных холестерином частиц ЛПВП<sub>2</sub> [25]. Следовательно, нагруженные холестерином фибробласты могут быть использованы как модель периферических клеток в экспериментах по изучению акцепции клеточного холестерина ЛПВП.

С другой стороны, при инкубации нормолипидемических сывороток с клетками гепатомы Нер G-2 мы отметили снижение доли частиц ЛПВП<sub>2</sub> и увеличение доли подфракции ЛПВП<sub>3a</sub> в общем пуле ЛПВП (см. рис. 2). Из табл. 3 видно, что средние значения, полученные для всей контрольной группы, показывают наличие статистически достоверных по направлению изменений в подфракциях ЛПВП<sub>2b</sub> и ЛПВП<sub>3a</sub>: уменьшение доли ЛПВП<sub>2b</sub> и нарастание доли ЛПВП<sub>3a</sub>. Такое перераспределение частиц может быть объяснено переносом холестерина с ЛПВП<sub>2b</sub> в клетки гепатомы и умень-

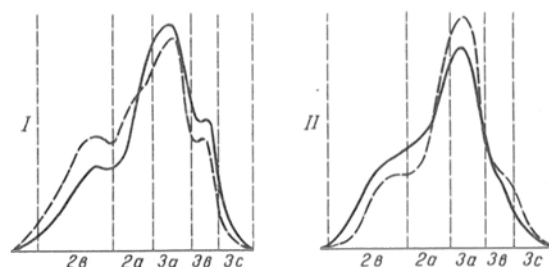


Рис. 2. Характерные денситограммы суммарной фракции ЛПВП в нормолипидемических сыворотках, инкубированных без клеток (сплошная линия) и с клетками (пунктирная линия).

Здесь и на рис. 3 и 4: I — фибробласты, II — гепатома Нер G-2.

Динамика субфракционного спектра ЛПВП (в % от контроля) при инкубации сывороток с фибробластами

Обследованные	ЛПВП <sub>2б</sub>	ЛПВП <sub>2а</sub>	ЛПВП <sub>3а</sub>	ЛПВП <sub>3б</sub>	ЛПВП <sub>3с</sub>
С нормолипидемией	25,4±8,6**	23,7±6,1**	-12,5±3,2**	-17,8±5,1**	-24,8±3,8**
С гиперхолестеринемией	19,6±11,2**	3,2±3,4	2,1±4,6	-20,9±4,8**	-23,3±10,4*
С гипертриглицеридемией	42,2±13,6**	8,2±7,0	2,6±3,2	-14,9±4,9**	-17,3±7,9*
С гипоальфахолестеринемией	-6,0±5,1	22,8±5,1**	4,6±3,8	-22,1±2,5**	-22,1±5,9**
С гиперальфахолестеринемией	7,0±2,5*	6,4±5,9	-2,8±3,0	-14,7±3,8**	-21,3±9,1*

Примечание. Здесь и в табл. 3 звездочки — достоверные различия с контролем по парному критерию Вилкоксона: одна —  $p < 0,05$ , две —  $p < 0,01$ .

Таблица 3

Динамика субфракционного спектра ЛПВП (в % от контроля) при инкубации сывороток с гепатомой НерG-2

Обследованные	ЛПВП <sub>2б</sub>	ЛПВП <sub>2а</sub>	ЛПВП <sub>3а</sub>	ЛПВП <sub>3б</sub>	ЛПВП <sub>3с</sub>
С нормолипидемией	-10,0±2,9*	0,4±7,8	13,6±5,6*	7,9±13,2	-15,4±12,2
С гиперхолестеринемией	-14,7±3,1**	-9,9±10,7	9,5±6,3	20,7±8,4*	116,0±43,7*
С гипертриглицеридемией	-8,2±13,2	7,9±9,5	7,1±4,7	2,3±18,3	-13,6±9,0
С гипоальфахолестеринемией	57,3±13,9*	-5,6±9,8	-4,2±13,5	-30,4±8,7*	-32,7±5,1**
С гиперальфахолестеринемией	1,7±6,8	13,0±4,6**	-1,4±4,8	-21,0±5,4**	-35,0±3,3**

шением их до размеров подфракции ЛПВП<sub>3а</sub>. Эти результаты подтверждают возможность использования культуры гепатомы G-2 как модели печеночных клеток, осуществляющих захват холестерина ЛПВП.

Необходимо отметить, что клетки гепатомы G-2 способны к синтезу и секреции апобелков и частиц липопротеидов [15]. С целью обнаружения возможного вклада этих частиц в получаемую нами картину субфракционного спектра ЛПВП был проведен анализ среды инкубации клеток гепатомы (24 ч, среда без сыворотки) с помощью градиентного гель-электрофореза, который не выявил наличия липопротеидных частиц с размерами от 7 до 13 нм, характерных для ЛПВП сыворотки крови человека.

Далее были поставлены эксперименты с целью изучения особенностей ЛПВП-клеточных взаимодействий в условиях различных дислипидемий.

Известно, что гиперхолестеринемия и гипертриглицеридемия — формы дислипидемий, которые часто сопряжены с возникновением и развитием атеросклероза [16, 24]. При инкубации гиперхолестеринемических и гипертриглицеридемических сывороток с фибробластами мы наблюдали сходную картину (рис. 3): в обоих случаях отмечалось снижение доли самых мелких частиц ЛПВП<sub>3б</sub> и ЛПВП<sub>3с</sub> с параллельным нарастанием доли подфракции ЛПВП<sub>2б</sub> (см. табл. 2). Направленность изменения субфракционного спектра ЛПВП здесь аналогична ситуации в контрольной группе; акцепция холестерина проходит, по-видимому, даже более активно, поскольку нарастает доля только самых крупных частиц ЛПВП<sub>2б</sub>.

При инкубации с клетками гепатомы сывороток крови лиц с гиперхолестеринемией мы отмечали падение доли частиц ЛПВП<sub>2б</sub> и возрастание доли ЛПВП<sub>3б</sub> и особенно ЛПВП<sub>3с</sub> (см. рис. 3 и табл. 3). Интенсивное нарастание доли самых мелких частиц может свидетельствовать о более эффективном переносе холестерина с ЛПВП на клетки печени, чем в случае нормолипидемии. Из вышеизложенного следует, что при гиперхоле-

стеринемии «система обратного транспорта» холестерина функционирует нормально.

Каких-либо достоверных по направленности изменений субфракционного спектра ЛПВП при экспозиции гипертриглицеридемических сывороток с гепатомой нам выявить не удалось (см. рис. 3 и табл. 3). Известно, что для гипертриглицеридемии характерны повышенное содержание триглицеридов в частицах ЛПВП<sub>2</sub> и недозагруженность их этерифицированным холестерином [12]. Такие видоизмененные частицы ЛПВП<sub>2</sub>, вероятно, не могут в полной мере взаимодействовать с клетками печени, поэтому превращение крупных частиц в мелкие (наблюдаемое при переносе холестерина с ЛПВП в клетки гепатомы) протекает менее активно.

В следующей серии экспериментов исследовали ЛПВП-клеточные взаимодействия в условиях гипоальфахолестеринемии, которая также являет-

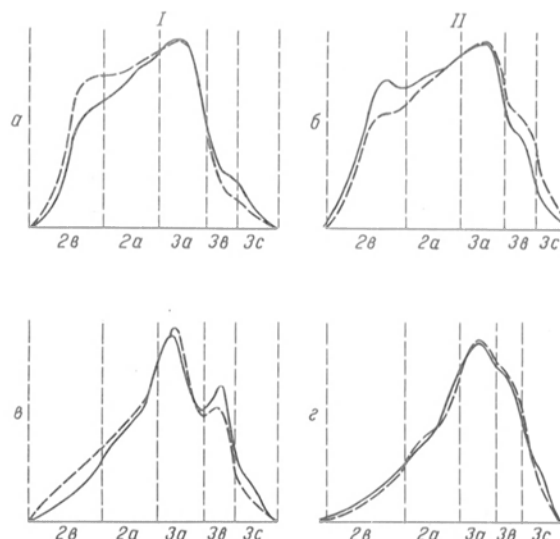


Рис. 3. Примеры изменения субфракционного спектра ЛПВП при инкубации гиперхолестеринемических (а, б) и гипертриглицеридемических (в, г) сывороток с клетками.

Здесь и на рис. 4: сплошная линия — инкубация без клеток, пунктирная — с клетками.

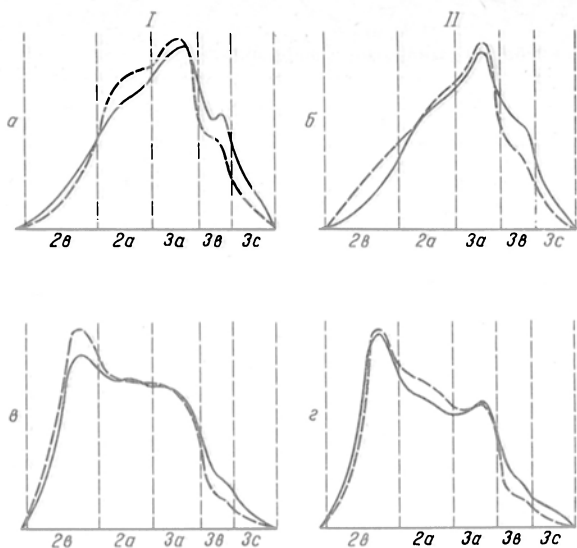


Рис. 4. Примеры изменения субфракционного спектра ЛПВП при инкубации гипоальфахолестеринемических (а, б) и гиперальфахолестеринемических (в, г) сывороток с клетками.

ся независимым фактором риска ишемической болезни сердца [24]. При инкубации этих сывороток с фибробластами, как и во всех предыдущих случаях, было отмечено снижение доли подфракций ЛПВП<sub>3в</sub> и ЛПВП<sub>3с</sub> (рис. 4). В то же время в пределах подкласса ЛПВП<sub>2</sub> происходило достоверное увеличение доли только подфракции ЛПВП<sub>2а</sub>, а содержание подфракции самых крупных частиц ЛПВП<sub>2в</sub> не возрастало (см. табл. 2). Это означает, что при гипоальфахолестеринемии процесс формирования полноценных обогащенных холестерином частиц ЛПВП<sub>2в</sub>, вероятно, в значительной степени нарушен.

Фактором, препятствующим образованию нормальных ЛПВП<sub>2в</sub>, отчасти может являться сниженная активность лецитин-холестерин-ацилтрансферазы (ЛХАТ) в гипоальфахолестеринемических сыворотках [4]. Кроме того, для лиц с данной формой дислипидемии характерна высокая активность белка — переносчика эфиров холестерина (БПЭХ) [26], т. е. имеет место мощный отток эфиров холестерина с ЛПВП<sub>2в</sub> на липопротеиды низкой плотности (ЛПНП) и липопротеиды очень низкой плотности (ЛПОНП), в результате чего частицы ЛПВП<sub>2в</sub> становятся недозагруженными холестерином. Действительно, для гипоальфахолестеринемических ЛПВП характерно более низкое отношение холестерин/апо-А-I [8], что в свою очередь, может отражаться на эффективности взаимодействия ЛПВП<sub>2</sub> с клетками печени. Так, при инкубации гипоальфахолестеринемических сывороток с гепатомой содержание подфракции ЛПВП<sub>2в</sub> не снижалось, как это было характерно для нормолипидемических сывороток, а напротив, увеличивалось с параллельным уменьшением ЛПВП<sub>3в</sub> и ЛПВП<sub>3с</sub> (см. рис. 4 и табл. 3).

Учитывая, что клетки гепатомы G-2 продуцируют и секретируют в среду ЛХАТ [15], можно полагать, что это компенсирует недостаток ЛХАТ в сыворотке крови лиц с гипоальфахолестеринемией и вызывает более активное превращение ЛПВП<sub>3</sub> в ЛПВП<sub>2</sub> за счет акцепции свободного холестерина с ЛПНП и ЛПОНП. В пользу такого

предположения свидетельствуют и полученные нами ранее данные о том, что снижение уровня клеточного холестерина при инкубации гладкомышечных клеток аорты человека с гипоальфахолестеринемическими ЛПВП происходит более активно в присутствии делипидированной сыворотки от нормолипидемиков (активность ЛХАТ в которой выше), чем от лиц с гипоальфахолестеринемией [23].

Особый интерес представляет изучение ЛПВП-клеточных взаимодействий при гиперальфахолестеринемии, традиционно рассматриваемой как антиатерогенная дислипидемия [16]. Экспозиция гиперальфахолестеринемических сывороток с культурой фибробластов приводила к падению количества ЛПВП<sub>3</sub> и возрастанию ЛПВП<sub>2</sub> (см. рис. 4). При этом достоверно уменьшались доли подфракций ЛПВП<sub>3в</sub> и ЛПВП<sub>3с</sub> и увеличивалась доля ЛПВП<sub>2в</sub> (см. табл. 2), т. е. динамика субфракционных переходов ЛПВП в значительной степени напоминала динамику, наблюдаемую в нормолипидемических сыворотках.

Вместе с тем, при инкубации с клетками гепатомы сывороток от лиц с гиперальфахолестеринемией мы не обнаружили снижения доли ЛПВП<sub>2в</sub>, характерного для экспериментов с нормолипидемическими сыворотками. Это можно объяснить увеличенной скоростью формирования крупных частиц ЛПВП<sub>2</sub> при гиперальфахолестеринемии за счет особенностей ферментных систем в сыворотке крови: 1) большей активности ЛХАТ [5]; 2) сниженной активности БПЭХ [26, 27] и 3) усиленного липопротеидлиполиза липопротеидов низких плотностей [21]. Объяснить интенсивное снижение долей ЛПВП<sub>3в</sub> и ЛПВП<sub>3с</sub> (см. табл. 3), по-видимому, можно превращением этих частиц в более крупные ЛПВП<sub>2</sub> за счет высокой активности ЛХАТ.

Измененные активности ферментных систем метаболизма липопротеидов в плазме лиц с гиперальфахолестеринемией могут быть причиной смещения распределения холестерина между липопротеидами низких плотностей и ЛПВП в сторону последних, результатом чего является высокий уровень холестерина ЛПВП и сниженный уровень холестерина ЛПНП и ЛПОНП [17].

Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии выраженных отличий в динамике субфракционного спектра ЛПВП при инкубации нагруженных холестерином фибробластов с нормолипидемическими сыворотками и сыворотками от лиц с гиперхолестеринемией, гипертриглицеридемией и гиперальфахолестеринемией. Однако, в случае гипоальфахолестеринемии имеет место нарушение процесса формирования полноценных частиц ЛПВП<sub>2в</sub>. По-видимому, образующиеся частицы ЛПВП<sub>2в</sub> дефектны и поэтому менее активно поглощаются клетками гепатомы. Следовательно, сниженную холестерин-транспортную способность системы ЛПВП при гипоальфахолестеринемии можно рассматривать как причину атерогенности этой формы дислипидемии. При гиперхолестеринемии передача холестерина с ЛПВП в клетки гепатомы происходит более активно, чем при нормолипидемии и, следовательно, высокий уровень холестерина в плазме крови нельзя объяснить низкой скоростью его транспортировки в печень в составе ЛПВП. Антиатерогенность гиперальфахолестеринемии, по-видимому, объясняется активным пере-

носом холестерина с ЛПОНП и ЛПНП на ЛПВП, в результате чего снижается концентрация в плазме крови атерогенных липопротеидов.

Авторы благодарны профессорам Перовой Н. В., Жуковскому Г. С. и Рууге Э. К. за постоянный интерес к работе и полезные обсуждения.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. — Л., 1973. — С. 19—21.
2. Метод спинных меток: Теория и применение / Под ред. Л. Берлинера. — М., 1979.
3. Панасенко О. М., Вольнова Т. В., Азизова О. А., Владимиров Ю. А. // Биол. мембраны. — 1987. — № 12. — С. 1319—1324.
4. Озерова И. И., Герасимова Е. И., Фам Тхи Май, Курданов Х. А. // Вопр. мед. химии. — 1984. — № 5. — С. 118—123.
5. Озерова И. И., Торховская И. И., Полесский В. А., Герасимова Е. И. // Там же. — 1980. — № 3. — С. 365—370.
6. Сердюк А. И., Шахов Ю. А., Печавев А. С. и др. // Биохимия. — 1989. — № 10. — С. 1686—1692.
7. Шахов Ю. А., Сердюк А. И., Косых В. А. и др. // Там же. — 1989. — № 3. — С. 440—447.
8. Щербак И. А., Перова И. В., Метельская В. А. и др. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 2. — С. 93—101.
9. Albers J. J., Cheung M. C. // USA—USSR First Lipoprotein Symposium (NIH Publ. N 83—1966). — 1982. — P. 35—53.
10. Blanche P. J., Gong E. L., Forte T. N., Nichols A. V. // Biochim. biophys. Acta. — 1981. — Vol. 665. — P. 408—419.
11. Brewer H. B., Gregg R. E., Hoeg J. M., Fojo S. S. // Clin. Chem. — 1988. — Vol. 34, N 8. — (B). — P. B4—B8.
12. Chang L. B. F., Hopkins G. J., Barter P. J. // Atherosclerosis. — 1985. — Vol. 56. — P. 61—70.
13. Dashti N., Wolfbauer G., Alaupovic P. // Biochim. biophys. Acta. — 1985. — Vol. 833. — P. 100—110.
14. Eisenberg S. // J. Lipid Res. — 1984. — Vol. 25. — P. 1017—1058.
15. Erickson S. K., Fielding P. E. // Ibid. — 1986. — Vol. 27. — P. 875—883.
16. Kannel W. B. // Amer. J. Cardiol. — 1983. — Vol. 52. — P. 9B—13B.
17. Koizumi J., Mabuchi H., Yoshimura A. et al. // Atherosclerosis. — 1985. — Vol. 58. — P. 175—186.
18. Kutchai H., Chandler L. H., Zavaico G. B. // Biochim. biophys. Acta. — 1983. — Vol. 736. — P. 137—149.
19. Lindgren E. T. // Analysis of Lipids and Lipoproteins / Ed. E. C. Perkins. — Champaign, 1975. — P. 204—224.
20. Nichols A. V., Gong E. L., Blanche P. J. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1981. — Vol. 100. — P. 391—399.
21. Nikkila E. A. // High Density Lipoproteins and Atherosclerosis / Ed A. M. Gotto et al. — Amsterdam, 1977. — P. 177—192.
22. Oram J. F., Brinton E. A., Bierman E. L. // J. clin. Invest. — 1983. — Vol. 72. — P. 1611—1621.
23. Shakhov Yu., Serdjuk A., Dorian B. et al. // International Conference on Preventive Cardiology, 2nd: Abstracts. — Washington, 1989. — N 62. — P. A11.
24. Study Group of the European Atherosclerosis Society // Europ. Heart J. — 1987. — Vol. 8. — P. 77—88.
25. Tabas I., Tall A. R. // J. biol. Chem. — 1984. — Vol. 259. — P. 13897—13905.
26. Tall A. R. // J. Lipid Res. — 1986. — Vol. 27. — P. 361—367.
27. Yamashita S., Matsuzawa Y., Okazaki M. et al. // Atherosclerosis. — 1988. — Vol. 70. — P. 7—12.

Поступила 30.10.89

#### SUBFRACTIONAL ALTERATIONS OF HIGH DENSITY LIPOPROTEINS AFTER INTERACTION WITH FIBROBLASTS AND G-2 HEPATOMA IN VARIOUS FORMS OF DISLIPIDEMIA

A. P. Serdyuk, Yu. A. Shakhov, V. V. Kostantinov, I. N. Gorshkova, M. A. Sokolova

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

Subfractional alterations of high density lipoproteins (HDL) were studied after incubation of blood serum from patients

with normal lipid spectrum and with four types of dislipidemia (hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, hypo- and hyper- $\alpha$ -cholesterolemia) in mixtures containing human skin fibroblasts and G-2 hepatoma cells used as typical populations of peripheric and liver cells. Incubation of normolipidemic blood sera with fibroblasts overloaded with cholesterol led to conversion of small HDL<sub>1</sub> particles into large HDL<sub>2</sub> subfractions arising due to the lipoprotein acception of cholesterol. At the same time, incubation of these blood sera with the hepatoma cells resulted in a decrease of the large particles ratio in total pool of HDL because of their absorption by the cells. No distinct differences were detected in formation of large particles from small subfractions when cholesterol was accepted from fibroblasts under conditions of hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia and hyper- $\alpha$ -cholesterolemia, while formation of the largest particles HDL<sub>2b</sub> was impaired in hypo- $\alpha$ -cholesterolemia. These HDL<sub>2b</sub> particles interacted less effectively with hepatoma cells, thus suggesting the decreased cholesterol transport function of HDL in hypo- $\alpha$ -cholesterolemia. Content of HDL<sub>2b</sub> in total pool of HDL was unaltered if blood serum from patients with hyper- $\alpha$ -cholesterolemia was incubated together with the hepatoma cells. Antiatherogenic effect of hyper- $\alpha$ -cholesterolemia was caused mainly by active transfer of cholesterol from low density lipoproteins to HDL and a decrease in the LDL concentration but not by increased absorption of HDL particles by liver cells.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.33/.34-085.874.2-036.8-07:616.153/.154-074

Г. Ю. Мальцев, И. Р. Бияшева, Л. А. Орлова, А. В. Погожева, Т. III. Шарманов

#### КЛИНИКО-БИОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ДИЕТОТЕРАПИИ ГАСТРОЭНТЕРОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

Институт питания АМН СССР, Москва

Одним из перспективных направлений в терапии заболеваний гастроэнтерологического и обменно-алиментарного характера является применение специализированных продуктов, обогащенных витаминами и микроэлементами, поскольку имеются сведения о низкой обеспеченности организма данными компонентами пищи у больных с патологическими изменениями слизистой желудка и кишечника [3], а также данные, свидетельствующие о целесообразности использования пищевых антиканцерогенов, например антиоксидантов, при профилактике злокачественных новообразований в желудочно-кишечном тракте [2]. В свою очередь диетотерапия подобными продуктами определяет необходимость учитывать их регулирующее воздействие на систему иммунного и биохимического гомеостаза.

Целью настоящей работы явилась характеристика иммунохимического, белкового и витаминного статуса у гастроэнтерологических больных, получавших специализированный кисломолочный продукт, вырабатываемый из нормализованного коровьего молока с добавлением ксилита, сернокислой меди, молочно-кислого железа, желточно-жировой эмульсии с витамином Е, лизоцимного гидролизата, содержащего витамины РР, С и В<sub>6</sub>, и комплекса витаминов путем сквашивания закваской, приготовленной на чистых культурах ацидофильной палочки, казеи или ассоциации молочно-кислых бактерий, выделенных из женского молока.



Методика. Под наблюдением находились больные в возрасте до 50 лет с язвенной болезнью желудка, язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки и хроническим гастритом. Исследования проводили на базе гастроэнтерологического отделения Московской городской клинической больницы № 4. Больные были госпитализированы в стационар в момент обострения заболеваний, длительность которых варьировала от нескольких месяцев до 20 лет и более. В параллельных исследованиях использовали группу больных, находящихся на традиционном медикаментозном лечении. Специализированный продукт назначали обычно за 1 ч до приема пищи в нарастающем объеме 150, 300 и 500 мл/сут. Длительность лечения составляла 2—3 нед в зависимости от показаний. Клинические наблюдения проводили по общепринятой методике клинического обследования с учетом характера нозологической формы [1].

Сыворотку для исследований получали из крови, взятой из локтевой вены натощак, путем центрифугирования при 3000 об/мин в течение 10 мин. Параметры крови определяли на иммунохимическом анализаторе ICS-II фирмы «Beckman» методом кинетической нефелометрии с использованием набора стандартных антител. Имунная реакция происходила в присутствии фосфатного буфера при взаимодействии равных объемов (42 мкл) сыворотки крови и раствора стандартного антитела. Уровень витаминов А и Е в сыворотке крови определяли по методу [6], свободной и активированной глутатионредуктазы эритроцитов — по методу [5], сопряженной с ней глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы — с использованием наборов фирмы «Boehringer Mannheim».

Полученные результаты подвергали статистической обработке с оценкой достоверности различий по *t*-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Как показало клиническое обследование, у пациентов, получивших курс диетотерапии, в целом имела место более заметная нормализация состояния по ряду важнейших симптомов по сравнению с пациентами, получившими медикаментозную терапию. Наиболее характерным являлось более быстрое исчезновение болей, восстановление аппетита, снижение диспепсических явлений и болезненности при пальпации у больных хроническим гастритом, язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки.

Результаты исследований иммунохимического и белкового статуса больных язвенной болезнью желудка, двенадцатиперстной кишки и хроническим гастритом приведены в табл. 1. Следует обратить внимание на различие исходных показателей при диетотерапии специализированным продуктом и медикаментозной терапии. Подобная картина, по-видимому, обусловлена более интенсивной лекарственной терапией в период до госпитализации больных, находящихся на традиционном лечении, вследствие более выраженной клинической картины заболевания. Указанные различия касаются группы иммуноглобулинов, прежде всего IgA и IgG, альбумина,  $\alpha_1$ -анти-трипсинового фактора и гаптоглобина. В первом приближении можно отметить, что у больных, находящихся на диетотерапии, состояние большинства показателей является более стабильным, что в свою очередь указывает на более сохранение гомеостатических механизмы.

Вместе с тем во всех нозологических группах уровень трансферрина находится на грани верхней границы нормы, что может рассматриваться как специфический признак гастроэнтеропатологии, сопровождающейся, как известно, нарушениями всасывания, в частности железа. В меньшей степени на это обстоятельство указывает и более высокий уровень гаптоглобина при язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, особенно у больных, находящихся на лекарственной терапии. Таким образом, состояние трансферрина и гаптоглобина может отражать интенсивность поступления препаратов железа, в том числе и в составе специализированных антианемических продуктов.

В связи с прооксидантной функцией ионов железа возникает вопрос о состоянии антиоксидантной системы и сопряженных с ней витаминов, в частности токоферола и ретинола. Из табл. 2

Таблица 1

Содержание специфических белков (в мг/дл) в сыворотке крови больных гастроэнтерологического профиля на фоне диетической и медикаментозной терапии ( $X \pm m$ )

Группа больных	IgA	IgG	IgM	Компоненты комплемента		Альбумин, г/дл	$\alpha_1$ -Антитрипсиновый фактор	$\alpha_2$ -Макроглобулин	Трансферрин	Гаптоглобин
				C3	C4					
Язвенная болезнь желудка:										
до диетотерапии (13)	224 $\pm$ 33,7	1133 $\pm$ 91	158 $\pm$ 17,9	132 $\pm$ 12,9	31,4 $\pm$ 3,4	4,66 $\pm$ 0,21	251 $\pm$ 14,3	187 $\pm$ 18,3	325 $\pm$ 32,5	114 $\pm$ 22,7
после диетотерапии (12)	250 $\pm$ 34,8	1363 $\pm$ 95	158 $\pm$ 14,5	142 $\pm$ 8,9	46,9 $\pm$ 13,7	4,61 $\pm$ 0,20	147 $\pm$ 14,2	193 $\pm$ 19,2	369 $\pm$ 31,8	184 $\pm$ 17,2
до медикаментозной терапии (6)	272 $\pm$ 33,4	1135 $\pm$ 131	148 $\pm$ 14,5	137 $\pm$ 15,2	32,4 $\pm$ 5,1	2,91 $\pm$ 1,42	107 $\pm$ 23,1	186 $\pm$ 5,71	303 $\pm$ 15,5	215 $\pm$ 59,3
после медикаментозной терапии (5)	290 $\pm$ 49,4	1272 $\pm$ 202	179 $\pm$ 13,2	149 $\pm$ 14,7	37,1 $\pm$ 9,3	3,74 $\pm$ 1,26	131 $\pm$ 11,8	205 $\pm$ 16,6	366 $\pm$ 33,5	203 $\pm$ 40,7
Язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки:										
до диетотерапии (13)	251 $\pm$ 25,2	1359 $\pm$ 123	170 $\pm$ 26,6	152 $\pm$ 11,7	35,1 $\pm$ 3,0	5,31 $\pm$ 0,60	170 $\pm$ 25,9	199 $\pm$ 17,7	409 $\pm$ 41,8	174 $\pm$ 24,1
после диетотерапии (13)	258 $\pm$ 30,0	1588 $\pm$ 143	214 $\pm$ 55,0	157 $\pm$ 10,5	36,0 $\pm$ 2,7	5,84 $\pm$ 0,70	136 $\pm$ 22,4	195 $\pm$ 20,4	406 $\pm$ 39,0	174 $\pm$ 20,0
до медикаментозной терапии (6)	365 $\pm$ 41,1	1454 $\pm$ 132	163 $\pm$ 19,2	172 $\pm$ 12,7	37,1 $\pm$ 3,4	4,86 $\pm$ 1,00	133 $\pm$ 11,9	244 $\pm$ 26,2	426 $\pm$ 89,1	148 $\pm$ 26,6
после медикаментозной терапии (5)	164 $\pm$ 19,2	1368 $\pm$ 21,8	167 $\pm$ 17,9	150 $\pm$ 9,83	29,7 $\pm$ 2,0	7,21 $\pm$ 0,53	106 $\pm$ 13,1	242 $\pm$ 11,4	325 $\pm$ 23,4	169 $\pm$ 42,3
Хронический гастрит: до диетотерапии (15)	218 $\pm$ 18,4	1396 $\pm$ 87	203 $\pm$ 13,6	144 $\pm$ 12,2	30,7 $\pm$ 3,2	4,48 $\pm$ 0,28	149 $\pm$ 13,9	185 $\pm$ 13,0	344 $\pm$ 16,0	102 $\pm$ 20,5
после диетотерапии (15)	224 $\pm$ 20,1	1491 $\pm$ 131	214 $\pm$ 20,4	256 $\pm$ 9,26	30,9 $\pm$ 2,8	4,85 $\pm$ 0,19	150 $\pm$ 18,5	188 $\pm$ 15,1	366 $\pm$ 30,4	115 $\pm$ 19,6
до медикаментозной терапии (6)	215 $\pm$ 42,1	2118 $\pm$ 235	172 $\pm$ 26,8	129 $\pm$ 10,2	26,2 $\pm$ 6,4	5,98 $\pm$ 0,31	134 $\pm$ 16,4	229 $\pm$ 14,7	302 $\pm$ 26,8	136 $\pm$ 22,0
после медикаментозной терапии (5)	190 $\pm$ 46,1	1200 $\pm$ 74,8	207 $\pm$ 20,3	142 $\pm$ 17,0	31,0 $\pm$ 7,1	6,68 $\pm$ 0,65	119 $\pm$ 19,9	248 $\pm$ 13,1	327 $\pm$ 21,8	160 $\pm$ 28,4
Рекомендуемые границы нормы, мг/дл	70—312	639—1349	56—352	83—177	15—45	3700—5100	85—213	146—369	204—360	27—139

Примечание. В скобках — число обследованных больных.

Содержание отдельных компонентов антиоксидантной защиты в сыворотке крови больных гастроэнтерологического профиля при дието- и медикаментозной терапии (n=10—18)

Исследуемый показатель	Хронический гастрит			Язвенная болезнь					
				желудка			двенадцатиперстной кишки		
Токоферол:	≤	N	>	<	N	>	<	N	>
до диетотерапии	0,87	0,13	—	0,64	0,36	—	0,90	0,10	—
после диетотерапии	1,0	—	—	0,70	0,30	—	0,70	0,30	—
до медикаментозной терапии	0,60	0,33	0,17	0,89	0,11	—	0,81	0,19	—
после медикаментозной терапии	0,56	0,44	—	0,83	0,17	—	0,78	0,22	—
Ретинол:									
до диетотерапии	0,67	0,13	0,20	0,64	0,18	0,18	0,33	0,67	—
после диетотерапии	0,17	0,83	—	0,22	0,67	0,11	0,20	0,70	0,10
до медикаментозной терапии	0,29	0,29	0,42	0,20	0,50	0,30	0,18	0,41	0,41
после медикаментозной терапии	0,33	0,22	0,45	0,17	0,33	0,50	0,33	0,45	0,22
Активность глутатионпероксидазы, нмоль НАДФ в 1 мин·мг белка:									
до диетотерапии		96,7±38,6			84,5±19,7			110±16,3	
после диетотерапии		58,1±14,8			89,6±17,2			68,6±15,4	
Активность глутатионредуктазы, нмоль НАДФ в 1 мин·мл:									
до диетотерапии		0,22±0,09			0,23±0,07			0,25±0,09	
после диетотерапии		0,20±0,09			0,17±0,08			0,24±0,06	
до медикаментозной терапии		0,21±0,07			0,20±0,07			0,24±0,06	
после медикаментозной терапии		0,18±0,08			0,19±0,03			0,25±0,05	
Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, нмоль НАДФ/мин·мл:									
до диетотерапии		0,071±0,032			0,060±0,003			0,064±0,005	
после диетотерапии		0,087±0,013			0,071±0,010			0,064±0,014	
до медикаментозной терапии		0,025±0,002			0,018±0,001			0,033±0,016	
после медикаментозной терапии		0,018±0,001			0,035±0,004			0,042±0,016	

Примечание. < — частота случаев ниже границы нормы, N — частота случаев, входящих в границы нормы, > — частота случаев выше границы нормы.

видно, что уровень токоферола (в отличие от ретинола) в сыворотке крови больных всех нозологических групп был исходно снижен и в ходе лечения слабо восстанавливался, причем при диетотерапии в меньшей степени.

Предположение о повышенном расходе токоферола на функции антиоксидантной системы, очевидно, может быть проверено непосредственным исследованием ее компонентов. Активность глутатионпероксидазы эритроцитов в исходном состоянии действительно увеличена, несмотря на значительную дисперсию данных, и имеет тенденцию к снижению в ходе лечения. Сопряженная с ней глутатионредуктазная система эритроцитов является стабильной по базовой активности восстановления НАДФ как до, так и после лечения в одинаковой степени для исследуемых групп.

Вполне закономерным является вопрос о коферментном обеспечении указанных сопряженных систем.

Предварительные данные показали, что недостаточная обеспеченность рибофлавином (ФАД-эффект) вообще характерна для рассматриваемых заболеваний и слабо нормализуется при лечении. Другим регулирующим фактором выступает сопряженная система генерации НАДФ в глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной реакции пентозного пути, причем паре глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа — глутатионпероксидаза в последнее время уделяется значительное внимание в литературе [4]. Из данных видно, что именно в этой системе проявляются решающие различия между фармако- и диетотерапией специализированным продуктом. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы значительно выше при диетотерапии.

Таким образом, исследование сопряженных метаболических систем является перспективным направлением в оценке специфического действия диетотерапии, не уступающей по эффективности традиционным медикаментозным способам лечения.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Клинические методы исследования больного с патологией органов пищеварения: Метод. рекомендации. — М., 1981.
2. Bates C. J., Powers H. J. // Hum. Nutr. Clin. Nutr. — 1985. — Vol. 39, N 2. — P. 107—115.
3. Naiman J. L., Osky F. A., Diamond L. R. // Pediatrics. — 1964. — Vol. 33. — P. 83—99.
4. Rivlin R. S., Shils M. E., Sherlock P. // Amer. J. Med. — 1983. — Vol. 75. — P. 843—854.
5. Tilbotson J. A., Sauberlich H. S. // J. Nutr. — 1971. — Vol. 101. — P. 1459.
6. Zelan G., Norvick W. J. // Amer. J. clin. Path. — 1969. — Vol. 51. — P. 4.

Поступила 16.01.89

#### CLINICO-BIOCHEMICAL EVALUATION OF DIETOTHERAPY EFFICIENCY IN GASTROENTEROLOGICAL PATIENTS

G. Yu. Mal'tsev, I. R. Biyasheva, L. A. Orlova, A. V. Pogozheva

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

Dissimilar immunochemical, protein and vitamin parameters were found in blood of patients with gastroenterological diseases at the initial step of impairments under conditions of routine and especial diets. Specific alterations in content of transferrin, haptoglobin, tocopherol as well as in glutathione peroxidase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities showed that compensatory mechanisms were maintained better under conditions of the especial dietotherapy.

А. Б. Капитанов, Г. А. Грибанов, Э. А. Аскарова,  
Е. В. Бондарева, С. Н. Кулакова

## ИЗМЕНЕНИЕ ЛИПИДНОГО СОСТАВА МЕМБРАН МИТОХОНДРИЙ В ХОДЕ СУКЦИНАТ-ОКСИДАЗНОЙ РЕАКЦИИ

НИИ физико-химической медицины Минздрава РСФСР, Москва

Большинство мембранных ферментов, инактивирующихся в каталитическом цикле, образуют при катализе промежуточные свободнорадикальные продукты. Появление таких соединений, ведущих к инаktivации ферментов, может приводить и к модификации их липидного окружения [6].

Митохондриальная дыхательная цепь при недостатке АДФ, по достаточном количестве субстрата окисления и кислорода около 2 % потребляемых молекул последнего расходует на образование перекиси водорода. Большинство молекул перекиси образуется в результате дисмутации супероксидных радикалов [8]. Поэтому можно предполагать, что компоненты дыхательной цепи также склонны к самоинаktivации с параллельным окислением липидов мембран. Если это так, то в условиях функциональной нагрузки митохондрий и без нее модификация липидов должна осуществляться по разным схемам, с образованием разных промежуточных и конечных продуктов.

Целью настоящей работы являлось установление различий в образующихся продуктах деградации липидов мембран митохондрий в отсутствие и в присутствии субстрата окисления.

**Методика.** Использовали беспородных крыс-самцов массой 150–200 г. Митохондрии печени выделяли методом дифференциального центрифугирования [4].

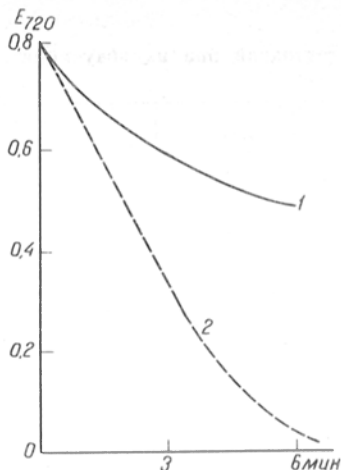
Митохондрии при концентрации 0,5 мг/мл инкубировали в среде, содержащей 300 мМ сахарозу, 10 мМ сукцинат натрия, 100 мкг/мл хлорамфеникола, 30 мМ трис-НСl-буфер рН 7,5, при 37 °С с медленным перемешиванием. Контрольная проба не содержала сукцинат. После 3 ч инкубации митохондрии концентрировали центрифугированием при 10 000 g в течение 15 мин и пробы сразу использовали для анализов.

Сукцинат-цитохром-С-редуктазную активность определяли по скорости восстановления окисленного цитохрома С [10]. Скорость набухания митохондрий оценивали по изменению оптической плотности суспензии, зависимость от светорасеяния, при длине волны 650 нм в термостатируемой ячейке с перемешиванием. Скорость потребления митохондриями кислорода определяли с использованием полярографа ОН-105 («Radelski», ВНР) и открытого платинового электрода в термостатируемой ячейке с перемешиванием, объемом 1 мл, при 37 °С. Среда инкубации содержала 300 мМ сахарозу, 2 мМ ЭДТА, 20 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 30 мМ трис-НСl-буфер рН 7,5, сукцинат добавляли до конечной концентрации 10 мМ, АДФ — до 0,25 мМ.

Микровязкость мембран митохондрий оценивали по степени эксимеризации пирена на спектрофлуориметре «Hitachi MPF-2A» [5].

Оценку интенсивности медленной вспышки хемилюминесценции и накопления ТБК-активных продуктов проводили согласно [1].

Исследование полного липидного состава и фосфолипидного состава митохондрий проводили, как описано [2, 3]. Жирно-кислотный состав митохондрий определяли по [7]. Концентрацию белка в препаратах измеряли по методу Лоури с использованием 0,06 % дезоксихолата натрия [11].



Зависимость скорости набухания митохондрий от присутствия субстрата окисления.

1 — контроль; 2 — в присутствии 10 мМ сукцината натрия.

**Результаты и обсуждение.** Ранее было установлено, что инаktivация дыхательной цепи митохондрий в изотонических растворах сахарозы проявляется в первую очередь в изменении ее интегрального показателя — степени сопряженности фосфорилирования со свободным окислением — и приводит к набуханию митохондрий и вследствие возрастания проницаемости внешней мембраны для субстратов к кажущейся активации компонентов дыхательной цепи, а также к окислению мембранных липидов с образованием лизофосфатидов (ЛФ) и свободных незэтерифицированных жирных кислот (СЖК) [9].

В нашем случае в соответствии с данными литературы добавление сукцината ускоряло набухание митохондрий (см. рисунок) и изменяло скорость сукцинатдегидрогеназной реакции. Величина  $V_{\text{max}}$  через 24 ч была больше контрольных величин (34 % по сравнению с 13 %). Снижение способности митохондрий к синтезу АТФ, как следует из табл. 1, выражено более значительно в присутствии сукцината в среде инкубации, т. е. в данном случае можно говорить о возможности самоинаktivации митохондрий при их функциональной нагрузке.

Известно, что при функционировании митохондрий образуются продукты частичного восстановления кислорода, способные теоретически индуцировать перекисное окисление липидов (ПОЛ) мембран митохондрий. Однако возможность протекания подобных реакций в митохондриях ограничена наличием мощных антиоксидантных систем, эффективно разрушающих уже образовавшиеся перекиси или обрывающие процесс перекисления на свободнорадикальных стади-

Таблица 1

Изменение функциональных показателей митохондрий при их инкубации с сукцинатом ( $n=3$ )

Время инкубации, ч	Потребление кислорода, $\mu\text{моль O}_2/\text{мин} \cdot \text{мг}$			$V_3/V_0$	Индекс Р.О
	без акцентора фосфата, $V_0$	в присутствии АДФ, $V_3$	после истощения АДФ, $V_4$		
0	$5,7 \pm 0,6$	$30,5 \pm 4,0$	$1,5 \pm 0,2$	5,4	3,6
3 (без сукцината)	$8,3 \pm 0,7$	$26,4 \pm 3,1$	$3,6 \pm 0,4$	3,3	2,0
3 (в присутствии сукцината)	$21,3 \pm 3,1$	$25,6 \pm 3,0$	$25,6 \pm 3,2$	1,2	—

Таблица 2

Показатели ПОЛ мембран митохондрий при их инкубации с сукцинатом ( $n=3-4$ )

Время инкубации, ч	МДА, нмоль/мин на 1 мг белка	Интенсивность хемилюминесценции, усл. ед.	Индекс ненасыщенности жирных кислот	Эксимеризация пирена, $I_{470}/I_{392}$
0	$1,5 \pm 0,1$	$61,5 \pm 7,1$	$1,26 \pm 0,05$	$0,67 \pm 0,08$
3 (без сукцината)	$1,8 \pm 0,2$	$54,4 \pm 7,2$	$1,42 \pm 0,06$	$0,67 \pm 0,08$
3 (в присутствии сукцината)	$1,7 \pm 0,1$	$53,7 \pm 6,3$	$1,44 \pm 0,06$	$0,69 \pm 0,07$

ях [1]. Помимо этого, митохондрии являются органеллами, архитектоника липидного бислоя мембран которых препятствует развитию в них ПОЛ. В то же время предполагается, что образующиеся вблизи активных центров такие продукты способны инактивировать генерирующие их ферменты [6]. При выбранных нами условиях инкубации митохондрий не отмечено развитие процессов ПОЛ, о чем свидетельствуют отсутствие накопления ТБК-активных продуктов, одинаковые интенсивности медленных всплесков хемилюминесценции, индуцированной ионами  $Fe^{2+}$ , в контрольной и опытных пробах, а также одинаковые степени эксимеризации в них-пирена. Не обнаружено изменений в жирно-кислотном составе фосфолипидов (ФЛ) мембран митохондрий и индексе их ненасыщенности за время проведения реакции (табл. 2).

Анализ выявленных изменений в липидном составе мембран митохондрий при отсутствии сукцината в среде и в его присутствии свидетельствует, что содержание общих липидов в митохондриях при инкубации *in vitro* в течение 3 ч снижалось наполовину в основном за счет распада эндогенных ФЛ (табл. 3). При этом отмечено возрастание относительной доли СЖК, эфиров холестерина (ЭХ) и метиловых эфиров (МЭ) жирных кислот (окисленные формы). Нагрузка митохондрий субстратом окисления сопровождается

лась меньшими по выраженности изменениями их липидного состава. Относительное содержание большинства липидных фракций не отличалось от исходных значений. Это может быть связано с реорганизацией ближайшего липидного окружения сукцинатдегидрогеназы и остальных компонентов работающей дыхательной цепи. Однако и в этих условиях набухание митохондрий оказывается более выраженным. Это является, вероятно, следствием того, что в таких условиях в нарушение мембранной проницаемости вносят вклад не только жирные кислоты, но и ЛФ.

Сведения об изменениях фосфолипидного состава митохондрий в присутствии и в отсутствие сукцината представлены в табл. 4. Видно, что 3-часовая инкубация митохондрий сопровождалась уменьшением доли фосфатидилхолинов (ХФ), фосфатидилэтаноламинов (ФЭА) с параллельным накоплением фосфатидных кислот (ФК), полиглицерофосфатидов (ПГФ), сфингомиелинов (СФМ), фосфатидилсерина (ФС) и в меньшей мере ЛФ. Вероятно, снижение содержания холин- и этанолсодержащих фракций ФЛ происходит не вследствие их прямого гидролитического распада, а по многоступенчатому механизму с участием ферментов биотрансформации липидов. Так, для ФХ в этих условиях возможен их переход в СФМ, часть ФХ, возможно, гидролизует до ЛФ или трансформируется в ФК. Для ФЭА вероятен переход в ФС и далее в ФК.

В условиях нагрузки митохондрий субстратом окисления выявлено накопление доли ЛФ с некоторой нормализацией содержания других компонентов (ФЭА, ФК, но не ФХ). В этих условиях, возможно, происходит переключение путей биотрансформации эндогенных ФЛ. Если некоторые пути сохраняются (например, для ФХ:  $ФХ \rightarrow СФМ$ ,  $ФХ \rightarrow ЛФ$ ), то переход  $ФХ \rightarrow ФК$ , очевидно, менее значим. Не функционирует, вероятно, и путь перехода  $ФЭА \rightarrow ФС$ , хотя переход  $ФС \rightarrow ФК$  возможен.

Отмеченные изменения в составе общих липидов и одинаковая направленность их в составе ФЛ контрольной и опытной проб не позволя-

Таблица 3

Липидный состав митохондрий при их инкубации с сукцинатом ( $n=3$ )

Время инкубации, ч	Общие липиды, мг на 1 мл суспензии	Состав общих липидов, %						
		ФЛ	Х	ЭХ	МГ+ДГ	СЖК	ТГ	МЭ
0	$6,7 \pm 0,4$	$78,0 \pm 4,1$	$4,1 \pm 0,5$	$3,5 \pm 0,4$	$2,9 \pm 0,3$	$5,4 \pm 0,4$	$4,3 \pm 0,4$	$1,8 \pm 0,1$
3 (без сукцината)	$2,3 \pm 0,3$	$70,1 \pm 3,0$	$4,0 \pm 0,2$	$6,0 \pm 0,5$	$2,2 \pm 0,3$	$8,3 \pm 0,6$	$3,5 \pm 0,4$	$5,9 \pm 0,3$
3 (в присутствии сукцината)	$3,1 \pm 0,3$	$79,5 \pm 4,2$	$3,8 \pm 0,4$	$3,6 \pm 0,3$	$3,0 \pm 0,3$	$5,0 \pm 0,4$	$2,6 \pm 0,3$	$2,5 \pm 0,2$

Примечание. Х — незэтерифицированный холестерин, МГ — моноглицериды, ДГ — диглицериды, ТГ — триглицериды.

Таблица 4

Фосфолипидный состав митохондрий при их инкубации с сукцинатом ( $n=3$ )

Время инкубации, ч	Состав фосфолипидов, %						
	ГЛФ*	ЛФ	ФС	СФМ	ФХ	ФЭА	ФК+ПГФ
0	$1,1 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$	$5,0 \pm 0,4$	$5,3 \pm 0,4$	$46,4 \pm 5,6$	$34,2 \pm 4,1$	$7,2 \pm 0,8$
3 (без сукцината)	$1,7 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,1$	$9,3 \pm 0,6$	$12,2 \pm 0,9$	$34,1 \pm 4,1$	$23,4 \pm 3,2$	$18,1 \pm 2,1$
3 (в присутствии сукцината)	$1,3 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,1$	$7,6 \pm 0,5$	$9,8 \pm 0,7$	$36,9 \pm 4,2$	$31,8 \pm 4,0$	$10,1 \pm 1,1$

\* Глицерофосфатиды.

ют, по нашему мнению, предполагать их зависимость от свободнорадикальных продуктов, образующихся при функционировании дыхательной цепи в присутствии сукцината.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М., 1972.
2. Грибанов Г. А., Сергеев С. А. // *Вопр. мед. химии*. — 1975. — Т. 21. — С. 654—659.
3. Грибанов Г. А., Сергеев С. А. // *Лаб. дело*. — 1977. — № 9. — С. 533—537.
4. Евтодченко Ю. В., Мохова Е. А. // *Механизмы дыхания, фотосинтеза и фиксации азота*. — М., 1967. — С. 35—48; С. 371.
5. Капитанов А. Б., Иванова В. Ф., Ладыгина В. Г. и др. // *Биохимия*. — 1983. — Т. 48. — С. 1930—1935.
6. Карузина И. И., Арчаков А. И. // *Вестн. АМН СССР*. — 1987. — № 7. — С. 60—67.
7. Карузина И. И., Менгазетдинов Д. Э., Капитанов А. Б. и др. // *Биохимия*. — 1987. — № 7. — С. 1090—1096.
8. Кольтовер В. К. Теория надежности. Супероксидные радикалы и старение (Препринт ин-та химической физики АН СССР). — Черногоровка, 1983.
9. Лузиков В. И. Регуляция формирования митохондрий. — М., 1980. — С. 70.
10. Disdale D. // *Meth. Enzymol.* — 1966. — Vol. 10. — P. 213—215.
11. Lowry O. H., Rozenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // *J. Biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265—275.

Поступила 10.12.89

## ALTERATIONS IN LIPID COMPOSITION OF MITOCHONDRIAL MEMBRANES DURING SUCCINATE OXIDATION

A. B. Capitanov, G. A. Gribanov, E. A. Askarova, E. V. Bondareva, S. N. Kulakova

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

Content of lipids, free cholesterol, cholesterol esters, phospholipids and fatty acid composition were studied in mitochondria incubated in samples containing succinate. Induction of lipid peroxidation, production of malonic dialdehyde and alterations in membranes fluidity were not detected in the preparations of mitochondria within 3 hrs of succinate oxidation. Self-inactivation of mitochondria appears to occur due to an increased uncoupling of oxidative phosphorylation.

© Б. Г. БОРЗЕНКО, 1990

УДК 618.19-006.6:577.963.32

Б. Г. Борзенко

## ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ДНК В ОРГАНИЗМЕ ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН, БОЛЬНЫХ МАСТОПАТИЕЙ И РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Донецкий медицинский институт

Известно, что, помимо системы ферментов, осуществляющих биосинтез пиримидиновых и пуриновых предшественников ДНК по основному пути (de novo), животная клетка дополнительно содержит полноценную систему ферментов, катализирующих биосинтез и взаимопревращение нуклеотидов по более быстрому «запасному» (реутилизационному) пути [3].

Соотношение основного и «запасного» путей биосинтеза тимидинмонофосфата (ТМФ) зависит от характера исследуемых клеток. Установлено, что нормальным покоящимся тканям свой-

ствен путь de novo, тем не менее в костном мозге здоровых людей преобладает «запасной» путь [5].

Ключевым ферментом «запасного» пути является фермент тимидинкиназа (ТК), активность которого прямо коррелирует с индексом клеточной пролиферации [4] и резко увеличивается в опухолевых тканях [16]. Известно, что активность ТК зависит от активности тимидинфосфорилазы (ТФ), варьирующей в различных покоящихся нормальных и опухолевых клетках [18]. Показано, что ферменты, участвующие в превращении аденозина, в частности аденозиндеаминаза (АДА) и 5'-нуклеотидаза АМФ (5'-НД) играют важную роль в формировании противоопухолевого иммунитета. Изменение активности этих ферментов приводит к нарушению функции Т- и В-клеток [9, 17].

Приведенные данные позволяют считать ТК, ТФ, АДА, 5'-НД маркерами превращений тимидина и аденозина, изменение активности которых отражает некоторые пути метаболизма указанных предшественников ДНК.

Целью настоящей работы явились изучение возрастных изменений активности ТК, ТФ, АДА, 5'-НД в сыворотке крови здоровых женщин, больных мастопатией и раком молочной железы и оценка возможности использования этих показателей при обследовании и лечении онкологических больных.

Методика. Обследованы 52 здоровые женщины в возрасте от 23 до 70 лет, 18 больных фиброзно-кистозной мастопатией, 74 больных раком молочной железы того же возраста.

Сыворотку крови онкологических больных исследовали до специального лечения, у 44 больных — до и после лечения, у 29 — каждые 5 дней в процессе комбинированного лечения. Лимфоциты выделяли в градиенте фикола — верографин [14].

Активность сывороточной ТК определяли по методу [1] в некоторой модификации, используя в качестве субстрата <sup>14</sup>С-тимидин отечественного производства. Радиоактивность дисков (диски ДЭДЭ-целлюлозной бумаги «Лимбро», Великобритания) подсчитывали в сцинтиляционной жидкости СЖ-8 на счетчике отечественного производства СБС-2. Удельную активность ТК выражали в наномолях ТМФ, образованного за 1 ч, в пересчете на 1 мг сывороточного белка.

Активность ТФ определяли спектрофотометрически [7] на спектрофотометре СФ-26 при длине волны 300 нм. Удельную активность фермента выражали в условных единицах, рассчитанных по приросту оптической плотности на 1 мг белка в течение 30 мин инкубации.

Активность лимфоцитарной и сывороточной АДА определяли спектрофотометрическим методом [11] по начальной скорости реакции. Удельную активность выражали в наномолях аденозина, превращенного в 1 мин, на 1 мг белка или 10<sup>6</sup> клеток. Активность лимфоцитарной и сывороточной 5'-НД АМФ определяли по количеству неорганического фосфата [8] в цветной реакции с двуххлористым оловом, используя в качестве субстрата неспецифической фосфатазы Na-глицерофосфат (в контрольных пробах). Удельную активность выражали в наномолях неорганического фосфата, освобожденного за 120 мин инкубации, на 1 мг белка. Содержание белка определяли по методу Лоури [13]. Полученный материал подвергнут статистической обработке.

Результаты и обсуждение. Активность ТК, ТФ, АДА и 5'-НД в сыворотке крови здоровых женщин, больных фиброзно-кистозными мастопатиями и раком молочной железы IIIБ стадии в зависимости от возраста представлена в табл. 1. Для исключения возможного влияния предоперационной терапии на активность исследуемых ферментов в организме онкологических больных мы



Таблица 1  
Активность ферментов метаболизма предшественников ДНК в сыворотке крови здоровых женщин (I), больных мастопатией (II) и раком молочной железы (III) различного возраста ( $M \pm m$ )

Возраст, годы	ТК, нмоль/ч на 1 мл белка			ТФ, усл. ед.			АДА, нмоль/мин на 1 мл белка			5-НД, АМФ, нмоль/мин на 1 мл белка		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
23—36	1,45±0,38	1,89±0,24	—	0,36±0,15	0,37±0,03	—	1,39±0,03	6,73±1,12*	—	5,91±0,27	6,00±0,72	—
36—45	1,79±0,35	2,01±0,21	3,58±0,45*	0,30±0,03	0,22±0,05	0,18±0,02*	3,43±0,45	7,31±1,96*	7,85±0,45*	7,24±0,96	7,02±0,81	11,96±0,49*
46—60	3,14±0,55	3,58±0,29	4,28±0,28	0,36±0,04	0,27±0,03	0,23±0,03*	1,68±0,22	6,78±0,42*	8,81±1,01*	5,70±0,31	6,47±0,46	11,27±0,65*
61—70	1,55±0,25	—	2,95±0,90*	0,37±0,06	—	0,12±0,03*	2,10±0,40	—	7,82±0,87*	4,22±0,31	—	11,83±0,55*

\*  $p < 0,05$  по сравнению с показателями здоровых женщин.

проанализировали данные больных разного возраста, не получавших предоперационного лечения. Установлено, что в организме здоровых женщин достоверные изменения активности ТК наблюдаются в возрасте от 36 до 70 лет, ТФ — от 23 до 60 лет, а АДА и 5<sup>1</sup>-НД — от 23 до 70 лет.

При обследовании больных мастопатиями достоверных изменений активности ТК по сравнению с нормой не обнаружено; этот показатель снижен у больных в возрасте от 46 до 60 лет. Активность АДА была достоверно увеличена у больных всех возрастных групп, активность 5<sup>1</sup>-НД колебалась в пределах нормы. В сыворотке крови больных раком молочной железы в возрасте от 36 до 60 лет активность ТК была достоверно выше, чем в сыворотке здоровых женщин и больных мастопатиями аналогичного возраста. Наибольшая активность ТК по сравнению с нормой наблюдалась у больных раком молочной железы в возрасте от 36 до 45 лет (группа менструирующих женщин). У больных 46—60 и 61—70 лет (группа больных, находившихся в менопаузе от 1 года до 20 лет) активность ТК была незначительно выше нормы. Имеются данные [10] о повышении активности ТК при раке молочной железы и корреляции ее эмбрионального изофермента и активности тимидилатсинтетазы. Нами показано, что активность ТК в сыворотке крови больных раком молочной железы достоверно выше, чем у больных мастопатией. Полученные нами данные согласуются с результатами исследования других авторов [2], обнаруживших, что активность ТК в цитозолях доброкачественных опухолей (узловая мастопатия) достоверно ниже, чем в злокачественных. Таким образом, высокая активность ТК, по-видимому, является характерной особенностью злокачественных опухолей молочной железы. Активность ТФ в сыворотке крови онкологических больных по сравнению с нормой снижена, особенно у больных 36—45 и 61—70 лет. Возможно, это проявление наблюдающейся в опухолях репрессии катаболизма [6].

Активность АДА и 5<sup>1</sup>-НД в сыворотке крови онкологических больных резко повышена. Нами проведено сравнительное исследование активности АДА и 5<sup>1</sup>-НД в сыворотке крови и лимфоцитах здоровых женщин и больных с изучаемой патологией (табл. 2). Обнаружено резкое повышение активности АДА в сыворотке крови больных мастопатиями и раком молочной железы на фоне снижения активности фермента в лимфоцитах. При этом возможно накопление аденозина в лимфоцитах, вызывающее изменение их функциональной готовности, и, вероятно, связанные с этим нарушения иммунного статуса организма [5]. В табл. 3 сопоставлена активность исследуемых ферментов в сыворотке крови, лимфоцитах и тканях больных раком молочной железы до и после оперативного вмешательства. После операции наблюдалось некоторое снижение АДА в сыворотке крови на фоне увеличения содержания фермента в лимфоцитах. Достоверных изменений в активности ТК, ТФ, 5<sup>1</sup>-НД не отмечено. Изучена динамика ТК, ТФ, АДА и 5<sup>1</sup>-НД в сыворотке крови 29 больных раком молочной железы в возрасте 46—60 лет при послеоперационной полихимиотерапии по схеме CMFV обычными курсовыми дозами. Установлено, что у больных с низ-

Активность АДА и 5'-НД АМФ в сыворотке крови и лимфоцитах здоровых женщин, больных мастопатией и раком молочной железы ( $M \pm m$ )

Группа обследованных	Количество исследований	АДА		5'-НД	
		сыворотка, нмоль/мин на 1 мг белка	лимфоциты, нмоль · 10 <sup>6</sup> клеток в час	сыворотка, нмоль/мин на 1 мг белка	лимфоциты, нмоль · 10 <sup>6</sup> клеток в час
Здоровые женщины	13	1,68 ± 0,22	150,0 ± 10,0	5,70 ± 0,31	53,0 ± 7,2
Больные мастопатией	6	6,78 ± 0,42*	70,0 ± 2,9*	6,47 ± 0,46	46,9 ± 3,2
Больные раком молочной железы	30	8,81 ± 1,01**	44,0 ± 3,1*	11,27 ± 0,65*	36,8 ± 2,0*

Примечание. \* —  $p < 0,05$ , \*\* —  $p < 0,001$  по сравнению с показателями здоровых женщин. Возраст обследованных 46—60 лет.

Таблица 3

Активность ферментов метаболизма предшественников ДНК в сыворотке крови, лимфоцитах и тканях онкологических больных в возрасте 46—60 лет до и после операции ( $M \pm m$ )

Условия определения	ТК сыворотки, нмоль/ч на 1 мг белка	ТФ сыворотки, усл. ед.	АДА		5'-НД АМФ	
			сыворотка, нмоль/мин на 1 мг белка	лимфоциты, нмоль · 10 <sup>6</sup> клеток в час	сыворотка, нмоль/мин на 1 мг белка	лимфоциты, нмоль · 10 <sup>6</sup> клеток в час
До операции	3,4 ± 0,51	0,27 ± 0,08	7,85 ± 1,28	40,08 ± 2,14	8,98 ± 1,23	28,83 ± 2,84
После операции	2,70 ± 0,31	0,22 ± 0,06	5,28 ± 0,73*	50,03 ± 5,16*	7,43 ± 1,21	26,85 ± 3,45

\*  $p < 0,05$ .

кой исходной (до лечения) активностью ТФ ( $0,11 \pm 0,03$  усл. ед.) в процессе лекарственной терапии активность ТК увеличилась в 3 раза ( $9,16 \pm 1,22$  усл. ед.). Активность ТФ, АДА и 5'-НД не изменилась. У больных с исходной активностью ТФ в пределах нормы ( $0,36 \pm 0,03$  усл. ед.) в процессе лечения активность ТК, АДА и 5'-НД снизилась, а ТФ достоверно увеличилась до  $0,46 \pm 0,07$  усл. ед. Анализ отдельных результатов показал, что в течение 4 лет смертность среди больных первой подгруппы (низкая исходная ТФ) составила 25 %, во второй подгруппе летальных исходов не было.

По-видимому, низкая эффективность полихимиотерапевтического лечения по схеме CMFV больных с резко сниженной исходной активностью ТФ может быть связана с участием именно этого фермента в «летальном» синтезе 5-фторурацила, входящего в схему лечения. Повышение активности ТК в период лечения объясняется, по-видимому, влиянием 5-фторурацила и метатрексата как ингибиторов синтеза ТМФ. Известно, что при торможении этого пути может повышаться активность «запасного» синтеза ТМФ, катализируемого ТК [12]. Полученные данные согласуются с приведенными другими авторами [2], обнаружившими резкое увеличение активности ТК (в 30 раз) в цитозоле опухоли молочной железы IIIБ стадии после химиотерапии, указывающее на активизацию пролиферативных процессов в опухоли и, возможно, приобретение ею устойчивости к лечению.

Таким образом, исследование показало наличие возрастных изменений активности ферментов метаболизма предшественников ДНК в организме как здоровых женщин, так и больных с патологией молочной железы.

Определение динамики активности исследуемых ферментов до и в процессе химиотерапевтического лечения онкологических больных может быть использовано в качестве биохимического теста эффективности терапии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Борзенко Б. Г., Горбачев А. А., Думанский Ю. В. // *Вопр. мед. химии.*— 1986.— № 6.— С. 51—54.
2. Герштейн Е. С., Бассалык Л. С. // *Вестн. АМН СССР.*— 1985.— № 1.— С. 41—44.
3. Котельников В. М. // *Экспер. онкол.*— 1986.— № 6.— С. 9—15.
4. Силаева С. А., Хацернова Б. Я., Шереметьева Т. И. // *Вопр. мед. химии.*— 1983.— № 2.— С. 57—60.
5. Уманский В. Ю., Гриневич Ю. А., Никольский И. С. // *Экспер. онкол.*— 1982.— № 4.— С. 37—39.
6. Шанот В. С. Биохимические аспекты опухолевого роста.— М., 1975.
7. Akira K., Yasuhiro H., Selsura S. et al. // *Chem. pharm. Bull.*— 1983.— Vol. 31.— P. 175—178.
8. Edwards N. Z., Cassidy J. T., Fox G. H. // *Clin. Immunol.— Immunopath.*— 1980.— Vol. 17.— P. 76—88.
9. Grilevich Yu. A., Uman'sky V. Yu., Kamenets L. Ya., Nikolsky I. S. // *Neoplasma.*— 1984.— Vol. 31.— P. 21—29.
10. Gavre S., Hannouche N., Gouan P. // *Bull. Cancer.*— 1988.— Vol. 72.— P. 144—149.
11. Kalckar H. M. // *J. biol. Chem.*— 1947.— Vol. 167.— P. 429—475.
12. Kuft D. V., Beardsly P., Karp D. et al. // *Blood.*— 1980.— Vol. 55.— P. 580—589.
13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // *J. biol. Chem.*— 1953.— Vol. 193.— P. 263—275.
14. Owen M. G., Crumpton M. V. // *Cell. Population.*— London, 1979.— P. 203—211.
15. Rustum V. M., Takito H., Gomes G. // *Antibiot. Chemother.*— 1980.— Vol. 28.— P. 86—93.
16. Taheri M. R., Wickremasinghe R. G., Haffbrand A. V. // *Brit. J. Haemat.*— 1982.— Vol. 52.— P. 401—409.
17. Tonnesen E., Tonnesen J., Christensen N. I. // *Acta path. microbiol. immunol. scand.*— 1984.— Vol. 92.— P. 81—83.
18. Van der Weyden M. B., Ellims P. H., Gan T. E. // *Amer. J. Haemat.*— 1983.— Vol. 14.— P. 301—311.

Поступила 18.10.89

AGE-DEPENDENT PECULIARITIES OF DNA PRECURSORS METABOLISM IN HEALTHY WOMEN, IN PATIENTS WITH MASTOPATHY AND WITH CANCER OF MAMMARY GLAND

V. G. Borzenko

Medical School, Donetsk

Activities of thymidine kinase, thymidine phosphorylase, adenosine deaminase and 5'-nucleotidase of AMP were studied in blood serum and lymphocytes of healthy women, patients with mastopathy and with mammary gland cancer of 23-70 years

old. Age-dependent alterations in the enzymatic activity were detected in blood serum of healthy women. Activity of thymidine kinase was increased simultaneously with a decrease in thymidine phosphorylase activity in 36-70 years old oncological patients, while adenosine deaminase activity was increased in patients with mastopathy and with mammary gland cancer of all the age groups. Dynamics of the enzymatic activity studied before and during chemotherapeutic treatment may be used as one of biochemical tests for evaluation of the therapy efficiency in oncological patients.

© А. С. СЕЙЛАНОВ, Б. М. НУРХАНОВ, 1990

УДК 616-001.17-085.246.2-032:611.33/.34]-036.8-07:616.36-008.939.15

А. С. Сейланов, Б. М. Нурханов

## ВЛИЯНИЕ ЭНТЕРОСОРБЦИИ НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ И АНТИОКСИДАНТНУЮ АКТИВНОСТЬ ЛИПИДОВ ПЕЧЕНИ И КРОВИ ПРИ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ

НИИ медицинской радиологии АМН СССР, Обнинск

Активация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) — одна из ключевых составляющих патохимических изменений, способствующих эндотоксемии при комбинированных термических поражениях (КТП). Известно, что нарушения системы регуляции свободнорадикального окисления липидов при КТП, сопровождающиеся накоплением продуктов ПОЛ в клетках, могут приводить к полной деградации клеточных мембранных структур с соответствующими последствиями для тканей пораженного организма [2]. Антиоксидантная активность (АОА) мембранных липидов — универсальное свойство любой клетки. Стабильность антиоксидантного статуса липидов рассматривается как неперемное условие устойчивости биосистем [3]. Следовательно, изменения в системе ПОЛ, нарушения липидного гомеостаза в тканях могут играть определенную роль в патогенезе и исходах КТП.

Эффективные способы борьбы с эндотоксемией в организме — эфферентные методы. В последние годы внимание исследователей привлекает способ гастроинтестинальной детоксикации в силу своей неинвазивности и простоты применения. Однако влияние различных энтеросорбентов на интенсивность накопления продуктов ПОЛ и АОА в организме при КТП не изучалось. Тем не менее эти показатели могут служить критерием для оценки детоксикационного эффекта энтеросорбентов [3].

Цель настоящего исследования — сравнительное изучение влияния различных по химической структуре и сорбционной способности средств для гастроинтестинальной детоксикации на интенсивность ПОЛ и АОА липидов плазмы крови и печеночной ткани при комбинированной термической травме.

Методика. Опыты проводили на 90 белых крысах-самцах линии Вистар массой 200–240 г (из них 18 служили интактным биоконтролем и 18 — контролем с КТП без применения энтеросорбции). Комбинированную термическую травму моделировали с помощью световой вспышки мощных кварцево-галогеновых ламп; термический ожог IIIБ степени наносили на 15 % поверхности тела. Спустя 1 и 24 ч после КТП двукратно внутривенно вводили энтеросорбенты: волокнистый угольный сорбент (ВУГС) — 0,3 г/кг, полиметилсилоксан (ПМС) — 4 г/кг, синтетический гомо- и сополимер

Таблица 1

Интенсивность образования малонового диальдегида и содержание эндогенного глутатиона в печени крыс после КТП при гастроинтестинальной детоксикации

Условия эксперимента	МДА, мкмоль/мг белка	GSH, отн. ед.
Биоконтроль	57,7 ± 1,1*	23,7 ± 2,6*
КТП-контроль	229,0 ± 2,4	7,8 ± 1,2
КТП+ИХАНТ	22,5 ± 2,3*	105,6 ± 2,5*
КТП+ВУГС	61,1 ± 1,0*	50,1 ± 6,4*
КТП+ПМС	59,3 ± 1,8*	78,0 ± 5,0*

Примечание. Здесь и в табл. 2: звездочка —  $p < 0,05$  относительно КТП-контроля.

пиперида (ИХАНТ) — 0,5 г/кг массы крысы. В каждой серии использовано по 18 животных. Сферические ВУГС, и ПМС успешно используются при лечении перитонита, панкреатита, хронической почечной недостаточности и желтухи, в острый период ожоговой болезни и приводят к уменьшению токсической фракции олигопептидов, билирубина в крови, снижению уровня токсичности сыворотки крови [6, 7, 11]. Учитывая специфику развития эндотоксемии [13], крыс декапировали через 48 ч после КТП, т. е. спустя 24 ч от момента последнего введения энтеросорбентов. Для количественного определения продуктов ПОЛ использовали усовершенствованный метод определения интенсивности флюоресценции комплекса тиобарбитуровой кислоты (ТБК) — малонового диальдегида (МДА) [12]. АОА липидов плазмы крови определяли по методу [4], содержание эндогенного глутатиона (GSH) — по методу [8]. Расчет содержания продуктов ПОЛ и эндогенного GSH проводили, соотнося величины соответствующих экстинкций к количеству белка в пробе, определяемого по Бредфорду [10]. Достоверность обнаруженных различий устанавливали с помощью критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Результаты проведенных исследований показали, что КТП вызывает определенные нарушения в системе ПОЛ. Значительные изменения отмечены в ткани печени. Из табл. 1 видно, что у животных с КТП увеличивается в 4 раза содержание МДА по сравнению с биоконтролем. При исследовании содержания ТБК-активных продуктов ПОЛ в печени животных с КТП на фоне применения энтеросорбентов установлено, что все примененные препараты обладают способностью снижать интенсивность процессов ПОЛ. Содержание МДА в печени крыс при применении гидрогеля ИХАНТ снижалось до 90 %, ВУГС — до 73 % и ПМС — до 74 % по сравнению с интактными животными. Необходимо отметить, что соотношения концентраций промежуточных продуктов ПОЛ — диеновых конъюгатов, определяемых во всех сериях эксперимента, полностью соответствуют соотношениям для МДА. Поэтому в данной работе приводятся только значения уровня МДА.

Положительный эффект энтеросорбентов при действии на процессы ПОЛ, активируемые в печени животных с КТП, очевидно, обусловлен в основном адсорбцией эндотоксинов и предупреждением их повреждающего действия на клетки печени. Накопление гидроперекисей — первичных устойчивых продуктов перекисного окисления, характеризующихся повышенной токсичностью, должно сопровождаться снижением тиолов в клетке за счет GSH-пероксидазной реакции. Действительно, параллельное изучение содержания эндогенного GSH в печени показало, что КТП приводит к значительному уменьшению его содержания. Введение энтеросорбентов животным с КТП сопровождается восстановлением уровня эндогенного GSH. Причем сопоставление изменений кон-

Таблица 2

Интенсивность образования МДА и АОА общих липидов плазмы крови крыс после КТП при гастроинтестинальной детоксикации

Условия эксперимента	МДА, мкмоль/мг белка	АОА, %	АОА/АОА (КТП), %
Биоконтроль	8,4±0,12	76,7±1,9	100,0
КТП-контроль	12,0±0,15	62,9±2,1*	—
КТП+ИХАНТ	9,7±0,33*	70,5±0,9	55,1*
КТП+ВУГС	17,2±0,5	63,9±2,0	7,2
КТП+ПМС	15,6±0,3	63,8±1,7	6,5

центрации GSH и МДА в печеночной ткани животных при КТП и на фоне введения энтеросорбентов свидетельствует о четкой корреляции результатов. Подобный характер изменений содержания GSH может служить подтверждением предполагаемого механизма действия использованных препаратов — адсорбции эндотоксинов, в том числе и липидной природы, из просвета желудочно-кишечного тракта. Кроме того, в очередной раз подтверждается важная роль эндогенного GSH (и соответственно таких ферментов антиоксидантной системы, как GSH-пероксидаза и GSH-редуктаза) в системе тканевой антирадикальной защиты организма [1].

Значительное повышение уровня продуктов ПОЛ в печени животных при КТП предполагает существенный их выброс в кровоток и, соответственно, увеличение концентрации в крови. Однако результаты, представленные в табл. 2, свидетельствуют о том, что содержание МДА в плазме крови животных после КТП повышается незначительно (по сравнению с аналогичным показателем для печени) и достигает 154 % от уровня биоконтроля. Более того, сопоставление данных относительно содержания продуктов ПОЛ в плазме крови интактных животных и животных с КТП показало, что уровень МДА в плазме по сравнению с печенью контрольных и травмированных животных существенно снижен, что может свидетельствовать о повышенном антиоксидантном статусе плазмы крови. Большое различие в интенсивности образования продуктов ПОЛ в плазме и печени животных при КТП также может свидетельствовать о повышенной АОА плазмы крови. С другой стороны, возможно, что накопление МДА и других продуктов ПОЛ в плазме крови животных после КТП становится максимальным в более поздние сроки после травмы [9].

В случае применения гастроинтестинальной детоксикации подавление процессов ПОЛ в плазме крови животных с КТП имеет место только при использовании энтеросорбентов ИХАНТ и выражается в снижении уровня МДА на 19 %. Напротив, ВУГС и ПМС вызывают некоторое увеличение уровня МДА по сравнению с контрольным на 43 и 30 % соответственно.

Неоднородность результатов исследования содержания продуктов ПОЛ в плазме крови при использовании препаратов указывает на существование альтернативных механизмов действия некоторых энтеросорбентов. Возможно их модифицирующее действие на АОА липидов крови. В норме изменения АОА липидов взаимосвязаны с нарушениями состава, окисленности и текучести липидов, т. е. с факторами, обеспечивающими

поддержание гомеостаза окислительных реакций, обновление состава липидов. Эксперименты по перераспределению АОА липидов показали, что АОА липидов плазмы крови животных с КТП снижена на 18 % по сравнению с интактными животными. Заметное повышение АОА плазмы крови у животных при КТП имеет место на фоне энтеросорбции препаратом ИХАНТ и составляет 55 % от контроля. Для ВУГС и ПМС наблюдалась незначительная тенденция к возрастанию АОА крови. Результаты свидетельствуют о четкой корреляции данных по содержанию в крови продуктов ПОЛ и изменению АОА при КТП на фоне применения препаратов ИХАНТ, ВУГС и ПМС.

Таким образом, положительное модифицирующее действие энтеросорбции при КТП на состояние системы антиоксидантной защиты организма проявлялось в значительном понижении уровня продуктов ПОЛ в печени и плазме крови, повышении АОА общих липидов плазмы и содержания эндогенного GSH в печени. Заметное снижение содержания продуктов ПОЛ в печени на 3-и сутки после КТП и введения энтеросорбентов (особенно ИХАНТ) связано, вероятно, с адсорбцией выделяемых эндотоксинов, в том числе липидной природы, в полость кишечника [5]. Важное значение подобного механизма детоксикации при использовании энтеросорбентов в патогенезе и исходе КТП подтверждается восстановлением содержания GSH в печени. Очевидно, система эндогенной антиоксидантной защиты организма, включающая наряду с другими компонентами и эндогенный GSH, судя по резкому снижению его содержания в печени после КТП, не справляется с процессами эндогенной интоксикации. Полученные результаты позволяют утверждать, что уровень продуктов ПОЛ в печени может служить критерием оценки эффективности действия энтеросорбентов при гастроинтестинальной детоксикации в условиях экспериментальной травмы.

Кроме того, характер изменений АОА общих липидов плазмы крови при использовании сорбентов на фоне КТП не исключает иных механизмов их действия, обуславливающих положительный детоксикационный эффект энтеросорбентов [6].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Агаджанов М. И., Симонян М. А., Казарян Ш. А. // *Вопр. мед. химии.* — 1989. — № 4. — С. 28—30.
2. Аристархова С. А., Бурлакова Е. Б., Заец Т. Л. // *Там же.* — 1983. — № 4. — С. 102.
3. Биохимические методы оценки тяжести эндогенной интоксикации у больных с термическими ожогами: (Инструктивно-метод. письмо) / Под ред. Р. И. Лифшица. — Челябинск, 1988.
4. Клеванов Г. И., Бабаенкова И. В., Теселкин Ю. О. и др. // *Лаб. дело.* — 1988. — № 5. — С. 59—62.
5. Лопаткин Н. А., Лопухин Ю. М. Эфферентные методы в медицине. — М., 1989.
6. Николаев В. Т. Метод гемосорбции в эксперименте и клинике. — Киев, 1984.
7. Повстаной Н. Е., Козинец Г. П. // *Клин. хир.* — 1989. — № 3. — С. 22—25.
8. Рыбина В. В., Корыстов Ю. Н., Дегтярева О. В. и др. // *Радиобиология.* — 1988. — Т. 28, № 4. — С. 435—437.
9. Рябинин В. Е. Ожоговая токсемия / Под ред. Р. И. Лифшица. — Челябинск, 1986. — С. 27—34.
10. Шоно Н. И., Баскаева Е. М. // *Лаб. дело.* — 1989. — № 4. — С. 4—7.
11. Шугаев А. И., Беляков Н. А., Мусаиыхов Х. Т. и др. // *Пат. физиол.* — 1987. — № 2. — С. 52—54.

12. Tanizama H., Sazuka Y., Takino Y. // Chem. pharm. Bull.— 1981.— Vol. 29, N 10.— P. 2910—2914.
13. Walker R. J. // Exp. Hemat.— 1978.— N 6.— P. 172—184.

Поступила 20.11.89

# EFFECT OF ENTEROSORPTION ON LIPID PEROXIDATION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF LIVER AND BLOOD LIPIDS AFTER COMBINED THERMIC TRAUMA

A. S. Seylanov, B. M. Nurkhanov

Institute of Medical Radiology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Obninsk

Enterosorbents IHANT, VUGS and PMS decreased considerably the lipid peroxidation products content in liver tissue within 3 days after combined thermic trauma. The effect observed appears to occur due to adsorption of endotoxins including lipid toxins in gastrointestinal tract. Content of lipid peroxidation products in liver tissue under pathologic conditions may serve as a criterion in evaluation of enterosorbents efficiency in gastrointestinal detoxication.

Для характеристики энзимного гомеостаза изучались следующие показатели: общая протеолитическая активность по гидролизу казеина (А. П. Левицкий и соавт., 1973 г.), дающая представление об активности группы нейтральных и слабощелочных протеаз при рН 7,6 (трипсин КФ 3.4.21.4, химотрипсин КФ 3.4.21.1, эластаза КФ 3.4.21.11, карбоксипептидаза КФ 3.4.12, катепсины А и В, плазмин КФ 3.4.21.7 и др.); протеолитическая активность (рН 3,5—5,5) по расщеплению гемоглобина (по Anson, 1938 г. в модификации А. П. Левицкого, 1973 г.), определяющая в основном активность лизосомального катепсина D (КФ 3.4.23.5). Общую протеолитическую и катептическую активность выражали в мкат на 1 л; уровень  $\alpha_1$ -ингибитора протеаз с использованием в качестве субстрата БАПНА, активность выражали в мкат на 1 л. Содержание гонадотропных и стероидных гормонов определяли радиоиммунологическим методом с помощью наборов реактивов фирмы «Cea-Ire-Sorin» (Франция).

Результаты и обсуждение. Установлено, что активность протеолитических ферментов и их ингибиторов в динамике нормального менструального цикла у здоровых женщин претерпевает определенные изменения. Они характеризуются (см. рисунок): 1) наиболее высоким

© В. Ф. НАГОРНАЯ, 1990

УДК 618.11-006.03-07: [616.153.1:577.152.34 + 577.152.34.042.2]

В. Ф. Нагорная

# ПРОТЕАЗЫ И ИХ ИНГИБИТОРЫ У БОЛЬНЫХ С ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫМИ ОПУХОЛЯМИ ЯИЧНИКОВ

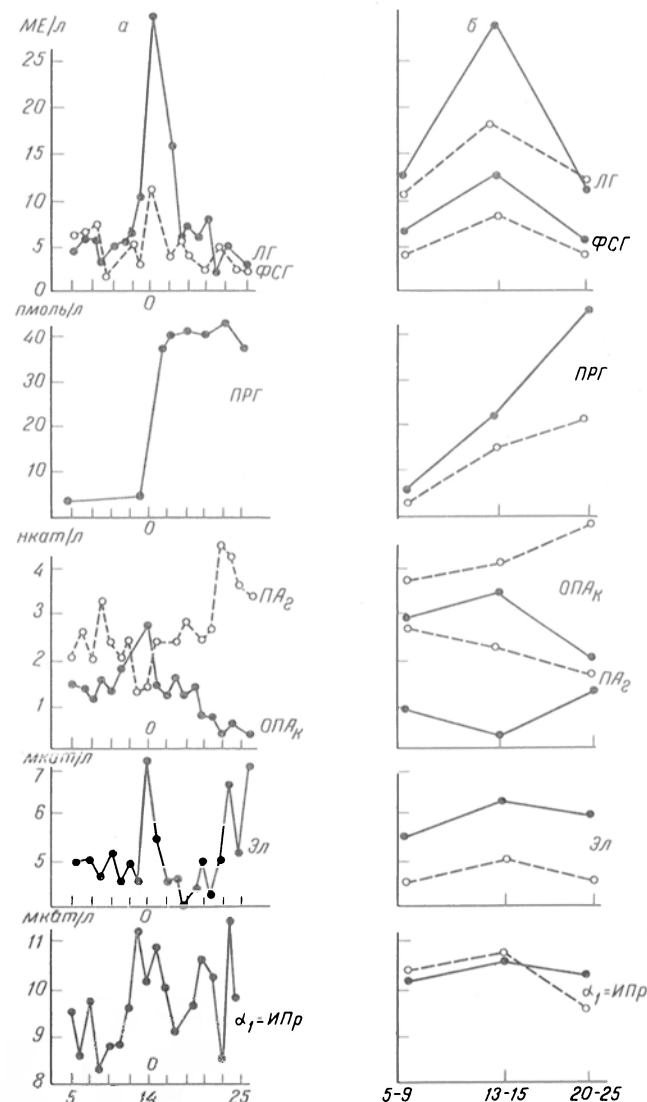
Кафедра акушерства и гинекологии факультета усовершенствования врачей Одесского медицинского института

Известна важная роль ферментов, в частности протеаз, в здоровом организме и при развитии патологических состояний. В женском организме они участвуют в обеспечении специфических функций — овуляции, регрессии желтого тела [8, 9]. В последние годы важное диагностическое, прогностическое и лечебное значение приобрела энзимология опухолей. Протеазы участвуют в делении и росте, пролиферации и инвазии клеток и тканей [1, 3, 5, 6, 10]. Доказано значительное повышение активности протеолитических ферментов в злокачественных тканях при различной локализации опухоли [2, 4, 7].

Исследования роли протеиназ и их ингибиторов при развитии доброкачественных опухолей единичны. В то же время представляется очевидным, что любой рост при отсутствии клинических проявлений первоначально осуществляется на молекулярном уровне и сопровождается изменением биохимических процессов в клетке [1].

Целью настоящего исследования явилось изучение роли протеолитических ферментов и их ингибиторов в патогенезе доброкачественных опухолей яичников (ДОЯ).

Методика. Изучены активность протеолитических ферментов и их ингибиторов в сыворотке крови и синхронно с протеазами секреция гонадотропных (фолликулостимулирующего — ФСГ, лютеинизирующего — ЛГ) и стероидных (прогестерона — ПРГ) гормонов. Исследования проведены у 30 здоровых женщин и 132 больных с ДОЯ. У 112 женщин исследования выполнялись на 5—9, 13—14, 20—25-й дни менструального цикла, у 20 — ежедневно в течение цикла. Полученный материал обработан статистически с подсчетом показателя Стьюдента и индекса корреляции между показателями энзимной и гормональной систем.



Гормонально-энзимные параллели у здоровых женщин и больных с ДОЯ.

а — секреция гонадотропных гормонов и гормонов яичников, уровень протеаз и ингибитора протеаз в динамике нормального менструального цикла (ежедневные исследования, проведенные у здоровой женщины 23 лет); б — направленность изменений секреции гонадотропных гормонов и гормонов яичников, протеаз и ингибитора протеаз у здоровых лиц (сплошная линия) и больных с ДОЯ (пунктирная линия) в течение менструального цикла. ОПА<sub>к</sub> — общая протеолитическая активность по казеину; ПА<sub>2</sub> — протеолитическая (катептическая) активность по гемоглобину; Зл — эластаза;  $\alpha_1$ -ИПр —  $\alpha_1$ -ингибитор протеаз.



уровнем нейтральных и слабощелочных протеаз в перiovуляторный период и выраженным его снижением в лютеиновую фазу цикла; 2) наиболее низкой катептической активностью в перiovуляторный период и ее повышением в лютеиновую фазу; 3) кратковременным резким повышением уровня нейтральных и слабощелочных протеаз и особенно эластазы в дни овуляции и в середине лютеиновой фазы — эта особенность активности выявлена во время ежедневных исследований в динамике менструального цикла; 4) изменением уровня  $\alpha_1$ -ингибиторов протеаз, в целом повторяющим динамику активности протеаз. Однако во время ежедневных исследований установлены дни с наиболее низким уровнем  $\alpha_1$ -ингибитора протеаз — они соответствуют пику активности слабощелочных и нейтральных протеаз и приходится на день овуляции. Несмотря на лабильность энзимной системы, быструю ее реакцию на изменяющееся состояние организма, закономерности, выявленные при ежедневных исследованиях у здоровых женщин, дают основание связать их с циклическими процессами, происходящими в организме женщины.

При изучении активности протеолитических ферментов у больных с ДОЯ обнаружены определенные изменения энзимного гомеостаза. Активность нейтральных и слабощелочных протеаз у больных женщин в течение цикла выше, чем в контрольной группе. Так, общая протеолитическая активность по казеину на 5—9-й день повышается до  $3,13 \pm 0,55$  нкат/л (в контрольной группе  $1,46 \pm 0,31$  нкат/л;  $p < 0,05$ ), в перiovуляторный период (13—15-й день) — до  $3,52 \pm 0,3$  нкат/л (в контроле  $1,79 \pm 0,47$  нкат/л;  $p < 0,01$ ); наиболее резкое ее повышение по сравнению с показателями здоровых лиц наблюдается на 20—25-й день (лютеиновая фаза) —  $4,64 \pm 1,04$  нкат/л ( $p < 0,001$ ).

Активность лизосомальных катепсинов является высокой в течение всего менструального цикла. Так, в фолликулиновую фазу протеолитическая активность по гемоглобину повышается до  $6,26 \pm 1,4$  нкат/л (у здоровых лиц  $2,32 \pm 0,47$  нкат/л;  $p < 0,01$ ), в перiovуляторный период ее значения сохраняются высокими —  $5,94 \pm 1,2$  нкат/л (в контроле  $1,49 \pm 0,49$  нкат/л;  $p < 0,01$ ), в лютеиновую фазу —  $4,86 \pm 1,4$  нкат/л (в контроле  $2,72 \pm 0,63$  нкат/л;  $p > 0,05$ ). Обнаружены также выраженные изменения активности эластазы. В отличие от других протеаз, активность которых повышается, уровень эластазы снижается в динамике цикла до  $3,49 \pm 0,36$ — $4,23 \pm 0,51$  мкат/л в разные фазы цикла (у здоровых лиц  $5,82 \pm 0,4$ — $6,4 \pm 0,57$  мкат/л;  $p < 0,001$ ).

Параллельно повышению активности протеаз в течение менструального цикла у больных увеличивается и уровень  $\alpha_1$ -ингибитора протеаз: в фолликулиновую фазу  $11,78 \pm 0,9$  мкат/л (у здоровых лиц  $9,48 \pm 0,30$  мкат/л;  $p < 0,05$ ), в перiovуляторный период  $11,42 \pm 0,8$  мкат/л (в контроле  $10,95 \pm 0,27$  мкат/л;  $p > 0,05$ ), в лютеиновую фазу отмечено снижение уровня  $\alpha_1$ -ингибитора протеаз до  $8,98 \pm 0,41$  мкат/л (в контроле  $10,15 \pm 0,7$  мкат/л;  $p > 0,05$ ).

Соотношение общая протеолитическая активность /  $\alpha_1$ -ингибитор протеаз в фолликулиновую фазу составило  $0,37 \pm 0,08$  (у здоровых лиц

$0,15 \pm 0,03$ ;  $p < 0,05$ ), в перiovуляторный период —  $0,36 \pm 0,02$  (в контроле  $0,21 \pm 0,02$ ;  $p < 0,001$ ), в лютеиновую фазу —  $0,30 \pm 0,04$  (в контроле  $0,05 \pm 0,001$ ;  $p < 0,001$ ). Из этого следует, что у женщин с ДОЯ по сравнению со здоровыми женщинами истинного повышения активности протеаз в перiovуляторный период не наблюдается.

Параллельно изменению энзимного гомеостаза у больных с ДОЯ отмечены изменения секреции гонадотропных и стероидных гормонов, которые характеризуются снижением в течение менструального цикла секреции обоих гонадотропных гормонов (ФСГ и ЛГ). Так, ФСГ в фолликулиновую фазу снижается до  $3,72 \pm 0,94$  МЕ/л (у здоровых лиц  $5,77 \pm 0,75$  МЕ/л), в лютеиновую фазу составляет  $2,1 \pm 0,44$  МЕ/л (у здоровых лиц  $2,75 \pm 0,4$  МЕ/л), в перiovуляторный период —  $6,75 \pm 1,83$  МЕ/л (у здоровых лиц  $10,31 \pm 0,65$  МЕ/л). Во время ежедневных исследований отмечено снижение овуляторных пиков гормона. Аналогичные изменения характеризуют секрецию ЛГ: в фолликулиновую фазу  $6,75 \pm 0,85$  МЕ/л (в контроле  $9,11 \pm 1,23$  МЕ/л), в лютеиновую —  $6,51 \pm 1,81$  МЕ/л (в контроле  $7,23 \pm 0,74$  МЕ/л). Наиболее выраженное снижение секреции гормона отмечено в перiovуляторный период —  $18,59 \pm 1,48$  (в контроле  $37,8 \pm 3,18$ ;  $p < 0,001$ ) за счет резкого уменьшения овуляторных пиков. Для стероидных гормонов наиболее характерны выраженные изменения секреции ПРГ: у большинства больных она снижена до  $23,9 \pm 6,4$  нмоль/л (в контроле  $46,8 \pm 8,0$  нмоль/л;  $p < 0,05$ ).

На рисунке показана направленность изменений уровня протеаз и их ингибиторов, гонадотропных и стероидных гормонов в различные фазы цикла. Как видно, у здоровых лиц повышению уровня гормонов в перiovуляторный период соответствует повышение общей протеолитической активности, активности эластазы; повышение секреции ПРГ в лютеиновую фазу сопровождается повышением катептической активности. Однонаправленность изменений подтверждается и совпадением пиков общей протеолитической активности, эластазы, ФСГ и ЛГ (при ежедневных исследованиях).

Можно допустить следующее объяснение обнаруженным связям. Гонадотропины и рилизинг-гормоны, осуществляющие их контроль, рецепторы в органах-мишенях имеют белковую природу. Поэтому объяснима тропность протеаз к этим гормонам, доказана взаимосвязь активности протеаз и секреции белковых гормонов [5, 6, 8, 9]. В наших исследованиях эта связь подтверждена наличием корреляционной зависимости между общей протеолитической активностью и уровнем ФСГ в I ( $r = -0,739$ ) и II ( $r = -0,615$ ) фазы; общей протеолитической активностью и уровнем ЛГ ( $r = -0,54$ ) в фолликулиновую фазу; катептической активностью и уровнем ЛГ во II фазу ( $r = -0,519$ ), активностью эластазы и ФСГ в перiovуляторный период ( $r = +0,530$ ). Протеолитические системы как биологические универсальные системы участвуют в циклических процессах, происходящих в женском организме. Слабощелочные и нейтральные протеазы участвуют в обеспечении про-

цессов овуляции, а лизосомальные катепсины — в обеспечении процессов, происходящих в лютеиновую фазу: расцвет и обратное развитие желтого тела, реализуя свою роль «санитаров» организма.

У больных с ДОЯ отмечено изменение не только активности протеаз, но и их соотношения в отдельные фазы цикла: общая протеолитическая активность вместо ожидаемого снижения, наблюдаемого в лютеиновую фазу у здоровых лиц, у больных, наоборот, повышается, а по относительному показателю (активность протеазы/уровень ингибитора) их активность в перiovуляторный период не изменяется (у здоровых лиц она повышается). Активность эластазы в лютеиновую фазу у больных снижается, а у здоровых уровень этого фермента в перiovуляторный период и в лютеиновую фазу одинаков. Уровень катепсина D вместо ожидаемого повышения, отмеченного у здоровых лиц, у больных снижается.

Снижение секреции белковых гормонов и повышение активности протеаз — очевидно, взаимосвязанные процессы. Особенности изменения активности протеаз в разные фазы цикла имеют принципиальное значение. Недостаточный уровень протеаз в период овуляции не обеспечивает механизмов овуляции. Недостаточный уровень лизосомальных протеаз в лютеиновую фазу, возможно, обусловлен неполноценностью самого желтого тела, не обеспеченного нормальной овуляцией. Другой причиной может быть низкий уровень катепсинов, не обеспечивающий нормального функционирования желтого тела, что проявляется в низкой секреции ПРГ.

Изменение уровня протеаз и их ингибиторов, нарушение соотношения их активности в отдельные фазы цикла, ведущее к изменению их функциональной нагрузки в период овуляции, лютеиновую фазу, и изменение секреции гонадотропных гормонов являются взаимосвязанными процессами, оказывающими влияние на патогенез заболевания.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Васильев В. Ю., Дорофеев Г. И., Ивашкин В. Г. и др. // Бюл. экспер. биол.— 1984.— № 6.— С. 717—719.
2. Вакслер И. Г., Веремеенко К. Н., Рыбуха В. Н. и др. // Экспер. онкол.— 1986.— № 3.— С. 65—67.
3. Веремеенко К. Н. // Биохимия животных и человека.— 1983.— Вып. 7.— С. 37—46.
4. Гешелин С. А., Вовчук С. В., Близнюк Б. Ф., Варбанец В. Ф. // Вопр. онкол.— 1984.— № 10.— С. 9—18.
5. Орехович В. Н., Локишина Л. А., Елисеева Ю. А. // Вестн. АМН СССР.— 1984.— № 8.— С. 3—11.
6. Пасхина Т. С. // Там же.— 1982.— № 9.— С. 50—56.
7. Adelman S. F., Horvett M. K., Rapp F. // Europ. J. Virol.— 1982.— Vol. 60.— P. 15—24.
8. Bagdasarian A., Wheeler J., Stewart G. J. et al. // J. clin. Invest.— 1981.— Vol. 67.— P. 281—291.
9. Lecomte P., Tarqui M. // Contracept. Fertil.— 1983.— Vol. 11, N 9.— P. 1035—1052.
10. Sloane B. F., Dunn J. R., Houn K. V. // Science.— 1983.— Vol. 212, N 4499.— P. 1151—1153.

## PROTEASES AND THEIR INHIBITORS IN PATIENTS WITH OVARY BENIGN TUMORS

V. F. Nagornaya

Medical School, Odessa

Activities of neutral and weakly alkaline proteases, cathepsins,  $\alpha_1$ -inhibitor of proteases were studied with simultaneous estimation of follicle stimulating, luteinizing hormones and progesterone in healthy persons and in patients with ovary benign tumors. A decrease in content of the peptide hormones was accompanied by an increase in proteolytic activity as well as by deterioration of these proteases ratio during various phases of the cycle; these alterations appear to be involved in pathogenesis of the disease.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.831-002-056.3-07:1616.411+616.438+616.4281-008.939.633.2

Л. Н. Дворянинович, В. Д. Курбаев, Н. М. Плотнокова

## АКТИВНОСТЬ ПЕНТОЗОФОСФАТНОГО ПУТИ И СОДЕРЖАНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В ИММУНОКОМПЕТЕНТНОЙ ТКАНИ ЖИВОТНЫХ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ АЛЛЕРГИЧЕСКИМ ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТОМ

Гродненский медицинский институт

Энцефаломиелит — поражение центральной нервной системы (ЦНС), наиболее характерным признаком которого является процесс демиелинизации преимущественно церебральных или стволовых спинальных отделов. Сам процесс демиелинизации является следствием повреждения нервной ткани в результате аутоаллергических реакций [12, 17]. Заболевание довольно часто встречается на территории нашей страны, особенно у детей, и имеет склонность к распространению, чему способствует общая аллергизация населения, повсеместно отмечаемая в последние годы.

Имеются сообщения, свидетельствующие о нарушении обмена витамина  $B_1$  в ЦНС больных энцефаломиелитом, а также установлено, что введение тиамин улучшает течение заболевания [9, 13, 14]. Наиболее исследованной реакцией, протекающей с обязательным участием коферментной формы витамина  $B_1$  тиаминдифосфата, является транскетолазная реакция. При участии транскетолазы (ТК) идут реакции исоксилирования образования пентозофосфатов из гексозофосфатов. Очевидно, что с ТК оказываются тесно связанными процессы обеспечения организма пентозофосфатами — синтез нуклеотидов и нуклеиновых кислот.

Особого внимания заслуживает вопрос об активности пентозофосфатного пути в лимфоидной ткани и его роли в обеспечении пластического обмена лимфоидных органов в организме больных энцефаломиелитом людей и животных. Однако данных по этому вопросу в литературе мы не обнаружили.

Методика. Опыты поставлены на беспородных крысах-самцах массой 220—240 г, содержавшихся на обычном рационе вивария. Экспериментальный аллергический энцефаломиелит (ЭАЭ) воспроизводили у крыс путем введения в подушечки лап 0,4 мл смеси, состоящей из гомологичной мозговой ткани (100 мг на животное), вазелинового масла и авто-

Поступила 29.12.89

клавированной вакцины БЦЖ (10 мг на животное). Смесь вводили по 0,1 мл в каждую лапу. Воспроизводимость ЭАЭ была у 100 % крыс. Животных забивали декапитацией. Исследовали активность ТК и содержание нуклеиновых кислот в селезенке, тимусе и трех группах лимфатических узлов (ЛУ) — подчелюстных, шейных и подмышечных — на 15—18-е сутки сенсибилизации, т. е. на стадии клинических проявлений заболевания. Активность фермента определяли по количеству образовавшегося седогептулозо-7-фосфата [10], содержание РНК и ДНК — по методу А. Fleck и Н. Munro [16], количество общего белка — по О. Н. Lowry и соавт. [18].

**Результаты и обсуждение.** У животных с ЭАЭ отмечено значительное уменьшение массы тимуса (~ на 70 %,  $p < 0,001$ ) и увеличение массы селезенки (~ на 124 %,  $p < 0,001$ ) (табл. 1). Масса ЛУ существенно не изменялась (табл. 2). Особенностью тимоцитов по сравнению с лимфоцитами периферической крови и ЛУ являются высокая митотическая активность и повышенная чувствительность к действию различного рода факторов — алиментарных, стрессовых, бактериальных и т. д. Значительное увеличение массы селезенки у животных с ЭАЭ на 15—18-е сутки сенсибилизации может свидетельствовать о гиперфункции этого органа, что, по-видимому, обусловлено аутоиммунными процессами и, возможно, в какой-то мере повышенным депонированием [1] в ответ на воздействие энцефалитогенной смеси. Известно, что этот орган играет существенную роль в специфической защите организма. Активность ТК в тимусе снижена в расчете на 1 мг ткани (см. табл. 1), однако удельная активность фермента не изменялась, что, по-видимому, обусловлено снижением количества общего белка в вилочковой железе животных с ЭАЭ. Транскетолазная активность заметно уменьшалась в подчелюстных ЛУ (см. табл. 2), тенденция к ее снижению обнаружена в шейных ЛУ и существенно не изменялась в подмышечных ЛУ.

Сообщения об обмене тиамин в организме больных энцефаломиелитом людей и животных

весьма немногочисленны. Так, в ткани мозга больного при подострой некротизирующей энцефаломиелопатии не обнаружен тиаминтрифосфат [13, 14]. Содержание же тиамин и его других фосфорных эфиров в мозге и активность пируватдегидрогеназы,  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназы, транскетолазы в крови соответствовали норме. Другие авторы [9] выявили дефицит тиамин в организме больных с энцефалопатией: нагрузка глюкозой приводила к значительному повышению содержания в крови пировиноградной и  $\alpha$ -кетоглутаровой кислот, введение витамина  $B_1$  нормализовало обмен обеих кислот. Уже установлено, что сама недостаточность витамина  $B_1$  в организме сопровождается развитием энцефалопатических явлений. Так, у крыс, находившихся в течение 4,5—5 нед на рационе без тиамин, появлялись дискоординация движений, опистотонус и другие нарушения, которые исчезали после инъекций тиамин [11]. У этих же животных в ЦНС обнаружено уменьшение содержания тиамин, снижение активности пируватдегидрогеназы и транскетолазы и соответственно накопление лактата и пирувата. Дополнительное введение витамина  $B_1$  нормализовало указанные показатели. В опытах на крысах с ЭАЭ показано, что активность ТК в отделах ЦНС возрастала в предклиническом периоде развития заболевания (3—9-е сутки) и нормализовалась в восстановительном периоде — 24—30-й день сенсибилизации [2].

Выявленные нами неоднозначные изменения активности ТК в лимфоидных органах крыс с ЭАЭ находятся в определенной связи с ролью фермента в метаболизме лимфоидной ткани, что может быть обусловлено различиями в содержании возможных молекулярных форм фермента, а также тиамин и его кофермента в лимфоидных органах. Однако такие данные нам не известны.

Установлено, что витамин  $B_1$  и катализируемая им транскетолазная реакция могут оказывать

Таблица 1

Некоторые биохимические показатели в селезенке и тимусе крыс с ЭАЭ

Исследуемый показатель	Тимус		Селезенка	
	контроль	опыт	контроль	опыт
Масса органа, мг	216±23,9 (6)	62,9±9,69* (7)	670±100 (6)	1502±106* (6)
Содержание ДНК, мкг на 1 г ткани	12,2±2,29 (6)	6,13±1,40* (7)	11,2±0,64 (6)	10,2±0,52 (7)
Содержание РНК, мкг на 1 г ткани	7,48±0,34 (6)	7,69±0,35 (7)	8,34±0,27 (6)	9,26±0,16* (7)
Активность ТК:				
нмоль/мин на 1 мг ткани	3,55±0,27 (6)	2,72±0,19* (7)	4,00±0,26 (6)	4,90±0,27* (6)
нмоль/мин на 1 мг белка	33,3±2,50 (6)	36,2±3,83 (6)	25,8±2,06 (6)	31,7±1,61* (6)
Содержание белка, мг на 1 г ткани	109±9,17 (6)	79,6±9,85* (7)	158±15,8 (6)	153±6,69 (7)

Примечание. Здесь и в табл. 2: в скобках число животных; звездочка —  $p < 0,05—0,001$ .

Таблица 2

Некоторые биохимические показатели в ЛУ крыс с ЭАЭ

Исследуемые показатели	Подчелюстные ЛУ		Шейные ЛУ		Подмышечные ЛУ	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
Масса, мг	218±12,9 (6)	222±32,9 (7)	93,3±10,8 (6)	113±18,1 (6)	186±21,8 (6)	303±72,5 (6)
Содержание ДНК, мкг на 1 г ткани	12,6±0,74 (6)	9,22±1,13* (7)	11,6±1,54 (6)	7,25±0,38* (7)	8,42±0,11 (5)	10,8±0,47* (6)
Содержание РНК, мкг на 1 г ткани	8,07±0,32 (6)	8,93±0,81 (7)	7,99±0,54 (5)	7,47±0,42 (7)	6,17±0,16 (6)	8,56±0,19* (7)
Активность ТК, нмоль/мин на 1 мг белка	36,2±2,83 (6)	26,3±2,33* (7)	44,7±4,16 (6)	35,0±2,00 (7)	36,0±6,66 (6)	35,0±3,33 (6)
Содержание белка, мг на 1 г ткани	131±20,0 (6)	116±9,25 (6)	97,0±6,23 (6)	89,0±3,96 (7)	87,6±9,50 (6)	106±7,58 (7)

влияние на обмен нуклеиновых кислот, которые являются необходимым компонентом иммуногенеза [4]. Сообщения об изучении нуклеинового обмена в организме животных с ЭАЭ единичны. Так, при исследовании синтеза нуклеиновых кислот [3] обнаружено накопление РНК в 1-е сутки после сенсибилизации морских свинок с острым энцефалитом в клетках спинного мозга, на 7-е сутки рост РНК ослабевал, а увеличивалось количество ДНК. На стадии парезов и параличей синтез ДНК был резко усилен, а РНК — ослаблен. Данных о содержании нуклеиновых кислот в иммунокомпетентной ткани животных с энцефаломиелитом в литературе мы не обнаружили.

В наших опытах отмечено достоверное уменьшение содержания ДНК у животных с ЭАЭ в тимусе (см. табл. 1), подчелюстных и шейных ЛУ (см. табл. 2). Значительно повышено содержание ДНК ( $\sim$  на 28 %,  $p < 0,001$ ) и РНК ( $\sim$  на 38 %,  $p < 0,01$ ) в подмышечных ЛУ (см. табл. 2). Действие специфического для иммунной системы раздражителя (энцефалитогенная смесь) обусловило типичную для стресса эндокринную реакцию [6]. Следствием этого является преобладание катаболических процессов в организме сенсибилизированных животных над анаболическими, увеличение содержания белков с аутогенными свойствами, что и приводит к выраженной реакции со стороны тимико-лимфатической системы с инволюцией тимуса. Однако с учетом возраста подопытных животных (масса тела 220—240 г) указанные изменения в вилочковой железе в какой-то степени, по-видимому, могут быть следствием возрастной инволюции этого органа. Отмеченное нами уменьшение активности ТК в тимусе и ЛУ животных с ЭАЭ, очевидно, обусловлено нарушением белоксинтезирующей функции лимфоидных клеток вследствие усиления катаболических процессов в этих органах.

В селезенке животных с ЭАЭ выявлено повышение активности ТК, а также количество РНК (см. табл. 1). Известно, что в селезенке имеется достаточно эффективный пентозофосфатный путь и вклад этого органа в формирование клеточного пула фосфонентоз достаточно велик [8]. Так, в гомогенатах селезенки исходный уровень дегидрогеназ в 3 раза выше, чем в гомогенатах печени, а активность ТК лишь в 0,7 раза меньше, чем в печени. Известно, что селезенка своеобразно реагирует и на различную обеспеченность организма тиаминном [14]. Кроме того, установлена активная роль селезенки в реализации противовоспалительного действия тиаминна — одного из процессов, которые лежат в основе осуществления барьерных функций организма [7]. Повышение активности ТК в селезенке крыс с ЭАЭ следует рассматривать как компенсаторную реакцию этого органа, направленную на выработку необходимого количества пентозофосфатов [4].

Таким образом, как показали результаты проведенных исследований, у животных с ЭАЭ снижены активность ТК и количество ДНК в тимусе, подчелюстных и шейных ЛУ, повышены активность ТК и количество РНК в селезенке, не изменена активность ТК и повышено содержание РНК и ДНК в подмышечных ЛУ. Как следует из анализа этих данных, реакция лимфоидных органов на введение энцефалитогенной смеси

была неоднозначной, что, по-видимому, обусловлено особенностями метаболизма в этих органах. Наиболее выраженные изменения исследуемых показателей выявлены в тимусе. Полученные данные могут быть полезны для объяснения механизмов повреждения реакций клеточного иммунитета при энцефаломиелите.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гольбер Л. П. Очерки физиологии и патофизиологии гепатолисанальной системы. — М., 1977.
2. Курбаев В. Д., Гордеев Я. Я. // Пентозофосфатный путь превращения углеводов и его регуляция. — Гродно, 1978. — С. 70.
3. Осипова Я. К. // Острый энцефаломиелит в эксперименте и клинике. — Минск, 1969. — С. 78—84.
4. Островский Ю. М. Активные центры и группировки в молекуле тиаминна. — Минск, 1975.
5. Островский Ю. М., Горбач Э. В., Маглыш С. С. и др. // Докл. АН БССР. — 1980. — № 1. — С. 75.
6. Панин Л. Е. Биохимические механизмы стресса. — Новосибирск, 1983.
7. Чукичев Е. М. // Пермский мед. ин-т: Итоговая науч. конф.: Материалы. — Пермь, 1966. — С. 135—137.
8. Шонка И., Ермоленко Р. // Вопр. мед. химии. — 1961. — № 2. — С. 115—120.
9. Buchle R. M. // Acta neurol. — 1967. — Vol. 43, N 2. — P. 149—157.
10. Bruns F. H., Dunwald E., Noltmann E. // Biochem. Z. — 1958. — Bd 330. — S. 497—508.
11. McCandless D., Schenker S. // J. clin. Invest. — 1968. — Vol. 47, N 10. — P. 2268—2280.
12. Cendrowski W., Polka G. // Neurol. Neurochir. pol. — 1973. — Vol. 7, N 1. — P. 51—54.
13. Cooper Jack R., Itokawa Yoshinori, Pincus Jonathan H. // Science. — 1969. — Vol. 164, N 384. — P. 74—75.
14. Cooper Jack R., Pincus Jonathan H. // J. Agricult. Food Chem. — 1972. — Vol. 20, N 3. — P. 490—493.
15. Fekete G., Prokai A. // Acta physiol. hung. — 1954. — Vol. 6. — P. 41.
16. Fleck A., Munro H. // Biochim. biophys. Acta. — 1962. — Vol. 55, N 5. — P. 571—583.
17. Gollich Stematsky, Rannon L., Vonsover A. // Europ. Neurol. — 1975. — Vol. 13, N 5. — P. 418—421.
18. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.

Поступила 19.12.89

#### ACTIVITY OF THE PENTOSEPHOSPHATE PATHWAY AND CONTENT OF NUCLEIC ACIDS IN IMMUNOCOMPETENT TISSUE OF ANIMALS WITH ALLERGIC ENCEPHALOMYELITIS

L. N. Dvoryaninovich, V. D. Kurbaev, N. M. Plotnikova

Medical School, Grodno

A decrease in thymus gland mass and an increase in spleen tissue mass, decrease of DNA content in thymus, cervical and submaxillary lymphonodes, increase in DNA and RNA content in axillary lymphonodes and of RNA in spleen were detected within 15-19 days in rats (220-240 g of body mass), sensitized with 0.4 ml of encephalogenous mixture (0.1 ml in each foot) containing 100 mg of homologous brain tissue, liquid petrolatum and 10 mg of heated BCG vaccine. Activity of transketolase was decreased in thymus, submaxillary lymphonodes and increased in spleen tissue of the sensitized animals.

В. М. Прокопенко, В. В. Слободская, Е. В. Шапот,  
В. В. Елисеев

## ВЛИЯНИЕ ГУАНОЗИН-5'-МОНОФOSFATA НА ПРОЦЕССЫ МЕТАБОЛИЗМА У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ МИОКАРДИТОМ

Всесоюзный научно-исследовательский технологический институт антибиотиков и ферментов медицинского назначения, Ленинград

В последние годы возрос интерес к нуклеозидам в связи с их широким использованием для лечения патологических состояний сердечно-сосудистой системы, печени, нервно-мышечного аппарата. Хотя производство и потребление лекарственных средств на основе нуклеозидов и нуклеотидов ежегодно растут [5], о механизмах действия этих соединений известно немного. Наиболее полно изучены адениновые нуклеотиды, инозин, оротовая кислота. Менее исследованы гуаниновые нуклеотиды, оказывающие выраженное влияние на миокард. Действие гуаниновых нуклеотидов носит двухфазный характер: вслед за кратковременным отрицательным эффектом наблюдается положительное хроно- и инотропное влияние. Наименьший отрицательный эффект дает гуанозин-5'-монофосфат (5'-ГМФ) [2].

Мы исследовали влияние экзогенного 5'-ГМФ на энергетический обмен сердца при адреналиновом миокардите.

Методика. Опыты проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 180—220 г. Адреналиновый некроз вызывали однократным внутривенным введением 0,1 % раствора адреналина (0,5 мл на 200 г массы тела животного). 5'-ГМФ («Reanal», Венгрия) вводили внутримышечно в дозе 25 мг на 1 кг массы тела в течение 10 дней. Содержание АТФ и КФ в сердце крыс определяли по [16]. Определение НАД в ткани миокарда осуществляли, как описано в работе

[7]. Осадок гликогена из ткани сердца получали по [14]. Гидролиз осадка гликогена осуществляли в течение 2,5 ч в 2 н.  $H_2SO_4$ . В нейтрализованном гидролизате количество глюкозы определяли о-толуидиновым методом [6]. Количество пировиноградной кислоты (ПВК) в миокарде регистрировали по убыли НАД-Н при 340 нм в присутствии лактатдегидрогеназы — ЛДГ [9]. Количество молочной кислоты определяли по [15]. Активность ЛДГ (КФ 1.1.1.27) измеряли по [13]. Для определения активности НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназы (КФ 1.1.1.41) митохондрии сердца выделяли методом дифференциального центрифугирования в солевой среде (0,145 М раствор KCl, содержащий 3,3 мМ  $KHCO_3$ , pH 7,4). Активность фермента измеряли спектрофотометрически по скорости восстановления эквивалентных количеств НАД [10]. Концентрацию белка определяли по [17]. Полученные результаты обрабатывали статистически по Стьюденту — Фишеру для малых выборок [1].

Результаты и обсуждение. При адреналиновом миокардите резко уменьшается количество НАД, что связано с замедлением ресинтеза НАД [11]. Десятидневный курс введения 5'-ГМФ приводит к нормализации содержания НАД в ткани миокарда, что в свою очередь способствует восстановлению активности НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназы, лимитирующей скорость реакций цикла трикарбоновых кислот (табл. 1). Однако восстановление истощенных энергетических ресурсов при введении 5'-ГМФ не происходит: содержание АТФ и КФ в сердце остается на таком же низком уровне, как и у животных контрольной группы.

При адреналиновом миокардите в условиях недостаточности кислорода и возникающего дефицита АТФ немаловажное значение для поддержания жизнеспособности сердца приобретает гликолиз. Исследование содержания гликогена в ткани сердца показало, что на 10-е сутки при адреналиновом миокардите, как и при инфаркте [12], наблюдается восстановление количества гликогена. Одновременно нормализуются уровень молочной кислоты и активность ЛДГ на 10-й день развития миокардита. Аналогичные результаты были получены ранее [12]. Введение крысам с

Таблица 1

Влияние 5'-ГМФ на некоторые компоненты аэробного пути образования АТФ и содержание макроэргических фосфатов у крыс с адреналиновым миокардитом

Группа животных	НАД, $\mu$ моль на 1 г ткани	Изоцитратдегидрогеназа, $\mu$ моль НАД-Н в 1 мин на 1 мг белка	АТФ, $\mu$ моль на 1 г ткани	КФ, $\mu$ моль на 1 г ткани
Интактные	89,2 $\pm$ 12,5 (6)	28,7 $\pm$ 1,6 (14)	4,8 $\pm$ 0,2 (10)	5,9 $\pm$ 0,3 (10)
Миокардит	54,2 $\pm$ 4,5 (9)	23,4 $\pm$ 1,49* (14)	4,07 $\pm$ 0,27* (7)	4,7 $\pm$ 0,16 (7)
Миокардит+5'-ГМФ	76,1 $\pm$ 8,2 (7)	26,97 $\pm$ 1,4 (14)	3,9 $\pm$ 0,3 (6)	4,38 $\pm$ 0,1 (6)

Примечания. Здесь и в табл. 2: в скобках — число опытов; звездочка —  $p < 0,05$ ; представлены величины  $M \pm m$ .

Таблица 2

Влияние 5'-ГМФ на некоторые компоненты гликолиза у крыс с адреналиновым миокардитом

Группа животных	Гликоген, мг %	Молочная кислота, $\mu$ моль на 1 г ткани	ЛДГ, $\mu$ моль НАД-Н в 1 мин на 1 мг белка	ПВК, $\mu$ моль на 1 г ткани
Интактные	162 $\pm$ 9 (19)	2,2 $\pm$ 0,19 (5)	1126 $\pm$ 108 (12)	0,16 $\pm$ 0,02 (7)
Миокардит	156 $\pm$ 16 (15)	1,9 $\pm$ 0,2 (6)	1454 $\pm$ 146 (11)	0,23 $\pm$ 0,03* (5)
Миокардит + 5'-ГМФ	77 $\pm$ 10 (7)	1,7 $\pm$ 0,1* (6)	964 $\pm$ 123 (11)	0,16 $\pm$ 0,03 (7)
Интактные + 5'-ГМФ	174 $\pm$ 36 (5)	1,9 $\pm$ 0,1 (5)		0,13 $\pm$ 0,04 (5)



адрениновым миокардитом 5'-ГМФ способствует задержке восстановления уровня гликогена в сердце (табл. 2), что может быть результатом более продолжительного периода активации гликолиза вследствие увеличения под влиянием 5'-ГМФ количества НАД и его доступности для реакции оксидоредукции [3]. Количество молочной кислоты и общая активность ЛДГ при этом не изменяются.

Известно, что ПВК, образуемая в сердце анаэробным путем из гликогена, в дальнейшем окисляется при участии ферментного комплекса пируватдекарбоксилазы [7]. При адрениновом миокардите наблюдается торможение декарбоксилирования ПВК [2], что приводит к накоплению пирувата в ткани (см. табл. 2). При введении 5'-ГМФ отмечается уменьшение количества ПВК, что может быть связано с усилением декарбоксилирования ПВК в связи с увеличением содержания в ткани НАД как одного из коферментов пируватдекарбоксилазного комплекса.

Таким образом, 10-дневный курс введения 5'-ГМФ при адрениновом миокардите вызывает положительные сдвиги в аэробной и анаэробной фазах биологического окисления, что выражается в восстановлении синтеза НАД и активации гликолиза.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бельский М. Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. — Л., 1963.
2. Бойко С. С. // *Вопр. мед. химии.* — 1969. — Т. 15. — С. 373—377.
3. Гроздова М. Е., Северин С. Е. // *Моделирование заболеваний.* — М., 1973. — С. 202—223.
4. Денисов В. М., Рукавишников С. М., Горбач Г. В. // *Актуальные вопросы обмена веществ.* — Вильнюс, 1987. — С. 87—88.
5. Елисеев В. В. // *Хим.-фарм. журн.* — 1987. — № 5. — С. 519—523.
6. Инструкция к набору химических реактивов для определения глюкозы в биологических жидкостях о-толуидиновым методом, утвержденная Министерством здравоохранения. М. — 1972.
7. Ленинджер А. // *Биохимия.* — М., 1974. — С. 397—401.
8. Прохорова М. И. // *Методы биохимических исследований.* — Л., 1982. — С. 161—165.
9. Прохорова М. И. // Там же. — С. 190—192.
10. Прохорова М. И. // Там же. — С. 200—202.
11. Северин С. Е., Цейтлин Л. А. // *Вопр. мед. химии.* — 1964. — Т. 10, № 3. — С. 300—305.
12. Фетисова Т. В., Фролькис Р. А. *Биохимия инфаркта миокарда.* — 1976. — С. 51—52.
13. Bergmeyer H. U., Berth E., Hess B. // *Methods of Enzymatic Analysis.* — New York, 1965. — P. 763—743.
14. Good C. A., Gramer H., Somogyi M. // *J. biol. Chem.* — 1933. — Vol. 2. — P. 485—497.
15. Hohorst H. Y. // *Methoden der enzymatischen Analyse.* — Berlin, 1970. — Bd 2. — S. 1425—1429.
16. Lamprecht W., Tranlschold J. // *Methods of Enzymatic Analysis.* — New York, 1974. — Vol. 4. — P. 2101—2109.
17. Lowry O. H., Rosebrough N. I., Farr A. L., Randall R. I. // *J. biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
18. Pleuffer T. // *Ibid.* — 1977. — Vol. 252. — P. 7224—7234.

Поступила 30.01.89

#### EFFECT OF GUANOSINE-5'-MONOPHOSPHATE ON METABOLISM IN RATS WITH MYOCARDITIS

V. M. Prokopenko, V. V. Slobodskaya, E. V. Shapot, V. V. Eliseev

All-Union Research Technological Institute of Antibiotics and Enzymes of Medical Use, Leningrad

Ten days course of 5'-GMP intramuscular administration at a dose of 25 mg/kg into rats with adrenaline-produced myocarditis led to normalization of NAD content in myocardial

tissue which contributed to restoration of NAD-dependent isocitrate dehydrogenase activity. During the 5'-GMP administration content of ATP and creatine phosphate was kept at the same low level as compared with controls, while restoration of glycogen content was retarded in the heart muscle. Activity of lactate dehydrogenase and lactic acid content were not altered. The decrease in content of pyruvic acid detected in response to 5'-GMP administration may occur due to elevated decarboxylation of pyruvate as a result of NAD content increase in heart muscle.

© О. К. Кульчицкий, Д. А. Ефимов, 1990

УДК 616.127-008.61 + 616.127-007.61 - 07:616.153.857.7\*118.5

О. К. Кульчицкий, Д. А. Ефимов

#### СИСТЕМА ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ ПРИ ГИПЕРФУНКЦИИ И ГИПЕРТРОФИИ МИОКАРДА У КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА

Институт геронтологии АМН СССР, Киев

Роль циклических нуклеотидов (ЦН) в регуляции метаболизма и сократительной активности сердца широко известна [15]. Именно через систему ЦН обеспечиваются адекватная нейрогормональная регуляция деятельности сердца [8], реализация механизмов адаптации при различных функциональных и экспериментальных воздействиях [2], в частности при развитии гипертрофии [17]. Ранее было показано, что у старых животных значительно изменяется нейрогормональная регуляция активности циклазной системы миокарда [1, 5], что соответствует значительным структурным, метаболическим и функциональным изменениям сердца в старости [10]. Поэтому представлялось целесообразным изучить особенности функционирования системы ЦН миокарда крыс разного возраста при гипертрофии и гиперфункции сердца.

**Методика.** Гипертрофию сердца воспроизводили путем коарктации брюшной аорты [4]. В гомогенатах миокарда определяли содержание цАМФ и цГМФ радиоинтерферентным методом [11] с помощью наборов фирмы «Amersham» (Англия). Активность фосфодиэстеразы (ФДЭ) определяли с помощью нисходящей хроматографии на бумаге [3]. Активность гуанилатциклазы (ГЦ) изучали в среде инкубации (общий объем 0,3 мл) состава (в ммоль/л): трис — 40, теофиллин,  $MgCl_2$  — 7, ГТФ — 1, креатинфосфат (КФ) — 20 (рН 7,4), креатинфосфокиназа (КФК) — 1 мг/мл. Активность аденилатциклазы (АЦ) определяли в плазматических мембранах миокарда, полученных по методу [12]. Среда инкубации для определения активности фермента общим объемом 0,15 мл включала (в ммоль/л): трис — 50, ЭДТА — 1, дигитонин — 1, теофиллин — 5, KCl — 10,  $MgCl_2$  — 5, КФ — 20, КФК — 1 мг/мл (рН 7,4). Реакцию проводили в течение 15 мин при 30 °С и останавливали кипячением. Денатурированный белок удаляли центрифугированием. Об активности ферментов судили по приросту цАМФ и цГМФ. Количество белка в пробах определяли методом [13]. Сократительную функцию изолированной папиллярной мышцы миокарда изучали в изометрическом и изотоническом режимах работы.

Полученные данные обработаны методами вариационной статистики с применением критерия Стьюдента и анализа корреляционных связей.

**Результаты и обсуждение.** Исследования показали наличие значительных изменений в системе ЦН, выраженность которых определяется возрастом животных и стадией гипертрофии. Как видно из таблицы, в аварийной стадии у животных обеих возрастных групп наблюда-

# Влияние коарктации аорты (4—6 сут) на аденилатциклазную систему миокарда крыс разного возраста

Животные	Статистический показатель	Контроль				Коарктация аорты			
		цАМФ	АЦ			цАМФ	АЦ		
			базальная	+адреналин	+фтористый натрий		базальная	+адреналин	+фтористый натрий
Взрослые	$M \pm m$	$885 \pm 57$	$16,0 \pm 1,2$	$21,5 \pm 1,8$	$30,2 \pm 2,4$	$545 \pm 38$	$14,4 \pm 1,0$	$16,7 \pm 1,4$	$29,8 \pm 2,5$
	$p$	—	—	$<0,05$	$<0,05$	$<0,05$	—	$<0,05$	$<0,05$
	$p_1$	—	—	—	—	—	—	—	—
Старые	$M \pm m$	$753 \pm 53$	$16,6 \pm 1,4$	$28,1 \pm 2,2$	$32,9 \pm 2,6$	$506 \pm 39$	$15,2 \pm 1,3$	$19,1 \pm 1,6$	$34,1 \pm 2,8$
	$p$	—	—	$<0,05$	$<0,05$	$<0,05$	—	$<0,05$	$<0,05$
	$p_1$	—	—	—	—	—	—	—	—
	$p_2$	—	—	$<0,05$	—	$<0,05$	—	$<0,05$	—

Примечание.  $p$  — по сравнению с базальной активностью АЦ,  $p_1$  — с контролем,  $p_2$  — с показателями взрослых животных. Содержание цАМФ приведено в пикомолях на 1 г ткани.

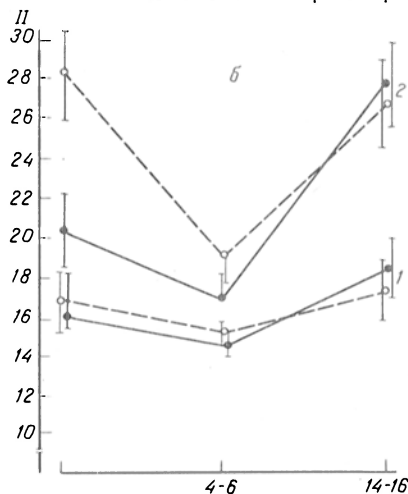
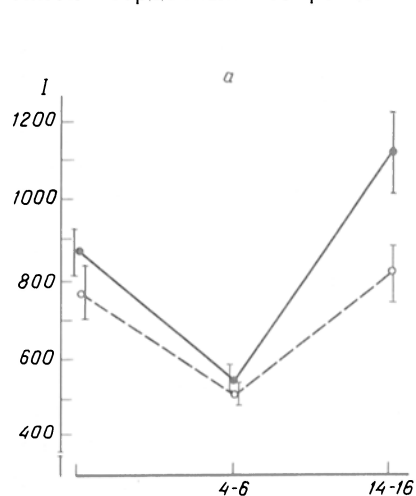
лось выраженное снижение уровня цАМФ в миокарде: на 38 % у взрослых и на 34 % у старых крыс. Кроме того, значительно снизилась адреналинстимулируемая активность АЦ, которая по сравнению с контролем у старых крыс составила 32 %, у взрослых — 23 %. Особенно наглядно это проявляется при сравнении величин, выражающих отношение стимулируемой и базальной активности АЦ. В контроле у взрослых крыс эта величина была равна  $1,30 \pm 0,10$ , у старых —  $1,72 \pm 0,14$  ( $p < 0,05$ ). В аварийной стадии это соотношение уменьшилось на 9 % ( $1,19 \pm 0,10$ ), у старых крыс — на 26 % ( $1,26 \pm 0,11$ ). Это свидетельствует о более значительных изменениях адреналинстимулируемой активности фермента у старых животных.

Иной характер носили изменения в системе ГЦ — цГМФ. У взрослых крыс достоверных изменений не отмечено. У старых крыс содержание цГМФ возросло (в контроле  $24,5 \pm 2,0$  нмоль на 1 г ткани, в опыте  $34,9 \pm 2,6$  нмоль/г), что обусловлено повышением активности ГЦ (в контроле  $17,8 \pm 1,3$  нмоль на 1 мг белка за 1 мин, в опыте  $23,2 \pm 1,6$  нмоль на 1 мг белка за 1 мин;  $p < 0,05$ ). Таким образом, в аварийной стадии отмечается падение содержания цАМФ у взрослых и старых крыс, более значительное снижение адреналинстимулируемой активности АЦ у старых животных, повышение концентрации цГМФ и активности ГЦ также у старых крыс. Изменений активности ФДЭ не обнаружено. В эти же сроки установлена достоверная корреляционная связь между силой сердечных сокращений и содержанием

цАМФ как у взрослых ( $r=0,77$ ), так и у старых ( $r=0,59$ ) животных. Кроме того, у старых крыс выявлена положительная корреляция между скоростью расслабления и адреналинстимулируемой активностью АЦ ( $r=0,75$ ).

Иные закономерности обнаружены в стадии выраженной гиперфункции и гипертрофии миокарда, особенно при сравнении сдвигов показателей АЦ в зависимости от срока после коарктации аорты (см. рисунок). Так, у взрослых животных отмечено значительное повышение содержания цАМФ и стимулируемой активности АЦ. В результате этого они оказались достоверно выше по сравнению не только с показателями в аварийной стадии, но и с контрольными величинами. У старых крыс эти показатели изменялись не столь значительно и достигали лишь уровня контроля. Кроме того, у последних наблюдалось некоторое снижение активности ГЦ и уровня цГМФ.

Выявленные возрастные особенности изменений системы ЦН могут определять особенности приспособления старого сердца к повышенной нагрузке. Известно, что в аварийной стадии у старых крыс в отличие от взрослых отмечается снижение сердечного индекса, индекса сократимости, развивается сердечная недостаточность [9]. В эти же сроки у старых животных значительно снижается адреналинстимулируемая активность АЦ. Вследствие этого будет ослабляться адренергический контроль за деятельностью сердца, нарушаться кальциевый обмен, реализация ионотропных эффектов катехоламинов. Вторым существенным фактором, влияющим на функцию



Изменения содержания цАМФ и активности АЦ в миокарде крыс разного возраста после коарктации аорты.

По оси абсцисс — дни после коарктации аорты; по оси ординат: а — содержание цАМФ (в пмоль на 1 г ткани); б — активность АЦ (в нмоль цАМФ на 1 мг белка за 1 мин). 1 — базальная активность АЦ, 2 — адреналинстимулируемая. Сплошная линия — взрослые, пунктирная — старые крысы.

сердца у старых крыс, является повышение уровня цГМФ в аварийной стадии. цГМФ не только снижает частоту и силу сердечных сокращений [14], но и препятствует развитию ионотропных эффектов катехоламинов [16]. Следовательно, сочетанное воздействие двух указанных факторов может в достаточной степени лимитировать сократительную функцию старого сердца в условиях гиперфункции. Снижение адреналинстимулируемой активности АЦ при гиперфункции сердца, не связанное с возрастом, было обнаружено и в других исследованиях [7]. Полагают, что в процессе формирования компенсаторной гипертрофии вследствие повышения уровня катехоламинов в сердце развивается десенситизация АЦ. Согласно этой точке зрения, более выраженное падение стимулируемой активности АЦ у старых крыс может быть обусловлено более значительным повышением содержания катехоламинов в сердце в аварийной стадии [9].

Взаимосвязь между сдвигами в системе ЦН и возрастными особенностями развития гипертрофии прослеживается и на 14–16-й день после коарктации аорты. У старых животных в этот срок показатели сократительной функции сердца лишь приближаются к контрольным, а гипертрофия выражена в гораздо меньшей степени, чем у взрослых [9]. Это соответствует сдвигам в системе АЦ — цАМФ. В то же время значительное увеличение содержания цАМФ у взрослых животных может являться пусковым звеном для стимуляции генетического аппарата клеток, лежащего в основе гипертрофии [6]. Следовательно, различия в реакциях системы ЦН миокарда на повышенную нагрузку во многом определяют степень развития гипертрофии. Таким образом, направленность и выраженность изменений циклазной системы в зависимости от срока после коарктации аорты соответствуют метаболическим и функциональным изменениям в деятельности сердца и во многом определяют возрастные особенности приспособления сердца к большим нагрузкам в старости.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Богацкая Л. П., Кульчицкий О. К. // Вести. АМН СССР.— 1986.— № 10.— С. 15—20.
2. Дорофеев Г. И., Кожемякин Л. А., Ивашкин В. Т. Циклические нуклеотиды и адаптация организма.— М., 1978.
3. Животова Н. И., Филиппович И. В., Романцев Е. Ф. // Докл. АН СССР.— 1975.— Т. 222.— С. 736—737.
4. Коган А. Х. // Бюл. exper. биол.— 1961.— № 1.— С. 112—115.
5. Кульчицкий О. К. // Вопр. мед. химии.— 1985.— № 4.— С. 91—93.
6. Меерсон Ф. З. Адаптация сердца к большой нагрузке и сердечная недостаточность.— М., 1975.
7. Мирошниченко В. П., Зубовская А. М., Григоронич Ю. А. и др. // Вопр. мед. химии.— 1981.— № 1.— С. 112—115.
8. Сорокин Л. В. // Успехи физиол. наук.— 1980.— № 1.— С. 120—139.
9. Фролькис В. В., Безруков В. В., Шевчук В. Г. Кровообращение и старение.— Л., 1984.
10. Frolkis V. V., Bogatskaya L. N., Stupina A. S., Shevchuk V. G. // Amer. Heart J.— 1977.— Vol. 93, N 3.— P. 334—348.
11. Gilman G., Murad F. // Meth. Enzymol.— 1974.— Vol. 38.— P. 49—61.
12. Maguire M. E., Ardsdale P. M. van, Gilman A. // Molec. Pharmacol.— 1976.— Vol. 12, N 3.— P. 335—339.
13. Markwell M., Haas S. M., Rieber L. L., Jolbert V. E. // Analyt. Biochem.— 1978.— Vol. 87, N 1.— P. 206—210.
14. Singh J., Plitney F. W. // Biochem. Pharmacol.— 1981.— Vol. 30.— P. 1475—1481.

15. Venter J. C. // Neurotransmitt. Recept.— 1981.— Vol. 1.— P. 213—347.
16. Watanabe A. M., Besch H. R. // Circulat. Res.— 1975.— Vol. 37, N 3.— P. 309—317.
17. Zimmer H.-G., Peller H. // Basic Res. Cardiol.— 1986.— Vol. 81, Suppl. 1.— P. 127—137.

Поступила 30.01.89

#### THE SYSTEM OF CYCLIC NUCLEOTIDES UNDER CONDITIONS OF MYOCARDIUM HYPERFUNCTION AND HYPERTROPHY IN RATS OF VARIOUS AGE

O. K. Kulchitsky, D. A. Efimov

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

Simulation of myocardial hyperfunction and hypertrophy in rats exhibited the age- and hypertrophy step-dependent alterations in the system of cyclic nucleotides. Significant activation of the HC-cGMP system, decrease in content of cAMP and stimulation of the AC activity were detected in old animals at the emergency step. At the later steps content of cAMP and the AC stimulated activity were increased more distinctly in adult rats as compared with old animals. These alterations were responsible for age-related peculiarities of myocardial contractility at the emergency step as well as for development of hypertrophy at the later steps. The cyclase system appears to facilitate the age-related adaptation of myocardium to overloading during the old age.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.248-053.2-07:616.155.3-008.939.631

А. А. Герасимов, И. И. Балаболкин, М. И. Баканов

#### ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНЫ ЛЕЙКОЦИТОВ ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ У ДЕТЕЙ

НИИ педиатрии АМН СССР, Москва

В процессе развития аллергической реакции происходят существенные изменения компонентов соединительной ткани. Показано, что при анафилактическом шоке значительно снижается содержание гексозаминов в легочной ткани [10].

Имеются сообщения о состоянии метаболитов соединительной ткани при бронхиальной астме. Так, выявлено повышение уровня нейраминовой и сиаловых кислот в мокроте в периоде обострения болезни [9]. Их содержание увеличивается и в сыворотке крови больных бронхиальной астмой [11]. При инфекционно-аллергической астме обнаружено повышение концентрации орозомукоида и гаптоглобина в крови. Отмечено увеличение активности гиалуронидазы в сыворотке крови детей с бронхиальной астмой [5]. При бронхиальной астме и атопическом дерматите у детей повышается экскреция с мочой оксипролина, кислых мукополисахаридов и, в частности, гиалуроновой кислоты и хондроитин-сульфатов [2, 3, 7].

Главным компонентом межклеточного матрикса соединительной ткани являются гликозаминогликаны (ГАГ). Установлено, что они также входят в состав лейкоцитов крови [16, 18].

Учитывая отсутствие работ по изучению уровня ГАГ в лейкоцитах при аллергических заболеваниях у детей, мы исследовали содержание ГАГ в лимфоцитах и нейтрофилах у детей с бронхиальной астмой в разные периоды заболевания.

**Методика.** Обследовано 56 детей от 3 до 15 лет, больных бронхиальной астмой: 19 детей с атоической и 37 со смешанной формой болезни. Большинство больных (77 %) обследованы в межприступном периоде заболевания. Преобладали дети со среднетяжелым течением болезни (68 %). У большинства больных (73 %) длительность бронхиальной астмы превышала 3 года. Наиболее часто (у 86 % детей) выявлялась поливалентная сенсibilизация к неинфекционным аллергенам.

Содержание ГАГ в лейкоцитах изучали по уровню входящих в их состав гексуроновых кислот (ГК), гексозаминов-(ГА) и гексоз (Г). Для оценки качественного состава ГАГ вычисляли карбазол-орциновый коэффициент (К/О).

Лимфоциты и гранулоциты выделяли из периферической крови по методике, описанной ранее [4]. Суспензии клеток размельчали в гомогенизаторе типа Поттера — Эльвейма с тефлоновым пестиком («В. Braun Melsungen AG», ФРГ) в течение 3 мин при скорости вращения 3000 об/мин с поступательными движениями пестика.

Для определения ГА гидролиз гомогенатов клеток проводили в течение 6 ч на кипящей водяной бане при 100 °С в 6 н. соляной кислоте [13]. К 5 мл гидролизата после нейтрализации прибавляли 2 мл 2 % раствора ацетилацетона («Fluka», Швейцария) в 0,5 н. растворе  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  и проводили ацетилирование в закрытой пробирке в течение 20 мин на кипящей водяной бане. К охлажденной пробе добавляли 2 мл реактива Эрлиха (1,6 г пара-диметиламинобензальдегида — «Fluka» в смеси с 60 мл концентрированной соляной кислоты и 60 мл 96 % этанола), встряхивали и через 45 мин измеряли оптическую плотность при 530 нм. Калибровочную кривую строили со стандартным раствором глюкозамингидрохлорида («Serva», ФРГ).

Для определения содержания Г применяли модифицированный антроновый метод [6]. Использовали 20-минутный гидролиз гомогенатов клеток в 0,5 н. соляной кислоте при 100 °С. К 0,5 мл гидролизата при очень тщательном охлаждении во льду прибавляли 5 мл антронового реактива (2,5 объема концентрированной серной кислоты и 1 объем воды и антрон — «Serva» для получения 0,2 % раствора; реактив готовили во льду непосредственно перед употреблением). Пробу нагревали 5 мин на кипящей водяной бане, охлаждали во льду и измеряли оптическую плотность при 620 нм. Калибровочную кривую строили с помощью эквимоллярной смеси галактозы и маннозы («Serva»).

Для определения содержания ГК гомогенаты лейкоцитов гидролизовали на кипящей водяной бане при 100 °С с 0,5 н. соляной кислотой в течение 20 мин [6].

Карбазоловый метод [12] применяли в модификации [8]. Для этого к 1 мл гидролизата прибавляли при охлаждении во льду 5 мл концентрированной серной кислоты, содержащей 0,025 М кристаллического тетраборнокислого натрия. После перемешивания во льду пробу нагревали 10 мин на кипящей водяной бане и снова охлаждали. Прибавляли 0,2 мл 0,125 % раствора карбазола в абсолютном этаноле и вновь нагревали пробу на кипящей водяной бане в течение 15 мин. После охлаждения измеряли оптическую плотность при 530 нм. Калибровочную кривую строили со стандартным раствором D-глюкуроновой кислоты («Serva»).

Орциновый метод применяли по [17]. К 1 мл гидролизата прибавляли при охлаждении во льду 2 мл серной кислоты удельного веса 1,84, содержащей 0,2 % орцина («Merck», ФРГ) и нагревали пробу 20 мин на водяной бане при 80 °С. После охлаждения измеряли оптическую плотность при 505 нм. Калибровочную кривую строили со стандартным раствором D-глюкуроновой кислоты («Serva»).

Содержание белка в клетках крови определяли по методу [15] с предварительной обработкой 0,5 % дезоксихолатом натрия в 0,1 н. NaOH.

Статистическую обработку данных производили на ЭВМ «LAVTAM» с применением пакета программ «Microstat» (Австралия).

**Результаты и обсуждение.** У здоровых детей (контрольная группа) содержание ГК было примерно одинаковым в 2 популяциях клеток, уровень Г и ГА в лимфоцитах был выше, чем в нейтрофилах (табл. 1). В лимфоцитах здоровых детей К/О был ниже 1, что свидетельствует о преобладании ГАГ, содержащих идуруновые кислоты (дерматан-сульфат). В гранулоцитах здоровых детей К/О был значительно больше единицы ( $1,76 \pm 0,22$ ), что указывает на преобладание ГАГ,

содержащих глюкуроновые кислоты (гиалуроновая кислота, хондроитин-4-и-6-сульфаты, гепаран-сульфат, гепарин). Эти результаты согласуются с данными литературы. Было показано, что нейтрофилы у взрослых людей содержат преимущественно хондроитин-4-сульфат, гиалуроновую кислоту и гепаран-сульфат [16].

Нами не выявлено зависимости изменений ГАГ в лейкоцитах от формы бронхиальной астмы у детей. Максимальные различия показателей отмечены в разные периоды болезни.

В межприступном периоде бронхиальной астмы происходило достоверное повышение содержания ГК, Г и ГА в лимфоцитах в сравнении с группой здоровых детей. При этом достоверно возрастал К/О; его значение больше единицы ( $1,26 \pm 0,15$ ) свидетельствует о преобладании в лимфоцитах у детей в периоде ремиссии заболевания ГАГ, содержащих преимущественно глюкуроновые кислоты. В нейтрофилах в периоде ремиссии также отмечена тенденция к увеличению содержания ГК, Г и ГА, а К/О практически не изменялся.

Период обострения бронхиальной астмы у детей характеризовался достоверным снижением уровня ГК и К/О в лимфоцитах в сравнении с периодом ремиссии и тенденцией к снижению содержания Г и ГА. Однако содержание ГК, Г и ГА оставалось недостоверно повышенным в сравнении с показателями здоровых детей. При этом К/О становился меньше единицы, что свидетельствует об изменении качественного состава ГАГ лимфоцитов в период обострения болезни в сторону преобладания ГАГ, содержащих идуруновые кислоты. В периоде приступов бронхиальной астмы в полиморфноядерных клетках достоверно снижалось содержание ГК, ГА и К/О в сравнении с периодом ремиссии, причем эта динамика была настолько выраженной, что уровень ГК и К/О становились даже достоверно меньше, чем в контроле. Динамика качественного состава ГАГ в нейтрофилах в периоде обострения была сходна с таковой в лимфоцитах, т. е. происходило накопление ГАГ, содержащих в основном идуруновые кислоты.

Изменения ГАГ в лейкоцитах, по-видимому, связаны со значительной активацией лизосомного аппарата, что приводит к усилению их катаболизма. Так, нами установлено повышение активности лизосомных гликозидаз  $\beta$ -галактозидазы, N-ацетил- $\beta$ -D-галактозаминидазы (N-АГА) и N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминидазы (N-АГ) в лимфоцитах и фагоцитах детей с бронхиальной астмой. Подтверждением этого могут служить выявленные в лимфоцитах больных детей отрицательные взаимосвязи между N-АГА и Г и между N-АГ и ГА, а в гранулоцитах — обратные корреляции Г с 3 изучавшимися ферментами и между N-АГА и ГА. Кроме того, существует и обратная связь — ГАГ регулируют активность ферментов, образуя с ними комплексы в первичных лизосомах и ингибируя их активность [14]. Изменения содержания ГАГ в клетках крови, по-видимому, также сказываются на функциональном состоянии лейкоцитов детей с бронхиальной астмой, хотя патофизиологическое значение разных фракций ГАГ в этих клетках не известно.

У 14 детей с бронхиальной астмой в периоде приступа болезни и после приступа мы изучали влияние селективного стимулятора  $\beta_2$ -адреноре-

Таблица 1

Содержание ГАГ в лейкоцитах детей в зависимости от периода бронхиальной астмы ( $M \pm m$ )

Период болезни	Лимфоциты				Нейтрофилы			
	ГК, мкмоль/мг	Г, мкмоль/мг	ГА, нмоль/мг	К/О	ГК, мкмоль/мг	Г, мкмоль/мг	ГА, нмоль/мг	К/О
1. Ремиссия ( $n=43$ ) $p$	$5,27 \pm 0,45$ $<0,001$	$15,93 \pm 1,82$ $<0,05$	$1355,53 \pm 219,94$ $<0,05$	$1,26 \pm 0,15$ $<0,01$	$3,64 \pm 0,39$ —	$7,83 \pm 1,71$ —	$821,82 \pm 142,7$ —	$1,8 \pm 0,10$ —
2. Обострение ( $n=13$ ) $p$ $p_{1-2}$	$3,61 \pm 0,54$ — $<0,05$	$12,57 \pm 1,91$ — —	$1135,18 \pm 1315$ — —	$0,69 \pm 0,1$ — $<0,01$	$1,71 \pm 0,29$ $<0,05$ $<0,001$	$5,49 \pm 2,3$ — —	$455,99 \pm 108,89$ — $<0,05$	$0,94 \pm 0,33$ $<0,05$ $<0,05$
Контрольная группа ( $n=17$ )	$2,88 \pm 0,48$	$9,84 \pm 1,88$	$858,21 \pm 112,34$	$0,73 \pm 0,08$	$2,84 \pm 0,46$	$6,25 \pm 1,39$	$501,77 \pm 121,23$	$1,76 \pm 0,22$

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3  $p$  — в сравнении с контрольной группой (здоровые дети).

Таблица 2

Содержание ГАГ в лейкоцитах детей с бронхиальной астмой на фоне лечения кленбутеролом ( $M \pm m$ )

Период обследования	Лимфоциты				Нейтрофилы			
	ГК, мкмоль/мг	Г, мкмоль/мг	ГА, нмоль/мг	К/О	ГК, мкмоль/мг	Г, мкмоль/мг	ГА, нмоль/мг	К/О
1. До лечения ( $n=14$ ) $p$	$3,87 \pm 0,44$ —	$13,15 \pm 1,93$ —	$1162,45 \pm 148,64$ —	$0,71 \pm 0,09$ —	$2,38 \pm 0,38$ —	$4,48 \pm 1,4$ —	$448,46 \pm 106,91$ —	$0,97 \pm 0,31$ $<0,05$
2. После лечения ( $n=14$ ) $p$ $p_{1-2}$	$5,62 \pm 0,52$ $<0,001$ $<0,05$	$19,67 \pm 2,06$ $<0,01$ $<0,05$	$1789,91 \pm 223,67$ $<0,001$ $<0,05$	$0,98 \pm 0,1$ — —	$5,97 \pm 0,55$ $<0,001$ $<0,001$	$6,18 \pm 1,76$ — —	$600,94 \pm 127,25$ — —	$2,57 \pm 0,58$ — $<0,05$
Контрольная группа ( $n=17$ )	$2,88 \pm 0,48$	$9,84 \pm 1,88$	$858,21 \pm 112,34$	$0,73 \pm 0,08$	$2,84 \pm 0,46$	$6,25 \pm 1,39$	$501,77 \pm 21,23$	$1,76 \pm 0,22$

Таблица 3

Содержание ГАГ в лейкоцитах детей с бронхиальной астмой на фоне лечения тактивином ( $M \pm m$ )

Период обследования	Лимфоциты				Нейтрофилы			
	ГК, мкмоль/мг	Г, мкмоль/мг	ГА, нмоль/мг	К/О	ГК, мкмоль/мг	Г, мкмоль/мг	ГА, нмоль/мг	К/О
1. До лечения ( $n=14$ ) $p$	$5,58 \pm 0,54$ $<0,001$	$13,28 \pm 1,95$ —	$1183,61 \pm 134,31$ —	$2,17 \pm 0,23$ $<0,001$	$4,11 \pm 0,44$ —	$7,04 \pm 1,36$ —	$869,53 \pm 146,32$ —	$2,12 \pm 0,31$ —
2. После лечения ( $n=14$ ) $p$ $p_{1-2}$	$4,46 \pm 0,48$ $<0,05$ —	$17,83 \pm 2,08$ $<0,01$ —	$1336,64 \pm 209,09$ — —	$1,6 \pm 0,18$ $<0,01$ —	$2,87 \pm 0,41$ — $<0,05$	$5,23 \pm 1,08$ — —	$757,31 \pm 134,99$ — —	$1,98 \pm 0,29$ — —
Контрольная группа ( $n=17$ )	$2,88 \pm 0,48$	$9,84 \pm 1,88$	$858,21 \pm 112,34$	$0,73 \pm 0,08$	$2,84 \pm 0,46$	$6,25 \pm 1,39$	$501,77 \pm 121,23$	$1,76 \pm 0,22$



центров кленбутерола (спиронента), эффект которого связан с повышением уровня цАМФ путем активации аденилатциклазы, на обструкцию бронхов и уровень ГАГ в лейкоцитах. Препарат использовали в виде сиропа из расчета 2 мкг на 1 кг массы тела в сутки на 3 приема в день (курс 4—7 дней). Действие препарата наступало через 20—30 мин после приема. Клинический эффект заключался в положительной динамике общего состояния детей, купировании приступов удушья, кашля, улучшении показателей функции внешнего дыхания. Полное исчезновение клинических признаков бронхоспазма наступало на 3—4-й день от начала лечения. У 64,3 % детей отмечено полное восстановление бронхиальной проходимости, у 28,6 % наблюдали уменьшение обструктивного синдрома и у 1 ребенка препарат был неэффективен. Кленбутерол хорошо переносился детьми, ни в одном случае не было отмечено побочных реакций.

В процессе лечения отмечали существенные изменения уровней ГАГ в лейкоцитах (табл. 2). До лечения у детей с бронхиальной астмой наблюдали незначительное повышение уровня ГК, Г и ГА в лимфоцитах в сравнении с группой здоровых детей; при этом К/О в этих клетках практически не отличался от нормы. В процессе терапии кленбутеролом достоверно повышалось содержание ГК, Г и ГА в лимфоцитах и наблюдалась тенденция к увеличению К/О. При этом возрастало отклонение данных показателей от нормы.

В нейтрофилах до назначения препарата уровень ГК, Г и ГА был незначительно снижен в сравнении с нормой, а К/О в отличие от нормы был меньше 1 ( $0,97 \pm 0,31$ ), что свидетельствует о наличии как количественных, так и качественных изменений ГАГ и появлении ГАГ, содержащих идуоновые кислоты. В ходе лечения кленбутеролом достоверно повышались уровень ГК и К/О в полиморфноядерных клетках и появлялась тенденция к накоплению Г и ГА. После лечения эти показатели превышали показатели здоровых детей, за исключением содержания Г в гранулоцитах, которое практически не отличалось от контроля. Кленбутерол изменял качественный состав ГАГ в нейтрофилах, повышая К/О и увеличивая в клетках процент ГАГ, содержащих глюкуроновые кислоты, преобладание которых характерно и для полиморфноядерных клеток здоровых детей. Динамика внутриклеточных ГАГ под влиянием препарата соответствует изменениям, наблюдающимся в периоде ремиссии, т. е. эффект кленбутерола в отношении содержания ГАГ можно расценить как благоприятный.

Было изучено влияние тимического иммуномодулятора тактивина на обмен ГАГ лейкоцитов у детей с бронхиальной астмой. Показано, что тактивин стимулирует Т-хелперы, нормализует соотношение между Т-хелперами и Т-супрессорами и активирует продукцию лимфокинов [1].

Препарат применен у 14 детей в межприступном периоде болезни. Все обследованные часто болели респираторно-вирусными инфекциями. У детей до назначения препарата определяли относительное количество Т-лимфоцитов методом Е-РОК. Лечение проводили под контролем показателей периферической крови, гуморального и клеточного иммунитета. Препарат вводили подкожно 1 раз

в сутки в дозе 1,5 мкг на 1 кг массы тела в течение 5 дней.

Применение тактивина оказывало положительное влияние на течение бронхиальной астмы, что выражалось в более быстром достижении ремиссии, улучшении общего самочувствия, сна, повышении аппетита. Отличные результаты были получены у 8 детей, хорошие — у 3, удовлетворительные — у 2, у 1 ребенка эффект отсутствовал.

В результате лечения происходила нормализация содержания ГК в нейтрофилах детей с бронхиальной астмой (табл. 3). Параллельно этому наблюдали тенденцию к повышению уровня Г и ГА в лимфоцитах и к снижению уровня ГК и К/О в лимфоцитах и уменьшению содержания Г, ГА и К/О в гранулоцитах. Следовательно, клинический эффект тактивина подтвержден его положительным влиянием на обмен ГК гранулоцитов.

Таким образом, можно предположить, что у детей с бронхиальной астмой изменение обмена ГАГ в лимфоцитах и гранулоцитах происходит вследствие нарушения баланса систем их синтеза и распада, что сочетается с увеличением активности разрушающих их лизосомальных гликозидаз. Бронхоспазмолитическая и иммуномодулирующая терапия дает определенный положительный эффект в отношении уровня внутриклеточных ГАГ, не нормализуя его полностью. С установлением патофизиологической роли разных фракций ГАГ лейкоцитов станет яснее значение выявленных нами изменений в развитии бронхиальной астмы у детей.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Арион В. Я. // Итоги науки и техники. Сер.: Иммунология.— М., 1982.— Т. 10.— С. 45—63.
2. Балаболкин И. И., Титаев А. А. // Педиатрия.— 1972.— № 7.— С. 9—12.
3. Балаболкин И. И., Юрков Ю. А., Гусева Е. Д. // Аллергические заболевания.— Саратов, 1978.— С. 92—95.
4. Герасимов А. А., Баканов М. И., Балаболкин И. И., Бершова Т. В. // Вопр. мед. химии.— 1988.— № 5.— С. 104—107.
5. Каганов С. Ю. Некоторые вопросы клиники и патогенеза бронхиальной астмы у детей: Дис. ... д-ра мед. наук.— М., 1965.
6. Слуцкий Л. И. Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани.— Л., 1969.
7. Юрков Ю. А., Балаболкин И. И., Королева Т. С. // Педиатрия.— 1981.— № 4.— С. 39—42.
8. Bitter T., Muir H. M. // *Analyt. Biochem.*— 1962.— Vol. 4.— P. 330—334.
9. Chlap Z., Stachura J., Sarnowska K. // *Acta med. pol.*— 1969.— Vol. 10, N 2.— P. 209—217.
10. Chyrek-Borowska S. // *Pol. med. J.*— 1968.— Vol. 7, N 1.— P. 202—206.
11. Chyrek-Borowska S., Kozłowska K., Zawistowski S. // *Pat. pol.*— 1967.— Vol. 28.— P. 301—313.
12. Dische Z. // *J. biol. Chem.*— 1947.— Vol. 167.— P. 189—198.
13. Elson L. A., Morgan W. T. J. // *Biochem J.*— 1933.— Vol. 27.— P. 1824.
14. Kaoru K., Yoshikatsu E., Kikumaro A. // *Clin. chim. Acta.*— 1978.— Vol. 85, N 2.— P. 151—157.
15. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. I. // *J. biol. Chem.*— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
16. Parmley R. T., Hurst R. E., Takagi M. et al. // *Blood.*— 1983.— Vol. 71, N 2.— P. 257—266.
17. Svennerholm L. // *J. Neurochem.*— 1956.— Vol. 1.— P. 42.
18. Vannuchi S., Fibbi G., Cappelletti R. et al. // *J. Cell Physiol.*— 1982.— Vol. 111.— P. 149—154.

Поступила 11.09.89

Content of hexuronic acids, hexoses and hexosamines was studied in lymphocytes and polymorphonuclear leukocytes of 56 children with bronchial asthma. The disease step-dependent alterations of the patterns studied were detected. Treatment of these children with bronchospasmolytic drug clenbuterol and with immunomodulator taktivine affected positively the bronchial asthma attack, which was followed by specific alterations in the carbohydrates content. Structural modifications of glycosaminoglycans in lymphocytes and phagocytes appear to be of importance for formation and development of allergic reactions in children with bronchial asthma.

как компонента соединительнотканного матрикса кроветворного костного мозга и костной ткани при лейкозе.

**Методика.** На аутопсийном, взятом не позднее 2—4 ч после смерти материале исследовали collagen I типа, выделенный из губчатой части кости грудины детей в возрасте от 9 мес до 14 лет с острым лимфобластным лейкозом, а также из костной ткани мышей высоколейкозной линии АКР-50 в фазе развернутого лейкоза. Контролем служили аналогичные препараты кости, полученные во время ортопедических вмешательств при травмах опорно-двигательного аппарата. В варианте нелеченого лейкоза исследовали collagen I типа кости и кожи мышей высоколейкозной линии АКР-50 в возрасте 9—10 мес. Для контроля использовали низколейкозную линию мышей С57BL. Препараты коллагена получали по методу [12]. Аминокислотный состав определяли на анализаторе типа ААА-881 после гидролиза проб в 6 н. HCl при 105 °C в течение 24 ч. Содержание углеводного компонента определяли после гидролиза в 2 н. HCl в течение 16 ч, используя антроновый реактив [15]. Электрофорез проводили в тонком слое полиакриламидного геля с градиентом концентрации 4,5—7,5 % [4]. Электрофореграммы получали сканированием гелей на микроденситометре ИТ-7608, используя светофильтры 550—560 нм. Количественный расчет проводили по весовому соотношению соответствующих зон электрофореграмм. Изофокусирование проводили в борат-полиольной системе [7]. Субъединичный состав изучали при высокоскоростной жидкостной хроматографии на ХЖ-1304 (СССР) на обращенной фазе. В качестве сорбента использовали «Seracon Six C<sub>18</sub>», размер частиц 5 мкм, размер колонки 0,32×15 см. Элюцию проводили в линейном градиенте концентрации метанола от 0 до 60 %. Элюент А — 0,1 % CH<sub>3</sub>COOH, элюент Б — 100 % метанол. На колонку наносили 50 мкл раствора, содержащего 250 мкг белка, скорость элюции 0,6 мл/мин. Гель-хроматографию осуществляли на ХЖ-1307 (СССР), используя колонку «Ultron-Pak-TSK-G-4000 SW» с предколонкой «Ultron-Pak-TSK-GSWP» фирмы I.K.B. Растворенный в 8 моль/л мочевины белок (200—250 мкг в объеме 50 мкл) наносили на колонку. Элюцию проводили в изократном режиме 0,05 моль/л трис-буфером, содержащим 2 моль/л мочевины и 0,1 моль/л NaCl. Скорость элюции 0,4 мл/мин в течение 4 ч. Детектирование спектрофотометрическое при 220 нм.

SLS-кристаллиты получали путем диализа 0,1 % раствора коллагена в 0,1 % растворе CH<sub>3</sub>COOH против 0,2 % раствора АТФ в 0,1 % CH<sub>3</sub>COOH. Контрастирование для электронно-микроскопического исследования проводили по методу [11].

**Результаты и обсуждение.** По электрофоретической подвижности в полиакриламидном геле с ДСН collagen костной ткани человека и мышей по наличию и соотношению  $\alpha_1$  и  $\alpha_2$ -цепей при лейкозе соответствует collagenу I типа (рис. 1). Однако аминокислотный состав (табл. 1) свидетельствует об их различии. Так, если при лейкозе соотношение Гли/Ала [10], Про/О-про [13] соответствует норме, то для соотношения О-про/О-лиз [9], отражающего определенные стадии постсинтетической модификации белка, этого не наблюдается. Углеводный компонент, являющийся интегральной частью молекулы, количественно от нормы не отличается (табл. 2). Адекватно указанным выше изменениям аминокислотного состава происходит сдвиг изоточек при фокусировании препаратов коллагена I типа (рис. 2). Так, у человека collagen кости в норме фокусируется двумя зонами и  $M \pm m$  для них составляет  $7,0 \pm 0,74$  и  $10,0 \pm 0,74$  при  $n=6$ , тогда как в развернутой фазе лейкоза изоточка одной из них сдвигается в сторону щелочных значений pH и  $M \pm m$  составляет  $10,9 \pm 0,12$  при  $n=12$ . У мыши для коллагена кости в норме значение pI составляет  $7,1 \pm 0,2$  и  $10,0 \pm 0,05$  ( $n=5$ ), тогда как при лейкозе наблюдается сдвиг до  $7,7 \pm 0,2$  и  $11,0 \pm 0,16$  соответственно при  $n=6$ . Для колла-

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.155.392-07:616-018.23-076

Т. Т. Володина, В. Д. Дроздова, Т. Н. Печенова, А. К. Шимановская, А. В. Нартиков, Н. А. Носаль, В. Б. Бойко, В. Г. Бебешко, М. Ф. Гулий

## ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ И СВОЙСТВ КОЛЛАГЕНА ПРИ ЛЕЙКОЗЕ

Институт биохимии им. А. В. Палладина АН УССР, Институт гематологии и переливания крови Минздрава УССР, Киев

В клинической картине острого лейкоза у детей костно-суставные нарушения занимают одно из ведущих мест и в 64 % случаев выявляются на ранних стадиях болезни. По мере прогрессирования лейкозного процесса частота костных нарушений достигает 87 %. Отмечено, что при лейкозе происходят существенные изменения в костной ткани. При этом структурные нарушения в виде многокомпонентных повреждений процесса минерализации кости развиваются на самых ранних, доклинических этапах формирования лейкоза [1].

На основе морфологических исследований (включая ультраструктуру) в развернутой фазе клинко-гематологических проявлений острого лейкоза у детей регистрируются глубокие и распространенные изменения стромы костного мозга [5]. Известно, что одним из основных компонентов стромы кроветворных органов являются коллагеновые структуры, относящиеся к группе твердых или структурных медиаторов [6]. Находясь в органах гемопоэза, кроветворные клетки подвергаются локальным короткодистантным воздействиям со стороны своего микроокружения, от которого зависит реализация дифференцировочных и пролиферативных возможностей гемопоэтических клеток-предшественников [8]. Общепризнано, что начальные изменения при лейкозе происходят в костном мозге, где в процессе лейкозогенеза клетки-предшественники утрачивают способность к дифференцировке и ответу на обычные регуляторные механизмы [2]. Кандидатом на роль одного из факторов дифференцировки считают именно коллагеновые структуры, непосредственно влияющие на метаболизм и дифференцировку клеток, с которыми они контактируют, в том числе стволовых клеток костного мозга [3].

Цель настоящей работы — изучение особенностей структуры и свойств молекулы коллагена

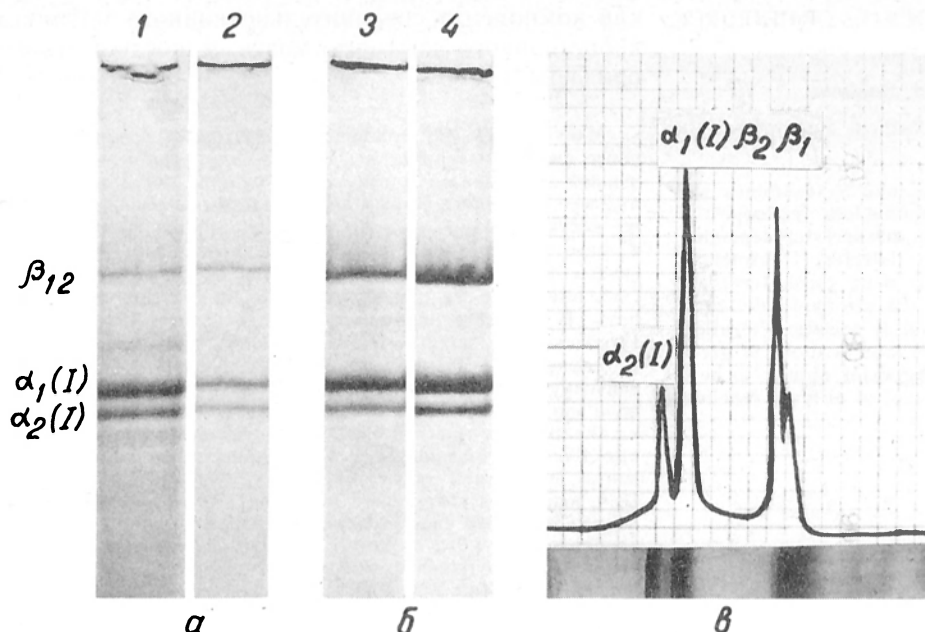


Рис. 1. Электрофореграммы препаратов коллагена в тонком слое полиакриламидного геля.

а — человек (кость): 1 — норма, 2 — лейкоз; б — мышь (кожа): 1 — норма, 2 — лейкоз; в — мышь (кость) — лейкоз. Соотношение  $\alpha_1(I)$ -и  $\alpha_2(I)$ -цепей составляет 2:1.

гена кожи ( $n=3$ ) рI составляет  $7,0 \pm 0,11$  и  $10,1 \pm 0,13$  в норме и  $7,0 \pm 0,01$  и  $10,8 \pm 0,2$  при лейкозе ( $n=6$ ).

Сравнительное фракционирование исследуемых препаратов методом обратноточной хроматографии (рис. 3) свидетельствует о различиях в гидрофобных свойствах молекулы коллагена кости в развернутой фазе лейкоза. У мышей линии АКР-50 этого не наблюдается. Гель-фильтрация (рис. 4), проведенная в условиях, исключающих ионное взаимодействие с носителем, указывает на значительные различия профилей элюции коллагена кости в норме и при лейкозе. По данным, полученным на аминокислотном анализаторе (см. табл. 1) и при электрофорезе с ДСН (см. рис. 1), разница в молекулярной массе при лейкозе не такая, чтобы отнести ее за счет измене-

ния размеров полипептидной цепи, как это можно было бы предположить по рис. 4. Возможно, в данном случае имеет место постсинтетическое взаимодействие молекулы коллагена с небелковыми компонентами (например, липидами), приводящее к увеличению гидрофобности, что могло бы быть причиной пространственной помехи при проведении гель-хроматографии.

Наличие SLS-кристаллитов свидетельствует, что способность молекул к латеральной агрегации при самосборке сохраняется, хотя ширина образующегося при лейкозе SLS-кристаллита значительно меньше, чем в норме (рис. 5). Причина такого формирования кристаллитов при данной патологии неясна, хотя по поперечной исчерченности (распределение полярных и неполярных локусов) они соответствуют коллагену I типа.

Таблица 1

Аминокислотный состав препаратов коллагена (в остатках на 1000 остатков;  $M \pm m$ )

Аминокислота	Человек (кость)		Мышь			
	норма ( $n=5$ )	лейкоз ( $n=14$ )	кость		кожа	
			норма ( $n=10$ )	лейкоз ( $n=10$ )	норма ( $n=12$ )	лейкоз ( $n=11$ )
Лиз	$28,28 \pm 0,52$	$28,15 \pm 0,65$	$39,09 \pm 0,38$	$30,60 \pm 0,78$	$30,72 \pm 1,18$	$31,75 \pm 1,19$
Гис	$6,78 \pm 0,43$	$5,75 \pm 0,23$	$4,73 \pm 0,24$	$3,69 \pm 0,28$	$5,33 \pm 0,41$	$5,35 \pm 0,37$
Арг	$47,71 \pm 1,75$	$45,67 \pm 0,73$	$48,30 \pm 0,61$	$47,91 \pm 0,81$	$44,56 \pm 0,91$	$46,00 \pm 1,05$
О-про	$97,50 \pm 3,73$	$122,09 \pm 3,40^*$	$98,93 \pm 1,38$	$99,37 \pm 3,61$	$100,26 \pm 2,78$	$108,00 \pm 2,48^*$
Асп	$41,25 \pm 1,25$	$55,41 \pm 1,04^*$	$38,83 \pm 0,80$	$38,69 \pm 1,50$	$41,53 \pm 1,74$	$44,39 \pm 3,41$
Тре	$17,64 \pm 0,95$	$16,57 \pm 0,27$	$24,05 \pm 0,58$	$21,91 \pm 0,53^*$	$25,46 \pm 0,97$	$25,14 \pm 1,60$
Сер	$31,13 \pm 0,38$	$30,92 \pm 0,47$	$38,23 \pm 1,43$	$39,95 \pm 1,11$	$45,25 \pm 0,73$	$44,46 \pm 0,90$
Глу	$75,54 \pm 1,67$	$73,81 \pm 0,86$	$97,51 \pm 1,30$	$85,65 \pm 2,92^*$	$80,56 \pm 2,86$	$82,06 \pm 2,53$
Про	$114,59 \pm 4,34$	$122,85 \pm 1,59$	$101,85 \pm 1,75$	$97,24 \pm 1,09^*$	$107,79 \pm 2,27$	$108,41 \pm 2,32$
Гли	$319,51 \pm 11,52$	$307,88 \pm 2,30$	$304,98 \pm 2,50$	$323,30 \pm 2,79^*$	$312,24 \pm 6,52$	$311,02 \pm 9,24$
Ала	$113,09 \pm 5,32$	$109,24 \pm 1,22$	$108,99 \pm 1,09$	$109,03 \pm 1,80$	$111,95 \pm 1,92$	$107,25 \pm 1,11^*$
Вал	$27,76 \pm 1,25$	$25,78 \pm 0,46$	$23,00 \pm 0,54$	$27,38 \pm 0,68^*$	$24,87 \pm 1,94$	$25,42 \pm 2,50$
Мет	$5,32 \pm 0,47$	$3,73 \pm 0,27$	$6,25 \pm 0,13$	$6,83 \pm 0,18$	$5,38 \pm 0,51$	$5,53 \pm 0,73$
И-лей	$10,90 \pm 0,39$	$9,76 \pm 0,18^*$	$13,73 \pm 0,26$	$13,18 \pm 0,49$	$13,37 \pm 1,22$	$13,91 \pm 1,79$
Лей	$26,59 \pm 0,89$	$24,93 \pm 0,67$	$27,88 \pm 0,16$	$30,90 \pm 0,67^*$	$32,79 \pm 1,57$	$29,05 \pm 1,56$
Тир	$5,09 \pm 0,24$	$5,14 \pm 0,13$	$4,81 \pm 0,24$	$6,21 \pm 0,34^*$	$7,29 \pm 0,79$	$7,40 \pm 1,05$
Фен	$15,19 \pm 1,60$	$12,92 \pm 0,26$	$11,94 \pm 0,22$	$14,59 \pm 0,41^*$	$14,44 \pm 0,91$	$15,27 \pm 1,10$
О-лиз	$4,17 \pm 0,88$	$3,69 \pm 0,09$	$6,71 \pm 0,08$	$7,89 \pm 0,26^*$	$4,16 \pm 0,17$	$4,07 \pm 0,46$
Гли/Ала	2,82	2,82	2,84	2,94	2,81	2,82
Про/О-про	1,18	0,93	1,03	0,98	1,08	1,04
О-про/О-лиз	23,4	29,8	14,8	12,6	24,05	26,8

\*  $p < 0,05$ .

Таблица 2

## Углеводный компонент молекулы коллагена (в %)

Условия исследования	Человек (кость)		Мышь			
	n	M±m	кость		кожа	
			n	M±m	n	M±m
Норма	7	2,14±0,26	6	1,67±0,07	12	2,45±0,12
Лейкоз	12	1,71±0,04	8	1,71±0,05	11	2,51±0,21

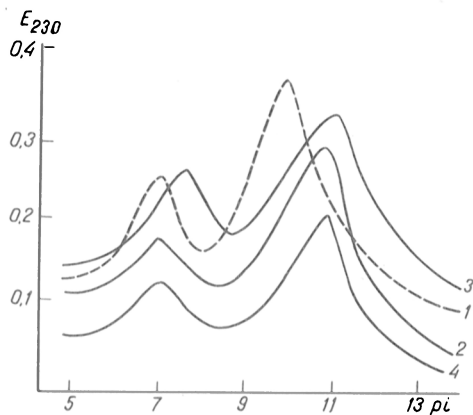


Рис. 2. Изофокусирование препаратов коллагена в борат-полиакриловой системе.

1 — норма — кость (человек), кожа (мышь); 2 — лейкоз — кость (человек); 3 — лейкоз — кость (мышь); 4 — лейкоз — кожа (мышь).

Вопрос о длине молекулы требует уточнения. Несмотря на упомянутые выше особенности структуры, зона высаливания препарата — 2,2 M NaCl характерна для коллагена I типа.

Итак, исследование коллагена — одного из компонентов внеклеточного матрикса кроветворного органа — дает основание предполагать причастность его к процессам нарушения нормальной дифференцировки кроветворных клеток на различных этапах формирования лейкоза. Osteoblastы в костной ткани и фибробласты в коже синте-

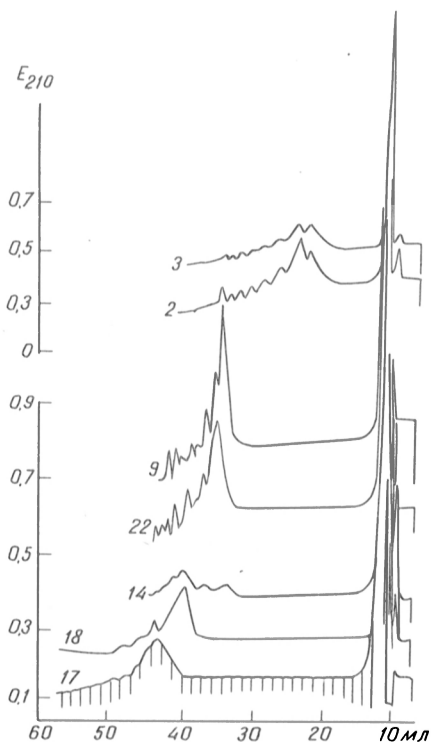


Рис. 3. Обратнo-фазная хроматография коллагена кости человека.

Перед нанесением на колонку пробы прогревали в элюенте при 40 °C на протяжении 30 мин. 2, 3 — норма; 9, 14, 17, 18, 22 — лейкоз.

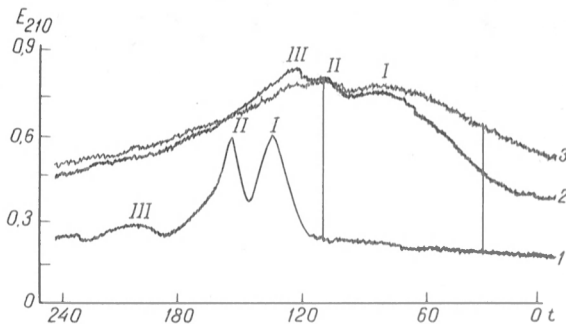


Рис. 4. Гель-фильтрация коллагена кости человека.

1 — норма; 2 — лейкоз; I — β-компоненты; II — α-компоненты; III — продукты деградации молекулы; t — время (в мин).

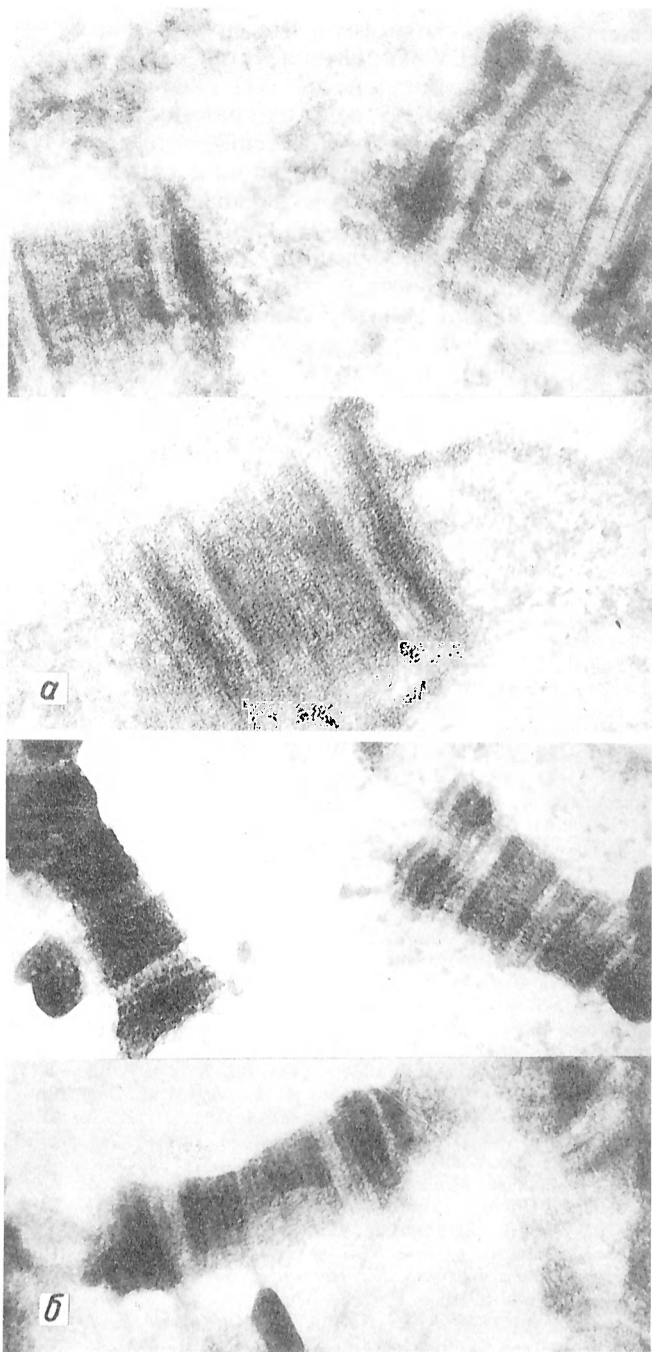


Рис. 5. SLS-кристаллиты препаратов коллагена мыши. а — норма; б — лейкоз. Электронный микроскоп ИИ-600 («Хитачи»). Ув. 100 000.

зируют транспортную форму молекулы с новыми, отсутствующими в норме свойствами, которая по выходе из клетки способна включаться в процессы фибриллообразования. Глубокие структурные модификации при лейкозе (несоответствие норме по аминокислотному составу, поверхностному заряду, гидрофобным свойствам) не могут не отразиться на фибриллогенезе. Известно, что структурный рисунок образующегося внеклеточного коллагенового каркаса, в котором как в сети располагаются кроветворные клетки, является одним из факторов их дифференцировки [3]. Не исключено, что изменение его узора [5] может быть одной из причин блока дифференцировки кроветворных клеток-предшественников. Проведенные исследования свидетельствуют о причастности коллагеновых структур к патогенезу спонтанного лейкоза. Следует отметить, что другая форма — лейкоз М-МЛV характеризуется интеграцией провируса в I интрон  $\alpha 1$  (I) коллагенового гена на расстоянии 19 п. н. от границы I экзона, что приводит к эмбриональной летали [14]. Полученные нами данные позволяют считать, что при остром лимфобластном лейкозе имеет место дефект процессинга, что может быть причиной нарушений в фибриллогенезе и взаимодействия клеточной поверхности с внеклеточным матриксом. Уместно напомнить, что контакт коллагена с различными клетками влияет на их дифференцировку и направленность биохимических процессов [3].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бебешко В. Г. Структурные и функциональные изменения костной и кроветворной ткани при развитии острого лейкоза: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Киев, 1981.
2. Бутенко З. А., Барановский М. А., Науменко О. И. // Лейкозные клетки, происхождение, ультраструктура, дифференцировка. — Киев, 1984. — С. 5.
3. Лебедев Д. А. // Успехи соврем. биол. — 1979. — Т. 88, № 1 (4). — С. 36—49.
4. Маурер Г. Диск-электрофорез. — М., 1971.
5. Настенко Е. П., Дроздова В. Д., Бебешко В. Г. // Всероссийский съезд гематологов и трансфузиологов, 2-й: Тезисы. — Челябинск, 1986. — С. 230—231.
6. Серов В. В., Шехтер А. Б. Соединительная ткань. — М., 1981. — С. 174.
7. Троицкий Г. В., Ажицкий Б. Ю. Изоэлектрическое фокусирование в самоорганизующихся искусственных pH-градиентах. — Киев, 1984. — С. 215.
8. Фриденштейн А. Я., Лурия Е. А. Клеточные основы кроветворного микроокружения. — М., 1980. — С. 9.
9. Blumenkrantz N., Asboe G., Hansen G. // Acta dermatovenereol. (Stockh.). — 1978. — Vol. 58, N 1. — P. 111—115.
10. Gella G., Tenni R., Castellani A. A. // Ital. J. Biochem. — 1979. — Vol. 28, N 2. — P. 163—244.
11. Kühn K., Egge M. // Biochem. Z. — 1966. — Bd 346. — S. 197—205.
12. Miller E. G., Martin G. R., Piez K. A., Powers M. J. // J. biol. Chem. — 1967. — Vol. 242, N 27. — P. 5481—5489.
13. Miller P. K., Lemmen G., Gay S., Meigel W. N. // Europ. J. Biochem. — 1975. — Vol. 59, N 1. — P. 97—104.
14. Schnike A., Harbers K., Jaenin R. // Nature. — 1983. — Vol. 304, N 5924. — P. 315—320.
15. Seifler S., Dayton S., Noreik B., Muntwyler E. // Arch. Biochem. — 1950. — Vol. 25, N 1. — P. 191—200.

#### COLLAGEN STRUCTURE AND PROPERTIES IN LEUKOSIS

T. T. Volodina, V. D. Drozdova, T. N. Pechenova, A. K. Shimanovskaya, A. V. Nartikov, N. A. Nosal, V. B. Boyko, V. G. Bebesheko, N. F. Guly

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Collagen I was isolated from human bone tissue and from mice bone tissue of the AKR-50 strain at the pronounced stage of leukosis. Dissimilarity of native and leukemic collagens was exhibited after evaluation of their amino acid composition, electrophoretic mobility in polyacrylamide gel containing SDS, content of the carbohydrate moiety as well as of isopoints, elution profiles in reverse-phase chromatography and gel filtration and electron microscopy of SLS-crystallites. Impairments of collagen processing in leukemia appear to be responsible for its alterations in structure and properties.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616-053.6-02:616.391-07:616.36-008.939.624

И. Н. Марокко, Г. Ю. Мальцев, В. В. Кржечковская, М. М. Гаппаров

#### ОСОБЕННОСТИ ОБНОВЛЕНИЯ МИКРОСОМАЛЬНЫХ ГЕМОПРОТЕИНОВ ПЕЧЕНИ МОРСКИХ СВИНОК В ДИНАМИКЕ ПИЩЕВОЙ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ

Институт питания АМН СССР, Москва

Функциональная сопряженность между системой микросомальных монооксигеназ печени и выраженностью проявлений реакций гиперчувствительности немедленного типа продемонстрирована экспериментальными исследованиями [1, 3, 7, 11] и проанализирована в ряде обзоров и монографий [2, 8, 9]. Однако механизмы изменения активности микросомальных монооксигеназ печени и содержания микросомальных гемопротенинов при развитии реакций гиперчувствительности остаются неизученными.

Одним из основных метаболических путей адаптации организма к неблагоприятным воздействиям является изменение скорости обновления ферментных белков [4, 14]. В связи с этим мы исследовали закономерности обновления микросомальных гемопротенинов: цитохрома P-450 и b<sub>5</sub>, а также активность микросомальных монооксигеназ в динамике экспериментальной пищевой сенсibilизации, осуществляемой белками с различными аллергенными свойствами.

Методика. Исследования выполнены на беспородных морских свинках-самцах с исходной массой 250—300 г, содержащихся на стандартном рационе вивария. Экспериментальную пищевую сенсibilизацию (ПС) и пищевую анафилаксию (ПА) вызывали, как описано ранее [13], к модельным пищевым белкам: куриному овальбумину — ОВА (5-кратно перекристаллизованному, производства Олайнского НИО «Биохимреактив») и бычьему сывороточному альбумину — БСА (производства Белорусского НИИ эпидемиологии и бактериологии), достоверно различающимся по аллергенным свойствам [13]. Состояние ПС оценивали *in vivo* по тяжести проявлений ПА, воспроизводимой через 1, 7, 14 и 21 сут после окончания перорального введения ОВА и БСА путем внутривенной инъекции разрешающих доз гомологичных белков в количестве 5 мг в 0,5 мл 0,9% раствора хлорида натрия. Животные контрольной группы получали равный объем растворителя. Тяжесть ПА оценивали по уровню летальности, числу судорожных проявлений и величине анафилактического индекса [21]. Статистическую достоверность различий тяжести ПА оценивали по методу углового преобразования Фишера [5].

Поступила 18.12.89



Проявление тяжести пищевой анафилаксии к ОВА и БСА при пищевой сенсибилизации

№ группы	Используемый белок	Срок сенсибилизации, дни	Число животных	Критерии тяжести пищевой анафилаксии		
				летальность, %	судороги, %	анафилактический индекс
1	ОВА	1	20	0	0	0
2	БСА		20	0	0	0
3	ОВА	7	25	52,0***.4	56,0***.4	3,00***.4
4	БСА		25	0	0	0
5	ОВА	14	30	33,3** .6	53,3** .6	2,64* .6
6	БСА		35	8,6	20,0	2,18
7	ОВА	21	24	50,0***.8	50,0***.8	2,80***.8
8	БСА		24	12,5	12,5	1,98

Примечание. Одна звездочка —  $p < 0,05$ , две —  $p < 0,01$ , три —  $p < 0,001$ , 4, 6, 8 — номера групп, по отношению к которым проводилось сравнение.

Таблица 2

Содержание цитохромов P-450 и  $b_5$  в печени при пищевой сенсибилизации ОВА и БСА ( $M \pm m$ ;  $n = 12$ )

Условия эксперимента	Срок сенсибилизации, дни	P-450	$b_5$	P-450	$b_5$
		нмоль на 1 г ткани		нмоль на 1 мг белка	
Контроль		37,8 ± 3,5	34,0 ± 3,2	1,13 ± 0,10	1,03 ± 0,09
Сенсибилизация ОВА	1	30,0 ± 2,8*	31,2 ± 2,8	0,90 ± 0,06*	0,91 ± 0,06
» БСА		27,6 ± 3,6*	21,4 ± 2,4**	0,97 ± 0,11	0,75 ± 0,08*
Контроль	7	36,8 ± 3,6	29,6 ± 3,0	1,16 ± 0,07	1,07 ± 0,10
Сенсибилизация ОВА		28,3 ± 2,4*	25,3 ± 2,1	0,95 ± 0,07*	0,80 ± 0,09*
» БСА	14	31,1 ± 5,3	35,2 ± 6,0	1,20 ± 0,04	1,38 ± 0,12
Контроль		34,3 ± 4,3	36,9 ± 4,7	1,05 ± 0,13	1,13 ± 0,13
Сенсибилизация ОВА	21	37,2 ± 1,9	40,1 ± 2,1	1,04 ± 0,08	1,12 ± 0,12
» БСА		38,6 ± 4,8	40,3 ± 5,0	1,14 ± 0,15	1,19 ± 0,11
Контроль	21	39,6 ± 1,4	29,1 ± 1,0	1,08 ± 0,11	0,99 ± 0,05
Сенсибилизация ОВА		47,6 ± 3,9*	68,4 ± 5,8**	1,54 ± 0,17**	2,27 ± 0,24**
» БСА		38,7 ± 2,1	40,4 ± 2,3**	1,27 ± 0,18	1,36 ± 0,15**

Примечание. Здесь и в табл. 3 и 4: одна звездочка —  $p < 0,05$ , две —  $p < 0,025$ .

В указанные сроки у контрольных и сенсибилизированных животных в гомогенате печени определяли содержание цитохрома P-450 по методу [18] на спектрофотометре «Спекорд». В микросомальной фракции печени, выделенной стандартной процедурой дифференциального центрифугирования, определяли содержание цитохромов P-450 и  $b_5$  методом [20], а также скорость  $n$ -гидроксилирования анилина и  $N$ -деметилирования аминопирина [6]. Белок определяли модифицированным методом Лоури [17]. Статистическую достоверность различий биохимических параметров оценивали по критерию Манна — Уитни [12].

Скорость обновления микросомальных гемопротеинов оценивали по кинетике включения 5-амино-4- $^{14}\text{C}$ -левулиновой кислоты (АЛК) с удельной радиоактивностью 55 нКи/нмоль («Amersham», Великобритания), вводимой внутривенно в дозе 4 мКи на животное за 10, 20, 30, 40 и 50 мин до взятия материала. Радиоактивность в микросомальной фракции определяли после осаждения ее охлажденной 10 % ТХУ и последовательного отмывания осадка 5 % ТХУ и смесью диэтиловый эфир—этанол (3:1). Осадок растворяли в 0,1 н. растворе гидроксида натрия, добавляли сцинтилляционную смесь толуол-тригон (2:1) и подсчитывали радиоактивность на счетчике «Rackbeta-1215» с коррекцией на гашение. Параметры обновления микросомальных гемопротеинов рассчитывали модифицированным способом [10] с использованием регрессионного анализа для обработки кривых включения и заменой уровня специфической радиоактивности предшественника постоянной во времени величиной, численно равной исходной радиоактивности препарата. Параметры обновления оценивали на основе вычисления доверительных зон регрессии.

Результаты и обсуждение. Анафилактическая чувствительность к ОВА (табл. 1) проявлялась раньше и по всем критериям тяжести достоверно превышала выраженность ПА к БСА.

При сенсибилизации ОВА (табл. 2) содержание цитохрома P-450 снижалось на 1-е и 7-е сутки

в среднем на 20 % с последующим увеличением его количества выше контрольных значений через 21 день ПС в среднем на 30 % при расчете на 1 г массы органа и на 1 мг белка. Содержание цитохрома  $b_5$  под влиянием ОВА уменьшалось на 7-е сутки на 25 % (удельное содержание) и характеризовалось выраженным (в 2,3 раза) превышением контрольного уровня на 21-й день при обоих способах расчета. Более слабая сенсибилизация БСА характеризовалась уменьшением количества цитохрома P-450 только на 1-е сутки на 27 % при расчете на 1 г массы органа. Содержание цитохрома  $b_5$  при этом снижалось на 1-е сутки ПС в среднем на 32 % с учетом обоих способов расчета. На 7-е и 21-е сутки эксперимента наблюдали увеличение уровня цитохрома  $b_5$  выше контрольного в среднем на 24 и 38 % соответственно независимо от способа расчета.

Исследование активности микросомальных монооксигеназ в динамике ПС ОВА и БСА (табл. 3) показало, что активность  $N$ -деметилазы аминопирина при сенсибилизации ОВА не изменялась на всех сроках эксперимента, а под влиянием БСА достоверно повышалась на 14-е сутки на 29 %. Активность  $n$ -гидроксилазы анилина при сенсибилизации ОВА на 1-е сутки превышала контрольные значения на 24 %, через 7 дней снижалась по сравнению с контрольным уровнем на 30 % и на 21-е сутки превышала контрольные величины в 1,5 раза. Сенсибилизация БСА сопровождалась уменьшением активности  $n$ -гидроксилазы

Таблица 3

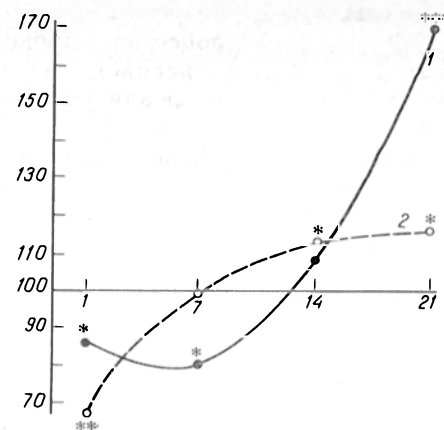
Активность монооксигеназ в микросомальной фракции печени (в нмоль/мин на 1 мг белка) при пищевой сенсibilизации ОВА и БСА ( $M \pm m$ ;  $n=12$ )

Условия эксперимента		Срок сенсibilизации, дни	N-деметилаза аминопирина	n-гидроксилаза анилина
Контроль			$7,01 \pm 0,98$	$0,88 \pm 0,07$
Сенсibilизация	ОВА	1	$7,03 \pm 0,70$	$1,09 \pm 0,09^*$
	БСА		$6,32 \pm 0,79$	$0,85 \pm 0,08$
Контроль			$7,32 \pm 0,83$	$0,79 \pm 0,08$
Сенсibilизация	ОВА	7	$6,71 \pm 1,01$	$0,56 \pm 0,04^*$
	БСА		$7,01 \pm 1,03$	$0,62 \pm 0,03^*$
Контроль			$6,87 \pm 0,69$	$0,77 \pm 0,05$
Сенсibilизация	ОВА	14	$7,52 \pm 0,91$	$0,69 \pm 0,06$
	БСА		$8,89 \pm 0,75^*$	$0,97 \pm 0,09^*$
Контроль			$7,90 \pm 0,59$	$0,72 \pm 0,08$
Сенсibilизация	ОВА	21	$8,10 \pm 0,27$	$1,11 \pm 0,06^{**}$
	БСА		$7,74 \pm 0,81$	$0,78 \pm 0,10$

анилина на 7-е сутки на 22 % и увеличением ее через 14 дней на 25 % по сравнению с контролем.

Результаты исследования скорости обновления суммы микросомальных гемопротенинов представлены в табл. 4. Выявлено, что при ПС обоими белками происходило снижение интенсивности обновления микросомальных гемопротенинов на 7-е и 14-е сутки почти вдвое. При сенсibilизации ОВА низкая обновляемость сохранялась и на 21-е сутки — 43 % от контроля, тогда как сенсibilизация БСА отличалась увеличением скорости обновления в этот период в 1,6 раза.

Таким образом, более тяжелые проявления реакции ПА к ОВА характеризовались уменьшением содержания цитохрома P-450, активности монооксигеназ по метаболизму субстратов II типа и скорости обновления микросомальных гемопротенинов. Снижение оборота микросомальных цитохромов при сенсibilизации ОВА было выражено на протяжении всего эксперимента, тогда как при сенсibilизации БСА первоначальное снижение сменялось значительным увеличением скорости обновления. Сопоставление динамики обновления и суммарного содержания микросомальных цитохромов (см. рисунок) на разных сроках ПС позволяет отметить определенную фазовость указанных процессов. В пер-



Изменение суммарного содержания микросомальных гемопротенинов в печени морских свинок при пищевой сенсibilизации ОВА и БСА (в нмоль цитохрома P-450 +  $b_5$  на 1 г ткани).

По оси абсцисс — дни сенсibilизации; по оси ординат — содержание гемопротенинов (% от контроля). 1 — сенсibilизация ОВА; 2 — сенсibilизация БСА. Одна звездочка —  $p < 0,05$ , две —  $p < 0,01$ , три —  $p < 0,001$ .

вую фазу, длящуюся при сенсibilизации ОВА 7 дней, а при сенсibilизации БСА — 1 сут, наблюдается ускорение катаболизма микросомальных гемопротенинов, что подтверждается снижением их суммарного количества. Снижение скорости обновления цитохромов в эту фазу, очевидно, направлено на стабилизацию их содержания. Вторая фаза характеризуется увеличением биосинтеза гемопротенинов, что проявляется в повышении их содержания. У животных с меньшей выраженностью ПА, сенсibilизированных БСА, указанный период развивается раньше и характеризуется на 14-й день возрастом активности обеих микросомальных монооксигеназ, а на 21-й день ПС — значительным увеличением скорости обновления микросомальных гемопротенинов. Выявленные закономерности позволяют подойти к пониманию механизма протективного в отношении пищевой сенсibilизации действия фенотарбита [3, 7], индуцирующего синтез цитохрома P-450 и снижающего скорость его оборота [19], но не замедляющего, однако, обновления его гема [15, 16].

Совокупность изложенных данных дает основание предполагать важную роль эпигенетических изменений гемопротенинов микросом в перестройке функционального состояния монооксигеназной системы печени при развитии реакций гиперчувствительности.

Таблица 4

Оборот микросомальных гемопротенинов печени в динамике пищевой сенсibilизации ОВА и БСА ( $M \pm m$ ;  $n=5$ )

Характер воздействия		Срок сенсibilизации, дни	Нмоль АЛК/нмоль цитохрома P-450 + $b_5$ /сутки
Контроль			$0,117 \pm 0,010$
Сенсibilизация	ОВА	1	$0,124 \pm 0,082$
»	БСА		$0,131 \pm 0,035$
Контроль			$0,108 \pm 0,012$
Сенсibilизация	ОВА	7	$0,057 \pm 0,005^*$
»	БСА		$0,062 \pm 0,002^*$
Контроль			$0,106 \pm 0,019$
Сенсibilизация	ОВА	14	$0,048 \pm 0,017^*$
»	БСА		$0,046 \pm 0,001^*$
Контроль			$0,067 \pm 0,029$
Сенсibilизация	ОВА	21	$0,029 \pm 0,015^*$
»	БСА		$0,109 \pm 0,005^*$

## ЛИТЕРАТУРА

- Акимов В. Г., Омельченко О. Г. // Вестн. дерматол.— 1987.— № 3.— С. 4—6.
- Арчаков А. И. Оксигеназы биологических мембран.— М., 1983.
- Вольский Н. Н., Цырлова И. Г., Козлов В. А. // Иммунология.— 1985.— № 3.— С. 47—49.
- Галпаров М. М. // Вестн. АМН СССР.— 1986.— № 3.— С. 22—28.
- Гублер Е. В. Вычислительные методы анализа и распознавание патологических процессов.— М., 1978.— С. 84—86.
- Карузина И. И., Арчаков А. И. // Современные методы в биохимии.— М., 1977.— С. 49—62.
- Ковалев И. Е., Пирузян Л. А., Шатерников В. А. и др. // Докл. АН СССР.— 1982.— Т. 266.— С. 247—249.
- Ковалев И. Е., Полевая О. Ю. Биохимические основы иммунитета к низкомолекулярным химическим соединениям.— М., 1985.

9. Лопаткин Н. А., Лопухин Ю. М. Эфферентные методы в медицине. — М., 1989.
10. Мальцев Г. Ю., Кржечковская В. В., Марокко И. Н., Гаппаров М. М. // Вопр. мед. химии. — 1990. — № 1. — С. 11.
11. Марокко И. Н., Хлопушина Т. Г., Лысенкова Е. М. и др. // Бюл. экспер. биол. — 1984. — № 12. — С. 713—715.
12. Поллард Дж. Справочник по вычислительным методам статистики. — М., 1982. — С. 171—174.
13. Садыкова Р. Е., Марокко И. Н., Мазо В. К. и др. // Вопр. питания. — 1987. — № 1. — С. 43—45.
14. Хочачка П., Сауеро Дж. Биохимическая адаптация. — М., 1988.
15. Garner R. C., McLean A. E. // Biochem. J. — 1969. — Vol. 114. — P. 7—11.
16. Greim H., Schenkman J. B., Klotzbücher M. // Biochim. biophys. Acta. — 1970. — Vol. 201. — P. 20—25.
17. Hartree E. // Analyt. Biochem. — 1972. — Vol. 48. — P. 422—427.
18. McLean A., Day P. // Biochem. Pharmacol. — 1974. — Vol. 23. — P. 1173—1180.
19. Omura T. // The Induction of Drug Metabolism / Ed. R. W. Estabrook, F. Lindenlaub. — Stuttgart, 1979. — P. 161—175.
20. Omuro T., Sato R. // J. biol. Chem. — 1964. — Vol. 239. — P. 2379—2385.
21. Weigle K., Cochrane C., Dixon F. // J. Immunol. — 1960. — Vol. 85. — P. 469—477.

Поступила 16.01.90

# SPECIFIC CHARACTERISTICS OF MICROSOMAL HEMO- PROTEINS TURNOVER IN GUINEA PIG LIVER TISSUE IN DYNAMICS OF ALIMENTARY SENSITIZATION

I. N. Marocco, G. Yu. Mal'tsev, V. V. Krzhechkovskaya,  
M. M. Gapparov

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

A phase-dependent type of microsomal hemoproteins turnover in liver tissue, estimated by incorporation of  $^{14}\text{C}$ -amino-levulinic acid, was detected in guinea pig males in dynamics of alimentary sensitization (1, 7, 14 and 21 days) with ovalbumin and bovine blood serum albumin (BSA). The first phase was expressed as elevated catabolism of microsomal cytochromes simultaneously with a decrease in their turnover; the second phase involved an increase in the hemoproteins biosynthesis. Less distinct sensitization with BSA exhibited the shortened period of the first phase, while activation of aminopyrine N-demethylase and aniline p-hydroxylase as well as considerably increased rate of microsomal cytochromes turnover were found during the second phase in liver tissue.

© А. С. ДУХАНИН, 1990

УДК 612.438.014.2.06:517.857].019.08

А. С. Духанин

## ВЛИЯНИЕ АДЕНОЗИНА НА РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОКОРТИКОИДРЕЦЕПТОРНЫХ КОМПЛЕКСОВ В ТИМОЦИТАХ КРЫС

П ММИ им. Н. И. Пирогова

Необходимым этапом в механизме реализации биологического действия глюкокортикоидных гормонов является связывание гормонрецепторных комплексов (ГРК) с ядерными акцепторами. Этот процесс может служить точкой приложения разнообразных регуляторных воздействий, в том числе со стороны аденилатциклазной системы клеток-мишеней. Так, биологические активные вещества, действие которых опосредуется цАМФ (катехоламины, пурины, простагландины  $E_1$  и  $D_2$ , глюкагон), потенцируют эффекты

глюкокортикоидов, влияя на рецепцию гормонов клетками-мишенями и на последующие этапы реализации гормонального сигнала [6, 7]. Однако молекулярные механизмы подобной гетероспецифической регуляции рецепции кортикостероидов клетками-мишенями еще не установлены.

В настоящей работе изучено влияние аденозина на специфическое связывание  $^3\text{H}$ -кортизола и внутриклеточное распределение рецепторов глюкокортикоидов в тимocyтaх крыс.

Методика. Исследования проводили на 32 беспородных белых крысах-самцах массой 150—180 г. Двустороннюю адреналэктомию производили иод эфирным наркозом по общепринятому методу. Животные содержались на солевой диете, крыс брали в опыт на 4—5-е сутки после операции. Тимocyты выделяли по описанной ранее методике [2]. Определение связывания  $^3\text{H}$ -кортизола (удельная радиоактивность 89 Ки/ммоль, «Amersham») цитозольной и ядерной фракциями тимocyтов проводили по следующей схеме: 0,5 мл суспензии тимocyтов  $[(1-2) \cdot 10^6 \text{ кл/мл}]$  инкубировали с  $2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$   $^3\text{H}$ -кортизолом без аденозина (контроль) и в присутствии его в течение 30 мин при  $37^\circ\text{C}$ . Последующие процедуры выполняли при  $4^\circ\text{C}$ . Для определения цитоплазматического связывания  $^3\text{H}$ -кортизола отбирали аликвоты (20 мкл) суспензии клеток и переносили их в пробирки, содержащие 100 мкл  $1,5 \text{ M}$   $\text{MgCl}_2$  в растворе декстранпокрытого угля, тщательно перемешивали и оставляли на 15 мин. Далее пробы центрифугировали (10 000 g, 10 мин) и в надосадочной жидкости измеряли радиоактивность. Для определения количества  $^3\text{H}$ -кортизолрецепторных комплексов, связавшихся с ядрами тимocyтов, из суспензии клеток отбирали аликвоты по 100 мкл. Для выделения ядер тимocyтов методом осмотического шока каждую порцию вносили в пробирки, содержащие 10 мл  $1,5 \text{ M}$  раствора  $\text{MgCl}_2$  в  $10 \text{ M}$  трис- $\text{HCl}$ -буфере pH 7,5 [13]. Через 30 мин пробы центрифугировали (3000 g, 10 мин) и к осадку добавляли 0,3 мл 96 % раствора этанола. После 2-часовой экстракции пробы повторно центрифугировали и отбирали 0,2 мл надосадка для подсчета радиоактивности. Количество специфических мест связывания  $^3\text{H}$ -кортизола в цитозольной и ядерной фракциях рассчитывали как разницу между количеством гормона, обнаруживаемого во фракции, полученной из тимocyтов, инкубированных без избытка немеченого гормона, и содержанием  $^3\text{H}$ -кортизола в той же фракции тимocyтов, инкубированных в присутствии  $2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$  немеченого кортизола.

Хроматография  $^3\text{H}$ -кортизолрецепторных комплексов. 20 г ДЭАЭ-целлюлозы DE-52 («Sigma») суспендировали в 120 мл  $100 \text{ M}$  трис-буфера, pH доводили до 7,4. Супернатант декантировали и смешивали с 30 мл ТДМ-буфера (10 mM трис- $\text{HCl}$ , 0,5 mM дитиотреитол, 10 mM молибдат натрия, pH 7,8 при  $3^\circ\text{C}$ ). Колонку (0,7×12 см) заполняли ДЭАЭ-целлюлозой и уравнивали ТДМ-буфером. Цитозоль, содержащий  $^3\text{H}$ -кортизолрецепторные комплексы, получали следующим образом. Выделенные из органов тимocyты ( $10^6 \text{ кл/мл}$ ) инкубировали с 33 им  $^3\text{H}$ -кортизолом при  $37^\circ\text{C}$  в течение 30 мин или при  $0^\circ\text{C}$  в течение 2 ч. По окончании инкубации тимocyты разрушали при  $0^\circ\text{C}$  путем добавления к 1 объему клеточной суспензии 5 объемов  $1,5 \text{ M}$  раствора  $\text{MgCl}_2$ , содержащего декстранпокрытый уголь (2 %, Norit A — «Serva», 0,2 % декстран T-70 — «Sigma» в ТДМ-буфере). Пробы встряхивали и оставляли на ледяной бане на 10 мин. Немедленно после осаждения активированного угля при 10 000 g в течение 5 мин цитозоль наносили на колонку в объеме 1 мл. Через колонку пропускали 25 мл ТДМ-буфера, затем элюцию проводили линейным градиентом  $\text{KCl}$  в интервале 0—0,4 M в ТДМ-буфере. Собирали фракции по 2 мл; их радиоактивность определяли на жидкостном сцинтилляционном радиометре SL-30 «Intertechnique».

Расчет доверительных интервалов экспериментальных значений и оценку достоверности различий между ними проводили по методу Стьюдента при уровне значимости  $p=0,05$  с помощью стандартных программ математического обеспечения для ЭВМ EMG 666/B.

Результаты и обсуждение. Первоначально было изучено влияние аденозина в концентрации  $2,5 \cdot 10^{-7}$ ,  $5 \cdot 10^{-7}$  и  $1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$  на распределение  $^3\text{H}$ -кортизолрецепторных комплексов ( $^3\text{H}$ -ГРК) между ядерной и цитозольной фрак-

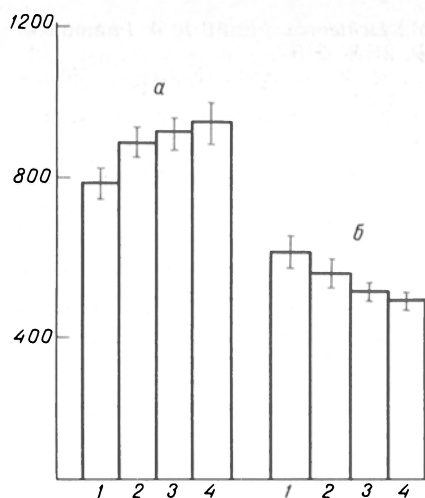


Рис. 1. Влияние аденозина на специфическое связывание  $^3\text{H}$ -кортизола ядерной (а) и цитозольной (б) фракциями тимоцитов.

По оси ординат — количество связанных  $^3\text{H}$ -кортизолрецепторных комплексов (в имп/мин на  $10^6$  клеток). 1 — контроль; 2 — аденозин  $2,5 \cdot 10^{-7}$  М; 3 — аденозин  $5 \cdot 10^{-7}$  М; 4 — аденозин  $1 \cdot 10^{-6}$  М.

цией клеток. Как видно на рис. 1, в присутствии аденозина (во всем диапазоне изученных концентраций) достоверно увеличивается ( $p < 0,05$ ) число связанных с ядрами  $^3\text{H}$ -ГРК и уменьшается количество  $^3\text{H}$ -ГРК в цитозольной фракции этих же клеток. Сдвиги в содержании  $^3\text{H}$ -ГРК в цитозоле по отношению к контрольным пробам становятся значимыми ( $p < 0,05$ ) при концентрации аденозина  $5 \cdot 10^{-7}$  М и выше. В результате суммарное специфическое связывание  $^3\text{H}$ -кортизола тимоцитами в отсутствие и в присутствии аденозина существенно не изменяется ( $p > 0,05$ ). Влияние аденозина носит дозозависимый характер и максимально проявляется при концентрации нуклеозида, равной  $1 \cdot 10^{-6}$  М. Следует отметить, что изученные концентрации аденозина находятся в диапазоне его физиологических концентраций ( $10^{-7}$ — $10^{-6}$  М) [9].

Для количественной оценки биологической активности глюкокортикоидов в опытах *in vitro* предложен равновесный параметр А (активность агониста), вычисленный как отношение количества ядерных  $^3\text{H}$ -ГРК к общему числу образованных ГРК [11]. Для гипотетического чистого агониста А равна единице, для антагониста А — нулю. По данным ряда авторов, полученным при изучении связывания  $^3\text{H}$ -глюкокортикоидов с клетками-мишенями для этих гормонов, значение параметра А ( $M \pm m$ ) для триамцинолона составляет  $0,74 \pm 0,04$ , для дексаметазона —  $0,66 \pm$

$\pm 0,02$ , для преднизолона —  $0,59 \pm 0,03$ , для кортикостерона —  $0,55 \pm 0,02$ . Рассчитанное в нашей работе экспериментальное значение параметра А для  $^3\text{H}$ -кортизола равно  $0,57 \pm 0,03$ . В результате воздействия на тимоциты аденозина отношение количества ядерных  $^3\text{H}$ -ГРК к общему числу сформировавшихся ГРК увеличивается. При концентрации нуклеозида  $5 \cdot 10^{-7}$  М указанное отношение достигает  $0,64 \pm 0,02$ , при концентрации  $1 \cdot 10^{-6}$  М  $0,66 \pm 0,03$  (приведены средние значения и доверительные интервалы, полученные по результатам 6 независимых опытов), что достоверно ( $p < 0,05$ ) выше контрольных значений параметра А. При концентрации аденозина  $2,5 \cdot 10^{-7}$  М доля ядерных  $^3\text{H}$ -ГРК возрастает незначительно ( $p > 0,05$ ).

Следовательно, в присутствии аденозина значения параметра А для кортизола приближаются к таковым для высокоактивных фторированных производных глюкокортикоидов (триамцинолона, дексаметазона). Повышение активности кортикостероидов в присутствии аденозина подтверждается данными о том, что аденозин в концентрации  $10^{-7}$ — $10^{-6}$  М потенцирует лимфолитический эффект глюкокортикоидов в условиях *in vivo* и *in vitro* [4].

Как известно, стероидрецепторные комплексы могут находиться в двух состояниях: исходном (неактивированном) и активированном, при котором резко возрастает их способность связываться ядрами клеток и ДНК. Эти две формы комплекса можно разделить с помощью хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе [12]. Для проверки предположения о возможности регуляции аденозином процесса активации (трансформации) цитозольных  $^3\text{H}$ -ГРК нами была проведена хроматография  $^3\text{H}$ -ГРК на ДЭАЭ-целлюлозе.

На рис. 2 показан профиль элюции  $^3\text{H}$ -ГРК в составе цитозоля тимоцитов, которые инкубировались с  $33$  нМ  $^3\text{H}$ -кортизола при  $0^\circ\text{C}$  в течение 2 ч (а) или при  $37^\circ\text{C}$  в течение 30 мин (б). При использовании активированного цитозоля клеток методом хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе получены две фракции ГРК: I — слабо связанная с ДЭАЭ-целлюлозой, выходящая с колонки при элюции  $50$  мМ КСI, и II — прочно связанная, выходящая при элюции  $200$  мМ КСI. Фракция I, слабо сорбирующаяся на анионообменнике, соответствует активированной форме кор-

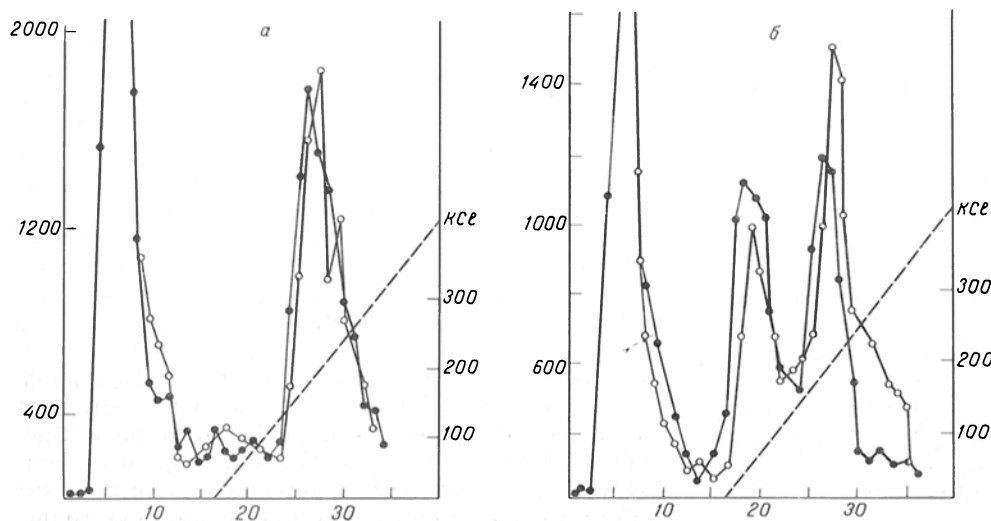


Рис. 2. Профили элюции цитозольных  $^3\text{H}$ -кортизолрецепторных комплексов.

Светлые кружки — в отсутствие, заштрихованные — в присутствии аденозина  $1 \cdot 10^{-6}$  при хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе. По оси абсцисс — номера фракций; по оси ординат — радиоактивность образцов [в имп/(мл·мин)]. Пунктирная линия — градиент КСI (в мМ).

тизолрецепторного комплекса, а фракция II — исходной неактивированной его форме. При элюции цитозольных препаратов, полученных из тимоцитов после их инкубации с  $^3\text{H}$ -кортизолом при  $0^\circ\text{C}$ ,  $^3\text{H}$ -ГРК выходят с колонки ДЭАЭ-целлюлозы одним пиком в зоне элюции неактивированной формы комплекса.

С целью определения влияния аденозина на трансформацию цитозольных ГРК проводили хроматографию  $^3\text{H}$ -ГРК, выделенных из клеток, которые инкубировались с  $^3\text{H}$ -кортизолом в присутствии аденозина в конечной концентрации  $1 \cdot 10^{-6}$  М. Как видно из профилей элюции  $^3\text{H}$ -кортизола, после инкубации тимоцитов с аденозином в течение 30 мин при  $37^\circ\text{C}$  количество неактивированной формы рецептора уменьшается, при этом содержание трансформированной формы ГРК существенно не изменяется. Таким образом, наблюдается не абсолютное увеличение активированной формы ГРК в цитозоле, а относительное ее изменение по отношению к неактивированной форме ГРК, что объясняется повышенной транслокацией в этих условиях активированных  $^3\text{H}$ -ГРК [1], поскольку независимо от химической природы молекул стероидных гормонов с ядром связывается около 60 % ГРК от общего числа активированных комплексов в клетке [10]. Вычисленное отношение количества активированной формы ГРК к содержанию неактивированной формы ГРК в отсутствие аденозина равно  $0,63 \pm 0,05$  ( $n=6$ ). В присутствии аденозина ( $1 \cdot 10^{-6}$  М) это отношение достоверно изменяется ( $p < 0,05$ ), составляя  $0,90 \pm 0,04$  ( $n=6$ ). Данный сдвиг связан с изменением равновесия между двумя формами комплексов в цитозоле и увеличением связывания активированной формы рецептора с ядрами клеток. Необходимо отметить, что добавление аденозина к тимоцитам, которые инкубировались при  $0^\circ\text{C}$ , не приводило к изменению содержания ГРК в цитозоле (рис. 2, а).

Полученные результаты свидетельствуют, что одним из механизмов модулирующего эффекта аденозина является его влияние на образование активированных ГРК, способных транслоцироваться в ядро. Поскольку этапы активации и транслокации глюкокортикоидрецепторных комплексов в ядра клеток-мишеней являются цАМФ-зависимыми [5, 8], влияние аденозина на эти процессы опосредовано, по-видимому, повышением концентрации цАМФ в тимоцитах, механизм которого описан нами ранее [3].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Кырге П. К., Вигел Э. Л., Тимпманн С. К. // Пробл. эндокринолог. — 1986. — № 6. — С. 44—48.
2. Пухальская Т. Г., Сергеев П. В. // Журн. микробиол. — 1983. — № 10. — С. 56—60.
3. Сергеев П. В., Духанин А. С., Семейкин А. В. // Бюл. экспер. биол. — 1987. — № 12. — С. 678—681.
4. Сергеев П. В., Шимановский Н. Л. // Фармакол. и токсикол. — 1987. — № 1. — С. 115—123.
5. Auricchio F., Migliaccio A., Castoria G. et al. // J. Steroid Biochem. — 1986. — Vol. 24. — P. 39—43.
6. Durant S., Seillan C., Duval D., Homo-Delarche F. // Int. J. Immunopharmacol. — 1984. — Vol. 6. — P. 223—232.
7. Gruol D., Ashby H., Campbell N. et al. // J. Steroid Biochem. — 1986. — Vol. 24. — P. 255—258.
8. Korge P. // J. molec. cell. Cardiol. — 1986. — Vol. 18. — P. 557—566.
9. Marone G., Plant M., Lichtenstein L. M. // J. Immunol. — 1978. — Vol. 11. — P. 2153—2156.
10. Miyable S., Harrison R. W. // Endocrinology. — 1983. — Vol. 112. — P. 2174—2180.
11. Munck A., Holbrook N. // J. Steroid Biochem. — 1987. — Vol. 26. — P. 173—179.
12. Schmidt T., Litwack G. // Physiol. Rev. — 1982. — Vol. 62. — P. 1131—1192.
13. Wira C., Munck A. // J. biol. Chem. — 1974. — Vol. 249. — P. 5328—5332.

Поступила 18.12.89

## EFFECT OF ADENOSINE ON DISTRIBUTION OF GLUCOCORTICOID-RECEPTOR COMPLEXES IN RAT THYMOCYTES

A. S. Dukhanin

II Medical School, Moscow

In presence of adenosine ( $10^{-7}$ — $10^{-6}$  M) content of nuclear  $^3\text{H}$ -hydrocortisone-receptor complexes was increased in rat thymus lymphocytes, while amount of these complexes was decreased in cytosol of these cells. DEAE-cellulose chromatography of the  $^3\text{H}$ -hydrocortisone-receptor complexes demonstrated that adenosine  $1 \cdot 10^{-6}$  M altered the ratio between active and non-active forms of the hormone-receptor complex. Adenosine appears to regulate transformation and translocation of the glucocorticoid-receptor complexes into the cell-target nuclei cAMP-dependent apparatus.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.155.392-036.11-085.277.3-036.8

М. Е. Ковтунова, В. Н. Паньков, С. И. Ворожцова, Т. И. Рябова, О. М. Целюсова

## УРОВНИ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК И ПОЛИАМИНОВ КАК ПОКАЗАТЕЛИ РЕФРАКТЕРНОСТИ К ХИМИОТЕРАПИИ БОЛЬНЫХ ОСТРЫМИ ЛЕЙКОЗАМИ

НИИ гематологии и переливания крови Минздрава РСФСР, г. Киров

За последние годы убедительно доказано, что в основе лейкозной трансформации лежат внутриклеточные изменения структуры и свойств ДНК, которая является главной мишенью канцеро- и мутагенных факторов [2, 7]. Особое место в развитии онкопатологии большинство исследователей отводят нарушениям в системе нуклеинового и белкового обмена, пытаясь связать возникновение неоплазий с накоплением в биологических жидкостях организма нуклеиновых кислот и полиаминов (ПА) [4, 9]. Утвердилось мнение, что ПА, обеспечивая оптимальные условия биосинтеза ДНК, РНК и белка, тесно связаны с процессами нормального и злокачественного роста [1, 10]. Это подтверждается данными о более высоком содержании ПА в молодых ядерных клетках по сравнению с безъядерными элементами крови [6]. В проведенных ранее исследованиях нами были установлены количественные изменения уровня внеклеточной ДНК у больных хроническими лейкозами в зависимости от агрессивности течения процесса, а также выявлена прямая корреляционная зависимость между концентрацией ПА крови и количеством ДНК в плазме крови [5]. Между тем, все еще остаются малоизученными вопросы, связанные с развитием рефрактерности к химиотерапии больных острыми лейкозами. Исследования биохимических параметров, лежащих в основе лейкозной транс-



формации, таких, как ДНК плазмы, а также веществ, обладающих регуляторными свойствами, таких, как ПА у больных лейкозами, рефрактерных к химиотерапии, возможно, будет способствовать раскрытию некоторых механизмов возникновения резистентности.

Целью настоящей работы явилось исследование уровня внеклеточной ДНК и содержания свободных и тотальных ПА в крови больных острыми лейкозами, резистентных к химиотерапии, а также установление взаимосвязи между этими показателями.

**Методика.** Биохимические исследования у больных острыми лимфо- и миелобластными лейкозами проводили при поступлении их в клинику и после окончания полихимиотерапии. Определяли уровень свободных и общих ПА в цельной крови и содержание внеклеточной ДНК в плазме крови. Принцип метода исследования ПА заключается в экстракции их *n*-бутиловым спиртом с последующим электрофоретическим разделением на бумаге, окрашиванием нингидриновым красителем и количественным определением колориметрическим способом при 540 нм [3]. Внеклеточную ДНК определяли в депротеинизированной плазме крови по флуоресценции комплекса ДНК–бисбензимида при длине волны возбуждения 365 нм и эмиссии 470 нм [8]. Полученные данные обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента.

**Результаты и обсуждение.** Осуществлен ретроспективный анализ содержания ПА и внеклеточной ДНК у 19 больных острыми лейкозами, рефрактерных к химиотерапии. Исследования проводили в динамике заболевания. Из общего числа больных у 10 был лимфобластный и у 9 — миелобластный вариант острого лейкоза. Больные были в возрасте 15–58 лет. Диагноз заболевания устанавливали на основании клинко-гематологических данных. Контрольные группы составили: при анализе содержания ПА в крови — 46 здоровых доноров, при определении ДНК в плазме крови — 26 здоровых людей. Доноры были в возрасте 16–60 лет.

При поступлении в клинику у большинства больных (16) отмечался рецидив заболевания. Клинически выявлялись гепатоспленомегалия и лимфаденопатия. В гемограммах у 2 больных острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) и у 1 больного острым миелобластным лейкозом (ОМЛ) установлены лейкоцитоз более  $300 \cdot 10^9/\text{л}$  и тромбоцитопения  $20\text{--}50 \cdot 10^9/\text{л}$ . По данным анализа пунктата костного мозга, количество бластных элементов колебалось от 15 до 50 %. У 3 больных была зарегистрирована первая атака заболевания. Отмечались жалобы на снижение работоспособности и аппетита. При клиническом обследовании только у 1 больного отмечалось увеличение размеров печени на 2 см ниже реберной дуги. Исследования пунктатов костного мозга позволили выявить у 2 больных ОМЛ и у 1 больного ОЛЛ. Несмотря на проведенную химиотера-

пию, у 13 человек развилась рефрактерность к цитостатическому лечению и отсутствовала положительная клинко-гематологическая динамика. У 4 больных наблюдалось клинко-гематологическое улучшение после лечения и у 2 больных — становление ремиссии. Однако в течение последующих 2–3 мес после выписки из стационара наступил рецидив острого лейкоза, что позволило включить данных пациентов в группу рефрактерных к химиотерапии. Лечение больных проводили по общепринятым схемам: ВПР (винкристин, преднизолон, рубомицин), ВАМП (винкристин, аметоптерин, 6-меркаптопурин, преднизолон), цитозар+рубомицин.

Результаты определения содержания ПА в крови больных острыми лейкозами представлены в табл. 1. Как видно из приведенных данных, уровень свободных и общих ПА в крови больных ОМЛ несколько выше, чем при ОЛЛ, по достоверных различий при этом не выявлено. Следует отметить более низкую концентрацию общих ПА в крови больных острыми лейкозами при поступлении в клинику по сравнению со здоровыми донорами, тогда как средняя концентрация свободных ПА при ОМЛ находится в пределах нормы. Невысокий уровень ПА до начала лечения, вероятно, связан с проведением поддерживающей цитостатической терапии. Резюмируя изложенное, необходимо подчеркнуть, что после завершения курса химиотерапии содержание как свободных, так и общих ПА практически не отличалось от их уровня до начала лечения.

Между тем у 2 больных ОМЛ и 1 больного ОЛЛ при поступлении отмечено значительно более высокое содержание общих и свободных ПА по сравнению с величинами, представленными в табл. 1, которые составили соответственно  $107 \pm 5,3$  и  $35,7 \pm 2,7$  нмоль/мл. Повышение концентрации ПА характеризовало активно текущий процесс. У этих пациентов летальный исход наступил в течение 1–2 нед с момента поступления в клинику.

У 1 больного ОЛЛ при поступлении уровень общих ПА составлял 67,6 нмоль/мл и свободных — 18,4 нмоль/мл. Он получал лечение по схеме ВАМП и через 5 дней после его начала содержание общих ПА в крови возросло до 463,8 нмоль/мл, появился пугресцин, отсутствовавший до начала лечения. Среди свободных ПА присутствовал только спермин. На следующий день больной погиб. При аутопсии обнаружено кровоизлияние в перикард и субарахноидальное пространство. Можно предположить, что в данном случае уровень ПА резко увеличился за счет активизации лейкозного процесса, о чем свидетельствует появление пугресцина в крови, не исключено и некоторое влияние цитостатической терапии.

Таблица 1

Содержание ПА в крови (нмоль/мл) больных острыми лейкозами, резистентных к химиотерапии ( $\bar{X} \pm m$ ,  $n=19$ )

Период исследования	ОЛЛ		ОМЛ	
	общие ПА	свободные ПА	общие ПА	свободные ПА
При поступлении в клинику	$47,7 \pm 13,0^*$	$16,9 \pm 2,3$	$60,2 \pm 9,3^{**}$	$24,1 \pm 4,7$
После окончания лечения	$56,0 \pm 7,3^*$	$19,4 \pm 2,7$	$64,1 \pm 5,2^*$	$23,2 \pm 4,0$
Здоровые доноры ( $n=46$ )	$84,6 \pm 2,6$	$15,7 \pm 0,49$		

Примечание. Здесь и в табл. 2: одна звездочка —  $p < 0,001$ , две —  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

Таблица 2

Содержание ДНК в плазме крови (мкг/мл) больных острыми лейкозами, резистентных к химиотерапии ( $\bar{X} \pm m$ ,  $n=11$ )

Период исследования	ОЛЛ	ОМЛ
При поступлении в клинику	9,41 $\pm$ 0,35*	10,28 $\pm$ 0,62*
После курса химиотерапии	9,38 $\pm$ 0,23*	10,77 $\pm$ 1,06*
Здоровые доноры ( $n=26$ )	5,5 $\pm$ 0,24	

Принимая во внимание, что ДНК играет важную роль в регуляции дифференцировки и пролиферации клеток, представляло значительный интерес изучение ее содержания в плазме крови больных острыми лейкозами. Полученные данные о содержании внеклеточной ДНК приведены в табл. 2, из которой видно, что ее уровень в плазме крови больных ОЛЛ и ОМЛ, резистентных к химиотерапии, до начала лечения достоверно выше, чем у здоровых людей. Причем проведение химиотерапии у этой группы больных не приводило к нормализации уровня внеклеточной ДНК, концентрация которой сохранялась повышенной и практически не изменялась до конца лечения. Обращает на себя внимание, что при ОЛЛ содержание ДНК в плазме крови несколько ниже, чем при ОМЛ, что, вероятно, связано с более активным течением процесса при миелобластном варианте лейкоза. Аналогичная зависимость выявлена и при исследовании ПА крови. Мы полагаем, что отсутствие заметных колебаний в количественном содержании исследуемых биохимических показателей, несмотря на проводимую терапию, свидетельствует об активно текущем процессе и нечувствительности лейкозных клеток к цитостатическому лечению.

Исследования показали, что имеется прямая зависимость между уровнями внеклеточной ДНК и ПА крови у больных острыми лейкозами, резистентных к химиотерапии. Это позволяет рекомендовать данные показатели в качестве

критериев рефрактерности к проводимому лечению. Полученные результаты могут оказаться полезными при выборе корректирующей терапии у этого контингента больных.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бердинских Н. К., Залеток С. П. Полиамины и опухолевый рост. — Киев, 1987.
2. Бутенко З. А. // Экспер. онкол. — 1986. — № 3. — С. 3—9.
3. Ворончихина Л. Д., Демьянова В. Т. // Лаб. дело. — 1985. — № 7. — С. 443—444.
4. Козак В. В., Шляховенко В. А., Юхименко М. Д. // Экспер. онкол. — 1986. — № 2. — С. 54—57.
5. Паньков В. П., Ворончихина Л. Д., Демьянова В. Т. и др. // Гематол. и трансфузиол. — 1988. — № 8. — С. 45—47.
6. Салтыкова Л. В., Блинов М. П. // Экспер. онкол. — 1987. — № 2. — С. 18—21.
7. Федоров Н. А. Структура ДНК и трансформация клеток. — М., 1988.
8. Федоров Н. А., Янева И. С., Скотникова О. И., Паньков В. П. // Бюл. экспер. биол. — 1986. — № 9. — С. 281—288.
9. Berdinskikh N. K., Zaletok S. P., Draga N. V. // Recent Progress in Polyamine Research. — New York, 1985. — P. 449—457.
10. Tabor C. W., Tabor H. // Ann. Rev. Biochem. — 1984. — Vol. 53. — P. 749—790.

## CONTENT OF EXTRACELLULAR DNA AND POLYAMINES USED AS CRITERIA OF LACK OF RESPONSE TO CHEMOTHERAPY IN PATIENTS WITH ACUTE LEUKOSIS

M. E. Kovtunova, V. N. Pan'kov, S. I. Vorozhlssova, T. I. Ryabova, O. M. Tselousova

Institute of Hematology and Blood Transfusion, Ministry of Public Health of the RSFSR, Kirov

Content of polyamines and extracellular DNA were studied in blood of patients with acute leukoses which did not respond to chemotherapy. Concentration of total polyamines was distinctly lower in blood of patients with acute lymphoblast and myeloblast leukoses as compared with healthy persons. Free and total polyamines were unaltered in blood of these patients after cytostatic therapy. In the patients with acute leukoses content of extracellular DNA was 2-fold higher as compared with controls. The high DNA content was maintained during the therapeutic course. Absence of any alterations in the biochemical patterns studied suggest that the patients with acute leukoses did not respond to the course of treatment used.

## МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

© Б. Г. Ляпков, Д. И. Воинов, 1990

УДК 616.153.922-074

Б. Г. Ляпков, Д. И. Воинов

### ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЭФИРОВ ХОЛЕСТЕРИНА НА ОСНОВЕ ТОПОЛОГИЧЕСКИХ ИНДЕКСОВ

Институт питания АМН СССР, Москва

Диагностика многих заболеваний связана с исследованием липидного обмена [6, 8]. Одним из наиболее популярных критериев состояния обмена липидов в клинической лабораторной практике является определение содержания холестерина (ХС) в крови, его распределения между липопротеидами низкой и высокой плотности, а также внутри подфракций последних [1, 3]. Существенный недостаток всех аналогичных исследований состоит в том, что определяется уровень общего ХС, в то время как установлено, что в плазме крови ХС содержится в ос-

новном (около 90 %) в этерифицированной форме [5]. Эта особенность в клинической практике, как правило, не учитывается. Между тем именно информация о том, какие молекулярные формы этерифицированного ХС содержатся в крови, имеет принципиальный характер, так как позволяет судить о метаболических взаимоотношениях между поступающими в организм липидами и эндогенно образованными. Таким образом, молекулярный спектр эфиров ХС крови в каждом конкретном случае отражает липидный статус организма и может служить важным критерием в оценке состояния обмена ХС и других липидов в организме [10, 11].

В настоящее время наиболее перспективным при анализе эфиров ХС является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, при котором разделению подвергаются непосредственно сами молекулярные виды эфиров ХС. В сравнении с методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) он более прост и исключает

многостадийность, характерную для ГЖХ [7, 9] и вносящую в окончательные результаты значительные погрешности вследствие разной степени гидролиза эфиров ХС и метилирования образовавшихся жирных кислот, дискриминации их при введении в высокотемпературный инжектор и пр. Одной из наиболее важных стадий анализа эфиров ХС является идентификация индивидуальных веществ на хроматограммах, которая затруднена тем, что ряд соединений данного класса могут не разделяться даже при самых оптимальных условиях их хроматографирования, а невозможность приобрести наиболее полный набор стандартов (например, фирма «Sigma-Aldrich Co.» поставляет лишь 8 *cis*-форм и 3 *trans*-формы, а фирма «Serva» — 13 молекулярных форм эфиров ХС) исключает правильное решение этой задачи. В биологических объектах в зависимости от состава поступающих экзогенных липидов и особенностей метаболизма эндогенно образованных липидов число индивидуальных молекулярных форм эфиров ХС весьма вариабельно и при хроматографии в основных или минорных пиках могут находиться несколько веществ. Решить проблему идентификации эфиров ХС можно, либо используя весьма трудоемкий химический метод с применением масс-спектрометрии, либо исследуя зависимость между структурой химических соединений или их отдельных фрагментов, описываемых специальными математическими приемами, и временем удерживания этих веществ (RT).

В настоящей работе предпринята попытка исследовать взаимосвязь между различными топологическими индексами и временем удерживания отдельных молекулярных видов эфиров ХС; прогнозировать возможность существования неразделенных пар или групп веществ; на основе выявленных функций идентифицировать неизвестные компоненты в биологических объектах.

**Методика.** Для анализа эфиров ХС использовали жидкостную хроматографическую систему: инжектор 210А «Beckman», насос 110А «Altex»: колонку «Ultrasphere ODS» (250×4,6 мм) 5 мкм, детектор «Kratos-SP-757» при длине волны 205 нм, интегратор «Shimadzu» CR-3A. Мобильная фаза — ацетон (о. с. ч):ацетонитрил (фирма «Burdic, Jackson») 66:34, скорость потока 2,5 мл/мин. Вводили следующие молекулярные формы эфиров ХС (стандарты): лаурилат, миристилат, пальмитат, олеат (*n*=9), линолеат (*n*=6, 9, 12)

Таблица 1

Установленные для стандартов эфиров ХС время удерживания (RT), коэффициенты емкости (K) и рассчитанные индексы Балабана для ненасыщенных дескрипторов и Рандича для насыщенных

Эфиры ХС	RT	K	Индекс Балабана	Индекс Рандича
Арахидонат ХС	8,542	6,626	2,727 150	
Линолеат ХС	10,465	8,343	2,761 985	
Олеат ХС	13,683	11,216	2,806 727	
Лаурилат ХС	9,432	7,421	<i>r</i> =1	5,914 335
Миристилат ХС	11,762	9,501		6,914 235
Пальмитат ХС	14,805	12,218		7,914 235
				<i>r</i> =0,999 987

**Примечание.** Весовой коэффициент для двойной связи=1,21462; мертвое время (DT) равнос 1,12; *r* — коэффициент корреляции.

и арахидонат (*n*=6, 5, 8, 11, 14) производства фирмы «Serva» и определяли их RT.

Поскольку молекулы эфиров ХС отличаются по жирнокислотному радикалу (ацильной группе), топологические индексы были рассчитаны только для данного дескриптора. Дескрипторы в молекулах эфиров ХС описывали следующими топологическими индексами: Винера, Рандича (от 1 до 8 порядков), Балабана [4] и углеродным числом (CN). Индекс Рандича, как известно, рассчитывают на основе матрицы смежности, в то время как индекс Балабана — на основе матрицы расстояний [2]. Оба индекса, как и индекс Винера, обесценивали только по углеродным атомам. Для оптимизации индекса Балабана весовой коэффициент для двойной связи устанавливали итерационным методом (шаг итерации 0,0001) на основе имеющихся ненасыщенных стандартов.

Фракцию эфиров ХС из биологических объектов (плазмы крови человека, крыс) выделяли методом ТСХ на силикагеле из общего липидного экстракта в системе петролейный эфир — диэтиловый эфир (15:2). Раствор эфиров ХС в хлороформе вводили в указанную хроматографическую систему. Данные обрабатывали с помощью компьютера IBM-PC/XT, статистические пакеты «Statgraphics» версия 2.6; «Systat» версия 4.04 и интегрированный пакет «Microsoft Excel» версия 2.0.

**Результаты и обсуждение.** Для выяснения зависимости между RT и рассчитанными топологическими индексами раствор указанных выше стандартов в хлороформе (500 мкг/мл) вводили в хроматограф (количество введений 21, медиана 1,2189). Исследовали линейную зависимость между lnRT и топологическими индексами (табл. 1). Для всех стандартов (насыщенных и ненасыщенных) линейная зависимость выявляется для индекса Рандича 5—8-го порядка и индекса Балабана (табл. 2). Для эфиров ХС,

Таблица 2

Коэффициенты корреляции (*r*) между вычисленными топологическими индексами для насыщенных и ненасыщенных дескрипторов (Д) и временем удерживания стандартов (RT)

Топологический индекс	Насыщенные Д		Ненасыщенные Д		Насыщенные и ненасыщенные Д	
	<i>r</i>	S.E.E.	<i>r</i>	S.E.E.	<i>r</i>	S.E.E.
CN	0,999 929	0,003 807	—	—	—	—
Винера	0,997 555	0,022 279	—0,669 279	0,248 327	0,031 232	0,238 543
Рандича 1	0,999 929	0,003 807	0,211 791	0,326 636	0,219 654	0,232 63
Рандича 2	0,999 929	0,003 807	0,903 031	0,143 572	0,416 112	0,217 016
Рандича 3	0,999 929	0,003 807	0,986 12	0,055 491	0,610 913	0,188 946
Рандича 4	0,999 929	0,003 807	0,999 647	0,008 882	0,795 138	0,144 73
Рандича 5	0,999 929	0,003 807	0,999 946	0,003 485	0,917 8	0,094 758
Рандича 6	0,999 929	0,003 807	0,999 625	0,009 146	0,961 246	0,065 796
Рандича 7	0,999 929	0,003 807	0,999 973	0,002 464	0,976 84	0,051 066
Рандича 8	0,999 929	0,003 808	0,999 431	0,011 269	0,978 102	0,049 671
Балабана	0,995 992	0,028 517	0,999 727	0,007 803	0,993 092	0,028 004

Примечание. S.E.E.— ошибка средней квадратичной.

Вычисленные значения индексов Балабана и Рандича и соответствующие им время удерживания (RT), коэффициенты емкости (K) и разрешения ( $R_s$ )

C	DB	Положение DB	Индекс	RT	K	$R_s$
3	0		1,414 235 62*	3,414 849	1,626 807	2,952 262
4	0		1,914 235 62*	3,822 281	1,940 216	2,952 262
5	0		2,414 235 62*	4,278 324	2,291 018	2,952 262
6	0		2,914 235 62*	4,788 778	2,683 676	2,942 262
7	0		3,414 235 62*	5,360 136	3,123 181	2,320 583
11	1	10	2,672 329 142	5,856 491	3,504 993	0,633 256
8	0		3,914 235 62*	5,999 663	3,615 125	2,952 262
9	0		4,414 235 62*	6,715 493	4,165 764	0,128 785
18	4	8—9—12—15	2,695 132 398	6,748 559	4,191 199	2,823 867
10	0		4,914 235 62*	7,516 731	4,782 101	0,426 145
18	4	4—8—12—15	2,715 085 125	7,639 898	4,876 844	0,060 694
20	5	5—8—11—14—17	2,715 457 43	7,657 603	4,890 464	1,361 056
18	3	9—12—15	2,723 808 16	8,065 69	5,204 377	0,007 15
18	3	—6—9—12—	2,723 852 019	8,067 89	5,206 069	0,362 025
14	1		2,726 072 75	0,180 058	5,292 353	0,582 624
22	6	4—7—10—13—16—19	2,729 646 771	8,363 865	5,433 742	0,155 346
11	0		5,414 235 62*	8,413 565	5,471 973	0,397 081
20	4	5—8—11—14	2,733 035 46	8,541 953	5,570 733	1,546 32
20	4	9—11—14—17	2,742 523 49	9,061 014	5,970 011	0,003 158
22	5	5—8—11—14—17	2,742 542 861	9,062 106	5,970 851	1,077 007
12	0		5,914 235 62*	9,417 402	6,244 156	0,068 787
22	5	7—10—13—16—19	2,749 150 258	9,442 141	6,263 185	2,167 274
20	3	8—11—14—	2,762 452 108	10,256 24	6,889 416	0,233 071
22	4	7—10—13—16	2,763 881 796	10,347 82	6,959 858	0,295 514
18	2	9—12—	2,765 694 53	10,465 1	7,050 078	0,189 5
13	0		6,414 235 62*	10,541 01	7,108 469	0,116 451
20	3	5—8—11—	2,767 571 267	10,587 93	7,144 561	0,439 152
16	1	9	2,770 265 129	10,766 76	7,282 123	2,398 1
14	0		6,914 235 62*	11,798 68	8,075 904	0,346 194
20	3	11—14—17—	2,787 109 195	11,955 49	8,196 533	2,607 037
15	0		7,414 235 62*	13,206 4	9,158 767	0,394 532
20	2	11—14—	2,805 534 352	13,406 62	9,132 783	0,534 815
18	1	9	2,808 815 69	13,682 94	9,525 341	0,655 082
18	1	11	2,812 834 238	14,029 12	9,791 631	0,766 258
18	1	6	2,817 534 876	14,445,19	10,111 68	0,604 457
16	0		7,914 235 62*	14,782 08	10,370 83	0,378 874
22	3	13—16—19	2,823 566 934	14,997 23	10,536 33	2,520 365
22	2	13—16	2,839 039 019	16,511 59	11,701 22	0,054 198
17	0		8,414 235 62*	16,545 75	11,727 5	0,398 818
20	1	9	2,841 817 907	16,799 35	11,922 57	0
20	1	11	2,841 817 907	16,799 35	11,922 57	2,554 538
18	0		8,914 235 62*	18,519 85	13,246 04	2,015 302
22	1	13	2,869 868 256	20,000 19	14,384 76	0,938 991
19	0		9,414 235 62*	20,729 49	14,945 76	2,945 564
24	1	15	2,893 716 157	23,196 82	16,843 71	0,006 718
20	0		9,914 235 62*	23,202 76	16,848 28	2,952 262
21	0		10,414 235 62*	25,971 12	18,977 79	2,952 262
22	0		10,914 235 62*	29,069 78	21,361 37	2,952 262
23	0		11,414,235 62*	32,538 15	24,029 35	2,952 262
24	0		11 914 235 62*	36,420 34	27,015 64	—48,825 82

Примечание. C — количество углеродных атомов в дескрипторе эфиров XC; DB — количество двойных связей в дескрипторах; звездочка — индекс Рандича.

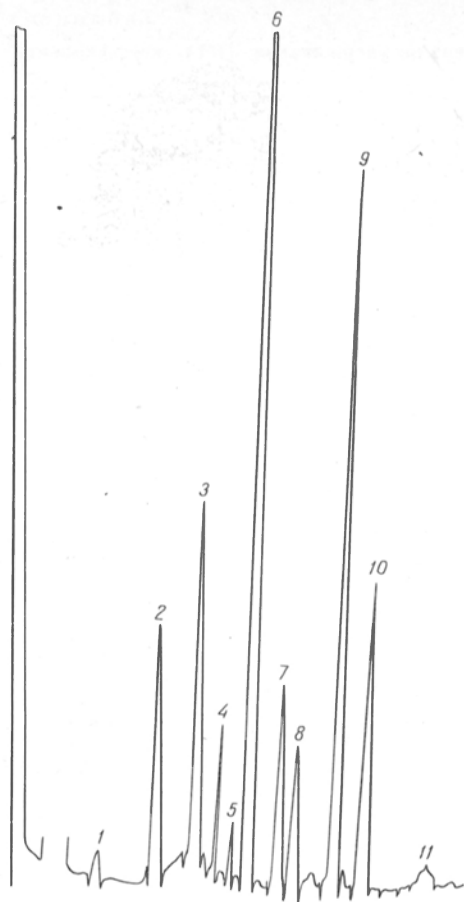
содержащих только насыщенные жирнокислотные радикалы, оптимальная линейная зависимость установлена для индекса Рандича (с 1-го по 8-й порядок) и для CN, худшие результаты получены при использовании индексов Винера и Балабана. Для эфиров XC с ненасыщенными жирными кислотами индексы Винера и Рандича 1-го порядка свидетельствовали об отсутствии линейности. Таким образом, для обеих групп веществ — с насыщенными или ненасыщенными жирнокислотными радикалами не найдено единого индекса, который бы с одинаковой точностью описывал связь между структурой молекул и их хроматографическими свойствами; поэтому для описания эфиров XC с насыщенными жирнокислотными радикалами был выбран индекс Рандича 1-го порядка, а для ненасыщенных — индекс Балабана.

Топологические индексы Рандича 1-го порядка и Балабана были рассчитаны для 50 дескрипторов и установлено RT для соответствующих им эфиров XC с помощью «Statgraphics», «Systat» и «MS Excel» (табл. 3). Для данных хроматографических условий (число теоретических тарелок 11 000) и соотношения ближайших разделяемых веществ 1:1 при различных в значении индекса Балабана менее 0,0037 и индекса Рандича менее 0,0919 возможно существование не разделяющихся смешанных пиков. Минимальное значение RT равно 9,66 с, коэффициента разрешения  $R_s$  — 0,6. При изменении соотношений концентраций двух ближайших веществ значения  $\Delta RT$  и  $\Delta R_s$  будут другими. Из табл. 3 видно, что возможные не разделяющиеся группы веществ в большинстве случаев содержат эфиры XC с нечет-

# Хроматограмма эфиров ХС плазмы крови человека.

Идентификация пиков на хроматограмме

№ пика	RT	Топологический индекс	Эфиры ХС	Дескриптор
1	7.52	4.9142	Каприлат	10:0
2	8.06	2.7238	γ-Линоленат	18:3 (6, 9, 12)
3	8.54	2.7330	Арахидонат	20:4 (5, 8, 11, 14)
4	9.42	5.9142	Лаурилат	12:0
5	10.25	2.7624	Дигомо-γ-линоленат	20:3 (8, 11, 14)
6	10.46	2.7656	Линолеат	18:2 (9, 12)
7	10.76	2.7703	Пальмитолеат	16:1 (9)
8	11.79	6.9142	Миристилат	14:0
9	13.68	2.8088	Олеат	18:1 (9)
10	14.76	7.9143	Пальмитат	16:0
11	18.52	8.9142	Стеарат	18:0



ным числом атомов углерода в дескрипторе, которые, как правило, лишь в весьма незначительных количествах могут присутствовать в организме млекопитающих; в этом случае идентификация эфиров ХС по приведенным топологическим индексам значительно упрощается. Дополнительным идентификационным признаком в случае использования неразделенных веществ, содержащих одновременно насыщенные и ненасыщенные жириокислотные радикалы в каждой из групп, может быть оптическая плотность при смещенных длинах волны от 205 до 217 нм, при которых вклад двойных связей в оптическую плотность изменяется весьма значительно.

Результаты работы показали, что, используя метод высокоэффективной жидкостной хроматографии для разделения эфиров ХС, выделенных из биологических объектов, и топологические индексы всех вариантов дескрипторов данных соединений, можно установить «очередность» RT для индивидуальных молекулярных форм и построить программу их идентификации (см. рисунок). Возможно, что ряд соединений, имеющих один пик, могут быть разделены при использовании градиентного элюирования и идентифицированы с помощью многоканального спектрофотометра на основе диодной матрицы. Однако и для подобного варианта работы необходимы дополнительные стандарты этого класса веществ.

## ЛИТЕРАТУРА

- Гасилин В. С., Курданов Х. А. и др. // Сов. мед. — 1981. — № 7. — С. 7—11.
- Кинг Р. Химические приложения топологии и теории графов: Пер. с англ. — М., 1987.

- Перова Н. В., Ноева Е. А., Герасимова Е. Н. // Кардиология. — 1983. — № 10. — С. 86—91.
- Balaban A. // Pure. appl. Chem. — 1983. — Vol. 55. — P. 199.
- Halpern M. J. Lipid Metabolism and Its Pathology. — Amsterdam, 1986.
- Kates M. Techniques of Lipidology. — Amsterdam, 1986. — P. 452.
- Kahl P. et al. // Biomed. biochim. Acta. — 1984. — Vol. 43. — P. 447—450.
- Kuksis A. // J. Chrom. Lib. — 1987. — Vol. 37. — P. 441.
- Lasserre M., Keraulret M. et al. // Ann. Nutr. Metab. — 1984. — Vol. 28. — P. 334.
- Melchert H. et al. // Atherosclerosis. — 1987. — Vol. 65. — P. 159—166.
- Moelanen T. et al. // Ibid. — 1986. — Vol. 59. — P. 113—119.

Поступила 16.01.90

## IDENTIFICATION OF CHOLESTEROL ESTERS USING THE TOPOLOGICAL CRITERIA

B. G. Lyapko, D. I. Voinov

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

Cholesterol esters obtained from biological sources were separated using highly-effective liquid chromatography. Identification of individual molecular forms of these esters was carried out by means of linear correlation between the period of their retaining and the topological indices by Balaban and Randich, describing the structure of descriptors (acyl group) in cholesterol esters.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.379-008.64:577.175.722]-092-07

С. И. Брилевская, Л. М. Шкуматов, Г. Г. Гацко

## МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ ОСТРОВКОВ ЛАНГЕРГАНСА ИЗ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРЫС

Институт радиобиологии АН БССР, Минск

По современным представлениям гормонально-метаболические нарушения при сахарном диабете обусловлены абсолютной или относительной недостаточностью инсулина. При изучении патогенеза диабета важная роль отводится биосинтезу и секреции инсулина β-клетками островков Лангерганса (ОЛ) поджелудочной железы (ПЖ) [3]. Однако сложность регуляции функции β-клеток в целостном организме, а также зависимость концентрации инсулина в крови от ряда процессов (секреция, связывание гормона с гормонами-чувствительными клетками, его метаболизм и выведение) затрудняют изучение гормонпродуцирующей способности β-клеток в опытах in vivo. Очевидно преимущество использования для дан-



ных целей модели изолированных ОЛ: она позволяет вычленить непосредственное влияние изучаемых воздействий на инсулинпродуцирующий аппарат ПЖ и является адекватной моделью для прямого определения скорости образования инсулина [9].

Применяемые в настоящее время для выделения ОЛ ПЖ методы могут быть разделены на ферментные (с использованием коллагеназы) [6, 8, 11, 14, 15] и методы, основанные на механической микродиссекции [13]. Наиболее общие недостатки этих методов: трудоемкость, длительность выделения и в связи с этим малый выход ОЛ (микродиссекция), относительно высокая стоимость и повреждающее действие на  $\beta$ -клетки некоторых используемых реактивов (ферментное выделение ОЛ) [1, 2, 4].

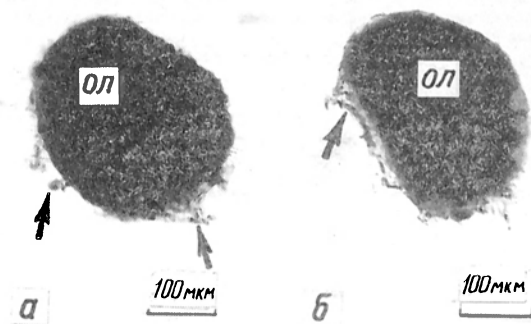
В связи с изложенным целью настоящего исследования заключалась в разработке простой и надежной модификации метода выделения ОЛ, позволяющей получать островки с сохраненной инсулинпродуцирующей функцией.

**Методика.** Опыты проводились на крысах-самцах линии Вистар стадного разведения, содержавшихся на стандартном рационе вивария. Масса животных составляла 300—350 г, возраст — 6 мес.

За основу выделения ОЛ был принят модифицированный метод [14], используемый во многих работах [5, 10, 14]. Животных декапитировали. Быстро вскрывали брюшную полость и извлекали ПЖ. Очищали ее от жировой ткани и помещали в чашку Петри с раствором А: 0,01 % бычий сывороточный альбумин (БСА) в растворе Хэнкса pH 7,4. Раствор А готовили в день опыта, все манипуляции с ПЖ проводили при 0 °С. Ткань ПЖ сильно растягивали, вводя в нее шприцем в нескольких местах раствор А. Избыток жидкости удаляли фильтровальной бумагой. Железу переносили в маленький стаканчик (10 мл) и в течение 3 мин измельчали ножницами. Затем в стаканчик с измельченной железой наливали раствор А, при этом кусочки ткани с островками оседают на дно, а жировая ткань всплывает и декантируется с жидкостью. К измельченной ПЖ добавляли 6 мл раствора А и переносили в гомогенизирующее устройство, состоящее из двух шприцев типа «Рекорд». Шприцы соединяет узел из инъекционной иглы, на острый конец которой напаяна канюля от другой иглы такого же диаметра. Гомогенизацию ткани осуществляли, продавливая ее из одного шприца в другой через узлы из игл двух диаметров: 1 и 2 мм. Сначала производили 20 ходов поршней с первым узлом, затем еще 13—15 ходов со вторым. Применение узлов, состоящих из игл разного диаметра, позволяет быстро достичь различной степени измельчения ткани, что значительно ускоряет процесс выделения островков. Гомогенизация — очень ответственный этап предлагаемой методики, поэтому в процессе выделения ОЛ необходимо строго придерживаться приведенных режимов. Полученный гомогенат промывали, добавляли к нему 100 мл раствора А, тщательно перемешивали и отстаивали в течение 8—10 мин, затем жидкость сливали. Операцию повторяли 2—3 раза.

Сбор и освобождение островков от остатков экзокринной ткани проводили под микроскопом МБС-9 при 16-кратном увеличении. Большинство ОЛ свободно лежит на дне чашки Петри и их можно легко собрать пастеровской пипеткой. Некоторые островки видны с остатками экзокринной ткани, их выделение осуществляли специальным микроинструментом.

В опытах использовали островки диаметром 150—250 мкм, 5 раз их промывали в 4 мл раствора А. Затем по 5 штук переносили в пластиковые пробирки с 0,4 мл инкубационной среды (ИС). Пробирки инкубировали в термостате ИТЖ-003 при постоянном покачивании. Состав ИС: 5 или 15 мМ глюкозы, бикарбонатный буфер Кребса — Рингера (непосредственно перед использованием пазируется смесью  $\text{CO}_2$ — $\text{O}_2$  в соотношении 5:95), 16 мМ HEPES, 1 мг/мл БСА и 18 аминокислот в концентрации, соответствующей их концентрации в сыворотке крови [5]. После окончания инкубации островки извлекали из ИС и переносили в пластиковые пробирки с 0,4 мл 0,01 М HCl для экстракции содержащегося



Изолированный ОЛ.

Стрелкой обозначены остатки экзокринной ткани. а — сферическая форма; б — эллипсоидная форма. Микроскоп Ergawal, Carl Zeiss, Jena Об.Х16; ок.Х3,2.

в них инсулина. Экстракцию проводили в течение 24 ч при 9 °С.

В экстрактах ОЛ и ИС определяли концентрацию иммунореактивного инсулина (ИРИ) с помощью набора «РИО-ИНС-ПГ- $^{125}\text{I}$ » (ИБОХ АН БССР). Все операции производили согласно инструкции, предлагаемой к набору. Однако в качестве разделительной системы связавшегося и несвязавшегося инсулина использовали «вторые» антитела (антитела кролика к иммуноглобулинам морской свинки, иммобилизованные на целлюлозе), так как эта разделительная система в отличие от системы на основе полиэтиленгликоля менее чувствительна к изменению концентрации белка в пробах. Результаты обработаны методом вариационной статистики на ЭВМ «Электроника МФ 0507».

**Результаты и обсуждение.** Согласно полученным результатам, предлагаемая методика позволяет выделять в среднем за 90 мин 60—70 островков из ПЖ двух крыс. На выделение 1 островка уходит, таким образом, около 90 с, что сравнимо с производительностью ферментных методов [12].

Выделенные островки жизнеспособны. В пользу такого вывода, во-первых, свидетельствует их внешний вид. Островки покрыты сплошной капсулой, обычно имеют сферическую или эллипсоидную форму (см. рисунок). Линейные размеры их находятся в пределах 50—600 мкм. Во-вторых, клетки ОЛ не окрашиваются метиленовым синим, что также указывает на целостность клеточных мембран. В-третьих, выделенные ОЛ *in vitro* способны синтезировать и секретировать инсулин, а также адекватно реагировать на стимулирующее воздействие глюкозой.

При сравнительном исследовании временной динамики изменений содержания инсулина в островках и выхода гормона в ИС, проведенном при 0 и 37 °С, было показано следующее. Инкубация при 0 °С в течение 2—6 ч приводит к незначительному увеличению концентрации ИРИ в ИС (см. таблицу). Это связано скорее всего с диффузией гормона из островков, так как при нулевой температуре подавляются и биосинтез, и секреция инсулина. Содержание гормона в ОЛ практически не изменяется. При 37 °С концентрация инсулина в ИС постепенно увеличивается: через 2 ч — в 7 раз, через 2 ч — в 26 раз и через 6 ч инкубации — более чем в 50 раз по сравнению с исходным уровнем (0 ч). При этом содержание гормона в островках не только уменьшается, а возрастает почти в 2 раза: с 8,7 до 16,5 пмоль/

Время инкубации, ч	0 °C		37 °C	
	ИРИ в ОЛ, пмоль/островок	ИРИ в ИС, пмоль/островок	ИРИ в ОЛ, пмоль/островок	ИРИ в ИС, пмоль/островок
0	8,757 $\pm$ 3,312	0,105 $\pm$ 0,04	8,716 $\pm$ 0,673	0,080 $\pm$ 0,006
2	7,602 $\pm$ 0,760	0,152 $\pm$ 0,009**	13,187 $\pm$ 1,523*	0,556 $\pm$ 0,029***
3	7,980 $\pm$ 0,213		13,834 $\pm$ 0,073**	1,367 $\pm$ 0,230***
4	9,524 $\pm$ 0,220	0,184 $\pm$ 0,020**	16,535 $\pm$ 1,617***	2,065 $\pm$ 0,176***
5	7,210 $\pm$ 0,157	0,130 $\pm$ 0,060*	15,427 $\pm$ 1,186***	2,922 $\pm$ 0,090***
6	6,437 $\pm$ 0,293	0,141 $\pm$ 0,009**	14,877 $\pm$ 1,266***	4,015 $\pm$ 0,094***

\*  $p \leq 0,05$ .  
 \*\*  $p \leq 0,01$ .  
 \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

островов. Это свидетельствует о том, что в ОЛ происходят биосинтез инсулина (суммарное количество его в островках и среде существенно увеличивается) и секреция гормона в инкубационную среду.

Глюкоза является естественным стимулятором секреции инсулина в организме. Поэтому важной характеристикой сохранности секретирующей функции ОЛ является способность их адекватно реагировать на увеличение концентрации глюкозы в инкубационной среде. Было установлено, что 2-часовая инкубация в среде, содержащей глюкозу в концентрации 5 мМ, ведет к накоплению в ней ИРИ (0,56 пмоль/островок). Повышение концентрации глюкозы в среде до 15 мМ приводит к накоплению ИРИ в ИС в количестве 1,65 пмоль/островок. Иначе говоря, 3-кратное увеличение концентрации глюкозы во столько же раз стимулирует и секрецию инсулина. При этом содержание ИРИ в ОЛ не зависело от концентрации глюкозы и составляло 10,0—11,4 пмоль/островок.

Таким образом, выделенные нами ОЛ сохраняют инсулинпродуцирующую функцию и способность адекватно реагировать на стимуляцию по крайней мере в течение 2 ч инкубации. По производительности (времени, затрачиваемом для выделения 1 островка) методика не уступает ферментным и значительно превосходит методы на основе микродиссекции [12, 13]. Причем, она во многом лишена недостатков, присущих ферментным методам, а параметры инсулинпродуцирующей функции выделенных ОЛ соответствуют параметрам таковой у ОЛ, полученных по общепринятому методу [6].

Все сказанное позволяет утверждать, что выделенные предлагаемым методом ОЛ могут быть успешно использованы для изучения биосинтеза и секреции инсулина, а также для исследования механизмов регуляции этих процессов.

Авторы выражают искреннюю признательность доктору мед. наук В. В. Полтораку за методическую и консультативную помощь при выполнении работы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков.— М., 1983.— С. 53.
2. Алексанян М. Г. // Актуальные вопросы экспериментальной и клинической эндокринологии.— Киев, 1982.— С. 95.

3. Жукова М. В., Полтораки В. В. // Пробл. эндокринолог.— 1980.— № 1.— С. 72—78.
4. Медведский Е. Б., Шалимов В. А. // Клини. хир.— 1982.— № 11.— С. 68—70.
5. Полтораки В. В. // Пробл. эндокринолог.— 1984.— № 3.— С. 53—56.
6. Полтораки В. В. Биосинтез и секреция инсулина при воздействии средств гормональной и негормональной природы: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.— Киев, 1983.
7. Buitrago A., Gylfe E., Henriksson C., Pertoft H. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1977.— Vol. 79.— P. 823—828.
8. Gray D. W. R., McShane P., Grant A., Morris P. J. // Diabetes.— 1984.— Vol. 33.— P. 1055—1061.
9. Hahn H.-J. // Endokrinologie.— 1978.— Bd 71.— S. 308—324.
10. Hahn H.-J., Heinke P. // Acta biol. med. germ.— 1975.— Bd 34.— S. 719—722.
11. Hahn H.-J., Lippman H. G., Schulz D. // Ibid.— 1978.— Bd 28.— S. 420—481.
12. Hahn H.-J., Lippman H. G., Schulz D. // Ibid.— 1970.— Bd 25.— S. 421—431.
13. Hellerstrom C. // Acta endocr. (Kbh.).— 1964.— Vol. 45.— P. 122—132.
14. Lacy P. E., Kostianowsky M. // Diabetes.— 1967.— Vol. 16.— P. 35—39.
15. Moskalowski S. // Gen. comp. Endocr.— 1965.— Vol. 5.— P. 342—353.
16. Reaven E. P., Gold G., Walker W., Reaven G. M. // Horm. Metabol. Res.— 1981.— Vol. 13, N 12.— P. 673—674.

Поступила 18.12.89

#### A MODIFIED PROCEDURE FOR ISOLATION OF LANGERHANS ISLANDS FROM RAT PANCREAS

S. I. Brylevskaya, L. M. Skumatov, G. G. Gatsko

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

A simple procedure is developed for isolation of Langerhans islands (LI) from rat pancreas. Homogenization of pancreatic tissue was carried out using two "Record" syringes equipped with needles of various diameter. Collagenase was not used in the procedure. After homogenization LI were individually separated using stereomicroscope. The insulin-producing capacity of LI was estimated by assay of immunoreactive insulin content in LI and in the incubation media at 0° and 37° as well as by their reaction to various concentrations of glucose. The procedure enabled to isolate functionally active LI and to study biosynthesis and secretion of insulin *in vitro*.

© А. А. ЧИРКИН, Н. Ю. КОНЕВАЛОВА, 1990

УДК 577.1:378.661

*А. А. Чиркин, Н. Ю. Коневалова*

## **ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫЕ ФОРМЫ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ СТУДЕНТОВ ПРИ ИЗУЧЕНИИ БИОХИМИИ В МЕДИЦИНСКОМ ВУЗЕ**

Витебский медицинский институт

Важным условием перестройки высшего образования является увеличение доли самостоятельной работы студентов путем сокращения обязательных аудиторных занятий [1]. В отечественной и зарубежной литературе накапливается опыт по организации самостоятельной работы студентов под контролем преподавателя. В частности, считают, что в основе самостоятельной работы студентов лежит выполнение индивидуальных занятий. Центральное место при этом отводится свободной дискуссии по изученному теоретическому материалу и результатам проведенных лабораторных исследований. При организации дискуссии необходимо соблюдать ряд условий: учитывать желание студента участвовать в дискуссии, избавить студентов от психологического напряжения в процессе собеседования, обеспечить активное и заинтересованное участие всех студентов в беседе, постоянно контролировать и направлять ход дискуссии, но без подавления инициативы и активности студентов. Хотя дискуссия (собеседование) и выполняет функцию контроля, она должна проходить не в форме опроса, а как общение коллег. Наилучший эффект преподавания достигается при работе с малыми группами, т. е. с группами по 3—4 студента [1, 3].

Эффективность самостоятельной работы студентов будет страдать при формализованном усредненном подходе к обучаемым. В то же время действующие нормативы не позволяют организовать высокоиндивидуализированное обучение. Исходя из этих предпосылок, мы решили апробировать дифференцированный подход к организации самостоятельной работы студентов в зависимости от исходного уровня теоретических знаний и лабораторных навыков.

На протяжении первых 4 занятий преподаватель условно делит студентов закрепленных за ним групп по исходному уровню: низкому, среднему и высокому уровню исходных знаний и навыков. Методика такого деления включает определение усвояемости знаний из курса биоорганической химии и статической биохимии, способности понимать и усваивать новый материал из разделов динамической биохимии, наличие навыков работы в химической лаборатории, характер освоения биохимического лабораторного оснащения. Для оценки способности к критическому и творческому мышлению студентам предлагаются ситуационные

задачи 3 степеней сложности: от простого использования материала изучаемой темы до умения сделать логический вывод, применяя дополнительную литературу и знания из смежных дисциплин. Следует отметить, что решение дифференцированных по сложности ситуационных задач проводится на протяжении всего учебного года и имеет целью перевод все большего числа студентов в группу, где решают сложные задачи. Опыт показывает, что примерно  $\frac{2}{3}$  студентов относятся к среднему уровню знаний и умений.

Рассмотрим некоторые особенности организации самостоятельной работы и дискуссии по ее результатам применительно к этой наибольшей группе студентов. Как известно, ряд тем в настоящее время предлагается студентам изучать самостоятельно. В частности, студентам было предложено самостоятельно изучить тему «Витамины». В качестве контроля усвоения материала было решено провести игровой конкурс между 4 студенческими группами по этой теме (форма КВН). Элемент состязательности резко повысил интерес студентов к изучению как обязательной, так и дополнительной литературы по данной теме. Игровая обстановка превратила конкурс в свободную и оживленную дискуссию, в процессе которой были достигнуты как контроль и коррекция знаний, так и самообучение студентов. На экзамене по биохимии студенты этих групп показали более глубокие знания по теме «Витамины» по сравнению с остальными студентами.

Опыт показывает, что часть студентов со средним уровнем знаний и умений формально относятся к выполнению лабораторных работ. Мотивация в виде ссылки на клиническое значение того или иного метода биохимического исследования не всегда достигает цели. В связи с этим в 6 студенческих группах наряду с выполнением запланированных лабораторных работ было предложено изучать методы биохимического исследования на модели острого алкогольного отравления, которое воспроизводилось внутрибрюшинным введением 20 % раствора этанола в дозе 3 г на 1 кг массы тела крысы. Для исследования предлагалась сыворотка крови крыс через 2 ч после введения этанола. Этот эксперимент проводила малая группа, сформированная на добровольных началах из 3—4 студентов. Результаты эксперимента вначале обсуждались с преподавателем в малой группе, а затем эта информация доводилась до сведения всей группы, рассматривались возможные механизмы изменений изучаемых биохимических показателей на базе изученного теоретического материала. Если в процессе дискуссии механизм раскрыть не удавалось, преподаватель не спешил с готовым решением, а предлагал обдумать возникшую задачу к следующему занятию. В результате у студентов повысился интерес к лабораторному практикуму и появилось ожидание открытия нового факта на предстоящем занятии.

Модель острого алкогольного отравления демонстрирует внешнюю картину острого опьянения и позволяет обнаружить вызванные алкоголем изменения обмена веществ: увеличение тимоловой пробы, снижение уровней мочевины и глюкозы в крови, повышение активности  $\alpha$ -амилазы,  $\gamma$ -глутаминилтранспептидазы и изменения в показателях липидного обмена в сыворотке крови и др. Это позволяет студентам с недостаточной лабораторной квалификацией все же получать значимые различия в величинах тех или иных тестов у контрольных и подопытных крыс. Эта модель использовалась 14 студентами при освоении лабораторного практикума в течение всего учебного года по индивидуальному плану.

На наш взгляд, основной предпосылкой для возникновения равноценной дискуссии между преподавателем и студентом может быть творческое содружество при решении конкретной задачи. Это было реализовано в группе студентов с высоким уровнем знаний и умений в рамках работы студенческой биохимической лаборатории (СБЛ). Для СБЛ была предложена тематика исследований, доступная для студентов II курса и в то же время имеющая реальное теоретическое и практическое значение: обследование состояния здоровья студентов II курса с целью выявления групп риска развития холестериноза. Поскольку эта тема сопряжена с общекафедральной темой научно-исследовательской работы, преподаватель — научный руководитель СБЛ — и студенты становятся единомышленниками в достижении конечной научной цели. Все студенты СБЛ разделены на малые группы по 4 человека, с которыми преподаватель и проводит основную работу по графику. Вся работа СБЛ планируется в виде годового цикла: подготовительный этап, анкетирование студентов и выявление групп риска, освоение биохимических методик и исследование с их помощью крови студентов с 3—4 факторами риска, анализ полученных результатов, рекомендации по оздоровлению. Лабораторный комплекс, осваиваемый студентами СБЛ, насчитывает 12 методик. Сама лабораторная работа приурочена к тому времени, когда студенты II курса изучают обмен липидов. Студенты СБЛ в этот период освобождались от обязательных лабораторных работ и проводили исследование по индивидуальным планам.

На всех этапах годового цикла работы СБЛ основной формой общения преподавателя со студентами была дискуссия. Особый интерес представляла заключительная дискуссия, на которой было представлено 9 последовательных по существу излагаемых вопросов-сообщений (по 7—10 минут каждый). Роль преподавателя заключалась в объединении всех докладов в логично связанную информацию и выделение наиболее важных теоретических и практических аспектов изучаемой проблемы. Так, студентами СБЛ показано, что при обследовании 327 студентов II курса факторов риска не было обнаружено у 30,4 % советских и 14,2 % иностранных студентов. По своей частоте факторы риска выстраивались в следующую последовательность: гипокинезия — наследственные факторы — курение — психоэмоциональные перегрузки — артериальная гипертензия — избыточная масса тела. Сочетание 3—4 факторов риска оказалось у 10 % советских и 16,8 % иностранных

студентов. При постановке таких студентов на диспансерный учет наиболее целесообразным явилось определение уровня холестерина в липопротеидах высокой плотности и подсчет атерогенного индекса, а не определение общего холестерина и триацилглицеринов. Преимуществом описанной формы организации самостоятельной работы студентов является творческое содружество преподавателя и студента в достижении средствами биохимии социально значимого результата: выявление групп риска — обоснование диспансеризации — создание комплекса оздоровительных мер. На экзамене все студенты СБЛ показали отличные и хорошие знания и большинство из них высказало желание работать в дальнейшем в научных студенческих кружках, используя биохимические методы исследования.

Таким образом использование дифференцированных форм организации самостоятельной работы позволяет студентам глубже проникать в теоретический материал и получать необходимые для врачебной деятельности практические навыки [2]. Кроме того, это путь к развитию творческих способностей каждого студента в зависимости от исходного уровня его знаний и умений.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ягодин Г. А. // Вестн. высш. школы. — 1986. — № 12. — С. 22—23.
2. Mehler A. H. // Biochem. Educ. — 1983. — Vol. 11, N 3. — P. 95—118.
3. Wood E. J. // Ibid. — 1988. — Vol. 16, N 1. — P. 13—16.

Поступила 13.07.89

#### DIFFERENTIAL FORMS OF SELF-DIRECTED STUDY OF BIOCHEMISTRY BY STUDENTS IN MEDICAL SCHOOL.

A. A. Chirkin, N. Yu. Konevalova

Medical School, Vitebsk

Methods of self-directed study of biochemistry by students are considered in connection with initial levels of their theoretical knowledge and laboratory experience. This type of training involved individual tasks and free discussion on the results obtained. Optimal results were observed in organization of self-directed work in small groups.