

ТОМ 36

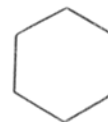
ВЫПУСК 6

НОЯБРЬ — ДЕКАБРЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



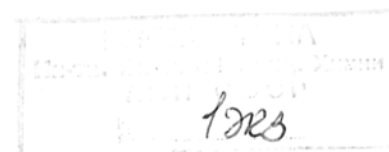
РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

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. РО-
МАКОВ, В. А. САКС, С. Е. СЕВЕРИН, В. Б. СПИРИЧЕВ, Е. А. СТРОЕВ

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

БАЕВ А. А. (Москва)	ТРОИЦКИЙ Г. В. (Симферополь)
БЫЧКОВ С. М. (Москва)	ТУРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)
КОНСТАНТИНОВ А. А. (Хабаровск)	ТЯХЕПЫЛД Л. Я. (Тарту)
КУДРЯШОВ Б. А. (Москва)	ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)
ЛЯХОВИЧ В. В. (Новосибирск)	ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)
ПАСХИНА Т. С. (Москва)	



© Л. Е. Панин, 1990

УДК 616.36-008.939.639.15-07

Л. Е. Панин

ЛИЗОСОМЫ И ОБМЕН ЛИПОПРОТЕИДОВ В ПЕЧЕНИ

Институт биохимии СО АМН СССР, Новосибирск

Коферментная роль апопротеинов хорошо известна. Так, показано, что апоА-I активирует холестеринацилтрансферазу. Аналогичный эффект дают ЛПВП. Напротив, апоА-II, входящие в состав ЛПВП, препятствовали эффекту апоА-I [10]. ЛПОНП и апоС-II повышали активность липопротеиновой липазы плазмы крови, в то время как апоС-I, апоА-I и богатый аргинином апопротеин ингибировали фермент [13].

Особый интерес представляют работы по апопротеиновой регуляции ферментов с внутриклеточной локализацией. Например, показано, что ЛПОНП и ЛПНП ингибируют активность β -оксид- β -метилглутарил-КоА-редуктазы в фибробластах кожи, клетках надпочечников, яичников, печени и т. д., а ЛПВП и их белковый компонент, напротив, повышают ее [8, 11]. Ранее нами было показано, что ЛПВП и ЛПОНП повышают активность АТФазы митохондрий печени крыс, причем апопротеины давали более выраженный эффект [3]. ЛПОНП и ЛПНП снижали скорость стероидогенеза в надпочечниках [4].

Роль липо(апо)протеинов в регуляции внутриклеточного метаболизма изучена недостаточно. Это связано, во-первых, с тем, что во многих тканях еще не обнаружены рецепторы ко всем классам липопротеидов (ЛП), во-вторых, прочно сложилось мнение, что ЛП после их интернализации подвергаются полной деградации во вторичных лизосомах клетки.

Учитывая это, мы попытались более подробно изучить взаимодействие плазменных ЛП с лизосомальным аппаратом и другими цитоструктурами клеток печени.

Методика. Работа выполнена на крысах-самцах линии Вистар массой 180–200 г. Препаративное выделение ЛП из плазмы крови осуществляли ультрацентрифугированием в растворе КВг [13] после освобождения ее от хиломикрон [3]. Центрифугирование проводили в роторе 75 Ti на ультрацентрифуге «Beckman» модель L5-75 (США) в течение 18–20 ч при 140 000 g. Полученные ЛПОНП ($d < 1,006$ г·см⁻³), ЛПНП ($d = 1,006–1,063$ г·см⁻³) и ЛПВП ($d = 1,063–1,210$ г·см⁻³) диализовали при 4 °С в течение 24 ч против 0,15 М раствора NaCl, содержащего 0,3 мМ ЭДТА, после чего выделенные ЛП метили по белковому компоненту ¹²⁵I [7, 15]. В растворе меченых ЛП с помощью 10 % ТХУ осаждалось 98 % радиоактивности. В липидной фазе ¹²⁵I-ЛП после экстрагирования ее смесью хлороформ–метанол (2:1) содержалось не более 8–10 % радиоактивности. ¹²⁵I-ЛП разбавляли физиологическим раствором

таким образом, чтобы конечная удельная радиоактивность составляла 20–60 имп·мин⁻¹·нг белка⁻¹. Полученный препарат вводили в хвостовую вену крыс в количестве 50 мкг белка на 100 г массы тела. Через 30 мин животных забивали, в образцах тканей определяли общую и удельную (на 1 мг ткани) радиоактивность. Для органов рассчитывали поглощение радиоактивности в процентах от введенной дозы.

Для получения субклеточных фракций гомогенат печени подвергали дифференциальному центрифугированию [10]. Выделяли фракцию крупных и мелких мембран, ядер, «тяжелых» митохондрий, лизосом с примесью «легких» митохондрий, микросом и надосадочную фракцию. Субклеточные фракции дополнительно дважды промывали и чистоту их оценивали методом энзиматического контроля [1].

Срезы печени толщиной 0,3–0,5 мм готовили после перфузии органа *in situ* холодным физиологическим раствором. Инкубацию осуществляли в бикарбонатном буфере Кребса–Рингера pH 7,4, содержащем 2 % альбумина и урановошенного с газовой средой, включающей 95 % O₂ и 5 % CO₂, при температуре 37 °С и постоянном покачивании. Продолжительность инкубации — 40 мин. При данных условиях инкубации срезы сохраняли свою жизнеспособность более 2 ч. В опытных пробах ЛП и их белковые компоненты вносили в количестве 0,2 мг белка на 1 мл инкубационной среды. Апопротеины получали в результате делипидирования ЛП охлажденной смесью хлороформ–метанол (2:1) с последующей многократной отмывкой эфиром.

Для оценки состояния лизосомального аппарата клеток печени определяли активность кислой фосфатазы по гидролизу β -глицерофосфата Na, катепсина D — по гидролизу гемоглобина и β -глюкозидазы по гидролизу *p*-нитрофенил- β -D-глюкопираноза. Определяли свободную, неосаждаемую и общую (с тритоном X-100) активность ферментов. Об осмотической устойчивости лизосомальных мембран судили по приросту неосаждаемой активности ферментов после предварительной инкубации гомогенатов в гипотонической среде (0,125 М раствор сахарозы pH 7, 4, 15 мин при 0 °С).

Достоверность различий средних величин оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. После внутривенного введения ¹²⁵I-ЛПОНП, ¹²⁵I-ЛПНП и ¹²⁵I-ЛПВП через 30 мин в печени обнаруживали соответственно 44, 27 и 7 % введенной дозы. В плазме крови сохранялось 50–60 % кислотоосаждаемой радиоактивности. Вместе взятые легкие, сердце, почки, надпочечники, яичники, тимус и селезенку включалось соответственно 4, 6 и 3, 2 % радиоактивности. Радиоактивность была обнаружена также в мышцах, жировой ткани, костном мозге и лимфатических узлах для всех классов ЛП. Очень много ЛПВП поглощали клетки ретикулоэндотелиальной системы (РЭС). Дать точную количественную оценку этого процесса в организме очень трудно. Однако для печеночного пула РЭС это было сделано нами ранее [6]. Оказалось, что липопротеидпоглощающая способность непаренхимных клеток печени по сравнению с гепатоцитами для ЛПОНП, ЛПНП и ЛПВП была соответственно в 6, 4 и 14 раз выше. В целом липопротеидпоглощающая способность печени обусловлена гепатоцитами, так как на непаренхимные клетки приходится не более 6,3 % объема всего органа [8]. Количество клеточных элементов РЭС в целом организме сопоставимо с

Таблица 1

Внутриклеточное распределение в печени крыс меченных по белку ^{125}I -ЛП через 30 мин после внутривенного введения, $\text{имп} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг белка}^{-1}$ фракции ($n=6$)

Субклеточные фракции	ЛПОНП	ЛПНП	ЛПВП
Крупные мембраны	165±29	342±64	201±36
Мелкие мембраны	203±36	167±37	180±35
Ядра	119±19	137±14	95±56
Митохондрии	392±70	669±213	291±43
Лизосомы	342±41	899±196	355±61
Микросомы	229±46	422±109	271±17
Цитозол клетки	69±17	276±53	171±24

таким органом, как печень, поэтому высокая скорость поглощения ими ЛПВП указывает на очень важную роль данной системы в обмене этой фракции ЛП.

Механизм захвата ЛП клетками может быть разный. В печени это рецепторно обусловленный эндоцитоз (через *apo B, E* рецепторы), перцепторный захват и захват через «сквинджер» рецепторы. Последний механизм связан с поглощением модифицированных ЛПНП. Показано, что 40 % модифицированных ЛПНП поглощаются гепатоцитами, а 50 % — эндотелиальными клетками [2]. Считается, что в клетке ЛП подвергаются деградации при участии лизосом.

Электронно-микроскопические исследования многих авторов, в том числе и наши, показали, что ЛП после захвата их клетками печени находятся в эндосомах. В дальнейшем происходит слияние последних с первичными лизосомами. В образовавшихся вторичных лизосомах происходит дезинтеграция ЛП-частицы.

Данные о распределении меченных ЛП в клетках печени представлены в табл. 1. Связь меченых ЛП с крупными мембранами отражает рецепцию ЛП цитоплазматическими мембранами клетки. Наличие метки в мелких мембранах преимущественно характеризует эндоцитоз. Появление метки в лизосомальной фракции указывает уже на слияние эндосом с лизосомами. Высокая удельная радиоактивность данной фракции свидетельствует о выраженности этого процесса. Однако, как видно из табл. 1, мечеными оказались и другие цитоструктуры: ядра, митохондрии, микросомы и цитозол клетки. Йодирование ЛП приводит к образованию ^{125}I -тирозина, который повторно не включается в белки и выводится из организма. Следовательно, высокая удельная радиоактивность всех цитоструктур не является результатом повторного включения метки в белок или результатом «загрязнения» их меченым тирозином после полного гидролиза апопротеинов в лизосомах, так как ме-

тка полностью осаждалась ТХУ и не отмывалась при очистке фракций.

На существенную неизменность структуры апопротеинов после интернализации ЛП указывает сохранение у них регуляторных свойств (табл. 2). Оказалось, что ЛПВП и апо-ЛПВП при инкубации их с переживающими срезами печени специфически повышали скорость гликолиза и гликогенолиза, однако не изменяли ее на субстратах, идущих в «гликолитической цепи» ниже гексокиназы и фосфоорилазы. Известно, что гликолиз — это цитоплазматический процесс. Возможность регуляции его с помощью апопротеинов указывает на способность последних проникать в цитоплазму клетки без изменения их структурных свойств или, возможно, после ограниченного протеолиза в лизосомах. На это же указывают данные табл. 1, где показано присутствие метки в достаточном количестве в цитозоле клетки. Именно цитозол клетки может быть источником апопротеинов и для других цитоструктур.

Взаимодействие ЛП и апо-ЛП с лизосомальным аппаратом печени носит сложный характер. Речь идет как о влиянии лизосом на ЛП, так и ЛП на лизосомы. Например, инкубация срезов печени с ЛПОНП, ЛПНП или ЛПВП не влияла на общую активность кислой фосфатазы, но значительно увеличивала свободную активность фермента — соответственно на 28, 76, 35 %. Кислая фосфатаза является преимущественно ферментом матрикса лизосом. Увеличение свободной при отсутствии каких-либо изменений ее неосаждаемой активности свидетельствует о повышении проницаемости лизосомальных мембран для субстрата, в данном случае β -глицерофосфата. Можно думать об образовании под влиянием апопротеинов в мембранах лизосом «пор», проницаемых для низкомолекулярных субстратов и непроницаемых для ферментов (табл. 3). Однако в условиях гипоосмотической среды инкубация срезов печени с апо-ЛПВП или апо-ЛПОНП приводила к резкому увеличению неосаждаемой активности кислой фосфатазы. Увеличение объема лизосом в гипоосмотической среде, по-видимому, повышала диаметр «пор» настолько, что делало возможным выход фермента в окружающую среду. Известно, что апопротеины, особенно такие как апо-А, обладают выраженными детергентными свойствами. После слияния эндосом с первичными лизосомами происходит дезинтеграция ЛП под влиянием лизосомальных ферментов с освобождением апопротеинов. Возможен также ограниченный протеолиз последних. Свободные апо-ЛП взаимодействуют с мембранами вторичных лизосом, приводя к образованию «пор» и снижая их механическую стойкость в гипоосмотической

Таблица 2

Влияние липопротеидов плазмы на скорость гликолиза и гликогенолиза в переживающих срезах печени крыс [4], $\text{нмоль лактата} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг белка}^{-1}$

Субстрат окисления	Ткань печени	Переживающие срезы			
		контроль	ЛПОНП	ЛПНП	ЛПВП
Глюкоза	9,1±1,1	9,3±0,7	10,4±1,1	12,1±1,1	13,5±1,4*
Гликоген	13,9±0,7	15,2±0,8	15,3±0,8	17,2±1,1	19,7±2,2*
Глюкозо-6-фосфат	23,1±1,6	23,0±1,1	21,3±1,8	21,7±1,8	24,7±2,2
Фруктозо-1,6-дифосфат	48,2±3,1	46,5±3,4	40,7±2,4	41,2±2,3	41,1±2,5

* $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

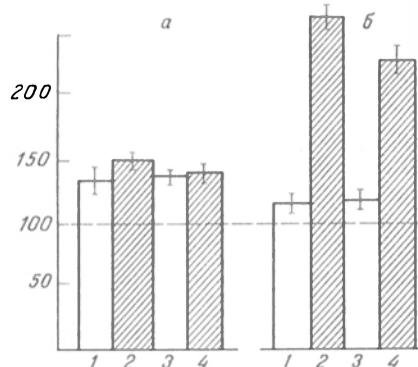
Влияние апо-ЛПВП и апо-ЛПОНП на активность кислой фосфатазы в переживающих срезах печени белых крыс

Условия опытов	Активность фермента			
	свободная, %	общая, мкмоль/мин на 1 г белка	неосаждаемая, %	неосаждаемая в гипотонической среде, %
Контроль (n=14)	4,35±0,37	25,96±0,51	3,40±0,40	3,89±0,60
Срезы+апо-ЛПВП (n=8)	5,96±0,80*	27,65±2,80	3,15±0,31	8,97±0,87*
Срезы+апо-ЛПОНП (n=6)	6,49±0,56*	26,67±2,20	3,08±0,27	10,50±0,98*

* $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

среде. Разумеется, этот процесс выражен в большей степени при добавлении в инкубационную среду апопротеинов, чем ЛП-частиц (см. рисунок). Интересно, что катепсин D — фермент со смешанной локализацией (в матриксе и мембранах лизосом) при добавлении в среду инкубации апо-ЛПВП изменял только свободную активность, которая повышалась на 54 % по сравнению с контролем. Мы рассматриваем этот эффект как проявление коферментных свойств одного из апо-ЛПВП. Мембраносвязанный фермент лизосом — β -глюкозидаза — не изменял своих каталитических свойств.

Таким образом, полученные нами результаты позволяют говорить, что апопротеины, образующиеся во вторичных лизосомах в результате дезинтеграции ЛП-частиц, не подвергаются гидролизу. Обладая детергентными свойствами, они активно взаимодействуют с лизосомальными мембранами, приводя к образованию в них пор, через которые не происходит выход ферментов в окружающую среду, но повышается доступ к ним соответствующих субстратов. Величина пор в гипотонической среде может увеличиваться настолько, что приводит к выходу из лизосом ферментов, однако в клетке такая ситуация практически невозможна. Низкомолекулярные апопротеины, проникая в цитоплазму, взаимодействуют со всеми цитоструктурами, реализуя при этом свои коферментные свойства, т. е. лизосомы под влиянием апопротеинов начинают работать по принципу сита.



Свободная (а) и неосаждаемая (б) активность кислой фосфатазы в переживающих срезах печени крыс при инкубации их с липопротеинами и апопротеинами.

По оси ординат — активность ферментов (в % от контроля). 1 — ЛПОНП, 2 — апо-ЛПОНП, 3 — ЛПВП, 4 — апо-ЛПВП.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арчаков А. И., Панченко Л. Ф., Капитанов А. Б. и др. // Цитология. — 1971. — Т. 13, № 7. — С. 887—894.
2. Ван Беркель, Харкес А., Нагелькерке Дж. // Федерация европейских биохимических о-в. Конф., 16-я: Тезисы докладов. — М., 1984. — С. 28.
3. Климов А. Н., Ловягина Т. Н., Баньковская Э. Б. // Лаб. дело. — 1966. — № 5. — С. 276—279.
4. Панин Л. Е. Биохимические механизмы стресса. — Новосибирск, 1983.
5. Панин Л. Е., Кузьменко Д. И. // Рукопись деп. в ВИНТИ, № 1879. Деп., 1979.
6. Панин Л. Е., Усыйнин И. Ф., Поляков Л. М. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 4. — С. 106—110.
7. Bilheimer D. W., Eisenberg S., Levy R. I. // Biochim. biophys. Acta. — 1972. — Vol. 260. — P. 212—221.
8. Blouin A., Bolender R. P., Weibel E. R. // J. Cell. Biol. — 1977. — Vol. 72. — P. 441—455.
9. Catapano A. L., Gianturco S. H., Kinnunen P. K. J. et al. // J. Biol. Chem. — 1979. — Vol. 254. — P. 1007—1009.
10. De Duve C., Pressman B. C., Gianetto R. et al. // Biochem. J. — 1955. — Vol. 60. — P. 604—617.
11. Fielding C. J., Shore V. G., Fielding P. E. // Biochem. biophys. Res. Commun. — Vol. 46. — P. 1493—1498.
12. Gianturco S. H., Eskin S. G., Navarro L. T. et al. // Biochim. biophys. Acta. — 1980. — Vol. 618. — P. 143—152.
13. Hatch F. T., Lees R. S. // Advanc. Lipid. Res. — 1968. — Vol. 6. — P. 2—68.
14. Kinnunen P. K., Jackson R. L., Smith L. C. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1977. — Vol. 74. — P. 4818—4851.
15. McFarlane A. S. // Nature. — 1958. — Vol. 182. — P. 53—58.

Поступила 20.03.90

LYSOSOMES AND LIPOPROTEIN METABOLISM IN LIVER TISSUE

L. E. Panin

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

Apoproteins were not hydrolyzed completely in liver cells after internalization of lipoproteins. They were accumulated in secondary lysosomes as a result of lipoprotein desintegration and reacted actively with lysosomal membranes, thus inducing pore-formation in the structures. Under these conditions lysosomal enzymes were not liberated into the environmental medium, while contact with the corresponding substrates was increased. Small molecular mass enabled the apoproteins to penetrate into cell cytoplasm, where they could interact with all the cytostructures: nuclei, mitochondria, microsomes and cytosol, carrying out their coenzymatic properties.

Н. И. Маянская, Л. Е. Панин, Ю. А. Николаев,
С. Д. Маянская

НЕКОТОРЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВОВЛЕЧЕНИЯ ЛИЗОСОМ В ПРОЦЕССЫ ТКАНЕВОГО ПО- ВРЕЖДЕНИЯ

Институт биохимии СО АМН СССР, Новосибирск

Открытие лизосом (Лз) [10] повлекло за собой исследование их роли в патологии. В настоящее время включение Лз в развитие патологических процессов может быть представлено в связи со следующими механизмами: 1) с перегрузкой вакуолярного аппарата вследствие несоответствия переваривающей способности Лз количеству и качеству поступающих в клетку субстратов; 2) с вторичной активацией этого аппарата в ответ на повреждение клетки; 3) с прямым действием на компоненты цитоплазмы и цитоструктуры лизосомальных ферментов, оказавшихся за пределами Лз при нарушении целостности их мембран; 4) с повреждающим действием лизосомальных гидролаз, секретированных клетками — профессиональными фагоцитами. Наиболее часто лизосомальный аппарат клеток включается в развитие патологических сдвигов за счет резкого неуправляемого усиления катаболических функций, что можно наблюдать, например, при большинстве стрессорных воздействий, неадекватных адаптивным возможностям организма [6]. В то же время на умеренные воздействия лизосомальный аппарат клеток отвечает реакцией активации, которая не сопровождается его повреждением и направлена на оптимизацию адаптации внутриклеточного метаболизма и структур к новым условиям существования [4]. До сих пор остается не ясным, какие механизмы лежат в основе нарушения реакции адаптации и вовлечения лизосомального аппарата в процессы инициации

и развития тканевого повреждения. Для решения этого вопроса представлялось целесообразным провести исследование лизосомального аппарата при нарастании тяжести стрессорного воздействия и выявить корреляции с появлением патологических изменений в организме. С этой целью в настоящей работе применяли дозированную физическую нагрузку разной интенсивности и длительности и измеряли активность лизосомальных ферментов в печени, сердце, скелетных мышцах, крови у крыс, а также в крови у практически здоровых людей и у больных с сердечной патологией разной тяжести.

Методика. Крыс-самок Вистар массой 150—200 г подвергали дозированной физической нагрузке в виде плавания в воде с температурой 30—32 °С в течение 1—3,5 ч без груза или с грузом, составляющим 4 % массы тела, однократно или ежедневно в течение 10 дней.

В гомогенате печени, сердечной и скелетных мышц определяли свободную, неосаждаемую (105 000 g, 60 мин) и общую (в присутствии 0,1 % тритона X-100) активность маркерных лизосомальных ферментов: кислой фосфатазы [10], катепсина D [7], β-глюкозидазы [7], β-галактозидазы [7] и кислой ДНКазы [5]. Параллельно активность этих же ферментов определяли в сыворотке крови. Количество белка в пробах измеряли методом Лоури [13].

Для обзорного микроскопического исследования кусочки тканей фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина и заключали в парафин или резали на замораживающем микротоме. Срезы окрашивали гематоксилин-эозином или на кислую фосфатазу по Гомори [1].

Для электронной микроскопии исследуемый материал после фиксации в растворе глутаральдегида и обезвоживания заливали в аралдит. Исследование ультратонких срезов проводили на электронном микроскопе JEM-100 (Япония).

Кроме того, исследовали активность лизосомальных ферментов в крови у больных с патологией сердечно-сосудистой системы. Под наблюдением находились больные с ишемической болезнью сердца (ИБС) — с прогрессирующей стенокардией, мелкоочаговым и крупноочаговым инфарктом миокарда и гипертрофической кардиомиопатией (ГКМП) — без явлений сердечно-сосудистой недостаточности и с недостаточностью I—IIA стадии. Группами сравнения для последующих служили больные нейроциркуляторной дистонией (НЦД) по кардинальному типу без признаков органических изменений в сердце, а также спортсмены-тяжелотлеты с более или менее выраженной гипертрофией миокарда, но без клинических признаков какой-либо патологии.

Таблица 1

Активность лизосомальных ферментов в печени и мышечных тканях крыс при физической нагрузке

Условия опытов		Активность ферментов в печени			Общая активность в мышцах, мкмоль/мин на 1 г белка	
		общая, мкмоль/мин на 1 г белка	свободная, %	прирост свободной в гипотонической среде, %	скелетных	сердечной
Контроль (22)	1	20,4±0,92	11,0±0,63	8,8±0,60	13,6±1,12	7,6±0,26
	2	1,1±0,04	20,6±1,12	24,0±1,50	0,4±0,02	0,6±0,03
	3	7,1±0,43	18,0±0,75	11,2±0,87	2,3±0,20	2,0±0,16
Плавание 3,5 ч без груза (18)	1	20,7±1,50	21,1±1,30*	25,9±2,00**	15,4±1,32	8,0±0,46
	2	1,1±0,09	33,7±0,92*	16,4±1,21	0,6±0,06*	0,7±0,05
	3	7,3±0,43	22,0±2,00	18,0±1,02*	3,3±0,20*	3,8±0,26**
Плавание 3,5 ч с грузом (20)	1	19,2±1,50	24,1±0,73**	32,1±2,83**	14,4±0,96	9,6±0,30*
	2	1,0±0,10	33,0±0,89*	19,8±2,00	0,6±0,05*	0,9±0,05**
	3	7,5±0,30	26,0±2,00*	22,7±1,34**	2,2±0,11	3,7±0,23**
Истощающая нагрузка (9)	1	22,1±1,99	43,0±4,03**	20,8±3,31*	16,0±1,00	14,6±0,60**
	2	1,1±0,04	31,0±1,05*	19,7±4,52	0,5±0,04	0,8±0,05
	3	6,6±0,46	29,6±2,08*	13,8±1,10	2,1±0,11	2,2±0,20

Примечания. 1 — кислая фосфатаза; 2 — катепсин D; 3 — β-глюкозидаза. Свободная активность ферментов в печени и ее прирост в гипотонической среде выражены в процентах общей активности. Звездочками здесь и в следующих таблицах обозначены достоверные отличия от контроля: одна звездочка — $p < 0,05$, две звездочки — $p < 0,01$. В скобках — число животных.

Таблица 2

Активность ферментов в сыворотке крови крыс после физической нагрузки, мкмоль/мин⁻¹·л сыворотки⁻¹ ($M \pm m$; $n=11$)

Условия опытов	Кислая фосфатаза	Катепсин D
Контроль	110±6,76	0 — следы
Плавание с грузом 3,5 ч	109±12	0 — следы
Истощающая нагрузка	121±14	5,6±0,2

У больных ГКМП активность ферментов определяли в состоянии покоя, на высоте дозированной физической нагрузки и в динамике восстановительного периода через 3, 12 и 24 ч. Физическая нагрузка проводилась в виде ступенчатой, непрерывно нарастающей спирометрии (СВЭМ) до достижения субмаксимальной частоты сердечных сокращений.

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

Результаты и обсуждение. Уже через 1 ч после начала мышечной работы во всех изучаемых тканях экспериментальных животных начинала обнаруживаться заметная активация Лз, которая еще больше усиливалась через 3,5 ч, особенно при усилении нагрузки путем отягощения грузом (табл. 1): повышалась общая активность ферментов в мышечных тканях, свободная активность в печени, увеличивалась осмотическая чувствительность Лз печени, определяемая по приросту свободной активности ферментов после инкубации гомогената в гипотонической среде. Активация Лз не сопровождалась какими-либо признаками их повреждения: не увеличивалась неосаждаемая активность ферментов, не было нарушения осмотических свойств Лз, в крови активность кислой фосфатазы не превышала контрольных значений, а активность катепсина D определялась лишь в следовых количествах (табл. 2).

Результаты биохимического исследования лизосомального аппарата печени и мышечных тканей коррелировали с данными гистохимического и электронно-микроскопического изучения. Уже после однократной нагрузки в сердце и скелетных мышцах наряду с выраженными явлениями гипертрофии митохондрий и гиперплазии эндоплазматического ретикула обнаруживалось увеличение числа первичных и вторичных Лз. В печени с помощью гистохимической реакции выявлялись отчетливое повышение активности кислой фосфатазы, увеличение числа гранул, дающих положительную реакцию на кислую фосфатазу, их агрегация и образование конгломератов. При электронной микроскопии определялось нарастание количества Лз аутофагического типа.

При дальнейшем увеличении мышечной нагрузки (физическая работа в истощающем режиме — плавание в течение 3,5 ч с грузом после 10-дневной нагрузки по 1 ч также с грузом) во всех исследованных тканях наблюдалась мощная активация лизосомального аппарата (см. табл. 1). При этом появлялись многочисленные признаки нарушения целостности Лз: на 33—111 % повышалась неосаждаемая активность кислой фосфатазы и катепсина D в сердечной и скелетных мышцах, в печени наблюдалось нарушение осмотических свойств Лз, что проявлялось в снижении прироста свободной активности ферментов после инкубации гомогената в гипотонической среде по сравнению с менее жесткими воздействиями.

В крови выявлялся высокий уровень активности катепсина D (см. табл. 2). При микроскопическом исследовании в этих тканях после истощающей физической нагрузки обнаруживались более или менее крупные некротические и некробиотические изменения. Так, в миокарде возникали мелкоочаговые повреждения миокардиоцитов. Часть из них была резко эозинофильной при окраске гематоксилин-эозином, другая, напротив, плохо воспринимала красители. При исследовании в поляризованном свете выявлено повреждение сократительного аппарата мышечных клеток: контрактура миофибрилл или их лизис. Чаще всего обнаруживался контрактурный тип повреждения с последующим коагуляционным некрозом клеток. В скелетных мышцах нередко находили гомогенные, почти не структурированные восковидные очаги протяженностью 20—30 саркомеров, усиленно связывающие как кислые, так и основные красители. Обнаруживаемая в поляризованном свете анизотропия дисков свидетельствовала о контрактурном повреждении мышечных волокон. В печени в этих условиях наблюдались гиперемия и отек стромы, дистрофические изменения гепатоцитов и некроз отдельных клеток. Таким образом, примененная нами нагрузка в истощающем режиме была для крыс чрезмерной по силе и вызывала патологические изменения той или иной выраженности как в мышечных тканях, так и в печени.

Подобную динамику перестройки лизосомального аппарата клеток от биологически целесообразной, адаптивной, до повреждения Лз и возникновения патологических изменений в тканях наблюдали по мере увеличения срока полного голодания [4, 6, 22], при нарастании длительности и степени гипоксического воздействия [19], дозы ионизирующей радиации [15], некоторых генотоксических ядов [2] и т. д. Во всех этих случаях массивное нарушение целостности лизосомальных мембран сопровождалось выходом активных кислых гидролаз в цитоплазму и циркулирующую кровь с последующим развитием цепного цитолитического процесса и повреждением ткани.

Выявление повышенного содержания лизосомальных ферментов в крови является ранним и весьма чувствительным тестом, свидетельствующим о патологических изменениях в тканях, а конкретно — об их деструктивном компоненте [4]. Вместе с тем лизосомальные ферменты, попавшие в кровь, сами, включаясь в цепной цитолитический процесс, могут вызывать неблагоприятные патологические изменения в организме и вследствие этого являются важным патогенетическим звеном многих заболеваний и их осложнений. С этой точки зрения гиперферментемия, вероятно, следует рассматривать как прогностический признак, характеризующий тяжесть патологии. Это хорошо прослеживается в наблюдениях на больных с клиническим течением болезни разной тяжести.

При измерении активности маркерных лизосомальных гидролаз в сыворотке крови у больных ГКМП, часть из которых страдали недостаточностью кровообращения I—IIА стадии, активность всех определяемых ферментов в состоянии покоя была значительно выше, чем в группах сравнения:

Таблица 3

Активность лизосомальных ферментов в сыворотке крови у больных ГКМП после дозированной физической нагрузки, мкмоль·мин⁻¹·л сыворотки⁻¹

Группа наблюдений		Кислая фосфатаза	Катепсин D	Кислая ДНК-аза	β-Глюкозидаза	β-Галактозидаза
I. Контроль (спортсмены: (n=7)	1	44,0±2,75	10,1±1,67	43,5±2,66	35,2±2,76	53,2±2,82
	2	28,1±2,53*	10,0±1,71	50,6±2,80	41,2±2,76	60,1±3,01
	3	39,9±2,82	11,6±1,87	52,0±3,05	32,0±2,40	63,8±2,72
	4	52,9±3,36	13,0±2,07	51,8±2,40	29,1±2,61	55,1±2,94
	5	49,6±3,15	10,5±1,79	45,6±2,88	27,2±2,88	48,1±3,09
II. Больные НЦД (n=29)	1	42,0±4,15	9,3±0,94	34,0±4,69	23,0±2,48	52,8±5,14
	2	42,5±5,62	8,8±0,76	48,5±4,48	29,8±4,05	51,2±5,85
	3	51,9±4,92	9,4±1,60	59,9±5,31*	25,8±4,35	57,7±5,33
	4	45,2±5,19	9,4±2,11	45,3±4,44	29,4±3,65	55,8±5,39
	5	47,6±5,37	8,4±1,43	40,3±4,59	20,2±2,59	46,4±5,32
III. Больные ГКМП без сердечной недостаточности (n=41)	1	54,5±4,59	12,0±1,10	54,5±5,60	33,8±4,75	87,6±6,89
	2	$p_{III-I} < 0,05$	$p_{III-I} < 0,05$	$p_{III-I} < 0,05$	$p_{III-I} < 0,05$	$p_{III-I} < 0,001$
	3	55,4±5,14	11,4±1,04	57,2±6,50	44,4±5,44	115,3±7,02**
	4	56,3±5,10	12,5±1,15	65,4±5,91	52,3±6,24*	89,1±6,80
	5	68,2±4,98*	12,1±1,10	82,5±6,66*	38,3±4,28	80,1±6,95
IV. Больные ГКМП с сердечной недостаточностью (n=18)	1	67,6±6,80	11,1±1,00	57,5±6,95	34,8±2,71	70,5±6,51
	2	62,8±4,66	12,7±0,42	83,9±5,29	30,5±4,87	115,2±5,00
	3	$p_{IV-I} < 0,01$	$p_{IV-I} < 0,05$	$p_{IV-I} < 0,01$		$p_{IV-I} < 0,01$
	4	52,7±4,54	14,7±2,52	69,8±4,34	53,4±4,20*	137,7±4,66**
	5	61,6±4,17	13,8±2,20	88,3±4,78	50,1±4,59*	121,8±5,15
		76,4±4,61	19,5±2,92*	87,0±4,50	42,7±4,56	96,1±4,95
		73,1±5,90	13,2±1,24	69,5±4,76	29,6±3,85	81,4±4,46

Примечания: 1 — состояние покоя; 2 — сразу после физической нагрузки; 3 — через 3 ч; 4 — через 12 ч; 5 — через 24 ч после нагрузки; n — число наблюдений. Звездочками обозначено достоверное отличие по отношению к состоянию физического покоя.

у больных НЦД и у спортсменов (табл. 3). Еще более контрастно эти различия проявлялись после дозированной физической нагрузки. Обращало на себя внимание то, что одна и та же по величине нагрузка, будучи адекватной для спортсменов и больных НЦД, не вызывала высвобождения лизосомальных ферментов в кровь, за исключением небольшого повышения активности кислой ДНКазы у больных НЦД через 3 ч после спировелоэргометрии. Для больных ГКМП эта нагрузка оказалась чрезмерной, что проявилось еще более значительным повышением активности кислых гидролаз в сыворотке крови через 3—12 ч после спировелоэргометрии. Все указанные сдвиги были еще ярче у

больных ГКМП с сердечной недостаточностью I—IIA стадии.

Четкая зависимость уровня ферментемии от клинической тяжести заболевания обнаружена нами также при определении активности лизосомальных ферментов в крови у больных ИБС в динамике после болевого приступа: хотя повышение активности лизосомальных ферментов в крови было найдено у всех наблюдаемых больных, при мелкоочаговом инфаркте миокарда оно было выше, чем при прогрессирующей стенокардии. Наиболее высокие значения обнаружены у больных с крупноочаговым инфарктом миокарда (табл. 4).

Таблица 4

Активность лизосомальных ферментов в крови у больных ИБС в динамике восстановления после болевого приступа, мкмоль·мин⁻¹·л⁻¹

Группа наблюдений		Сутки наблюдения				
		1-е	3-е	5-е	7-е	10-е
I. Контроль (доноры) (n=12)	1	42,0±2,58	39,3±4,31	40,0±4,22	42,3±3,70	37,0±5,32
	2	10,0±1,83	10,3±1,54	9,8±1,28	11,3±1,45	11,8±2,00
	3	22,8±2,45	25,4±3,00	23,8±3,02	26,2±3,35	23,4±1,87
	4	50,6±4,83	43,8±3,78	52,1±4,40	50,0±2,85	45,7±4,03
II. Прогессирующая стенокардия (n=18)	1	44,2±3,00	50,3±2,78	58,7±3,30*	53,2±4,11	48,2±3,82
	2	30,0±4,44*	28,3±3,32*	22,1±2,50*	17,8±2,01	18,0±2,50
	3	60,0±5,62**	67,3±5,83**	70,1±6,22*	46,3±5,90**	52,0±5,00**
	4	102,0±9,89**	115,0±12,8*	75,3±7,02*	82,1±6,82*	80,0±6,60*
III. Мелкоочаговый ин-фаркт миокарда (n=17)	1	52,0±5,00	42,0±3,83	39,1±4,00	38,5±3,00	40,0±2,80
	2	45,0±3,20**	12,0±1,83	11,1±0,98	7,6±2,20	6,3±2,40
	3	$p_{III-I} < 0,05$				
	4	65,2±6,11**	80,1±7,33**	78,0±5,90**	75,3±5,18**	72,2±6,00**
IV. Крупноочаговый ин-фаркт миокарда (n=18)	1	142,2±8,33***	145,0±9,20**	133,1±7,80**	115,3±8,4**	87,0±7,77**
	2	76,6±9,20**	83,1±7,77*	81,2±7,20**	83,8±7,83**	85,2±8,00***
	3	$p_{IV-III} < 0,05$	$p_{IV-III} < 0,01$	$p_{IV-III} < 0,01$	$p_{IV-III} < 0,01$	$p_{IV-III} < 0,01$
	4	48,2±5,11**	30,1±2,80**	36,0±4,11**	34,8±3,8**	20,8±3,00*
	5			$p_{IV-III} < 0,01$	$p_{IV-III} < 0,01$	
	6	96,3±7,72**	82,0±7,60**	78,0±5,30**	85,3±6,90*	98,2±9,20**
	7	$p_{IV-III} < 0,01$				
	8	130,3±9,13**	152,2±11,1**	182,0±12,2**	144,0±11,0*	148,2±9,2*

Примечания: 1 — кислая фосфатаза; 2 — катепсин D; 3 — β-глюкозидаза; 4 — кислая ДНК-аза.

Механизмы деструктивных изменений Лз под влиянием физических и химических агентов во многом остаются невыясненными. Среди многих возможных молекулярных механизмов повреждения Лз особо можно отметить повреждение протонного насоса, ведущее к чрезмерному закислению или, напротив, к ощелачиванию внутрилизосомального компартмента [13, 16]. На внутриклеточное закисление до некоторой критической величины и увеличение протеолиза как на одну из причин, вызывающих неуправляемую активацию Лз, указывали многие авторы при чрезмерной физической нагрузке [17, 18], при коронарогенных и некоронарогенных некрозах миокарда [21]. Важным фактором дестабилизации лизосомальных мембран и как следствие утечки активных кислых гидролаз в кровь является активация фосфолипаз, которые могут атаковать не только лизосомальные мембраны, но и другие мембранные образования, особенно сопредельных с Лз структур: в результате накопления лизофосфолипидов резко нарушаются целостность мембран и их функции [11, 20]. Определенный вклад в повреждение Лз и освобождение лизосомальных ферментов вносят процессы свободнорадикального окисления [12], что может лежать в основе ряда патологических состояний, включая и чрезмерную физическую работу [9]. Показано, что Лз могут накапливать продукты перекисного окисления липидов, что можно рассматривать как вторичную антиоксидантную защиту, но при этом они сами повреждаются, высвобождая ферменты в цитоплазму и вызывая гибель субклеточных структур [8].

По нашему мнению, в каждом из патологических процессов имеется не один какой-то отдельно взятый фактор дестабилизации Лз, а сочетание нескольких разных механизмов. Это заключение дает основание для поиска комплексных подходов к профилактике и коррекции лизосомозависимого тканевого повреждения при разных видах патологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агеев А. К. // Гистохимия щелочной и кислой фосфатазы человека в норме и патологии. — Л., 1969.
2. Блюгер А. Ф., Майоре А. Я., Бологова М. А. и др. // Бюл. экспер. биол. мед. — 1974. — Т. 78, № 3. — С. 109—113.
3. Панин Л. Е., Маянская Н. Н. // Бюл. экспер. биол. мед. — 1977. — № 6. — С. 678—680.
4. Панин Л. Е., Маянская Н. Н. // Лизосомы: роль в адаптации и восстановлении. — Новосибирск, 1987.
5. Покровский А. А., Арчаков А. И. // Современные методы в биохимии. — М., 1968. — С. 5—59.
6. Покровский А. А., Тутельян В. А. // Лизосомы. — М., 1976.
7. Barrett A. // Lysosomes, a laboratory handbook. — Amsterdam — London, 1972. — P. 46—149.
8. Brunk U., Cadenas E. // AMPIS. — 1988. — Vol. 96. — P. 3—13.
9. Davies K. J. A., Quintanilha A. T., Brooks G. A., Packer L. // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1982. — Vol. 107, N 4. — P. 1198—1205.
10. De Duve C., Pressman B. C., Gianette R. et al. // Biochem. J. — 1955. — Vol. 60, N 4. — P. 604—617.
11. Duncan C. J. // Cell Tissue Res. — 1988. — Vol. 253, N 2. — P. 457—462.
12. Imai K., Aimoto T., Sato M. et al. // Chem. Pharm. Bull. Tokyo. — 1988. — Vol. 36, N 11. — P. 4608—4612.
13. Leighty E., Stoner C. D., Ressallat M. M., Passananti G. T. et al. // Circulat. Res. — 1967. — Vol. 21, N 7. — P. 59—64.
14. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265—275.

15. Reynolds C., Wills E. D. // Int. J. Radiat. Biol. — 1974. — Vol. 25, N 2. — P. 113—120.
16. Schneider D. L., Manara F. S. // Res. Commun. Subst. — 1985. — Vol. 6, N 2. — P. 117—126.
17. Tischler M. E. // Biochem. J. — 1980. — Vol. 192, N 3. — P. 963—966.
18. Tullson P., Armstrong R. B. // Experientia. — 1981. — Vol. 37, N 12. — P. 1311—1311.
19. Wattiaux R., Wattiaux-DeCononck S. // Intern. Rev. Exp. Path. — 1984. — Vol. 26. — P. 85—107.
20. Weglicki W. B., Dickens B. F., Mak I. T. // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1984. — Vol. 124, N 1. — P. 229—235.
21. Wildenthal K. // Lysosomes in Biology and Pathology. — Amsterdam, 1975. — Vol. 4. — P. 167—191.
22. Wildenthal K., Poole A. R., Dingle J. T. // J. Mol. Cell. Cardiol. — 1975. — Vol. 7, N 11. — P. 841—855.

Поступила 20.03.90

SOME MECHANISMS OF LYSOSOMES INVOLVEMENT IN TISSUE INJURY

N. N. Mayanskaya, L. E. Panin, Yu. A. Nikolaev, S. D. Mayanskaya

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

Impairments in structural integrity of liver, heart and skeletal muscle lysosomes followed by necrotic and necrobiotic alterations in the tissues and secretion of active hydrolases in blood were detected under conditions of exhaustive physical exercises in rats when dose-dependent physical loading was studied. At the same time, in patients with hypertrophic cardiomyopathy physical loading, carried out as stepwise spirometry up to the submaximal heart rate, led to release of lysosomal enzymes into blood, which was not observed in healthy persons under similar conditions. The higher level of enzymes was found in circulation of the patients with most severe forms of the disease.

© Ю. А. МАЗИНГ, 1990

УДК 616.155.348-018.1:576.311.344]-008.939.6-07

Ю. А. Мазинг

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ КАТИОННЫХ БЕЛКОВ ЛИЗОСОМ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ

НИИ экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград

Катионные белки (КБ), получившие свое название из-за высокого положительного заряда их молекулы, занимают одно из ведущих мест в реализации и координации неспецифических защитных реакций организма. Они обладают широким спектром антимикробного действия, свойствами медиатора воспаления, фактора проницаемости, стимулятора метаболических процессов, неспецифических опсоинов при фагоцитозе. Многолетние исследования, проводившиеся под руководством проф. В. Е. Пигаревского, позволили обосновать гипотезу о КБ как биологически активных веществах, отобранных эволюцией в качестве молекулярного механизма барьерных функций организма [17]. Однако не исключено, что при ряде заболеваний КБ могут оказывать повреждающее действие. В настоящее время наиболее подробно изучены КБ, локализованные в азурофильных и специфических гранулах нейтрофилов. Образующиеся в промиелоцитарной стадии азурофильные гранулы содержат миелопероксидазу, эластазу, катепсин G, бактерицидный белок, увеличивающий проницаемость, лизоцим, дефенсины.

Возникающие на стадии миелоцита специфические гранулы нейтрофила заключают в себе меньший набор КБ — лактоферрин, лизоцим, дефенсины, витамин В₁₂, связывающий белок. Для суммарной оценки содержания КБ создан цитохимический метод, получивший название лизосомально-катионного теста (ЛКТ) [15, 16, 18, 19]. Применение ЛКТ в повседневной практике обследования больного показало его высокую эффективность как нового критерия оценки антимикробной защиты, позволило создать предпосылки для качественного изменения тактики лечебно-профилактических мероприятий при различных формах патологии человека [9].

Цитохимически КБ выявляются в специализированных клетках губок и асцидий, гранулоцитах крови лягушек, птиц (куры, гуси, утки, голуби) и млекопитающих. Наиболее высокая интенсивность окраски гранул наблюдается у нейтрофилов кролика, далее по мере снижения реакции располагаются гранулы клеток морской свинки, человека и обезьяны, лошади, крысы и крупного рогатого скота. В нейтрофилах мышей КБ с помощью ЛКТ не выявляются, хотя биохимически показано наличие многих из них. Это связано с тем, что краситель прочный зеленый, положенный в основу ЛКТ, связывается только с поверхностью гранулы, практически не меняя ее размеров. Величина же гранул нейтрофилов мышей находится ниже пределов разрешения светового микроскопа.

В процессе эмбрионального развития человека КБ, по-видимому, появляются в нейтрофильных гранулоцитах одновременно с моментом появления этих клеток в тканях. Нейтрофилы, обнаруживаемые в тонкой и толстой кишках, печени, селезенке, тимусе, легких уже на 13-й неделе гестации содержат лактоферрин [46]. Лизоцим в гранулоцитах легких выявляется с начала 12-й недели гестации, а тонкой кишки — с 16-й недели [41]. Однако к моменту рождения ребенка определяемое цитохимически содержание КБ в нейтрофильных гранулоцитах периферической крови существенно ниже, чем у взрослых доноров [1, 3, 7, 10, 28], причем их дефицит сохраняется и на 5-е сутки жизни [20]. При определении активности КБ миелопероксидазы в нейтрофилах крови новорожденных детей получены противоречивые результаты: одни авторы не нашли различий с клетками взрослых [14, 28, 31, 32, 42, 47], другие обнаружили существенный ее дефицит [2, 13, 20, 36, 37]. Установлены также 2-кратное снижение содержания лактоферрина в нейтрофилах новорожденных детей [31, 39] и существенный дефицит лизоцима [31]. В исследованиях на животных мы выявили значительный дефицит КБ у новорожденных телят [23], кроликов [20] и крыс. Суммарное их содержание у телят оказалось ниже, чем у половозрелых животных, на 20 %, у кроликов — на 15 %, у крыс — на 30 %. При определении активности миелопероксидазы обнаружено ее существенное снижение у телят, 5-кратное у кроликов и 7-кратное у крыс. Другие авторы [35] также выявили у новорожденных крыс только 25 % активности миелопероксидазы от ее уровня у взрослых животных. Крайне низкий уровень миелопероксидазы сохраняется у крыс в течение первых 10 дней развития, затем резко возрастает, но к 20-му дню остается все же ниже показателей у

взрослых животных. Если у половозрелых крыс содержание КБ в нейтрофильных гранулоцитах костного мозга всегда на 30 % выше, чем в клетках периферической крови, то в период постнатального развития до 21-го дня оно одинаково. Следовательно, у новорожденных отсутствует характерная для взрослых особей секретиция части КБ при выходе гранулоцитов из костного мозга. Этот факт может свидетельствовать о дефектном формировании рецепторных полей нейтрофилов новорожденных, поскольку показано [33], что Fc- и C3-рецепторы появляются в мембране специфических гранул. Соответственно их функционирование возможно лишь после встраивания в наружную мембрану клетки после дегрануляции, которая неизбежно будет сопровождаться секрецией КБ.

Новорожденные чрезвычайно чувствительны к инфекциям, вызываемым бактериями и грибами [38]. Несомненно, за это ответствен дефицит антител, комплемента, Т-лимфоцитов, поэтому новорожденный находится в состоянии естественной (физиологической) иммунной недостаточности [43, 44]. Однако в большей степени дефектность защиты обусловлена многочисленными аномалиями нейтрофильных гранулоцитов [40]. Обнаруживаемый дефицит КБ, в значительной мере формирующий антимикробный потенциал этих клеток, существенно усугубляет неэффективность защиты организма хозяина в период новорожденности. Но биологический смысл функциональной неполноценности нейтрофильных гранулоцитов новорожденных млекопитающих остается непонятным. Возможно, таким образом обеспечивается происходящая в этот период микробная колонизация желудочно-кишечного тракта. Антимикробная защита в этом случае гарантируется молоком матери, имеющим в высокой концентрации такие КБ, как лактоферрин, лактопероксидаза, лизоцим, и содержащим многочисленные фагоциты [34, 45].

Дефицит КБ у новорожденных не может быть объяснен стрессорной реакцией на роды, поскольку сохраняется длительное время. В эксперименте нами было показано [25], что иммобилизация крыс в течение 4 ч приводит после стресса к снижению показателей ЛКТ, но уже через 1 сут они возрастают и оказываются выше исходного уровня. Через 96 ч после стресса уровень КБ в нейтрофилах периферической крови выше нормы, но в клетках костного мозга он существенно ниже исходного уровня. Однократное стрессорное воздействие приводит к тому, что нейтрофильные гранулоциты циркулирующего пула становятся обладателями большего антимикробного потенциала, но их ближайший резерв в костном мозгу ослаблен и функционально менее состоятелен. Снижение содержания КБ непосредственно после стрессорного воздействия зарегистрировано при политравме у людей [27], интенсивной физической нагрузке у спортсменов [21] и кроликов [29], при иммобилизации крыс [24]. При иммобилизации доноров стафилококковым анатоксином происходит увеличение содержания КБ в нейтрофилах крови на 20 %, причем пик совпадает с периодом начала наиболее интенсивного антителообразования [11]. При многократной иммобилизации крыс уровень КБ возрастает, но при 4—5-кратном воздей-

ствии эффект снижается [6]. Приведенные авторами сведения о такой же реакции нейтрофилов мышей в силу описанных выше причин (мелкие гранулы клеток этих животных, не различимые в световой микроскоп), по-видимому, относятся к эозинофильным гранулоцитам, также содержащим КБ. Вероятно, такая же ошибка допущена авторами [22], которые анализировали воздействие антигенного стимула на содержание КБ в клетках крови мышей. Если это действительно так, то эти результаты являются первыми из известных нам примерами изменения содержания КБ в эозинофилах в ответ на воздействие или заболевание.

Изучение функциональной морфологии КБ нейтрофильных гранулоцитов при инфекционной патологии позволяет уверенно оценивать эффективность проводимой терапии и прогнозировать вероятность осложнений [9]. Полученные нами данные продолжают находить свое подтверждение при пневмониях [5, 8], вирусном гепатите [4], скарлатине [12], менингококковой инфекции [26]. Недавно высказано предложение о повышении информативности исследований содержания КБ при воспалительных заболеваниях легких путем обработки капли крови ультразвуком или облучения УФ-лучами [30]. Эти результаты нуждаются в проверке, особенно данные об увеличении после облучения содержания КБ. Мы не обнаружили изменения содержания КБ в нейтрофилах крови больных или здоровых телят через 2—5 мин после облучения их УФ-лучами [23].

Изучение функциональной морфологии лизосом нейтрофильных гранулоцитов, связанное с выявлением в них КБ, открывает широкие возможности в оценке неспецифической резистентности организма человека и животных, дает в руки исследователя новый инструмент для изучения процесса взаимодействия клеточных систем.

ЛИТЕРАТУРА

- Аладатов А. Г., Вишнякова А. П. // Лаб. дело.— 1978.— № 9.— С. 525—528.
- Бажора Ю. И., Буйко В. П. // Физиол. журн.— 1984.— № 1.— С. 96—101.
- Грязнова Т. П., Вишнякова А. П. // Иммунология и иммунопатология состояния у детей: Тезисы докладов.— М., 1983.— С. 34—35.
- Домашенко О. Н., Бондарев Л. С. // Лаб. дело.— 1988.— № 9.— С. 25—27.
- Домашенко О. Н., Сотник Ю. П. // Лаб. дело.— 1989.— № 5.— С. 15—17.
- Корнева Е. А., Шхинек Э. К. Гормоны и иммунная система.— Л., 1988.— С. 138—139.
- Кузнецова А. В., Эвранова Г. Б. // Педиатрия.— 1987.— № 12.— С. 74—75.
- Кусельман А. И., Ильясова К. А., Пономарева Р. С. и др. // Иммунология.— 1989.— № 3.— С. 87—89.
- Мазинг Ю. А. // Клиническая морфология нейтрофильных гранулоцитов.— Л., 1988.— С. 102—137.
- Мазинг Ю. А., Старосельская И. Я. // Лаб. дело.— 1981.— № 10.— С. 582—584.
- Мельникова В. Н., Волкова С. Д., Смирнова А. И. и др. // Общие и частные вопросы воспаления и иммунитета.— Л., 1988.— С. 71—74.
- Нагоев Б. С. // Лаб. дело.— 1988.— № 10.— С. 42—44.
- Нестерова И. В. // Моск. мед. ин-т. 2-й: Труды.— 1980.— № 26.— С. 40—46.
- Осин А. Я. // Вопросы охр. мат.— 1986.— № 7.— С. 24—29.
- Пигаревский В. Е. // Пат. физиол.— 1975.— № 3.— С. 86—88.
- Пигаревский В. Е. Лизосомально-катионный тест: Метод. рекомендации.— М., 1979.
- Пигаревский В. Е. // Клиническая морфология нейтрофильных гранулоцитов.— Л., 1988.— С. 3—11.
- Пигаревский В. Е., Мазинг Ю. А. // Лаб. дело.— 1981.— № 10.— С. 579—582.
- Пигаревский В. Е., Мазинг Ю. А. Лизосомально-катионный тест: Метод. письмо.— Л., 1987.
- Пигаревский В. Е., Кокриков В. Н., Мазинг Ю. А. и др. // Клиническая морфология нейтрофильных гранулоцитов.— Л., 1988.— С. 76—86.
- Прияткин С. А. // Общие и частные проблемы онкоморфологии.— Л., 1985.— С. 89—93.
- Светличная М. А. // Дсп. в ВИНТИ 18.06.87. № 4451—В87.
- Скорина И. А., Мазинг Ю. А., Самойлова К. А., Пигаревский В. Е. // Цитология.— 1988.— № 5.— С. 616—622.
- Суродейкина Л. П., Шипов Г. А. // Лаб. дело.— 1987.— № 7.— С. 529—531.
- Филиппов В. К., Мазинг Ю. А., Фролов Б. А. // Частные вопросы онкоморфологии.— Л., 1986.— С. 109—112.
- Черных М. Д., Сорокина М. П., Пигаревский В. Е., Цинзерлинг В. А. // Общие и частные вопросы воспаления и иммунитета.— Л., 1988.— С. 107—111.
- Худайберенов Г. С., Селезнев С. А., Подосинников И. С. // Вестр. хир.— 1981.— № 11.— С. 56—59.
- Цаллагова Р. Б., Мерденова Т. К. // Иммунология и иммунопатологические состояния у детей: Тезисы докладов.— М., 1983.— С. 68—69.
- Шинкарев С. И. // Физиол. журн.— 1983.— № 1.— С. 70—73.
- Яценко Л. В., Остапук З. П., Гах Л. И. // Лаб. дело.— 1989.— № 6.— С. 22—26.
- Ambruso D. R., Bentwood B., Henson P. M., Johnston R. B. // *Pediatr. Res.*— 1984.— Vol. 18, N 11.— P. 1148—1153.
- Ambruso D. R., Bentwood B., Henson P. M., Johnston R. B. // *Pediatr. Res.*— 1987.— Vol. 21.— P. 205—210.
- Bainton D. F., Miller L. J., Kishimoto T. K., Springer T. A. // *J. exp. Med.*— 1987.— Vol. 166.— P. 1641—1653.
- Butte N. F., Goldblum R. M., Fehl L. M. et al. // *Acta paediatr. scand.*— 1984.— Vol. 73.— P. 296—301.
- Christensen R. D., Rothstein G. // *Pediatr. Res.*— 1985.— Vol. 19.— P. 1278—1282.
- Gorberand J., Pris J., Rignier C. // *Biol. Neonat.*— 1973.— Vol. 22.— P. 280—285.
- Corberand J. // *Acta Haematol.*— 1976.— Vol. 55.— P. 199—204.
- Дэвис М. Б., Готефорс Д. Бактериальные инфекции плода и новорожденного: Пер. с англ.— М., 1987.
- Freeman K. L., Anderson D. S., Hughes G. J. // *Clin. Chem.*— 1985.— Vol. 31.— P. 407—409.
- Hill H. R. // *Pediatr. Res.*— 1987.— Vol. 22.— P. 375—382.
- Klockars M., Reitamo A., Adinolfi M. // *Biol. Neonate.*— 1977.— Vol. 32.— P. 243—249.
- Marodi L., Leijh P. Q. J., Furth R. van // *Pediatr. Res.*— 1984.— Vol. 18.— P. 1127—1131.
- Милер И. Иммунизм человеческого плода и новорожденного.— Прага, 1983.
- Pabst H. F., Kreth H. W. // *J. Pediatr.*— 1980.— Vol. 97.— P. 519—534.
- Pitt J. // *Pediatrics.*— 1979.— Vol. 64.— P. 745—749.
- Reitamo S., Kontinen Y. T., Dodd S., Adinolfi M. // *Acta paediatr. scand.*— 1981.— Vol. 70.— P. 395—398.
- Shigeoka A. O., Charette R. P., Wyman M. L., Hill H. R. // *J. Pediatr.*— 1981.— Vol. 98.— P. 392—398.

Поступила 20.03.90

FUNCTIONAL MORPHOLOGY OF LYSOSOMAL CATION PROTEINS IN NEUTROPHIL GRANULOCYTES

Yu. A. Mazing

Institute of Experimental Medicine, Academy of Medical Sciences of the USSR, Leningrad

Data on cytochemical analysis of cation proteins in human and animal neutrophil granulocytes are discussed. Deficiency of cation proteins in blood neutrophils was detected at the step of mammals early postnatal development; reaction of the proteins to stress-effects in considered. Cytochemical evaluation of cation proteins in neutrophilic granulocytes may serve as one of criteria of the unspecific resistance state.

Т. П. Моженок, А. Г. Бульчев, А. Д. Браун

ИНГИБИТОРЫ И СТИМУЛЯТОРЫ ПРОЦЕССА СЛИЯНИЯ ЛИЗОСОМ С ФАГОСОМАМИ

Институт цитологии АН СССР, Ленинград

По современным представлениям, при проникновении в клетку возбудителей туберкулеза, токсоплазмоза, проказы и других патогенных организмов происходит торможение слияния фагосом с лизосомами [10, 15, 16, 21], что делает клетку беззащитной против инфекции.

Эти данные стимулировали экспериментальные исследования по изысканию химических агентов, стимулирующих или ингибирующих слияние лизосом с фагосомами. Было выяснено, что на результат слияния фагосом с лизосомами оказывают влияние характер и величина заряда на поверхности частиц [24, 31], текучесть мембранных липидов [6, 20, 21].

Особый интерес представляют данные, указывающие на участие цитоскелета в процессе слияния мембран [7, 18].

Мы исследовали влияние на слияние лизосом с фагосомами полисахарида (маннана) и его сульфатированного производного (маннансульфата), красителей — основных (толуидиновый синий и нильский голубой) и кислотного (трипановый синий), неэлектролитов (мочевина, глутаральдегид), антибиотиков (рифампицин, даунорубин) и полиаминов (спермин, спермидин). Известно, что наиболее эффективными ингибиторами слияния лизосом с фагосомами являются сульфатированные полисахариды. Соединения этого типа были обнаружены в *Mycobacterium tuberculosis* [14, 15]. Выбор основных и кислотных красителей определялся их способностью накапливаться в матриксе лизосом или сорбироваться на мембранных структурах и изменять их заряд [12]. Неэлектролиты и полиамины были использованы в связи с их способностью оказывать влияние на полимеризацию актина [1, 2, 27]. Выбор антибиотиков был обусловлен их высокой химиотерапевтической активностью и способностью оказывать влияние на цитоскелет [5, 23].

Методика. Исследования слияния лизосом с фагосомами проводили по методу [19]. Культуры макрофагов получали из клеток перитонеальной жидкости, взятой от мышей линии СС57 Black/6. Клетки культивировали в среде Игла, содержащей 15–20 % эмбриональной сыворотки теленка, 100 Ед/мл пенициллина. Среду меняли каждый день. Плотность клеток в каждой культуральной чашке (35 мл) — $4 \cdot 10^5$.

Объектом фагоцитоза служили свежие пекарские дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*). Для опсонизации дрожжевых частиц смешивали 300 мкл 5 % суспензии дрожжей в вероналовом буфере (рН 6,5) с 300 мкл свежей мышиной сыворотки, инкубировали 30 мин при 37 °С, затем промывали несколько раз в холодном вероналовом буфере.

Монослойные культуры макрофагов инкубировали в течение 30 мин при 37 °С в растворе акридинового оранжевого (АО) в конечной концентрации 5 мкг на 1 мл среды для мечения лизосом. Затем краситель сливали, промывали 1 раз 2 мл чистой среды, добавляли в каждую чашку по 1 мл холодной 0,004 % суспензии опсонизированных дрожжей и оставляли на 20 мин. Несвязанные дрожжевые частицы удаляли промыванием холодной средой Игла, и культуры быстро переносили в термостат (37 °С). Через 1,5–2 ч клетки исследовали в

флюоресцентном микроскопе Люма И1 (ЛЮМО). Фотографирование клеток проводили при длине волны 520 нм.

Присутствие окрашенных АО дрожжевых частиц внутри клеток указывает на слияние фагосом с лизосомами. В каждом случае определяли индекс слияния (количество клеток, в которых произошло слияние фагосом с лизосомами, на 100 просмотренных макрофагов, в %) [10]. Опыты с каждым исследуемым агентом повторяли 5–6 раз. Результаты обрабатывали статистически по Стьюденту [4]. Для изучения влияния избранных соединений на слияние фагосом с лизосомами их растворы добавляли к культурам перитонеальных макрофагов до окраски АО.

Результаты и обсуждение. На рисунке, см. вклейку представлены основные этапы наблюдаемого процесса слияния лизосом с фагосомами в перитонеальных макрофагах мышей: 1 — перитонеальные макрофаги, окрашенные АО в течение 30 мин: в клетках четко видны ярко флюоресцирующие лизосомальные структуры; 2 — дрожжевые частицы, снятые при той же длине волны, что и перитонеальные макрофаги, но не обладающие собственной флюоресценцией; 3 — перитонеальные макрофаги и дрожжевые частицы (без предварительного воздействия исследуемых агентов): часть дрожжевых частиц находится внутри макрофагов, что свидетельствует о фагоцитарной активности этих клеток; 4 — перитонеальный макрофаг, в котором произошло слияние фагосом с лизосомами (видны ярко светящиеся фагосомы) — контроль; 5 — перитонеальный макрофаг после действия маннана, окраски АО и инкубации с дрожжевыми частицами: хорошо видно, что слияние фагосом с лизосомами произошло (фагосомы ярко флюоресцируют); 6 — перитонеальный макрофаг после воздействия маннансульфата, окраски АО и инкубации с дрожжевыми частицами: отчетливо видно, что слияние фагосом с лизосомами не произошло (фагосомы не флюоресцируют).

Результаты исследования действия полианионов, красителей, неэлектролитов, антибиотиков и полиаминов на слияние фагосом с лизосомами приведены в табл. 1 и 2.

Как видно из табл. 1, маннан практически не влияет на слияние лизосом с фагосомами. Напротив, его сульфатированное производное ман-

Таблица 1
Влияние полисахаридов, полианионов и красителей на слияние лизосом с фагосомами

Препарат и его концентрация, М	Время инкубации, ч	Количество слившихся фагосом, %
Полисахариды и полианионы		
Контроль	72	71,5±6,6
Маннан, $1,25 \cdot 10^{-5}$	24	70,6±6,04
Маннансульфат, $1,25 \cdot 10^{-5}$	24	19,7±3,7
Маннан, $1,25 \cdot 10^{-6}$	72	68,0±3,7
Маннансульфат, $1,25 \cdot 10^{-6}$	72	12,1±0,7
Маннан, $1,25 \cdot 10^{-6}$	24	69,0±2,45
Маннансульфат, $1,25 \cdot 10^{-6}$	24	14,3±2,2
Маннан, $1,25 \cdot 10^{-6}$	72	71,1±1,2
Маннансульфат, $1,25 \cdot 10^{-6}$	72	14,5±0,4
Красители		
Контроль	4	66,05±0,1
Трипановый синий, $1 \cdot 10^{-4}$	72	22,3±3,7
» » $0,5 \cdot 10^{-4}$	72	22,9±4,04
Толуидиновый синий, $3 \cdot 10^{-4}$	4	31,4±4,9
» » $0,3 \cdot 10^{-4}$	4	46,3±3,0
Нильский голубой, $0,7 \cdot 10^{-4}$	4	35,9±2,3
» » $0,14 \cdot 10^{-4}$	4	34,5±4,3

Примечание. Здесь и в табл. 2 представлены средние данные 4–6 опытов.

Таблица 2

Влияние неэлектролитов, антибиотиков, полиаминов на слияние лизосом с фагосомами

Препарат и его концентрация, М	Время инкубации, ч	Количество слившихся фагосом, %
Неэлектролиты		
Контроль	4	62,6±4,3
Мочевина, 1,0	4	35,2±0,8
Глутаральдегид, 0,1	4	17,1±4,3
Антибиотики		
Контроль	4	50,9±4,2
Рифампицин, $1,0 \cdot 10^{-3}$	4	79,0±8,8
Рифампицин, $1,2 \cdot 10^{-3}$	4	83,5±2,1
Даунорубицин, $8,5 \cdot 10^{-6}$	4	64,3±3,2
Даунорубицин, $4 \cdot 10^{-6}$	4	70,4±1,3
Полиамины		
Контроль	2	55,7±2,6
Спермидин, $0,2 \cdot 10^{-3}$	2	69,2±0,9
Спермин, $0,2 \cdot 10^{-3}$	2	72,8±5,3

наносульфат значительно ингибирует этот процесс. Как уже указывалось выше, интерес к полианионам возник в связи с обнаружением этого типа соединений в *M. tuberculosis* и тормозящим влиянием их на слияние фагосом с лизосомами. Этот эффект, возможно, связан с ионным взаимодействием между полианионными нитями бактериальных сульфатидов и мембранами, которое приводит к изменению последних и их дисфункции [14]. По данным Килиан и Кона [20, 21], полианионы накапливаются в лизосомальных структурах. По данным этих же авторов, мембраны лизосом, накопивших декстраносульфат, оказались более жесткими, чем мембраны лизосом, накопивших декстран. Авторы предполагают, что внутрилизосомальный декстраносульфат взаимодействует с липидами и иолипептидами мембраны, снижая тем самым ее текучесть и способность сливаться. Вопрос о существенной роли липидного компонента в слиянии мембран рассматривается в ряде работ [17, 31].

В свою очередь из представленных результатов можно сделать вывод, что исследованные красители оказывают ингибирующее влияние на слияние лизосом с фагосомами.

По Де Дюву [12], красители проникают в лизосомы путем диффузии в своей незаряженной форме. Основные красители являются функционально акцепторами протонов, кислотные — донорами протонов. В результате кислотно-основных реакций в лизосомальном матриксе изменяется концентрация водородных ионов: при диффузии основных красителей pH увеличивается, при диффузии кислотных — снижается. Известно, что заряженные частицы влияют на слияние мембран: дивалентные катионы индуцируют слияние, а моновалентные катионы стимулируют только агрегацию без слияния [9, 13]. На значение для слияния мембран преодоления силы электростатического отталкивания указывают Верклей и соавт. [31].

Кроме того, как известно, лизосомотропные агенты могут взаимодействовать с лизосомными гидролазами, изменяя их активность [3] и, следовательно, переваривание содержимого в фаголизосомах может быть заторможено или ускорено. Так, при аккумуляции красителя трипанового синего, сурамина, ауриотомалата в лизосомах зна-

чительно снижается скорость расщепления I¹²⁵-альбумина лизосомными гидролазами.

Как видно из табл. 2, неэлектролиты оказывают отчетливое ингибирующее влияние на слияние лизосом с фагосомами. По нашим данным [1, 2], мочевины и глутаральдегид оказывают тормозящее действие на полимеризацию актина. Полученные нами данные о действии этих соединений на слияние лизосом с фагосомами указывают на возможное участие актина в этом процессе. Хорошо известно, что состояние цитоскелета играет ключевую роль в движении внутриклеточных частиц, органелл, включений, секреторных гранул [2].

В свою очередь оба исследованных антибиотика — рифампицин и даунорубицин — вызывают стимуляцию процесса слияния лизосом с фагосомами. Как показано сотрудниками нашей лаборатории [3], эти антибиотики, являясь лизосомотропными агентами, вызывают изменение активности лизосомных гидролаз. Имеются данные, что даунорубицин и адриамицин, интенсивно используемые в химиотерапии острых лейкозов и твердых опухолей, активируют полимеризацию актина и перераспределение компонентов цитоскелета [23]. На роль актина в процессе слияния лизосом с фагосомами указывают и наши данные о влиянии на этот процесс полиаминов (см. табл. 2). Полиамины — спермин, спермидин — оказывают стимулирующее действие на процесс слияния лизосом с фагосомами.

Полиамины (спермин, спермидин, путресцин и др.) — поликатионы и являются постоянными компонентами клетки. Показано, что полиамины являются модуляторами мембранного слияния через их взаимодействие с трифосфоинозитидами, такими как фосфотидилинозитол-4,5-дифосфат [25]. Мембраностабилизирующие эффекты полиаминов известны уже многие годы. И, наконец, известно, что полиамины являются активными стимуляторами процесса полимеризации актина в опытах *in vitro* [27].

Таким образом, антибиотики и полиамины, по-видимому, являются стимуляторами процесса слияния лизосом с фагосомами. Можно предположить, что действие этих веществ скорее всего связано с их влиянием на реакции актина, поскольку известно, в частности, участие ориентированных актиновых узлов в образовании связей между клетками эпидермиса [8]. По некоторым данным, стимулятор слияния лизосом с фагосомами форбол-12-меристат-13-ацетат, являясь потенциальным активатором протеинкиназы C, вызывает реорганизацию актина и винкулина [22, 28, 29]. Кроме того, установлено, что фаллоидининдуцируемая полимеризация актина вызывает увеличение фагоцитарной активности [30]. На изолированных лизосомах показано также, что лизосомальные мембраны могут присоединяться к актиновым филаментам [11, 26]. Эти сведения в сочетании с результатами исследований, полученными с использованием стабилизаторов актиновых филаментов и антимикротрубочковых препаратов [7], позволяют расценить роль актиновых микрофиламентов как ключевую в регуляции движения лизосом во время гетеро- и аутофагии.

В. Н. Кокряков

КАТИОННЫЕ БЕЛКИ ЛИЗОСОМ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ПРИ ФАГОЦИТОЗЕ И ВОСПАЛЕНИИ

НИИ экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград

1. Браун А. Д., Моженок Т. П., Покровская Т. Г. // Цитология. — 1984. — Т. 26, № 5. — С. 614—617.
2. Браун А. Д., Моженок Т. П. Неспецифический адаптационный синдром клеточной системы. — Л., 1987.
3. Булычев А. Г., Ассиновская О. А., Семенова Е. Г. // Вопр. мед. химии. — 1988. — № 5. — С. 20—24.
4. Джерми М. Количественная биология в задачах и примерах. — М., 1972.
5. Zubovitch I. K., Votjakov B. I., Mishaeva H. P. и др. // Антибиотики. — 1989. — № 2. — С. 123—125.
6. Шрагин А. С., Василенко И. А., Селищева А. А. и др. // Биол. мембраны. — 1985. — Т. 2, № 8. — С. 789—794.
7. Araki N., Ogaawa K. // J. Histochem. Cytochem. — 1988. — Vol. 36. — P. 863.
8. Bereiter-Hahn J., Anderson O., Reif W. E. Cytomechanics. — Tokyo, 1987.
9. Cohen F. C., Akabas M. H., Finkelstein A. // Fed. Amer. Soc. Environ. Biol. — 1985. — Vol. 67. — P. 121—126.
10. Draper P., Hart D. A., Joung M. // Infect. a. Immun. — 1979. — Vol. 24. — P. 558—561.
11. Dubois S. E., Sheets R. V. // Trans. Amer. Microsc. Soc. — 1986. — Vol. 105. — P. 387—395.
12. Duve Ch. de, de Baray T., Poole B. et al. // Biochem. Pharmacol. — 1974. — Vol. 23. — P. 2495—2531.
13. Ellens H., Bentz J., Szoka F. // Biochemistry (Wash.). — 1985. — Vol. 24. — P. 3099—30106.
14. Goren M. B., D'Arcy Hart P., Young M. R., Armstrong D. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1976. — Vol. 73. — P. 2510—2514.
15. Goren M. B. // Ann. Rev. Microbiol. — 1977. — Vol. 31. — P. 507—533.
16. Horvitz M. A. // J. exp. Med. — 1983. — Vol. 158. — P. 2108—2126.
17. Kalderon N., Gilula N. B. // J. cell Biol. — 1979. — Vol. 81. — P. 411—425.
18. Kresken H., Momayesi M., Braun C. // J. Histochem. Cytochem. — 1986. — Vol. 34. — P. 455—465.
19. Kielian M., Cohn Z. A. // J. cell Biol. — 1980. — Vol. 85. — P. 754—765.
20. Kielian M. C., Cohn Z. A. // Ibid. — 1982. — Vol. 93. — P. 875—882.
21. Kielian M. C., Steinman R. M., Cohn Z. // Ibid. — Vol. 93. — P. 866—874.
22. Kitano J., Okada N., Adachi J. // Exp. cell Res. — 1986. — Vol. 167. — P. 369—376.
23. Malinari A., Calcabrini A., Crateri P., Arancia G. // Europ. J. cell Biol. — 1988. — Vol. 47. — P. 8.
24. Markin V. S., Kozlov M. M., Boroviyagin V. L. // Gen. Physiol. Biophys. — 1984. — Vol. 3. — P. 361—377.
25. Meers P., Hong K., Bentz J., Papahadjopoulos M. // Biochemistry (Wash.). — 1986. — Vol. 25. — P. 3109—3118.
26. Merabian M., Bame K. J., Rome L. H. // J. cell Biol. — 1984. — Vol. 99. — P. 680—685.
27. Oriol-Audit C. // Recent Progress in Polyamine Research. — Budapest, 1985. — P. 151—160.
28. Phaire-Washington L. S., Silvestein S. C., Wang E. // J. cell Biol. — 1980. — Vol. 86. — P. 641—645.
29. Schliwa M., Nakamura T., Poster K., Euteneuer U. // Ibid. — 1984. — Vol. 99. — P. 1045—1049.
30. Trudel P., Gicquaud C. // Europ. J. cell Biol. — 1987. — Vol. 43. — P. 195—202.
31. Verkley A. J., Leunissen-Bijvelt J., Kruijff B. et al. // Cell Fusion. — London, 1984. — P. 45—59.

Поступила 23.03.90

INHIBITORS AND STIMULATORS OF THE LYSOSOME-PHAGOSOME FUSION

T. P. Mozhenok, A. G. Bulychov, A. D. Brown

Institute of Cytology, Academy of Sciences of the USSR, Leningrad

Polyanion (mannan sulfate), basic dyes (toluidine blue, nil blue), acidic dyes (trypan blue), non-electrolytes (urea, glutaraldehyde) inhibited the lysosome-phagosome fusion, while antibiotics (rifampicin, daunorubicin), polyamines (spermine, spermidine) stimulated the process.

Катионные белки (КБ) лизосомного аппарата нейтрофильных гранулоцитов (НГ) являются физиологически активными веществами, определяющими многие закономерности процессов фагоцитоза и воспаления [4, 10, 16, 17, 33]. Это гетерогенная по своей структуре и функциям группа белков (дефенсины, лизоцим, катепсин G, эластаза, бактерицидный проницаемость-увеличивающий протеин, фосфолипаза A₂, лактоферрин, миелопероксидаза), их отличительное физико-химическое свойство — катионный характер молекул [4, 33]. Благодаря положительному заряду своих молекул КБ активно взаимодействуют по электростатическому механизму с полианионными соединениями клеток и жидких сред организма, вовлекаясь таким образом в генез и развитие многих защитно-приспособительных и патогенетических процессов.

Поиски антимикробных веществ НГ привели к открытию группы низкомолекулярных КБ ($M < 5000$), названных сначала лизосомными КБ [36], а в настоящее время — дефенсинами (от английского defence — защита, оборона) [15]. Термин «дефенсины» наиболее удачен, так как в нем нашло отражение основное функциональное свойство рассматриваемых белков — способность обеспечивать защиту организма человека и животных от возбудителей инфекционных болезней бактериальной, грибковой и вирусной природы. Методами высокоэффективной жидкостной хроматографии и гель-фильтрации удалось в настоящее время выделить 6 индивидуальных компонентов дефенсинов кролика [31], 3 — человека [30] и 1 — морской свинки [32]. Установлена первичная структура этих белков, основными особенностями которой являются высокая доля аргинина (от 4 до 10 остатков на общее число 29—34), заметное содержание гидрофобных аминокислот (30—40 моль%) и 6 остатков цистеина, образующих 3 внутримолекулярные дисульфидные связи. Последовательность аминокислот в одном из компонентов дефенсина кролика выглядит следующим образом: NH₂-вал-Вал-Цис-Ала-Цис-Арг-Арг-Ала-Лей-Цис-Лей-Про-Арг-Глу-Арг-Арг-Ала-Гли-Фала-Цис-Арг-Илей-Арг-Гли-Арг-Илей-Гис-Про-Лей-Цис-Арг-Арг-СООН. Как видно, структура рассматриваемого белка характеризуется чередованием положительно заряженных (катионных) и гидрофобных участков. Подобное сочетание в дефенсилах свойство заряженной и неполярной молекул придает им способность поверхностно-активных соединений и лежит в основе их антимикробного действия. Бактерицидная [1, 2, 6, 33], микоцидная [29] и вирусоцидная [20] активность дефенсинов продемонстрирована in vitro. Дополненные систематическими морфологическими исследо-

ваниями функциональной роли КБ при фагоцитозе и воспалении [9, 11], эти данные дают основание говорить о дефенсинах как антибиотиках животного происхождения с широким спектром антимикробного действия.

В нашей лаборатории впервые были изучены антивирусные свойства дефенсинов кролика на модели экспериментального герпетического энцефаломиелимита у мышей линии СВА. С этой целью мышам заражали интрацеребрально вирусом простого герпеса (ВПГ-1, штамм Л-2) в дозе 3 Ig LD_{50} . Антивирусную активность суммарной фракции дефенсинов кролика [3] испытывали по лечебно-профилактической схеме, которая состояла во внутрибрюшинном серийном введении препарата в дозах 25, 50 и 100 мкг на животное сначала за сутки до инокуляции вируса, а затем ежедневно в течение 3 дней после инфицирования мышам. Суммарная доза дефенсинов при этом составляла 100, 200 и 400 мкг на животное. Действие белка на течение инфекционного процесса оценивали по увеличению числа выживших подопытных мышам по сравнению с контрольными, которым инъецировали изотонический раствор хлорида натрия. У мышам в результате инфицирования развивался энцефаломиелит. Большая часть контрольных животных и тех, которым вводили один раз 25 мкг белка, погибли на 5–7-е сутки заболевания. Слабый и недостоверный защитный эффект наблюдали при использовании одноразовой дозы дефенсина 50 мкг. Четкое терапевтическое действие выявлено при одноразовом введении мышам 100 мкг дефенсина. В этой группе выжило мышам на 30 % больше, чем в контрольной. Выявленный эффект может быть связан как с прямым антивирусным действием дефенсинов [20], проявляемым во внеклеточной среде либо в вакуолярном аппарате животных клеток, так и с их опосредованным влиянием на клетки, в которых репродуцируется вирус. В настоящее время осуществляется расшифровка механизмов лечебно-профилактического действия экзогенных дефенсинов при вирусной инфекции. Эти исследования важны в плане обоснования возможности применения этой группы КБ в медицинской и ветеринарной практике при инфекционных заболеваниях.

Микробоцидное действие дефенсинов определяется способностью КБ адсорбироваться за счет электростатических сил притяжения на отрицательно заряженных структурах (липополисахариды, тейхоевые кислоты, фосфолипиды и др.) поверхности бактерий, грибов и оболочечных вирусов. Контакт антимикробного белка с поверхностью микроорганизмов создает необходимые предпосылки для его последующего проникновения во внутренние структуры клеток и вирионов. Поскольку молекулы дефенсина имеют в своем составе липофильные участки, постольку уже путем гидрофобных взаимодействий может осуществляться пассивная диффузия белка через двойной липидный слой мембран [4, 33]. Транслокации белка через клеточные мембраны способствует направленность электрического поля последних со знаком «минус» внутри клеток. Экспериментально показано, что анаэробизм или ингибирование дыхательной цепи бактерий, приводящие к падению мембранного потенциала, резко снижают цито-

цидное действие КБ [34]. В процессе пенетрации КБ через клеточные барьеры наблюдаются дезорганизация их упорядоченной структуры и нарушение, вплоть до полного подавления, метаболических процессов (дыхание, окислительное фосфорилирование, биосинтез ДНК, РНК и белков [24, 37]), нормальная реализация которых сопряжена с плазмалеммой. В структуре оболочек микробов формируются неспецифические поры, утечка через них ионов и метаболитов снижает жизнеспособность клеток. Суммарным выражением неблагоприятных воздействий дефенсинов на структурную целостность и обмен микроорганизмов становится их гибель [4]. Во многом сходно антимикробное действие таких представителей группы лизосомных КБ, как бактерицидный проницаемость-увеличивающий протеин [35] и катепсин G [24]. Более того, дестабилизирующее клеточную структуру воздействие рассмотренных КБ облегчает литическое действие на микробные компоненты лизоцима, эластазы, фосфолипазы A_2 и многочисленных кислых гидролаз [36] лизосомного аппарата НГ. Существенно усиливает инактивацию микробной флоры включение в процесс миелопероксидазной системы [7, 19] и лактоферрина [5]. Совместное действие КБ на микроорганизмы в фаголизосоме НГ и макрофагов или внеклеточно в очагах воспаления в значительной степени обеспечивает эффективность процесса киллинга — одного из необходимых условий поддержания стерильности внутренней среды макроорганизма.

В пользу развиваемого представления о ключевой роли КБ в обеспечении неспецифической антимикробной резистентности свидетельствуют наши данные о дефиците этих белков в НГ новорожденных животных и человека. Нами установлено, что содержание миелопероксидазы, эластазы и катепсина G в НГ донорской крови человека почти в 4 раза больше, чем в лейкоцитах пуповинной крови новорожденных. У кроликов общее содержание КБ, миелопероксидазы и эластазы в НГ половозрелых животных соответственно в 4,5 и 2 раза выше, чем у 7-дневных сосунков. Эти исследования дают основание предполагать, что наряду с незрелостью ряда других клеточных и гуморальных факторов иммунитета преходящий возрастной дефицит антимикробных КБ в НГ новорожденных детей и животных может рассматриваться в качестве одного из факторов риска по развитию аутоинфекционных заболеваний в раннем постнатальном периоде [21].

Участие КБ в процессе фагоцитоза, по-видимому, не ограничивается только их антимикробным действием. В настоящее время есть сведения о ряде других функциональных проявлений белков этой группы. *In vitro* продемонстрировано, что один из компонентов дефенсина кролика и лейкоцитарный лизоцим человека, будучи адсорбированы микробными клетками, достоверно увеличивают такие показатели фагоцитоза, как фагоцитарное число и индекс фагоцитоза [26]. Это происходит благодаря снижению КБ отрицательного заряда поверхности бактерий, что облегчает контакт объектов фагоцитоза с плазмалеммой лейкоцитов и их последующую интернализацию в фагосоме. Рассматриваемую способность КБ усиливать фагоцитоз можно оценивать как прооп-

сонизирующую. Низкомолекулярная фракция КБ из лизосом НГ человека, содержащая лизоцим и дефенсины, обладает хемотаксической активностью в отношении лейкоцитов [22]. КБ повышают адгезивность НГ [25] и их метаболическую активность [14]. Эти данные свидетельствуют о том, что КБ способны влиять на протекание всех стадий фагоцитоза, выступая в роли ауто-стимулирующих веществ [16]. Однако требуются дополнительные исследования для доказательства реальности проявления всех рассмотренных форм биологической активности КБ.

Вследствие того что НГ являются преобладающим типом лейкоцитов на начальных этапах острого воспаления, естественно предположить участие их КБ в этом патофизиологическом процессе. Роль КБ в фагоцитарном компоненте воспаления нами уже была проанализирована. Кроме этого, имеются сведения о способности сериновых протеиназ НГ (катепсин G, эластаза) активировать калликреин-кининовую, ренин-ангиотензиновую и комплементарную системы плазмы крови. Эти данные обобщены в ряде обзоров [13, 18, 23]. По мнению ряда авторов, участие сериновых протеиназ НГ в продукции физиологически активных пептидов (кинины, ангиотензин II, C5a, C3b и др.) можно рассматривать в качестве проявления их регуляторных функций. Таким образом, может осуществляться модуляция отдельных реакций воспалительного процесса. Необходимо подчеркнуть, что правомочность подобных представлений еще требует экспериментального обоснования.

Известна способность дефенсинов кролика [27] значительно увеличивать проницаемость сосудов у животных, которым внутрикожно инъецировали эти КБ. При этом увеличение проницаемости происходит как в результате прямого взаимодействия дефенсинов со стенками сосудов, так и опосредованно, через предварительное освобождение гистамина из тучных клеток. В основе этой активности дефенсинов лежит их повышенная тропность как поликатионов к поверхности мембран. Адсорбируясь на клетках, КБ нарушают упорядоченную структуру мембран и их барьерные функции.

В связи с высокой проникающей способностью дефенсинов представляло интерес их влияние на гемостаз у экспериментальных животных. Сотрудники кафедры физиологии человека и животных МГУ им. М. В. Ломоносова изучали действие общей фракции дефенсинов кролика, выделенной нами, на функциональное состояние противосвертывающей системы крови крыс. При внутривенном введении дефенсинов крысам в дозе 100—500 мкг/кг авторы наблюдали снижение суммарной фибринолитической активности плазмы и ее неферментативного фибринолиза более чем на 50 %. Дефенсины в этих условиях влияли в основном на антикоагулянтные свойства плазмы крови, обусловленные комплексными соединениями гепарина. По-видимому, благодаря активному электростатическому взаимодействию белка с гепарином [28] происходит нейтрализация его физиологических свойств. Далее было установлено, что в условиях активации функции противосвертывающей системы, индуцированной внутривенным введением тканевого тромбопластина, появление де-

фенсина в кровотоке приводит к снижению повышенного уровня неферментативной фибринолитической активности до контрольных значений [8]. Существенно важно также и то, что при депрессии функции противосвертывающей системы, вызванной аминазином, белок не усугубляет это состояние. Все это говорит о возможных гемостатических свойствах дефенсинов, многие проявления которых еще до конца не изучены. Сочетание в дефенсидах свойств веществ, ингибирующих неферментативный фибринолиз и обладающих антимикробной активностью, позволяет считать их перспективным объектом дальнейшего углубленного исследования с целью создания препаратов для борьбы с кровотечениями при инфекционной патологии.

Таким образом, представленные данные литературы и результаты наблюдений об участии катионных белков нейтрофильных гранулоцитов в процессах фагоцитоза и воспаления свидетельствуют о широком функциональном потенциале этой группы биологически активных соединений. КБ выступают в организме не только в роли высокоэффективных антибиотических агентов, но и в качестве регуляторных молекул, обеспечивающих многие стороны защитно-приспособительных процессов (хемотаксис, опсонизация, эндцитоз, изменение метаболизма клеток и проницаемости сосудов, поддержание гемостаза). Все это в совокупности позволяет рассматривать КБ как особый класс физиологически активных соединений, отобранных в процессе эволюции в качестве биохимического механизма барьерных функций организма человека и животных [4, 12].

ЛИТЕРАТУРА

1. Анатолий С. А., Кокряков В. П., Юнусова М. И. и др. // Журн. микробиологии, 1977.— № 3.— С. 71—75.
2. Ашмарин И. П., Кокряков В. П., Лылова С. Н., Раменская Н. П. // Вопр. мед. химии.— 1977.— № 4.— С. 234—237.
3. Кокряков В. Н. Катионные белки ядра и лизосом нейтрофилов кролика: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Л., 1973.— 22 с.
4. Кокряков В. Н. // В кн.: Клиническая морфология нейтрофильных гранулоцитов.— Л., 1988.— С. 12—51.
5. Кокряков В. Н., Ротова Г. М. // Деп. в ВИНТИ 22.05.85, № 3519—85 деп.
6. Кокряков В. Н., Толыбеков А. С., Ашмарин И. П., Пигаревский В. Е. // Журн. микробиологии.— 1977.— № 9.— С. 194—196.
7. Кокряков В. Н., Борисов А. И., Слепенков С. В., Лылова С. Н. // Биохимия.— 1982.— № 1.— С. 100—107.
8. Кудряшов Б. А., Ашмарин И. П., Ляпина Л. А. и др. // Физиол. журн. СССР.— 1988.— № 12.— С. 1759—1763.
9. Мазинг Ю. А. // В кн.: Клиническая морфология нейтрофильных гранулоцитов.— Л., 1988.— С. 102—137.
10. Пигаревский В. Е. // Арх. пат.— 1983.— № 11.— С. 14—22.
11. Пигаревский В. Е. // В кн.: Клиническая морфология нейтрофильных гранулоцитов.— Л., 1988.— С. 3—11.
12. Пигаревский В. Е., Мазинг Ю. А., Кокряков В. П. и др. // В кн.: Тез. докл. III Всес. симпози. «Структура и функции лизосом».— М., 1986.— С. 156—157.
13. Янковский О. Ю., Довнар Т. Е. // Журн. общей биологии.— 1985.— № 1.— С. 93—101.
14. Alam M., Ranadive N. S., Pruzanski W. // Inflammation.— 1987.— Vol. 11.— P. 131—142.
15. Ganz T., Selsted M. E., Szklarek D. et al. // J. Clin. Invest.— 1985.— Vol. 76.— P. 1427—1435.
16. Ginsburg I. // Inflammation.— 1987.— Vol. 11.— P. 489—515.
17. Goldstein I. M. // In: Mediators of inflammation.— 1974.— P. 51—84.

18. Havemann K., Gramse M. // In: *Proteases. Potential role in health and disease.*— 1984.— P. 1—20.
19. Klebanoff S. J. // *Ann. Int. Med.*— 1980.— Vol. 93.— P. 480—489.
20. Lehrer R. I., Daher K., Ganz T., Selsted M. E. // *J. Virol.*— 1985.— Vol. 54.— P. 467—472.
21. (Miller I.) *Милер И.* Иммуитет человеческого плода и новорожденного.— Прага, 1983.— 228 с.
22. Nitzan D. W., Pruzanski W., Saito S., Ranadive N. // *Inflammation.*— 1985. Vol. 9.— P. 375—387.
23. Olsson I., Venge P. // *Allergy.* Vol. 35.— P. 1—13.
24. Olsson I., Odeberg H., Weiss G., Elsbach P. // In: *Mentral proteases of human polymorphonuclear leukocytes biochemistry, physiology and clinical significance.*— Baltimore: Urban and Schwarzenberg.— 1978.— P. 18—32.
25. Oseas R. S., Allen J., Yang H. H. et al. // *Immunology.*— 1981.— Vol. 33.— P. 523—526.
26. Pruzanski W., Saito S. // *Exptl. Cell Res.*— 1978.— Vol. 117.— P. 1—13.
27. Ranadive N. S., Cochrane C. G. // *J. Exp. Med.*— 1968.— Vol. 128.— P. 605—622.
28. Saba H. I., Roberts H. R., Herion J. C. // *Blood.*— 1968.— Vol. 31.— P. 369—375.
29. Selsted M. E., Szklarek D., Ganz T., Lehrer R. I. // *Infect. Immun.*— 1985.— Vol. 49.— P. 202—206.
30. Selsted M. E., Harwig S. S., Ganz T. et al. // *J. Clin. Invest.*— 1985.— Vol. 75.— P. 1436—1439.
31. Selsted M. E., Brown D. M., Delange R. J. et al. // *J. Biol. Chem.*— 1985.— Vol. 260.— P. 4579—4584.
32. Selsted M. E., Harwig S. S. // *Glen. Res.*— 1987.— Vol. 35.— P. 490A.
33. Spitznagel J. K. // *Contemp. Top. Immunobiol.*— 1984.— Vol. 14.— P. 283—343.
34. Walton E. // *Brit. J. Exp. Path.*— 1978.— Vol. 59.— P. 416—431.
35. Weiss J., Victor M., Elsbach P. // *J. Clin. Invest.*— 1983.— Vol. 71.— P. 540—549.
36. Zeya H. I., Spitznagel J. K. // *J. Bact.*— 1966.— Vol. 91.— P. 750—754.
37. Zeya H. I., Spitznagel J. K. // *J. Bact.*— 1966.— Vol. 91.— P. 755—762.

Поступила 20.03.90

LYSOSOMAL CATION PROTEINS OF NEUTROPHIL GRANULOCYTES UNDER CONDITIONS OF PHAGOCYTOSIS AND INFLAMMATION

V. N. Kokryakov

Institute of Experimental Medicine, Academy of Medical Sciences of the USSR, Leningrad

Literature and experimental data are reviewed on functional properties of cation proteins in neutrophil granulocytes under conditions of phagocytosis and inflammation. These proteins are not only effective antimicrobial agents but they regulate a lot of protective-adaptational reactions responsible for development of human and animal unspecific resistance.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 615.281.105.4:[612.014:576.311.344].07

Т. Н. Беляева, А. Г. Булычев, О. Е. Ласская, Е. Г. Семенова

ДЕЙСТВИЕ САНГВИРИТРИНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ЛИЗОСОМНОГО АППАРАТА ФИБРОБЛАСТОВ

Институт цитологии АН СССР, Ленинград, Всесоюзный институт лекарственных растений, Москва

Важную роль при поступлении веществ в клетку играет лизосомно-вакуолярный аппарат. В свою очередь сегрегация лизосомотропного соединения вызывает изменение ферментативной активности лизосомных гидролаз. Показано, что при поступлении в клетку и аккумуляции в ней нейтрального красного, акридинового оранжевого, даунорубици-

на, хлорохина происходит ингибирование лизосомных ферментов [4, 5, 14, 18]. Однако в некоторых случаях обнаруживается активирующее влияние на лизосомные гидролазы лизосомотропных веществ сангвиритрина и хелеритрина [7]. Эти алкалоиды близки по своим химическим и биологическим свойствам и входят в состав смеси алкалоидов сока чистотела (*Chelidonium majus* L.). Известно, что сок чистотела применяется в народной медицине для лечения ряда болезней [2, 9].

Сангвиритрин обладает антимикробной и антифунгицидной активностью и применяется как химиотерапевтическое средство [1, 6]. Отметим также, что исследуемые алкалоиды относятся к группе веществ, интеркалирующих в ДНК. Большая группа этих веществ обладает антиканцерогенной активностью и применяется для лечения ряда опухолей [22].

Представляло интерес исследовать кинетику поступления сангвиритрина в клетки млекопитающих и его распределение, изучить аккумуляцию сангвиритрина в клеточных органеллах и его влияние на функциональную активность лизосомного аппарата клетки.

Методика. Исследование проводили на монослойной культуре сублинии мышинных фибробластов L, полученной путем адаптации клеток суспензионной сублинии LS к росту в монослое [8]. Клетки культуры выращивали на среде Игла с добавлением 15 % сыворотки крупного рогатого скота во флаконах без добавления антибиотиков. Возможность заражения контролировали микробиологическими методами. Для проведения исследований клетки выращивали на чашках Петри диаметром 100 мм в 10 мл среды. Использовали клетки в логарифмической фазе роста, выращенные в CO_2 -инкубаторе. Клетки промывали холодным раствором KCl (0,15 M), с поверхности чашки их снимали механически в 0,15 M KCl. Гомогенат клеток готовили путем их разрушения в гомогенизаторе Даунса в растворе 0,15 M KCl, содержащем 0,1 % тритона X-100.

Активность катепсина D, кислой фосфатазы, кислой липазы, β -галактозидазы, N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы (АГ) и галактозилтрансферазы устанавливали по методу, описанному в работе [4].

Количественное содержание сангвиритрина проводили с помощью спектрофлуориметра MPF-2A ("Hitachi", Япония). Клетки промывали забуференным соевым раствором (PBS) pH 7,4 при 0 °C, затем растворяли в 0,1 н NaOH и сангвиритрин определяли при $\lambda_{\text{ex}} = 330$ нм и $\lambda_{\text{em}} = 420$ нм. Белок определяли методом Лоури [16]. Препарат сангвиритрина был получен во Всесоюзном институте лекарственных растений.

Результаты и обсуждение. Для изучения динамики поступления сангвиритрина в фибробласты сублинии LSM проводили их инкубацию в среде с разной концентрацией вещества. Данные, представленные на рис. 1, показывают, что

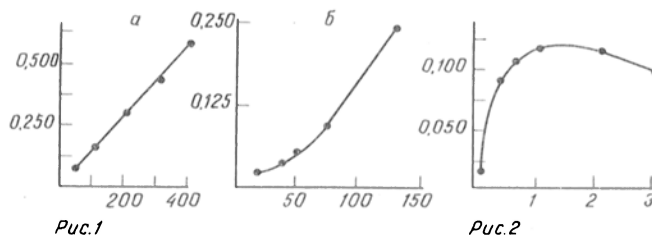


Рис. 1. Поглощение сангвиритрина фибробластами сублинии.

Здесь и на рис. 2, 3: по оси абсцисс — концентрация сангвиритрина в среде, мкМ; по оси ординат — концентрация сангвиритрина в клетках, мкМ на 1 мг белка. а — инкубация 4 ч; б — инкубация 2 ч.

Рис. 2. Зависимость поглощения сангвиритрина фибробластами сублинии LSM от времени инкубации.

Здесь и на рис. 3: по оси абсцисс — время инкубации, ч. Концентрация сангвиритрина в среде 70 мкМ.

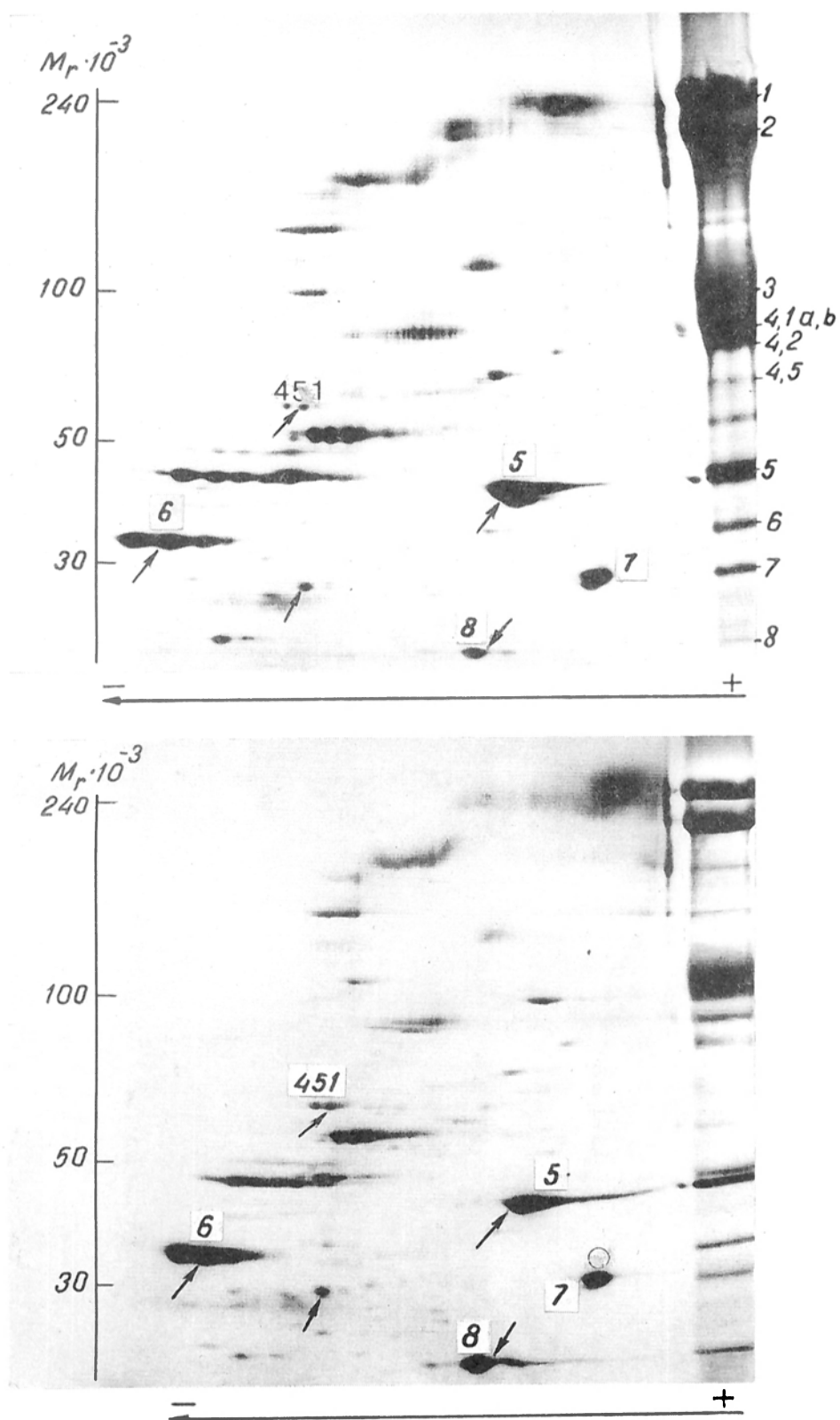
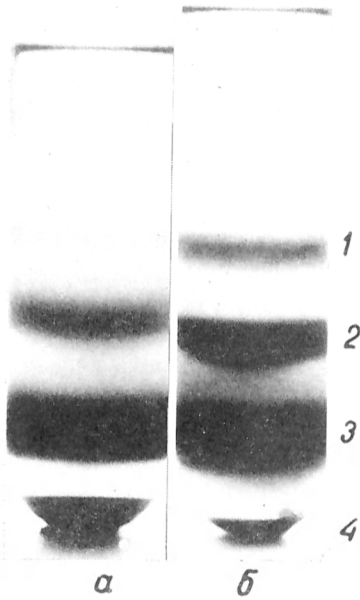


Рис 1. Двухмерная электрофо́реграмма белков мембран эритроцитов человека, здорового донора (а) и больного ХГ (б)

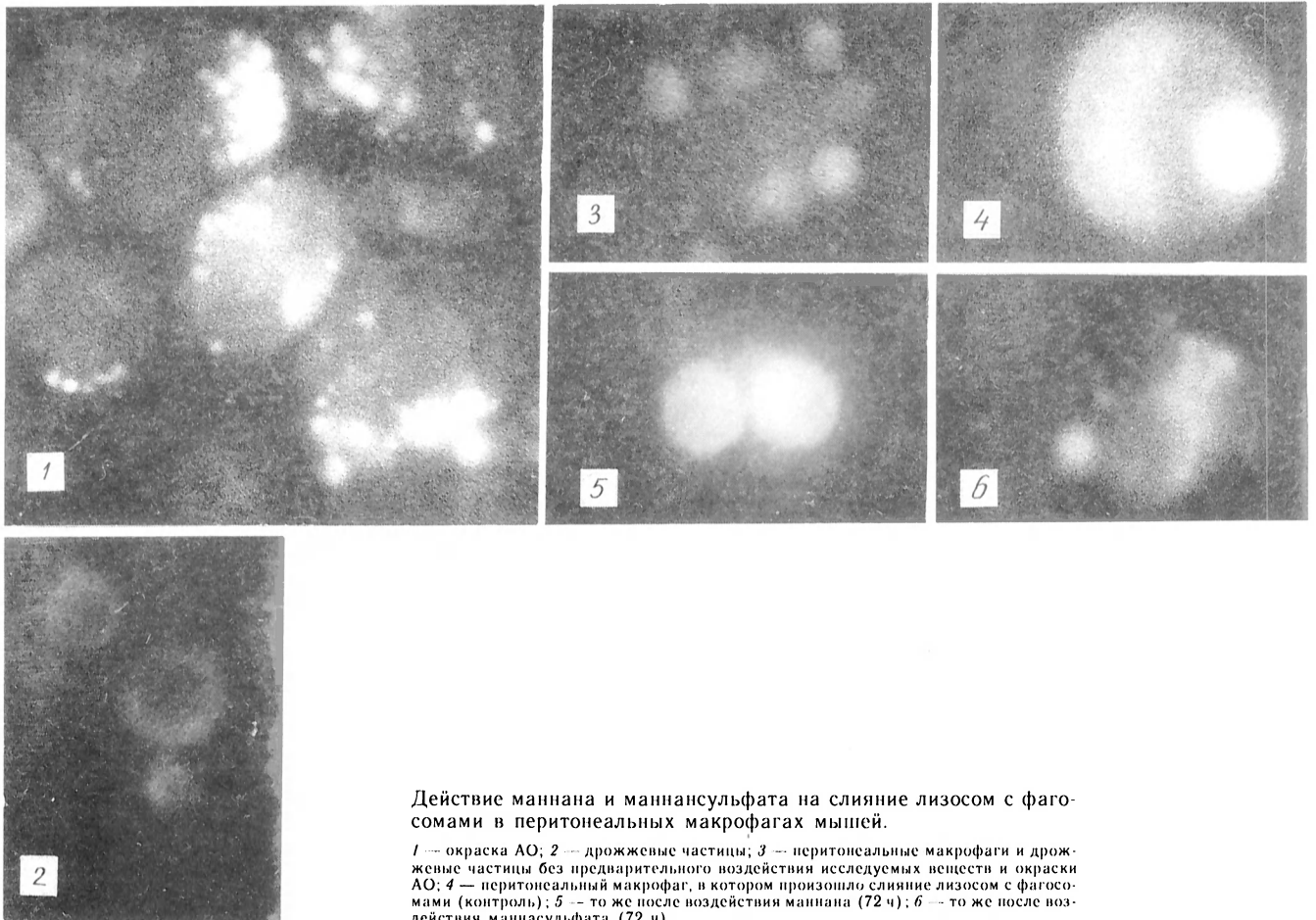
Стрелками обозначены белки смешанной локализации между мембраной и цитозолем. Контуром обозначен дополнительный белок у больного ХГ. Направление ИЭФ показано стрелой. Справа дорожка одномерного разделения. Обозначения основных белков произведено согласно номенклатуре Степа — Хеста.

Рис. 2. Распределение эритроцитов в ступенчатом градиенте фикола — 400.

a — здоровый донор, *б* — больной хореей Гентингтона. (1—4 — номера фракций).



К ст. Т. П. Моженок и соавт.



Действие маннана и маннансульфата на слияние лизосом с фагосомами в перитонеальных макрофагах мышей.

1 — окраска АО; 2 — дрожжевые частицы; 3 — перитонеальные макрофаги и дрожжевые частицы без предварительного воздействия исследуемых веществ и окраски АО; 4 — перитонеальный макрофаг, в котором произошло слияние лизосом с фагосомами (контроль); 5 — то же после воздействия маннана (72 ч); 6 — то же после воздействия маннансульфата (72 ч).

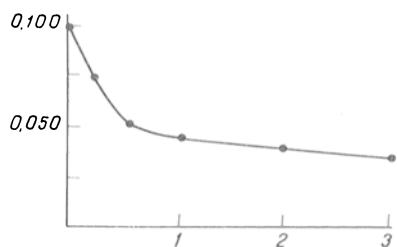


Рис. 3. Выход сангвиритрина в свежую среду после его аккумуляции клетками.

количество аккумулированного клетками сангвиритрина зависит от его концентрации в среде инкубации. На рис. 2 представлена аккумуляция клетками сангвиритрина при концентрации в среде 70 мкМ. Видно, что в первые 30 мин клетки поглощают сангвиритрин с большой скоростью. За это время накапливается около 80 % вещества, аккумулирующегося клетками в течение часа. После 2 ч инкубации отмечается снижение накопления сангвиритрина клетками. По-видимому, это может быть связано с токсическим действием сангвиритрина. Однако при уменьшении концентрации в среде сангвиритрина в 10 раз характер кривой сохраняется. Исходя из имеющихся данных о соотношении объема клетки и количества ее белка [21], можно сделать вывод, что при концентрации во внешней среде $7 \cdot 10^{-5}$ М сангвиритрина за 2 ч инкубации происходит увеличение его количества в клетке в 385 раз. Аналогичный характер поглощения веществ клетками во времени получен для даунорубидина [5] и AMSA [13]. При помещении клеток после инкубации с сангвиритрином в чистую среду наблюдается выход этого вещества из клеток (рис. 3). 50 % аккумулированного сангвиритрина теряется клетками в первые 30 мин, далее интенсивность процесса резко уменьшается. Отметим, что определенная часть препарата остается связанной клетками.

Интеркаляция в ДНК исследуемых веществ установлена рядом авторов [10, 17, 19]. Естественно, что при таком взаимодействии происходит ингибирование реакций, протекающих на ДНК, как на матрице [3]. Однако при взаимодействии сангвиритрина с клетками заметное количество алкалоида связывается с цитоплазмой. В опытах по равновесному центрифугированию в линейном градиенте плотности сахарозы гомогената клеток,

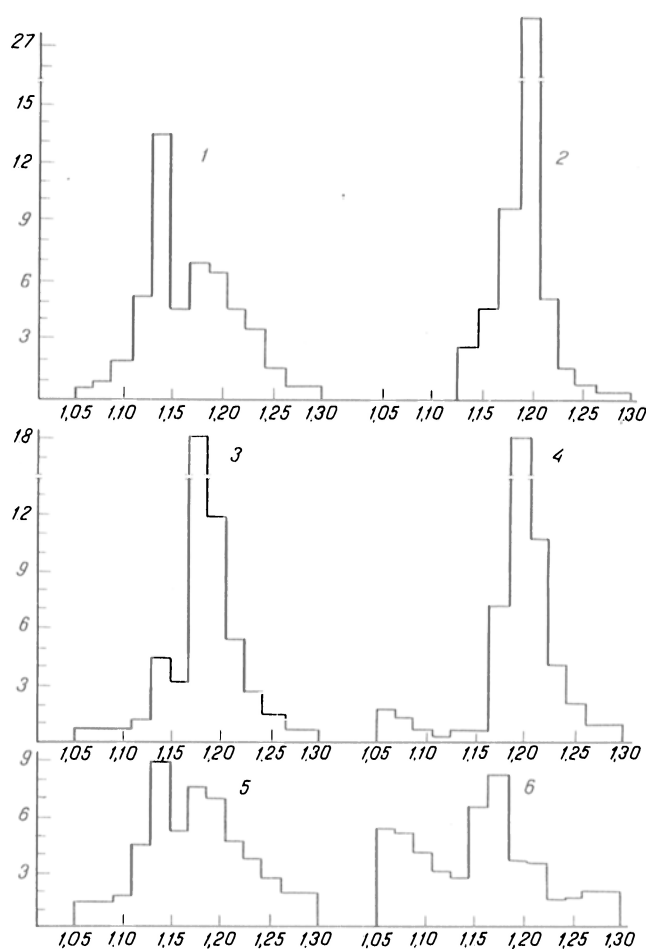


Рис. 4. Изоникническое центрифугирование гомогената фибробластов.

По осям абсцисс — плотность сахарозы, г/см³; по осям ординат — относительная активность по фракции. 1 — галактозилтрансфераза; 2 — цитохромоксидаза; 3 — катепсин D; 4 — АГ; 5 — сангвиритрин; 6 — общий белок.

инкубируемых 1 ч в присутствии $2,5 \cdot 10^{-5}$ М сангвиритрина, после охлаждения ядерной фракции, показано, что сангвиритрин присутствует в широком диапазоне фракции градиента. Эти данные совпадают с результатами, полученными при обработке клеток изохинилиновыми алкалоидами [20]. Как следует из рис. 4, распределение сангвиритри-

Таблица 1

Активность лизосомных ферментов в гомогенате клеток при различной концентрации сангвиритрина, М

Фермент	Контроль	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}
Катепсин D	488±93	445±116	501±101	433±81
Кислая липаза	16,3±7,8	16,3±8,0	15,4±6,5	8,7±5,5*
N-ацетил-β-D-глюкозаминидаза	47,8±16,2	44,9±7,4	51,6±15,6	51±15,3
β-Галактозидаза	2,2±0,4	2,1±0,4	2,1±0,5	2,1±0,8
Кислая фосфатаза	27,6±8,8	23,1±3,0	30,2±10,8	20,8±4,8

Примечание. Здесь и в табл. 2: активность катепсина D выражена в импульсах в минуту на 1 мг белка за 1 мин инкубации, активность остальных ферментов — в наномолях продукта реакции на 1 мг белка за 1 мин. Звездочка — $p < 0,05$.

Таблица 2

Активность лизосомных ферментов в фибробластах при различной концентрации сангвиритрина в среде, М

Фермент	Контроль	$5 \cdot 10^{-5}$	10^{-4}	$2 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-4}$
Катепсин D	578±144	490±135	463±141	293±34*	218±91*
Кислая липаза	13,1±6	10,2±5,2	12,7±3,5	8,5±5,4*	5,9±2,8*
N-ацетил-β-D-глюкозаминидаза	63,1±18,5	48,4±13,5	42,5±16,2*	33,3±18,9*	22,3±5,7*
β-Галактозидаза	2,9±0,8	2,5±0,8	1,7±0,2*	1,5±0,5*	1,2±0,8*
Кислая фосфатаза	34,6±9,9	27,3±9,5	29,7±5,6	20,2±5,8*	14,2±4,4*

на совпадает с распределением активности маркерных ферментов лизосом — АГ и катепсина D. Однако хорошо выраженные пики имеются и в области распределения элементов аппарата Гольджи и митохондрий. Эти данные свидетельствуют о том, что часть сангвиритрина, поглощенного клеткой, связывается с этими внутриклеточными структурами, и соответствуют предыдущему исследованию по изучению разобщающего действия сангвиритрина на окислительное фосфорилирование митохондрий [11].

При изучении влияния сангвиритрина на активность лизосомных гидролаз в первой серии опытов готовили гомогенат клеток (1 мг белка в 1 мл), вводили сангвиритрин, чтобы выдерживали в течение часа на холоду и исследовали ферментативную активность. Как видно из табл. 1, при этих условиях ингибирующее действие сангвиритрина выражено незначительно.

При инкубации клеток в CO₂-инкубаторе в течение 1 ч в среде, содержащей сангвиритрин в концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ М, последняя оказывает почти 50 % ингибирующее действие на активность катепсина D, АГ и β -галактозидазы, а в концентрации $4 \cdot 10^{-4}$ М сангвиритрин подавляет активность кислой липазы (на 55 %) и кислой фосфатазы (на 58 %).

Сангвинарин легко взаимодействует с SH-группами ферментов [12]. Поэтому можно полагать, что сангвиритрин, являющийся слабым основанием, находясь в лизосомах в высоких концентрациях, взаимодействует с активным центром ферментов, в состав которых входят SH-группы, и подавляет их активность. Вместе с тем ингибирование катепсина D, который играет важную роль во внутрилизосомном протеолизе, может вызвать нарушение обмена клеточных белков, а также препятствовать формированию ферментного состава лизосом, так как известно, что ряд вновь синтезированных ферментов, попадая в лизосомы, проявляет функциональную активность лишь после ограниченного протеолиза [15].

По-видимому, сангвиритрин, кроме известных мишеней действия, способен ингибировать отдельные лизосомные гидролазы, что необходимо учитывать при длительном применении препарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адгина В. В., Вичканова С. А., Лаская О. Е. // Антибиотики. — 1973. — № 9. — С. 902—905.
2. Балицкий К. П., Воронцова А. Л. // Лекарственные растения и рак. — Киев, 1982. — С. 156—161.
3. Беляева Т. Н., Седова В. М., Фаддеева М. Д. // Биохимия. — 1984. — Т. 49. — С. 222—229.
4. Булычев А. Г., Семенова Е. Г., Ассиновская О. А. // Цитология. — 1986. — Т. 28, № 7. — С. 703—712.
5. Булычев А. Г., Семенова Е. Г., Ассиновская О. А., Прозоровская М. П. // Цитология. — 1988. — Т. 30, № 5. — С. 560—567.
6. Вичканова С. А., Толкачев О. Н., Мартынова Р. Г., Арзамасцев Е. В. // Хим.-фарм. журн. — 1982. — № 12. — С. 107—112.
7. Короленко Т. А. Биохимические аспекты лизосомотропизма. — Новосибирск, 1983.
8. Семенова Е. Г., Хоменко А. В., Мамаева С. Е. // Цитология. — 1984. — Т. 26, № 10. — С. 1156—1160.
9. Станец М. П. О лечебных свойствах чистотела обыкновенного. — Киев, 1966.
10. Фаддеева М. Д., Беляева Т. Н., Новиков И. П., и др. // Докл. АН СССР. — 1980. — Т. 253, № 2. — С. 491—494.

11. Фаддеева М. Д., Беляева Т. Н., Соколовская Е. Л. // Цитология. — 1987. — Т. 29, № 5. — С. 576—581.
12. Cohen H. G., Seifen E. E., Straub K., Frefenback O., Stromitz F. R. // Biochem. Pharmacol. — 1978. — Vol. 27. — P. 2555—2558.
13. Darkin S., Kalph R. K. // FEBS Letters. — 1985. — Vol. 190, N 2. — P. 349—353.
14. De Groot Ph., Elferink R. O., Hollemans M. et al. // Exp. Cell Res. — 1981. — Vol. 136. — P. 327—333.
15. Gieselmann V., Hasilik A., Von Figura K. // J. Biol. Chem. — 1985. — Vol. 260. — P. 3215—3220.
16. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Randall R. J. // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—272.
17. Maiti M., Nandi R., Chaudhuri K. // FEBS Letters. — 1982. — Vol. 142. — P. 280—284.
18. Reasor M., Hosteiler K. V. // Biochem. biophys. Acta. — 1984. — Vol. 793. — P. 497—501.
19. Smekal E., Kubova N., Kleinwachter V. // Studia biophysica. — 1985. — Vol. 105, N 2. — P. 77—84.
20. Sveida J., Slavik J., Drovak R., Adamek R. // Scripta Medica. — 1969. — Vol. 42, N 6—7. — P. 291—295.
21. Tulkens P., Tromet A. // Biochem. Pharmacol. — 1978. — Vol. 27. — P. 415—424.
22. Waring M. J. // Ann. Rev. Biochem. — 1981. — Vol. 50. — P. 159—193.

Поступила 23.03.90

EFFECTS OF SANGUITRINE ON THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF LYSOSOMES IN FIBROBLASTS

T. N. Belyaeva, A. G. Bulychov, O. E. Lasskaya, E. G. Semenova

Institute of Cytology, Academy of Sciences of the USSR, Leningrad, All-Union Institute of Medical Plants, Moscow

Kinetics of sanguitrine consumption by L cells of LSM substrain was studied in cell culture. About half of the drug used was absorbed by cells within 20 min. Sanguitrine inhibited the lysosomal hydrolases (cathepsin D, β -D-galactosidase and N-acetyl- β -D-glucosaminidase) activity by 50 % at concentration $2 \cdot 10^{-4}$ M. The drug at concentration $4 \cdot 10^{-4}$ M inhibited acid lipase by 55 % and acid phosphatase by 58 %.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 612.017.1.08:[612.112.95+612.411+612.438].015.13:577.152.344

А. В. Васильев, Т. А. Воробейчик, Д. В. Гуткин, В. А. Тютельян

АКТИВНОСТЬ ЛИЗОСОМНЫХ ПРОТЕИНАЗ В МАКРОФАГАХ, СЕЛЕЗЕНКЕ И ТИМУСЕ МЫШЕЙ В ДИНАМИКЕ ФОРМИРОВАНИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА

Институт питания АМН СССР, Москва

В настоящее время общепризнана роль ферментов лизосомного аппарата в развитии иммунных реакций [10, 11, 14, 21, 22]. При этом в связи с белковой природой антигенов и антител можно предположить, что наибольшее участие в этих процессах принимают протеиназы лизосом — катепсины. Известно, что развитие иммунной реакции является многостадийным процессом и этой стадийности может соответствовать адекватная реакция лизосомного аппарата, в частности протеолитической системы лизосом. Однако экспериментальное изучение этого вопроса ранее не проводилось. Целью данной работы явилось комплексное исследование лизосомных эндонептидаз (катепсинов D, L, В и Н) и экзонептидаз (катепсинов А и С) в динамике развития иммунного ответа.

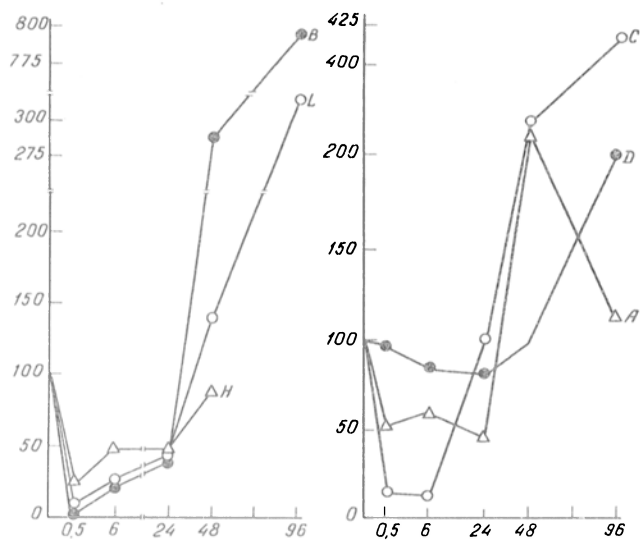


Рис. 1. Динамика активности лизосомных протеиназ в перитонеальных макрофагах мышей при антигенной стимуляции. Здесь и на рис. 2, 3: по оси абсцисс — время, ч; по оси ординат — активность ферментов, % по сравнению с контролем. А, В, С, D, H, L — катепсины.

Методика. Мышам линии СВА×С57BL/6 массой 20–25 г вводили внутривенно 0,5 мл 5 % суспензии эритроцитов барана и декантировали через 0,5, 6, 24, 48 и 96 ч после антигенной стимуляции. Выделяли суспензию перитонеальных макрофагов, селезенку и тимус. В селезенке определяли число антителообразующих клеток (АОК) методом локального гемолиза в агарозе [16].

Для биохимических исследований из полученного материала готовили гомогенаты по стандартной методике на 0,25 М растворе сахарозы, содержащем 1 мМ ЭДТА [1]. В гомогенатах с помощью спектрофотометрических и спектрофлуориметрических методов определяли активность катепсинов А, В, С, D, H и L, используя в качестве субстратов КБЗ-глу-L-тир, бензил-арг-арг-метокси-β-нафтиламин, гли-фен-β-нафтиламин, гемоглобин, L-арг-7-амидо-4-метилкумарин, КБЗ-арг-7-амидо-4-метилкумарин соответственно [1, 2, 17]. Содержание белка определяли по методу Lowry и соавт. [18]. Полученные данные обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Для характеристики выраженности иммунного ответа через разные промежутки времени после введения эритроцитов барана исследовали продукцию АОК в селезенке. Было установлено, что число их прогрессивно нарастает по мере формирования иммунного ответа и через 48 ч увеличивается в 2,5 раза по сравнению с исходным уровнем, а через 96 ч — более чем в 10 раз.

Динамика активности катепсинов в перитонеальных макрофагах мышей представлена на рис. 1, из которого видно, что реакция различных протеиназ имеет стереотипный характер. Это выражается в том, что через 0,5 ч после иммунизации происходит резкое падение активности ферментов, а затем ее постепенное увеличение. Ко 2-м суткам после антигенной стимуляции активность катепсинов В, L, А и С значительно превышает исходный уровень. На 4-е сутки активность катепсина В увеличена в 8 раз, активность катепсина L — в 3 раза, активность катепсина С — в 4 раза, а катепсина D — в 2 раза. В то же время активность катепсина А возвращается к исходному уровню. Такой характер изменения активности лизосомных ферментов отражает участие макрофагов в процессах формирования иммунного ответа, имеющих выраженный стадийный характер [4, 12].

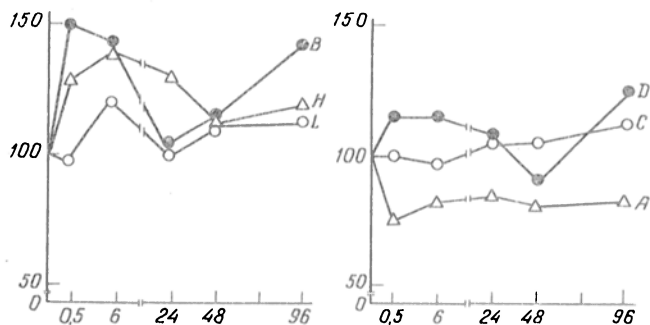


Рис. 2. Динамика активности лизосомных протеиназ в селезенке мышей при антигенной стимуляции.

На I стадии происходит резкая интенсификация макрофагального фагоцитоза, что сопровождается расходом лизосомных гидролаз в реакциях внутриклеточного протеолиза антигенного материала и соответственно уменьшением их активности. На II стадии происходит, по-видимому, индукция синтеза лизосомных ферментов *de novo*, что проявляется в значительном увеличении их общей активности в макрофагах. Полученные нами результаты соответствуют данным ранее выполненных исследований, в которых обнаружена аналогичная динамика активности других лизосомных гидролаз — кислой фосфатазы, РНКазы, ДНКазы и β-глюкуронидазы [4, 6, 19, 20].

Динамика активности ферментов в селезенке и тимусе представлена на рис. 2 и 3, из которых следует, что при антигенной стимуляции реакция протеиназ в этих органах выражена слабее, чем в макрофагах: нет столь резких колебаний активности катепсинов, а также четко выраженной стадийности. Активность тиролиновых протеиназ в селезенке в течение первых 6 ч наблюдения достоверно увеличивается (активность катепсина В на 44 %, катепсина H на 42 %, катепсина L на 26 %) и нормализуется ко 2-м суткам. Через 96 ч вновь происходит некоторое увеличение активности катепсина В.

Примерно такой же характер имеет динамика активности катепсина D: увеличение на ранних сроках на 18 %, нормализация к 1–2-м суткам и вновь увеличение через 96 ч. Активность экзопептидаз на всех сроках наблюдения достоверно не меняется.

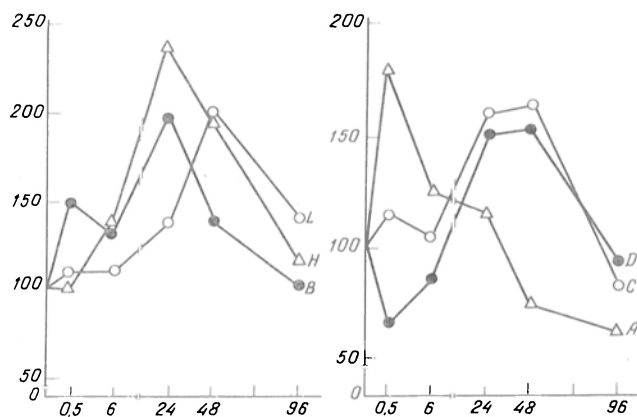


Рис. 3. Динамика активности лизосомных протеиназ в тимусе мышей при антигенной стимуляции.

Можно предположить, что наблюдаемые изменения активности эндопептидаз в селезенке связаны как с активацией лизосомных ферментов (особенно на ранней стадии формирования иммунного ответа), так и с изменением состава клеточных популяций. В ранее выполненных работах [5, 7, 9] показаны увеличение числа и активности иммунокомпетентных клеток и интенсивная трансформация В-лимфоцитов в плазмоциты, начинающаяся на 3-и сутки после антигенной стимуляции. Одновременно увеличиваются количество и активность макрофагов селезенки и количество содержащихся в них лизосом [5]. Данные изменения вызваны, вероятно, миграцией лимфоцитов и макрофагов, а также усилением синтеза нуклеиновых кислот и белков в селезенке, что подтверждается возрастанием количества РНК на 3—5-е сутки после антигенной стимуляции [3].

В тимусе тиоловые протеиназы проявляют тенденцию к постепенному увеличению активности, достигающему максимума между 1-ми и 2-ми сутками после антигенной стимуляции. Через 96 ч активность этих протеиназ снижается до исходного уровня. Такой же характер носят изменения активности катепсинов D и C. Активность этих ферментов сначала увеличивается, достигая максимума через 24—48 ч после антигенной стимуляции, а затем нормализуется к 96 ч наблюдения. Напротив, активность катепсина A существенно увеличивается уже через 30 мин, достигает максимума к 6 ч и в дальнейшем достоверно не меняется.

Таким образом, основная тенденция изменения активности протеолитической системы лизосом в тимусе проявляется в активации лизосомных протеиназ на ранних стадиях формирования иммунного ответа. Такая активация может быть связана с протеканием реакций ограниченного протеолиза при образовании гормонов тимуса из высокомолекулярных предшественников [8, 13, 15].

В целом проведенное исследование свидетельствует о наличии выраженных стадийных изменений активности катепсинов лизосом в динамике формирования иммунного ответа. Эти изменения в тимусе характеризуются максимальным увеличением на ранних стадиях наблюдения, а в селезенке и макрофагах — на 2—4-е сутки после антигенной стимуляции, т. е. на пике развития гуморального иммунитета.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баррет А. Дж., Хит М. // Лизосомы: методы исследования / Под ред. Дж. Дингла: Пер. с англ.— М., 1980.— С. 25—156.
2. Васильев А. В., Капелевич Т. А., Тутельян В. А. // Вопр. мед. химии.— 1983.— № 3.— С. 127—130.
3. Грутман М. И. // Журн. микробиол.— 1966.— № 6.— С. 67—71.
4. Гуткин В. С., Горбатов В. А., Феоктистова Т. А. Лизосомы в антибактериальном иммунитете животных.— М., 1984.
5. Давронов Р. Б., Ботирова З. Б., Кахарбекова А. К. Компенсаторно-приспособительные процессы в клетках внутренней среды.— Ташкент, 1988.— С. 11—14.
6. Медуницин М. В. // Иммунология.— 1980.— № 2.— С. 20—26.
7. Михайлова Т. Н., Штернберг И. Б., Зингер Г. В., Козлова Ю. Г. // Журн. микробиол.— 1969.— № 11.— С. 94—98.
8. Морозов В. Г., Хавинсон В. Х. // Успехи соврем. биол.— 1984.— Т. 97.— Вып. 1.— С. 36—49.
9. Николаев А. И., Алферова В. Б., Розгон М. Н. // Журн. микробиол.— 1968.— № 6.— С. 126—130.

10. Панин Л. Е., Мазинская Н. Н. Лизосомы.— Новосибирск, 1987.
11. Покровский А. А., Тутельян В. А. Лизосомы.— М., 1976.
12. Учитель И. Я. Макрофаги в иммунитете.— М., 1978.
13. Шведов А. С. // Иммунология.— 1986.— № 3.— С. 8—13.
14. Anomoto T., Okazaki T., Hanada K. et al. // Biochim. Biophys. Res. Commun.— 1984.— Vol. 118.— P. 117—123.
15. Bach J. F. // Contemp. Top. Immunol.— 1973.— P. 189.
16. Jerne K. K., Nordin A. A. // Science.— 1963.— Vol. 140.— P. 405.
17. Kirschke H. // Proteinases in Mammalian Tissues and Cells.— Halle, 1982.— P. 125—128.
18. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall K. // J. Biol. Chem.— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
19. Pierce C. W. // Amer. J. Pathol.— 1980.— Vol. 98.— P. 10—28.
20. Rosenthal A. C. // Nature.— 1977.— Vol. 267.— P. 156—158.
21. Weissman G., Ducor P. // Advanc. Immunol.— 1970.— Vol. 12.— P. 283—288.
22. Werdlin D. // Amer. Inst. Pacteur. Immunol.— 1986.— Vol. 137.— P. 323—326.

Поступила 23.03.90

ACTIVITY OF LYSOSOMAL PROTEINASES IN MICE MACROPHAGES, SPLEEN AND THYMUS DURING DEVELOPMENT OF IMMUNE RESPONSE

A. V. Vasil'ev, T. A. Vorobeychik, D. V. Gutkin, V. A. Tutel'yan

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

Activity of lysosomal proteinases cathepsins A, B, C, D, H and L was studied in peritoneal macrophages, spleen and thymus of mice CBA×C57BL/6 strain in dynamics of immune response formation to sheep erythrocytes from 0.5 hr to 96 hrs. The most distinct alterations in the enzymatic activity were detected in macrophages. Activity of the enzymes studied was sharply decreased within 0.5 hr after immunization and then increased gradually, attaining maximal rates within 4 days. Two-phase increase in activity of cathepsins D and thiol-dependent proteinases cathepsins B, L and H was found in spleen within 0.5-6 hrs and 96 hrs after the antigen stimulation. Dynamics of individual cathepsins activity was dissimilar in thymus but the activity was mainly increased during 24-48 hrs of the antigen stimulation. The data obtained suggest that activity of lysosomal proteinases was distinctly altered in dynamics of the immune response development attaining its maximal values at the peak phase of humoral immunity formation.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 615.283.926.017:615.275.3].015.4:[612.35.014:576.311.344].015.1:577.152.344

Т. А. Короленко, Е. В. Рукавишникова,
А. Б. Пуньшев

ЭФФЕКТ ОДНОКРАТНОГО И ПОВТОРНОГО ВВЕДЕНИЯ ХЛОРОХИНА НА АКТИВНОСТЬ ПРОТЕИНАЗ ЛИЗОСОМ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ КРЫС

Институт физиологии СО АМН СССР, Новосибирск, Новосибирский медицинский институт

Хлорохин, слабоосновный ароматический амин, широко применяется как противовоспалительный препарат в терапии ревматоидного артрита [1, 9], а также как антипаразитарное средство при лечении и профилактике малярии [16]. В экспериментах на изолированных клетках (гепатоцитах, фибробластах) хлорохин используют для селективного подавления лизосомного пути катаболизма белка [20]. Блокируя внутрилизосомный протеолиз хло-

рохином, удастся воспроизвести признаки болезненной накопления, связанные с нарушением деградации в лизосомах фосфолипидов, белков и т. д. До настоящего времени неясно, осуществляет ли препарат свое действие благодаря подавлению активности кислых гидролаз или определяющими факторами являются повышение pH внутри лизосом, нарушение рециклирования рецепторов и усиление секреции вновь синтезированных кислых гидролаз во внесклеточное пространство [5, 12, 20]. Значительная часть исследований по изучению механизма действия хлорохина проведена в условиях *in vitro* (культура ткани, изолированные гепатоциты, а также изолированные лизосомы). Действие хлорохина *in vivo* изучено недостаточно, причем данные литературы зачастую противоречивы [10, 16, 21, 22], что связано с различиями экспериментальных процедур (вид животных, дозы хлорохина и др.).

В настоящей работе сравнивается влияние однократного и повторного введения высокой дозы хлорохина на активность протеиназ лизосом и функциональную активность макрофагов печени крыс в динамике накопления препарата в лизосомах и его выведения.

Методика. В эксперименте использовали 170 крыс-самцов Вистар массой 150—250 г, а также 25 мышей СВА/C57Bl. Хлорохин (делагил) (EGYT, Венгрия) вводили крысам внутривенно в дозе 30 мг/кг [2]. При однократном введении препарата крыс деканитировали через 0,5, 1, 3, 5 и 24 ч после инъекции. При повторных введениях хлорохина вводили крысам в той же дозе ежедневно в течение 7 дней. Животных деканитировали спустя 0,5, 1, 3, 24 и 72 ч после завершающей инъекции. Печень извлекали, промывали раствором 0,25М сахарозы, содержащей 1 мМ ЭДТА, и гомогенизировали в гомогенизаторе с тефлоновым пестиком. Используемые препаративные процедуры описаны ранее [2, 4]. Осмотические свойства лизосом оценивали по приросту оседиментируемой активности β -галактозидазы после обработки гомогената печени в 0,15М сахарозе [4]. Активность β -галактозидазы, кислой фосфатазы определяли по [6], активность цистеиновых и аспартильных протеиназ — как описано ранее [2], используя в качестве субстрата азоказеин. Содержание хлорохина в гомогенате и субклеточных фракциях печени измеряли флюориметрически [7]. Функциональную активность системы мононуклеарных фагоцитов определяли по клиренсу коллоидного углерода («Günther-Wagner», ФРГ). Взвесь в 2 % растворе желатина вводили в хвостовую вену в дозе 35 мг на 100 г массы под легким эфирным наркозом. Период полувыведения коллоида определяли графически; для характеристики фагоцитоза использовали коэффициент k , вычисляемый по формуле: $k = \frac{\lg 2}{t_{1/2}}$ [19], где $t_{1/2}$ — время получения коллоида.

Для контроля подавления активности цистеиновых протеиназ *in vivo* мышам вводили ингибитор Ер-475 внутривенно однократно в дозе 10 мг/кг, используя в качестве контроля интактных животных и мышей с введением растворителя. Мышей деканитировали спустя 3 ч после инъекции Ер-475, когда проявляется ингибирующий эффект [13]. Ер-475 любезно предоставлен д-ром К. Ханада (Япония).

Содержание белка в пробах оценивали по методу Lowry и соавт. [15]. Статистическую обработку результатов проводили методом параллельных рядов вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Ранее нами показан ингибирующий эффект хлорохина на чистые ферменты — катепсин Н, В и L — при использовании синтетических субстратов. Эффект был незначителен, если применяли белковый субстрат азоказеин и экстракт ферментов лизосом. Наблюдали также неспецифическое взаимодействие высоких концентраций хлорохина с азоказеином, что указывало на возможность формирования анало-

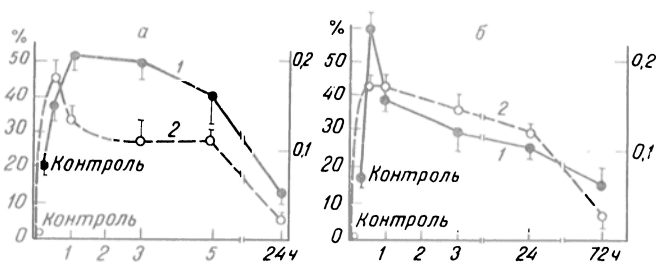


Рис. 1. Влияние однократного (а) и повторного (б) введения хлорохина крысам на осмотические свойства лизосом в процессе накопления и выведения препарата.

По оси абсцисс — время после введения хлорохина крысам, ч; по оси ординат: слева — оседиментируемая активность β -галактозидазы (1), % от общей активности, справа — концентрация хлорохина в гомогенате печени (2), в мкмоль на 1 г ткани.

гичных комплексов в лизосомах клеток печени *in vivo* [2].

Однократное введение крысам хлорохина в высокой дозе (30 мг/кг) приводит к быстрому накоплению препарата в печени. Максимальные значения регистрируются через 0,5—1 ч (до 0,18 мкмоль хлорохина в расчете на 1 г ткани) (рис. 1). Это соответствует данным других исследователей, которые использовали однократно более высокую дозу (70 мг/кг для мышей) и обнаружили более высокую концентрацию хлорохина в гомогенате печени (примерно в 2,5 раза) [7]. Спустя 24 ч после однократного введения соединения наблюдается почти полное его выведение. Отмечено резкое увеличение осмотической повреждаемости лизосом в гипотоническом растворе сахарозы, причем максимальные нарушения развивались через 1 ч после введения хлорохина, т. е. почти одновременно с пиком максимальной концентрации препарата. Очевидно, резкие нарушения осмотических свойств лизосом отражают накопление препарата в лизосомах, а также формирование в гепатоцитах значительного числа аутофагосом, мембрана которых обладает повышенной повреждаемостью при обработке в гипотонической среде [3]. Формирование многочисленных аутофагосом отмечено исследователями, использовавшими дозы хлорозина от 10 до 50 мг/кг спустя 45 мин, 1 ч [11, 20—22]. Восстановление осмотических свойств лизосом совпадает с выведением хлорохина. Накопление хлорохина в лизосомах, как показано нами, сопровождалось лишь умеренной лабильзацией, судя по увеличению оседиментируемой активности β -галактозидазы (контроль $12,7 \pm 0,8$ % при $n=19$; через 0,5 ч после введения хлорохина $17,3 \pm 1,7$ % при $n=11$; $p < 0,05$). При отмеченных нарушениях свойств лизосом печени способность фагоцитировать частицы коллоидного углерода не изменена. У интактных крыс период полувыведения коллоидного углерода составляет 7—12 мин, что соответствует коэффициенту фагоцитоза $0,033 \pm 0,0027$ (табл. 1). При введении хлорохина крысам существенных изменений фагоцитирующей способности клеток системы мононуклеарных фагоцитов не обнаружено, хотя ряд исследователей наблюдали подавление фагоцитоза макрофагами *in vitro* при воздействии хлорохина [5].

Прежде чем перейти к рассмотрению изменений активности ферментов, следует отметить, что при однократном введении крысам хлорохина существ-

Таблица 1

Влияние однократного введения крысам хлорохина на активность системы мононуклеарных фагоцитов (клиренс коллоидного углерода)

Группа животных	Коэффициент фагоцитоза, $M \pm m$
Контрольная (15)	$0,033 \pm 0,0027$
Исследованная после введения хлорохина через:	
0,5 ч (14)	$0,037 \pm 0,0047$
1 ч (8)	$0,031 \pm 0,0050$
3 ч (9)	$0,032 \pm 0,0069$
5 ч (9)	$0,036 \pm 0,0048$
24 ч (8)	$0,039 \pm 0,0041$

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3 в скобках — количество животных.

венных изменений содержания белка в ткани печени не обнаружено; оно снижено только спустя 24 ч после инъекции препарата (контроль $109,7 \pm 8,6$ мг/на 1 г ткани при $n=19$; опыт $62,6 \pm 6,8$ мг на 1 г ткани при $n=5$; $p < 0,01$). Относительная масса печени не изменена (снижена лишь через 5 ч после введения препарата: контроль $3,7 \pm 0,12$ % при $n=19$; опыт $3,1 \pm 0,08$ % при $n=6$; $p < 0,01$). Нами обнаружено увеличение общей и неседиментируемой активности β -галактозидазы в печени на 25—30 % через 4 и 24 ч, что может просто отражать снижение содержания белка (табл. 2). Более четкие данные получены в отношении протеиназ лизосом (рис. 2), активность которых увеличена, как катепсина D, так цистеиновых протеиназ. Следует отметить, что вследствие наличия высокомолекулярного ингибитора цистеиновых протеиназ в цитозоле мы проводили исследование активности в суммарной гранулярной фракции (включающей ядра, митохондрии, лизосомы и микросомы, за исключением надосадочной фракции).

При повторных введениях хлорохина крысам максимальные значения концентрации препарата не превышали соответствующие данные при его однократном введении с пиком на 0,5 ч (см. рис. 1). Однако выведение хлорохина осуществлялось более медленно: через 24 ч после заключительной инъекции в печени содержалось около половины накопленного соединения и только спустя 3 сут происходило почти полное выведение хлорохина.

Таблица 2

Влияние однократного введения крысам хлорохина на общую (в мкмоль/мм/мг белка) и неседиментируемую (в % от общей) β -галактозидазы активность печени ($M \pm m$)

Группа животных		Активность β -галактозидазы	
		неседиментируемая	общая
Контрольная	(19)	$12,7 \pm 0,77$	$1,00 \pm 0,06$
Исследованная после введения хлорохина через:			
0,5 ч	(11)	$17,3 \pm 1,66^*$	$0,96 \pm 0,09$
1 ч	(8)	$16,2 \pm 2,01$	$0,87 \pm 0,10$
3 ч	(8)	$20,0 \pm 3,63$	$1,20 \pm 0,13$
5 ч	(6)	$16,4 \pm 1,39^*$	$1,81 \pm 0,17^*$
24 ч	(5)	$12,3 \pm 0,73$	$1,64 \pm 0,22^*$

Примечание. Здесь и в табл. 3 одна звездочка — $p < 0,05$, две — $p < 0,01$.

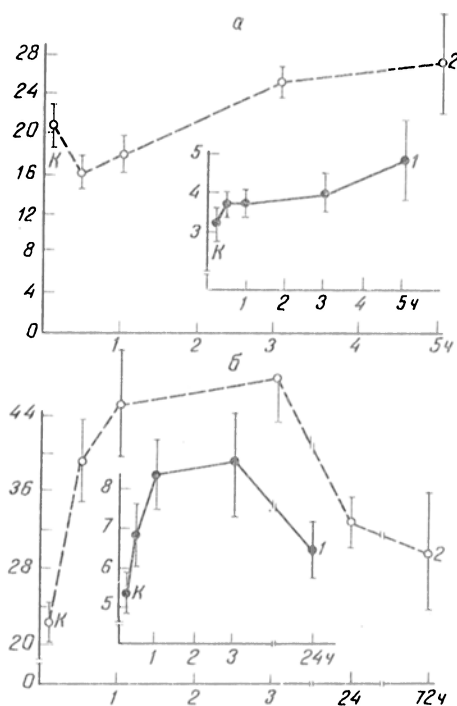


Рис. 2. Влияние однократного (а) и повторного (б) введения хлорохина крысам на суммарную активность цистеиновых протеиназ (1) и катепсина D (2) в суммарной гранулярной фракции печени крыс.

По оси абсцисс — время после введения хлорохина, в ч; по оси ординат — активность протеиназ лизосом ($L_{\text{лиз}}$, мин на 1 мг белка; К — контроль).

Как и при однократном введении хлорохина, при повторном использовании препарата наблюдали выраженные нарушения осмотического поведения лизосом (см. рис. 1), «нормализация» наступала лишь через 3 сут, т. е. к моменту почти полного выведения хлорохина из печени. Лабилизация лизосом — весьма умеренная, спустя 0,5 и 1 ч после завершающей инъекции, о чем судили по уровню неседиментируемой активности. При повторных введениях хлорохина регистрировали также увеличение общей активности β -галактозидазы до 130—140 % в большинство исследованных сроков (табл. 3). В сравнении с однократным введением более существенно возрастала общая активность катепсина D (до 200—220 %) и цистеиновых протеиназ (до 160 %) во все исследованные сроки (см. рис. 2). Даже спустя 24 и 72 ч при значительном выведении хлорохина уровень активности исследованных протеиназ оставался достаточно высоким.

Таблица 3

Влияние повторного введения хлорохина крысам на общую (в мкмоль/мин/мг белка) и неседиментируемую (в % от общей) активность β -галактозидазы в печени

Группа животных		Активность β -галактозидазы	
		неседиментируемая	общая
Контрольная	(12)	$10,4 \pm 0,56$	$1,17 \pm 0,029$
Исследованная после введения хлорохина через:			
0,5 ч	(10)	$15,5 \pm 0,10^{**}$	$1,61 \pm 0,074^{**}$
1 ч	(8)	$13,8 \pm 1,00^{**}$	$1,51 \pm 0,068^{**}$
3 ч	(8)	$10,0 \pm 0,57$	$1,50 \pm 0,057^{**}$
24 ч	(10)	$10,5 \pm 1,11$	$1,45 \pm 0,049^{**}$
72 ч	(4)	$9,4 \pm 0,64$	$1,10 \pm 0,076$

Принимая во внимание способность хлорохина подавлять катаболизм белка в лизосомах изолированных гепатоцитов [20], следовало бы ожидать снижения активности протеиназ. Так, нами ранее показано снижение активности чистых катепсинов Н, В и L хлорохином *in vitro* [2]. Однако *in vivo* обнаружен противоположный эффект — увеличение активности, более выраженное при повторном использовании препарата. Следует отметить, что содержание белка в печени возрастало (через 0,5 ч после курса введения хлорохина $167 \pm 3,6$ мг на 1 г ткани, через 5 ч $169,1 \pm 4,9$ мг на 1 г ткани, $p < 0,05$; контроль $155,2 \pm 3,0$ мг на 1 г ткани), а относительная масса печени была снижена. Следовательно, увеличение активности протеиназ лизосом и других ферментов лизосом не обусловлено относительным снижением содержания белка в органе, и поэтому целесообразно говорить о причинах увеличения активности кислых гидролаз. Для катепсина D и цистеиновых протеиназ не обнаружено эндогенных активаторов, действием которых можно было бы объяснить полученные результаты [13, 20]. Вместе с тем при введении ингибитора Ер-475 активность катепсинов В, L и Н в гомогенате печени снижалась на 80 % при дозе 10 мг/кг, более существенное подавление активности обнаружено при дозе Ер-475, превышающей 10 мг/кг, (субстрат для цистеиновых протеиназ — азоказеин), что соответствует данным литературы [13]. Очевидно, однократное и повторное (в большей степени) введение хлорохина сопровождается парадоксальным увеличением активности протеиназ, которое свойственно и другим ферментам лизосом (β -галактозидазе, кислой фосфатазе, согласно нашим данным), а также, по данным литературы, α -фукозидазе [10], арилсульфатазам [10, 12]. Следовательно, можно предполагать действие одного из продуктов интрализосомного накопления на ряд ферментов, локализованных в лизосомах [9, 10]. Учитывая множественность эффектов хлорохина [8, 11, 17, 18], следует помнить о возможности временной «консервации» кислых гидролаз, механизм которой не известен [21, 22]. Несомненно, что имеет значение и снижение уровня секреции лизосомных ферментов в желчь при однократном воздействии хлорохина [22]. Недавно, однако, показано усиление секреции ферментов в желчь при повторном использовании более высокой дозы хлорохина — 50 мг/кг [21, 22].

Введение хлорохина в последние годы нередко рассматривают как модель лизосомной болезни накопления, связанной с подавлением активности ферментов лизосом [10, 12]. Однако *in vivo* ряд исследователей показали увеличение активности кислых гидролаз, хотя *in vitro* было показано их подавление [10]. Эти результаты трудно объяснить в настоящее время. Эффект препарата, очевидно, в значительной степени зависит от выбранной дозы, числа введений препарата. Особенно эффективны схемы с хроническим использованием соединения [10]. На изолированных клетках в концентрации свыше 1 мкМ хлорохин нарушает функционирование гепатоцитов, макрофагов [5, 20], селективно подавляет лизосомный путь протеолиза [20], нарушает рециклирование рецепторов [12], ингибирует катепсин В [17, 18], вызывает накопление фосфолипидов [16]. Не все из

этих эффектов могут быть достигнуты *in vivo*. Возможно, что в наших экспериментах с использованием высокой дозы хлорохина в лизосомах не была достигнута та высокая концентрация соединения, которая характерна для экспериментов с изолированными клетками.

ЛИТЕРАТУРА

1. Короленко Т. А. Биохимические аспекты лизосомотропизма. — Новосибирск, 1983.
2. Короленко Т. А., Пупышев А. Б., Мудраковская А. В. // *Вопр. мед. химии*. — 1987. — Т. 33, вып. 5. — С. 93—96.
3. Покровский А. А., Тугельян В. А. Лизосомы. — М., 1976.
4. Пупышев А. Б., Малыгин А. Е., Короленко Т. А. // *Биохимия*. — 1981. — Т. 46, № 7. — С. 1167—1174.
5. Antoni F., Hrabak A., Csuka I. // *Biochem. Pharmacol.* — 1986. — Vol. 35, N 17. — P. 2869—2874.
6. Barrett A. J. // *Lysosomes: a Laboratory Handbook* / Ed. J. T. Dingle. — Amsterdam, 1972. — P. 46—135.
7. Colombo M. I., Bertini F. // *Biol. Cell.* — 1985. — Vol. 54, N 1. — P. 73—78.
8. Dean R. T., Jessup W., Roberts C. R. // *Biochem. J.* — 1984. — Vol. 217. — P. 27—40.
9. French J. K., Hurst N. P., O'Donnell M. L., Belts W. H. // *Ann. Rheum. Dis.* — 1987. — Vol. 46. — P. 42—45.
10. Fredman P., Klinhardt G. W., Svennerholm L. // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1987. — Vol. 917. — P. 1—8.
11. Glaumann H., Ahlberg J., Berkenstam A., Henell F. // *Exp. Cell Res.* — 1986. — Vol. 163. — P. 151—158.
12. Gonzalez-Noriega A., Grubb J. H., Talkad V., Sly W. S. // *J. Cell Biol.* — 1980. — Vol. 85. — P. 839—852.
13. Hanada K., Tamai M., Adachi T. et al. // *Proteinase inhibitors: Medical and Biological Aspects* / Eds N. Karunuma et al. — Tokyo, 1983. — P. 25—36.
14. Hollingdale M. R. // *The Liver: Biology and Pathology* / Eds. I. M. Arias et al. — New York, 1988. — P. 1195—1211.
15. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // *J. Biol. Chem.* — 1951. — Vol. 153. — P. 265—275.
16. McChesney E. W., Fitch C. D. // *Antimalarial Drugs. II. Current antimalarials and new developments* / Eds W. Peters, W. H. G. Richards. — Berlin, 1984. — P. 3—60.
17. Ohkuma S., Poole B. // *J. Cell Biol.* — 1981. — Vol. 90, N 3. — P. 656—664.
18. Poole B., Ohkuma S. // *J. Cell. Biol.* — 1981. — Vol. 90, N 3. — P. 665—669.
19. Saba T. M. // *Arch. Intern. Med.* — 1970. — Vol. 126, N 6. — P. 1031—1032.
20. Seglen P. O. // *Lysosomes: their Role in Protein Breakdown*. — London; New York, 1987. — P. 371—414.
21. Sewell R. B., Barham S. S., LaRusso N. F. // *Gastroenterology*. — 1983. — Vol. 85, N 5. — P. 1146—1153.
22. Sewell R. B., Grinpukel S. A., Zinmeister A. R., LaRusso N. F. // *Gastroenterology*. — 1988. — Vol. 95, N 4. — P. 1088—1098.

Поступила 20.03.90

EFFECTS OF SINGLE AND REPEATED CHLOROQUINE ADMINISTRATIONS ON LYSOSOMAL PROTEINASES ACTIVITY IN RAT LIVER TISSUE

T. A. Korolenko, E. V. Rukavishnikova, A. B. Pupyshov

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

Effects of single and repeated injections of lysosomotropic agent chloroquine on lysosomal proteolytic activity and physicochemical properties of rat liver lysosomes have been studied. Chloroquine was administered intraperitoneally to rats at a dose of 30 mg/kg of body mass. Osmotic properties, lysosomal enzymes activity and functional state of the system of mononuclear phagocytes were estimated. No alterations of colloid carbon clearance followed by a single dose of chloroquine administration were noted. Distinct alterations in osmotic properties, weak labilization of lysosomes and an increase in acid hydrolases activity were similar after single and/or repeated chloroquine administrations, whereas activation of cysteine proteinases and cathepsin D were most pronounced. Chloroquine accumulation by rat liver cells proved to be similar, but the drug excretion was longer after repeated injections. The lysosomal disorders noted were similar to those symptoms of lysosomal storage disease.

Т. М. Шубитидзе, Т. Н. Бусова, Р. А. Рязанова,
С. И. Табагари

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЛИЗОСОМНОГО АППАРАТА ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ ПЕСТИЦИДОВ ДИТИОКАРБАМАТНОГО РЯДА

Тбилисский медицинский институт, НИИ гигиены им. Ф. Ф. Эрисмана Минздрава РСФСР, Москва

Выяснение биохимических механизмов действия чужеродных веществ, загрязняющих внутреннюю среду организма, дает возможность оценить патофизиологические последствия их токсического действия и разработать соответствующие профилактические и терапевтические меры при интоксикации. Следует отметить, что повреждающее действие экзогенных химических веществ опосредуется прежде всего через структурно-функциональные нарушения, возникающие на субклеточном уровне. При этом специфичность токсического действия определяется влиянием на отдельные звенья метаболизма. Среди реальных загрязнителей окружающей среды и внутренней среды организма животных и человека значительное место занимают пестициды, но детальные особенности биохимического действия многих из них остаются неясными, что, в частности, относится к группе пестицидов дитиокарбаматного ряда [9—11].

Поскольку лизосомальная система клетки является одним из звеньев ферментной защиты организма от действия чужеродных веществ [5—7] и имеются отдельные сведения о влиянии пестицидов данной группы (сульфокарбатион, тетраметилтиурамдисульфид — ТМТД) на структурно-функциональное состояние лизосомного аппарата [2, 8], представлялось целесообразным исследовать влияние на функциональное состояние лизосом гепатоцитов различных по токсичности представителей дитиокарбаматов — цинеба, полимарцина, ТМТД в сравнении со стандартными биохимическими тестами, характеризующими

функциональное состояние печени, — активностью аминотрансфераз.

Методика. Животные с исходной массой тела 260—280 г в течение 30 дней получали ежедневно внутрижелудочно с помощью зонда ТМТД, полимарцина и цинеб в ежедневной дозе $1/20$ ЛД₅₀ в виде суспензии в подсолнечном масле. Спустя 15 дней после начала эксперимента у животных из хвостовой вены брали кровь для исследования активности ферментов в сыворотке.

Общую, неседиментируемую активность в печени и активность в сыворотке крови лизосомных протеиназ, катепсинов А, В, С, D, определяли с помощью спектрофотометрических и спектрофлуориметрических методов [1], как описано ранее [3, 4]. Активность аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспаратаминотрансферазы (АСТ) в печени и сыворотке крови определяли с помощью стандартного набора реактивов «Lachema» (Чехословакия). Содержание белка в исследуемом материале определяли по методу Лоури [12]. Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. К концу эксперимента не было выявлено достоверных различий в массе тела контрольных и опытных животных и различий в относительной массе печени, почек и селезенки. Также не было отмечено клинических проявлений интоксикации.

Вместе с тем, как свидетельствуют результаты ферментного анализа, введение пестицидов животным приводило к существенному изменению общей активности лизосомных протеиназ в печени (табл. 1), что в целом выражалось в снижении активности всех исследованных ферментов. Однако детальный анализ полученных данных позволяет выделить определенную закономерность в действии пестицидов на протеолитическую систему лизосом. Так, введение ТМТД приводило к снижению активности ферментов на 30—65 % по сравнению с контролем. В свою очередь введение полимарцина и цинеба вызывало снижение активности комплекса лизосомных протеиназ на 28—56 и 19—40 % соответственно. При этом в последнем случае достоверные различия по сравнению с контролем были выявлены только для катепсинов В и С. Следует отметить, что и в случае введения ТМТД и полимарцина в наибольшей степени угнеталась активность данных тиоловых протеиназ.

Представляет интерес и изменение уровня неседиментируемой активности лизосомных гидро-

Таблица 1

Активность аминотрансфераз, ммоль (ч·г), и лизосомных протеиназ в печени крыс при введении пестицидов карбаматного ряда в дозе $1/20$ ЛД₅₀ в течение 30 дней

Условия эксперимента	АЛТ	АСТ	Катепсин А	Катепсин В	Катепсин С	Катепсин D
Контроль	679±93	292±58	2,01±0,11	2,79±0,14	24,9±1,2	7,84±0,23
ТМТД	739±91	315±54	1,41±0,08*	0,98±0,09*	10,5±0,7*	4,54±0,14*
Полимарцин	733±44	192±20	1,46±0,06*	1,23±0,05*	14,2±0,7*	5,10±0,21*
Цинеб	858±80	234±21	1,63±0,10	1,67±0,06*	18,4±0,7*	5,96±0,29

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 представлены средние данные ($M \pm m$) из 10 опытов; звездочкой обозначена достоверность $p < 0,05—0,001$.

Таблица 2

Неседиментируемая активность лизосомных протеиназ в печени крыс при введении пестицидов карбаматного ряда в дозе $1/20$ ЛД₅₀ в течение 30 дней (в процентах общей активности)

Условия эксперимента	Катепсин А	Катепсин В	Катепсин С	Катепсин D
Контроль	3,79±0,17	6,18±0,18	4,31±0,20	14,0±1,1
ТМТД	5,76±0,22*	11,7±0,24*	9,13±0,37*	32,8±2,0*
Полимарцин	5,12±0,24*	9,08±0,30*	7,03±0,21*	25,3±1,4*
Цинеб	3,63±0,16	6,92±0,21	5,04±0,18	14,7±0,97

лаз при введении указанных пестицидов (табл. 2). Как видно, и в этом случае изменение уровня неседиментируемой активности (при одинаковой направленности) зависело от используемого в эксперименте препарата. Введение ТМТД сопровождалось возрастанием уровня неседиментируемой активности ферментов лизосом до 152—234 % контроля, тогда как введение полимарцина вызывало прирост неседиментируемой активности катепсинов А, В, С и D только до 135—181 % контроля, а при введении цинеба достоверных изменений в уровне неседиментируемой активности не выявлено.

В этом аспекте привлекают внимание результаты исследования активности лизосомных протеиназ в сыворотке крови, представленные в табл. 3. Как видно, через 15 дней после начала введения пестицидов в сыворотке достоверно возрасла активность катепсинов В, С и D на 37—65 % в случае ТМТД и катепсинов С и D на 40 и 44 % соответственно в случае введения полимарцина. К концу эксперимента выявлено достоверное увеличение активности в сыворотке катепсинов В, С и D при введении ТМТД на 85—94 %, а при введении полимарцина — на 47—62 %. Существенно, что ни в одном случае не обнаружено увеличения активности лизосомных гидролаз в сыворотке крови крыс при введении цинеба.

Особо следует отметить, что ни в печени, ни в сыворотке крови введение ни одного из использованных препаратов не вызывало значимых изменений в активности АЛТ, АСТ.

Полученные результаты позволяют рассматривать структурно-функциональное состояние лизосомного аппарата печени как чувствительное звено реакции метаболических систем организма на введение пестицидов дитиокарбаматного ряда, а уровень активности лизосомных гидролаз в сыворотке — как адекватный критерий оценки токсического действия изученных препаратов.

В свою очередь эти данные в совокупности с результатами, полученными нами ранее [3, 4, 8], и результатами других авторов [2] дают основание считать, что реакция лизосомного аппарата на действие дитиокарбаматов является общей для различных пестицидов данной группы.

Вместе с тем полученные сведения могут служить определенным ориентиром при выборе путем фармакологической коррекции с использованием соответствующих лизосомотропных соединений, прямо или опосредованно влияющих на активность ферментных ансамблей лизосом и стабильность их мембран при токсическом действии пестицидов в условиях как промышленного производства, так и производства сельскохозяйственной продукции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильев А. В., Капелевич Т. А., Тутельян В. А. // *Вопр. мед. химии.* — 1983. — № 3. — С. 127—130.
2. Непесова И. А., Васильев А. В., Тутельян В. А. // *Гиг. и сан.* — 1985. — № 1. — С. 89—91.
3. Табагари С. И., Шубитидзе Т. М., Абдушелишвили Г. В. // *Вопр. мед. химии.* — 1987. — № 5. — С. 112—115.
4. Табагари С. И., Шубитидзе Т. М., Абдушелишвили Г. В. // *Там же.* — 1988. — № 5. — С. 110—113.
5. Тутельян В. А. // *Вопр. питания.* — 1983. — № 6. — С. 10—17.
6. Тутельян В. А. // *Вестн. АМН СССР.* — 1986. — № 11. — С. 8—15.

Таблица 3

Активность аминотрансфераз, ммоль/(ч·л), и лизосомных протеиназ, ммоль(мин·г белка) в сыворотке крови крыс при введении пестицидов карбаматного ряда в дозе $1/20$ ЛД₅₀ в течение 15 и 30 дней

Условия эксперимента	АЛТ		АСТ		Катепсин А		Катепсин В		Катепсин С		Катепсин D	
	15 дней	30 дней	15 дней	30 дней	15 дней	30 дней	15 дней	30 дней	15 дней	30 дней	15 дней	30 дней
Контроль	0,83±0,06	1,62±0,18	0,43±0,03	0,72±0,03	0,15±0,01	0,19±0,02	0,45±0,02	0,37±0,01	0,73±0,03	0,87±0,04	0,24±0,01	0,29±0,02
ТМТД	0,94±0,11	1,14±0,25	0,58±0,09	0,81±0,11	0,18±0,02	0,24±0,02	0,63±0,02*	0,68±0,03*	1,00±0,12*	1,69±0,17*	0,40±0,02*	0,55±0,03*
Полимарцин	1,10±0,11*	0,98±0,25	0,72±0,09*	0,56±0,04*	0,16±0,01	0,24±0,02	0,57±0,03	0,54±0,02*	1,02±0,10*	1,41±0,11*	0,34±0,01*	0,46±0,02*
Цинеб	0,94±0,08*	1,03±0,16*	0,60±0,09	0,62±0,10	0,14±0,01	0,20±0,01	0,51±0,02	0,44±0,01	0,92±0,03	0,93±0,03	0,27±0,02	0,34±0,02

7. Тутельян В. А., Бондарев Г. И., Мартинчик А. Н. // Питание и процессы биотрансформации чужеродных веществ.— М., 1987.— С. 212.
8. Шубитидзе Т. М., Бусова Т. Н., Рязанова Р. А., Абдушелишвили Г. В. // Гиг. и сан.— 1988.— № 3.— С. 87—89.
9. Bluzat R., Jonot O., Seuge J. // Bull. environ. Contam. Toxicol.— 1982.— Vol. 29, N 2.— P. 248—252.
10. Danielsson B. R. G. // Arch. Toxicol.— 1984.— Vol. 55, N 3.— P. 168—172.
11. Heijbroek W. M. H., Muggleton D. F., Parke D. V. // Xenobiotica.— 1984.— Vol. 14, N 3.— P. 235—249.
12. Lowry O., Rosebrough N. J., Farr A. et al. // J. Biol. Chem.— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.

Поступила 23.03.90

EFFECT OF DITHIOCARBAMATE-CONTAINING PESTICIDES ON THE STATES OF RAT LIVER LYSOSOMES

T. M. Shubitidze, T. N. Busova, S. I. Tabagari, R. A. Ryazanova

Medical School, Tbilisi, F. F. Erisman Institute of Hygiene, Moscow

Total and non-sedimentable activity of cathepsins A, B, C and D in rat liver tissue as well as activity of these lysosomal proteinases in blood serum were studied during intragastric administration of tetramethyl thiuramdisulfide (TMTD), polymarsine and tsineb within 30 days at a dose of 1/20 LD₅₀. The enzymatic activity alterations, which involved a decrease in total activity of lysosomal proteinases and an increase of the activity in non-sedimentable fraction and blood serum, were distinctly decreased in series: TMTD — polymarsine — tsineb. The data obtained suggest that structural-functional state of lysosomes was considerably altered in response to the effect of dithiocarbamate-containing pesticides.

© В. А. ФРОЛОВ, Б. К. ШКИРМАНТЕ, 1990

УДК 616.935-092.9-07: [616.127-018.1 + 616.36-018.1] - 008.931 + 616.153.1

В. А. Фролов, Б. К. Шкирманте

АКТИВНОСТЬ ЛИЗОСОМНЫХ ФЕРМЕНТОВ В КАРДИОМИОЦИТАХ, ГЕПАТОЦИТАХ И КРОВИ В ДИНАМИКЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ДИФТЕРИЙНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Университет дружбы народов им. П. Лумумбы, Москва

В ряде экспериментальных исследований [2, 3] показано, что в процессе дифтерийной интоксикации в лизосомном аппарате кардиомиоцитов происходят определенные изменения, выражающиеся, в частности, в увеличении количества этих органелл и возрастании степени повреждения их мембран.

Однако роль этих изменений на различных стадиях поражения миокарда дифтерийным токсином остается пока невыясненной, как и вопрос о том, происходит ли в этом случае активация лизосомного аппарата других органов и в какой связи стоят наблюдаемые явления с изменением содержания в крови ферментов лизосом.

В целях ответа на некоторые из указанных вопросов и было проведено настоящее исследование. Биохимическими методами на разных стадиях экспериментальной дифтерийной интоксикации мы изучали ферментную активность лизосом в миокарде, печени и плазме крови.

Методика. Опыты были поставлены на 40 кроликах-самцах породы шиншилла массой 2,5—3,5 кг. У 30 животных моделировалась дифтерийная интоксикация путем

однократного внутривенного введения дифтерийного токсина в дозе 1 ДЛМ/кг. За 1 ДЛМ принимали такое количество токсина, которое при однократном интратрибушном введении морским свинкам массой 250 г вызывало гибель 40 % животных на 3-и сутки при явлениях поражения надпочечников. Контрольными были 10 кроликов. У контрольных животных, а также у подопытных через 24, 72 и 6 сут после введения токсина брали кровь из краевой вены уха. Затем под легким гексеналовым наркозом производили торакотомию, извлекали сердце и печень и переносили в ледяные буферные растворы для гомогенизации: 0,6 М КСl, 0,25 М сахароза, 10 мМ имидазол («Серва», ФРГ), pH 7,25, 1 мМ ЭДТА для сердца и 0,33 М сахароза, 1 мМ ЭДТА, 3,8 мМ триэтанолламин, pH 7,25 для печени.

При 0—4 °С органы отмывали, очищали от соединительной ткани, взвешивали, измельчали ножницами и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе тефлоновым пестиком в течение 180 с. Гомогенат 1:10 подвергали дифференциальному центрифугированию [9] на ультрацентрифуге 18-М фирмы «Beckman». В лизосомном надосадке определяли количество белка, неседиментируемую активность β-D-глюкуронидазы и N-ацетил-β-D-галактозаминидазы. Для определения активности ферментов использовали колориметрический микрометод совместного определения β-глюкуронидазы и N-ацетил-β-D-галактозаминидазы согласно рекомендациям Vaes, Jacques [10]. Активность β-глюкуронидазы определяли по скорости гидролиза фенолфталейн-глюкуронида («Сигма», США) и N-ацетил-β-D-галактозаминидазы — по скорости гидролиза 4-нитрофенил-N-ацетил-β-D-галактозаминида («Сигма», США) [1].

Инкубационная смесь содержала 2 мМ фенолфталейн-глюкуронида, 5 мМ 4-нитрофенил-N-ацетил-β-D-галактозаминида, 0,2 М ацетатный буфер pH 5,5 в объеме 100 мкл, к которой добавляли 20 мкл исследуемого материала. Фракцию печени дополнительно разводили 1:5. Время инкубации при 37 °С составляло 60 мин для сердца и 15 мин для печени и плазмы крови. Реакцию останавливали 0,5 мл 1 М Na₂CO₃ и пробы центрифугировали при 3000 g 10 мин. Фотоколориметрировали в микрокуветках на спектрофотометре DU-8B фирмы «Bekman» (США) при длине волны 405 нм (N-ацетил-β-D-галактозаминидаза) и 555 нм (β-D-глюкуронидаза). В контрольном опыте исследуемый материал добавляли после остановки реакции. Раствор сравнения содержал 20 мкл соответствующего гомогенизационного буфера, 100 мкл 0,2 М ацетатного буфера pH 5,5 и 0,5 мл 1 М Na₂CO₃.

Активность ферментов выражали в наномолях освобожденного 4-нитрофенола и фенолфталейна на 1 мл плазмы за 15 мин и на 1 мг белка в исследуемом материале за 15 мин для печени и за 60 мин для сердца. Белок определяли по методу Лоури в модификации С. П. Сяткина [4], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

Все числовые данные подвергались статистической обработке и корреляционному анализу на персональном компьютере «Commodore 64» по разработанной нами программе, за достоверную принималась разность средних при $p \leq 0,05$. При проведении корреляционного анализа связь оценивалась как сильная при абсолютном значении коэффициента корреляции (r) $\geq 0,7$, как имеющая среднюю силу при $r = 0,69—0,3$ и как слабая при $r \leq 0,29$. Достоверность коэффициентов корреляции определялась на основании соответствующих формул, заложенных в используемую нами программу.

Результаты и обсуждение. Динамика изменения активности изучаемых лизосомных гликозидоз в процессе дифтерийной интоксикации отражена на рис. 1 и 2. И в левом, и в правом желудочке сердца по мере развития дифтерийного процесса происходят значительные изменения уровня неседиментируемой активности N-ацетил-β-D-галактозаминидазы, которая максимально повышается через 72 ч после начала интоксикации, причем это повышение в абсолютных значениях достоверно отличается от контроля ($p < 0,05$). Корреляционный анализ показал, что в динамике процесса между величинами неседиментируемой активности фермента имеется сильная достоверная положительная связь с коэффициентом корреляции +0,94. Другими словами,

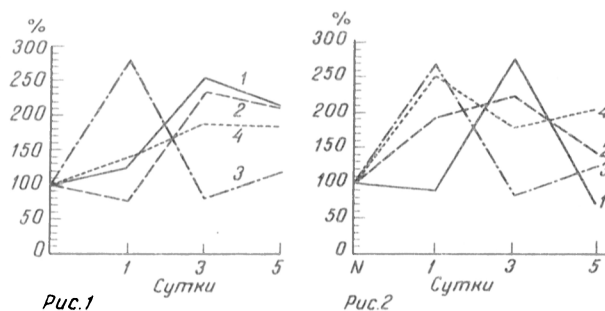


Рис. 1. Динамика неседиментируемой активности N-ацетил-β-D-галактозаминидазы при дифтерийной интоксикации.

Здесь и на рис. 2: по оси абсцисс — продолжительность интоксикации; по оси ординат — активность фермента, % контроля. 1 — неседиментируемая активность в ткани левого желудочка; 2 — то же в ткани правого желудочка; 3 — то же в ткани печени; 4 — активность фермента в плазме крови.

Рис. 2. Динамика неседиментируемой активности β-D-глюкуронидазы при дифтерийной интоксикации.

указанные изменения в обоих желудочках сердца протекают параллельно.

Одновременно отмечается повышение активности фермента в плазме крови, достигающее максимума также через 72 ч после начала процесса ($p < 0,05$).

Неседиментируемая активность этого фермента в гепатоцитах имеет несколько иную динамику с максимумом через 24 ч ($p < 0,05$). Далее уровень неседиментируемой активности практически возвращается к норме.

Что касается β-D-глюкуронидазы (см. рис. 2), то в левом желудочке неседиментируемая активность этого фермента достоверно ($p < 0,05$) повышается через 72 ч, возвращаясь к норме на 6-е сутки. В правом желудочке отмечается достоверное по сравнению с контролем ($p < 0,05$) повышение неседиментируемой активности фермента в период 24—72 ч со снижением на 6-е сутки, хотя в этот срок ее величина достоверно ($p < 0,05$) превышает контроль. Связь между этими показателями в левом и правом желудочках сердца характеризуется коэффициентом корреляции $+0,82$, что при сопоставляемом количестве пар показателей не позволяет говорить о ее достоверности; можно лишь отметить определенную тенденцию. По-видимому, правомерно утверждать наличие определенного параллелизма в динамике изменения неседиментируемой активности β-D-глюкуронидазы в обоих желудочках. Однако этот параллелизм менее отчетлив, чем для N-ацетил-β-D-галактозаминидазы.

В печени неседиментируемая активность β-D-глюкуронидазы значительно повышается в первые сутки ($p < 0,05$), а через 72 ч и на 6-е сутки колеблется около нормального уровня.

В плазме крови наблюдается повышение актив-

Таблица 1

Коэффициенты корреляции между неседиментируемой активностью N-ацетил-β-галактозаминидазы в сердце и печени и активность в плазме крови

Пары показателей	Контроль	24 ч	72 ч	6-е сутки
Лев. жел.— кровь	+0,86	+0,89	+0,90	+0,82
Прав. жел.— кровь	+0,98	+0,94	+0,94	+0,83
Печень — кровь	+0,99	+0,83	+0,81	+0,49*
Лев. жел.— печень	+0,84	+0,82	+0,75	+0,85
Прав. жел.— печень	+0,87	+0,70	+0,75	+0,78*

Примечание. Здесь и в табл. 2 звездочкой отмечена недостоверная связь.

ности фермента во все сроки развития дифтерийной интоксикации ($p < 0,05$) с максимумом через 24 ч.

Корреляционный анализ показал, что между уровнем неседиментируемой активности N-ацетил-β-D-галактозаминидазы в различных отделах сердца и в печени, а также между этими уровнями и активностью фермента в крови в большинстве случаев существуют сильные достоверные связи. Зависимость имеет логарифмический характер и описывается уравнением:

$$y = a + b \cdot \ln(x - c),$$

где a — величина смещения по оси y ; b — параметр кривой, определяющий ее крутизну; c — смещение по оси x .

В динамике развития дифтерийной интоксикации обнаружена сильная положительная связь (а для левого желудочка и достоверная) между активностью фермента в левом и правом желудочках сердца и в плазме крови ($r = +0,96$; $r = +0,83$ соответственно). Связь между активностью фермента в печени и плазме крови характеризуется коэффициентом корреляции — $0,98$ (т. е. связь является сильной, отрицательной, достоверной) (табл. 1).

Несколько иная зависимость была выявлена нами при оценке связей неседиментируемой активности β-D-глюкуронидазы. В тех случаях, когда эта связь выявлялась, она также имела вид логарифмической зависимости, описываемой приведенным выше уравнением.

Величины коэффициентов корреляции, характеризующих указанные связи, приводятся в табл. 2.

При анализе динамики процесса обнаружена сильная достоверная положительная связь между неседиментируемой активностью фермента в печени и таковой в плазме крови ($r = +0,98$).

Сопоставление между собой и анализ приведенных выше данных позволяют высказать следующие предположения.

Таблица 2

Коэффициенты корреляции между неседиментируемой активностью β-D-глюкуронидазы в сердце и активностью в плазме крови

Пары показателей	Контроль	24 ч	72 ч	6-е сутки
Лев. жел.— кровь	Связи нет	—0,78	Связи нет	Связи нет
Прав. жел.— кровь	Связи нет	—0,98	Связи нет	Связи нет
Печень — кровь	+0,97	+0,80*	+0,72	+0,49*
Лев. жел.— печень	Связи нет	—0,71	+0,83	—0,79*
Прав. жел.— печень	Связи нет	—0,99	+0,63	—0,69*

На основании результатов, приведенных в табл. 1, можно сказать, что связь неседиментируемой активности N-ацетил-β-D-галактозидазы с ее активностью в плазме крови имеет и в сердце, и в печени сходную динамику. Однако меньшая величина коэффициентов корреляции для пары печень—кровь (кроме контрольной группы), больший статистический разброс (при компьютерном анализе характера связей для этой пары отбрасывалось значительно большее количество «выскакивающих» вариант, нежели для других пар), а также наличие в динамике процесса для этой пары показателей сильной отрицательной достоверной связи, в то время как для пар левый желудочек—кровь и правый желудочек—кровь эта связь расценивалась как сильная и положительная, дают основание полагать, что активность данного фермента в крови определяется в основном процессами в миокарде.

Можно предположить, что дифтерийный токсин оказывает лизосомотропное действие, вызывая и в сердце, и в печени повышение проницаемости лизосомных мембран вследствие торможения синтеза белка [7, 8] и, возможно, снижает выработку энергии [5], нарушая тем самым структуру мембран и способствуя изменению их белково-липидного состава. Поскольку дифтерийный токсин все же имеет высокий тропизм к миокарду, лизосомы последнего повреждаются достаточно интенсивно, что ведет к нарастанию неседиментируемой активности типичного для лизосом кардиомиоцитов фермента [11] — N-ацетил-β-D-галактозаминидазы. Вследствие этого, по-видимому, нарастает активность данного фермента и в плазме крови.

Что же касается β-D-глюкуронидазы — типичного фермента лизосом гепатоцитов [6], то заслуживают особого обсуждения появление сильной отрицательной достоверной связи между неседиментируемой активностью этого фермента в миокарде и печени через 24 ч после введения дифтерийного токсина, а также аналогичная связь в парах показателей левый желудочек — кровь и правый желудочек — кровь в этот же срок. По-видимому, дифтерийный токсин, повреждая мембраны лизосом гепатоцитов, ведет к усиленной солюбилизации данного фермента и нарастанию его активности в крови.

Таким образом, можно предположить, что в условиях дифтерийной интоксикации функционируют различные механизмы регуляции проницаемости лизосомных мембран в кардиомиоцитах и гепатоцитах при данной патологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баррет А. Дж., Хит М. Ф. // Лизосомы. — М. — 1980. С. 25—156.
2. Ефимова Л. В. Защитно-приспособительный и повреждающий характер процессов липолиза при развитии патологических процессов в сердце: Автореф. дис. докт. биол. наук. — М. — 1987.
3. Пауков В. С., Фролов В. А. // Элементы теории патологии сердца. — М. — 1982. — С. 270.
4. Сяткин С. П. // Вопр. мед. химии. — 1981. — № 1, С. 136—138.
5. ADP-ribosylation of Proteins / Ed.: F. R. Althaus, H. Hiltz, S. Shall. — Berlin, New York, Heidelberg, Tokio. — 1985. P. 578.
6. Dean R. T. // Biochem. J. — 1974. — Vol. 138. — P. 395—405.

7. Johnson W. G., Wilson D., Greenfield L., Jontle R. J. // J. Biol. Chem. — 1988. — Vol. 263. — N 2. — P. 1295—1300.
8. Pappenheimer A. M. // Ann. Rev. Biochem. — 1977. — Vol. 46, N 1. — P. 69—93.
9. Ruth R. C., Kennet F. F., Weglicki W. B. // J. Mol. Cell. Cardiol. — 1978. — Vol. 10. — N. 8. — P. 739—751.
10. Vaes G., Jacques P. // Biochem. J. — 1965. — Vol. 97. — P. 380—388.
11. Welman E., Peters T. J. // J. Mol. Cell. Cardiol. — 1976. — Vol. 8, N 6. — P. 443—463.

Поступила 14.03.90

CORRELATION OF LYSOSMAL ENZYMES ACTIVITY IN CARDIOMYOCYTES, HEPATOCYTES AND BLOOD IN DYNAMICS OF EXPERIMENTAL DIPHTHERITIC INTOXICATION

V. A. Frolov, B. K. Shkirmante

P. Lumumba People's Friendship University, Moscow.

Non-sedimentable activity of N-acetyl-β-D-galactosaminidase and β-D-glucuronidase was studied in left and right ventricles of myocardium, in liver tissue and blood plasma of rabbits with experimental diphtheritic intoxication. Specific dynamics of the enzymatic activity was found during the diphtheritic intoxication, indicating that various mechanisms were involved in regulation of lysosomal membranes permeability under conditions of the disease.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.127-005.4-092.4-07:[616.127-008.931:577.152.321]-02:615.217.22

Т. Н. Иванова, Э. Д. Полякова, А. И. Иванов

АКТИВНОСТЬ ЛИЗОСОМНЫХ ФЕРМЕНТОВ В ИЗОЛИРОВАННОМ ПЕРФУЗИРУЕМОМ СЕРДЦЕ КРЫС В УСЛОВИЯХ ОБРАТИМОЙ ИШЕМИИ И ПОСТИШЕМИЧЕСКОЙ РЕПЕРФУЗИИ НА ФОНЕ ВВЕДЕНИЯ ДИБУТИРИЛ-ЦАМФ И ИЗОПРОТЕРЕНОЛА

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

В настоящее время доказано участие лизосомных ферментов в процессе аутолиза при инфаркте миокарда [7, 8, 15, 26]. При этом изменяется проницаемость мембран лизосом и увеличивается выход кислых гидролаз в саркоплазму [6—8]. В ряде работ указано на участие циклических нуклеотидов (цАМФ и цГМФ) в регуляции лизосомного аппарата клеток [6, 17, 19]. Показано, что снижение внутриклеточного уровня цАМФ при многих патологических процессах сопровождается увеличением активности кислых гидролаз в саркоплазме [6, 7].

Однако характер изменений функционального состояния лизосомного аппарата на стадии раннего обратимого ишемического повреждения миокарда и в первые минуты постишемического восстановления кровотока остается недостаточно изученным. Известно, что постишемическая реперфузия может вызывать дополнительные метаболические нарушения и повреждения мембранных структур кардиомиоцитов [13, 14, 16]. Повреждающий эффект реперфузии существенным образом зависит от степени повреждения клеток при ишемии и обусловлен так называемыми кислородным и кальциевым парадоксами, возникающими при восстановлении кровотока в ишемизированном участке

миокарда [9, 10, 12, 14]. Суть этих процессов сводится к образованию избыточных количеств свободных радикалов кислорода, увеличению внутриклеточного содержания Ca^{2+} и усилению интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ), что приводит к нарушению структуры и функции внутриклеточных органелл [4, 14, 18, 20—23].

Целью настоящей работы явилось изучение изменений активности лизосомных ферментов и интенсивности процессов ПОЛ при обратимой ишемии изолированных сердец крыс и последующей реперфузии, а также возможности направленного изменения состояния мембран лизосом в этих условиях посредством введения в перфузионный раствор веществ, повышающих внутриклеточный уровень цАМФ, — дибутирил-цАМФ (дб-цАМФ) и изопротеренола.

Методика. Исследования проводили на изолированных перфузируемых по Лангендорфу сердцах крыс. Перфузию осуществляли раствором Кребса—Гензелята pH 7,4, аэрированным газовой смесью, состоящей из 95 % O_2 и 5 % CO_2 , при температуре 37 °C. Для обеспечения изоволюмического режима работы сердца и регистрации систолического давления в полость левого желудочка вводили латексный баллончик, соединенный с трансдьюсером Р231А («GoGo», США). Диастолическое давление в баллончике поддерживали на уровне, обеспечивающем максимально возможное систолическое давление в левом желудочке сердца на протяжении всего эксперимента. Исходная скорость перфузионного протока 10 мл/мин. При моделировании ишемии скорость перфузионного протока снижали до 1 мл/мин. Реперфузию осуществляли после 40 мин ишемии в течение 20 мин, для этого скорость протока восстанавливали до исходного уровня. Вещества, повышающие внутриклеточное содержание цАМФ, добавляли в перфузионный раствор спустя 30 мин от начала ишемии. Конечные концентрации дб-цАМФ (0,2, 1,0, 5,0 и 25,0·10⁻⁵ М) и изопротеренола (2,5·10⁻⁹ М) подбирали таким образом, чтобы частота и сила сердечных сокращений не изменялись.

Для определения активности кислой фосфатазы и катепсина D ткань левого желудочка сердца гомогенизировали в 0,25 М растворе сахарозы, содержащем 1 мМ ЭДТА pH 7,4, и подвергали дифференциальному центрифугированию. В гомогенате, обработанном тритоном X-100 в конечной концентрации 0,1 %, измеряли общую активность ферментов. В надосадке, полученной после центрифугирования при 30 000 g 40 мин, определяли активность кислых гидролаз, которую принимали за свободную. Связанную активность измеряли в полученном осадке (фракция, обогащенная лизосомами), ресуспендированном в 0,25 М растворе сахарозы. Определение активности лизосомных ферментов проводили с помощью спектрофотометрических методов [3]. В качестве

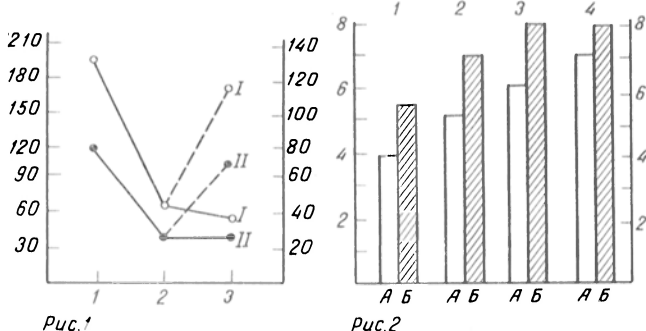


Рис. 1. Изменение частоты (I) и силы (II) сердечных сокращений в условиях ишемии и постиншемической реперфузии.

По осям ординат: слева — ритм сердечных сокращений, удары в минуту, справа — пиковое систолическое давление в левом желудочке сердца, мм рт. ст. 1 — контроль; 2 — 20 мин ишемии; 3 — 40 мин ишемии; 4 — 60 мин ишемии. Ишемия обозначена сплошной линией, постиншемическая реперфузия — штриховой.

Рис. 2. Содержание МДА (А) и лактата (Б) в ткани сердца в условиях ишемии и постиншемической реперфузии.

По осям ординат: слева — уровень МДА, нмоль на 1 г массы сырой ткани, справа — содержание лактата, ммоль на 1 г массы сырой ткани. 1 — контроль; 2 — 20 мин ишемии; 3 — 40 мин ишемии; 4 — 60 мин ишемии; 5 — 20 мин реперфузии после 40 мин ишемии.

субстратов для определения активности кислой фосфатазы и катепсина D использовали динатриевую соль 4-нитрофенилфосфата и гемоглобин соответственно («Serva», ФРГ, и «Sigma», США). О состоянии лизосомных мембран судили по изменению отношения свободной к связанной активности ферментов.

Для характеристики активности процесса ПОЛ определяли концентрацию малонового диальдегида (МДА) в ткани левого желудочка сердца [11].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента. Достоверными считали различия при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение. При скорости перфузии 10 мл/мин в течение 60 мин частота и сила сердечных сокращений не изменялись. На 40—60-й минуте ишемии (ограничение скорости перфузии до 1 мл/мин) наблюдали снижение частоты сердечных сокращений и падение пикового систолического давления в левом желудочке на 70 % (рис. 1). Одновременно в ткани сердца увеличивалось содержание лактата, что свидетельствовало о развитии ацидоза, и усиливались процессы ПОЛ. Последнее выражалось в увеличении концентрации МДА в миокарде к 40-й минуте ишемии (рис. 2).

Постиншемическая реперфузия в течение 20 мин после 40 мин ишемии приводила к полному восстановлению ритма и силы сердечных сокращений, т. е. ишемические нарушения имели обратимый характер. Однако содержание лактата и МДА в миокарде в этот период возрастало. Полученные результаты подтверждают имеющиеся в литературе данные о развитии ацидоза и усилении процессов ПОЛ в условиях ишемии и особенно в первые минуты постиншемического восстановления кровотока [22, 24, 27].

При определении общей активности кислой фосфатазы и катепсина D в условиях 20, 40 и 60 мин ишемии достоверных изменений не обнаружено. Постиншемическая реперфузия сопровождалась некоторой тенденцией к снижению общей активности обоих ферментов (табл. 1).

Изменение величины отношения свободной к связанной активности кислых гидролаз в условиях ишемии и постиншемической реперфузии представлено на рис. 3. Степень этого изменения позво-

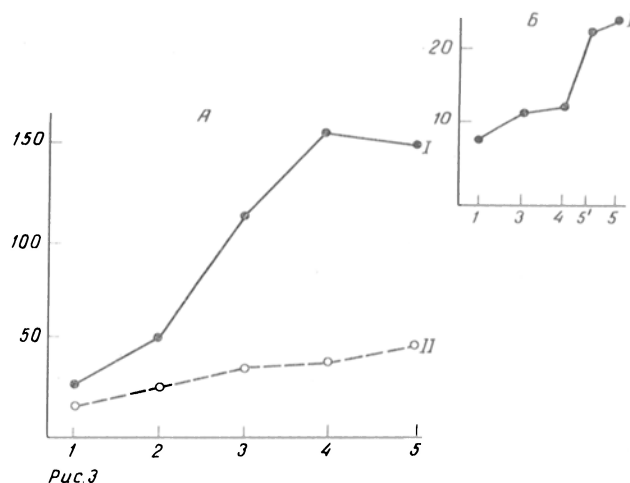


Рис. 3. Изменение величины отношения свободной активности к связанной активности кислой фосфатазы (I) и катепсина D (II) в сердце при ишемии и постиншемической реперфузии (А) и активности кислой фосфатазы в оттекающем от сердца перфузате (Б).

По оси ординат: А — свободная активность ферментов, % от связанной, Б — активность кислой фосфатазы, МЕ/мл перфузата, 1 — контроль; 2 — 20 мин ишемии; 3 — 40 мин ишемии; 4 — 60 мин ишемии; 5 — 20 мин реперфузии после 40 мин ишемии; 5' — первая минута реперфузии.

Активность кислой фосфатазы и катепсина D в изолированном перфузируемом сердце крыс в условиях постишемической реперфузии на фоне введения в перфузионный раствор дб-цАМФ и изопротеренола ($M \pm m$)

Условия перфузии	Активность ферментов, нмоль/мин на 1 г сырой ткани			Отношение свободной активности к связанной, %
	общая	свободная	связанная	
Кислая фосфатаза				
Контроль (ишемия 40 мин+20 мин реперфузии)	1280,9±71,5 (12)	392,1±8,8 (8)	256,4±19,8 (8)	153
дб-цАМФ: 1,0·10 ⁻⁵ М	1208,9±24,2 (12)	377,7±13,2 (10)	263,5±10,9 (10)	143
5,0·10 ⁻⁵ М	1359,3±16,4 (10)	367,2±8,7* (10)	310,5±10,7* (10)	115
Контроль	1046,6±34,7 (6)	353,2±20,8 (6)	240,3±14,1 (6)	147
Изопротеренол, 2,5·10 ⁻⁹ М	1062,1±48,0 (6)	314,6±9,9 (6)	264,3±13,2* (6)	119
Катепсин D				
Контроль	953,3±67,0 (8)	286,4±7,6 (8)	591,2±22,5 (8)	48
дб-цАМФ: 1,0·10 ⁻⁵ М	840,0±18,9 (12)	246,3±11,1 (12)	673,9±37,6 (12)	37
5,0·10 ⁻⁵ М	1006,5±40,6 (10)	264,8±7,1* (11)	805,8±41,8* (11)	33
Контроль	931,5±35,2 (6)	252,0±7,7 (6)	539,7±41,7 (6)	47
Изопротеренол, 2,5·10 ⁻⁹ М	974,3±51,8 (6)	256,4±15,7 (6)	665,3±22,0* (6)	39

Примечание. Звездочка — $p < 0,05$. Здесь и в табл. 2 в скобках — число опытов.

ляет судить о состоянии лизосомных мембран в данных условиях.

Величина отношения свободной активности кислой фосфатазы к связанной повышалась к 20-й минуте ишемии и возрастала по мере продолжительности ишемического воздействия. При реперфузии эта величина несколько снижалась, что, однако, не свидетельствовало об уменьшении лабильности мембран лизосом, поскольку с первой минуты реперфузии в оттекающем от сердца перфузате наблюдали увеличение активности кислой фосфатазы и тенденцию к снижению общей активности этого фермента в миокарде. Для катепсина D достоверное изменение величины отношения свободной к связанной активности наблюдалось только к 40-й минуте ишемии. Величина отношения возрастала в условиях постишемической реперфузии. В оттекающем от сердца перфузате активность катепсина D не выявлялась.

Таким образом, реакция лизосомного аппарата на ишемическое воздействие начинается уже на стадии обратимых изменений и выражается в увеличении доли свободной активности кислых гидролаз в саркоплазме. Причем свободная активность кислой фосфатазы повышается раньше, чем катепсина D. Очевидно, это можно объяснить различной степенью связи данных ферментов с мембраной лизосом. По-видимому, увеличение свободной активности кислых гидролаз при ишемии и особенно в первые минуты реперфузии на фоне прогрессирующего ацидоза в совокупности с активацией процессов ПОЛ способствует формированию необратимых изменений в миокарде.

Ранее было показано, что в условиях обратной ишемии (20—40 мин) и после 20 мин реперфузии имеет место повышение внутриклеточного содержания цАМФ в миокарде, которое, по-видимому, носит адаптивный характер [6]. Исходя из данных литературы о стабилизирующем влиянии цАМФ на лизосомные мембраны [6, 17, 19], нами было сделано предположение, что, несмотря на достоверное возрастание уровня цАМФ в миокарде, его оказывается недостаточно для поддержания стабильности лизосомных мембран и осуществления регуляторного влияния на активность лизосомного аппарата. В предыдущей работе с целью повышения внутриклеточного содержания цАМФ использовали ингибитор активности фосфодиэстеразы — кофеин — в конечной концентрации, не изменяющей силу и частоту сердечных сокращений и, следовательно, существенно не влияющей на уровень Ca^{2+} в клетках. Введение кофеина в перфузионный раствор в условиях ишемии и особенно постишемической реперфузии приводило к достоверному повышению уровня цАМФ в миокарде и уменьшению величины отношения свободной активности кислых гидролаз к связанной, что свидетельствовало о стабилизации мембран лизосом в этих условиях [5].

В настоящей работе была изучена возможность изменения состояния лизосомного аппарата при воздействии на другие звенья аденилатциклической системы. Как указано выше, спустя 30 мин от начала ишемического воздействия в перфузионный раствор добавляли синтетический аналог цАМФ — дб-цАМФ — или активатор аденилатциклазы — изопротеренол.

Добавление дб-цАМФ в условиях ишемии не

изменяло величину отношения свободной активности к связанной как для кислой фосфатазы, так и для катепсина D. При постишемической реперфузии величина этого отношения для обоих ферментов уменьшалась в 1,5 раза, при этом общая активность кислой фосфатазы и катепсина D не изменялась (см. табл. 1). Возможно, что такой эффект дб-цАМФ связан с различной скоростью его проникновения в клетки в условиях ишемии и реперфузии. При введении в перфузионный раствор изопроterenолола в условиях реперфузии также наблюдали уменьшение величины отношения свободной активности к связанной для обоих ферментов.

Кроме того, при ишемии и реперфузии на фоне повышения внутриклеточного уровня цАМФ посредством введения дб-цАМФ отмечалось уменьшение содержания МДА в миокарде на 27—40 % (табл. 2), что свидетельствовало о снижении активности процессов ПОЛ.

Таким образом, полученные результаты подтверждают предположение о регуляторном влиянии цАМФ на лизосомные мембраны. Недостаточный уровень цАМФ в клетке, развивающийся ацидоз и активация процессов ПОЛ, особенно усиливающихся в период постишемической реперфузии, приводят к нарушению целостности лизосомных мембран и неконтролируемому поступлению кислых гидролаз в саркоплазму, что может способствовать развитию необратимых повреждений миокардиальной ткани. Известно, что в условиях ишемии происходит нарушение диссоциации холофермента цАМФ-зависимой протеникиназы и, следовательно, скорости цАМФ-зависимого фосфорилирования мембранных белков, в том числе и белков мембран лизосом [1, 2]. Дополнительное повышение уровня цАМФ в условиях обратимой ишемии и постишемической реперфузии может приводить к нормализующему влиянию процесса диссоциации фермента на регуляторную

Таблица 2

Содержание МДА в изолированном перфузируемом сердце крыс в условиях ишемии и постишемической реперфузии на фоне введения дб-цАМФ ($M \pm m$)

Условия перфузии	МДА, нмоль на 1 г ткани
Контроль	$4,06 \pm 0,29$ (12)
Ишемия 40 мин	$5,40 \pm 0,60^*$ (5)
Ишемия 40 мин + дб-цАМФ: $0,2 \cdot 10^{-5}$ М	$4,68 \pm 0,27$ (5)
$1,0 \cdot 10^{-5}$ М	$4,64 \pm 0,19$ (5)
$5,0 \cdot 10^{-5}$ М	$3,87 \pm 0,33^*$ (6)
$25,0 \cdot 10^{-5}$ М	$3,30 \pm 0,45^*$ (6)
Ишемия 60 мин	$5,70 \pm 0,35^*$ (8)
Ишемия 40 мин + 20 мин	$6,84 \pm 0,38^*$ (7)
Реперфузии + дб-цАМФ: $1,0 \cdot 10^{-5}$ М	$5,10 \pm 0,16^*$ (6)
$5,0 \cdot 10^{-5}$ М	$5,24 \pm 0,15^*$ (5)

Примечание. Звездочка — $p \leq 0,01$. В качестве контроля использованы результаты, полученные при 40 и 60 мин перфузии сердца.

и каталитическую субъединицы, восстанавливать скорость цАМФ-зависимого фосфорилирования мембранных белков и, таким образом, регулировать проницаемость лизосомных мембран. Уменьшение выхода кислых гидролаз в саркоплазму на стадии обратимых ишемических повреждений и в первые минуты постишемической реперфузии может способствовать предотвращению развития необратимых нарушений в миокарде в этот период. Кроме того, снижение активности процессов ПОЛ также предупреждает развитие дополнительных повреждений структуры и функции кардиомиоцитов при ишемии и особенно в условиях постишемического восстановления кровотока, когда активность процессов ПОЛ резко повышается. Однако механизм, посредством которого цАМФ снижает интенсивность образования МДА, нуждается в дальнейшем изучении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антипенко В. А., Гончаров О. Г., Коровкин Б. Ф. и др. // *Вопр. мед. химии.*— 1981.— № 4.— С. 492—495.
2. Антипенко В. А., Лыжова С. П. // *Биохимия.*— 1985.— Т. 50, № 1.— С. 12—16.
3. Баррет А. Дж., Хит М. Ф. // *Лизосомы: Методы исследования.*— М., 1980.— С. 122—141.
4. Владимиров Ю. А., Коган Э. М. // *Кардиология.*— 1981.— Т. 21, № 1.— С. 82—89.
5. Иванова Т. Н., Иванов А. И., Лосев Н. И., Коровин Б. Ф. // *Бюл. экспер. биол. и мед.*— 1989.— № 7.
6. Коровкин Б. Ф., Полякова Э. Д., Стволинская Н. С. и др. // *Вопр. мед. химии.*— 1987.— Т. 33, № 5.— С. 33—38.
7. Стрельникова Т. Б., Скорин В. И., Сафонова Е. С., Коровкин Б. Ф. // *Вопр. мед. химии.*— 1977.— № 2.— С. 251—253.
8. Allan R. M., Welman E. // *Biochem. J.*— 1980.— Vol. 190, N 1.— P. 139—144.
9. Altschuld R. A., Hostettler J. R., Brierley G. P. // *Circular. Res.*— 1981.— Vol. 49, N 2.— P. 307—315.
10. Amano J., Sunamori K., Kudo K., Suzuki // *J. Mol. Cell. Cardiol.*— 1980.— Vol. 12, N 1.— P. 6.
11. Biblack W. R., Okita R. T., Hochstein P. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*— 1973.— Vol. 53, N 2.— P. 459—465.
12. Braunwald E., Kloner A. // *J. Clin. Invest.*— 1985.— Vol. 76, N 5.— P. 1713—1719.
13. Buckberg G. D. // *J. Thorac. Cardiol. Surg.*— 1986.— Vol. 92, N 3.— P. 483—487.
14. Chapman R. A. // *Biomed. Biochem. Acta.*— 1987.— Vol. 46, N 8/9.— P. 512—516.
15. Decker R. S., Poole Z. R., Dingle Y. T., Weldenthal K. // *J. Mol. Cell. Cardiol.*— 1979.— Vol. 11, N 2.— P. 189—196.
16. Ely S. W., Mentrek R. M., Lasley R. D. et al. // *J. Thorac. Cardiol. Res.*— 1985.— Vol. 90, N 4.— P. 549—557.
17. Goldfarb R. D., Glenn Y. M. // *Molecul. and cellular. aspects of shock and trauma* / Eds. A. M. Lefer, W. Schumer.— 1983.— Vol. 3, N 4.— P. 147—167.
18. Hardina D. P., Poolewilson R. A. // *J. Mol. Cell. Cardiol.*— 1981.— Vol. 13, N 1.— P. 37.
19. Ignarro L. J., Krassikaff N., Styuka J. // *J. Pharmacol. exp. Ther.*— 1973.— Vol. 186, N 1.— P. 86—99.
20. Reimer K. A., Jennings R. B. // *Acta Med. Scand.*— 1981.— Vol. 210, N 651.— P. 19—27.
21. Reimer K. A., Jennings R. B., Hill M. L. // *Circular. Res.*— 1981.— Vol. 49, N 4.— P. 901—911.
22. Shen A. C., Jennings R. B. // *Amer. J. Pathol.*— 1972.— Vol. 67.— P. 417—440.
23. Shrago E. // *Circular. Res.*— 1976.— Vol. 38, N 5.— P. 75—79.
24. Sperelakis N. // *Amer. Heart. J.*— 1984.— Vol. 107, N 2.— P. 347—357.
25. Van der Vusse G. J., Stam H. // *Basic Res. Cardiol.*— 1987.— Vol. 82, N 1.— P. 149—153.
26. Will-Shahab L., Schimke I., Haberland A., Kottner I. // *Biochem. Acta.*— 1987.— Vol. 46, N 819.— P. 427—432.
27. Welman E. // *Brit. J. Pharmacol.*— 1979.— Vol. 65, N 3.— P. 479—483.

Поступила 20.03.90

ACTIVITY OF LYSOSOMAL ENZYMES IN ISOLATED PERFUSED RAT HEART UNDER CONDITIONS OF REVERSIBLE ISCHEMIA AND POSTISCHEMIC REPERFUSION SIMULTANEOUSLY WITH DIBUTYRYL-cAMP AND ISOPROTERENOL ADMINISTRATION

T. N. Ivanova, E. D. Polyakova, A. I. Ivanov

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

Activity of lysosomal enzymes and lipid peroxidation as well as effects of dibutyl-*c*-AMP and isoproterenol, which increased the intracellular content of *c*-AMP, on the state of lysosomal membranes were studied in isolated perfused rat heart under conditions of reversible ischemia and subsequent reperfusion. The ischemia and especially postischemic reperfusion led to activation of acid hydrolases in sarcoplasmic reticulum and of lipid peroxidation; content of malonic dialdehyde was increased in heart tissue. Addition of dibutyl-*c*-AMP or isoproterenol into the perfusion solution at concentrations not affecting the heart systole caused a decrease in activity of lysosomal enzymes in sarcoplasm as well as in the rate of lipid peroxidation. A decrease in the lysosomal membranes lability and in the rate of lipid peroxidation appear to prevent the irreversible impairments of cardiomyocytes in ischemia particularly within the first minutes of postischemic reperfusion. Possible mechanisms of lysosomal membranes stabilization under conditions of reversible ischemia and postischemic reperfusion are discussed.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.155.3-008.17-07:616.155.34

С. И. Табагари, С. Н. Феофилактова,
Е. А. Варсанович, А. В. Васильев, В. А. Тутельян

АКТИВНОСТЬ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ГИДРОЛАЗ В РАЗЛИЧНЫХ ТКАНЯХ КРОЛИКА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ

Институт питания АМН СССР, Москва

Известно, что развитие атероматозного поражения сопровождается многочисленными биохимическими изменениями, среди которых существенное место занимают нарушения в структурно-функциональном состоянии лизосомального аппарата [16, 17]. Значительная роль при этом отводится системе лизосомальных протеиназ и липаз, которые принимают участие во внутрилизосомальной деградации ЛПНП в клетках интимы [3, 9, 20]. В то же время роль лизосомального аппарата клеток других органов и тканей, составляющих единую патогенетическую цепь при развитии атеросклероза, остается далеко не ясной. Вместе с тем есть все основания считать, что гидролитический комплекс лизосом различных типов клеток при определенных условиях способен принимать участие в модификации ЛПНП [4, 6, 9], вызывая увеличение пула атерогенных ЛПНП. В связи с этим целью настоящей работы явилось исследование функционального состояния гидролитического комплекса лизосом в слизистой тонкого кишечника, печени, тромбоцитах, моноцитах и интима грудной аорты кролика при развитии экспериментального атеросклероза.

Методика. В работе использовали 20 кроликов-самцов породы шиншилла с исходной массой тела 1,5—1,8 кг. Животным опытной группы ежедневно в течение 100 дней вводили внутривенно с помощью зонда холестерин,

растворенный в подсолнечном масле в дозе 300 мг/кг. Животные контрольной группы получали подсолнечное масло. Под пентанальным наркозом вскрывали брюшную полость, тщательно перфузировали перед выделением печень охлажденным физиологическим раствором; собирали кровь из брюшной аорты, отбирали грудную аорту и слизистую верхней трети тонкого кишечника.

Тромбоциты и моноциты выделяли из крови путем последовательного центрифугирования в градиенте фиколл—верографии в нашей модификации [15]. Клетки грудной аорты выделяли диспергированием кусочком аорты (0,5 мм) ферментным раствором, содержащим коллагеназу тип IV и эластазу тип III («Sigma», США), в течение 75 мин при 37 °С (1 мл/50 мг ткани) согласно методам [10, 17]. Полученную суспензию клеток дважды промывали холодным раствором Хенкса. Гомогенаты печени, слизистой тонкого кишечника, выделенных клеток крови и грудной аорты готовили в растворе 0,25 М сахарозы pH 7,4, содержащей 1 мМ ЭДТА.

В исследуемом материале определяли активность 5 лизосомальных протеиназ — катепсинов В (КФ 3.4.22.1), С (КФ 3.4.14.1) D (КФ 3.4.23.5), Н (КФ 3.4.22.16) и L (КФ 3.4.22.15) с помощью спектрофотометрических и спектрофлуориметрических методов [2, 12], используя в качестве субстратов бензонил-арг-арг-метокси-β-нафтиламин, гли-фен-β-нафтиламин, гемоглобин, арг-7-амидо-4-метилкумарин и N-КБЗ-фен-арг-7-амидо-4-метилкумарин («Sigma», США) соответственно.

Активность кислой холестеролэстеразы (КФ 1.1.1.13) определяли по методу [18] в модификации [21], используя в качестве субстрата 12,7 мкмоль холестерол-(1-¹⁴C)-олаата (удельная радиоактивность 56 мКи/ммоль, «Amersham», Англия), суспендированный в лецитин-дигитонинную дисперсию. Активность кислых фосфолипаз A₁ (КФ 3.1.1.32) и A₂ (КФ 3.1.1.14) определяли по методу [19] с использованием в качестве субстрата синтезированного 1-ацил-2-(1-¹⁴C)-олеоил-глицеро-3-*sn*-фосфорилхолин [22]. Активность кислой липазы (КФ 3.1.1.3) и β-глюкуронидазы (КФ 3.2.1.31) определяли спектрофотометрически по методу [1], используя в качестве субстрата соответственно β-нафтилкаприлат («Sigma», США) и p-нитрофенил-β-D-глюкуронид («Sigma», США). Содержание белка определяли методом Лоури [14]. В сыворотке крови определяли концентрацию общих липидов, а также холестерина и триглицеридов с использованием биохимического анализатора «Спектрум» (фирма «АВБОТТ», США). Кроме этого, определяли содержание холестерина в циркулирующих иммунных комплексах (ЦИК), выделенных из сыворотки по методу [23].

Результаты и обсуждение. К окончанию эксперимента у животных опытной группы в сыворотке крови резко возрастало содержание триглицеридов, общих липидов, общего холестерина и холестерина в составе ЦИКов — в 3,5, 6,9, 13 и 17 раз соответственно. Это является отражением развития гиперхолестеринемии и выраженных нарушений липидного обмена.

Результаты ферментного анализа, представленные в таблице, свидетельствуют, что развитие гиперхолестеринемии сопровождалось существенными изменениями активности ферментов во всех исследованных тканях. При этом наиболее выраженные нарушения были обнаружены в печени. Как видно, развитие атеросклероза приводило к значительной активации комплекса лизосомальных эндонептидаз — на 52—135 %, фосфолипаз A₁ и A₂ — на 62 и 72 % соответственно, и увеличению активности холестеролэстеразы на 44 %. Вместе с тем активность кислой липазы практически не отличалась от контрольного уровня. В свою очередь в слизистой оболочке тонкого кишечника активность холестеролэстеразы достоверно возрастала на 29 %. В гладкомышечных клетках аорты кроликов с индуцированным атеросклерозом обнаружена резкая активация тиоловых протеиназ — катепсинов L и H, холестеролэстеразы, кислой липазы, фосфолипазы A₂ и

Фермент	Аорта		Моноциты		Тромбоциты		Печень		Слизистая кишечника	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
Катепсин D	7,86±0,85	8,73±0,76	0,64±0,17	1,00±0,19*	0,82±0,18	0,65±0,11	11,9±1,40	20,5±1,80*	12,9±0,80	13,9±0,80
Катепсин B	0,35±0,06	0,42±0,07	0,045±0,010	0,117±0,036*	0,112±0,036	0,156±0,019*	1,19±0,27	2,80±0,49*	0,96±0,24	0,96±0,16
Катепсин L	11,1±2,77	20,7±5,26*	3,73±0,41	2,72±0,63	4,08±0,55	3,87±0,22	0,75±0,18	1,14±0,09*	0,59±0,09	0,83±0,10*
Катепсин H	4,03±0,62	9,15±1,74*	—	—	—	—	16,2±3,24	27,1±1,59*	—	—
Катепсин C	0,046±0,008	0,016±0,006	1,18±0,28	1,60±0,30	0,70±0,17	1,01±0,25	14,5±2,57	17,6±2,22	15,2±2,03	16,6±0,78
Кислая липаза	0,99±0,02	1,66±0,09*	3,33±0,02	2,54±0,1*	0,198±0,020	0,163±0,013*	0,88±0,02	0,75±0,03*	0,66±0,03	0,68±0,02
Холестеролэстераза	22,3±2,01	32,4±2,30*	481±38	791±64*	538±52	416±34	86,1±5,9	124,3±7,5*	38,0±2,7	49,0±3,4*
Фосфолипаза A ₁	0,34±0,03	0,43±0,02*	1,99±0,36	2,90±0,20*	1,12±0,18	3,63±0,24*	2,48±0,34	4,01±0,22*	—	—
Фосфолипаза A ₂	0,51±0,02	0,81±0,02*	2,03±0,30	3,21±0,22*	1,01±0,19	3,2±0,50*	2,67±0,28	4,58±0,12*	—	—
β-Глюкуронидаза	0,096±0,007	0,368±0,051*	0,276±0,080	0,226±0,041	0,123±0,016	0,137±0,012	2,71±0,15	3,74±0,39*	0,200±0,009	0,198±0,010

Примечание. Активность холестеролэстеразы выражена в нмоль/час на 1 г белка. Звездочка — $p < 0,05$; $n = 17$.

β-глюкуронидазы, что согласуется с нашими данными и результатами исследований других авторов, полученными на культуре фибробластов, атеросклеротических клетках интимы аорты и при исследовании активности лизосомальных гидролаз в гладкомышечных клетках аорты у различных животных с экспериментальной гиперхолестеринемией [11, 13, 16].

Определенный интерес представляют результаты исследования активности ферментов в форменных элементах крови — моноцитах и тромбоцитах. Если в тромбоцитах выявлена типичная картина активации катепсина B и фосфолипаз A₁ и A₂, что характерно для гиперлипидемических и гиперхолестеринемических состояний [6, 7], то в моноцитах развитие гиперхолестеринемии, помимо активации перечисленных ферментов, сопровождалось увеличением активности аспартильной эндонептидазы — катепсина D и холестеролэстеразы. Полученные данные позволяют предполагать существенную роль лизосомального аппарата моноцитов в поглощении и катаболизме экстраклеточных липопротеидов. Это представляется достаточно обоснованным в свете имеющихся сведений о том, что эндонептидоз модифицированных ЛПНП, иммунных комплексов ЛПНП, а также комплексов ЛПНП с другими белками не блокируется при повышении уровня холестерина [5].

В то же время нарушения функционального состояния в системе кислых протеиназ и липаз печени и слизистой тонкого кишечника, по-видимому, отражают участие лизосом гепатоцитов и энтероцитов как в модификации, так и в регуляции транспорта и метаболизма липопротеидов при атеросклерозе. Однако последовательность и значимость лизосомального гидролиза липопротеидов в различных типах клеток при развитии данной патологии остаются неясными.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баррет А. Дж., Хит М. Ф. — Лизосомные ферменты // В кн.: «Лизосомы» под ред. Дж. Дингла. — М., Мир, — 1980. — с. 25—156.
2. Васильев А. В., Капелевич Т. А., Тутельян В. А. // Вопр. мед. химии. — 1983. — № 3. — с. 127—130.
3. Васильев А. В., Ли Хаа Рен, Орехов А. И. и др. // Вопр. мед. химии. — 1989. — № 4 — с. 124—127.
4. Ковалева Г. Г., Карманский И. М. // Вопр. мед. химии. — 1989. — № 3 — с. 47—51.
5. Репин В. С. // Успехи совр. биол. — 1990. — т. 109. — № 1 — с. 120—129.
6. Тутельян В. А., Васильев А. В. // Вестник АМН СССР. — 1987. — № 7. — с. 48—53.
7. Тутельян В. А., Васильев А. В. // Вестник АМН СССР. — 1990. — № 1 — с. 14—22.
8. Шпикитер В. О. // Вопр. мед. химии. — 1987. — № 4. — с. 2—8.
9. Coales P. M., Langer T., Cortner J. A. // Atherosclerosis. — 1986. — Vol. 62 — p. 11—20.
10. Haley N. J., Fowler S., de Duve C. // J. Lipid Res. — 1980. — Vol. 2. — p. 961—969.
11. Henze K., Wolfram G. // Klin. Wochenshr. — 1988. — Vol. 66. — p. 144—148.
12. Kirshke H., Cystein proteinases. // Proteinases in mammalian Tissues and Cells. — Halle. — 1982. — p. 125—128.
13. Lojda Z., Ruzickova A., Havrankova E., Synkova V. // Histochemical J. — 1984. — Vol. 16. — p. 399—405.
14. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. S. // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — p. 265—275.
15. Pertofl H., Histerstein M., Kagedal L. // Cell Population. Methodological Sarveys (ed. E. Horwood). — 1979. — Vol. 9. — p. 67—80.
16. Peters T. J. Lysosomes of the arterial wall. // Lysosomes

in Biology and Pathology.— Amsterdam.— 1975.— Vol. 4.— p. 47—74.

17. *Peters T. J., Muller M., de Duve C.* // J. Exper. Med.— 1972.— Vol. 136.— p. 1117—1139.
18. *Pitman R. C., Khao J. C., Steinberg D.* // J. Biol. Chem.— 1975.— Vol. 250.— p. 4505—4510.
19. *Robertson A. J., Lands W. R. M.* // Biochemistry (Wash.).— 1962.— Vol. 1.— p. 804—810.
20. *Sasahara M., Hazama F., Amano S. et al.* // Atherosclerosis.— 1988.— Vol. 70.— p. 52—62.
21. *Severson D., Fletcher T.* // Atherosclerosis.— 1978.— Vol. 31.— p. 21—32.
22. *Stoffel W., Trabert V.* // Hoppe—Seyler's Z. physiol. Chem.— 1969.— Bd. 350.— S. 836—844.
23. *SZondy E., Horvath M., Mezey Z. et al.* // Atherosclerosis.— 1983.— Vol. 49.— p. 69—77.

Поступила 10.05.90

ACTIVITY OF LYSOSOMAL HYDROLASES IN RABBIT DIFFERENT TISSUES UNDER CONDITIONS OF EXPERIMENTAL ATHEROSCLEROSIS

Tabagari S. I., Pheophilactova S. N., Varsanovich E. A., Vasilyev A. V., Tutelyan V. A.

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

Activity of cathepsins D, B, C, H, L, acid lipase, acid cholesterol ester hydrolase, phospholipase A1, A2 and glucuronidase were studied in liver, small intestinal mucosa, intimal aortic cells, blood platelets and monocyte of rabbit after oral administration of cholesterol at daily dose of 300 mg/kg body weight within 100 days. Under this conditions distinct changes functional state of lysosomal systems were found in liver, monocyte and intima aortic cells. A possible mechanism of observed enzymological changes is discussed.

© Л. В. ЕФИМОВА, 1990

УДК 616.127-008.931:577.152.311]-092.9-07

Л. В. Ефимова

АКТИВНОСТЬ ЩЕЛОЧНЫХ ФОСФОЛИПАЗ А ЛИЗОСОМ И МИТОХОНДРИЙ В ПОВРЕЖДЕННОМ МИОКАРДЕ КРОЛИКОВ

Университет дружбы народов им. П. Лумумбы, Москва

В ряде исследований показано, что в поврежденном миокарде происходит усиленный гидролиз фосфолипидов [3, 13, 21]. Это сопровождается нарушением структурной и функциональной организации мембранных образований, о чем косвенно свидетельствует изменение активности фосфолипаз А в крови больных острым инфарктом миокарда [2]. В экспериментальных исследованиях большое внимание уделяли исследованию кислых фосфолипаз А митохондрий [6] и в меньшей степени лизосом [10], причем объектом изуче-

ния являлась в основном печень крыс [3]. Наименее изученными оказались щелочные фосфолипазы А в лизосомах и митохондриях миокарда кроликов.

Методика. В опытах использовали сердце 15 интактных кроликов породы шиншилла массой 3,0±0,5 кг и сердце 24 кроликов через 6 сут после воспроизведения у них гемодинамической перегрузки сердца путем коарктации восходящей аорты на 1/2 от исходного диаметра, острой очаговой ишемии миокарда перевязкой нисходящей ветви левой коронарной артерии на границе средней и нижней трети и дифтерийной интоксикации путем внутривенного однократного введения 0,3 минимальной летальной дозы дифтерийного токсина на 1 кг массы тела (по 8 животных в группе). Митохондриальную и лизосомальные фракции выделяли из миокардиальной ткани после перфузии сердца сначала 0,145 М NaCl (0 °С), а затем 0,25 М раствором сахарозы с 0,001 М ЭДТА pH 7,4; 0 °С. Ткань гомогенизировали в среде следующего состава: 0,25 М сахароза, 1 мМ ЭДТА, 5 мМ трис-HCl pH 7,4. Митохондрии выделяли по стандартной процедуре центрифугированием при 2 °С в течение 10 мин при 800 g, затем 10 мин при 10 000 g. Осадок митохондрий дважды промывали в той же среде. Фракцию лизосом получали центрифугированием надосадка при 64 000 g и дважды промывали в минимальном объеме в тех же условиях [18]. Активность фосфолипаз А определяли регистрирующим методом потенциометрического титрования высших жирных кислот при постоянном pH на pH-метре фирмы «Radiometrg» (Дания). Субстратом для определения фосфолипазной активности служил L-α-лецитин («Merk», ФРГ), для чего из 2 мл 10 % спиртового раствора удаляли растворитель на ротаторном испарителе, добавляли 11,6 мг дезоксихолата натрия и 5 мл воды. Смесь обрабатывали ультразвуком на ультразвуковом дезинтеграторе MSE (США) при 150 Вт в течение 1,5 мин при средней мощности и амплитуде 10 мк. Определение активности фосфолипазы А вели в общем объеме 5 мл при 37 °С. Реакционные смеси содержали: 0,5 мл 0,5 М KCl, 0,025 мл 0,2 М CaCl₂ в случае лизосом и 0,1 мл для митохондриальной фракции, 0,13 мл субстрата, 0,1 мл суспензии лизосом или митохондрий.

Белок определяли по Лоури [11], кислотную фосфатазу — методом [9], кислотную β-глюкозидазу — по методу [5], цитохромоксидазу митохондрий — по методу [17], активность моноаминоксидазы внешних мембран митохондрий [16] с использованием тирамингидрохлорида («Merk», ФРГ) — по методу [12].

Результаты и обсуждение. Как видно из табл. 1, полученный препарат лизосом характеризуется высокой степенью чистоты, о чем свидетельствует минимальное содержание цитохромоксидазы и моноаминоксидазы.

В 1967 г. Mellors и Tappel [14] сообщили о первой лизосомальной фосфолипазе из печени крыс. Этот фермент имел кислый pH-оптимум и гидролизировал эфирные связи жирных кислот фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина в положении 1 и 2. Результаты последующих исследований были противоречивыми в отношении как pH-оптимумов, так и необходимости ионов Ca²⁺. Была описана Ca²⁺-зависимая фосфолипаза А, локализованная на внешних мембранах митохондрий, которая была сходна с лизосомальным

Таблица 1

Характеристика фракций лизосом и митохондрий из миокарда кроликов

Фракция	Белок, %	Кислая фосфатаза		β-Глюкозидаза		Цитохром-оксидаза		Моноамин-оксидаза	
		уд. акт.	%	уд. акт.	%	уд. акт.	%	уд. акт.	%
Гомогенат	100,0	29,9	100,0	32,6	100,0	287	100,0	—	100,2
Митохондрии	11,7	58,7	28,7	64,3	31,2	886	34,0	—	0,02
Лизосомы	0,18	732	6,0	787	8,0	21,3	0,01	—	0,02

Примечание. Удельная активность (уд. акт.) выражена в мкмольх продукта реакции, образованного за 1 мин на 1 мг белка; процентную активность рассчитывали как общую активность данной фракции, разделенную на общую активность в неочищенном гомогенате и умноженную на 100.

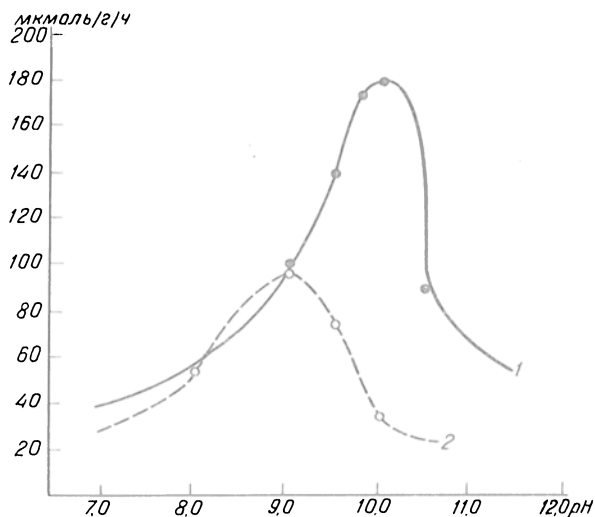


Рис. 1. Влияние pH на активность фосфолипаз А миокарда кролика.

Здесь и на рис. 2 и 4: 1 — фракция лизосом, 2 — митохондрий.

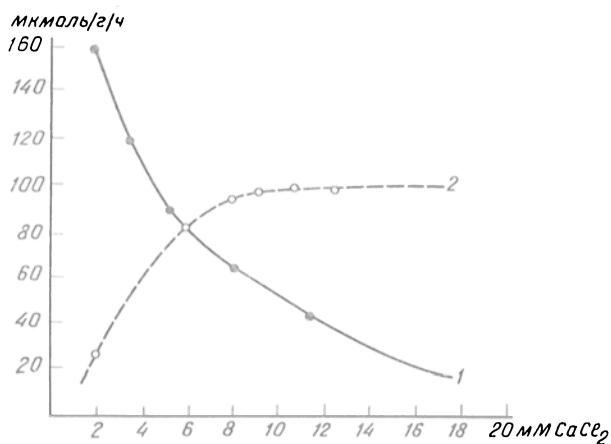


Рис. 2. Зависимость активности фосфолипаз А миокарда кролика от концентрации Ca^{2+} .

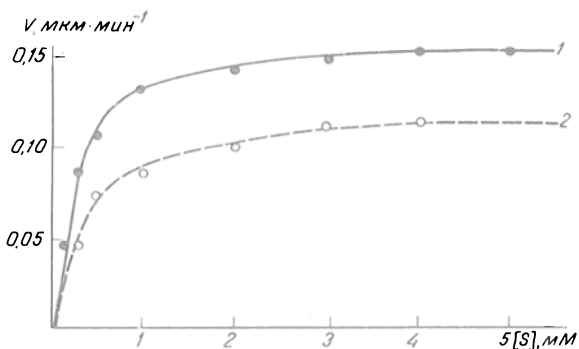


Рис. 3. Гидролиз лецитина под действием препаратов лизосом (1) или митохондрий (2) из миокарда кролика.

ферментом [15]. Были выявлены Ca^{2+} -зависимые фосфолипазы А, активные в нейтральной [22] или щелочной [6] области pH, не принадлежащие фракциям лизосом, и в то же время найдены нейтральные и щелочные фосфолипазы А лизосом [6].

Таким образом, хотя в лизосомах из различных источников выделены как кислые, так и нейтральные и щелочные фосфолипазы А, мы изучили ще-

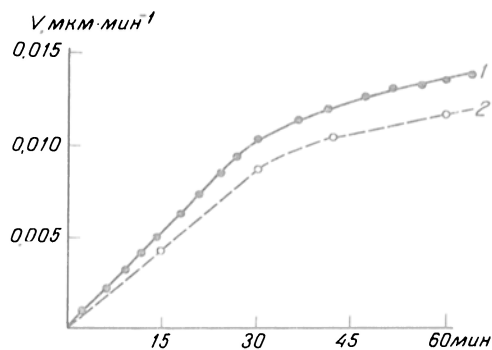


Рис. 4. Зависимость скорости фосфолипазной реакции от концентрации субстрата.

лочные фосфолипазы, поскольку найдено, что они локализируются на мембранах лизосом [19], тогда как кислые фосфолипазы принадлежат к ферментам матрикса лизосом [8]. Зависимость активности фосфолипаз А в препаратах лизосом и митохондрий из миокардиальной ткани кролика от pH представлена на рис. 1. В сердечной мышце кролика исследованные ферменты обладали максимальной активностью при pH 10,0 в препаратах, обогащенных лизосомами, и при pH 9,0 в препаратах, обогащенных митохондриями. Изучение зависимости активности фосфолипазы А от концентрации Ca^{2+} показало, что щелочные фосфолипазы А лизосом из миокарда кроликов не требуют присутствия Ca^{2+} , а митохондриальные фосфолипазы А являются Ca -зависимыми (рис. 2).

При изучении зависимости скорости липолиза от времени инкубации было обнаружено, что она является постоянной в течение довольно продолжительного срока. Как видно из рис. 3, гидролиз лецитина в случае, когда источниками фермента являются препараты, обогащенные лизосомами или митохондриями, в течение 30 мин протекает с постоянной скоростью, после чего скорость реакции снижается. Как видно на рис. 4, при гидролизе субстрата оптимальная скорость реакции наблюдалась при его концентрации $3 \cdot 10^{-3}$ М и оставалась постоянной при дальнейшем увеличении концентрации.

Соблюдая описанные выше условия, мы исследовали активность щелочных фосфолипаз А в митохондриальной лизосомальной фракциях миокарда кроликов на 6-е сутки развития патологических состояний, сопровождающихся повреждением сердечной мышцы. Как видно из табл. 2, при всех изученных патологических процессах повреждение мышцы сердца сопровождается увеличением активности фосфолипазы А в митохондриальной фракции (в 2—4 раза) и одновременным сни-

Таблица 2

Активность фосфолипаз А в миокарде кроликов на 6-е сутки развития патологических состояний в сердце

Фракция	Интактные животные	Гемодинамическая перегрузка сердца	Острая очаговая ишемия миокарда	Дифтерийная интоксикация
Лизосомы	12,58	8,11	9,83	11,60
Митохондрии	11,66	18,30	29,50	22,37

Примечание. Активность фосфолипаз А выражена в мкмольх жирных кислот на 1 г сырой массы за 1 ч.

жением ее во фракции, обогащенной лизосомами. Наиболее резко возрастает активность фосфолипаз А мембран митохондрий при острой очаговой ишемии миокарда (в 4,4 раза), а также при дифтерийной интоксикации (в 3,3 раза). В меньшей степени увеличивается активность митохондриальных фосфолипаз А, когда мышца сердца остается первично интактной. При гемодинамической перегрузке сердца активность фосфолипазы А митохондрий возрастает лишь в 2,6 раза. Наибольшее снижение лизосомальной активности фосфолипазы А происходит при экспериментальном стенозе аорты у кроликов — почти на 30 %. При ишемическом повреждении сердца и дифтерийной интоксикации лизосомальная активность фосфолипаз А к 6-м суткам развития этих патологических процессов составляет 78 и 86 % соответственно по сравнению с исходной.

Известно, что развитие патологических процессов в сердце сопровождается повреждением митохондрий [20, 24], увеличением концентрации в них ионов Ca^{2+} [2], следствием чего, по-видимому, и является наблюдаемое в данном исследовании увеличение активности щелочных Са-зависимых фосфолипаз А внешних мембран митохондрий. Напротив, фосфолипазная активность мембран лизосом ингибировалась увеличивающимися концентрациями Ca^{2+} . Возможно, что в условиях, приводящих к повреждению кардиомиоцитов, снижение активности фосфолипаз А мембран лизосом обусловлено изменением концентрации Ca^{2+} . В свою очередь, отмеченное ранее усиление гидролиза фосфолипидов в поврежденной сердечной мышце [2, 12, 20], связано, по-видимому, с увеличением активности щелочных фосфолипаз В внешних мембран митохондрий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кольцов П. А., Ли Е. Д., Протопопова Л. В. // Сов. мед.— 1979.— № 1.— С. 21—23.
2. Меерсон Ф. З., Сухих Г. Т., Каткова Л. С. // Вест. АМН СССР.— 1984.— № 4.— С. 45—51.
3. Яхнина Д. Н., Устинова М. И., Агабекова И. И. и др. // Митохондрии. Аккумуляция энергии и регуляция ферментативных процессов.— М., 1977.— С. 53—55.
4. Bartolf M., Franson R. C. // Biochim. Biophys. Acta.— 1984.— Vol. 793, N 3.— P. 379—386.
5. Bech C., Tappel A. L. // Biochim. Biophys. Acta.— 1968.— Vol. 151.— P. 159.
6. Eisen C., Bartolf M., Franson R. C. // Biochim. Biophys. Acta.— 1984.— Vol. 793, N 1.— P. 10—17.
7. Franson R. C., Waite M., La Via // Biochemistry.— 1971.— Vol. 10, N 10.— P. 1942—1946.
8. Franson R. C., Waite M., Weglicki W. // Biochemistry.— 1972.— Vol. 11, N 3.— P. 472—476.
9. Imakawa T., Amanuma-Muto K., Ohkuma S. et al. // J. Biochem.— 1983.— Vol. 93.— P. 1517—1523.
10. Kunze H., Hesse B., Bohn E. // Biochim. Biophys. Acta.— 1982.— Vol. 711.— P. 10—18.
11. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Tarr A. L. et al. // J. Biol. Chem.— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
12. McCaman R. E., McCaman M. W., Hunt J. M. et al. // J. Neurochem.— 1965.— Vol. 12.— P. 15—19.
13. Meerson F. Z., Kagan V. E., Kozlov Yu. P. et al. // Basic Res. Cardiol.— 1982.— Vol. 77.— P. 465.
14. Mellors A., Tappel A. L. // J. Lipid Res.— 1967.— Vol. 8.— P. 479.
15. Rahman Y. E., Verhagen J., Wiel D. F. M. // Biochim. Biophys. Acta.— 1970.— Vol. 38.— P. 670—679.
16. Schnaitmann C., Greenawalt J. W. // J. Cell. Biol.— 1968.— Vol. 38.— P. 1—9.
17. Soltocassa G. L., Kuylenstierna R., Ernster L., Bergstrand A. // J. Cell. Biol.— 1967.— Vol. 32.— P. 415—419.

18. Stein O., Vandehock Y., Stein Y. // Atherosclerosis.— 1977.— Vol. 26.— P. 465—472.
19. Stoffel W., Heimann G. // Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.— 1974.— Vol. 355.— P. 651—659.
20. Trump B. F. // Arch. path. Anat. Abt. B.— 1977.— Bd 26, S. 17.
21. Vladimirov Yu. A., Olenov V. J., Suslova T. B. et al. // Advanc. Lipid Res.— 1980.— Vol. 17.— P. 173.
22. Waite M. // Biochemistry.— 1969.— Vol. 8.— P. 2536—2541.
23. Weglicki W. B., Waite M., Sisson P., Shket S. B. // Biochim. Biophys. Acta.— 1971.— Vol. 231.— P. 512—517.
24. Whalen D. A., Hamilton D. G., Ganote C. E. et al. // Amer. J. Path.— 1974.— Vol. 74.— P. 381—388.

Поступила 15.03.90

ACTIVITY OF ALKALINE PHOSPHOLIPASE A FROM LYSOSOMES AND MITOCHONDRIA IN IMPAIRED RABBIT MYOCARDIUM

L. V. Efimova

P. Lumumba People's Friendship University, Moscow

Alkaline phospholipases A were studied in rabbit myocardium under normal conditions and in heart impairment of various etiology. In mitochondrial fraction activity of phospholipase A was increased with elevation of Ca^{2+} concentration, while the enzyme was Ca^{2+} -independent in lysosomes. Hemodynamic overloading of heart, acute local myocardial ischemia and diphtheritic intoxication led to an increase (2-4-fold) of mitochondrial phospholipases A activity with simultaneous decrease of the enzymatic activity in lysosomal membranes.

© В. А. Фролов, С. П. Сяткин

УДК 612.35.014.576.311.344].019:599.323.4

В. А. Фролов, С. П. Сяткин

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ПЕЧЕНИ КРЫС ЛИЗОСОМ

Университет дружбы народов им. П. Лумумбы, Москва

В условиях клеточного гомеостаза функционирование лизосом является необходимым для жизнедеятельности клетки [8]. Вместе с тем причастность этих органелл к патогенезу подавляющего большинства заболеваний человека и животных также хорошо известна [3]. Реализацию патогенетических воздействий на уровне лизосомного аппарата клеток связывают с повреждением мембран этих частиц и выходом их гидролитических ферментов в цитоплазму. Это может быть одной из причин начала и развития процесса гибели клеток и некрогизации тканей. Более глубокое понимание этого явления связано с изучением физико-химических свойств лизосом, поскольку наличие полупроницаемой, одинарной мембраны обуславливает функционирование этих органелл в клетке по типу осмотической системы. Данные литературы позволяют рассматривать переход от саногенетического к патологическому режиму функционирования лизосом как результат изменения физико-химических факторов окружающей эти частицы внутриклеточной среды, в частности таких, как осмотическое давление, рН и температура.

Цель нашей работы — изучение непосредственного, прямого влияния этих факторов на структурную целостность лизосом.

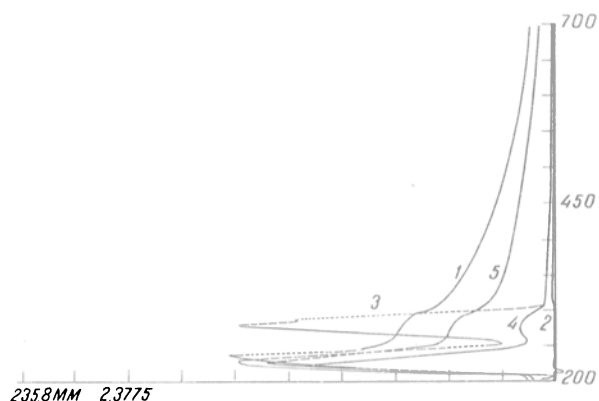


Рис. 1. Спектры поглощения суспензии изолированных лизосом при действии различных детергентов.

По оси абсцисс — значения оптической плотности; по оси ординат — длина волны (нм). 1 — стандартный препарат суспензии intactных лизосом; 2 — раствор 0,7 М сахарозы pH 7,0, содержащий 1 мМ ЭДТА; 3, 4, 5 — стандартные препараты суспензии лизосом, обработанные тритон X-100, додецилсульфатом натрия и дезоксихолатом натрия соответственно.

Методика. Использовали intactных беспородных белых крыс-самцов массой 120—180 г после 48 ч голодания. Печень брали у декапитированных животных, отмывали от крови 0,25 М раствором сахарозы с 1 мМ ЭДТА pH 7,0. Обогащенную фракцию лизосом получали с помощью дифференциального центрифугирования [14], ресуспендировали в 0,7 М растворе сахарозы pH 7,0 в соотношении 1:0,2 (масса: объем) до концентрации лизосомного белка 5 мг/мл, хранили при 0—4 °C и использовали в качестве исходной суспензии.

Спектры пропускания, рассеянного света и поглощения снимали в режиме автоматического сканирования $T=f(\lambda)$ и $A=f(\lambda)$ на спектрофотометре DL-8B фирмы «Бекман» (США) в диапазоне длин волн от 700 до 200 нм при скорости сканирования 100 нм/мин, ширине щели 0,5 нм и температуре 10 °C в термостатированной кювете. Растворами сравнения служили контрольные пробы на растворители и реагенты.

Величину оптической плотности стандартного препарата суспензии обогащенной фракции лизосом регистрировали как функцию от времени по методу [11].

Моделирование процессов осмотического, термического и зависимо от pH среды повреждения этих органелл осуществляли, задавая значения концентрации растворов сахарозы, температуры и pH инкубационной среды в интервале от 0,7 до 0,125 М, от 10 до 50 °C и от 3,0 до 8,0 pH.

Действие кадаверина на структурную целостность лизосом оценивали на фоне гипертермии, добавляя его к стандартному препарату суспензии лизосом. Термолизис в данном случае инициировали, добавляя исходную суспензию лизосом к предварительно нагретому до 50 °C 0,7 М раствору сахарозы pH 7,0.

Результаты и обсуждение. Спектральные свойства суспензии изолированных лизосом исследовали с целью определения оптимального режима регистрации степени разрушения этих частиц. Предварительные исследования спектров пропускания и рассеянного света данной суспензии характерных пиков не выявили. Изменение этих показателей в диапазоне длин волн от 700 до 300 нм после разрушения лизосом детергентами было незначительно. Спектр поглощения препарата суспензии лизосом, изолированных из

печени (рис. 1) и почек [13] крыс, в видимой области длин волн характерных пигментных и собственных пиков не имеет. При полном разрушении лизосом тритоном X-100 величина экстинкции снижалась практически до базовой линии, а ЛА в диапазоне длин волн от 500 до 550 нм была максимальной. Это позволяет принять ее за меру количества разрушенных лизосом, равную 100 %. Ранее соответствие между понижением абсорбции и количеством разрушенных лизосом было показано в аналогичных исследованиях на суспензии изолированных из почек крыс лизосом путем определения баланса свободной и общей активности маркерных ферментов [11].

Таким образом, наиболее удобным для оценки структурного состояния лизосом оказалось измерение оптической плотности суспензии этих частиц при 520 нм. Раствор 0,7 М сахарозы с 1 мМ ЭДТА в этой области спектра поглощения практически не имеет. Он служил раствором сравнения, а его спектр поглощения принимали за базовую линию. Из 3 использованных детергентов менее эффективным в сравнении с тритоном X-100 и додецилсульфатом натрия был дезоксихолат натрия. Загрязнение обогащенной фракции лизосом из почек крыс митохондриями до 5—6 % не влияет на измерение абсорбции при 520 нм [5]. Для используемого препарата лизосом из печени крыс были получены аналогичные результаты.

Результаты изучения динамики процесса осмотической, термической и pH-зависимой лабильности изолированных лизосом суммированы на рис. 2.

Процесс осмолитизиса моделировали путем инкубирования суспензии лизосом при 37 °C, pH 7,0 в течение 5 мин при указанных выше значениях силы осмотического давления. Легко измеримые изменения в структурной целостности органелл происходят уже через 30 с. Максимальное разрушение достигало 90 %. Особенностью данной зависимости было наличие «плато» или «стационарного» участка на графиках в интервале от 1,4 до 0,7 МПа, где величина скорости распада лизосом оставалась практически на одном уровне. Это, очевидно, связано с гетерогенностью фракции лизосом и позволяет выделить долю органелл с высокой, средней и низкой осморезистентностью, каждую из которых определяют на графике границы «стационарного» участка. Изменения размера этого участка будут свидетельствовать о количественных сдвигах в качественном составе лизосомного аппарата и могут быть использованы как показатели количественной оценки осморезистентности лизосом.

Аналогичная закономерность динамики осмолитизиса лизосом проявилась для суспензии

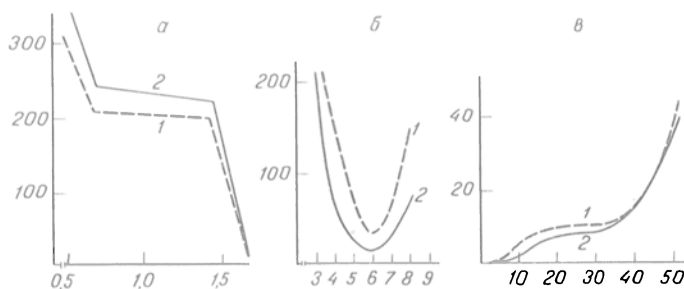


Рис. 2. Скорость разрушения лизосом в зависимости от силы осмотического давления, pH, температуры инкубационной среды и сроков хранения исходной суспензии при 0—4 °C.

По оси абсцисс: а — осмотическое давление (л, МПа), б — pH, в — температура инкубационной среды, °C; по оси ординат — скорость распада лизосом, АА/мин · 10⁻³. Исходную суспензию хранили при 0—4 °C в течение 16 (1) и 40 (2) ч.

с увеличенным сроком хранения. После дополнительного инкубирования исходной суспензии в течение 24 ч при 0—4 °С осмотическая чувствительность частиц повысилась практически на всем протяжении исследованного диапазона осмотического давления, очевидно, за счет поступления сахарозы внутрь лизосом.

Полученные результаты позволяют предположить, что нарушения структурной целостности лизосом, наблюдаемые при развитии патологических процессов, в частности при ишемии миокарда [15] и печени [10], а также при реоксигенации гипоксического сердца [6], происходят в результате накопления осмотически активных веществ в лизосомах на фоне лабильности их мембран. Аналогичным образом действует на лизосомы перегрузка лизосомотропными осмофильными веществами [1]. Очевидно, что осмотическая чувствительность лизосом будет отражать глубину патологического процесса. Величину осмотического лизиса можно также рассматривать как меру проницаемости лизосомных мембран для ионов.

Динамику процесса лабильности изолированных лизосом в зависимости от pH инкубационной среды изучали, добавляя исходную суспензию к предварительно нагретому до 37 °С 0,6 М раствору сахарозы с 1 мМ ЭДТА. Минимальной скоростью разрушения была в узком интервале значений pH и резко возрастала по мере изменения водородного показателя от 6,0 до 3 или 8,0. В целом данная зависимость имела параболический вид. Существенные изменения в структурной целостности этих частиц происходят уже через 30 с инкубации. Максимальное разрушение достигало 50 %. Наличие предельного значения степени разрушения лизосом указывает на то, что остаточная величина оптической плотности обусловлена фрагментами лизосомных мембран.

Дополнительное инкубирование исходной суспензии в течение 24 ч при 0—4 °С снижало чувствительность лизосом к pH среды инкубирования на всем протяжении исследованного интервала. Характер зависимости при этом не изменился.

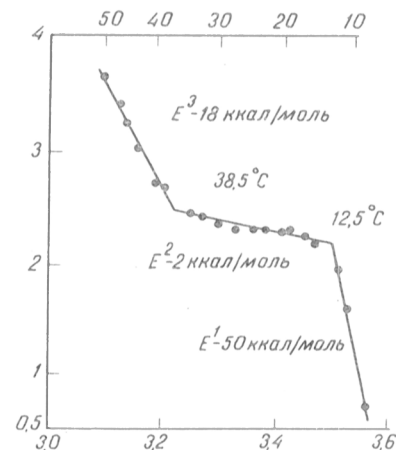
Устойчивость лизосом при pH 6,0, вероятно, обусловлена наличием трансмембранного градиента H^+ и как следствие этого трансмембранного потенциала. Устранение его путем выравнивания pH при закислении среды или нейтрализацией при защелачивании ведет к лабильности и разрушению лизосом.

Основным компонентом протонной помпы лизосом, создающей и поддерживающей трансмембранный градиент pH, служит специфическая H^+ -переносящая АТФаза [10]. Полученные результаты поддерживают «лизосомную» гипотезу миокардиального инфаркта, связывающую лабильность лизосом с понижением уровня АТФ и pH внутриклеточной среды [7].

Процесс термолизиса изучали, добавляя исходную суспензию к предварительно нагретому до заданной температуры 0,6 М раствору сахарозы pH 7,0 с 1 мМ ЭДТА. Зависимость скорости распада лизосом от температуры инкубационной среды проявила фазный характер. Величина повреждения была наименьшей при 10 °С, незначительно повышалась в интервале от 10 до 37 °С и резко возрастала при дальнейшем увеличении

Рис. 3. Зависимость логарифма скорости лизиса изолированных интактных лизосом от величины обратной температуры.

По оси абсцисс: сверху — температура, °С, снизу — значения обратной абсолютной температуры ($1/T \cdot 10^3$, К⁻¹); по оси ординат — значения логарифма скорости распада лизосом в процессе инкубации проб в 0,7 М растворе сахарозы pH 7,0.



температуры. Это хорошо согласуется с положительным терапевтическим эффектом гипертермического воздействия на опухолевую ткань [2] и может быть одним из механизмов такого действия гипертермии.

После дополнительного инкубирования исходной суспензии в течение 24 ч при 0—4 °С терморезистентность лизосом повысилась на 30 % в интервале от 10 до 30 °С. Это можно объяснить гетерогенностью фракции лизосом и разрушением их наиболее термолабильной доли. Причину нивелирования различия в термоустойчивости лизосом при гипертермии объясняют данные, представленные на рис. 3. Интерпретация данной зависимости в координатах уравнения Аррениуса выявила наличие на графике 2 конкретных температур 38,5 и 12,5 °С и 3 принципиально различных участков, в пределах которых абсолютная скорость разрушения лизосом различна. При 38,5 °С лизосомные мембраны полностью деструктурируются и различия в термотолерантности исчезают. Резкое увеличение скорости распада лизосом при $t > 38,5$ °С, очевидно, обусловлено фазовым состоянием и кинетической энергией системы. Термолабильность, вероятно, инициирует осмотическое повреждение этих органелл, как это было показано для эритроцитов [4]. Температуры фазового перехода бактериальной мембраны *Escherichia coli* 38 °С [9], тритиносом около 15 °С, определенные по изменению латентности маркерных гидролаз при охлаждении до 0 °С [12], и мембран интактных лизосом 38,5 и 12,5 °С (см. рис. 2) оказались близкими по величине. Вычислены 3 значения энергии активации, соответствующие фазовому состоянию мембран лизосом: для кристаллического состояния ($t < 12,5$ °С) $E^1 = 50$ ккал / моль, расплавленного ($t > 38,5$ °С) $E^3 = 18$ ккал / моль и смешанного ($12,5 < t < 38,5$ °С) $E^2 = 2$ ккал / моль. Значения этих характерных величин температуры фазового перехода и энергии активации могут быть использованы в качестве динамических показателей структурного состояния лизосомных мембран и позволят косвенно судить о качественных изменениях их фосфолипидных компонентов, поскольку они зависят от количества остатков жирных кислот, содержания холестерина и лизоглицерофосфатидных включений, а также от природы полярной группы фосфолипидов.

При исследовании влияния кадаверина на стабильность интактных лизосом моделировали про-

цесс термолитизиса, который протекал во времени линейно, и через 5 мин его величина составила 26 %. Добавление в пробу 1,5 диаминопентана до конечной концентрации 1 и 0,1 мМ снижало степень повреждения лизосом в 4 и 2 раза соответственно. Аналогичным образом влиял кадаверин на скорость лизиса лизосом, снижая ее в 3,7 и 2,7 раза соответственно, тогда как при концентрации 0,01 мМ он не проявлял протекторного эффекта.

Таким образом, показана возможность прямого повреждающего действия на лизосомы изученных соединений. Полученные результаты подтверждают предположение о роли лизосом как об одном из ключевых звеньев молекулярных механизмов формирования ряда патологических состояний организма человека и животных, в основе которых лежат генерализованная гипертермия (ожоговая болезнь, тепловое поражение) и гипотермия (консервация тканей, обморожение), а также изменение внутриклеточного pH (ишемия и реоксигенация органов) и осмотического давления (отравление лизосомотропными химическими соединениями, перегрузка лизосом осмофильными веществами).

Получены относительно простые и достаточно информативные зависимости, характеризующие осморезистентность, кислотоустойчивость и термотолерантность изолированных интактных лизосом, которые можно использовать в качестве динамических показателей для количественной оценки структурного состояния этих органелл при различных физико-химических воздействиях в опытах *in vivo* и *in vitro*. Варьируя условия инкубирования проб, можно оценивать эффективность лабилизирующего и стабилизирующего действия лизосомотропных веществ. Предлагаемая система оценки структурного состояния лизосом может найти широкое применение в области биохимии, физиологии и патофизиологии клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Короленко Т. И. Биохимические аспекты лизосомотропизма. — Новосибирск, 1983.
2. Структура и функции лизосом / Под ред. С. С. Дебова: Тезисы. — Новосибирск, 1980.
3. Ульяновский С. Е., Суринов Б. П. // Бюл. экспер. биол. — 1984. — № 7. — С. 39.
4. Aloni B., Eitan A., Livne A. // Biochim. Biophys. Acta. — 1977. — Vol. 465. — P. 46.
5. Badenoch-Jones P., Baum H. // Biochem. J. — 1974. — Vol. 142. — P. 1.
6. Decker R. S., Wildenthal K. // Amer. J. Path. — 1980. — Vol. 98. — P. 425.
7. Decker R. S., Wildenthal K. // Lab. Invest. — 1973. — Vol. 38. — P. 662.
8. Holtzman B. // Lysosomes: a survey. Springer-Verlag. Wien—New York, 1976.
9. Linden C., Wright K., McConnell H. M., Fox C. F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1973. — Vol. 70. — P. 2274.
10. Marzella L., Glaumann H. // Virchow. s Arch. Abt. B. Zellpath. — 1981. — Bd 36. — S. 1.
11. Ngaha E. O., Fry M., Plummer D. T. // Chem. Biol. Interactions. — 1979. — Vol. 24. — P. 199.
12. Ruth R. C., Weglicki W. B. // Biochem. J. — 1972. — Vol. 172. — P. 163.
13. Shibko S., Tappel A. T. // Biochem. J. — 1965. — Vol. 95. — P. 731.
14. Stahn S., Maior K. P., Hanning K. // J. Cell. Biol. — 1970. — Vol. 48. — P. 576.
15. Wildenthal K., Decker R., Poole A. R., Dingle J. T. // Lab. Invest. — 1978. — Vol. 38. — P. 656.

Поступила 20.03.90

SPECTROPHOTOMETRIC INVESTIGATION OF PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF RAT LIVER LYSOSOMES

V. A. Frolov, S. P. Syatkin

P. Lumumba People's Friendship University, Moscow

Physico-chemical properties of intact lysosomes isolated from rat liver tissue were studied using spectrophotometric methods. The lysosomal suspension did not show specific maximal peaks in spectra of light passing through, scattering and absorbance. Stability of the suspension was most suitably evaluated at 520 nm. The rate of lysosomes lysis was distinctly increased at temperature above 37° at pH below 3.0 and above 7.0 as well as in osmotic pressure (π) exceeding 0.75 MPa. The temperature of phase conversion at 12.5° and 38.5° was calculated from Arrhenius plot. Activating energy of the lysosomes thermolysis was equal to 50, 2 and 18 kcal/mol for solid, mixed and liquid phases of lysosomal membranes, respectively. Additional incubation of the initial lysosomal suspension at 0-4° within 24 hrs led to an increase in osmos- and acid-stability within all the ranges of π and pH values studied as well as to decrease of its sensitivity to hypothermia (10-30°) but not to hyperthermia (above 37°). Cadaverine at final concentration 1.0 and 0.1 mM protected lysosomes from thermolysis. Osmos-resistance, acid-stability and thermotolerance may be used as available dynamic parameters of the particles structure state as well as in evaluation of deteriorating effects of various physico-chemical factors *in vivo* and *in vitro*.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 582.282.23:581.19:547.458

И. Шандула, Г. Коган, Л. Маслер

СТРУКТУРА И НЕКОТОРЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ДРОЖЖЕВЫХ β -D-ГЛЮКАНОВ

Химический институт Центра химических исследований Словацкой Академии наук. Братислава, ЧССР

В быстро увеличивающейся группе иммуномодулирующих соединений важное место занимают лизосомотропные соединения — β -1,3-D-глюканы. В природе они встречаются как основные компоненты мембранных структур дрожжей, грибов, некоторых бактерий, а также растений. С точки зрения химического строения и биологической активности наиболее хорошо изученными глюканами являются лентинан, полученный из популярного в Японии съедобного гриба *Lentinus edodes*, и шизофиллан, выделенный из гриба *Schizophyllum commune*. Из числа бактериальных полисахаридов, обладающих иммуностимулирующими свойствами, наиболее известны курдлан из *Alcaligenes faecalis* и леван из *Aerobacter levani*, у которого основной мономерной единицей является β -2,6-фруктоза.

Молекулу глюкана образуют цепи глюкопиранозильных единиц, соединенных β -1,3-гликозидными связями. Главная цепь в некоторых местах разветвляется посредством β -1,6-гликозидных связей. Количественное соотношение этих двух типов связей является специфическим для глюканов, полученных из разных источников. Химические и биологические свойства глюканов зависят от таких факторов, как тип и соотношение гликозидных связей, надмолекулярная структура, физическое состояние, растворимость в воде, способность образовывать гели, расщепляемость ферментами и т. п. Было обнаружено, что глюканы с наиболее выраженными иммуномодулирующими свойствами образуют тройную спиральную структуру,

в которой сплетены 3 линейные цепи, причем на 1 виток спирали приходится 6 глюкозных единиц, как это наблюдается, например, у лентинана и пизофиллана. С другой стороны, линейные β -1,3-D-глюканы типа ламинарана или нахима-рана, не обладающие иммуностимулирующими свойствами, таких спиральных структур не образуют.

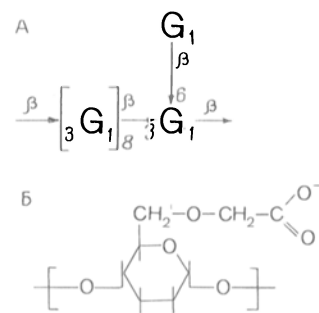
Уже в течение многих лет средством для стимуляции ретикулоэндотелиальной системы является зимозан, представляющий собой комплекс глюкана, маннана и белка, выделенный из клеточных стен хлебопекарных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [1, 16]. Ранее сообщалось [18], что действенным началом зимозана является α -1,3-D-глюкан. Препарат маннозим, производство которого было начато позднее в Венгрии, также является смесью маннана и глюкана. Обширные иммунофармакологические исследования глюканов, выделенных из *Saccharomyces cerevisiae*, были проведены рядом авторов [5, 6], однако для изучения иммунофармакологических свойств глюканов необходимо наличие строго определенного и хорошо охарактеризованного вещества. Поэтому в последние годы мы уделили внимание выделению и характеристике дрожжевых β -1,3-D-глюканов, выделенных главным образом из *Saccharomyces cerevisiae*.

Разделение и характеристика дрожжевых полисахаридов

Полисахариды составляют более 75 % сухой массы клеточной стенки дрожжей. В соответствии с выполняемой функцией и химическим составом их можно разделить на каркасные глюканы и аморфные гетерополисахариды, главным образом маннаны, образующие с белками поверхностные гликопротеины. Выделение отдельных полисахаридных компонентов клеточных стенок основано на их последовательной обработке разбавленными щелочами, а затем разбавленными неорганическими и органическими кислотами. Под действием щелочей происходит растворение гликопротеинов, которые затем пурифицируются с помощью Cu^{2+} (реактива Фелинга). Таким образом, происходит выделение поверхностных антигенных маннанов. С медицинской точки зрения особого внимания заслуживают маннаны патогенных кандид [11, 15]. Мы провели подробное изучение строения и иммунохимических свойств всех патогенных микроорганизмов рода *Candida*. Маннан *S. albicans* имеет сильно разветвленную структуру и состоит из маннозильных единиц, соединенных в главной цепи α -1,6-, а в боковых цепях α -1,2- и α -1,3-гликозидными связями. Длина боковых цепей специфична для маннанов отдельных видов дрожжей, например, маннан *S. albicans* имеет длинные боковые цепи, состоящие из 4—5 маннозильных единиц, а для *S. cerevisiae* характерны короткие боковые цепи, состоящие из 2—3 единиц. Поверхностные маннаны хорошо растворимы в воде, их молекулярные массы находятся в диапазоне 20 000—50 000.

Наиболее химически устойчивой частью клеточной стенки дрожжей, остающейся не растворимой в воде после воздействия разбавленных кислот

Рис. 1. Формулы β -1,3-D-глюкана (А) и карбоксиметилглюкана (Б).



и щелочей, является так называемый корпускулярный глюкан. С помощью электронной микроскопии было показано, что нерастворимый глюкан *S. cerevisiae* не гомогенен, а состоит из микрофибриллярной и аморфной частей [12]. С помощью γ -облучения источником ^{60}Co нам удалось отделить фибриллярную часть глюкана от аморфной. Под действием излучения происходит расщепление гликозидных связей на границе фибриллярной и аморфной частей. Анализ с помощью метилирования и ЯМР-спектроскопии показал, что фибриллярная водонерастворимая часть является β -1,3-D-глюканом, в котором в среднем каждая девятая глюкозильная группа замещена в положении 6 D-глюкозой (рис. 1). С другой стороны, водорастворимую аморфную часть составляет слабо разветвленный β -1,6-D-глюкан [10]. С помощью измерения сдвига максимума поглощения красителя конго красного по методу [13] мы обнаружили, что фибриллярный глюкан образует в зависимости от pH среды спиральные структуры различной кратности [10].

После частичного формолиза корпускулярный глюкан мы получили водорастворимую фракцию β -1,3-D-глюкана с более низкой молекулярной массой и нерастворимую фракцию с высокой молекулярной массой. β -1,6-D-глюкан, представляющий аморфную часть, вероятнее всего, разложился вследствие гидролиза, поскольку известно, что β -1,6-гликозидные связи менее устойчивы к действию органических кислот, чем другие типы гликозидных связей, и из смеси был удален диализом.

Нерастворимый глюкан клеточных стенок содержит также третий компонент — α -1,4-D-глюкан. Его содержание, колеблющееся от 0 до 30 %, зависит от используемого штамма, физиологических условий роста, а также способа выделения полисахаридов. Поскольку он не обладает иммуномодулирующими свойствами, желательно его удаление из смеси. Содержание α -глюкана можно снизить путем многократного промывания разбавленными кислотами или действием соответствующих ферментов, например α -амилазой. Полная схема выделения полисахаридов из биомассы дрожжей или их клеточных стенок приведена на рис. 2.

Растворимые формы β -1,3-D-глюканов

Корпускулярный глюкан обладает выраженными иммуномодулирующими свойствами, не растворим в воде и имеет молекулярную массу порядка нескольких миллионов. При внутривенном введении он вызывает гепатоспленомегалию, а также может привести к появлению эмболий при про-

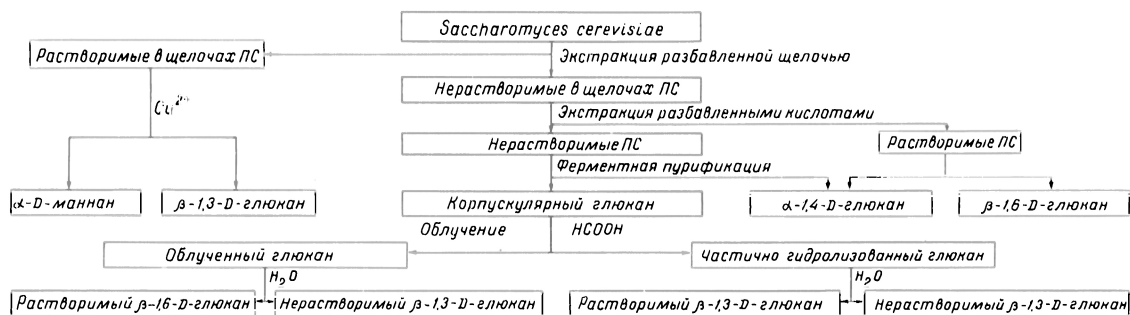


Рис. 2. Схема фракционирования дрожжевых полисахаридов (ПС).

хождении через капилляры. Следует подчеркнуть, что клинически наиболее перспективными для парентерального введения являются растворимые формы, сохраняющие иммуномодулирующие свойства нерастворимых форм.

Растворимые β -1,3-D-глюканы можно получить из партикулярного глюкана путем кислого гидролиза. Однако фрагменты, полученные таким способом, имеют слишком низкую молекулярную массу и мало активны в качестве иммуномодуляторов, а, кроме того, образуются с низким выходом. Более удобно получать из корпускулярного глюкана водорастворимые производные путем введения в молекулу полярной группы. Нами был получен ряд растворимых в воде производных глюкана, представленных в табл. 1. Среди перечисленных производных наиболее активным оказался карбоксиметилглюкан, который мы приготовили с различными степенями замещения. Оказалось, что биологическая активность производных глюкана зависит также от степени замещения. Например, карбоксиметилглюканы со степенью замещения 1,15, хотя и очень хорошо растворимы в воде, но обладают низкой активностью. С другой стороны, производные со степенью замещения 0,42 уже не растворимы в воде. Обнаружено, что наибольшей биологической активностью обладают трудно растворимые производные, т. е. находящиеся на границе растворимости. Дериватизация, т. е. замещение гидроксильной группы глюкозы полярной группой, вероятнее всего, происходит по углероду С6 вследствие пространственной предпочтительности. Фрагмент карбоксиметилглюкана показан на рис. 1.

Производные α -1,3-D-глюканов имеют широкое распределение молекулярных масс. Для получения более узких фракций применяется фракционирование органическими растворителями. С помощью фракционирования ацетоном карбоксиметилглюкана со степенью замещения 0,89 были получены 3 фракции (рис. 3). Молекулярная масса I фракции превышала 1 млн, II фракция имела среднюю

молекулярную массу около 800 000, а III содержала молекулы с меньшей молекулярной массой, не осаждаемые ацетоном и наименее биологически активные. Некоторые физико-химические параметры корпускулярного глюкана, а также карбоксиметилглюканов, полученных из *Saccharomyces cerevisiae*, приведены в табл. 2. Иммуномодулирующие свойства упомянутых соединений, дрожжевого партикулярного глюкана и его водорастворимых форм являются предметом исследований нескольких коллективов Словацкой АН, результаты которых представлены в работах [2, 7, 8].

Иммунофармакологическое действие глюканов

β -Глюканы микробиологического происхождения обладают рядом важных иммунофармакологических свойств. На широкой выборке экспериментальных моделей инфекций было показано, что предварительное лечение глюканом воздействует на клиническую картину заболевания, ведет к более легкому течению его и снижению смертности. Глюканы повышают сопротивляемость организма по отношению к ряду вирусных, бактериальных, грибковых и паразитарных заболеваний [3, 9]. Кроме того, они ингибируют рост некоторых экспериментально вызванных опухолей, при метастазирующей саркоме снижают число метастаз [19], повышают резистентность организма по отношению к химическому карциногенезу [4, 19]. Под действием глюканов наблюдали увеличение числа макрофагов в опухоли и повышение их функциональной активности. Глюканы проявляют значительное радиозащитное действие, стимулируют гемопоэз и продлевают время выживания облученных животных [14, 17]. Глюканы

Таблица 1
Растворимые производные β -1,3-D-глюкана, выделенного из *S. cerevisiae*

Производное	Степень замещения
Карбоксиметилглюкан	0,42; 0,56; 0,64; 0,89; 1,15
Карбоксиэтилглюкан	0,70
Сульфозетилглюкан	0,30
Сульфопропилглюкан	0,30
Глюкуроноглюкан	14 % карбоксила

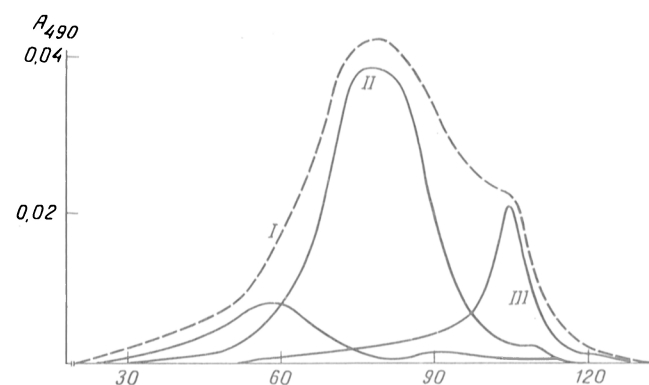


Рис. 3. Профиль элюции карбоксиметилглюкана (КМГ) при хроматографии на сепарозе CL-2B.

Пунктирная линия — КМГ до фракционирования ацетоном, сплошная — после. Характеристика фракций 1—3 приведена в тексте. По оси абсцисс — объем элюата (в мл).

Физико-химические свойства β -глюкана *S. cerevisiae* и его производных

Исследуемые свойства	β -Глюкан	Облученный β -глюкан		Частично гидролизированный β -глюкан	КМГ со степенью замещения 0,92	КМГ, II фракция
		β -1,3-	β -1,6-			
Растворимость в H_2O	—	—	+	+	+	+
Оптическая активность, $(\alpha)_D$	+37°	+32°	-4°	+23°	+27°	+33°
Собственная вязкость (η) в ДМСО	0,7—1,1	0,1—0,2	0	0,51	1,22	1,10
Молекулярная масса	$6 \cdot 10^5$ — $2 \cdot 10^6$ 890	$(6-8) \cdot 10^5$ 891	10^4 — $9 \cdot 10^4$ 893	$5 \cdot 10^4$ — 10^5 890	$4 \cdot 10^5$ — $2 \cdot 10^6$	$6 \cdot 10^5$ — $9 \cdot 10^5$
ИК-спектр, cm^{-1} ^{13}C -ЯМР, м. д.	86,2 (C=3)	86,2 (C=3)	104,2 (C=1)	86,2 (C=3)	—	—

могут действовать также как адъюванты и могут быть успешно использованы при получении вирусных и бактериальных вакцин [5]. Они воздействуют на стимулирующие механизмы естественного и специфического иммунитета, значительно усиливают фагоцитарную функцию печени. Некоторые авторы обнаружили также повышенную активность лизосомальных ферментов в сыворотке крови и лейкоцитах [5, 6].

Важным преимуществом глюканов является их нетоксичность. В организмах отсутствует подходящая ферментная система для их быстрого разложения, поэтому они разлагаются медленно и в результате их деполимеризации образуется глюкоза, являющаяся основным метаболитом всех живых организмов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Басс-Иладхан Х. Ф. Зимозан. // Изд. Зинатне.— Рига, 1970.
2. Трновец Т., Наварова Я. // Структура и функция лизосом.— М., 1986.
3. Cawley S., Ormrod D. J., Miller T. E. // Int. J. Immunother.— 1987.— Vol. 3.— P. 159—170.
4. Chihara G. Basic Mechanisms and Clinical Treatment of Tumor Metastasis.— Academic Press.— New York, 1985.— P. 535—547.
5. DiLuzio N. R. // Trends Pharmacol. Sci.— 1983.— Vol. 4.— P. 344—347.
6. DiLuzio N. R., Jacques P. Advances in Immunopharmacology.— New York, 1985.— P. 360—375.
7. Ferenčík M., Kotulová D., Masler L., Šandula J., Pruzinec P. // Bratisl. lek. listy.— 1988.— Vol.— 89.— P. 424—432.
8. Ferenčík M., Kotulová D., Masler L., Bergendi L. et al. // Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.— 1986.— Vol. 8.— P. 163—166.
9. Jacques P. // J. Immunomodul. Polysach.— Elsevier Biomed Pres.— Amsterdam, 1982.— P. 429—438.
10. Kogan G., Alfoldi J., Masler L. // Biopolymers.— 1988.— Vol. 27.— P. 1055—1063.
11. Kogan G., Pavliak V., Sandula J., Masler L. // Carbohydr. Res.— 1988.— Vol. 184.— P. 17—182.
12. Копецка М. // J. Basic Microbiol.— 1985.— Vol. 25.— P. 161—174.
13. Ogawa K., Watanabe T., Tsurugi J., Ono S. // Carbohydr. Res.— 1972.— Vol. 23.— P. 399—405.
14. Patchen M. L., MacVittie T. J. // J. Biol. Resp.— 1986.— Vol. 5.— P. 45—60.
15. Pavliak V., Sandula J. // Mycoses.— 1988.— Vol. 31.— P. 34—39.
16. Pillener L., Ecker E. E. // J. Biol. Chem.— 1941.— Vol. 17.— P. 139.
17. Posposil M., Lary J., Netiková J., Marek M. // Experientia.— 1982.— Vol. 38.— P. 1232—1234.
18. Riggi S. J., DiLuzio N. R. // Amer. J. Physiol.— 1961.— Vol. 20.— P. 297—305.
19. Williams D. L., Sherwood E. R., McNamee R. B. et al. // Hepatology.— 1985.— Vol. 5.— P. 198—206.

STRUCTURE AND SOME CHARACTERISTICS OF THE YEAST β -D-GLUCANS

J. Sandula, G. Kogan, L. Masler

Intitute of Chemistry, Center of Chemical Research, Slovak Academy of Sciences, Bratislava

Yeast cell wall contains mainly polysaccharides. Among them β -1,3-D-glucans play role of the sceletal carcass of the yeast cell wall, while D-mannans represent its surface antigens. Mannans are vuilt of α -1,6-linked polymannosyl backbone with the side chains consisting of α -1,2- and α -1,3-linked mannosyl units. The branching degree and length of the side chains are specific for individual yeast strains. By means of subsequent alkaline and acid extractions mannans and soluble glucans can be separated, leaving insoluble particulate glucan. The latter is inhomogenous and consists of microfibrillar and amorphous components. By means of γ -irradiation these two components were separated and the structure of each was determined. It was found that microfibrillar glucan had a structure close to that of immunomodulating glucans isolated from Japanese fungi. By means of carboxymethylation of particulate glucan its water-soluble derivatives were prepared. Some immunopharmacological properties of the particulate glucan and its soluble derivatives are discussed in relation to their structural and physico-chemical characteristics.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.37-002.1-092.9-02:615.355:577.152.344.042]-07

Н. Л. Матвеев, Т. А. Валуева, С. И. Емельянов,
Г. Н. Писаревский, Г. П. Титова, В. А. Пенин,
В. В. Мосолов

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОГО БЕЛКА — ИНГИБИТОРА ПРОТЕИНАЗ — НА РАЗВИТИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПАНКРЕАТИТА У СОБАК

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Московский медицинский стоматологический институт им. Н. А. Семашко

Нарушение контроля процессов активации протеиназ играет ведущую роль в развитии ряда тяжелых заболеваний человека. Одним из таких состояний является острый панкреатит, особенно его некротические формы [7]. В настоящее время большинство исследователей [17, 21, 23] признают определяющее значение панкреатических протеиназ в патогенезе панкреатита. Патологическая активация трипсина даст начало каскаду ферментных реакций, обуславливающих тяжесть клинических проявлений панкреонекроза. Летальность при этой патологии приближается к 50 % [4, 22].

Как показали исследования, одним из факторов в развитии панкреатита является врожденная или приобретенная недостаточность основных сывороточных белковых ингибиторов протеолитических ферментов [15, 24]. Установлено также, что со-

Поступила 20.03.90

путствующие панкреонекрозу изменения в печени препятствуют элиминации ее ретикулоэндотелиальной системой комплексов фермент — ингибитор [11] и синтезу ингибиторов [3]. В связи с этим вполне обоснованным становится желание клиницистов использовать экзогенные природные и синтетические ингибиторы протеиназ при лечении панкреатита [2, 25]. Природные белковые препараты, применяемые в настоящее время с этой целью, содержат основной ингибитор трипсина (ингибитор Кунитца), выделяемый из разных органов крупного рогатого скота. Препараты ингибитора вводят в организм больного внутривенно, при хирургическом вмешательстве — внутрибрюшинно или используют тампоны, смоченные его раствором [9]. Однако ингибитор трипсина Кунитца активно сорбируется в почках и быстро выводится из организма. Установлено, что через 60 мин после внутривенного введения трасилола до 90 % введенного препарата обнаруживается в почках [20]. Поэтому для достижения терапевтического эффекта ингибитор часто вводят и в высоких дозах (до 1 млн антикалликреиновых единиц в сутки и более) [18]. Кроме того, основной ингибитор трипсина не подавляет активность панкреатической эластазы, которая вовлечена в патогенез панкреатита [7, 14], поэтому при уже развившихся деструктивных изменениях ингибитор не оказывает существенного влияния на течение патологического процесса в поджелудочной железе [5].

Мы изучали влияние на течение экспериментального панкреонекроза у собак другого экзогенного белкового ингибитора протеиназ — омовукоида из белка утиных яиц, эффективно подавляющего активность панкреатических сериновых протеиназ, в том числе эластаз, *in vitro* [10].

Методика. Для моделирования экспериментального панкреонекроза использовали 19 самцов беспородных собак массой от 4 до 15 кг. Панкреатит вызывали по методу Андерсона и соавт. [13]. С целью увеличения тяжести повреждения поджелудочной железы количество вводимой аутожелчи увеличивали с 0,2 до 0,5 мл/кг. После инъекции главный проток поджелудочной железы перевязывали кетгутом. Собак помещали в индивидуальные клетки, содержали без пищи, прием воды не ограничивали. Омовукоид в виде раствора в изо-

тоническом растворе хлорида натрия (3,3 мг/100 мл) вводили внутривенно в дозе 1 мг/кг через 2,5 ч после воспроизведения острого панкреатита и в той же дозе 1 раз ежедневно. Никакого другого лечения не проводили. Кровь брали с помощью катетера, введенного в бедренную вену до эксперимента, через 1, 2, 3, 4, 5 и 24 ч. Образцы крови центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин в присутствии стабилизатора — раствора гепарина (250 ЕД/мл). Собранную плазму хранили в пластиковых пробирках при -20°C . При вскрытии забирали поджелудочную железу и фиксировали ее в 10 % растворе формалина для гистологического исследования.

Омовукоид получали из белка утиных яиц по методу, описанному ранее [10]. Активность препарата омовукоида составляла 8000 АТрЕД/мг, что соответствует примерно 1600 антикалликреиновых единиц на 1 мг белка.

Амидазную активность трипсина и трипсиноподобных протеиназ в плазме крови определяли спектрофотометрически по модифицированному методу Какаде [19], используя в качестве субстрата N- α -бензоил-D, L-аргинин-D-нитроанилид. К 2,87 мл раствора субстрата ($0,7 \cdot 10^{-3}$ М) в 0,05 М трис-HCl-буфере pH 8,2 добавляли 0,03 мл раствора фермента (или плазмы) и измеряли прирост оптической плотности при 410 нм после 4 мин инкубации при комнатной температуре против контроля, не содержащего фермент (плазму). При расчете активности фермента учитывали вклад мутности исходного раствора плазмы, которую измеряли при 550 нм. За единицу ферментной активности принимали то количество фермента (плазмы), которое расщепляет 1 нмоль субстрата за 1 с.

Активность ингибиторов трипсина в плазме крови оценивали по подавлению активности трипсина из поджелудочной железы крупного рогатого скота («Serva», ФРГ). За единицу активности ингибитора (АТрЕД) принимали то количество плазмы, которое снижает активность трипсина на 1 ед.

Активность α -амилаз в плазме крови определяли по стандартному методу [16], используя в качестве субстрата крахмал.

Концентрацию свободных жирных кислот определяли в исходной и денатурированной при 60°C в течение 10 мин плазме [6]. Активность фосфолипазы A_2 оценивали по данным прироста содержания свободных жирных кислот в денатурированной плазме после инкубации при 37°C в течение 30 и 60 мин [8].

Результаты и обсуждение. Гистологический анализ поджелудочной железы на ранних стадиях развития панкреатита с учетом разнородности группы экспериментальных животных (возраст, масса тела, преморбидный фон) позволил выделить 2 морфологические формы процесса. У собак 1-й группы (5 контрольных и 5 получавших лечение) наблюдали гистологические признаки диффузного мелкоочагового панкреонекроза с выраженным геморрагическим компонентом (рис. 1). В поджелудочной железе собак 2-й

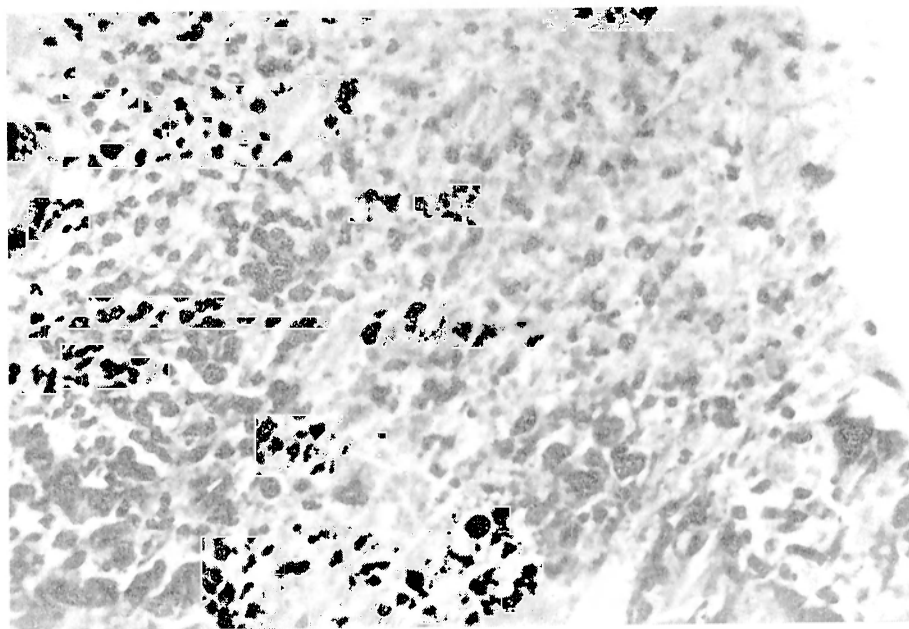


Рис. 1. Геморрагическое пропитывание внутридолькового некроза ацинарной ткани поджелудочной железы у животных 1-й группы.

Здесь и на рис. 2 окраска гематоксилином и эозином; $\times 400$.

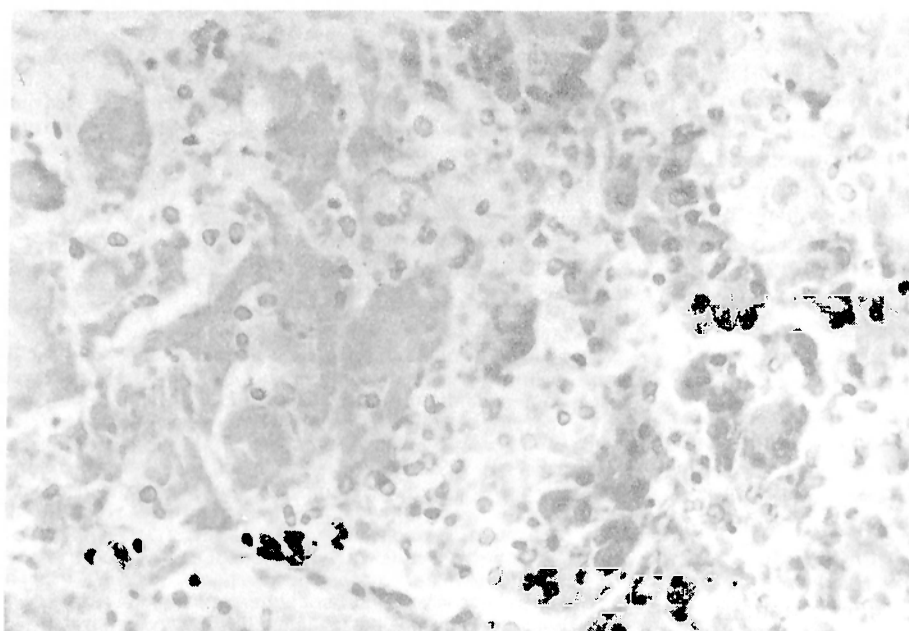


Рис. 2. Внутриволокнистый некроз с воспалительной инфильтрацией некротизированных ацинусов поджелудочной железы у животных 2-й группы.

группы (4 контрольных и 5 получавших лечение) выявлены изменения по типу очагового некроза без явных нарушений кровообращения в железе. Некротический процесс в этом случае более выражен в интерстициальной ткани и сопровождается отчетливой воспалительной реакцией (рис. 2).

Как видно из табл. 1 и 2, у контрольных животных 1-й группы наблюдается постепенное повышение активности трипсиноподобных протеиназ в плазме крови, которое сопровождается понижением активности ингибиторов трипсина. Активность трипсиноподобных протеиназ в плазме крови контрольных животных 2-й группы значительно снижается после воспроизведения модели, в то время как активность ингибиторов трипсина сохраняется почти на исходном уровне. У контрольных животных обеих групп обнаруживается высокая активность α -амилаз в плазме (табл. 3). Результаты определения содержания свободных жирных кислот в исходной плазме и после инкубации денатурированной плазмы при 37 °С в течение 30 и 60 мин (табл. 4) свидетельствуют о высокой активности липолитических ферментов, в том числе фосфолипазы A_2 , в крови контрольных животных обеих групп.

Таким образом, гистологические и биохимические исследования выявляют характерные для выбранной модели признаки ранних стадий развития панкреонекроза [12, 13]. Следует отметить, что модель панкреонекроза с внутриволокнистым введением желчи не дает выраженной трипсинемии. Это соответствует данным Ахо и соавт. [24], которые показали, что большая часть зимогенных гранул ацинарных клеток поджелудочной железы остается неразрушенной. Вероятно, по этой причине у контрольных животных 1-й группы изменения активности трипсиноподобных протеиназ и ингибиторов трипсина в плазме были недостоверны, несмотря на 2-кратное увеличение объема вводимой желчи по сравнению с опытами, описанными Андерсоном и соавт. [13]. Можно предполагать, что у ряда животных (как это отмечалось для 2-й группы) прогрессирование заболевания и летальный исход связаны с действием ферментов,

активирующихся в очагах воспаления лейкоцитов. В связи с небольшими масштабами деструкции ацинарной ткани в этих случаях трипсинемия практически не обнаруживается, однако можно ожидать активацию лейкоцитарных протеиназ, активность которых не измеряли в этой серии экспериментов.

Через 1 сут после воспроизведения панкреатита уровень ферментемии и активность ингибиторов трипсина для всех исследованных животных были сходны и составляли достаточно высокие значения: $2613,0 \pm 520,1$ нмоль/с·л, $177,9 \pm 22,4$ г/ч·мл, $7149,8 \pm 1399,2$ АТрЕД/мл для активности трипсиноподобных протеиназ, α -амилаз и ингибиторов трипсина соответственно при содержании свободных жирных кислот $766,6 \pm 33,0$, $1136,8 \pm 73,5$ и $1212,1 \pm 71,6$ имоль/мл для исходной и денатурированной плазмы (30 и 60 мин инкубации) соответственно. Все контрольные животные погибли в пределах 30 ч.

После внутривенного введения овомукоида в плазме животных обеих групп отмечается достоверное снижение активности трипсиноподобных протеиназ (см. табл. 1) и недостоверное повышение активности ингибиторов трипсина (см. табл. 2). Существенных изменений активности α -амилаз (см. табл. 3) плазмы под влиянием лечения не наблюдалось. Увеличение количества свободных жирных кислот (см. табл. 4) в исходной плазме подопытных животных в отличие от контрольных не носит достоверного характера. Однако прирост содержания свободных жирных кислот в денатурированной плазме после инкубации заметно снижается в результате лечения, что может свидетельствовать о снижении активности фосфолипазы A_2 [8].

Анализ гистологических данных показал, что через сутки после внутривенного введения овомукоида в поджелудочной железе животных обеих групп по сравнению с контролем отграничиваются очаги некроза, улучшается микроциркуляция, уменьшается лейкоцитарная инфильтрация зон некроза. Из 10 животных, леченных овомукоидами, через 72 ч погибли 3. Никаких аллергических

таблица 1

Активность трипсиноподобных протеиназ в плазме крови собак с острым панкреатитом до и после введения омовукоида, нмоль/с·л

Группа животных	Опыт						Контроль					
	до введения			после введения								
	0 ч	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	5 ч	0 ч	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	5 ч
1-я	2000,8±668,3	2880,0±773,1	3120,0±670,6	2277,5±408,2	1370,0±410,4	1120,0±84,9*	2050,6±566,0	2225,0±688,2	2510,0±770,7	2492,0±878,2	2685,0±936,8	2860,0±862,7
2-я	3343,8±835,7	2010,8±624,2	1772,8±313,3	824,0±447,4	1666,7±580,1	580,0±84,9*	2531,6±728,5	1407,8±580,2	1032,1±432,4	997,8±212,8	1113,5±601,5	837,0±171,3

Примечание. Здесь и в табл. 4 $p < 0,05$ относительно значений до введения омовукоида.

Таблица 2

Активность ингибиторов трипсина в плазме крови собак с острым панкреатитом до и после введения омовукоида, АТРЕД/мл

Группа животных	Опыт						Контроль					
	до введения			после введения								
	0 ч	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	5 ч	0 ч	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	5 ч
1-я	8981,5±2164,5	6930,0±996,5	4967,5±1178,8	7390,5±1184,5	6620,0±905,9	5589,0±293,4	8633,5±1341,6	7890,0±247,5	7780,0±141,4	7330,0±502,0	6870,0±473,8	7580,0±205,2
2-я	8254,4±749,6	8745,2±814,8	8932,6±1000,8	9678,6±1257,8	8233,3±1408,3	7410,0±855,6	7398,0±631,3	7807,0±801,9	8034,1±795,3	7121,8±866,7	7241,5±959,7	7050,9±815,6

Активность α -амилаз в плазме крови собак с острым панкреатитом до и после введения омовукоида, г/ч·мл

Таблица 3

Группа животных	Опыт						Контроль					
	до введения			после введения								
	0 ч	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	5 ч	0 ч	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	5 ч
1-я	62,5±5,8	135,5±11,3	167,1±16,4	193,1±28,4	172,8±21,5	176,3±24,2	69,0±2,1	123,0±14,8	135,0±27,6	117,0±6,4	132,0±25,5	117,0±14,8
2-я	72,0±14,1	120,7±34,2	148,0±60,5	108,0±19,8	136,0±21,7	103,0±15,2	69,0±2,1	123,0±14,8	135,0±27,6	117,0±6,4	132,0±25,5	117,0±14,8

Таблица 4

Содержание свободных жирных кислот в плазме крови собак с острым панкреатитом до и после введения омовукоида, нмоль/мл

Группа животных	Образец плазмы	Время инкубации, мин	Опыт						Контроль					
			до введения			после введения								
			0 ч	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	5 ч	0 ч	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	5 ч
1-я	Исходная	—	373,8±73,9	361,2±72,0	433,6±65,9	552,0±73,6	609,9±77,8	408,5±102,6	253,6±85,1	240,0±93,9	301,7±79,6	678,5±134,4	701,9±131,1*	407,7±113,3
	Денатурированная	30 60	450,6±81,1 496,2±101,3	414,2±78,7 519,1±119,0	510,2±78,1 545,5±188,0	583,7±132,5 722,6±132,6	682,8±77,8 736,9±52,6	499,1±121,1 583,7±97,3	393,7±101,9 529,6±110,9	363,3±61,0 520,3±89,9	436,7±93,0 560,8±111,1	848,5±87,0 995,2±200,1	841,8±108,5 961,0±99,9	541,0±124,0 659,1±91,8
2-я	Исходная	—	224,8±62,3	178,3±63,3	474,7±162,4	611,8±26,3	803,9±255,5	612,5±141,1	250,9±70,9	231,5±79,0	349,9±119,1	531,0±93,1	787,7±112,5*	691,2±99,0
	Денатурированная	30 60	411,7±73,1 576,1±78,9	384,1±74,5 511,2±106,5	512,9±149,2 618,1±172,9	668,5±87,7 761,3±70,3	961,4±314,7 1155,8±317,3	731,0±211,0 871,1±181,9	401,6±86,1 532,2±52,9	393,0±76,6 504,3±106,5	470,9±123,1 553,3±144,4	764,3±101,7 892,1±87,9	935,4±191,9 1060,8±215,0	844,3±81,5 954,5±126,4

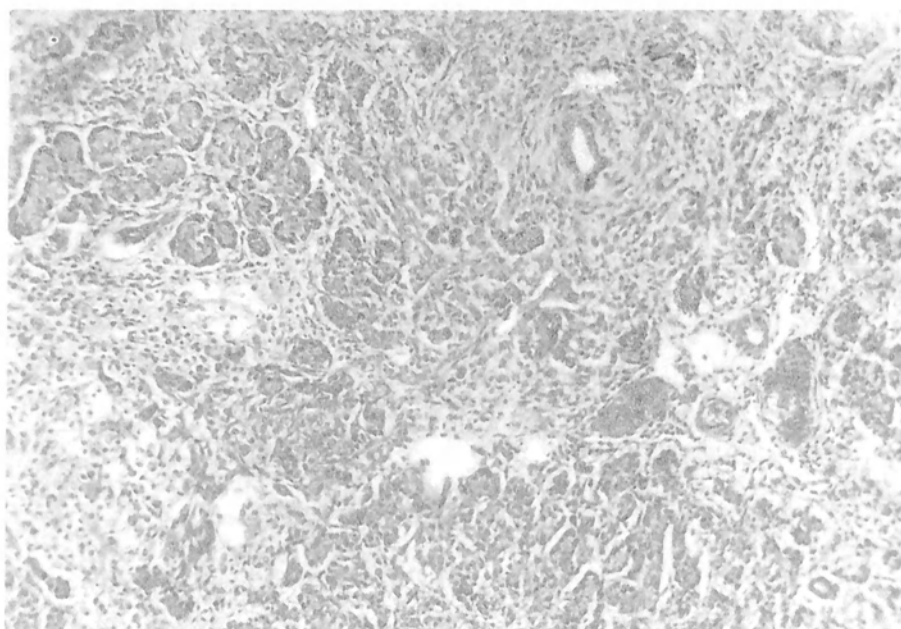


Рис. 3. Умеренный междольковый склероз и атрофия ацинарной ткани через 4 сут после лечения овомукоидом панкреонекроза у животных обеих групп.

Окраска гематоксилином и эозином; ун. 100.

и токсических реакций при введении овомукоида у экспериментальных животных не наблюдали. Через 4—6 сут гистологически у животных обеих групп выявляется заживление очагов некроза без выраженного склерозирования ткани поджелудочной железы (рис. 3). Гипотрофические процессы в поджелудочной железе, обнаруженные в эти сроки, по-видимому, связаны с перевязкой главного панкреатического протока в ходе эксперимента, а не являются следствием побочного действия овомукоида.

Таким образом, утиный овомукоид в дозе 1 мг/кг (примерно 1600 антикалликреиновых единиц на 1 кг) оказывает отчетливое положительное терапевтическое действие при остром экспериментальном панкреатите. Действительно, показатель летальности собак опытных групп (30 %) указывает на положительный эффект этого препарата даже в условиях достаточно жесткого эксперимента, при которых летальность контрольных животных (100 % через 30 ч эксперимента) была значительно выше, чем по данным Андерсона и соавт. [13].

Как отмечают многие исследователи, трасилол в концентрации, сравнимой с использованной в данной работе, практически не влияет на течение экспериментального панкреонекроза [18]. Более высокая по сравнению с препаратами на основе ингибитора Кунитца эффективность терапевтического действия низких доз овомукоида обусловлена его высокой антипротеиназной «емкостью», поскольку 1 молекула ингибитора способна одновременно связывать 2 молекулы трипсина и 1 молекулу химотрипсина с образованием тетрамолекулярного комплекса [1]. Кроме того, имеются все основания предполагать, что эффективность действия утиного овомукоида при лечении описанных форм панкреонекроза, характеризующихся различной степенью паренхимных или интерстициальных повреждений поджелудочной железы, связана со способностью ингибитора подавлять активность не только трипсиноподобных протеиназ, но и лейкоцитарных эластаз [1].

ЛИТЕРАТУРА

1. Ванчугова Л. В., Валуева Т. А., Ромашкин В. И. и др. // Биохимия.— 1988.— Т. 53, № 9.— С. 1445—1461.
2. Гостищев В. К., Владимиров В. Г., Журавлев А. Г. и др. // Хирургия.— 1983.— № 1.— С. 383—390.
3. Канцалиев Л. Б., Индроккова С. Б. // Хирургия.— 1983.— № 7.— С. 41—44.
4. Кутяков М. Г., Ермолаев В. А., Баскаков В. А., Островский В. К. // Хирургия.— 1985.— № 7.— С. 71—75.
5. Пенин В. А., Петров В. В., Титова Г. П. и др. // Фармакология и токсикология.— 1982.— № 5.— С. 83—87.
6. Прохоров М. Ю., Тиунов М. П., Шакалис Д. А. // Лаб. дело.— 1977.— № 9.— С. 47—50.
7. Савельев В. С., Буянов В. М., Огнев Ю. В. Острый панкреатит.— М., 1983.
8. Сороковой В. И., Марачев А. Г., Моченова И. И. и др. // Гематол. и трансфузиол.— 1987.— № 10.— С. 24—28.
9. Сыновец А. С., Левицкий А. П. Ингибиторы протеолитических ферментов в медицине.— Киев, 1979.
10. Илльгин М. Н., Валуева Т. А., Кестере А. Я., Мосолов В. В. // Биохимия.— 1981.— Т. 46, № 3.— С. 473—479.
11. Adham N. F., Song M. K., Habberfelde C. C. // Gastroenterology.— 1983.— Vol. 84.— P. 461—469.
12. Aho H. J., Koskensalo S. M.— L., Nevalainen T. J. // Scand. J. Gastroenterol.— 1980.— Vol. 15.— P. 411—416.
13. Anderson M. C., Van Hager F., Mether H. C., Mehn W. H. // Surg. Gynec. Obstet.— 1958.— Vol. 107.— P. 693—703.
14. Balldin G., Ohlsson K. // Surgery.— 1979.— Vol. 85.— P. 451—456.
15. Berninger R. W. // J. Med. (USA).— 1985.— Vol. 16.— N 1.— 3.
16. Caraway W. T. // Amer. J. Clin. Pathol.— 1959.— Vol. 32.— P. 97—103.
17. Gabryelowicz A. // Mt. Sinai. J. Med.— 1987.— Vol. 54.— P. 384—388.
18. Imrie C. W., McKenzie M. // Digestion.— 1981.— Vol. 22.— P. 32—38.
19. Kakade M. I., Simons N., Liener G. E. // Cereal. Chem.— 1969.— Vol. 46.— P. 518—526.
20. Lasso A. // Scand. J. Gastroenterology.— 1984.— N 19.— Suppl. 99.— P. 1—57.
21. Letko G., Falkenberg B., Wilhelm W. // Int. J. Pancreatol.— 1989.— Vol. 4.— P. 431—441.
22. Renner V. J., // Dig. Dis. Sci.— 1985.— Vol. 30.— P. 1005—1018.
23. Rinderknecht H. // Dig. Dis. Sci.— 1986.— Vol. 31.— P. 314—321.
24. Wilson J. S., Korsten M. A., Pirola R. C. // Int. J. Pancreatol.— 1989.— Vol. 4.— P. 109—125.
25. Wisner J. R., Ozawa S., Renner I. G. // Int. J. Pancreatol.— 1989.— Vol. 4.— P. 383—390.

Поступила 23.03.90

EFFECT OF EXOGENOUS PROTEIN INHIBITOR OF PROTEINASES ON DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL PANCREATITIS IN DOGS

N. L. Matveev, T. A. Valueva, S. I. Emel'yanov, G. N. Pisarevsky, G. P. Titova, V. A. Penin, V. V. Mosolov

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, N. A. Semashko Medical Stomatological School, Moscow

Small doses of an exogenous protein inhibitor of proteinases ovomucoid, isolated from duck egg-white, exhibited distinct therapeutic effects in acute pancreatitis of dogs. The inhibitor decreased the lethality rate and exceeded the basic Kunitz trypsin inhibitor in its efficiency.

© В. СЕРХАН, И. Г. ЩЕРБАК, 1990

УДК 612.128:577.152.344.042.2]:547.962.4

В. Серхан, И. Г. Щербак

АНТИТРИПСИНОВЫЕ ЭФФЕКТЫ α_2 -МАКРОГЛОБУЛИНА

Ленинградский медицинский институт им. акад. И. П. Павлова

α_2 -Макроглобулин (МГ) занимает особое место среди всех известных белково-пептидных ингибиторов протеиназ. Открытый в начале 60-х годов [3, 8, 11, 20], этот белок сочетает универсальность действия на протеиназы разных классов и уникальный механизм ингибиторного эффекта, который и сегодня трактуется в основном в рамках «ловушечной» гипотезы, предложенной в 1973 г. [5]. Несмотря на многочисленные подтверждения и существенные уточнения этой гипотезы [2, 4, 13—15, 19], многие вопросы остаются пока открытыми, в том числе особенности ингибирующего действия МГ на активность различных протеиназ по отношению к низкомолекулярным субстратам. По данным литературы, степень подобного ингибирования варьирует от почти полного его отсутствия [9] до 20—25 % [11, 16, 18] и даже до 50 % [12, 17]. В рамках проводимых нами исследований МГ потребовалось уточнить степень угнетения этим белком N-бензоил-L-аргинин-пара-нитроанилид (БАПНА)-гидролазной активности трипсина (Тр), для чего и были проведены эксперименты с очищенными препаратами МГ из плазмы крови практически здоровых людей.

Методика. В каждой процедуре выделения и очистки препарата МГ использовали индивидуальную плазму человека (90—120 мл). Процедуру осуществляли в 3 этапа: осаждение МГ сульфатом аммония (0—1,9 М), фракционирование полученного осадка с использованием полиэтиленгликоля-6000 (4,5—12 %) и гель-фильтрация на колонках ультрагеля АСА-22 (фирма LKB, Швеция) размером 2,6×80 см с элюцией буфером Б (0,02 М трис-НСl, содержащий 0,4 М хлорида натрия и 2 мМ Na-ЭДТА; pH 7,6) со скоростью 18 мл·ч⁻¹. Белковые пики регистрировали с помощью прибора Увикорд (LKB, Швеция) по светопоглощению при 275 нм. Обычно этап хроматографии повторяли 2—4 раза. В конечном итоге достигали примерно 25-кратной очистки препарата МГ с выходом до 40—45 %. Ионнообменная хроматография на колонке Сервацел ДЭАЭ-52 не приводила к дополнительной очистке и давала единственный белковый пик, максимум которого соответствовал 0,2 М хлорида натрия в элюирующем буфере (рН 7,6). Однородность препарата подтверждена электрофорезом в ПААГ посредством радиальной иммунодиффузии с использованием стандартного набора для определения МГ

(производство фирмы «Sevac», ЧССР), а также в опытах с инактивацией МГ монометиламином (ММА) описанным ранее методом [1]. Содержание белка определяли методом Лоури [10].

Для оценки ингибиторной активности МГ использовали кристаллический препарат бычьего Тр фирмы «Спофа» (ЧССР). В предварительных экспериментах установлено, что содержание активного фермента в препарате составляло примерно 64 %. Соответствующую поправку на степень чистоты препарата учитывали во всех расчетах.

Активность Тр в отношении БАПНА регистрировали по скорости прироста светопоглощения при 405 нм с использованием спектрофотометра СФ-46. Измерения проводили в присутствии 1 мМ Ca²⁺ при pH 8,0 и температуре 37 °С в буфере А (0,02 М трис-НСl, содержащий 0,23 М хлорида натрия) или 0,2 М натрий-фосфатном буфере (буфер В). Конечная концентрация БАПНА при использовании этих буферных систем составляла соответственно 0,7 и 4,6 мМ.

Для оценки антитрипсинового эффекта МГ осуществляли в течение 5 мин преинкубацию МГ с разными количествами Тр, после чего смесь разводили буфером и добавляли к ней БАПНА. Затем после 5 мин инкубации к смеси добавляли 0,1 мл раствора соевого ингибитора трипсина (СИТ) в концентрации, достаточной для полного ингибирования содержащегося в системе фермента, и остаточную активность Тр регистрировали в течение следующих 5 мин для оценки количества фермента, связанного МГ [7].

Результаты и обсуждение. В табл. 1 представлены результаты экспериментов, проведенных с разными препаратами МГ. Первая цифра в шифре препарата означает номер индивидуальной плазмы крови человека, буквой Г и следующей за нею цифрой отмечено число процедур гель-фильтрации, проведенных на 3-м этапе очистки, буквой С и следующей за нею цифрой — порядковый номер белковых пиков, полученных в ходе ионообменной хроматографии препаратов

Таблица 1

Ингибирование активности трипсина очищенными препаратами α_2 -макроглобулина

Препарат МГ	Количество Тр в пробе, мкг	Исходное молярное отношение Тр/МГ	Активность Тр, АЕ ₄₀₅ за 5 мин			Степень ингибирования Тр в комплексе с МГ, %
			А _{исх}	А _{МГ}	А _{СИТ}	
6-Г-1	8	0,98	0,268	0,202	0,092	42
	12	1,47	0,400	0,300	0,079	56
	16	1,96	0,522	0,375	0,080	65
	12	5,88	0,396	0,322	0,025	75
8-Г-1	4	1,18	0,175	0,077	0,041	70
	8	2,35	0,362	0,213	0,047	76
	12	3,53	0,559	0,450	0,066	62
	16	4,71	0,775	0,623	0,066	70
8-С-1	4	1,66	0,217	0,113	0,050	67
	8	3,31	0,368	0,212	0,045	78
8-С-2	4	1,45	0,215	0,087	0,053	71
	8	2,91	0,371	0,210	0,059	73
8-С-3	4	1,37	0,204	0,092	0,038	75
	8	2,74	0,350	0,182	0,034	83
9-Г-1	8	2,59	0,200	0,150	0,066	42
13-Г-4	4	0,54	0,326	0,189	0,114	55
	4	1,08	0,315	0,232	0,091	48
14-Г-6	4	0,72	0,237	0,125	0,100	53
	4	1,08	0,237	0,135	0,113	47
	8	1,44	0,462	0,266	0,168	51
	6	1,62	0,362	0,266	0,127	43
	4	2,15	0,262	0,204	0,070	45
	10	5,39	0,611	0,535	0,064	54
14-С-1	4	1,06	0,358	0,164	0,125	61
14-С-2	4	1,08	0,358	0,169	0,121	61
14-С-3	4	1,06	0,358	0,217	0,078	64

Примечание. А_{исх} — активность Тр без ингибиторов; А_{МГ} — после введения МГ; А_{СИТ} — после введения СИТ. Степень ингибирования Тр в комплексе с МГ, % = $\frac{А_{исх} - А_{МГ}}{(А_{исх} - А_{МГ}) + А_{СИТ}} \cdot 100$.

8-Г-1 или 14-Г-6 на колонках сферона ДЭАЭ-1000 при ступенчатом повышении концентрации NaCl в элюирующем буфере Б до 0,15, 0,175 и 0,2 М.

Как видно из табл. 1, степень снижения БАПНА-гидролазной активности Тр после его преинкубации с МГ варьировала в широких пределах и колебалась от 40 до 65 %, иногда достигала 75—83 %. При этом степень ингибирования Тр зависела и от молярного отношения Тр/МГ. Обычно с увеличением этого отношения степень ингибирования нарастала, что особенно отчетливо выражено в опытах с препаратом 6-Г-1 — от 42 до 75 %. Иногда наблюдали явное снижение (препарат 13-Г-4). Наконец, в ряде случаев степень ингибирования варьировала с изменением отношения Тр : МГ без какой-либо закономерности от 43 до 54 % для препарата 14-Г-6 и от 62 до 76 % для препарата 8-Г-1. Эти колебания не могли быть объяснены недостаточной точностью методики, так как хорошая воспроизводимость результатов наблюдалась не только в параллельных опытах, но и при воспроизведении их в разные дни.

Полученные данные не позволяют принимать рассчитанную степень ингибирования Тр, попавшего в «ловушку» МГ, за сколько-нибудь стабильную характеристику образующихся комплексов. Значительную вариабельность нельзя объяснить и наличием в препаратах МГ примеси каких-то иных ингибиторов Тр, так как опыты с инактивацией МГ путем его преинкубации с монометиламином (ММА) показали полное отсутствие эффекта начального ингибирования Тр под влиянием МГ, и образования комплексов, устойчивых к СИТ.

Поскольку в рамках «ловушечной» гипотезы [5] полученные результаты не находят удовлетворительного объяснения, мы выдвинули предположение о существовании 2 типов взаимодействия МГ с Тр. Один из них («ловушечный») осуществляется в соответствии с упомянутой гипотезой и результат его — попадание 1—2 молекул Тр в соответствующие «ловушки» тетрамерной молекулы МГ с почти полным сохранением БАПНА-гидролазной активности фермента, который может быть обозначен как активный комплексированный Тр (акТр). Другой тип взаимодействия, обозначенный нами как альтернативный, приводит к полной и необратимой потере ферментом (в составе комплекса с МГ) не только иротеолитической активности, но и активности в отношении низкомолекулярных субстратов типа БАПНА. Такой Тр мы обозначили как инактивированный комплексированный Тр (икТр).

Количество акТр в таком случае может быть рассчитано по отношению остаточной активности

Тр в присутствии избытка СИТ ($A_{СИТ}$) к исходной активности без МГ ($A_{исх}$), умноженному на исходное количество Тр в пробе. Количество икТр рассчитывают по степени начального ингибирования ($A_{исх} - A_{МГ}/A_{исх}$), умноженной на исходное количество Тр в пробе. Осуществление таких расчетов позволило не просто систематизировать варьирующие, весьма разбросанные данные о степени ингибирования Тр, приведенные в табл. 1, но и выявить определенные закономерности.

В качестве иллюстрации на рис. 1 приведены результаты расчета содержания акТр и икТр в составе комплексов с МГ (препарат 9-Г-2), разные количества которого преинкубированы с 8 мкг Тр. Как видно, образование и тех, и других комплексов пропорционально количеству МГ в исходной смеси до тех пор, пока не начинает ощущаться недостаток Тр. В другой серии опытов дефицит Тр предотвращали путем изменения исходных количеств фермента и препарата 9-Г-2 таким образом, чтобы поддерживать молярный избыток Тр в диапазоне 1,33—2,66. В этих условиях пропорциональность и акТр, и икТр количеству МГ в среде наблюдалась во всем 4-кратном интервале использованных концентраций МГ (рис. 2). При этом молярное отношение акТр/МГ в составе комплексов колебалось в отдельных опытах в диапазоне 0,71—0,78, а икТр/МГ — 0,34—0,47. Эти соотношения были довольно стабильны и хорошо воспроизводились при повторении анализов даже после длительного (до 3 мес) хранения стерильных препаратов МГ на холоду. Так, для препарата 9-Г-2 (см. рис. 1 и 2) повторные анализы на протяжении 3 мес хранения неизменно показывали отношение акТр/МГ в пределах $0,77 \pm 0,022$, а икТр/МГ — $0,40 \pm 0,020$ ($M \pm m$ из 14 опытов).

Примечательно, что соотношение формирования обоих типов комплексов Тр — МГ существенно варьировало в разных индивидуальных препаратах МГ (табл. 2). Чаще несколько преобладала

Таблица 2

Соотношение комплексов акТр — МГ и икТр — МГ при взаимодействии трипсина с разными препаратами МГ

Препарат МГ	Число анализов	Молярные отношения		Доля комплексов, %	
		акТр/МГ	икТр/МГ	акТр — МГ	икТр — МГ
9-Г-2	14	$0,77 \pm 0,022$	$0,40 \pm 0,020$	66	34
13-Г-1	6	$0,34 \pm 0,003$	$0,28 \pm 0,023$	55	45
13-Г-4	7	$0,34 \pm 0,004$	$0,24 \pm 0,018$	59	41
14-Г-6	12	$0,59 \pm 0,017$	$0,62 \pm 0,054$	49	51
15-Г-1	10	$0,38 \pm 0,011$	$0,50 \pm 0,029$	43	57

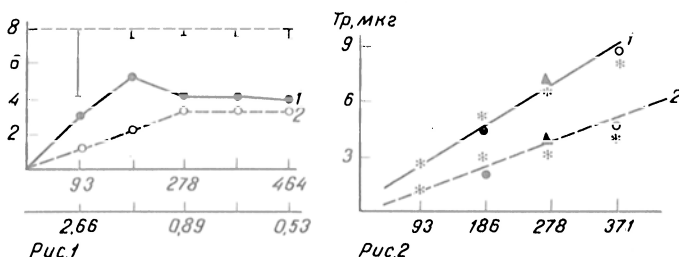


Рис. 2. Количество Тр в комплексах акТр — МГ (1) и икТр — МГ (2), образующихся в условиях избытка Тр.

По оси абсцисс — количество МГ (в мкг); по оси ординат — количество Тр (в мкг). Исходное молярное отношение Тр/МГ составляло: звездочка — 2,66, треугольник — 1,78, светлые кружки — 1,33, темные — 2,00.

Рис. 1. Влияние исходного содержания МГ на количество акТр (1) и икТр (2) в образующихся комплексах Тр — МГ.

По оси ординат — содержание Тр в пробе (в мкг); по оси абсцисс — исходное количество МГ (в мкг). — верхняя ось и молярное отношение фермента к ингибитору — Тр/МГ (нижняя ось) в среде преинкубации. Вертикальными линиями обозначено количество Тр, не вошедшего в состав комплексов («свободный» Тр).

способность МГ формировать комплексы акТр — МГ, чем икТр — МГ (препараты 13-Г-1, 13-Г-4). Иногда это преобладание было очень значительным (препарат 9-Г-2), хотя встречалось и обратное соотношение (препарат 15-Г-1) или примерно равное распределение Тр между активными и неактивными комплексами с МГ (препарат 14-Г-6).

Выявленная вариабельность соотношения 2 типов взаимодействия МГ с Тр явно свидетельствует против того, что они свойственны молекулам одного и того же нативного МГ — тогда указанное соотношение было бы примерно одинаковым в разных препаратах МГ, отражая просто вероятность реагирования по одному или другому типу. Следовательно, полученные нами данные свидетельствуют в пользу существования разных молекулярных форм МГ, каждая из которых способна образовывать с Тр комплексы только свойственного ей типа (т. е., либо акТр — МГ, либо икТр — МГ). Соотношение этих двух форм МГ может варьировать у разных доноров и/или в зависимости от каких-то особенностей в проведении ранних этапов очистки МГ.

О возможности существования разных молекулярных форм нативного МГ свидетельствуют и результаты экспериментов с инактивацией его в ходе преинкубации с ММА в буфере А РН 8,0 при 37 °С в течение 60 мин. Введение в эту систему Тр и через 5 мин субстрата (БАПНА) для регистрации остаточной активности фермента до и после добавления избытка СИТ позволяло оценить влияние ММА на способность МГ образовывать разные типы комплексов с Тр. В табл. 3 представлены результаты таких экспериментов, проведенных с использованием одного и того же количества Тр (8 мкг в пробе). Можно видеть, что полная инактивация МГ в описанных условиях происходила лишь при достаточно высоких (не менее 0,1 М) концентрациях ММА. При этом МГ утрачивал способность формировать как активные, так и неактивные комплексы с Тр. Однако меньшие концентрации ММА, вызывавшие лишь

частичную инактивацию МГ, гораздо эффективнее предотвращали образование активных комплексов, чем неактивных. В контрольных опытах, в которых ММА добавляли после преинкубации МГ с Тр, это соединение не оказывало заметного влияния на количество уже сформировавшихся комплексов акТр — МГ и икТр — МГ.

Аналогичные эксперименты, проведенные с использованием гидроксилamina вместо ММА, дали сходные результаты. При этом, однако, к блокирующему действию гидроксилamina более чувствительным оказался не «ловушечный», а альтернативный тип взаимодействия МГ с Тр.

Полученные нами данные определенно свидетельствуют против отождествления 2 типов взаимодействия между МГ и Тр с ковалентным или нековалентным связыванием, соотношение которых должно носить вероятностный характер [6, 19] и, следовательно, быть постоянным для разных препаратов МГ из одного биологического источника, а также для частично инактивированных препаратов МГ.

Таким образом, представленные результаты свидетельствуют, что наряду с общепринятым механизмом захвата протеиназы в «ловушку» МГ существует иной, альтернативный тип взаимодействия, в результате которого фермент теряет свою активность в отношении не только белковых, но и низкомолекулярных субстратов. Каждый из 2 типов взаимодействия МГ с Тр присущ, по-видимому, разным молекулярным формам МГ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Боголюбова Г. М., Санковский А. А., Щербак И. Г. // Лаб. дело. — 1988. — № 12. — С. 87—90.
2. Веремеенко К. П., Голобородько О. П., Кузим А. И. Протеолиз в норме и при патологии. — Киев, 1988.
3. Веремеенко К. П., Кузим А. И. // Биохимия. — 1964. — Т. 29, № 1. — С. 132—137.
4. Arakawa H., Nishigai M., Ikai A. // J. Biol. Chem. — 1989. — Vol. 264, N 4. — P. 2350—2356.
5. Barrett A. J., Starkey P. M. // Biochem. J. — 1973. — Vol. 133, N 4. — P. 709—724.
6. Eccleston E. D., Howard J. B. // J. Biol. Chem. — 1985. — Vol. 260, N 18. — P. 10169—10176.
7. Garrot P. O. // Clin. Chim. Acta. — 1966. — Vol. 14, N 4. — P. 493—501.
8. Haverback B. J., Dyce B., Bundy H. F. et al. // J. Clin. Invest. — 1962. — Vol. 41, N 5. — P. 972—980.
9. James K., Taylor F. B., Jr., Fudenberg H. H. // Biochim. Biophys. Acta. — 1967. — Vol. 133, N 2. — P. 374—376.
10. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265—275.
11. Mehl J. W., O'Connel W., De Groot J. // Science. — 1964. — Vol. 145, N 3634. — P. 821—826.
12. Rinderknecht H., Fleming R. M., Geokas M. C. // Biochim. Biophys. Acta. — 1975. — Vol. 377, N 1. — P. 158—165.
13. Roberts R. C., Hall P. K. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1983. — Vol. 431. — P. 61—68.
14. Salvesen G. S., Sayers A., Barrett A. J. // Biochem. J. — 1981. — Vol. 195, N 2. — P. 453—461.
15. Sollrup-Jensen L., Petersen T. E., Magnusson S. // FEBS Lett. — 1981. — Vol. 128, N 1. — P. 127—132.
16. Starkey P. M., Barrett A. J. // Biochem. J. — 1973. — Vol. 131, N 4. — P. 823—831.
17. Van Leuwen F., Cassiman J.-J., Van den Berghe H. // J. Biol. Chem. — 1981. — Vol. 256, N 17. — P. 9023—9027.
18. Wang D., Wu K., Feinman R. D. // J. Biol. Chem. — 1981. — Vol. 256, N 21. — P. 10934—10940.
19. Wang D., Yuan A. I., Feinman R. D. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1983. — Vol. 431. — P. 90—97.
20. Weremeenko K. N., Belitzer W. A. // Acta biol. med. germ. — 1963. — Bd 11, N 4. — S. 451—462.

Поступила 20.03.90

Таблица 3
Влияние преинкубации с монометиламином на анти трипсиновую активность МГ

Количество препарата МГ в пробе, мкг	Концентрация ММА, мм	Количество Тр в комплексах с МГ, мкг		Степень угнетения образования комплексов, %	
		акТр	икТр	акТр/МГ	икТр/МГ
186 мкг (9-Г-2)	0	1,92	4,79	0	0
	34	1,20	1,82	38	62
	68	0,72	1,15	63	76
	135	0	0	100	100
93 мкг (9-Г-2)	0	0,99	2,43	0	0
	14	0,76	1,93	23	21
	43	0,54	0,58	46	75
	68	0,49	0,34	51	86
	86	0,54	0,67	46	72
110 мкг (13-Г-4)	135	0,18	0	82	100
	0	2,9	2,99	0	0
	90	0,89	0,58	69	81
	180	0	0	100	100
167 мкг (14-Г-6)	0	3,05	2,91	0	0
	540	0,24	0	92	100
	370*	3,19	2,79	—5	4

Примечание. Звездочка — ММА добавлен после преинкубации МГ с Тр, но за 40 мин до введения субстрата в систему.

Purified preparations of α_2 -macroglobulin were preincubated with bovine trypsin at various molar ratios. Effects of the preincubation were measured before and after addition of soybean trypsin inhibitor in excess if N-benz-L-arg-p-nitroanilide was used as a substrate. Two types of interaction between α_2 -macroglobulin and trypsin were detected. One of them was carried out depending on the "trap" hypothesis, another type of the interaction led to the enzyme loss of both proteolytic activity and its ability to hydrolyze the low molecular substrate. The data obtained suggest that various molecular forms of native α_2 -macroglobulin were responsible for these types of interaction.

УДК 612.014:576.311.344[616-018.1:576.311.344]:061.3(571.14-25)

Т. А. Короленко, Н. Н. Маянская

ВСЕСОЮЗНОЕ РАБОЧЕЕ СОВЕЩАНИЕ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ «СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ ЛИЗОСОМ»

С 12 по 16 июня 1989 г. в Новосибирске состоялось очередное рабочее совещание ученых из Москвы, Ленинграда, Томска, Рязани, Дисненстретовска, а также зарубежных гостей из Нидерландов, Японии, Чехословакии и Болгарии на тему «Структура и функции лизосом». На нем были представлены исследования по актуальным проблемам клеточной биологии, каковыми, несомненно, являются эндоцитоз и участие в этом процессе лизосом, внутрилизосомальный протеолиз, физиологическая регуляция функций лизосом, медицинские и биологические аспекты изучения ингибиторов протеиназ. Значительный интерес представил доклад М. Хардона (Нидерланды), посвященный диацитозу и лизосомальной деградации в клетках печени. Как известно, транзитоз соединений может осуществляться из крови в желчь (IgA, в незначительной степени — асиалогликопротеин) или из крови в кровь (например, трансферрин). Основная часть асиалогликопротеина подвергается деградации в лизосомах. Пути соединений внутри клетки (прежде всего белков) зависят от введенной дозы, родства к рецептору, а также от свойств клеток. Используя новые методы иммуногистохимии, в работе удалось показать функциональную гетерогенность лизосом гепатоцитов различных отделов печеночной дольки. Так, число захваченных гранул золота (17 нм) возрастало в направлении от перипортальной до перивенозной зоны. При поглощении других веществ (соли желчных кислот, таурохолат, бромсульфалеин, эпидермальный фактор роста) наиболее активны перипортальные гепатоциты. Автор считает, что определенное значение могут иметь также особенности строения выстилающих эпителиальных клеток и купферовских клеток печени.

В сообщении С. Иокоты (Япония) были представлены новые данные о иммуногистохимической локализации в клетках проксимальных канальцев почки катепсина В, L и H, играющих существенную роль в деградации белков, поглощенных эндоцитозом. В работе были представлены данные, подтверждающие одинаковую локализацию протеиназ и введенной внутривенно пероксидазы хрена во внутриклеточной переваривающей системе клеток проксимального канальца, в основном в SI-сегменте проксимальной трубки, которая, как известно, активно захватывает белки благодаря гломерулярному аппарату. Значительное внимание в лекции было уделено самой иммуногистохимической технике.

Ряд докладов был посвящен вопросам фармакологической коррекции функций лизосом. Т. П. Моженко и соавт. (Ленинград) показали действие ряда соединений, влияющих на слияние фагосом с лизосомами, которое оценивали по одинаковой локализации маркера фагоцитоза (дрожжевых клеток) и акридинового оранжевого в перитонеальных макрофагах мышей. Антибиотики рифампицин и даунорубин стимулировали слияние лизосом с фагосомами, очевидно, через влияние на актин, сульфатированный маннан (но не маннан) ингибировал этот процесс. Авторы считают, что стабилизаторы актиновых филаментов и антимиотрубочковые препараты важны в регуляции движения лизосом при ауто- и гетерофагии.

А. Г. Булычев и Т. Н. Беляева (Ленинград) в своем докладе охарактеризовали лизосомотропные свойства сангвиритрина, обладающего антимикробной и антифунгальной активностью. Сангвиритрин, являющийся слабым основанием, накапливается в высоких концентрациях в лизосомах мышечных фибробластов и подавляет активность ряда ферментов лизосом (катепсина D, N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы), что может быть одним из побочных эффектов препарата, который следует учитывать при длительном его использовании в качестве лечебного соединения.

А. М. Нестеров и соавт. (Ленинград) представили новые данные по исследованию механизма действия эпидермального фактора роста (ЭФР), начиная с момента связывания ЭФР с рецептором на плазматической мембране и заканчивая деградацией в лизосомах. Показано, что в клетках эпидермальной карциномы человека линии A-431, интернализованные ЭФР-рецепторные комплексы остаются недиссоциированными и функционально активными.

В докладах Т. Трновца и Й. Сандулы (Чехо-Словакия) были охарактеризованы структура и биологическая активность лизосомальных соединений — гликанов. Наиболее перспективны β -(1—3)-D-гликаны, обладающие противоопухолевой и противовоспалительной активностью. В эксперименте на мышцах гликаны усиливали неспецифическую резистентность при пневмонии у мышей, вызываемой *K. pneumoniae*. Наибольшему выживанию способствовали дериваты гликанов, вводимые вместе с антибиотиком гентамицином, причем доза и токсичность последнего резко снижались. Показано, что под влиянием гликанов усиливается синтез интерферона и иммуноглобулинов IgG и IgM. Так как чистые гликаны плохо растворимы в воде, то целесообразно создание новых дериватов, например карбоксиметилгликана, обладающего выраженным биологическим эффектом.

Я. Наварова (Чехо-Словакия) доложила результаты своих исследований по фармакологической коррекции (стабилизации) лизосом клеток слизистой оболочки желудка крыс противовоспалительными препаратами (пентаксин и др.). Предложена оригинальная модель для тестирования лекарств, используемых в гастроэнтерологии.

В сообщении Т. А. Короленко и соавт. (Новосибирск) исследован механизм действия лизосомотропных ингибиторов протеолиза, применяемых в клинической медицине, а также их эффект на протеиназы лизосом.

В докладе Л. Е. Панина (Новосибирск) был подведен итог исследованиям, проводимым в течение ряда лет по изучению гормональной регуляции лизосомального аппарата при стрессе. Показано, что при стрессе активация лизосом (лабилизация мембран, повышение удельной активности кислых гидролаз, возрастание числа вторичных лизосом) в печени, сердце и скелетных мышцах — следствие повышения продукции глюкокортикоидных гормонов и катехоламинов, с одной стороны, и снижения уровня инсулина — с другой. Приводятся данные о том, что в регуляции активности лизосомального аппарата гепатоцитов важную роль играет кооперативный эффект липопротеидов крови и адаптивных гормонов.

Н. И. Маянская (Новосибирск) представила результаты исследований некоторых механизмов вовлечения лизосомального аппарата в возникновение и развитие тканевого повреждения. В эксперименте на крысах (чрезмерная физическая нагрузка) и у больных с сердечной патологией отмечена высокая корреляция нарушений лизосом с выраженностью тканевого повреждения (миокарда и скелетных мышц).

Л. П. Крыстев и О. Полякова-Крыстева (Болгария) сообщили результаты исследования роли лизосом печени в гепатоканцерогенезе, а также в патогенезе некоторых паразитарных заболеваний. Обнаружено, что лизосомы печени — мишени для многих токсических агентов, под действием которых увеличивается пролиферативная активность клеток и возможен неопластический рост или фибропластические процессы, приводящие к циррозу печени.

Значительный интерес вызвали доклады С. П. Сяткина (Москва) о спектрофотометрическом исследовании физико-химических свойств изолированных лизосом, Л. Л. Беляева (Новосибирск) о роли лизосом в транзитозе адресованных лигандов, Б. П. Шаронова и С. Н. Лыловой (Ленинград) о значении дегранулированной мислопероксидазы в развитии патологического состояния, вызываемого стимулированными нейтрофилами.

Во время совещания были организованы два «круглых стола» по темам: «Направленная регуляция функций лизосом — ингибиторы и активаторы», «Лизосомы в патологии».

Состоялся интересный обмен научной информацией, выделены наиболее перспективные научные направления исследований. Определенный интерес вызвали новые методы исследований эндоцитоза и лизосом, которые еще слабо при-

меняются в нашей стране. Обсужден план будущих совместных исследований лизосом. Принято решение о проведении очередного международного симпозиума по структуре и функциям лизосом в 1991 г. в Софии, Болгария.

© К. Д. ПЛЕЦИТЫЙ, 1990

УДК 616.155.392-02:577.161.2]-07

К. Д. Плецитый

АКТИВНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ ВИТАМИНА D КАК РЕГУЛЯТОРЫ ПРОЦЕССОВ КЛЕТОЧ- НОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИ- РОВКИ. СООБЩЕНИЕ III. ЛЕЙКОЗНЫЕ КЛЕТКИ (обзор)

Институт общей патологии и патологической физиологии АМН СССР, Москва

В предыдущих сообщениях были подвергнуты анализу данные литературы о влиянии активных метаболитов витамина D, главным образом 1,25-дигидроксивитамина D₃ [1,25(OH)₂D₃] на процессы пролиферации и дифференцировки активированных Т- и В-лимфоцитов, а также нормальных (нетрансформированных) клеток моноцитарно-макрофагальной системы [1, 2]. В настоящее время при всей важности подобной информации еще больший интерес (в практическом плане) представляют появляющиеся с 1981 г. материалы о способности метаболитов витамина D, в основном 1,25(OH)₂D₃, оказывать нормализующее влияние как на фенотипические, так и на функциональные характеристики клеток, трансформированных в лейкозные. При этом основным объектом исследований стали три типа клеток — клетки HL-60, впервые выделенные от больного острым миелолейкозом [17], моноцитоподобные человеческие клетки U937 и клетки мышинного миелолейкоза M1. Единичные наблюдения посвящены также роли 1,25(OH)₂D₃ при синдроме миелоплазии и влиянию гормона на некоторые другие, помимо M1, линии мышинных лейкозных клеток. В связи со сказанным представляется целесообразным изложение материала в подобной последовательности с завершающим анализом возможных механизмов нормализующего действия метаболитов витамина D на фенотип и функциональные характеристики лейкозных клеток.

Клетки HL-60. Результаты первых исследований в этой области, выполненных С. Миуага и соавт. [42], появились в 1981 г. Авторы культивировали клетки HL-60 в течение 4 дней в присутствии 1,25(OH)₂D₃ в концентрациях от 10⁻¹⁰ до 10⁻⁸ М. При этом было выявлено, что рост клеток тормозится дозо- и времязависимым образом. Наблюдались резко выраженные изменения фенотипа клеток — примерно половина из них трансформировалась из промиелоцитов в миелоциты, метамиелоциты или зрелые гранулоциты. Эти клетки были меньшего размера, у них были уменьшены соотношение между размерами ядра и цитоплазмы, а также число цитоплазматических гранул. Под влиянием 1,25(OH)₂D₃ более чем в 8 раз возрастала резко подавленная фагоцитарная активность клеток и значительно (более чем в 5 раз) увеличивалась численность С3-рецеп-

торов. В этих исследованиях другие метаболиты витамина D — 1-OH-D₃, 25-OH-D₃, 1,24S-(OH)₂D₃ и 24,25(OH)₂D₃ — оказались малоэффективными. Помимо 1,25(OH)₂D₃, позитивный эффект проявлял только 1,24S-(OH)₂D₃.

Чтобы далее не касаться вопроса о влиянии 1,25(OH)₂D₃ на фагоцитарную активность клеток HL-60, отметим, что здесь существует полная тождественность результатов целого ряда наблюдений в плане стимулирующего действия гормона на этот процесс [16, 39, 65]. Кроме того, имеются данные о том, что в цитозоле клеток HL-60 под влиянием 1,25(OH)₂D₃ появляется фактор, активирующий NADPH-оксидазу — локализованный в плазматической мембране фагоцитов фермент, участвующий в так называемом «респираторном взрыве», происходящем при активации фагоцитов. Этот фактор не является протеинкиназой С, в норме стимулирующей «взрыв»; он отсутствует в интактных клетках HL-60, не подвергавшихся контакту с 1,25(OH)₂D₃ [48].

Возвращаясь к материалам о влиянии гормона на дифференцировку клеток HL-60, следует отметить, что несколько позднее, после проведения дополнительных проверочных опытов, группа авторов, впервые описавшая этот факт [42], была вынуждена внести довольно существенные коррективы в свои первоначальные суждения. В более тщательно проведенных исследованиях подтвердились стимуляция фагоцитарной активности клеток HL-60 и увеличение числа С3-рецепторов под действием 1,25(OH)₂D₃, а также было отмечено, что последний в 40 раз усиливает восстановление нитросинего тетразолия (тест на бактерицидную активность). Вместе с тем показано, что под влиянием гормона в клетках начинает выявляться активность α-нафтилацетатэстеразы — маркерного фермента моноцитов/макрофагов и клетки активно взаимодействуют с моноклональными антителами MAS 072, специфичными в отношении антигенов моноцитов/макрофагов, но не реагируют с моноклональными антителами 067, специфичными для антигенов гранулоцитов. Таким образом, делается вывод о том, что 1,25(OH)₂D₃ способствует дифференцировке клеток HL-60 в сторону моноцитов/макрофагов, но не гранулоцитов [65]. Сходные данные, также основанные на выявлении маркерного фермента и использовании моноклональных антител к дифференцировочным антигенам моноцитов/макрофагов, были представлены и другими группами исследователей [19, 40, 52, 56]. При изучении кинетики связывания 1,25(OH)₂D₃ с рецепторами и взаимодействия гормонорецепторных комплексов с хроматином было отмечено, что эти процессы носят тот же характер, что и при использовании классических клеток-мишеней 1,25(OH)₂D₃ — клеток кишечника и парацитовидных желез [64].

Широкомасштабные исследования, посвященные изучению влияния 1,25(OH)₂D₃ на фенотипические и функциональные свойства клеток HL-60, провели D. Mangelsdorf и соавт. [39]. В этих исследованиях гормон подавлял рост клеток, вызывал их дифференцировку в сторону моноцитов/макрофагов, что определяли морфологически, стимулировал появление маркерной неспецифической эстеразной активности, вызывал у клеток

способность прикрепляться к пластику, активировал захват частиц гриба *Candida* и процесс восстановления нитросинего тетразолия. Авторы также подтвердили предварительные данные [64] о том, что влияние $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ на клетки HL-60 реализуется через внутриклеточный рецептор гормона. При более детальном изучении клеток, чувствительных к $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, и субклона нечувствительных клеток выяснилось, что одна чувствительная клетка содержит примерно 4000 молекул рецептора гормона, а нечувствительная — около 8 % от этого числа [39]. Эти данные детализировали полученные годом ранее предварительные сведения о связи чувствительности клеток HL-60 к действию $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ с количеством молекул рецептора гормона в клетках [34]. Вывод о значении количества присутствующих в клетке рецепторов $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ для эффективного действия гормона нашел подтверждение и в исследованиях других авторов [22]. Применение гормона вызывало у клеток HL-60 способность к экспрессии рецептора для IgA, что характерно для моноцитов крови, но отсутствует в норме у клеток HL-60 [38], а также стимулировало фагоцитоз эритроцитов быка, обработанных человеческим IgA [59]. При ультраструктурном морфологическом и иммунохимическом исследовании влияния $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ на клетки HL-60 и клетки больных хроническим гранулоцитарным лейкозом были получены однозначные результаты: изменение размера и формы клеточного ядра, развитие аутофагических вакуолей и появление малых гранул в цитоплазме [52].

Ряд работ посвящен влиянию $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ на эффекторные свойства клеток HL-60. При использовании разных видов клеток-мишеней показано, что под влиянием гормона антителозависимая цитотоксичность клеток, в норме практически не определяющаяся, достигает показателей, характерных для нормальных моноцитов человеческой крови [16, 21, 56, 66]. Более детальное изучение этого вопроса показало наличие у всех клеток с высокой цитотоксической активностью антигена зрелых моноцитов Leu M3 [16].

Все исследования, результаты которых приведены выше, выполнены в условиях внесения в культуру клеток в качестве питательного агента сыворотки, как правило телячьей эмбриональной. Однако при проведении экспериментов в условиях отсутствия сыворотки в культуре влияние $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ на такие показатели дифференцировки клеток HL-60, как хемилюминесценция и лизоцимная активность, существенно (в среднем в 5 раз) усиливалось, хотя число клеточных рецепторов гормона не изменялось [36]. Эти данные находятся в полном соответствии с полученными в последнее время материалами о том, что в среде, содержащей витамин-D-связывающий белок, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ менее активно тормозит стимулированный митогенами blastogenesis лимфоцитов, чем в среде без этого белка [67]. Поскольку любая сыворотка содержит примеси витамин-D-связывающего белка, логично согласиться с мнением [67], что этот белок связывает какую-то часть молекул гормона, что, естественно, ослабляет биологические эффекты последнего.

При изучении особенностей ингибирующего действия $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ на процессы пролиферации

клеток HL-60 было установлено, что гормон не оказывает действия немедленно, для этого требуется в среднем 4 дня. При этом наблюдаются резкое увеличение числа клеток, находящихся в фазе G_1/G_0 клеточного цикла и уменьшение числа клеток в фазе S [18, 19, 22]. Дальнейший анализ механизмов действия гормона на дифференцировку клеток HL-60 показал, что он подавляет ДНК-зависимую РНК-полимеразную активность и соответственно снижает активность РНК-полимеразы II, тогда как другие метаболиты витамина D — $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ и 1-OHD_3 — не влияют на процессы транскрипции, что коррелирует с их неспособностью тормозить пролиферацию и влиять на способность к дифференцировке клеток HL-60 в сторону моноцитов/макрофагов [12]. Этим данным соответствуют материалы, свидетельствующие, что $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ регулирует процесс транскрипции фактора некроза опухоли (ФНО) [61]. Этот фактор, обнаруживаемый в сыворотке животных после введения эндотоксина, обладает цитостатическими свойствами в отношении различных типов опухолевых клеток [15]. К обсуждаемым вопросам ФНО имеет то отношение, что потенцирует действие гормона на клетки HL-60, о чем свидетельствуют результаты изучения морфологических, биохимических и функциональных характеристик клеток [33, 66, 69]. ФНО реализует свое действие через собственный рецептор, имеющийся у клеток HL-60 [69]. Из других агентов, помимо ФНО, потенцирующих влияние $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, наиболее широко изучен интерферон- γ (ИФН- γ), который оказывает регуляторное действие на дифференцировку и антителозависимую цитотоксичность клеток HL-60 совместно не только с $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, но и с ФНО [66, 69]. Кроме того, было показано, что под влиянием $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ клетки HL-60 приобретают способность к экспрессии антигенов главного комплекса гистосовместимости типа I; ИФН- γ также потенцирует подобный эффект гормона [8].

В последнее время появляются интересные данные о влиянии гормона на экспрессию клетками HL-60 различных онкогенов. Следует отметить, что вопрос о роли последних еще далек от окончательного решения. Так, в клетках некоторых видов опухолей экспрессия онкогенов усилена. В то же время появление отдельных онкогенов свидетельствует о происходящем процессе дифференцировки клеток некоторых типов [35]. Установлено, что в процессе дифференцировки клеток HL-60 экспрессия с-тус онкогена подавляется, что параллельно сопровождается торможением в клетках синтеза ДНК, и отменяется при удалении $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ из среды [9, 14, 33, 53, 63]. В связи с этим представляют интерес данные о том, что ингибиторы синтеза ДНК выражено усиливают дифференцировку клеток HL-60, индуцированную гормоном [32], т. е. создается впечатление, что подавление синтеза ДНК является необходимым моментом для дифференцировки клеток HL-60. Подавление экспрессии с-тус онкогена можно признать позитивным фактом в свете данных о том, что усиленная экспрессия с-тус характерна для широкого спектра опухолей различной природы и для малодифференцированных клеток [35]. Экспрессия других онкогенов (с-fos, с-fms) под влиянием $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ усили-

вается, что коррелирует с активной дифференцировкой клеток HL-60 в моноцитоподобные клетки, тогда как удаление из среды гормона одновременно отменяет дифференцировку клеток и снижает уровень транскрипции мРНК *c-fos* и *c-fms* онкогенов [63]. Эти факты позволяют исследователям сделать вывод, что появление указанных онкогенов служит признаком дифференцировки клеток в моноцитарно-макрофагальном направлении. Этот вывод подтверждается, в частности, данными об экспрессии *c-fos* предшественниками моноцитов в костном мозге [45].

Мало изучен вопрос о роли кальция в реализации влияния $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ на процессы пролиферации и дифференцировки клеток HL-60. Вовлеченность кальция в этот процесс недавно была установлена в эксперименте [37]. В то же время имеются данные о том, что под влиянием гормона снижаются кальцийсвязывающая активность клеток HL-60 и содержание в них кальмодулина. Как в интактных, так и в обработанных $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ клетках отсутствует кальцийсвязывающий белок с молекулярной массой 28 000, опосредующий транспорт кальция в клетках некоторых типов [13].

Из других свойств $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ следует отметить его способность вызывать у клеток HL-60 экспрессию рецепторов для лейкотриена B_4 — мощного хемотаксического фактора [23], а также продуцировать тромбоксан B_2 и простагландин E_2 [28], что, как известно [11], характерно для человеческих моноцитов и макрофагов.

В настоящее время ведутся интенсивные исследования по созданию различных производных естественных метаболитов витамина D с целью получения препаратов, обладающих большей, чем $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, активностью в отношении влияния на пролиферацию и дифференцировку лейкозных клеток. Так, были синтезированы 30 аналогов $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, большинство из них обладали слабой активностью, однако 24- и 26-гомо- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ и их 22-дегидроаналоги по таким тестам, как фагоцитоз, восстановление нитросинего тетразолия и активность эстеразы, показали примерно в 10 раз большую активность, чем $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. При более детальном исследовании выявился довольно примечательный факт: несмотря на такую высокую активность полученные препараты имели ту же аффинность к рецептору $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, что и сам гормон [51]. Два фторированных аналога гормона также в 10 раз превосходили активность $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ по способности изменять морфологию клеток HL-60 в сторону моноцитов/макрофагов и усиливать активность эстеразы и восстановление нитросинего тетразолия [31]. При этом аффинность фторированных аналогов гормона в отношении рецептора $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ соответствовала таковой для самого гормона. Недавно получены два препарата — 26, 27-диэтил- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ и 24,24- F_2 -24-гомо- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, которые также примерно в 10 раз активнее $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (на модели торможения пролиферации клеток HL-60), но практически не обладают D-витаминной активностью, что было определено по основным биохимическим показателям [30]. В плане использования метаболитов витамина D в клинической практике последнее обстоятельство представляется весьма важным.

К л е т к и U937. Первые наблюдения в этом на-

правлении появились в 1983 г., когда две группы исследователей независимо друг от друга показали, что $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ резко (до полной остановки) подавляет пролиферацию клеток и меняет фенотип, который при морфологическом анализе приобретает характерные черты моноцитов/макрофагов [20, 49]. Клетки начинают также более интенсивно восстанавливать нитросиний тетразолий, у них возрастает фагоцитарная активность. Для индукции дифференцировки, вызываемой гормоном, уровень синтеза ДНК клетками не играет роли, тогда как агенты, тормозящие синтез как РНК, так и белка, препятствуют дифференцировке. При добавлении к культуре клеток гормон взаимодействует со своим внутриклеточным рецептором, однако этот процесс, по-видимому, не является необходимым для дифференцировки, поскольку один из клонов клеток U937, имевший внутриклеточные рецепторы $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, не реагировал на гормон в направлении дифференцировки. В то же время следует отметить, что концентрация рецепторов $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ в цитозоле резистентных к гормону клеток была существенно ниже, чем у чувствительного клона [49]. Выполненные позднее исследования отличались сходной направленностью. Так, было подтверждено торможение пролиферации клеток под влиянием гормона [6, 41, 55]. Как было отмечено при использовании моноклональных антител, число клеток, несущих антигены моноцитов/макрофагов, под влиянием $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ возрастало с 5 до 77 %, также происходили усиление экспрессии антигенов главного комплекса гистосовместимости типа I [55], активация процессов фагоцитоза [41, 55], экспрессия Fc- и C3-рецепторов, появление у клеток адгезивных свойств и значительной активности α -нафтилацетатэстеразы [6, 41, 55]. Гормон усиливал также проявления реакции хемилюминесценции клеток [26]. Под влиянием $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ у клеток появлялась выраженная антителозависимая цитотоксичность, в норме практически отсутствующая [21, 55, 66]. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ потенцировал продукцию клетками U937 моноцитарного монокина, индуцированную лимфокином, выделяющимся при активации Т-лимфоцитов [6].

Ряд наблюдений посвящен анализу действия различных агентов, потенцирующих биологические эффекты гормона в отношении клеток U937. Как и в экспериментах с клетками HL-60, ИФН- γ и ФНО усиливали способность $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ вызывать экспрессию клетками U937 антигенов моноцитов/макрофагов и стимулировать антителозависимую цитотоксичность, причем максимальный эффект достигался при сочетанном действии всех трех агентов, ИФН- γ также потенцировал действие гормона в отношении стимуляции клетками экспрессии Fc-рецептора [66]. Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор в норме практически не способствовал экспрессии клетками U937 моноцитарных антигенов, однако резко усиливал этот процесс, индуцируемый $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Оба эти агента поодиночке слабо влияли на хемотаксис клеток, однако их сочетанное применение выражено активировало этот процесс. Аналогичный эффект был получен при изучении фагоцитоза эритроцитов, обработанных антителами [71]. В случае, когда торможение роста и пролиферации клеток U937 вызывали с по-

мощью форболового эфира, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ отчетливо усиливал его эффекты, как и потенцировал усиление адгезивных свойств клеток. Поскольку форболовый эфир ряд своих биологических эффектов реализует путем активации протеинкиназы С, исследовали, как влияет на этот процесс $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, и установили его активирующее действие [68].

При стимуляции продукции клетками U937 цАМФ изопроterenолом, форсколином или простагландином E_2 продукция цАМФ в присутствии $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ снижается в 2,5—3 раза. Механизм этого снижения остается неясным [25, 58].

Так же, как и при использовании клеток HL-60, в бессывороточной среде гормон оказывает значительно более выраженное влияние на процессы пролиферации и дифференцировки, чем при добавлении в среду сыворотки [6].

При рассмотрении влияния гормона на некоторые другие функциональные свойства клеток U937 показано, в частности, что он способствует продукции клетками O_2^- , активируя действие форболмиристатацетата и опсонизированного зимозана, которые в норме не способны оказывать подобное воздействие. При этом гормон сам по себе также не был способен вызывать продукцию O_2^- [57]. При использовании иного методического теста — определения активности хемилюминесценции клеток U937 индуцированной форболмиристатацетатом, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ давал потенцирующий эффект, но лишь в присутствии среды, полученной при активации Т-лимфоцитов, т. е. в присутствии лимфокина(ов) [60]. Наконец, необходимо коснуться данных о роли кальция в реализации биологических эффектов $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ в отношении клеток U937. Процессы клеточной дифференцировки, происходящие под влиянием гормона, тормозятся при использовании кальциевого ионофора A23187 [49]. Как недостаток, так и избыток кальция в среде неблагоприятно сказываются на способности гормона влиять на дифференцировку клеток U937 [7].

В отдельных работах исследовали действие на процессы клеточной пролиферации и дифференцировки других, помимо $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, метаболитов витамина D_3 — $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, 25-OHD_3 , $25,26(\text{OH})_2\text{D}_3$, которые оказались в десятки и сотни раз менее активными, чем $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [49, 58, 68]. В то же время недавно синтезированный новый аналог $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ — M6903 — был примерно в 2 раза более активным исходным соединением, чем $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, в плане торможения пролиферации клеток и обладал примерно такой же, как гормон, способностью индуцировать дифференцировку клеток. Важно, что его кальциемическая активность, выявляемая по способности вызывать гиперкальцемию, гиперкальцемию и мобилизацию кальция из костей, была примерно в 100 раз ниже, чем у $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [10].

Целесообразно также коснуться немногочисленных данных о применении $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ при синдроме миелодисплазии, который является предшественником острого миелолейкоза. При культивировании костномозговых клеток лиц, страдающих синдромом миелодисплазии, в присутствии $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ наблюдали их дифференцировку в сторону зрелых моноцитов/макрофагов, что выяв-

ляли как морфологически, так и с помощью соответствующих моноклональных антител. У клеток выявлялась неспецифическая эстеразная активность, а фагоцитоз возрастал до нормальных показателей [46, 57]. Однако предварительные клинические наблюдения, проведенные, правда, всего у 7 больных с синдромом миелодисплазии, не дали существенных результатов [54].

Клетки M1. В 1981 г. было показано, что добавление $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ к культуре клеток мышинного миелолейкоза M1 вызывало торможение роста и пролиферации клеток, которые параллельно с этим приобретали адгезивные свойства, в них резко возрастала активность лизоцима (типичный маркерный фермент дифференцированных макрофагов), а также фагоцитарная активность. При этом параллельно происходила интенсивная экспрессия Fc- и C3-рецепторов [5]. Все это указывало на дифференцировку клеток в сторону макрофагов. Позднее подобные эксперименты были проведены в условиях *in vivo*. При перевивке мышам клеток M1 животные погибали в 100 % случаев, при этом продолжительность жизни в контроле составляла в среднем 23 дня, а у мышей, получавших 3 раза в неделю $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ или 1-OHD_3 , соответственно 34 и 39 дней. При использовании бестимусных мышей *pude* были получены еще более обнадеживающие результаты: через 70 дней после перевивки лейкозных клеток 40 % мышей, получавших метаболит витамина D_3 , еще оставались в живых [29]. Эти эффекты могли иметь двойную природу, реализуясь за счет как влияния гормона на процессы пролиферации и дифференцировки клеток M1, так и усиления эффекторных свойств макрофагов, что могло приводить к уничтожению части лейкозных клеток. При изучении влияния кальция на пролиферацию и дифференцировку клеток M1, индуцированную $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, было отмечено, что кальций связан с реализацией действия гормона на процессы роста, но не дифференцировки клеток [43].

В литературе имеются также единичные наблюдения о влиянии $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ на другие, помимо M1, линии лейкозных мышинных клеток. Гормон, мало влияя на пролиферацию макрофагоподобной линии лейкозных клеток P388D1, тем не менее выраженно стимулировал их фагоцитарную активность, адгезивные свойства и способность связываться с неопсонизированными эритроцитами [24]. Клетки WENI-3 (мышинный миелолейкоз) под влиянием гормона тормозили свою пролиферацию. При этом увеличивалось число клеток, находившихся в фазе G_0/G_1 , и уменьшалось число клеток в фазе S. Клетки начинали экспрессировать поверхностные антигены моноцитов/макрофагов, приобретали способность к фагоцитозу, восстановлению нитросинего тетразолия и проявляли неспецифическую эстеразную активность [4]. В присутствии ИФН- γ биологические эффекты $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ в отношении клеток WENI-3 усиливаются, в частности гормон потенцирует индуцируемую ИФН- γ экспрессию комплекса антигенов класса II главного комплекса гистосовместимости [44].

Подводя некоторые итоги, следует отметить, что результаты практически всех исследований, приведенные выше, носят одноплановый характер

и подтверждают друг друга. Сейчас можно признать доказанным, что клетки миелолейкоза, а также макрофагоподобные трансформированные клетки человека и мыши под влиянием $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ подвергаются целому ряду изменений. Во-первых, тормозятся их активный рост и пролиферация. Во-вторых, они интенсивно дифференцируются в сторону клеток моноцитарно-макрофагального ряда. Это обстоятельство доказано при использовании целого ряда методов — морфологических, иммунологических (выявление с помощью моноклональных антител антигенов зрелых моноцитов/макрофагов), биохимических (появление или возрастание активности маркерных ферментов лизоцима и неспецифической эстеразы). Наконец, у клеток появляются исходно отсутствующие способности к адгезии, фагоцитозу, антителозависимой клеточной цитотоксичности, экспрессии Fc- и C3-рецепторов и т. д. Все это однозначно свидетельствует об их дифференцировке в направлении зрелых моноцитов/макрофагов.

Каковы возможные механизмы, лежащие в основе подобных изменений? В первую очередь следует обратить внимание на полученные рядом исследователей данные, свидетельствующие, что инициальным моментом, обуславливающим воздействие $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ на фенотипические и функциональные свойства лейкозных клеток, является взаимодействие гормона со своим внутриклеточным рецептором, находящимся в данных клетках. Поскольку в настоящее время установлено, что все свои основные биологические эффекты $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ реализует путем взаимодействия с рецептором с последующим влиянием на геном клетки, нет оснований сомневаться в том, что подобный механизм также имеет место. Вызывает интерес другой вопрос: является ли подобный механизм единственным? Прямых данных в этом плане нет, но некоторые косвенные доказательства способны поставить положительный ответ на этот вопрос под сомнение. Так, известно, что биологические эффекты метаболитов витамина D проявляются тем сильнее, чем выше их аффинность в отношении рецептора $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Таких примеров в литературе накоплено достаточно много [3, 27]. Однако некоторые материалы, рассмотренные выше, свидетельствуют, что ряд недавно синтезированных аналогов $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ обладают идентичной с ним аффинностью в отношении рецептора, однако во много раз более эффективны в плане воздействия на процессы пролиферации и дифференцировки лейкозных клеток [10, 30, 31]. В связи с этим возникает предположение о другом, помимо опосредуемого через рецептор, механизме действия этих препаратов, однако конкретные характеристики этого механизма неизвестны, что делает в настоящее время некорректными какие-либо предположения. Что касается кальция, то $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ не только регулирует его внутриклеточный обмен, но и действует на быстрые потоки кальция в клетку. Однако кальций, являясь вторичным посредником, и без того в норме имеет отношение к большинству клеточных функций и реакций, происходящих в клетке.

Еще один момент, привлекающий внимание, связан с дозами $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, вызывающими антипролиферативный и дифференцировочный эффект.

Большинство исследователей ограничивались применением гормона в концентрации 10^{-7} — 10^{-8} М. Однако в тех работах, где $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ использовался в физиологических, имеющих место в условиях *in vivo* концентрациях, также были получены положительные результаты [5, 41, 55]. В связи с этим хочется коснуться данных [70], которые не привлекли широкого внимания. Авторы, обследуя 17 больных с различными видами лейкозов, обнаружили у них достоверное снижение уровня $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ в сыворотке. Закономерность сохранялась и при удалении из группы обследованных лиц старше 50 лет с целью исключить возрастные изменения уровня гормона. При этом содержание в крови больных $24,24(\text{OH})_2\text{D}_3$ и 25-OHD_3 не было существенно изменено. Неизвестно (но в будущем это может выясниться), первичный или вторичный характер носит снижение уровня гормона при лейкозах. Если это снижение предшествует развитию лейкоза, тогда становится очевидным, что гормональная система витамина D, вероятно через $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, является системой контроля за состоянием фенотипа и функциональной активности находящихся в циркуляции клеток, а также, вполне вероятно, клеток костного мозга.

Данные литературы указывают также на важную роль метаболитов витамина D, в первую очередь $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, в контроле за пролиферацией и дифференцировкой опухолевых клеток различных типов, в частности раковых клеток (как известно, раком называются опухоли эпителиального происхождения). Подобные материалы будут представлены в следующем сообщении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Плещитый К. Д. // *Вопр. мед. химии*.— 1988.— № 5.— С. 4—9.
2. Плещитый К. Д. // *Там же*.— 1990.— № 3.— С. 5.
3. Сергеев И. И. // *Там же*.— 1989.— № 1.— С. 2—11.
4. Abe J., Moriya Y., Saito M. et al. // *Cancer Res.*— 1986.— Vol. 46.— P. 6316—6321.
5. Abe E., Miyaura C., Sakagami H. et al. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.*— 1981.— Vol. 78.— P. 4990—4994.
6. Amento E. P., Bhalla A. K., Kumick J. T. et al. // *J. clin. Invest.*— 1984.— Vol. 73.— P. 731—739.
7. Atsumi Y., Dodd R. C., Gray T. K. // *Amer. J. med. Res.*— 1985.— Vol. 2891.— P. 47—50.
8. Ball E. D., Guyre P. M., Glynn J. M. et al. // *J. Immunol.*— 1984.— Vol. 132.— P. 2424—2428.
9. Bar-Shavit Z., Kahn A. J., Stone K. R. et al. // *Endocrinology.*— 1986.— Vol. 118.— P. 679—686.
10. Binderup L., Brumm E. // *Biochem. Pharmacol.*— 1988.— Vol. 37.— P. 889—895.
11. Bockman R. S. // *Prostaglandins.*— 1981.— Vol. 21.— P. 9—31.
12. Bresnik E. H., Simpson R. U. // *Cancer Res.*— 1986.— Vol. 46.— P. 4979—4983.
13. Brevli Z. S., Christakos S., Studzinski G. P. // *Lab. Invest.*— 1986.— Vol. 55.— P. 269—275.
14. Brevli Z. S., Studzinski G. P. // *J. Cell. Physiol.*— 1986.— Vol. 128.— P. 171—179.
15. Carswell E. A., Old L. J., Kassel R. L. et al. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.*— 1975.— Vol. 72.— P. 3666—3670.
16. Chini L., Fattorossi A., Galli A. et al. // *Biol. Ist. sieroter. Milan.*— 1987.— Vol. 66.— P. 222—227.
17. Collins S. J., Gallo R. C., Gallagher R. E. // *Nature.*— 1977.— Vol. 270.— P. 347—349.
18. Daniel C. P., Parreira A., Goldman J. M., McCarthy D. M. // *Leuk. Res.*— 1987.— Vol. 11.— P. 191—196.
19. Djubegovic B., Christmas S. E., Evans G., Moore M. // *Biomed. Pharmacother.*— 1986.— Vol. 40.— P. 407—416.
20. Dodd R. C., Cohen M. S., Newman S. L., Gray T. K. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.*— 1983.— Vol. 80.— P. 7538—7541.

21. *Espevik T.* // Scand. J. Immunol.— 1985.— Vol. 22.— P. 105—109.
22. *Freake H. C., Iwasaki J., McCarthy D. M.*— 1984.— Vol. 44.— P. 3827—3831.
23. *Goldman D. W., Olson D. M., Payan D. G.* et al. // J. Immunol.— 1986.— Vol. 136.— P. 4631—4636.
24. *Goldman R.* // Cancer Res.— 1984.— Vol. 44.— P. 11—15.
25. *Goldring S. R., Amento E. P., Roelke M. S., Krane S. M.* // J. Immunol.— 1986.— Vol. 136.— P. 3461—3466.
26. *Gray T. K., Cohen M. S.* // Surv. Immunol. Res.— 1985.— Vol. 4.— P. 200—212.
27. *Haussler M. R.* // Ann. Rev. Nutr.— 1986.— Vol. 6.— P. 527—562.
28. *Honda A., Morita I., Murota S., Mori Y.* // Biochim. biophys. Acta.— 1986.— Vol. 877.— P. 423—432.
29. *Honma Y., Hozumi M., Abe E.* et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1983.— Vol. 80.— P. 291—294.
30. *Ikekawa N., Eguchi T., Hara N.* et al. // Chem. pharm. Bull. (Tokyo).— 1987.— Vol. 35.— P. 4362—4365.
31. *Inaba M., Okuno S., Nishizawa Y.* et al. // Arch. Biochem.— 1987.— Vol. 258.— P. 421—425.
32. *Ishikura H., Okazaki T., Mochizuki T.* et al. // Exp. Hemat.— 1985.— Vol. 13.— P. 981—988.
33. *Katakami Y., Nakao Y., Katakami N.* et al. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1988.— Vol. 152.— P. 1151—1157.
34. *Kuriyagashi T., Tanaka H., Abe E., Suda T.* // Endocrinology.— 1983.— Vol. 113.— P. 1992—1998.
35. *Lebovitz R. M.* // Lab. Invest.— 1986.— Vol. 55.— P. 249—251.
36. *Lee Y., Dunlop B. E., Melton W. S.* // Biochem. Pharmacol.— 1987.— Vol. 36.— P. 3893—3901.
37. *Levy R., Nathan I., Barnea E.* et al. // Exp. Hemat.— 1988.— Vol. 16.— P. 290—294.
38. *Maliszewski C. R., Shen L., Fanger M. W.* // J. Immunol.— 1985.— Vol. 135.— P. 3878—3881.
39. *Mangelsdorf D. J., Koeffler H. P., Donaldson C. A.* et al. // J. Cell. Biol.— 1984.— Vol. 98.— P. 391—398.
40. *McCarthy D. M., San Miguel J. F., Freake H. C.* et al. // Leuk. Res.— 1986.— Vol. 7.— P. 51—55.
41. *Mezzetti G., Bagnara G., Monti M. G.* et al. // Life Sci.— 1984.— Vol. 34.— P. 2185—2191.
42. *Miyaura C., Abe E., Kuriyagashi T.* et al. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1981.— Vol. 102.— P. 937—943.
43. *Miyaura C., Abe E., Suda T.* // Endocrinology.— 1984.— Vol. 115.— P. 1891—1896.
44. *Morel P. A., Manolagas S. C., Provvedini D. M.* et al. // J. Immunol.— 1986.— Vol. 136.— P. 2181—2186.
45. *Muller R.* // Trends biochem. Sci.— 1986.— Vol. 11.— P. 129—136.
46. *Nagler A., Ricklis I., Gazit E.* et al. // Europ. J. clin. Invest.— 1986.— Vol. 16.— P. 297—301.
47. *Nagler A., Ricklis I., Tataru I., Fabian I.* // J. lab. clin. Med.— 1987.— Vol. 110.— P. 237—244.
48. *Nozawa R., Kato H., Yokota T.* // J. Biochem. (Tokyo).— 1988.— Vol. 103.— P. 43—47.
49. *Olsson L., Gullberg U., Ivhed I., Nilsson K.* // Cancer Res.— 1983.— Vol. 43.— P. 5862—5867.
50. *Ostrom V. K., Lau W. F., Lee S. H.* et al. // J. biol. Chem.— 1987.— Vol. 262.— P. 14164—14171.
51. *Ostrom V. K., Tanaka Y., Prahl J.* et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1987.— Vol. 84.— P. 2610—2614.
52. *Polli N., O'Brien M., Tavares de Castro J.* et al. // Leuk. Res.— 1985.— Vol. 9.— P. 259—270.
53. *Reitsma P. H., Rothberg P. G., Astrin S. M.* et al. // Nature.— 1983.— Vol. 306.— P. 492—494.
54. *Richard C., Mazo E., Cuadrado M. A.* et al. // Amer. J. Hemat.— 19.— Vol. 23.— P. 175—178.
55. *Rigby W. F. C., Shen L., Ball E. D.* et al. // Blood.— 1984.— Vol. 65.— P. 1110—1115.
56. *Rigby W. F. C., Shen L., Ball E. D., Fanger M. W.* // Molec. Immunol.— 1985.— Vol. 22.— P. 567—572.
57. *Roux-Lombard P., Cruchaud A., Dayer J.-M.* // Cell. Immunol.— 1986.— Vol. 97.— P. 286—296.
58. *Rubin J. E., Catherwood B. D.* // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1984.— Vol. 123.— P. 210—215.
59. *Shen L., Maliszewski C. R., Rigby W. F. C.* // Molec. Immunol.— 1986.— Vol. 23.— P. 611—618.
60. *Snipes R. G., Ways K., D'Amico C. N.* et al. // Blood.— 1987.— Vol. 70.— P. 1639—1644.
61. *Steffen M., Cayre Y., Manogue K. R., Moore M. A. S.* // Immunology.— 1988.— Vol. 63.— P. 43—46.
62. *Studzinski G. P., Bhandal A. K., Brevli Z. S.* // Cancer Res.— 1985.— Vol. 45.— P. 3898—3905.
63. *Studzinski G. P., Brevli Z. S.* // J. nat. Cancer Inst.— 1987.— Vol. 79.— P. 67—76.
64. *Tanaka H., Abe E., Miyaura C.* et al. // Biochem. J.— 1982.— Vol. 204.— P. 713—719.
65. *Tanaka H., Abe E., Miyaura C.* et al. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1983.— Vol. 117.— P. 86—92.
66. *Trinchieri G., Rosen M., Perussia B.* // Cancer Res.— 1987.— Vol. 47.— P. 2236—2242.
67. *Vanham G., Van Baelen H., Bouillon R.* // J. Steroid Biochem.— 1988.— Vol. 29.— P. 381—386.
68. *Ways D. K., Dodd R. C., Bennett T. E.* et al. // Endocrinology.— 1987.— Vol. 121.— P. 1654—1661.
69. *Weinberg J. B., Larrick J. W.* // Blood.— 1987.— Vol. 70.— P. 994—1002.
70. *Wong P., Nakamura H., Endoh N.* et al. // Brit. J. Haemat.— 1986.— Vol. 64.— P. 844—846.
71. *Zuckerman S. H., Surprenant Y. M., Tang J.* // Blood.— 1988.— Vol. 71.— P. 619—624.

Поступила 16.01.90

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.514-039.35-092:616.98:578.825.1]-07:[616.153.1:616.154:578.245

И. А. Суетина, Т. М. Соколова, О. И. Белостоцкая,
Л. А. Лаврухина, Ф. И. Ершов

УРОВНИ ИНТЕРФЕРОНЗАВИСИМЫХ ФЕРМЕНТОВ У БОЛЬНЫХ КРАПИВНИЦЕЙ, СВЯЗАННОЙ С ЧАСТЫМИ ВИРУСНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ

Институт вирусологии им. Д. И. Иванова АМН СССР, Москва

Взаимодействие интерферонов с клетками вызывает в них индукцию синтеза ряда белков, в частности 2', 5' олигоаденилат синтетазы (2-5А синтетаза) и специфической дсРНК-зависимой протеинкиназы. Активация обоих ферментов в большинстве случаев коррелирует с развитием в клетках антивирусного состояния и обуславливает антипролиферативное действие интерферонов [10]. Исследования уровней ферментов в пробах крови показали, что 2-5А синтетаза и дсРНК-зависимая протеинкиназа являются удобными маркерами циркулирующего в крови (сывороточного) интерферона [7, 14]. При многих вирусных инфекциях наблюдается кратковременное повышение уровня сывороточного интерферона и более стабильное — уровней индуцируемых ферментов. При аутоиммунных заболеваниях высокий уровень циркулирующего интерферона и высокий уровень активности 2-5А синтетазы расцениваются как плохой прогностический признак [15, 16]. В настоящее время в клинических исследованиях по интерферонотерапии методики определения интерферонзависимых ферментов широко применяются для оценки эффективности действия интерферонов и при разработке схем их применения [11, 12, 14]. Подобные исследования по ферментам системы интерферона у больных аллергической крапивницей с частыми острыми респираторными вирусными инфекциями (ОРВИ) и герпесом ранее не проводились.

Учитывая эффективность применения рекомбинантного α_2 -интерферона (реаферона) при ОРВИ и герпесе [2, 3, 9], также было важно изучить действие реаферона у часто болеющих этими вирусными инфекциями больных с крапивницей и ангионевротическими отеками.

Методика. В исследованиях были использованы пробы венозной крови, взятой с добавлением гепарина у 13 здоровых

доноров и 27 больных рецидивирующей крапивницей и ангионевротическими отеками, сопровождающимися частыми ОРВИ и герпесом (от 1—2 раз в месяц до 5—6 раз в год) с длительностью заболевания от 1 года до 17 лет. Курс реаферона проведен 10 пациентам.

Реоферон вводили внутримышечно по 10^6 единиц через день в течение 5 дней. Кровь отстаивали 1 ч в холодильнике, отбрасывали плазму в пластиковые микропробирки, добавляли ингибитор протеаз контрикал (100 ед/мл) и замораживали при -65°C . Выделение лимфоцитов из крови осуществляли известным методом фракционирования в градиенте фикола с плотностью $1,08\text{ г/см}^3$ при 1000 г в течение 20 мин. Лимфоциты отмывали в $0,14\text{ М}$ растворе NaCl 2 раза, подсчитывали в камере Горяева и замораживали в виде осадка при -65°C . Тестирование протеинкиназной активности и 2-5А-синтетазы проводили по известным методикам [7, 14] с небольшими модификациями. В одном опыте параллельно определяли активности ферментов у больных и доноров, сравнивая их между собой.

Для оценки активности специфической дсРНК-зависимой протеинкиназы в плазме определяли уровень фосфорилирования экзогенных гистонов, так как ранее было показано, что гистоны являются приоритетным субстратом специфической киназы, которая в присутствии гистонов аутофосфорилируется [7]. К аликвоте плазмы 5 мкл добавляли 45 мкл буфера синтеза, содержащего 50 мМ KCl , 5 мМ MnCl_2 , $2,5\text{ мМ MgAc}_2$, $7\text{ мМ } \beta$ -меркаптоэтанол (МЕ), 4 мг/мл гистонов (суммарная фракция), 15% глицерина, $40\text{—}80\text{ КБк } 5'\text{-}\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-АТФ}$ (более 37 ПБк/М «Радиофармацевт» ИЯФ АН Узбекской ССР). Инкубировали 1 ч при 33°C . Фосфорилированные гистоны сорбировали на фильтры из хроматографической бумаги ЗММ, отмывали в 10% ТХУ с $0,5\text{ мМ АТФ}$ и ацетоне. Радиоактивность подсчитывали в толуоловом сцинтилляторе, содержащем РРО 5 г/л и РОРОР $0,1\text{ г/л}$ на счетчике «Интертекник» (Франция). Активность фермента выражали в пикомолях на количество гистонов в пробе.

Активность 2-5А-синтетазы измеряли в экстрактах очищенных лимфоцитов периферической крови. Осадок лимфоцитов лизировали в буфере с $0,5\%$ понидет П-40, содержащем 50 мМ KCl , $2,5\text{ мМ MgAc}_2$, $7\text{ мМ } \beta$ МЕ, 20 мМ трис-HCl pH 7,4, 10% глицерина (на 10^6 клеток 50 мкл буфера лизиса). К аликвоте 5 мкл экстракта лимфоцитов добавляли 45 мкл буфера синтеза, состоящего из 100 мМ KCl , 25 мМ MgAc_2 , 20 мМ трис-HCl pH 7,4, $7\text{ мМ } \beta$ МЕ, $10\text{ мМ креатинфосфата}$, 200 мкг/мл креатинфосфокиназы (25 МЕ/мг креатина «Калбиохем», 75 мкг/мл поли И-поли Ц, 1 мМ АТФ и $40\text{—}80\text{ КБк } \alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-АТФ}$ (37 ПБк/М , «Радиофармацевт» ИЯФ АН Узбекской ССР). Инкубировали 16 ч при 33°C . Затем к пробам добавляли 1 ед. щелочной фосфатазы на 1 ч при 37°C и аликвоты проб 2 мкл наносили на пластины ПЕИ-целлюлозы («Мерк», США). Тонкослойную хроматографию проводили в 1 М уксусной кислоте, при этом наблюдали хорошее отделение 2-5А-олигонуклеотидов от свободного фосфора. Качественную оценку синтезированного 2-5А-олигонуклеотида проводили визуально автордиографией пластин с рентгеновской пленкой. Пятна с подвижностью димера АрА или тримера АрАрА ссабливали и подсчитывали радиоактивность в толуоловом сцинтилляторе (состав сцинтиллятора и счетчик указаны выше). Результаты выражали в пикомолях АТФ, превращенного в 2-5А экстрактом 10^5 лимфоцитов.

Титрование сыровоточного интерферона осуществляли в монотесте фибробластов человека (линия М19) по задержке цитопатического действия вируса везикулярного стоматита (ВВС) микрометодом [8]. Интерфероновую реакцию лимфоцитов (ИРЛ) определяли *in vitro* [6]. К суспензии лимфоцитов (1 млн клеток в мл), очищенных в градиенте фикола и разведенных в среде Игла с 10% сыровотки доноров IV группы, добавляли $0,1\text{ мл}$ вируса болезни Ньюкасла $10\text{—}100\text{ БОЕ/кл}$ (индукция α -интерферона) или $0,1\text{ мл}$ фитогемагглютинаина 20 мкг (индукция γ -интерферона). Лейкоцитарный интерферон собирали через 24 ч инкубации при 37°C , вирус инактивировали HCl при pH 2,0 в течение 3—5 сут, нейтрализовали средой добавлением NaOH до pH 7,0. Оба типа интерферонов титровали микрометодом на диплоидных клетках человека (фибробласты линии М19) по подавлению цитопатического действия ВВС [8].

Результаты и их обсуждение. Больных с рецидивирующей крапивницей и ангионевротическими отеками обследовали в периоды ремиссии и обострения. Обострение аллергического заболевания часто возникало на фоне вирусных инфекций, которые диагностировали по клиническим проявлениям и данным иммунофлюоресценции как ОРВИ, герпес простой или сочетание ОРВИ и герпеса. Частота и длительность сочетанного возникновения аллергического и вирусного заболеваний давали основание рассматривать их в этиологической взаимосвязи.

В настоящей работе впервые определены уровни интерферонзависимых ферментов у такой категории больных и проанализирована их связь с циркулирующим интерфероном и способностью лейкоцитов и лимфоцитов к продукции интерферона (ИРЛ) *in vitro*. В табл. 1 суммированы результаты определения активности 2-5А-синтетазы, протеинкиназы, фосфорилирующей гистоны, и циркулирующего интерферона у больных рецидивирующей крапивницей и ангионевротическими отеками и здоровых доноров. В целом для обследованной категории больных характерны повышенные уровни циркулирующего интерферона и интерферонзависимых ферментов. Приrost активностей ферментов в фазе ремиссии больше, чем в фазе обострения. Уровни 2-5А-синтетазы в лимфоцитах больных с частыми ОРВИ и сочетании ОРВИ с герпесом достоверно выше уровня фермента у здоровых доноров ($p > 95\%$). Протеинкиназная активность плазмы больных достоверно превышает уровень здоровых доноров как в ремиссии, так и в обострении заболевания. При данном

Таблица 1

Уровни циркулирующего интерферона и интерферонзависимых ферментов у больных крапивницей и ангионевротическими отеками, сопровождающимися частыми ОРВИ и герпесом

Фаза заболевания	Вирусная инфекция	Число обследованных	Сывороточный интерферон, ед/мл	2-5А-синтетаза пкМ/ 10^5 кл	Протеинкиназа, пкмоль/80 мкг гистонов
Обострение	ОРВИ	11	$7,1 \pm 4,0$	$2,4 \pm 1,1$	$0,72 \pm 0,27^*$
	Герпес	2	$10,0 \pm 4,3$	$3,0 \pm 2,5$	$0,69 \pm 0,09^*$
	ОРВИ+герпес	5	$31,6 \pm 2,5^*$	$3,4 \pm 1,0$	$0,72 \pm 0,31^*$
	ОРВИ	9	$10,0 \pm 3,2^*$	$3,4 \pm 1,2^*$	$0,65 \pm 0,30^*$
Ремиссия	Герпес	3	$25,1 \pm 5,0^*$	$3,3 \pm 1,4$	$0,92 \pm 0,11^*$
	ОРВИ+герпес	7	$7,9 \pm 2,5$	$4,5 \pm 2,0^*$	$0,65 \pm 0,26^*$
Здоровые	Доноры	13	$4,0 \pm 1,4$	$2,5 \pm 1,5$	$0,39 \pm 0,15$

Примечание. Сыровоточный интерферон: среднегеометрические титры. Ферменты: среднеарифметические показатели в пробе. Оценка достоверности различий уровней ферментов в разных группах проведена путем нахождения средней ошибки

разности (m разн. = γ разн. $\sqrt{\frac{n_1 + n_2}{n_1 \cdot n_2}}$) и критерия Стьюдента ($t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{m \text{ разн.}}$) для вероятности $p > 95\%$. Достоверные показатели обозначены звездочкой (по сравнению с донорами).

Воздействие лечения рекомбинантным α_2 интерфероном больных рецидивирующей крапивницей с частыми ОРВИ и герпесом на показатели системы интерферона

Фаза заболевания	Вирусная инфекция		Число обследованных	Сывороточный интерферон, ед/мл	2-5А-синтетаза, пкМ/10 ⁶ кл	Протеинкиназа пкмоль/80 мкг гистонов
	инфекция	реаферон				
Обострение	ОРВИ	—	12	7,1±4,0	2,4±1,1	0,72±0,27
Ремиссия	ОРВИ	+	3	20,0±12,5	3,8±0,9	0,80±0,19
		—	8	10,0±3,2	3,4±1,2	0,65±0,30
	ОРВИ+герпес	+	2	7,9±1,0	3,0±0,4	0,55±0,19
		—	7	7,9±2,5	4,5±2,0	0,65±0,26
		+	3	15,8±3,2	3,1±1,6	0,71±0,36

ограниченном числе наблюдений различия между активностями ферментов в фазах обострения и ремиссии не являются достоверными.

Введение экзогенного реаферона таким больным повышало уровень циркулирующего интерферона в пределах 10—20 ед/мл (табл. 2). У больных, леченных реафероном, существенных изменений в активности протеинкиназы не наблюдали. После лечения реафероном активность 2-5А-синтетазы имела тенденцию к повышению у больных в периоде обострения ОРВИ и снижению в периоде ремиссии ОРВИ и герпеса. К сожалению, малое число наблюдений не позволяет с достоверностью оценить происходящие изменения.

В табл. 3 демонстрируется 3 варианта наблюдаемых связей между исследованными ферментами и циркулирующим интерфероном: 1) заметная прямая у больных ОРВИ в периоде ремиссии, когда рост активности фермента 2-5А-синтетазы коррелирует с возрастанием уровня сывороточного интерферона ($0,7 > r > 0,5$). Прямая связь характерна для большинства острых вирусных инфекций и наблюдается при введении экзогенного интерферона здоровым людям [11, 15]; 2) умеренная прямая связь ферментов с сывороточным интерфероном ($0,5 > r > 0,3$) обнаружена у больных с сочетанием ОРВИ и герпеса в фазах обострения и ремиссии (2-5А-синтетаза). Такая корреляция для протеинкиназы выявлена только в периоде ремиссии у больных с частыми ОРВИ или герпесом; 3) для данной категории больных наиболее характерно отсутствие связи уровней ферментов с сывороточным интерфероном ($r < 0,3$) в периоде обострения. Подобная аномалия также описана у больных СПИДом, леченных реафероном [12]. Рецидивирующая крапивница относится к атопическим заболеваниям с нарушением ряда иммунологических реакций [5]. У таких больных с частыми вирусными инфекциями нами выявлены анома-

лии и в реакциях системы интерферона, что подтверждается и данными табл. 4, где приведены результаты изучения свойства лимфоцитов больных продуцировать α - и γ -интерфероны *in vitro* в ответ на вирус и митоген. Как в фазе обострения, так и в фазе ремиссии у 50—100 % больных выявлена сниженная способность клеток к продукции интерферонов на фоне повышенного количества интерферона в сыворотке крови. Интерфероновый статус в норме характеризуется отсутствием (или фоновыми значениями) циркулирующего интерферона в сочетании с выраженной способностью лейкоцитов продуцировать интерфероны [1, 6]. Взаимосвязь иммунной и интерфероновой систем в организме, по-видимому, обуславливает нарушения в обоих типах реакций. Нарушения в реакциях иммунной и интерфероновой систем проявляются у больных аутоиммунными, опухолевыми и тяжелыми хроническими вирусными инфекциями [12, 14—16]. Как свидетельствуют наши данные, нарушения характерны и для больных рецидивирующей крапивницей и ангионевротическими отеками с частыми ОРВИ и герпесом.

Как и в случае аутоиммунных заболеваний, при аллергической крапивнице высокие уровни циркулирующего интерферона и интерферонзависимых ферментов не обеспечивают защиту от вирусных инфекций. Это может быть вызвано дефектностью циркулирующего интерферона и подавлением им пролиферативной активности Т- и В-лимфоцитов [13]. Возникающие аномалии в иммунном ответе (суперпродукция IgE и IgG), приводящие к литическим реакциям, освобождению медиаторов воспаления и увеличению проницаемости клеток [5], могут изменять и процессы взаимодействия антигенов (вирусов) и интерферонов с чувствительными клетками. Повышенная проницаемость мембран клеток в местах воспаления может являться причиной как повышенного попадания вирусов и

Таблица 3

Корреляция уровней ферментов с циркулирующим интерфероном у больных рецидивирующей крапивницей с частыми вирусными инфекциями

Вирусная инфекция	Фаза заболевания	Степень связи и коэффициент корреляции	
		2-5А-синтетаза	протеинкиназа
ОРВИ	Обострение	Отсутствие $r+0,15$	Отсутствие $r+0,15$
	Ремиссия	Прямая заметная $r+0,6$	Отсутствие $r-0,24$
Герпес	Обострение	Отсутствие $r+0,001$	Отсутствие $r+0,02$
	Ремиссия	Отсутствие $r-0,25$	Умеренная прямая $r+0,32$
ОРВИ+герпес	Обострение	Умеренная прямая $r+0,41$	Отсутствие $r-0,02$
	Ремиссия	Умеренная прямая $r+0,39$	Отсутствие $r+0,003$

Примечания. Коэффициент корреляции вычисляли по формуле $r = \frac{\sum (x-\bar{x}) \cdot (y-\bar{y})}{N \sigma_x \sigma_y}$, где r — коэффициент корреляции; $(x-\bar{x})$ и $(y-\bar{y})$ — отклонения от среднего варианта каждого ряда наблюдений; N — число наблюдений; Σ — знак суммы; σ_x , σ_y — средние квадратичные отклонения каждого ряда.

Таблица 4

Изменения в ИРЛ и циркулирующем интерфероне у больных рецидивирующей крапивницей часто болеющих ОРВИ и герпесом

Фаза заболевания	Вирусная инфекция	Число обследованных	Процент больных со сниженным ИРЛ (≤ 40 ед/мл)		Процент больных с повышенным сывороточным интерфероном (>16 ед/мл)
			α	γ	
Обострение	ОРВИ	15	66	80	33
	Герпес	2	100	50	50
	ОРВИ + герпес	4	50	50	100
Ремиссия	ОРВИ	10	60	60	63
	Герпес	4	75	50	66
	ОРВИ + герпес	10	50	60	43
Здоровые	Доноры*	13	21	25	12

* Данные ИРЛ и сывороточного интерферона у здоровых доноров взяты из работы [1].

интерферонов в клетки, так и их секретируют и распространения.

Введение антиинтерфероновой сыворотки и, таким образом, нейтрализация циркулирующего интерферона облегчают течение аллергических и аутоиммунных заболеваний [13, 17]. Интерфероны усиливают экспрессию ряда важных антигенов и рецепторов на поверхности клеток (гистосовместимости, Ia, Lyt, Fc), повышают освобождение гистамина базофилами [13]. Все эти факты можно рассматривать как противопоказания к применению экзогенного интерферона при атонических заболеваниях. Наши данные о нормализации ИРЛ и снижении частоты рецидивов у больных крапивницей, леченных рефероном, указывают на положительный эффект интерферонотерапии, хотя со стороны ферментов системы интерферона 2-5A-синтетазы и протеникиназы не происходит заметных изменений и отмечается лишь тенденция к снижению аномально высоких уровней 2-5A-синтетазы до уровня доноров.

ЛИТЕРАТУРА

- Ершов Ф. И., Готовцева Е. П., Носик Н. П. // Иммунология. — 1986. — Т. 3. — С. 52—54.
- Итоги и перспективы теоретических и практических (клинических) исследований по проблеме интерферона // Материалы Всесоюзной конф. — Тбилиси, 1985.
- Иммунопрофилактика и интерферонотерапия вирусных инфекций // Труды Ин-та Пастера. — Л., 1985. — Т. 62. — С. 1.
- Лаврухина Л. А., Соколова Т. М., Суетина И. А. и др. // Антивирусные вещества при химиотерапии вирусных инфекций. — Минск, 1986. — С. 45—48.
- Либман Ф., Кроуфорд Л. Лечение больных аллергией: Пер. с англ. — М., 1986.
- Соловьев В. Л., Бектемиров Т. А. // Интерфероны в теории и практике медицины. — М., 1981.
- Buffel-Janevresse C., Hovanessian A. G. // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. — 1984. — Vol. 175. — P. 169—175.
- Campbell J. B., Grunberger T., Kochman M. A., White S. L. // Canad. J. Microbiol. — 1975. — Vol. 25. — P. 1247—1253.
- Kohl S. // J. Infect. Dis. — 1983. — Vol. 147. — P. 484—488.
- Lengyel P. // Methods Enzymology. — 1982. — Vol. 79. — P. 135—149.
- Merritt J. A., Ball L. A., Sielaff K. M., Meltzer D. M., Borden E. C. // J. Intern. Res. — 1986. — Vol. 6. — P. 189—198.
- Preble O. T., Rook A. H., Steis R. et al. // J. Infect. Dis. — 1985. — Vol. 152. — P. 457—465.
- Preble O. T., Friedmann R. M. // Laboratory Invest. — 1983. — Vol. 49. — P. 4—18.
- Revel M., Schattner A., Wallach D. et al. // The Clinical Potential of Interferons/Eds Kono R., Vilcek J. — Tokyo, 1982. — P. 353—368.
- Read S. E., Williams B. R., Coates R. A. et al. // J. Infect. Dis. — 1985. — Vol. 152. — P. 466—472.
- Schattner A., Wallach D., Merlin G. et al. // J. Intern. Res. — 1982. — Vol. 2. — P. 355—361.
- Skurkovich S. V., Eremkina E. I. // Ann. Allergy. — 1975. — Vol. 35. — P. 356—360.

Поступила 20.12.89

ACTIVITY OF INTERFERON-DEPENDENT ENZYMES IN PATIENTS WITH URTICARIA ACCOMPANIED BY MULTIPLE VIRAL INFECTIONS

I. A. Suetina, T. M. Sokolova, O. I. Belostotskaya, L. A. Lavrukhi-na, F. I. Ershov

D. I. Ivanovsky Institute of Virology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

27 patients with relapsing and giant urticaria accompanied by multiple general respiratory viral infection and herpeticism were studied during acute and remittent steps as compared with 13 healthy volunteers. 10 patients were treated with reaferon. Elevated rates of circulating interferon and interferon-dependent enzymes as well as a decreased ability of leukocytes and lymphocytes to produce α- and γ-interferons were detected in these patients. Anomalous reactions of the interferon system were found in the patients with urticaria and general viral respiratory infection simultaneously with impairments of the immunity response: disconnection between rates of interferon-dependent enzymes and circulating interferon. The course of interferon therapy within 5 days using recombinant α₂-interferon did not obviate these deteriorations, although activity of 2-5A synthetase tended to decrease down to the level observed in healthy persons.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616-008.931:[577.152.411+577.152.632]-074

В. В. Аленин, М. Ф. Яковлева, И. М. Быстрова, И. А. Зазерская, В. Д. Домкин

ТЕСТИРОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ БИОСИНТЕЗА ПУРИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ АИР-КАРБОКСИЛАЗЫ И САИКАР-СИНТЕАЗЫ В ЭКСТРАКТАХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Ленинградский университет

Способностью осуществлять биосинтез пуриновых нуклеотидов de novo обладают организмы самого различного уровня организации — бактерии [15], дрожжи [19], высшие растения [28], насекомые [23], птицы [16], млекопитающие [26] и человек [20].

Информация о ферментах, катализирующих отдельные стадии биосинтеза пуринов, в основном получена с использованием экстрактов клеток некоторых микроорганизмов и гомогенатов печени птиц [21]. Данные о тестировании активностей целого ряда ферментов биосинтеза пуринов у человека в литературе отсутствуют. К таким ферментам относятся 5-аминоимидазолриботидкарбоксилаза (АИР-карбоксилаза, КФ 4.1.1.21) и 4-(N-сукцинокарбоксамид)-5-аминоимидазолриботидсинтетаза (САИКАР-синтетаза, КФ 6.3.2.6), катализирующие две последовательные реакции в цепи биосинтеза пуринов: АИР-карбоксилаза — обратимую реакцию присоединения CO₂ к АИР с образованием 4-карбокси-5-аминоимидазолриботида

(КАИР): САИКАР-синтетаза — магнийзависимую, сопряженную с гидролизом АТФ до АДФ и неорганического фосфата, обратимую реакцию присоединения L-аспарагиновой кислоты к КАИР с образованием САИКАР.

«Надмолекулярная организация» АИР-карбоксилазы и САИКАР-синтетазы в клетках низших и высших эукариотических организмов существенно различна. Например, в клетках дрожжей оба фермента существуют в виде отдельных полипептидных цепей и не образуют прочного мультиэнзимного комплекса [4]. У птиц же белковые последовательности, отвечающие за активности АИР-карбоксилазы и САИКАР-синтетазы, объединены в одной полипептидной цепи (из печени цыпленка выделен гомогенный бифункциональный белок, обладающий обеими активностями и состоящий из идентичных субъединиц) [25]. Представляло интерес получить белковые препараты АИР-карбоксилазы и САИКАР-синтетазы из клеток человека и выяснить характер их организации.

Известно [13], что биосинтез пуринов в зрелых эритроцитах не функционирует и что одной из причин этого является отсутствие в эритроцитах фермента амидофосфорибозилтрансферазы (КФ 2.4.2.14). Относительно других ферментов биосинтеза пуринов в эритроцитах известно мало и данные противоречивы. В отношении АИР-карбоксилазы и САИКАР-синтетазы никаких данных нет. Представляло интерес выяснить, присутствуют ли эти ферменты в активном состоянии в эритроцитах.

В культурах клеток лабораторных животных САИКАР-синтетаза способна катализировать присоединение к КАИР природного противоопухолевого антибиотика аланозина, являющегося аналогом L-аспарагиновой кислоты, в результате чего образуется аланозиновый аналог САИКАР, являющийся истинным противоопухолевым агентом при химиотерапевтическом использовании аланозина [30]. Измерение активности АИР-карбоксилазы и САИКАР-синтетазы в клетках и биологических жидкостях человека представляло интерес в связи с проблемой применения аланозина в качестве лекарственного препарата.

В сообщении представлены результаты, полученные при тестировании активностей АИР-карбоксилазы и САИКАР-синтетазы в биологических жидкостях и клетках человека, а также при выделении из эритроцитов человека белковых препаратов, обладающих активностями указанных ферментов.

Методика. В работе использовали сефадекс G-200 (Fine) («Pharmacia», Швеция), L-аспарагиновую кислоту (BDH, Англия), ТЛС-целлюлозу и азид натрия («Serva», ФРГ), дитиотреитол (ДТТ), этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА), фенолметилсульфонилфторид (ФМСФ) и альфа-целлюлозу («Sigma», США), АТФ («Reanal», Венгрия), все остальные реактивы — отечественного производства. Кальций-фосфатный гель готовили по методу [7]. Белок определяли по методу [10].

Все спектрофотометрические измерения выполняли на регистрирующем спектрофотометре SP-8000 («Pye Unicam», Англия). Центрифугирование проводили при 4 °С на центрифугах К-24 и К-70 (ГДР) и микроцентрифуге М-320а (ПНР). Растворы ферментных препаратов концентрировали на установке «Amicon 12» («Amicon», США), используя фильтр ХМ-100 той же фирмы, задерживающий белки с молекулярной массой более 100 кДа.

При приготовлении лизатов цельной крови использовали кровь человека, взятую из пальца. В качестве антикоагулянта

применяли цитрат натрия (3,8 %). Форменные элементы крови выделяли из свежей донорской крови. Плазму крови, желчь и биоптаты желудка получали по стандартным методикам, применяющимся в клинике. Для получения лизатов цельной крови аликвоту 0,01–0,20 мл крови с антикоагулянтом разбавляли равным объемом либо дистиллированной воды, либо 0,01 М натрий-фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 0,1 мМ ЭДТА и 1 мМ ДТТ, и лизировали однократным замораживанием при –70 °С и оттаиванием. Оттаявшую при комнатной температуре пробу без дополнительной очистки использовали для тестирования активностей ферментов.

Для получения гемолизатов эритроцитов 3 мл крови, разбавленной в 1,5 раза 5 % раствором цитрата натрия, наносили на колонку (1,4×3,5 см), заполненную смесью равных количеств ТЛС-целлюлозы и альфа-целлюлозы и уравновешенную 0,15 М NaCl [9]. Эритроциты элюировали с колонки уравновешивающим раствором. Элюат центрифугировали (10 мин, 1000 g), осевшие эритроциты трижды промывали 0,15 М NaCl и гемолизовали добавлением трех объемов холодной деионизованной воды.

Лейкоциты получали по методу [5] и лизировали так же, как эритроциты.

Тромбоциты выделяли по методу [3]. Центрифугировали (10 мин, 1000 об/мин) смесь 9 мл венозной крови и 1 мл 3,8 % раствора цитрата натрия. Затем центрифугировали верхний слой плазмы (3 мл), содержащий тромбоциты. Осадок тромбоцитов промывали (3×3 мл) 0,1 М трис-НСl-буфером (рН 7,4), каждый раз отделяя клетки центрифугированием. Осадок тромбоцитов хранили при –20 °С. Для получения лизата клетки размораживали, добавляли к ним 0,2 мл 0,06 М трис-фосфатного буфера (рН 8,0) и смесь центрифугировали на микроцентрифуге 15 мин. Супернатант использовали для определения активностей ферментов.

Для получения гомогенатов биоптата желудка 2–4 мг ткани помещали в охлажденный гомогенизатор, добавляли 0,2 мл 0,05 М трис-фосфатного буфера (рН 8,0) и гомогенизировали пробу в ледяной бане 1,5 мин. Гомогенат центрифугировали (5 мин) на микроцентрифуге. Осадок и гомогенизатор промывали 0,4 мл того же буфера. Объединенные супернатант и «промывки» осветляли центрифугированием и использовали для тестирования активностей ферментов.

КАИР — субстрат для тестирования активности АИР-карбоксилазы и САИКАР-синтетазы — синтезировали по методике [11].

Для определения активности АИР-карбоксилазы использовали спектрофотометрический метод, описанный в работе [2]. Проба 2 мл в термостатированной кювете (37 °С) спектрофотометра содержала 0,06 М натрий-фосфатный буфер (рН 8,0 при 37 °С), 0,1 мМ ЭДТА, 0,04 мМ КАИР и 10–40 мкл лизата или 200–400 мкл гомогената биоптата желудка. Скорость ферментативной реакции определяли по регистрируемому прибором падению оптической плотности при 253 нм за 1 мин. Контрольная проба содержала все указанные компоненты, кроме КАИР.

При качественном тестировании активности САИКАР-синтетазы использовали колориметрический метод [25]. В качестве контрольных использовали пробы, содержащие все ингредиенты, за исключением в одном случае L-аспарагиновой кислоты, а в другом КАИР. Для тестирования активности САИКАР-синтетазы в частично очищенных белковых препаратах, полученных из эритроцитов, использовали спектрофотометрический метод [2, 4]. Скорость ферментативной реакции, катализируемой этим ферментом, определяли по возрастанию оптической плотности при 282 нм за 1 мин в термостатированной (37 °С) кювете спектрофотометра. Проба объемом 2 мл содержала 0,1 М трис-НСl-буфер; 4,5 мМ MgCl₂; 0,3 мМ АТФ; 70 мМ L-аспарат; 0,2 М KHCO₃; 0,08 мМ КАИР и аликвоту частично очищенного белкового препарата (рН смеси 8,0 при 37 °С). Контрольная проба содержала все компоненты, кроме L-аспартата. Активность АИР-карбоксилазы и САИКАР-синтетазы выражали в Е и на 1 мл, где Е — число наномолей КАИР, превращенного в продукты реакции за 1 мин.

Получение белкового препарата, обладающего активностями АИР-карбоксилазы и САИКАР-синтетазы. Все операции, связанные с получением белкового препарата, проводили при 4 °С. Для выделения ферментов использовали содержащий 0,6 % NaCl и 1 % глюкозы раствор гемоглобина человека [11]. К 390 мл такого раствора добавляли при непрерывном перемешивании 490 мл кальций-фосфатного геля в воде [7]. Суспензию перемешивали в течение 1 ч и центрифугировали (20 мин, 2600 g). К сорбенту, промытому с помощью центрифугирования водой (около 6 л, до получения бесцветного супернатанта), добавляли 250 мл 0,1 М натрий-фосфатного буфера (рН 7,3), содержащего 20 % сульфата аммония, 1 мМ ДТТ, 0,1 мМ ФМСФ и 0,02 % азида натрия. Смесь оставляли

на ночь, затем центрифугировали (30 мин, 2600 g). Сорбент промывали двумя порциями (по 250 мл) того же буфера. Все три содержащие белок супернатанта объединяли. К полученному раствору (690 мл) добавляли при перемешивании твердый сульфат аммония до 66 % насыщения (с учетом сульфата аммония в исходном буфере), поддерживая pH смеси около 7,0 добавлением 1M NaOH. Через 30—40 мин выпавший осадок белков отделяли центрифугированием (30 мин, 2300 g), растворяли в 38 мл 5 мМ натрий-фосфатного буфера (pH 7,0), содержащего 1 мМ ДТТ, и смесь повторно центрифугировали. Активность САИКАР-синтетазы в полученном препарате, определенная спектрофотометрическим методом, составляла 230 Е на 1 мг белка. Полученный супернатант разбавляли до 200 мл тем же буфером и концентрировали на установке фирмы «Amicon», используя фильтр XM-100 диаметром 63 мм (давление создавали азотом). Раствор, оставшийся над фильтром после первого концентрирования, вновь разбавляли до 200 мл и операцию концентрирования повторяли. Сконцентрированный таким образом раствор (около 13 мл) лиофилизировали и хранили при -20 °C.

Гель-фильтрация на сефадексе G-200. Порцию лиофилизованного белкового препарата (200 Е АИР-карбоксилазы и 10 Е САИКАР-синтетазы) растворяли в 0,6 мл 0,1 М триацетатного буфера (pH 8,0), содержащего 1 мМ ДТТ, 0,1 мМ ЭДТА и 10 % глицерина. Раствор центрифугировали и наносили на колонку (1×40 см) с сефадексом G-200, уравновешенную тем же буфером. Белки элюировали с колонки уравновешивающим буфером [4] (скорость элюции 7,2 мл/ч, объем фракций 0,5 мл). Во фракциях элюата определяли активность АИР-карбоксилазы и САИКАР-синтетазы.

Результаты и обсуждение. Ранее нами были разработаны спектрофотометрические методики, позволяющие количественно определять активности АИР-карбоксилазы и САИКАР-синтетазы в грубых клеточных экстрактах микроорганизмов [2]. Мы установили, что аналогичная методика может быть использована и для количественного определения активности АИР-карбоксилазы в грубых экстрактах клеток человека. В случае же САИКАР-синтетазы чувствительность спектрофотометрического метода оказалась недостаточной для того, чтобы тестировать относительно низкую активность этого фермента в указанных экстрактах. Поэтому активность САИКАР-синтетазы тестировали качественно, используя колориметрический метод [25].

Данные по тестированию активностей АИР-карбоксилазы и САИКАР-синтетазы в биологических жидкостях (плазме крови и желчи), а также в лизатах цельной крови и гомогенатах биоптатов желудка человека представлены в табл. 1. Активность этих ферментов обнаружена в лизатах цельной крови и в гомогенатах клеток желудка и не обнаружена в плазме крови и желчи. Поскольку в плазме указанные ферменты отсутствуют, ясно, что они локализованы в форменных элементах крови и только в результате лизиса форменных элементов появляются в лизатах цельной крови. В литературе имеются противоречивые данные относительно того, в каких форменных элементах крови может осуществляться биосинтез пуринов. Экспериментально установлено, что в лимфоцитах биосинтез пуринов идет [8, 14], и, следовательно, в лимфоцитах должны присутствовать исследуемые нами ферменты. В лейкоцитах и тромбоцитах человека биосинтез пуринов функционирует, по-видимому, с очень низкой эффективностью [24] или вообще не функционирует [22]. Полагают [13], что эритроциты человека в процессе созревания из ретикулоцитов теряют способность синтезировать пуриновые нуклеотиды de novo в результате утраты (или инактивации) амидофосфорибозилтрансферазы. Для того чтобы определить, со-

Таблица 1

Активность АИР-карбоксилазы и САИКАР-синтетазы в клетках и биологических жидкостях человека

№ п/п	Исследованный препарат	Активность фермента	
		АИР-карбоксилаза	САИКАР-синтетаза
1	Лизат цельной крови	0,90	Есть
2	Плазма крови	Нет	Нет
3	Гемолизат эритроцитов	0,94	Есть
4	Лизат лейкоцитов	6,30	Есть
5	Лизат тромбоцитов	5,80	Есть
6	Желчь	Нет	Нет
7	Гомогенат биоптата желудка	1,80	Есть
8	Гемолизат эритроцитов больного лимфолейкозом	1,40	Есть
9	Лизат лейкоцитов больного лимфолейкозом	12,0	Не определяли

Примечание. Препараты 1—7 от здоровых доноров, препараты 8 и 9 — из крови больного лимфолейкозом; значения активности АИР-карбоксилазы приведены в наномолях КАИР за 1 мин на 1 мг белка; активность САИКАР-синтетазы определяли качественно колориметрическим методом [25].

держатся ли в эритроцитах, лейкоцитах и тромбоцитах АИР-карбоксилаза и САИКАР-синтетаза, из крови здоровых доноров выделяли указанные форменные элементы и в лизатах этих клеток определяли активности ферментов. Как следует из данных, представленных в табл. 1, во всех исследованных нами форменных элементах крови тестируются активности обоих ферментов.

Средние значения активностей АИР-карбоксилазы в лизатах цельной крови и тромбоцитов, а также в гомогенатах клеток желудка человека представлены в табл. 2. Активность фермента выражали в единицах активности (в наномолях КАИР за 1 мин), отнесенных к 1 мл донорской крови или к содержанию общего белка в 1 мл грубого клеточного экстракта. Метод характеризуется хорошей воспроизводимостью, требует всего 10 мкл крови (или несколько миллиграммов ткани) и может быть рекомендован в качестве экспресс-метода для количественной оценки активности АИР-карбоксилазы у человека.

Известно, что активность некоторых ферментов, участвующих в биосинтезе пуринов, достоверно повышена в опухолевых клетках по сравнению с нормой [6]. Это документировано в отношении амидофосфорибозилтрансферазы (КФ 2.4.2.14) [8, 27], формилглицинамидинриботид-синтетазы (КФ 6.3.5.3) [12], аденилосукинаг-синтетазы

Таблица 2

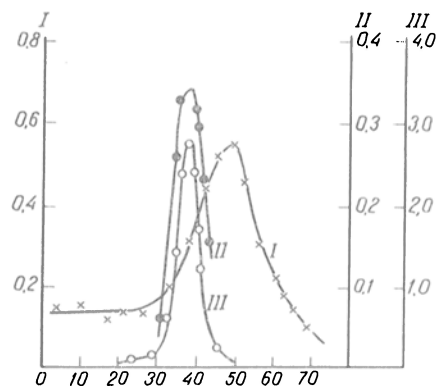
Средние значения активности АИР-карбоксилазы в различных клетках доноров

Исследованный препарат	Число определений	Число доноров	Активность АИР-карбоксилазы
Лизат цельной крови	5	1	0,46±0,02*
Лизат цельной крови	1	26	0,35±0,03*
Лизат тромбоцитов	2	21	5,8±0,5**
Гомогенат биоптата желудка	2	4	1,2±0,6**

Примечание. Для приведенных средних значений указан 95 % доверительный интервал; одна звездочка — наномоли КАИР за 1 мин на 1 мл донорской крови; две звездочки — наномоли КАИР за 1 мин на 1 мг белка в клеточном экстракте.

(КФ 6.3.4.4) [17] и ИМФ-дегидрогеназы (КФ 1.2.1.14) [18]. Мы определили активность АИР-карбоксилазы в гемолизате эритроцитов и лизате лейкоцитов больного лимфолейкозом (см. табл. 1). Факт, что активность АИР-карбоксилазы в лизате лейкоцитов больного лимфолейкозом в 2 раза выше, чем у здорового донора, можно рассматривать как указание на то, что и активность АИР-карбоксилазы наряду с активностями других упомянутых выше ферментов, участвующих в биосинтезе пуринов, может повышаться при онкологических заболеваниях.

Уровень активности АИР-карбоксилазы в эритроцитах примерно в 6 раз ниже, чем в лейкоцитах и тромбоцитах (см. табл. 1). Тем не менее, поскольку около 70 % активности фермента, обнаруживаемого в лизатах цельной крови, содержится в эритроцитах, именно эритроцитарная масса является предпочтительным исходным материалом для выделения АИР-карбоксилазы. Мы установили, что удобным источником для выделения АИР-карбоксилазы и САИКАР-синтетазы может служить раствор гемоглобина, полученный из эритроцитов по методу [11]. Включающая три стадии очистки процедура получения частично очищенного белкового препарата, обладающего активностями АИР-карбоксилазы и САИКАР-синтетазы, представлена в табл. 3 (см. также «Методика»). Активность САИКАР-синтетазы до стадии сульфат-аммонийного осаждения тестировали качественно с помощью колориметрического метода. После указанной стадии использовали спектрофотометрическую методику. Существенно то, что на всех стадиях очистки наблюдали соотношение АИР-карбоксилазы и САИКАР-синтетазы. На основании последнего наблюдения мы предположили, что у человека (как и у птиц [25]) активностью этих двух ферментов обладает один бифункциональный фермент. С целью проверки этого предположения мы провели хроматографию полученного препарата фермента на сефадексе G-200 в условиях, при которых дрожжевые АИР-карбоксилаза (мультимер с молекулярной массой, превышающей 200 кДа) и САИКАР-синтетаза (мономер с молекулярной массой 34,5 кДа) легко отделяются друг от друга, а нативный бифункциональный фермент из печени цыпленка (мультимер с молекулярной массой 350 кДа) элюируется одним пиком [25]. Про-



Хроматография белкового препарата, выделенного из эритроцитов человека, на сефадексе G-200.

I — белок (A_{280}); II — активность САИКАР-синтетазы, Е/мл; III — активность АИР-карбоксилазы, Е/мл. По оси абсцисс — номера фракций.

филь гель-фильтрации (см. рисунок) препарата, полученного нами из эритроцитов человека, характерен для бифункционального фермента, обладающего активностями АИР-карбоксилазы и САИКАР-синтетазы. Он резко отличается от профиля элюции (не представлен), полученного нами при гель-фильтрации на той же колонке смеси дрожжевых ферментов (максимальная активность дрожжевой АИР-карбоксилазы обнаружена в 37-й фракции, и САИКАР-синтетазы — в 62-й фракции).

В препарате, полученном после гель-фильтрации, активности АИР-карбоксилазы и САИКАР-синтетазы равны соответственно 200 и 40 нмоль КАИР за 1 мин на 1 мг белка, т. е. активность АИР-карбоксилазы значительно выше таковой САИКАР-синтетазы. Гомогенный бифункциональный фермент, выделенный из печени цыпленка [25], а также грубые белковые препараты, полученные из печени и мозга млекопитающих [29], характеризуются качественно аналогичным соотношением активностей (в пользу АИР-карбоксилазы). Следует отметить, что для дрожжей, у которых первичная структура указанных ферментов кодируется двумя несцепленными генами (ферменты функционируют как независимые белки), наблюдается обратная закономерность — активность АИР-карбоксилазы существенно ниже, чем активность САИКАР-синтетазы [2].

На основании изложенных фактов можно предположить, что у птиц, млекопитающих и человека в отличие от микроорганизмов двухстадийное превращение АИР в САИКАР катализирует один бифункциональный фермент, первичная структура которого кодируется, по-видимому, одним геном (у млекопитающих и человека геном Ade-D [26], контролирующим синтез АИР-карбоксилазы).

Таблица 3

Очистка белкового препарата, обладающего активностями АИР-карбоксилазы и САИКАР-синтетазы, из эритроцитов человека

Этап очистки	Объем, мл	Содержание белка, мг/мл	Активность АИР-карбоксилазы		Выход, %	Степень очистки
			а	б		
Исходный раствор гемоглобина	390	122,6	64	0,52	—	—
Кальций фосфатный гель	690	2,50	36	14,6	100	28
Сульфат аммония	38	3,87	352	91	54	174
Мембранное фильтрование и лиофилизация	13,2	9,23	960	104	51	200

Примечание. а — наномоли КАИР за 1 мин на 1 мл; б — наномоли КАИР за 1 мин на 1 мг белка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аленин В. В., Домкин В. Д. // Журн. общ. химии. — 1984. — Т. 54, № 10. — С. 2365—2373.
2. Аленин В. В., Останин К. В., Домкин В. Д. // Прикладная биохим. — 1988. — № 6. — С. 856—862.
3. Мрочек А. Г., Тябук Т. Г. Методы исследования тромбоцитов и эритроцитов в клинической кардиологии. — Минск, 1985.
4. Останин К. В. Генетико-биохимическое изучение фосфоро-

зил-сукцинокарбоксамид-аминоимидазол-синтетаза дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Л., 1985.

5. Порешина Л. П., Васильева М. И., Феногенова Н. А. и др. // Гематол. и трансфузиол.— 1985.— № 3.— С. 28—32.
6. Ходосова И. А. Ферменты опухолевых клеток.— Л., 1988.
7. Agarwal R. P., Agarwal K. C. // Meth. Enzymol.— 1978.— Vol. 51.— P. 581.
8. Becher H. J., Loehr G. W. // Verh. Dtsch. Ges. inn. Med.— 1978.— Bd 84.— S. 168—171.
9. Beutler E. Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods.— New York, 1975.
10. Bradford M. // Analyt. Biochem.— 1976.— Vol. 72.— P. 248—254.
11. De Venuto F., Zegna A. // J. surg. Res.— 1983.— Vol. 34, N 3.— P. 205—212.
12. Elliot W. L., Weber G. // Cancer Res.— 1984.— Vol. 44, N 6.— P. 2430—2434.
13. Fontenelle L. J., Henderson J. F. // Biochim. biophys. Acta.— 1969.— Vol. 177.— P. 175—176.
14. Gordon R. B., Counsilman A. C., Cross S. M. C., Emmerson B. T. // Clin. Sci.— 1982.— Vol. 63, N 5.— P. 429—435.
15. Gots J. S., Benson C. E., Jochimsen B., Koduri K. R. // Purine and Pyrimidine Metabolism.— New York, 1977.— P. 23—38.
16. Henderson J. F., Paterson A. R. P. // Nucleotide Metabolism.— New York, 1973.— P. 97—123.
17. Jackson R. C., Morris H. P., Weber G. // Cancer Res.— 1977.— Vol. 37.— P. 3057—3065.
18. Jackson R. C., Morris H. P., Weber G. // Biochem. J.— 1977.— Vol. 166.— P. 1—10.
19. Jones E. W., Fink G. R. // Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Metabolism and Gene Expression / Eds J. M. Strathern, E. W. Jones, J. R. Broach.— New York, 1982.— P. 249—263.
20. McCairns E., Fahey D., Saner D., Rowe P. B. // J. biol. Chem.— 1983.— Vol. 258, N 3.— P. 1851—1856.
21. Methods in Enzymology / Ed S. P. Colwick, N. O. Kaplan.— New York, 1963.— Vol. 6.— P. 52—117; 1978.— Vol. 51.— P. 171—224.
22. Murray A. W. // Ann. Rev. Biochem.— 1971.— Vol. 40.— P. 811—826.
23. Nash D., Henderson J. F. // Advanc. comp. Physiol. Biochem.— 1982.— Vol. 8.— P. 1—51.
24. Nucleosides and Cancer Treatment (Rational) Approaches to Antimetabolite Selectivity and Modulation / Ed. Y. H. N. Tattersal, R. M. Fox.— Sydney, 1981.— P. 23.
25. Patey C. A. II., Shaw G. // Biochem. J.— 1973.— Vol. 135, N 3.— P. 543—545.
26. Patterson D. // Molecular Cell Genetics / Ed. M. M. Gottesman.— New York, 1985.— P. 275—309.
27. Prajda N., Morris H. P., Weber G. // Cancer Res.— 1979.— Vol. 39.— P. 3909—3914.
28. Reynolds P. H. S., Blevins D. G., Randall D. D. // Arch. Biochem.— 1984.— Vol. 229.— P. 623—631.
29. Shaw G., Thomas S. E. // J. Neurochem.— 1976.— Vol. 27.— P. 637—639.
30. Tyagi A. K., Cooney D. A. // Cancer Res.— 1980.— Vol. 40, N 12.— P. 4390—4397.

Поступила 25.01.89

ASSAY OF PURINE NUCLEOTIDE BIOSYNTHESIS ENZYMES AIR-CARBOXYLASE AND SAICAR-SYNTHETASE IN HUMAN CELL EXTRACTS

V. V. Alenin, M. F. Yakovleva, I. M. Bystrova, I. A. Zazerskaya, V. D. Domkin

State University, Leningrad

Activities of AIR-carboxylase (ES 4.1.1.21) and SAICAR-synthetase (EC 6.3.2.6) were found in lysates of human erythrocytes, thrombocytes and leukocytes and in homogenate of the stomach biopsy sample. However, these activities were absent in blood plasma and bile. The human erythrocyte enzyme preparation, which had both activities, was isolated and purified about 200 times. The copurification of both activities and properties of the enzyme preparation suggest that two consecutive reactions of purine biosynthesis *de novo* (from AIR to SAICAR) in human cells are catalyzed by one bifunctional enzyme which is probably encoded by one gene.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.831-008.934.66-02:[615.917:547.262]-092.9

С. Ю. Островский, Б. И. Горенштейн, И. Л. Быков

СВОБОДНЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ МОЗГА ПРИ УМЕРЕННОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ ЖИВОТНЫХ И ВВЕДЕНИИ ЭТАНОЛАМИНА

Институт биохимии АН Белорусской ССР, Гродно

Помимо выполнения пластических функций, аминокислоты мозга являются предшественниками нейромедиаторов, сами выступают в роли последних и, наконец, наряду с глюкозой могут стать альтернативным источником энергии. В отличие от большинства органов и тканей обмен аминокислот в мозге характеризуется рядом особенностей и зависимостью от высокоспециализированных транспортных систем на уровне нейронитов и гематоэнцефалического барьера [5, 7, 13, 17]. Влияние алкоголя на обмен классических нейромедиаторов и некоторых их предшественников изучено относительно подробно [2, 8], в то время как общий фонд свободных аминокислот и особенности его формирования охарактеризованы значительно меньше [4, 6]. В большей мере это касается ситуаций, связанных с умеренной алкоголизацией, которую следует рассматривать как наиболее частный вариант интоксикации. Еще один аспект вопроса, на который мы обращаем внимание в этом сообщении, касается поиска природных антагонистов алкоголя, каковыми могут стать структурные аналоги этанола, в частности, производное аминокислоты серина этаноламин (ЭА). Уже известно, что ЭА ингибирует алкогольдегидрогеназу, фосфоэтанолламин (ФЭА) может распадаться с образованием ацетальдегида [6], а диэтанолламин в отношении наркотического действия алкоголя выступает одновременно как агонист и антагонист последнего [11]. Оба соединения (ЭА и ФЭА) рассматриваются [16, 19] как вероятные нейромодуляторы или нейромедиаторы, они весьма активно влияют на композицию фосфолипидов в биологических мембранах [6]. Показано также, что введение ЭА животным ослабляет наркотическое действие этанола [1]. Изучение взаимоотношений между алкоголем, аминокислотами и ЭА рассматривается нами [6] как одна из предпосылок возможности создания новых лекарственных средств на основе природных соединений.

Методика. Крысы-самцы (по 8 животных в группе) массой 180—200 г получали однократно внутривенно ЭА (100 мг/кг), нейтрализованный в изотоническом растворе хлорида натрия, или изомольное количество (230 мг/кг) ФЭА. Этанол в 25 % водном растворе (1 г/кг) вводили через зонд в желудок. При комбинации вводимых соединений соответствующие контрольные манипуляции осуществляли с водой или изотоническим солевым раствором. Спустя 1 ч после инъекции животных декапитировали. Половину мозга немедленно после извлечения (10—15 с) замораживали в жидком азоте, а затем гомогенизировали в 6 % растворе сульфосалициловой кислоты, после чего в безбелковом центрифугате определяли свободные аминокислоты на анализаторе Т-339 [3]. Из гомогената мозга, приготовленного на изотоническом растворе сахарозы, выделяли митохондрии и цитозольную фракцию (1 050 000 g, 60 млн), в которых известными методами [9, 10] исследовали активность АЛТ и АСТ, глутаматдегидрогеназы (ГДГ) и пируватдегидроге-

назы (ПДГ). Критерии достоверности различий и достоверности коэффициентов корреляции рассчитывали на основе стандартных математических программ на ЭВМ «Мера-Камак» СМ 4А.

Результаты и обсуждение. Содержание почти всех аминокислот в мозге не изменяется при введении в указанных нами дозах алкоголя, ЭА, ФЭА или сочетания последних с этанолом. Достоверно различался только уровень Тау в мозге крыс, получавших этанол (8254 ± 531), по сравнению с животными, которым наряду с этанолом вводили и ЭА (6563 ± 450 нмоль/г; $p < 0,05$). Изменения показателей по отношению к контролю (7437 ± 575 нмоль/г) противоположны, что можно рассматривать как проявление антагонистических взаимоотношений между этанолом и ЭА. Аналогичные изменения наблюдаются и по уровню Ори, содержание которого почти удваивалось после введения этанола (95 ± 6 нмоль/г в опыте и 48 ± 9 нмоль/г в контроле; $p < 0,01$) и не менялось (43 ± 3 нмоль/г), когда вводили этанол в сочетании с ЭА. Чувствительность орнитиндекарбоксилазы к алкоголю хорошо известна [20] и с этим склонны связывать ингибирующее действие этанола на биосинтез белка. Эффект ЭА, таким образом, интересен в плане поиска средств, устраняющих одно из наиболее коварных действий алкоголя — атрофию мозга [15]. Цикл мочевинообразования путем синтеза цитрулина из Ори практически не функционирует в мозге и главным механизмом удаления избытка аммиака является образование и выведение Гли [5, 12]. Последний при этом обменивается на уровне гематоэнцефалического барьера с группой так называемых больших нейтральных аминокислот [14], которые при избытке аммиака могут накапливаться поэтому в мозге. Взаимоотношения уровня аммиака с Асп и аминокислот, участвующих в его превращениях и транспорте, представлены в табл. 1. Между уровнями Глу и Гли в мозге контрольных животных существует положительная корреляционная связь, которая нарушается при всех экспериментальных воздействиях. Этанол и ЭА при этом одинаково влияют на взаимоотношения между уровнем аммиака и Глу или Гли. Алкоголь, как известно [6], резко увеличивает отношение НАДН/НАД, что может сказаться на протекании глутаматдегидрогеназной реакции, а ЭА и ФЭА сами могут рассматриваться как дополнительные источники аммиака. Указанными обстоятельствами удовлетворительно объясняется противоположное действие этанола, с одной стороны, и ЭА и ФЭА, с другой, на взаимоотношения аммиака и Асп (см. табл. 1). Последний путем

переаминирования превращается при этом в Глу, который является переносчиком аммиака [12]. Сопряженность сдвигов уровня Глу и активности АСТ, характерная для мозга контрольных животных, полностью разрушается этанолом, не затрагивается введением ЭА или ФЭА, но только первый, а не второй снимает действие алкоголя (см. табл. 1). Взаимоотношения уровня Глу и Асп свидетельствуют о вероятном участии систем переаминирования в транспорте аммиака, образованного из ЭА и ФЭА. Сам по себе этанол, по-видимому, тормозит образование амида аспарагиновой кислоты, в связи с чем при накоплении в мозге Гли одновременно возрастает и содержание Асп ($r = 0,85$).

Участие больших нейтральных аминокислот в транспорте аммиака [14], если судить об этом хотя бы по взаимоотношениям с Лей (см. табл. 1), качественно неоднородно. ЭА и ФЭА могут ввиду наличия свободного гидроксильного радикала у второго резко различаться по влиянию на транспортные системы гематоэнцефалического барьера. О действии этих двух (ЭА и ФЭА) дополнительно вводимых соединений непосредственно в нейронах вряд ли приходится думать, поскольку их содержание в мозге не изменялось в опытных группах животных. В достаточно наглядной форме различия в действии ЭА и ФЭА на транспорт, а, возможно, и метаболизм больших нейтральных аминокислот, демонстрируют данные (см. табл. 1) о взаимоотношениях самого ЭА с Лей. Коэффициент корреляции резко отличается от контрольного после введения животным ЭА и не отличается от него после введения ФЭА. Сочетание ЭА с этанолом (если судить по коэффициенту корреляции) свидетельствует об антагонизме друг с другом каждого из примененных соединений.

В обмене самого ЭА и ФЭА заслуживают внимания данные, характеризующие судьбу возможного предшественника (Сер) обоих соединений и вероятного продукта их окислительного катаболизма Гли [6, 18]. Наработка Гли при окислении ЭА не исключается, поскольку при введении этанола положительная корреляция в уровне обоих соединений, имевшаяся у контрольных крыс, исчезает (см. табл. 1). Судьба Тре, Сер и Гли определяется как в контроле, так и под влиянием ЭА соотношением хорошо известных взаимопревращений всех трех аминокислот [18]. Если судить (см. табл. 1) по знакам коэффициентов корреляции в парах Тре/Сер и Тре/Гли изменение активности треонинальдолазы и серинок-

Таблица 1

Корреляционные взаимоотношения (r) свободных аминокислот, некоторых их производных и АСТ в мозге крыс, которым вводили этанол, ЭА, ФЭА ($n=7$)

Группа животных	НН ₄ Асп	Глу Гли	Глу Асп	Гли Асп	Глу АСТ	ЭА Гли	ЭА Лей	Тре Сер	Тре Гли	Тре Фен	Тре Гли	ГАМК Асп
Контроль	-0,45	0,72*	0,17	0,43	0,74*	0,73*	0,90*	-0,48	-0,12	0,98*	0,79*	-0,38
Этанол	-0,54	-0,69*	-0,42	0,85*	-0,54	0,16	0,68*	-0,13	0,51	-0,29	0,37	0,81*
ЭА	0,76*	-0,60	0,76*	-0,35	0,57	-0,35	-0,56	0,77*	0,74*	0,62	-0,03	0,23
Этанол+ЭА	-0,48	0,08	0,19	-0,26	0,66*	0,62	0,74*	0,25	0,10	0,90*	0,88*	-0,04
ФЭА	0,87*	-0,61	0,89*	-0,33	0,83*	-0,13	0,91*	-0,06	0,63	0,60	0,70*	0,03
Этанол+ФЭА	0,01	0,53	-0,17	-0,38	-0,14	-0,02	0,10	-0,20	0,72*	-0,32	-0,06	0,56

Примечание. Звездочка — $p < 0,05$ — 0,001.

симетилтрансферазы, по-видимому, противоположно, так как Гли является одновременно и продуктом и субстратом обеих реакций. ЭА и ФЭА в сочетании с этанолом выступают как вероятные ингибиторы треонинальдолазы, поскольку оба воздействия могут сопровождаться накоплением не только глицина, но и ацетальдегида [6], второго продукта рассматриваемой реакции. Разнонаправленность эффектов ЭА и ФЭА просматривается и по отношению обоих соединений к уровню 2-аминоацетилсукциновой кислоты. Последняя образуется из 2-кетобутирата — продукта треониндегидратазной реакции или при распаде цистатионина, который синтезируется конденсацией Сер и Мет.

Анализ взаимоотношений среди нейротрансмиттерных аминокислот весьма затруднителен, поскольку их уровень может определяться не только особенностями собственного метаболизма [18], но и специфическими взаимодействиями, характеризующими протекание в центральной нервной системе (ЦНС) процессов торможения и возбуждения [7]. При этом накопление одного вида аминокислот, например, возбуждающих — Глу, Асп, будет уравниваться немедленным дополнительным сверхсинтезом тормозных аминокислот — Тау, Гли, ГАМК. Метаболизм перечисленных выше аминокислот на отдельных этапах протекает независимо друг от друга, характеризуется спецификой в отдельных структурах мозга [7, 8] и корреляционные коэффициенты будут поэтому интегрировать в себе значительно больше переменных, чем это имело место при рассмотрении процессов, описанных нами выше. Тем не менее этанол известен функционально как мощный наркотический агент и биохимически как сильный восстановитель [6]; ЭА и ФЭА некоторые авторы рассматривают как нейромодуляторы [16, 19], т. е. поводов для хотя бы грубой оценки вмешательства этих соединений в пул нейротрансмиттеров вполне достаточно.

Предшественником катехоламинов является Тир, сам образующийся из Фен. Уровни обоих аминокислот у контрольных животных почти абсолютно взаимозависимы ($r=0,98$), но такая связь нарушается ($r=-0,29$), под влиянием этанола (см. табл. 1). Качественно сами по себе ЭА и ФЭА действуют в мозге при этом сходно (соответственно $r=0,62$ и $0,60$), но эффекты этанола снимают только ЭА: при сочетании этанола и ЭА коэффициент корреляции не отличим от контроля и равен $0,90$, а после сочетания этанола и ФЭА он остается таким же ($-0,32$), как и при введении алкоголя. Как и в данных рассмотренных нами ранее, и здесь проявляется яркая зависимость

конечного эффекта от того свободна (ЭА) или заблокирована (ФЭА) гидроксильная группировка в соединении, конкурирующем с этанолом. Сходный антагонизм этанола с ЭА, но не ФЭА прослеживается и по другим нейротрансмиттерным аминокислотам, хотя в одних случаях элиминируются эффекты этанола, а в других — самого ЭА (см. табл. 1). Более общая характеристика состояния процессов торможения и возбуждения в ЦНС в зависимости от уровня свободных аминокислот может быть представлена [7] соответствующими суммами и их взаимоотношениями (табл. 2). Соотношение тормозных и возбуждающих аминокислот, слегка повышающееся под влиянием этанола, нормализуется при совместном с этанолом введении ЭА или ФЭА. Равновесие в рассматриваемом соотношении достигалось при этом с помощью противоположных механизмов — ЭА вместе с этанолом несколько снижал суммарное содержание тормозных, а ФЭА повышал сумму возбуждающих аминокислот.

При анализе взаимосвязей активностей АСТ, АЛТ, ГДГ и ПДГ в мозге можно говорить о нескольких достаточно характерных закономерностях, независимых от наших воздействий. Так, у животных всех групп всегда отрицательны взаимозависимости в парах АСТ/АЛТ или АЛТ/ГДГ и положительны в паре АСТ/ГДГ. В целом это хорошо согласуется с использованием ряда общих субстратов ферментами, о которых идет речь [18]. Одновременно полученные данные свидетельствуют о достаточной независимости процессов переаминирования в мозге от действия относительно невысокой дозы алкоголя на организм животного. Только взаимоотношения АЛТ/ПДГ, взаимозависимые в контроле ($r=0,71$; $p<0,05$), полностью нарушались под влиянием алкоголя ($r=-0,04$).

Всего вероятнее, что основным механизмом отмеченного сдвига могло стать известное [6] изменение соотношения НАДН/НАД в тканях алкоголизованных животных.

В заключение следует отметить, что часть установленных нами закономерностей, по-видимому, носит достаточно общий характер, поскольку взаимоотношения между различными параметрами перекрестно подтверждают друг друга. Практически важным результатом, объясняющим неоднократно уже зарегистрированные [1, 6, 9] положительные эффекты ЭА при алкогольной интоксикации, является установление на метаболическом уровне отчетливо антагонистических отношений между самим этанолом и ЭА. Ближайшей перспективой более детальных исследований в этой области должны стать дифференцирован-

Таблица 2

Суммарное содержание (в мкмоль/г) и соотношение возбуждающих и тормозных аминокислот в мозге крыс, при введении этанола и его структурных аналогов

Показатель	Контроль	Этанол	ЭА	ЭА+этанол	ФЭА	ФЭА+этанол
Тау+Гли+ГАМК	10,12±0,51	11,46±0,95	10,32±0,89	9,57±0,29**	10,16±0,58	9,99±0,49
Глу+Асп	10,26±0,36	9,85±0,13	10,14±0,27	10,14±0,37	10,20±0,37	10,42±0,23*
Тау+Гли+ГАМК Глу+Асп	0,99±0,06	1,16±0,08	1,04±0,11	0,95±0,02*	0,99±0,09	0,96±0,04*

Примечание. Одна звездочка — $p<0,05$, две — $p<0,1$ по отношению к животным, получавшим этанол.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авагимян Э. А., Дурухян С. А., Гюлобазян Т. А., Камалян Р. Г. // Биол. журн. Армении.— 1987.— Т. 40, № 10.— С. 815—819.
2. Анохина И. П., Коган Б. М. // Вопр. наркол.— 1988.— № 3.— С. 3—6.
3. Бенсон Дж., Патерсон Дж. // Новые методы анализа аминокислот, пептидов и белков.— М., 1974.— С. 9—84.
4. Борисенко С. А. // Клинико-биологические основы фармакотерапии алкоголизма.— М., 1987.— С. 69—75.
5. Кометиани П. А. Обмен аминокислот.— Тбилиси, 1967.— С. 99—121.
6. Метаболические предпосылки и последствия потребления алкоголя / Островский Ю. М., Сатановская В. И., Островский С. Ю. и др.— Минск, 1988.
7. Раевский К. С., Георгиев В. П. Медиаторные аминокислоты.— М., 1986.
8. Сытинский И. А. Биохимические основы действия этанола на центральную нервную систему.— М., 1980.
9. Экспериментальная витаминология / Под ред. Ю. М. Островского.— М., 1979.
10. Bergmeyer H. U. // Methods der enzymatischen Analyse.— Weinheim 1962.— S. 851—853.
11. Blum K., Wallace J. E., Ruback R. S., Geller I. // Europ. J. Pharmacol.— 1972.— Vol. 19.— P. 218—222.
12. Cooper A., Plum F. // Physiol. Rev.— 1987.— Vol. 67.— P. 440—519.
13. Hawkins R. A. // Fed. Proc.— 1986.— Vol. 45.— P. 2055—2059.
14. Inoue I., Guskinen T., Kabayashi K., Saheki T. // Biochem. Med. Metab. Biol.— 1987.— Vol. 38.— P. 378—386.
15. Ishibashi M., Nakazawa Y., Yokoyama T. et al. // Drug Alcohol Depend.— 1987.— Vol. 19.— P. 325—332.
16. Lehmann A., Hamberger A. // J. Neurochem.— 1983.— Vol. 41, Suppl.— P. S. 118B.
17. Lerner J. // Comp. Biochem. Physiol.— 1987.— Vol. 87—B.— P. 443—457.
18. Musil Y., Novakova O., Kunz K. Biochemistry in Schematic Perspective.— 1987.
19. Perschak H., Wolfensberger M., Do K. Q. et al. // J. Neurochem.— 1986.— Vol. 46.— P. 1338—1346.
20. Tanaka T., Sakagawa Y., Nishiguchi S. et al. // Alcohol and Alcoholism.— 1988.— Vol. 23.— P. A—72.

Поступила 18.12.89

FREE AMINO ACIDS IN BRAIN OF ALCOHOLIZED ANIMALS TREATED WITH ETHANOLAMINE

S. Yu. Ostrovsky, B. I. Gorenshstein, I. L. Bykov

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Grodno

Content of free amino acids was studied in rat brain after moderately-acute alcohol intoxication (1g/kg of body mass), after administration of ethanolamine (100 mg/kg), phosphoethanolamine (230 mg/kg) and/or combination of these drugs with ethanol. Ethanolamine, as distinct from phosphoethanolamine, removed the effects of alcohol. Structural similarity of ethanol and ethanolamine was apparently responsible for their antagonism.

В. А. Розанов, И. И. Абу Сали, А. Я. Розанов ИЗУЧЕНИЕ НЕЙРОМЕТАБОЛИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ И АНТИГИПОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ВИТАМИННО-КОФЕРМЕНТНОГО КОМПЛЕКСА, ВКЛЮЧАЮЩЕГО ТИАМИНПИРОФОСФАТ, ЛИПОАТ, 4-ФОСФОПАНТОТЕНАТ, НИКОТИНАТ И ФЛАВИНАДЕНИНМОНОНУКЛЕОТИД

Одесский медицинский институт

Ранее было показано, что добавление коферментов пируватдегидрогеназного комплекса — ПДК (тиаминпирофосфат, липоат, CoA, НАД⁺ и ФАД) к суспензии митохондрий печени в определенных молярных соотношениях приводит к выраженной активации окисления пирувата и поглощения O₂, что не может быть достигнуто при добавлении каждого из коферментов в отдельности; при этом наблюдается кооперативность транспорта коферментов в митохондрии [4—6]. Установлено, что компоненты цитоплазматической фракции ускоряют накопление меченых коферментов митохондриями печени [6], и выдвинута гипотеза, согласно которой транспорт коферментов в митохондрии осуществляется в соединении с комплементарными им субъединицами мультиэнзимных комплексов [4]. В последнее время гипотеза находит подтверждение, по крайней мере для тиаминфосфатов [3]. Выяснилось, что взаимодействие витаминов, коферментных ПДК, возможно и на путях их прохождения через гистогематические барьеры и биотрансформации при их сочетанном парентеральном введении [7, 10].

Специфическая активность витаминного комплекса В₁—В₂—В₃—РР—липоат послужила основанием рекомендовать его с целью коррекции метаболизма при гипоксических состояниях [11]. В последнее время обобщены результаты клинических испытаний этих рекомендаций при сердечно-сосудистой патологии [2]. В то же время метаболические эффекты этого сочетания витаминов или коферментов в нервной ткани не изучены. Представляет интерес возможность направленной регуляции метаболизма в нервной ткани с помощью витаминно-коферментного комплекса, включающего наряду с витаминами коферментные формы или их ближайшие предшественники.

В настоящем исследовании приводятся данные о влиянии витаминно-коферментного комплекса, содержащего тиаминпирофосфат, липоат, 4-фосфопантотенат-Na, никотинат-Na и флавинаденинмононуклеотид на альтернативные пути утилизации α-кетоглутарата: α-кетоглутаратдегидрогеназный и ГАМК-трансаминазный (нейроспецифический ГАМК-шунт).

Методика. В опытах использованы белые линейные крысы Вистар обоего пола, массой 180—220 г, и мыши линии Balb/c, самки, массой 18—20 г. Эксперименты проводили в условиях *in vitro* и *in vivo*. В опытах *in vitro* крыс декапитировали, быстро извлекали головной мозг, освобождали его от мягкой мозговой оболочки и внутрижелудочковых сплетений и гомогенизировали в соотношении 1:5 (масса/объем) в бидистиллированной воде. Аликвоты гомогената (200 мг исходной ткани) помещали в инкубационные сосуды для изу-

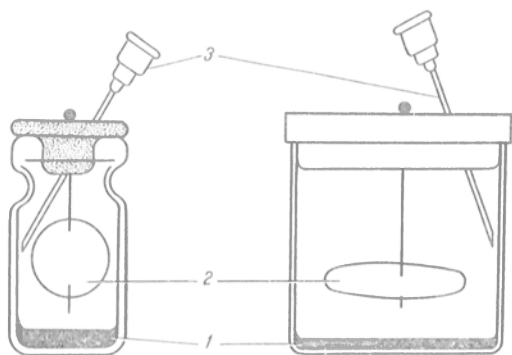


Рис. 1. Инкубационный сосуд для определения интенсивности декарбоксилирования меченых субстратов.

1 — тонкий слой гомогената ткани; 2 — поглотитель $^{14}\text{CO}_2$ (бумажный фильтр, смоченный раствором NaOH); 3 — боковая игла для введения раствора, останавливающего реакцию.

чения выделения $^{14}\text{CO}_2$ (рис. 1) и добавляли комплекс коферментов, содержащий (в мкМ): тиаминпирофосфат (кокарбоксилаза фармакопейная) — 0,03; липоат (фармакопейный) — 0,5; CoASH (фирма «Fluka», 75—90 % чистоты) — 0,3; НАД $^+$ (фирма «Reanal», 85 % чистоты) — 0,5; ФАД (Koch-Light) — 0,06. Пробы преинкубировали в течение 5 мин при 37 °С, после чего добавляли меченые субстраты; 1,4- ^{14}C янтарную кислоту (4,11 ГБк·ммоль $^{-1}$, «Amersham»), 5- ^{14}C α -кетоглутарат (562,4 МБк·ммоль $^{-1}$, «Amersham») и 1- ^{14}C α -кетоглутарат (2,18 ГБк·ммоль $^{-1}$, «Amersham») в концентрации 0,1 мМ; 1- ^{14}C ГАМК (438,08 МБк·ммоль $^{-1}$, Inst. of isotopes, Budapest) и 4- ^{14}C аспарагиновую кислоту (2 ГБк·ммоль $^{-1}$, «Amersham») в концентрации 1 мМ. Инкубационные сосуды герметизировали и инкубировали в течение 10 мин при 37 °С при постоянном перемешивании. Реакцию останавливали добавлением раствора ТХУ (через боковую иглу, до конечной концентрации 6 %), после чего пробы инкубировали еще 10 мин при тех же условиях для более полного поглощения $^{14}\text{CO}_2$ из объема сосуда. Радиоактивность высушенного поглотителя подсчитывали на газопотоочном счетчике 2154-1М «Протока», учитывая коэффициент гашения (≈ 80 %) и степень улавливания, приближающуюся к 100 %, что предварительно определено в модельных экспериментах с $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$.

В экспериментах *in vivo* животным (крысам) вводили внутривенно витаминно-коферментный комплекс следующего состава (в мг·кг $^{-1}$ массы): тиаминпирофосфат (кокар-

боксилаза фармакопейная) — 0,7—1; липоевая кислота (фармакопейная) — 4,6—5; 4-фосфопантотенат-Na (получен из ВНИИ ММП СССР) — 11—12; никотиновая кислота (фармакопейная) — 7,4—7,5; рибофлавинмононуклеотид (фармакопейный) — 3,5—3,7. Комплекс, предварительно нейтрализованный NaHCO_3 до pH 7,2—7,4, вводили пятикратно в течение 2 сут. Контрольным животным вводили эквивалентное по объему количество физиологического раствора. Животных декапитировали через 1 ч после последней инъекции. Головной мозг после стандартной обработки (удаление крови, мозговых синестений, мягкой мозговой оболочки) разделяли на мозжечок, кору и стволую (оставшуюся) часть. Гомогенаты отделов мозга, приготовленные на бидистиллированной воде в соотношении 1:10 (масса/объем), использовали для определения α -кетоглутарат: феррицианид-редуктазной активности (КГДК), активности аспарат- и аланинаминотрансфераз (АСТ и АЛТ), ферментов ГАМК-шунта: глутаматдекарбоксилазы (ГДК) и ГАМК- α -кетоглутаратамино-трансферазы (ГАМК-Т) и содержания глутамата (ГЛ) и ГАМК, как описано ранее [8].

Антигипоксическую активность комплекса оценивали по тесту гипоксии замкнутого пространства. В этих экспериментах использовали мышей и применяли три варианта: 1) помещение животных в индивидуальные герметичные камеры объемом 125 см 3 ; 2) помещение животных группами по 10 штук в камеры объемом 1550 см 3 (жизненный объем на 1 животное 155 см 3); 3) помещение животных группами по 16 штук в камеры объемом 11 000 см 3 (жизненный объем на 1 животное 688 см 3). Исследуемый комплекс в этом случае вводили подкожно, животных помещали в камеру сразу же (через 2—3 мин) после введения раствора. Учитывали среднюю продолжительность жизни (СПЖ) в условиях гипоксии замкнутого пространства и распределение сроков гибели животных.

Результаты экспериментов обработаны статистически с применением методов вариационной и непараметрической статистики [9].

Результаты и обсуждение. Результаты изучения метаболических ответов головного мозга при многократном инъектировании витаминно-коферментного комплекса крысам приведены в табл. 1. Как видно из представленных данных, через 1 ч после последней инъекции комплекса наблюдаются ряд достоверных изменений исследованных показателей. В частности, отмечено вы-

Таблица 1

Характеристика системы метаболизма ГАМК через 1 ч после серии инъекций витаминно-коферментного комплекса $n=8-18$, \bar{X} ($X_{\min}-X_{\max}$)

Показатели	Отдел мозга	Контроль	Опыт
α -КГД-активность, мкмоль α -КГ·г $^{-1}$ ткани·мин $^{-1}$	М	0,515 (0,304—0,609)	0,964* (0,716—1,324)
	К	0,495 (0,358—0,752)	0,808* (0,376—1,074)
	С	0,562 (0,465—0,698)	0,593 (0,304—0,805)
ГДК-активность, мкмоль ГАМК·г $^{-1}$ ткани·мин $^{-1}$	М	0,11 (0,069—0,161)	0,095 (0,058—0,177)
	К	0,113 (0,053—0,191)	0,079 (0,023—0,108)
	С	0,120 (0,059—0,183)	0,123 (0,083—0,224)
«Эндогенная» ГДК-активность, мкмоль	М	0,023 (0,006—0,055)	0,015 (0,010—0,024)
	С	0,027 (0,016—0,045)	0,020 (0,013—0,030)
	С	0,028 (0,012—0,040)	0,014 (0,003—0,032)
ГАМК·г $^{-1}$ ткани·мин $^{-1}$	М	0,327 (0,267—0,419)	0,349 (0,240—0,407)
	К	0,214 (0,178—0,241)	0,307* (0,255—0,481)
	С	0,234 (0,187—0,274)	0,296* (0,225—0,412)
АСТ-активность, мкмоль пирувата·г $^{-1}$ ткани·мин $^{-1}$	М	5,03 (3,33—6,72)	4,14 (3,35—5,55)
	К	3,36 (2,83—3,70)	2,50 (1,90—3,22)
	С	3,70 (3,12—4,50)	2,62* (1,42—3,22)
АЛТ-активность мкмоль пирувата г $^{-1}$ ткани·мин $^{-1}$	М	1,34 (0,38—1,94)	1,17 (0,42—2,09)
	К	0,74 (0,10—1,33)	0,42 (0,33—0,88)
	С	0,82 (0,23—1,28)	0,48* (0,33—0,83)
Содержание ГЛ, мкмоль·г $^{-1}$ ткани	М	8,82 (4,80—12,53)	7,20* (3,28—9,73)
	К	12,01 (7,44—18,42)	8,30* (4,73—11,05)
	С	8,93 (5,60—17,69)	7,67 (5,87—10,00)
Содержание ГАМК, мкмоль·г $^{-1}$ ткани	М	2,72 (1,51—5,68)	2,60 (1,78—3,96)
	К	3,41 (1,44—6,53)	1,68* (1,30—2,62)
	С	2,96 (1,82—6,02)	2,38 (1,30—4,45)

Примечание. Звездочка — $p < 0,05$. М — мозжечок; К — кора; С — стволлая часть. В скобках — пределы колебаний.

раженное усиление утилизации α -кетоглутарата, наиболее отчетливое в мозжечке (+87 %), достаточно выраженное в коре (+63 %) и менее существенное в стволовой части мозга (+6 %). Таким образом, введение комплекса обеспечивает активизацию энергообеспечивающих процессов утилизации α -кетоглутарата. Активность аминотрансферазных систем, в частности АСТ и АЛТ в мозжечке и коре, проявляет тенденцию к снижению, в стволовой части мозга наблюдается достоверное снижение активности АСТ и АЛТ. Изменения со стороны системы метаболизма ГАМК сводятся к следующему. ГДК-активность, как максимальная, так и эндогенная, изменялась незначительно, в то время как ГАМК-Т-активность значительно и достоверно повышалась в коре (+43 %) и стволовой части мозга (+27 %), проявляя тенденцию к повышению в мозжечке (+7 %). Таким образом, α -КГДК-активность и ГАМК-Т-активность, обеспечивающие альтернативные взаимодополняющие пути утилизации α -кетоглутарата в нервной ткани, после введения комплекса достоверно повышаются, что свидетельствует об увеличении пропускной способности цикла Кребса на стадии превращения α -кетоглутарата в сукцинат. Суммарно такое увеличение может быть оценено в пределах 94 % в мозжечке, 106 % в коре и 32 % в стволовой части мозга.

Выявленному увеличению активности исследованных ферментов в нервной ткани соответствует и обнаруженное снижение содержания ГЛ и ГАМК. Достоверное уменьшение уровня ГЛ имело место в ткани мозжечка и коры больших полушарий, а уровень ГАМК достоверно снижался только в коре (см. табл. 1). Суммарное снижение содержания этих аминокислот составило 24 % в мозжечке, 82 % в коре и 34 % в стволовой части мозга.

Это может быть расценено как проявление их ускоренной утилизации в качестве субстратов окисления. Последнее подтверждается в экспериментах с мечеными субстратами *in vitro*. Как видно из представленных данных (рис. 2), преинкубация гомогенатов мозга с витаминно-коферментным комплексом приводит к достоверному

усилению катаболизма $5[^{14}\text{C}]\alpha\text{-КГ}$ и выраженному ускорению катаболизма $1[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ и $4[^{14}\text{C}]\text{аспарагиновой кислоты}$. Декарбоксилирование $1[^{14}\text{C}]\alpha\text{-кетоглутарата}$ и $1,4[^{14}\text{C}]\text{янтарной кислоты}$ при этом существенно не изменялось. Анализируя возможные метаболические механизмы, лежащие в основе суммарного выхода $^{14}\text{CO}_2$ при добавлении перечисленных меченых субстратов, мы обратили внимание на то, что выход $^{14}\text{CO}_2$ при добавлении $1[^{14}\text{C}]\alpha\text{-кетоглутарата}$ осуществляется без участия трикарбоновой стадии цикла Кребса, поскольку в результате декарбоксилирования α -кетоглутарата и образующегося из него ГЛ получают немеченые продукты, в то время как остальные субстраты декарбоксилируются после входа в цикл Кребса на стадии оксалоацетата (фосфоенолпируваткарбоксикиназная реакция) или на стадии изоцитрата и новообразованного α -кетоглутарата. Следовательно, наблюдаемое усиление катаболизма $5[^{14}\text{C}]\alpha\text{-кетоглутарата}$, $1[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ и $4[^{14}\text{C}]\text{аспарагиновой кислоты}$ можно расценивать как проявление активизации множества реакций, обеспечивающих их вход в цикл Кребса и реакций всего цикла Кребса в целом. В связи с этим можно думать, что α -кетоглутарат-феррицианид-редуктазная активность, измеряемая по методу [13], отражает не только прямое восстановление феррицианида за счет окисления α -кетоглутарата, но и за счет других субстратов, концентрация которых возрастает при окислении α -кетоглутарата. Остается непонятным отсутствие активирующего влияния витаминно-коферментного комплекса на катаболизм $1,4[^{14}\text{C}]\text{янтарной кислоты}$. Это обстоятельство не согласуется с предположением об активизации функционирования всего цикла Кребса в целом, однако следует учитывать, что катаболизм $1,4[^{14}\text{C}]\text{янтарной кислоты}$ был наиболее быстрым по сравнению с таковым всех исследованных субстратов, входящих в цикл Кребса. По-видимому, в связи с этим стимулирующее влияние витаминно-коферментного комплекса не было выявлено.

В целом оценка нейрометаболических эффектов использованного витаминно-коферментного комплекса свидетельствует о его общем стимулирующем влиянии на процессы катаболизма энергодающих субстратов и особенно аминокислот, метаболически связанных с циклом Кребса, аспарагиновой и ГАМК. Этот эффект дает основание предполагать наличие антигипоксического действия данного сочетания витаминно-коферментных факторов. Результаты оценки защитного действия комплекса при гипоксии замкнутого пространства подтверждают высказанное предположение (табл. 2). Как видно из представленных данных, однократная инъекция комплекса мышам приводит к достоверному увеличению СПЖ в условиях гипоксии замкнутого пространства, при острой гипоксии (объем на 1 животное 125—155 см³) СПЖ составляет 124—132 % от контроля, а при более мягкой гипоксии — 150 % от контроля.

Таким образом, используемый витаминно-коферментный комплекс оказывает защитное действие при гипоксии замкнутого пространства; можно полагать, что этот его эффект определенным образом связан с его нейрометаболическими эффектами.

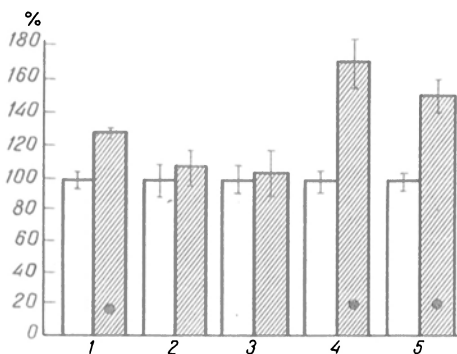


Рис. 2. Влияние преинкубации с комплексом коферментов на интенсивность катаболизма меченых субстратов.

1 — $5[^{14}\text{C}]\alpha\text{-кетоглутарат}$; 2 — $1[^{14}\text{C}]\alpha\text{-кетоглутарат}$; 3 — $1,4[^{14}\text{C}]\text{янтарная кислота}$; 4 — $1[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$; 5 — $4[^{14}\text{C}]\text{аспарагиновая кислота}$. По оси ординат — уровень радиоактивности, % от контроля (без комплекса коферментов). Светлые столбики — интенсивность декарбоксилирования без преинкубации; заштрихованные — с преинкубацией. Темный кружок — достоверно значимые различия.

Таблица 2

СПЖ мышей (в секундах) в условиях гипоксии замкнутого пространства при защите витаминно-коферментным комплексом

Условия опыта	Контроль	Опыт
Пребывание в индивидуальных камерах объемом 125 см ³	742±15 (47)	982±208 (8)
Пребывание в камере группами:		
объем на 1 животное 155 см ³	1104±34 (50)	1378±41 (10)
объем на 1 животное 688 см ³	5712±215 (80)	8538±728 (14)

Примечание. В скобках — число опытов.

фектами: активизацией энергообеспечивающих реакций цикла Кребса, компенсаторного ГАМК-шунта, ускорением использования аминокислот, в частности, АСП и ГАМК по пути катаболизма в нервной ткани. В то же время следует учитывать, что механизмы действия витаминов и коферментов, входящих в состав комплекса, без сомнения не ограничиваются влиянием на цикл Кребса и ГАМК-шунт, несмотря на подбор соотношений между компонентами, соответственно их естественным соотношениям в составе ПДК. Эффекты каждого из компонентов множественны и могут быть реализованы через триггерные некоферментные механизмы [1]. Однако, как свидетельствуют экспериментальные и клинические данные, сочетанное применение коферментных пируватдегидрогеназе витаминов более эффективно, чем их раздельное применение [12], а данные настоящей статьи свидетельствуют о целесообразности сочетанного применения ряда готовых коферментных форм, выпускаемых промышленностью в сочетании с витаминными препаратами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Виноградов В. В. Некоферментные функции витамина РР.— Минск, 1987.
2. Межвитаминные отношения при ишемической болезни сердца и гипертонической болезни / Борец В. М., Мирончик В. В., Артаева Л. П. и др.— Минск, 1988.
3. Метаболические эффекты недостаточности функционально связанных В-витаминов / Под ред. Ю. М. Островского.— Минск, 1987.
4. Розанов А. Я., Дьяченко Л. Ф., Карпов Л. М. и др. // Всесоюзный биохимический съезд: Тезисы докладов.— Ташкент, 1969.— Секц. 14.— С. 42—43.
5. Розанов А. Я., Ву Ван Ань, Петров С. А. // Укр. биохим. журн.— 1973.— Т. 45, № 3.— С. 338—341.
6. Розанов А. Я., Карпов Л. М., Петров С. А. // Там же.— 1985.— Т. 57, № 3.— С. 71—74.
7. Розанов А. Я., Якубик Э. Ю. // Биохимия.— 1985.— Т. 50, № 9.— С. 1399—1405.
8. Розанов В. А., Карпов Г. А., Сергеева О. Н. // Вопр. мед. химии.— 1988.— № 1.— С. 29—33.
9. Сепетлиев Д. Статистические методы в научных медицинских исследованиях.— М., 1968.
10. Филиппова Т. О., Карпов Л. М., Розанов В. А. // Укр. биохим. журн.— 1978.— Т. 50, № 2.— С. 193—195.
11. Хмелевский Ю. В., Розанов А. Я. Обмен витаминов при заболеваниях сердечно-сосудистой системы.— Киев, 1975.
12. Шилов П. И., Яковлев Т. Н. Основы клинической витаминологии.— Л., 1968.
13. Gubler C. J. // J. biol. Chem.— 1961.— Vol. 236, N 12.— P. 3112—3120.

Поступила 13.04.89

NEUROMETABOLIC AND ANTIHYPoxic ACTIVITIES OF THE VITAMIN-COENZYME COMPLEX CONTAINING THIAMIN PYROPHOSPHATE, LIPOATE, 4-PHOSPHOPANTOTHENATE, NICOTINATE AND FLAVINADENINE MONONUCLEOTIDE

V. A. Rozanov, I. I. Abu Asali, A. Ya. Rozanov

Medical School, Odessa

Administration of the vitamin-coenzyme complex containing thiamin pyrophosphate:lipote:4-phosphopantothenate:nicotinate:flavinadenine mononucleotide (0.2:3:5:8:1) led to increased utilization of α -ketoglutarate in nervous tissue via α -ketoglutarate dehydrogenase and GABA-transaminase pathways. In these systems content of glutamate and GABA was decreased, suggesting their elevated consumption as energy-providing substrates. If 4-phosphopantothenate was substituted by CoASH and nicotinate — by NAD⁺, increased decarboxylation of 5-¹⁴C- α -ketoglutarate, 1-¹⁴C-GABA and 4-¹⁴C-Asp was detected in brain homogenates *in vitro*. The neurometabolic effects were accompanied by pronounced antihypoxic effects as shown by the test «hypoxia of closed space».

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.98:579.861.1]-031.81:06:616.153.1]-07-616.153.915

И. М. Рослый, А. С. Миримский, И. Г. Ремизова, В. А. Юркив

РОЛЬ ЛИПИДНЫХ КОМПОНЕНТОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ В ЦИТОЛИЗЕ ПРИ ГЕНЕРАЛИЗОВАННОЙ МЕНИНГОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ

ЦНИИ эпидемиологии Минздрава СССР, Москва

Ухудшение состояния больных при менингококковой инфекции (МИ) сопровождается органами поражениями [9, 10, 14], одним из признаков которых в остром периоде и динамике заболевания является значительная и длительная гиперферментемия. Гиперферментемия характеризует тяжесть течения МИ и отмечается при различных клинических формах [7]. Причинами ее могут быть иммунокомплексное поражение, активация фосфолипаз, а также усиление перекисного окисления липидов [1]. При генерализации МИ наряду с перечисленным могут усиливать цитоллиз и другие механизмы.

Один из наиболее характерных биохимических показателей тяжести состояния при МИ — стойкая и длительная гиперлипопротеинемия [9, 10, 13, 14], которая может быть результатом тромбогеморрагического синдрома, поражения микрососудов с повреждением эндотелия, а также следствием адаптационных изменений в начальную фазу стресса [6]. Гиперлипопротеинемия сочетается с повышенным уровнем жирных кислот [6], которые наряду с бактериально-токсическими компонентами относятся к субстратам токсикоза и способны вызывать цитоллиз [16, 17].

Цель данной работы — изучение динамики липидных компонентов сыворотки в период самых значительных энзимологических сдвигов в исследуемой крови.

Методика. Исследование крови проведено у 20 больных МИ тяжелого течения в возрасте от 32 до 54 лет на 1, 2

и 20-е сутки заболевания. Хромографический анализ липидных компонентов проводили, как описано ранее [4]. Уровень активности ферментов АСТ (аспартаттрансаминазы), АЛТ (аланинтрансаминазы), КФК (креатинфосфокиназы), ЦФ (щелочной фосфатазы) определяли с использованием наборов фирмы КОНЕ (Финляндия), а уровень бета-липопротеинов (БЛП) по методу Бурштейн и Самай [3] на биохимическом анализаторе ОЛЛИ-3000 (Финляндия).

Результаты и обсуждение. Динамическое наблюдение за основными биохимическими показателями крови у больных с тяжелым течением МИ показало [9—11, 13, 14], что гиперферментемия — характерная особенность осложненных форм МИ и свидетельствует о полиорганности процесса, а выраженность ее во многом определяет тяжесть течения заболевания. Септический статус больных усиливает органную патологию [11], в которой центральное место занимают сердечно-сосудистые расстройства с элементами цереброкордиального синдрома. При этом степень изменения показателей коррелирует с тяжестью течения заболевания.

Достоверно меняется уровень общего белка с максимальных значений на 1-е сутки ($85,06 \pm 9,6$ г/л) за счет преимущественно гиперфибриногенемии (уровень выше 650 мг%) до минимальных значений ($67,7 \pm 9,1$ г/л) на 5—7-е сутки заболевания на фоне гипоальбуминемии (уровень альбумина ниже 40 г/л), что свидетельствует о снижении белковосинтетической функции печени при наличии признаков ее поражения [9] и усилении катаболизма белков на 7—10-е сутки заболевания. В первые 5 сут заболевания при любом исходном уровне, который зависит от возраста и пола больного, отмечается повышение БЛП разной степени выраженности.

Как видно из таблицы, на 1-е сутки уровень БЛП составил 644 ± 112 мг%, на 2-е сутки — 524 ± 138 мг%, достигая максимума на 20-е сутки, т. е. к моменту улучшения состояния. Алиментарные БЛП выполняют транспортную функцию и поэтому повышение их уровня в остром периоде указывает на временное ухудшение утилизации в тканях за счет микроциркуляторных расстройств [15], снижения липолиза за счет тромбгеморрагического синдрома, а также функциональных нарушений печени.

Ведущим патофизиологическим феноменом генерализованной МИ является снижение сократительной способности миокарда, отмечаемое у всех больных [5], которое является следствием кислородно-субстратного блока на уровне микроциркуляции [8, 15] в острой фазе заболевания, а также поражения сердца [10].

Нарушение транскапиллярного газообмена при МИ [7] свидетельствует о дефиците кислорода, поступающего в клетки для окисления субстратов, в том числе жирных кислот. Результатом снижения сократительной способности миокарда на фоне высокого периферического сопротивления [5, 14, 15] является формирование гиподинамического типа кровообращения, для которого характерен повышенный уровень БЛП и фибриногена [2]. Снижение кислорода в тканях и ухудшение окисления жирных кислот должно сопровождаться повышением их уровня в крови.

Адаптация метода газохромографического анализа липидов [4] для изучения сыворотки крови при инфекционной патологии позволила оценить характер изменения липидного профиля у крайне тяжелых больных с признаками поражения сердца, мозга, печени и присоединением осложнений в виде отека мозга. Из всех выделяемых пиков липидного профиля нами отобраны 6 компонентов с длинной углеводной цепочкой, которые соответствовали миристиновой $C_{14:0}$, пальмитиновой $C_{16:0}$, стеариновой $C_{18:0}$, арахидоновой $C_{20:0}$, а также 2 ненасыщенные кислоты — олеиновой $C_{18:1}$ и линолевой $C_{18:2}$. Анализ их процентного содержания показал, что они подвержены наибольшим изменениям в динамике. Содержание их было максимальным (10,8 %) в 1-е сутки, а затем происходило их снижение (до 3,39 %) к 20-м суткам на фоне менее выраженных изменений других компонентов жирно-кислотного спектра. Таким образом, гиперлипидемией острого периода соответствовало повышение содержания длинноцепочечных жирных кислот.

Экспериментальными исследованиями установлено, что токсичность свободных жирных кислот [16, 17] зависит от длины углеводной цепочки с максимальным эффектом у C_{16} и C_{18} , ее насыщенности и длительности воздействия. Жирные кислоты обладают сильным повреждающим воздействием на клетки миокарда и клетки эндотелия, а суммарный токсический эффект зависит не только от жирно-кислотного состава, но и времени экспозиции, которое должно составлять 2—36 ч. Таким образом, наряду с детергентным действием и способностью разобщать окисление и фосфорилирование жирные кислоты обладают и прямым цитолитическим эффектом. Гиперферментемия при тяжелом течении МИ может быть результатом не только названных выше механизмов цитолиза [1], но и детерминироваться жирными кислотами, если их метаболизм по какой-то причине задерживается.

Результатом субстратно-газообменных нарушений в сердце является повышение уровня «сердечных» ферментов — КФК и АСТ — в крови, которое, как установлено нами ранее, характерно для этой категории больных [10]. В наших исследованиях указанная особенность подтвердилась на примере АСТ и КФК, содержание которых в 1-е сутки составило $39,6 \pm 12,4$ и 332 ± 141 МЕ/л соответственно, на 2-е сутки (см. таблицу) было существенно выше — $71,5 \pm 21$ и 1029 ± 215 МЕ/л соответственно, т. е. усилению цитолиза на 2-е сутки предшествовало повышение в крови БЛП и длинноцепочечных жирных кислот. К 20-м сут-

Динамика содержания ферментов и липидных компонентов сыворотки у больных менингококковой инфекцией

Наименование ферментов	Время заболевания, сутки		
	1-е	2-е	20-е
АСТ, МЕ/л	$39,6 \pm 12,4$	$71,5 \pm 21$	$23,5 \pm 11$
КФК, МЕ/л	332 ± 93	1029 ± 215	122 ± 21
АЛТ, МЕ/л	$46,7 \pm 11,4$	$51 \pm 13,5$	$38,6 \pm 13,9$
ЦФ, МЕ/л	124 ± 36	139 ± 47	119 ± 54
БЛП, мг%	644 ± 112	524 ± 138	701 ± 198
Содержание длинноцепочечных жирных кислот, %	$10 \pm 1,8$	$9,78 \pm 1,73$	$3,39 \pm 1,02$

Примечание. Уровень ферментов в контрольной группе (здоровые доноры): АСТ — $21,7 \pm 6,3$ МЕ/л, КФК — $10,3 \pm 4,1$ МЕ/л, АЛТ — $14,3 \pm 4,8$ МЕ/л, ЦФ — $61,5 \pm 23,4$ МЕ/л, БЛП — 309 ± 69 мг%, содержание ДЖК — $3,02 \pm 0,89$ %.

кам отмечалась практически полная нормализация уровня активности ферментов в крови при нормализации уровня жирных кислот. В модельных экспериментах [16, 17] по выявлению токсического действия жирных кислот длительность экспозиции фактически соответствовала времени нарастания активности ферментов. Таким образом, фракция длинноцепочечных жирных кислот может участвовать в возникновении цитолитического эффекта на клетки миокарда, особенность метаболизма которых зависит от жирных кислот как источника энергии, но способность защищаться от их токсического действия переводом их в менее токсичные триглицериды крайне низка [16, 17].

Динамика изменения ферментов «печеночной» группы иная: уровень активности АЛТ в 1-е сутки $46,7 \pm 11,4$ МЕ/л, на 2-е сутки $51 \pm 13,5$ МЕ/л, а на 20-е сутки $38,6 \pm 13,9$ МЕ/л с крайне монотонным повышением ЩФ в 1,5—2 раза в те же сроки. Отсутствие пиковых выбросов ЩФ указывает на ее, возможно, эндотелиальное происхождение, где она богато представлена, а тотальное повреждение микрососудов характерно для МИ, особенно смешанной ее формы [7, 15]. Клетки эндотелия также подвержены действию жирных кислот [16, 17], но могут их использовать только при низком уровне концентрации. Токсичность жирных кислот снижается при их связи с альбуминами, однако у обследованных нами больных обычно отмечается стойкая гипоальбуминемия, которая также может способствовать усилению липидного звена цитолиза.

Таким образом, проведенные исследования показывают возможную роль насыщенных и ненасыщенных длинноцепочечных жирно-кислотных компонентов в формировании цитолиза у больных генерализованными формами МИ. Указанный механизм не является единственным в повреждении миокардиоцитов, однако его роль может быть существенной с первых суток заболевания, когда перекисный механизм окисления еще не достиг своего максимального уровня [13], а его эффект может контролироваться компонентами антиоксидантной системы [12].

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю. А. Роль нарушений барьерной и матричной функций липидного слоя мембран в патологии: Актовая речь. — М., 1986.
2. Задионченко В. С., Копалова М. С., Гороховская В. И. // Кардиология. — 1983. — № 3. — С. 33—36.
3. Колб В. Г., Камышинов В. С. Справочник по клинической химии. — Минск, 1982.
4. Линберг Л. Ф., Миримский А. С., Попов С. А. и др. // Вопр. мед. химии. — 1988. — № 4. — С. 33—36.
5. Мельник Г. В. Нарушение сократительности миокарда и периферического кровообращения у больных генерализованной менингококковой инфекцией: Дис. ... канд. мед. наук. — М., 1978.
6. Панин Л. Е. Биохимические механизмы стресса. — Новосибирск, 1983.
7. Покровский В. И., Фаворова И. М., Костюкова И. И. Менингококковая инфекция. — М., 1976.
8. Покровский В. И., Булычев В. В., Серегин В. И. // Анест. и реаниматол. — 1978. — № 6. — С. 69—73.
9. Радзивил Г. Г., Рослый И. М. // Тер. арх. — 1988. — № 2. — С. 59—64.
10. Радзивил Г. Г., Рослый И. М. // Там же. — № 11. — С. 53—57.
11. Радзивил Г. Г., Рослый И. М. // Журн. невропатол. и психиатр. — 1989. — № 2. — С. 10—15.

12. Ромм А. Р., Рослый И. М., Козлов А. В. и др. // Бюл. exper. биол. — 1988. — № 6. — С. 672—674.
13. Рослый И. М., Ромм А. Р., Козлов А. В. и др. // Там же. — 1987. — № 6. — С. 672—674.
14. Рослый И. М., Радзивил Г. Г. // Клини. мед. — 1989. — № 4. — С. 54—58.
15. Титов В. В. // Клинические и экспериментальные аспекты регуляции агрегатного состояния крови. — Саратов, 1984. — С. 59—61.
16. Wenzel D. G., Hale T. W. // Toxicology. — 1978. — Vol. 11. — P. 109—117.
17. Wenzel D. G., Hale T. W. // Ibid. — P. 119—125.

Поступила 18.12.89

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.851.7-076:616.155.1-018.1:576.314

С. Ф. Захаров, А. М. Шандаля, М. В. Щеглова, П. С. Громов, Н. Г. Инсарова, В. А. Сыцова, Е. Д. Маркова, С. С. Шишкин, И. А. Иванова-Смоленская

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В НОРМЕ И БОЛЬНЫХ ХОРЕЕЙ ГЕНТИНГТОНА

Институт медицинской генетики АМН СССР, Институт неврологии АМН СССР, Москва

Хорея Гентингтона (ХГ) — прогрессирующее наследственное заболевание центральной нервной системы с аутомно-доминантной передачей. Исследования, направленные на выяснение молекулярных причин и основ патогенеза при ХГ, особенно интенсифицировались после получения ДНК-зонда, пригодного для диагностики ХГ методом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов [16]. Однако, несмотря на все усилия первичный биохимический дефект и молекулярные механизмы патогенеза этого заболевания остаются пока не выясненными. Одной из популярных гипотез патогенеза ХГ является предположение о существовании при ХГ генерализованного мембранного дефекта [4]. Поиск доказательств дефектности клеточной мембраны при ХГ чаще всего велись на культивируемых фибробластах и эритроцитах [5, 9]. В данной работе было проведено сравнительное исследование эритроцитов больных ХГ и здоровых доноров по характеристикам, отражающим состояние клеточной мембраны: осморезистентность, плавучая плотность, активность К, Na насоса, а также белковый состав мембраны эритроцита.

Методика. В работе использовали образцы венозной крови 14 больных ХГ, диагноз которым был установлен в отделении нейрогенетики Института неврологии АМН СССР. Кровь здоровых доноров получали на донорском пункте ВОИЦ АМН СССР.

Среди обследованных больных было 3 женщины и 11 мужчин в возрасте от 27 до 58 лет с длительностью заболевания от 5 до 12 лет. Клиническая картина заболевания у большинства больных [13] складывалась из гиперкинетического синдрома хореического характера и интеллектуально-мнестических нарушений различной степени выраженности (гиперкинетическая форма). Один больной страдал ригидным вариантом заболевания: основным синдромом клинической картины заболевания у него был акинетико-ригидный синдром с нарушением речи, глотания, походки в сочетании с деменцией и нерезко выраженным хореическим гиперкинезом. Легкая степень выраженности клинического синд-

рома отмечена у 2 больных, средняя — у 6, тяжелая также у 6 больных.

Получение эритроцитов и их фракционирование в градиенте плотности Фиколла

Лейкоциты и тромбоциты удаляли при осаждении эритроцитов в 1,5 % декстране-500 на 0,15 М NaCl, 5 мМ Na-фосфатном буфере pH 7,4 с последующим пропусканием эритроцитарной массы через HBS-целлюлозу. Эритроциты наслаивали на 6-ступенчатый градиент плотности Фиколла [3] со следующими значениями плотности: 1 — 1,075 г/мл, 2 — 1,083 г/мл, 3 — 1,089 г/мл, 4 — 1,095 г/мл, 5 — 1,100 г/мл, 6 — 1,105 г/мл и центрифугировали в роторе SW-27 в течение 90 мин при 25 000 об/мин.

Получение теней эритроцитов

Клетки различных фракций отмывали в 0,15 М NaCl, 5 мМ Na-фосфатном буфере pH 7,4 и центрифугировали 3 раза в течение 10 мин при 2000 g. Осажденные эритроциты были гемолизированы по Dodge [7].

Двухмерный электрофорез белков мембраны эритроцитов

Все процедуры двухмерного электрофореза были проведены по методу О'Фаррелла [13]. Некоторые модификации были введены при осуществлении изоэлектрофокусирования и описаны ниже. Лиофилизированные тени эритроцитов смешивали с раствором, содержащим 9,5 М мочевины, 3 % тритона X-305, 0,1 % бромида цетилтриметиламмония, 3 % β -меркаптоэтанола, 2 % амфолинов pH 3—9,5 (LKB, Швеция). Гели длиной 10 см готовили согласно методу О'Фаррелла, за исключением того, что тритон X-100 был заменен на тритон X-305. Гели фокусировали в течение 24 ч при 18 В/см и 2 ч при 50 В/см. Использование тритона X-305 требовало повышения температуры, при которой проводили все этапы ИЭФ до 30 °C. Второе направление осуществляли обычным способом в системе Леммли в градиенте акриламида 5—25 %. Гели окрашивали кумасси R-250.

Анализ Na, K-АТФазной активности в препаратах эритроцитарных мембран проводили методом [11] с увеличением времени инкубации проб до 60 мин, как рекомендовано [14]. Содержание белка в пробах определяли методом Лоури [12]. Осморезистентность эритроцитов определяли согласно описанию в публикации [6]. Ретикулоциты выявляли микроскопией препаратов после окраски креозоловым синим.

Результаты и обсуждение. В настоящее время накоплено достаточное количество экспериментальных данных в пользу того, что у больных ХГ клеточная мембрана дефектна [4, 5]. Это предположение находит, в частности, косвенное подтверждение в том, что некоторые интегральные характеристики эритроцитов у обследованных нами больных ХГ заметно отличаются от соответствующих свойств клеток здоровых доноров. Одной из таких характеристик, непосредственно связанных с состоянием эритроцитарной мембраны, является осмотическая резистентность эритроцитов. Как показали проведенные исследования, гемолиз был повышен у 11 больных (78,5 %), снижен у 1 (7,3 %), в пределах нормы у 2 (14,2 %), что в среднем составляет $34,0 \pm \pm 2,3$ % и достоверно отличалось от здоровых доноров контрольной группы ($23,4 \pm \pm 2,7$ %, $p < 0,05$). Соответственно осмотическая резистентность в группе больных была достоверно снижена ($66,6 \pm \pm 3,3$ %) по сравнению со здоровыми донорами ($75,5 \pm \pm 3,0$ %). Корреляции между тяжестью клинического синдрома и степенью нарушений гемолиза и осмотической резистентностью не выявлено.

Учитывая, что нарушение осмотической резистентности эритроцитов может развиваться при различных соматических заболеваниях (поражениях печени, желудка, анемиях и др.), мы исследовали морфологический состав периферической крови.

Индексы эритроцитов лишь в 2 случаях свидетельствовали о легкой нормохромной анемии, у 1 больного цветовой показатель (ЦП) был выше единицы при умеренном снижении числа эритроцитов, в 2 случаях ЦП равнялся 0,7. В остальных случаях существенных изменений в картине красной крови не обнаружено. Средний диаметр эритроцитов у всех больных несколько увеличен и колебался от 7,6 до 8,6 мк. Среди макроцитов у 3 больных с ХГ найдены единичные гигантоциты и мегалоциты 110,5—11,5 мк с гемоглобином, заполнявшим без просвета всю клетку. Число ретикулоцитов в периферической крови не превышало 2,6 %, чаще всего было в пределах нормы (0,7—1,1 %). При исследовании качественных показателей морфологического состава крови не обнаружено ни мишенистых клеток, ни стоматитов, ни других морфологических аномалий. Ни у одного больного не выявлено каких-либо клинических признаков желтухи.

Одним из факторов, определяющих устойчивость эритроцитарной мембраны к осмотическому шоку, кроме структурных аномалий мембраны, является активная и пассивная проницаемость мембраны эритроцита для низкомолекулярных ионов, прежде всего K и Na. В связи с этим для нас представляла интерес оценка активности K, Na-АТФазы как основного компонента K⁺, Na⁺ насоса у больных ХГ.

Полученные результаты свидетельствуют, что у всех больных ХГ активность K, Na-АТФазы в сравнении с нормой значительно увеличена ($135 \pm \pm 46,5$ и $27,5 \pm \pm 9,4$ нмоль/ч/мг белка соответственно). Несмотря на значительную вариабельность значений как у здоровых доноров (контрольная группа), так и у больных ХГ средние значения активности K, Na-АТФазы в группе последних превышают соответствующие значения в норме более чем в 4 раза. Эти данные согласуются с результатами ряда авторов [16], но не подтверждаются другими [8].

Такая неоднозначность полученных результатов в сравнении с данными литературы, возможно, объясняется существованием выраженного клинического полиморфизма ХГ.

Представления о генерализованном мембранном дефекте при болезни ХГ предполагают поиск соответствующего молекулярного маркера в липидной и белковой составляющей мембран эритроцитов. Попытки обнаружить первичный биохимический дефект при ХГ на уровне белкового компонента эритроцитарной мембраны с помощью одномерного электрофореза в полиакриламидном геле, согласно методу Леммли, предпринимались неоднократно. Так, в частности, сообщалось о наблюдавшихся отличиях в белковом составе мембран среди группы 4,5 (по номенклатуре Стэка Хеста) [15]. В нашей лаборатории метод двухмерного электрофореза по О'Фарреллу был модифицирован в применении к мембранным белкам эритроцитов, что позволило получать хорошо воспроизводимые электрофореграммы, на которых удастся идентифицировать около 200 белков [1]. На основе разработанной модификации мы приняли сравнительный анализ мембранных белков эритроцитов у больных ХГ.

На рис. 1, см. вклейку представлены двухмерные электрофореграммы белков мембран эритроцитов.

роцитов у пациентов с ХГ и здорового донора, окрашенные кумасси R-250. Визуальный анализ двухмерных электрофореграмм 20 больных с ХГ в сравнении с нормой ($n=18$) не выявил достоверных различий в белковом составе мембран эритроцитов у обследованных лиц ни по локализации на электрофореграммах, ни по количественной представленности. Количественные вариации белка в различных пятнах затрагивают, как нами было показано раньше [1], в основном компоненты смешанной локализации между мембраной и цитозолем. Наиболее сильно варьирующие среды них на рис. 1 обозначены стрелками. Возможно, что описанные ранее изменения в представленности одного из белков группы 4,5 у больных с ХГ [15] объясняются именно тем, что 1 из наиболее представленных фракций этой группы белков (см. рис. 1, белок 4.5.1) относится к слабо ассоциированным белкам, преимущественно цитозольной локализации, и ее представленность в препаратах эритроцитарных мембран зависит от характера отмывки мембран от цитозольных компонентов, а также вероятно от функционального состояния эритроцитов. Во всяком случае достоверной корреляции между различной представленностью ряда белков в препаратах мембран у пациентов с диагнозом ХГ обнаружить не удалось. Лишь у 1 больного была обнаружена существенная особенность в зоне белков группы 7, предварительно определенных как немышечные тропомиозины, присутствовал дополнительный белок с $M_r=30\,000$ и $\alpha\text{PI}-1=-0,25$, обозначенный на рис. 1, б контуром. Вероятнее всего эта находка не имеет отношения к ХГ, а отражает индивидуальную особенность экспрессии генома в клетках эритроидного ряда у данного лица (биохимический полиморфизм).

Мы проанализировали также белковый состав мембран эритроцитов больных ХГ и здоровых людей в процессе старения эритроцитов. С этой целью полученные описанным выше методом эритроциты фракционировали по возрасту в ступенчатом градиенте плотности фиколла-400 (рис. 2, см. вклейку). Результаты фракционирования позволили обнаружить существенную особенность: почти у всех обследованных больных ХГ наблюдалось относительное увеличение доли медленно оседлывающей фракции эритроцитов, что визуально выражалось в том, что у больных ХГ практически всегда выявлялась дополнительная, самая легкая фракция, практически не обнаруживаемая у здоровых лиц. Следует отметить, что представленность указанной фракции сильно варьировала, а у 2 больных из 14 обследованных по этому методу ее не удалось выявить. Цитологическое исследование полученных фракций показало, что эта наиболее легкая фракция почти полностью представлена ретикулоцитами. Двухмерный анализ белкового состава мембран эритроцитов, фракционированных по возрасту указанным выше методом, также не выявил существенных различий в динамике изменения белкового состава мембран эритроцитов в процессе их старения у больных ХГ и здоровых лиц, что указывает на отсутствие изменений в составе специфических эндопротеаз, участвующих в старении эритроцитов.

Однако комплекс полученных данных, указы-

вающих на четкие изменения резистентности эритроцитов и K^+ , Na^+ -АТФазной активности, может свидетельствовать о существовании патологии клеточных мембран при ХГ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Громов П. С., Захаров С. Ф., Шишкин С. С., Ильинский Р. В. // Биохимия.— 1988.— Т. 51, № 8.— С. 1316—1326.
2. Захаров С. Ф., Громов П. С., Шишкин С. С. // Вопр. мед. химии.— 1988.— № 3.— С. 139—142.
3. Шандала А. М., Захаров С. Ф., Громов П. С., Шишкин С. С. // Гематол. и трансфузиол.— 1987.— № 10.— С. 28—31.
4. Beverstock J. C. et al. // Hum. Genet.— 1984.— Vol. 66.— P. 115—131.
5. Butterfield D. A. et al. // Advanc Neurol.— 1979.— Vol. 23.— P. 397—408.
6. Dacie J. V. Practical Haematology.— 2-nd. Ed.— Edinburgh, 1958.
7. Dodge J. T. et al. // Arch. Biochem.— 1963.— Vol. 100.— P. 119.
8. Dubbelman T. M. et al. // J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.— 1981.— Vol. 44.— P. 570—573.
9. Fung L. W. M. et al. // Amer. J. hum. Genet.— 1982.— Vol. 34.— P. 469—480.
10. Guzella J. F. et al. // Science.— 1984.— Vol. 225.— P. 1320—1326.
11. Klodos J. et al. // Analyt. Biochem.— 1975.— Vol. 67.— P. 397—403.
12. Lowry O. H. et al. // J. biol. Chem.— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
13. O'Farrell P. H. // Ibid.— 1975.— Vol. 250.— P. 4007—4021.
14. Reznik V. M. et al. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1986.— Vol. 137.— P. 1021—1031.
15. Shishkin S. S. et al. // European Society Human Genetics, 18-th: Symposium.— Budapest, 1985.— P. 110.
16. Zanella A. et al. // J. neurol. Sci.— 1980.— Vol. 47.— P. 93—103.

Поступила 25.04.89

HUMAN BLOOD ERYTHROCYTES UNDER CONDITIONS OF NORMAL STATE AND IN HUNTINGTON'S CHOREA

S. F. Zakharov, A. M. Shandala, M. V. Tscheglova, P. S. Gromov, N. G. Insarova, V. A. Sychova, S. S. Shishkin, I. A. Ivanova-Smolenskaya

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

Erythrocytes of healthy volunteers and of patients with hereditary chorea were studied. Evaluation of the state of cellular membrane was carried out by measuring osmotic resistance, activity of Na^+ , K^+ -ATPase and protein composition. In the patients osmotic resistance of erythrocytes was distinctly decreased down to 66.3 ± 3.3 , while the Na^+ , K^+ -ATPase activity was increased 4-fold as compared with controls. Protein composition of erythrocyte membranes, studied by means of two-dimensional electrophoresis, was similar both in healthy persons and in patients with hereditary chorea when the electrophoregrams were analyzed visually. An additional protein with $M_r=30,000$ and $r=1-0.25$ was detected in one of the patients. Slowly sedimenting fraction of erythrocytes was found in almost all the patients with hereditary chorea when erythrocytes ageing was studied by means of fractionation in Ficoll density gradient. The fraction was not observed in healthy persons. These data suggest that the cell membranes in Huntington's chorea are altered as compared with normal state.

А. Е. Медведев

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ ЛИДОКАИНОМ И АМИНАЗИНОМ α АМФ-ЗАВИСИМОЙ СТИМУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ МИТОХОНДРИЙ

Красноярский медицинский институт

Несмотря на многочисленные данные о стимуляции энергетических функций митохондрий α АМФ и гормонами, активирующими аденилатциклазу, механизмы действия α АМФ остаются невыясненными [3, 4, 13, 22]. α АМФ-зависимая активация некоторых ферментов матрикса (НАД-изоцитратдегидрогеназы) и внутренней мембраны (трансгидрогеназы) сохраняется после солюбилизации митохондрий, что свидетельствует в пользу изменений каталитических свойств самих ферментов [13]. α АМФ действует на сами митохондрии [3, 5, 6], его влияние на активность окислительных ферментов носит опосредованный характер и для проявления эффекта α АМФ необходимы преинкубация и целостность внутренней мембраны митохондрий [5, 6].

Одним из традиционных подходов при изучении мембранно-зависимых процессов является модификация мембран, которая может вызываться различными способами [1]. Фармакологические препараты из группы местных анестетиков и родственных им соединений фенотиазинового ряда являются удобным инструментом, обеспечивающим быстрое изменение физико-химических свойств мембран [1, 2, 15]. Поэтому представлялось полезным использование этих веществ в анализе α АМФ-зависимой стимуляции функций митохондрий.

Целью настоящей работы было изучение влияния местного анестетика лидокаина и производного фенотиазина — аминазина (хлорпромазина) — на чувствительность окислительных ферментов митохондрий к действию α АМФ. Объектами исследования послужили фермент матрикса — НАД-изоцитратдегидрогеназа (КФ 1.1.1.41) и внутренней мембраны — трансгидрогеназа (КФ 1.6.1.1), активность которых повышается после инкубации митохондрий с α АМФ [3, 5, 6].

Методика. Работа выполнена на 60 крысах линии Вистар обоего пола массой 150—250 г. Животных наркотизировали внутривенной инъекцией тиопентала натрия (50 мг/кг). В опытах *in vivo* лидокаин (10 мг/кг внутримышечно) или аминазин (5 мг/кг подкожно) вводили за 23—25 и 20 мин соответственно до умерщвления. Митохондрии из печени выделяли традиционным методом дифференциального центрифугирования в среде, содержащей 0,25 М сахарозу, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ трис-НСI-буфер (рН 7,5) [16]. Условия инкубации митохондрий с α АМФ описаны ранее [6]. Лидокаин и аминазин (в ампулах) вносили в среду инкубации за 2—3 мин перед α АМФ. Активность ферментов определяли после обработки митохондрий 1 % раствором тритона X-100 [3, 6, 13]: НАД-изоцитратдегидрогеназы — как описано [17], трансгидрогеназы — с использованием НАДФН-регенерирующих систем [19]. Белок измеряли биуретовым методом с бычьим сывороточным альбумином в качестве стандарта [11]. Серии сравнивали между собой, используя критерий t Стьюдента для связанных и несвязанных выборок. Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

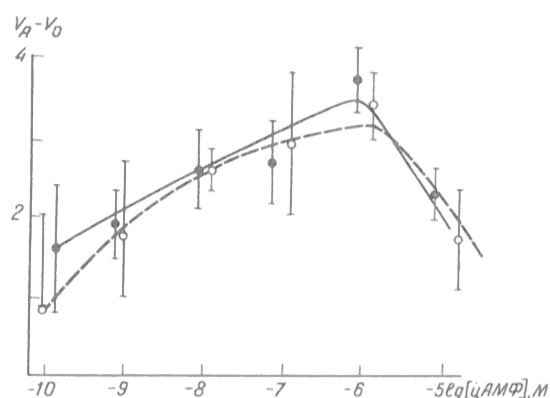


Рис. 1. Зависимость активации трансгидрогеназы (светлые кружки) и НАД-изоцитратдегидрогеназы (темные кружки) от концентрации α АМФ в среде инкубации митохондрий.

V_0 — скорость реакции в присутствии α АМФ; V_A — скорость реакции без α АМФ: для трансгидрогеназы — $9,2 \pm 0,8$ нмоль/мин на 1 мг белка; для НАД-изоцитратдегидрогеназы — $12,8 \pm 1,5$ нмоль/мин на 1 мг белка.

В работе использованы никотинамидные коферменты, α АМФ, НАДФ-изоцитратдегидрогеназа, глюкозо-6-фосфат (фирма «Reanal», Венгрия), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (фирма «Fluka», Швейцария), тритон X-100 (фирма «Ferah», Западный Берлин), лидокаин (фирма «Gedeon Richter», Венгрия). Остальные реактивы были производства «Реахим» (СССР) максимально доступной чистоты.

Результаты и их обсуждение. Инкубация митохондрий с α АМФ в соответствии с предыдущими данными [3, 5, 6] повышает активность НАД-изоцитратдегидрогеназы и трансгидрогеназы. Зависимость их активации от концентрации α АМФ в среде инкубации митохондрий описывается кривой с насыщением при $1 \cdot 10^{-6}$ М (рис. 1). Дальнейшее увеличение концентрации

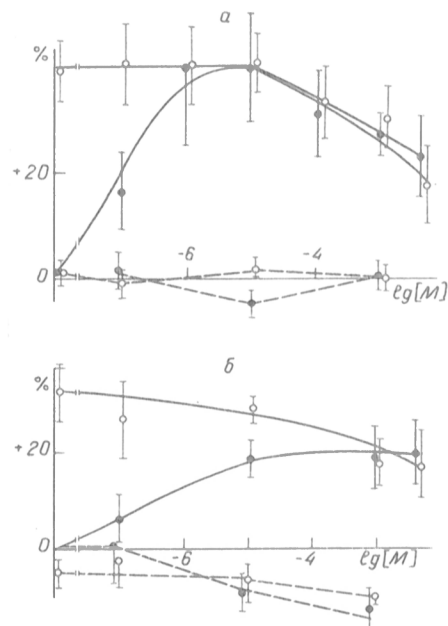


Рис. 2. Зависимость активности трансгидрогеназы (а) и НАД-изоцитратдегидрогеназы (б) и их чувствительности к стимуляции α АМФ от концентрации лидокаина в среде инкубации митохондрий.

По оси абсцисс — логарифм молярной концентрации лидокаина; по оси ординат — прирост активности ферментов, выраженный в процентах к инкубированному без добавок контролю. Активность ферментов в контроле: трансгидрогеназа — $6,2 \pm 0,4$, НАД-изоцитратдегидрогеназа — $6,0 \pm 0,5$ нмоль/мин на 1 мг белка. Светлые кружки — инкубация с α АМФ; темные — инкубация без α АМФ. Сплошная линия — среда инкубации не содержит тритона X-100, пунктирная — в среде присутствует 1 % тритон X-100.

цАМФ несколько снижает величину прироста активности обоих ферментов, поэтому в последующих экспериментах использовали 1 мкМ цАМФ. Добавление лидокаина приводит к увеличению активности обоих ферментов из митохондрий, инкубируемых без цАМФ (рис. 2). Эффект лидокаина для обоих ферментов выходит на насыщение при 10^{-6} — 10^{-5} М и остается примерно на том же уровне вплоть до $5 \cdot 10^{-3}$ М. При инкубации с митохондриями в насыщающих концентрациях (10^{-6} — 10^{-5} М) лидокаин увеличивает активность НАД-изоцитратдегидрогеназы и трансгидрогеназы, подобно цАМФ, хотя влияние лидокаина на изоцитратдегидрогеназу оказывается несколько меньше такового цАМФ ($p < 0,1$ — $0,05$). При концентрациях анестетика 1—5 мМ инкубация с митохондриями вызывает меньший прирост активности трансгидрогеназы, чем цАМФ ($p < 0,05$). Совместная инкубация митохондрий с лидокаином и цАМФ, взятыми в насыщающих концентрациях, не вызывает дополнительного прироста активности НАД-изоцитратдегидрогеназы и трансгидрогеназы по сравнению с самостоятельным влиянием цАМФ. При концентрациях анестетика 1—5 мМ эффект суммы (лидокаин+цАМФ) становится значимо ниже эффекта цАМФ ($p < 0,05$), но не превышает влияния самого лидокаина. Последнее свидетельствует, очевидно, о том, что при высоких (миллимолярных) концентрациях лидокаин начинает блокировать действие цАМФ.

Аминазин, инкубированный с митохондриями, во всех изученных концентрациях мало влияет на активность НАД-изоцитратдегидрогеназы (табл. 1). На трансгидрогеназу он воздействует (80 % ингибирование) только при высокой концентрации (1 мМ). В обоих случаях добавление аминазина в среду инкубации митохондрий ликвидирует прирост активности, вызываемый цАМФ. Предупреждение эффекта цАМФ на трансгидрогеназу отмечается при более низких концентрациях (0,1 мкМ) по сравнению с действием аминазина на цАМФ-зависимую активацию НАД-изоцитратдегидрогеназы (10 мкМ) — см. табл. 1.

Предварительное добавление в среду инкубации 1 % раствора тритона X-100 делает активность обоих ферментов нечувствительной как к влиянию цАМФ, лидокаина, так и их суммы (см. рис. 2). Инкубация с солюбилизированными митохондриями 1,2 мМ лидокаина и 0,5 мМ аминазина не влияет ни на активность НАД-изоцитратдегидрогеназы ($p < 0,3$ — $0,6$), ни на выраженность

активации фермента, вызванной предварительной инкубацией митохондрий с цАМФ ($+34 \pm 3$ % — эффект цАМФ без лекарств; $+31 \pm 5$ % — после инкубации лизата с лидокаином; $+30 \pm 8$ % — после инкубации лизата с аминазином; $p < 0,02$ — $0,001$). В аналогичных экспериментах 1 мМ лидокаин и низкие концентрации аминазина (0,1—10 мкМ) не влияют ни на активность трансгидрогеназы, ни на эффект цАМФ ($p > 0,2$ — $0,5$). Аминазин (0,5 мМ) угнетает, как и при инкубации с целостными митохондриями, активность трансгидрогеназы (-79 ± 4 %) и эффект цАМФ. Влияние 0,5 мМ аминазина проявляется и без преинкубации лизата митохондрий: при добавлении прямо в среду измерения активность трансгидрогеназы снижается на 76 ± 5 %.

Ингибирование трансгидрогеназы миллимолярными концентрациями аминазина, проявляющееся и без преинкубации, по-видимому, является результатом взаимодействия вещества либо с самой молекулой фермента, либо с его ближайшим окружением, сохраняющимся и после солюбилизации органелл. Следует отметить, что высокие концентрации аминазина ингибируют и другие ферменты внутренней мембраны [9, 18].

Во всех остальных случаях зависимость эффектов лидокаина и аминазина от целостности митохондриальных мембран указывает на опосредованный характер влияния этих веществ на цАМФ-зависимую активацию НАД-изоцитратдегидрогеназы и трансгидрогеназы.

Однозначно определить механизм(ы) предупреждения лидокаином и аминазином цАМФ-зависимой стимуляции ферментов митохондрий сложно. Аминазин в числе других фенотиазинов является ингибитором кальмодулина [1, 18]. Несмотря на присутствие небольшого количества кальмодулина в митохондриях [12], влияние представителей этой группы лекарств на функции митохондрий осуществляется иными путями [18, 21]. Есть сообщения об ингибировании активности фосфолипазы A_2 лидокаином и аминазином [14], об изменении состава митохондриальных фосфолипидов родственными соединениями [2]. Наконец, вещества, структурно близкие лидокаину и аминазину, могут непосредственно взаимодействовать с фосфолипидами мембран [10, 20]. С учетом этих данных нам представляется, что влияние лидокаина и аминазина на активность и чувствительность ферментов митохондрий к цАМФ в конечном счете осуществляется путем изменения состояния (и, возможно, состава) липидного компонента митохондрий; проявление воздействия цАМФ на

Таблица 1

Влияние аминазина на активность НАД-изоцитратдегидрогеназы и трансгидрогеназы и чувствительность к стимуляции цАМФ при инкубации с митохондриями из печени

Аминазин, М	НАД ⁺ -изоцитратдегидрогеназа			Трансгидрогеназа		
	исходная активность	прирост с цАМФ	<i>p</i>	исходная активность	прирост с цАМФ	<i>p</i>
0	$8,1 \pm 0,5$	$+2,5 \pm 0,4$	$< 0,01$	$8,2 \pm 0,7$	$+3,1 \pm 0,9$	$< 0,001$
$1 \cdot 10^{-7}$	$8,2 \pm 0,6$	$+2,2 \pm 0,2$	$< 0,01$	$8,9 \pm 1,4$	$+1,1 \pm 0,6^*$	$> 0,1$
$1 \cdot 10^{-5}$	$8,9 \pm 0,6^*$	$-0,1 \pm 0,4^*$	$> 0,8$	$7,8 \pm 1,3$	$+0,6 \pm 0,9^*$	$> 0,1$
$1 \cdot 10^{-3}$	$7,8 \pm 0,5$	$+0,1 \pm 0,4^*$	$> 0,8$	$1,8 \pm 0,2^*$	$+0,1 \pm 0,1^*$	$> 0,9$

Примечание. Результаты выражены в наномолях в 1 мин на 1 мг белка. Звездочкой указана значимость различий в активности или цАМФ-зависимом ее приросте в каждом столбце ($p < 0,05$). В сериях по 6—7 опытов.

Влияние инъекции лидокаина и аминазина крысам на активность НАД-изоцитратдегидрогеназы и трансгидрогеназы и чувствительность к стимуляции цАМФ при инкубации с изолированными митохондриями

Условия опыта	НАД-изоцитратдегидрогеназа			Трансгидрогеназа		
	—цАМФ	+цАМФ	<i>p</i>	—цАМФ	+цАМФ	<i>p</i>
Контроль	8,4±0,7	11,3±1,1	<0,001	12,4±0,8	16,1±1,2	<0,01
Аминазин	7,9±0,7	8,0±0,9*	>0,8	11,5±1,1	11,8±1,1*	>0,5
Лидокаин	8,2±0,8	7,5±0,8*	>0,1	12,6±1,1	12,4±1,00*	>0,8

Примечание. Результаты выражены в наномолях в 1 мин на 1 мг белка. В сериях по 6—13 опытов. Остальные условия приведены в разделе «Методика», а также в примечании к табл. 1.

функции митохондрий в свою очередь зависит от (а может быть и является результатом изменения) состояния и (или) состава липидов митохондрий.

Влияние лидокаина и аминазина на чувствительность НАД-изоцитратдегидрогеназы и трансгидрогеназы к стимуляции цАМФ проявляется и при инъекции их животным (табл. 2). При этом действие аминазина полностью совпадает с его эффектом при инкубации с митохондриями. Лидокаин в отличие от опытов *in vitro* не стимулирует активности ферментов, но предупреждает цАМФ-зависимую активацию НАД-изоцитратдегидрогеназы и трансгидрогеназы. Последнее может быть следствием создания в печени высокой концентрации лекарства, при которой проявляется блокирование эффекта цАМФ. Отметим, что преимущественное распределение лидокаина в печени и некоторых других органах при парентеральном введении широко признано [8], а в наших опытах миллимолярные концентрации лидокаина уже значительно снижали эффект цАМФ (см. рис. 1).

Таким образом, предупреждение активации ферментов митохондрий цАМФ после предварительной инъекции лидокаина и аминазина означает, что эти лекарства и *in vivo* способны влиять на свойства митохондрий, делая их нечувствительными к цАМФ. Это, по-видимому, может ограничить, при необходимости, избыточную реакцию окислительного метаболизма митохондрий на шок, гипоксию и другие виды стресса. Важно отметить, что лидокаин уже нашел применение в кардиохирургии [7] для потенцирования антигипоксического эффекта умеренной гипотермии.

ЛИТЕРАТУРА

- Болдырев А. А. Введение в биохимию мембран.— М., 1986.
- Декутович Г. В., Каргополов А. В. // Вопр. мед. химии.— 1986.— № 6.— С. 38—40.
- Кулинский В. И., Воробьева Л. М., Труфанова Л. В. // Циклические нуклеотиды.— М., 1979.— С. 56—72.
- Кулинский В. И., Медведев А. Е., Воробьева Л. М. и др. // Молекулярные механизмы и регуляция энергетического обмена.— Пущино, 1987.— С. 161—174.
- Медведев А. Е., Кунцевич А. К., Труфанова Л. В., Голубенко А. В. // Циклические нуклеотиды и регуляция ферментативных реакций.— Рязань, 1985.— С. 163—164.
- Медведев А. Е., Труфанова Л. В., Кулинский В. И. // Биохимия.— 1986.— № 7.— С. 1165—1173.
- Мешалкин Е. Н., Верещагин И. П. Оклюзии в условиях неглубокой гипотермической защиты.— Новосибирск, 1985.
- Чекман И. С., Полещук А. П., Пятак О. А. и др. // Справочник по клинической фармакологии и фармакотерапии.— Киев, 1986.— С. 109—112.
- Chazotte B., Vanderkooi G., Chignell D. // Biochim. biophys. Acta.— 1982.— Vol. 680.— P. 310—336.
- Forrest B. J., Mattai J. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1983.— Vol. 114.— P. 1001—1005.
- Gornall A. G., Bardawill C. I., David M. M. // J. biol. Chem.— 1949.— Vol. 177.— P. 751—766.
- Halase O., Takuda M., Itano T. et al. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1982.— Vol. 104.— P. 673—679.
- Kulinsky V. I., Trufanova L. V., Medvedev A. E. // FEBS Lett.— 1984.— Vol. 177.— P. 143—145.
- Kunze H., Nahas N., Traynor J. R., Wurl M. // Biochim. biophys. Acta.— 1976.— Vol. 441.— P. 93—102.
- Papahajopoulos D., Jacobsen K., Poste G., Shephard G. // Ibid.— 1975.— Vol. 394.— P. 504—519.
- Pedersen P. L., Greenwalt J. W., Reynafarje B. et al. // Meth. Cell Biol.— 1978.— Vol. 20.— P. 411—481.
- Plaut G. W. E., Aogaichi T. // J. biol. Chem.— 1968.— Vol. 243.— P. 5572—5583.
- Rubin L., Rasmussen H. // Biochim. biophys. Acta.— 1981.— Vol. 637.— P. 415—422.
- Rydström J. // Meth. Enzymol.— 1979.— Vol. 55—F.— P. 261—275.
- Schlieper P., Michaelis L. // Biophys. Struct. Mech.— 1983.— Vol. 10.— P. 1—9.
- Vale M. G. P., Moreno A. J. M., Carvalho A. P. // Biochem. J.— 1983.— Vol. 214.— P. 929—935.
- Williamson J. R., Cooper R. II., Hoek J. B. // Biochim. biophys. Acta.— 1981.— Vol. 639.— P. 243—295.

Поступила 25.04.89

PREVENTION OF CAMP-DEPENDENT STIMULATION OF SOME MITOCHONDRIAL OXIDATIVE ENZYMES ACTIVITY BY LIDOCAINE AND AMINAZINE

A. E. Medvedev

Medical School, Krasnoyarsk

Lidocaine or aminazine (chlorpromazine) injected to rats or incubated with liver mitochondria prevented NAD-isocitrate dehydrogenase and transhydrogenase activation during the subsequent incubation of mitochondria with cAMP. Integrity of mitochondrial membranes is obligatory for manifestation of the drugs effect. Lidocaine and aminazine-induced desensitization of mitochondria to the cAMP action was apparently realized via alteration in the state (and/or composition) of lipid component of mitochondria. The significance of mitochondria sensitivity to cAMP stimulation is discussed.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 618.19-006.6-018-008.94:577.175.63/.641-07

Н. В. Хотченкова, В. Г. Дегтярь, Л. С. Бассалык,
Н. Е. Кушлинский

ПОВЫШЕНИЕ КАЧЕСТВА ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕЦЕПТОРОВ ЭСТРАДИОЛА И ПРОГЕСТЕРОНА В ЦИТОЗОЛЕ ТКАНИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ РАКЕ

Всесоюзный онкологический научный центр АМН СССР, Москва

Многочисленные исследования показали важность определения содержания рецепторов эстрогенов (РЭ) в опухолях молочной железы (МЖ) при выборе адекватного метода лечения больных [3, 5]. Изучение механизмов взаимодействия эстрогенов и прогестина и их рецепторов в функции МЖ человека позволило предположить, что определение содержания рецепторов прогестерона (РП) у больных раком молочной железы (РМЖ) является важным дополнительным критерием гормональной чувствительности опухоли [8, 17]. Несмотря на практическую значимость определения РЭ и РП в ткани МЖ у больных РМЖ, до сих пор не разработаны четкие методические рекомендации по их определению, хотя в литературе описаны попытки стандартизации этих методов (например, [10]).

Одним из наиболее уязвимых мест в методах определения рецепторов стероидных гормонов является значительная вариабельность концентраций белка в цитозоле ткани МЖ у больных РМЖ. В настоящей работе рассматриваются некоторые вопросы, связанные с неоднозначностью результатов определения РЭ и РП при разных концентрациях общего белка в цитозоле.

Методика. Биоматериал хранили при -65°C не более 3 нед. 5—10 равных по массе кусочков ткани МЖ больных РМЖ растирали при охлаждении жидким азотом в фарфоровой ступке, добавляли 4—5 объемов буфера (масса/объем) состава 10 мМ трис- HCl , 1,5 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотрейтола (фирма «Fluka», ФРГ), 0,3 % азида натрия («Koch-Light Laboratories», Англия), pH 7,4 при 20°C , 20 % (по объему) глицерина («Fluka», ФРГ). Смесь хорошо размешивали в ступке, оттаивали при 0°C , центрифугировали 20 мин при 1500 g (с охлаждением) и из супернатанта получали цитозоль центрифугированием при 105 000 g в течение 60 мин. Пробу цитозоля объемом 0,1 мл (по 5 параллелей) инкубировали 14—16 ч при 0°C с ^3H -эстрадиолом-17 β или ^3H -прогестероном («Amersham», Англия) при концентрации 10 и 20 нмоль/л соответственно (общее связывание) и в присутствии 100-кратного молярного избытка диэтилстильбестрола или R-5020 соответственно (неспецифическое связывание). При определении РП во все пробирки добавляли 50-кратный избыток немеченого кортизола для предотвращения взаимодействия ^3H -прогестерона с транскортином крови и рецепторами глюкокортикоидов. После инкубации к пробам добавляли равный объем 0,5 % суспензии угля Норит А («Serva», ФРГ) в 0,05 % растворе декстрана Т-70 («Farmacia», Швеция), интенсивно встряхивали, инкубировали 15 мин при 0°C , центрифугировали 10 мин при 1500 g и аликвоту надосадочной жидкости радио-

метрировали. Специфическое связывание рассчитывали как разницу между общим и неспецифическим связыванием с учетом удельной радиоактивности лиганда, эффективности радиометрии и концентрации белка в пробе. Использовали очищенные радиоактивные лиганды [1]. Содержание белка в пробах определяли по методу Лоури [12]. Статистическую обработку результатов проводили по [2].

Результаты и обсуждение. При определении содержания РЭ и РП при разных концентрациях общего белка цитозоля получены неоднородные результаты (рис. 1). Максимальное количество РЭ и РП определяется при концентрации общего белка цитозоля 0,75—1,25 мг/мл.

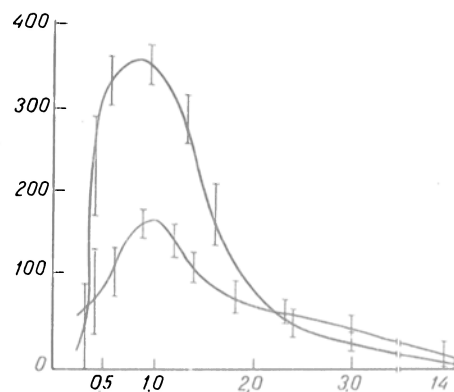


Рис. 1. Содержание РЭ (1) и РП (2) при насыщающих концентрациях лиганда и разных концентрациях общего белка в цитозоле опухоли МЖ.

По оси абсцисс — концентрация белка в цитозоле (в мг/мл), по оси ординат — количество рецепторов (в фмоль на 1 мг белка).

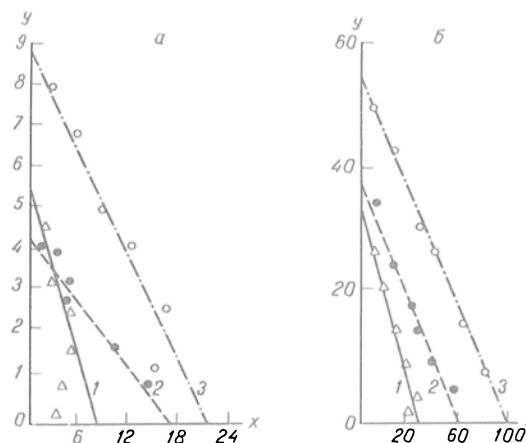


Рис. 2. Определение параметров связывания РЭ (а) и РП (б) по методу Скетчарда при разных концентрациях общего белка в цитозоле опухоли МЖ человека.

Концентрация белка в цитозоле: 1—3 — соответственно 0,73, 1,07, 1,71 мг/мл. Объем пробы 0,10 мл. а: 1 — пересечение $X=8,21$, пересечение $Y=5,62$, $r^2=-0,997$; 2 — пересечение $X=17,77$, пересечение $Y=4,31$, $r^2=-0,872$; 3 — пересечение $X=21,61$, пересечение $Y=9,14$, $r^2=-0,903$. б: 1 — пересечение $X=35,80$, пересечение $Y=36,81$, $r^2=-0,966$; 2 — пересечение $X=62,64$, пересечение $Y=39,09$, $r^2=-0,937$; 3 — пересечение $X=107,22$, пересечение $Y=56,49$, $r^2=-0,995$. По оси абсцисс — связанный стероид, $B \cdot 10^{11}$ моль/л; по оси ординат — $B/F \cdot 10^2$.

В данных опытах нами использовался метод определения содержания рецепторов «по одной точке» (при насыщающих концентрациях лиганда). Этот метод применяется очень часто на практике, так как ряд исследователей считают, что определение содержания рецепторов при насыщающих концентрациях «по одной точке» приводит к аналогичным количественным показателям, полученным другими методами [4, 15], включая и определение $V_{\text{макс}}$ по методу Скетчарда [18].

Для проверки утверждения об идентичности количественного определения рецепторов двумя методами мы оценили содержание РЭ и РП в цитозоле при концентрации белка, которая бы соответствовала максимальной выявляемости рецепторов, и при концентрациях белка, соответственно меньших и больших, при которых определяется меньшее количество рецепторов, чем в интервале оптимальных концентраций белка. На рис. 2 видно, что наклоны прямых графиков Скетчарда для РП очень близки для всех 3 концентраций белка, а для РЭ наклон прямой, полученной для самой низкой концентрации белка, заметно отличается. Более того, линейная зависимость наблюдается только для первых 4 из 6 точек. При этих же концентрациях белка проводили определение содержания рецепторов «по одной точке» (см. таблицу). Как видно из таблицы, определение содержания РЭ и РП «по одной точке» приводит к достоверно различающимся результатам, особенно для РЭ. В то же время во всех случаях определения содержания рецепторов по методу Скетчарда различия между величинами, установленными при разных концентрациях белка, статистически недостоверны для обоих типов рецепторов. Сравнение количественных величин рецепторов, полученных двумя методами, выявило статистически достоверные различия в уровне РЭ, определенном при минимальной концентрации общего белка цитозоля.

Зависимость между выявляемыми количественными показателями РЭ и РП и концентрацией общего белка в цитозоле является, по-видимому, одним из спорных моментов при использовании результатов анализа рецепторов стероидов для практической оценки гормоночувствительности опухоли [5]. Это важно как для конкретного больного, так и для выбора границы рецепторположительности опухоли при групповой

оценке. По нашему мнению, указанный фактор играет не последнюю роль, учитывая отсутствие четких критериев оценки гормональной чувствительности опухоли [6, 11, 13, 14].

В начале 80-х годов рядом исследователей было отмечено в некоторых случаях отсутствие линейности при определении содержания РЭ и РП в опухолях МЖ человека в зависимости от концентрации общего белка в цитозоле [16, 17], причем особенно заметно несоответствие между концентрацией белка и содержанием РЭ при низких концентрациях белка [16]. Наши данные показывают, какова может быть зависимость между этими параметрами (см. рис. 1). Сходные результаты получены для РЭ [9]. По-видимому, отсутствие линейности в пределах низких концентраций общего белка цитозоля позволило исследователям в середине 80-х годов высказать предположение, что более адекватным методом определения содержания рецепторов стероидов в опухолях МЖ человека является множественный титрационный анализ. Результаты обрабатываются чаще всего по методу Скетчарда, что находит отражение и при разработке рекомендаций по стандартизации метода [10]. Данные таблицы показывают, что метод Скетчарда — достаточно надежный подход к решению проблемы получения достоверных результатов, хотя при низких значениях общего белка цитозоля это утверждение может быть проблематичным.

В настоящее время трудно с определенностью объяснить причины «аномальной определяемости» РЭ и РП при низких концентрациях белка и насыщающих концентрациях лиганда. Вероятно, в основе этого явления лежат конформационные изменения, которые могут происходить с молекулами рецепторов при низких концентрациях самого рецептора, но в присутствии высоких концентраций лиганда. Возможно, этим объясняется нелинейная зависимость некоторых точек в графике Скетчарда для РЭ и РП при самой низкой концентрации белка.

Следует отметить, что представленная на рис. 1 зависимость количества РЭ и РП от концентрации общего белка цитозоля не связана с возможным присутствием белков крови в цитозоле [7], так как характер кривой воспроизводится на разных образцах. Кроме того, сходная зависимость была получена нами для РЭ и РП в цитозолях матки и семенников крысы, аденомы и опухоли предстательной железы человека (данные не приводятся).

Вне зависимости от причин, которые вызывают «аномальную определяемость» РЭ и РП в цитозоле опухоли МЖ человека в области некоторых значений концентрации общего белка, из результатов данной работы можно сделать, по нашему мнению, два важных практических вывода. Во-первых, для получения сравнимых результатов при определении содержания РЭ и РП в опухолях МЖ человека «по одной точке» (насыщающие концентрации лигандов) необходимо использовать одинаковую стандартную концентрацию общего белка цитозольной фракции в пределах $1 \pm 0,25$ мг/мл. Во-вторых, предпочтительнее определять $V_{\text{макс}}$ с разными концентрациями лиганда и обрабатывать результаты

Содержание РЭ и РП (в фмоль на 1 мг общего белка) в цитозоле опухоли МЖ человека, определенное при насыщающих концентрациях лиганда (А) и по методу Скетчарда (Б), при разных концентрациях белка

Концентрация белка, мг/мл	РЭ		РП	
	А	Б	А'	Б'
0,73 (I)	52±16	112±34 (1,46)	404±89	490±108 (0,97)
1,07 (II)	140±42	166±52 (4,12)	578±127	585±122 (1,60)
1,71 (III)	100±31	126±38 (2,36)	552±135	627±127 (1,90)

Примечание. Различия достоверны для АI—БI; АI—АII; АI—АIII; А'I—А'II; А'I—А'III. В скобках — Kd (в моль/л · 10⁻⁹)

методом Скетчарда или любым другим методом, но при этом не использовать концентрации общего белка в цитозоле ниже 0,7 и выше 2 мг/мл.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дегтярь В. Г., Кушлинский Н. Е., Хотченкова Н. В. // *Вопр. мед. химии.*— 1987.— № 2.— С. 71—73.
2. Дегтярь В. Г., Милосердов Ю. В. // Там же.— № 1.— С. 121—126.
3. Рецепторы стероидных гормонов в опухолях человека / Под ред. Л. С. Бассалыка.— М., 1987.
4. Allegra J., Lippman M., McGuire W. // *Cancer Res.*— 1979.— Vol. 39.— P. 1447—1454.
5. Alonko A. // *Ann. Clin. Res.*— 1985.— Vol. 17.— P. 10—14.
6. Drafta D., Prisco A. et al. // *J. Steroid Biochem.*— 1983.— Vol. 18.— P. 459—463.
7. Hehenl R., Twaddle E. // *Ibid.*— 1979.— Vol. 10.— P. 95—98.
8. Horwitz K. B., McGuire W. L. et al. // *Science.*— 1975.— Vol. 189.— P. 726—731.
9. Jacobson B. E. // *Canad. J. med. Technol.*— 1981.— Vol. 43.— P. 17—33.
10. Koenders A., Thorpe S. M. // *Europ. J. Cancer Clin. Oncol.*— 1983.— Vol. 19.— P. 1221—1229.
11. Lippman M. E., Allegra G. C. // *Cancer (Philad.)*— 1980.— Vol. 46, Suppl. 12.— P. 2829—2834.
12. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // *J. biol. Chem.*— 1951.— Vol. 193, N 2.— P. 265—275.
13. Manni A., Arafah B., Pearson O. H. // *Cancer (Philad.)*— 1980.— Vol. 46, Suppl. 12.— P. 2838—2841.
14. Mason R. S., Miller W. R. et al. // *Lancet.*— 1981.— N 8220.— P. 617—621.
15. Numkung P. C., Petre P. G. // *J. Steroid Biochem.*— 1981.— Vol. 14.— P. 851—854.
16. Poulsen H. S. // *Europ. J. Cancer.*— 1981.— Vol. 17.— P. 495—501.
17. Quirk S., Gannel J., Fander J. // *Endocrinology.*— 1982.— Vol. 111.— P. 1883—1890.
18. Scatchard G. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*— 1949.— Vol. 14.— P. 660—672.

Поступила 18.12.89

IMPROVEMENT OF ESTRADIOL AND PROGESTERONE RECEPTORS EVALUATION IN CYTOSOL OF MAMMARY GLAND CANCER

N. V. Khotchenkova, V. G. Degtyar, L. S. Bassalyk, N. E. Kushlinsky

All-Union Oncological Reserch Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Receptors of estrogens and progestins were studied in cytosol of human mammary gland cancer depending on concentration of total protein. In saturating concentrations of ligand content of these receptors might be distinctly dissimilar when concentration of total protein varied in cytosol, whereas Scatchard plot showed the same phenomena independently on concentration of total protein. Adequate and comparable results in estimation of estrogen and progestin receptors, which is of importance in treatment of mammary gland cancer, may be accomplished by calculation of total protein in cytosol within the limits 1 ± 0.25 mg ml⁻¹ under saturating concentrations of ligand or using the titrimetric procedure where concentration of total protein constituted 0.7-2.0 mg ml⁻¹.

© Л. В. Платонова, Т. С. Пасхина

УДК 616.611-002-07:616.633.1:577.152.344.042.2]-074

Л. В. Платонова, Т. С. Пасхина

РАЗРАБОТКА ИММУНОФЕРМЕНТНОГО МЕТОДА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КИСЛОТОСТАБИЛЬНОГО ИНГИБИТОРА ТРИПСИНА МОЧИ; ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ОЦЕНКИ ТЯЖЕСТИ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТА

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Кислотостабильный ингибитор трипсина мочи (ИТМ), присутствием которого определяется более 90 % антитриптической активности мочи здорового человека, является кислым гликопротеидом (pI 2,8—4,2) с высоким содержанием углеводного компонента (~50 %) и M_r 22 000—44 000 (электрофорез в ПААГ с додецилсульфатом Na) [11, 18].

ИТМ ингибирует панкреатические ферменты: трипсин, химотрипсин ($K_i 10^{-10}$ — 10^{-9} М), а также инактивирует сериновые протеиназы гранулоцитов человека: эластазу, катепсин G и активатор плазминогена [11]. Эти факты позволяют считать ИТМ мощным противовоспалительным агентом. Недавно обнаружено новое свойство ИТМ как ростового фактора — ИТМ, секретируемый клетками гепатомы человека проявляет свойства фактора роста в культуре эндотелиальных клеток человека [17].

Достигнуты значительные успехи в изучении свойств и структуры ИТМ [11]. Наиболее сложным является вопрос о происхождении ИТМ, в том числе и о месте его синтеза. Существовавшее ранее представление [11] об энзиматическом освобождении ИТМ из высокомолекулярного предшественника — интер- α -ингибитора трипсина — в настоящее время радикально пересматривается [10, 20].

Содержание ИТМ в моче резко повышено при беременности, что и способствовало его первоначальному открытию Аструмом в виде белка мочи беременных женщин — «минжина» [8]. Уровень ИТМ повышен в плазме крови и моче при многих патологических состояниях: воспалении, коронарном тромбозе, инфаркте миокарда, артериальной гипертензии [5, 9, 16, 19], а также при диссеминированных формах рака [18] и заболеваниях почек [6, 9].

Как показали наши ранние исследования с использованием двойного перекрестного и ракетного иммуноэлектрофорезов [6], экскреция ИТМ с мочой резко повышена у больных хроническим гломерулонефритом (ХГН), особенно при его нефротической форме и при переходе ХГН в стадию хронической почечной недостаточности, что может иметь диагностическое значение. Методы иммуноэлектрофорезов непригодны для применения в клинической практике. В настоящее время для измерения антигенного содержания ИТМ в биологических жидкостях описаны радиоиммунологический метод [21] и прямой вариант иммуноферментного анализа — ИФА [23].

Учитывая диагностическое значение определения ИТМ в моче при заболеваниях почек,

мы описали новый метод выделения ИТМ, разработку непрямого варианта ИФА данного ингибитора протеиназ и оценили пригодность разработанной тест-системы для определения ИТМ в моче здоровых лиц и больных ХГН.

Методика. Использовали полистироловые планшеты фирмы «Dunatex» (Швейцария), конъюгат козьих антител к иммуноглобулинам кролика с пероксидазой хрена производства предприятия НИИ эпидемиологии и микробиологии им. П. Ф. Гамалеи АМН СССР, хитозан (ТУ 6-09-95-098—79) и о-фенилендиамин производства «Реахим» (СССР), твин-20 фирмы «Loba Chemie» (Австрия), сывороточный альбумин человека (ЧСА) фирмы «Reanal» (Венгрия), набор белков-маркеров для электрофореза фирмы «Serva» (ФРГ).

Химотрипсин-сефарозу 4В готовили согласно методике [14]. Активность иммобилизованного химотрипсина составляла 7 мкмоль гидролизованного этилового эфира N-бензоил-L-тирозина на 1 мл отжатой химотрипсин-сефарозы в 1 мин в стандартных условиях.

ИТМ выделяли из мочи здоровых мужчин в возрасте от 30 до 40 лет. Утреннюю мочу (10 л) разбавляли равным объемом водопроводной воды и добавляли 50 г сухого хитозана. Смесь подкисляли 2 н. HCl до pH 5,0—5,5 и перемешивали 1—2 ч при комнатной температуре; мочу декантировали, сорбент промывали водопроводной водой до отсутствия поглощения при 280 нм в промывных водах. Элюцию ИТМ с хитозана проводили в колонке 1 н. аммиаком; фракции, содержащие ингибитор, объединяли, подкисляли до pH 8,0 и концентрировали ультрафильтрацией на мембране UM-10 фирмы «Amicon» (США). Концентрированный элюат разбавляли равным объемом 0,1 М трис-HCl-буфера pH 8, добавляли сухой NaCl до концентрации 0,25 М и раствор вносили в колонку с химотрипсин-сефарозой 4В (50 мл), уравновешенной 0,05 М трис-HCl-буфером pH 8, содержащим 0,25 М NaCl, со скоростью 10—15 мл/ч. Затем сорбент последовательно промывали уравновешивающим буфером до исчезновения поглощения при 280 нм и 70—100 мм дистиллированной воды. ИТМ элюировали 0,01 н. HCl, содержащей 1 М NaCl и 15 % изопропанола (по объему). Фракции, содержащие ингибитор, объединяли, концентрировали на роторном испарителе и диализовали против дистиллированной воды в течение ночи при 4 °С. Обессоленный препарат ИТМ подвергали гель-фильтрации на колонке (0,9×60 см) с сефадексом G-100, уравновешенным 0,05 М трис-HCl-буфером pH 8, содержащим 0,1 М NaCl. На профиле элюции получали 2 белковых пика, соответствующие формам ИТМ с M_r 44 000 и 22 000 (по данным электрофореза в ПААГ в присутствии додецилсульфата Na). Фракции объединяли соответственно пикам, обессоливали диализом и лиофилизировали.

Антитриптическую активность (АТА) мочи и растворов ИТМ на разных этапах его очистки измеряли по торможению гидролиза этилового эфира N-бензоил-L-аргинина трипсином [2, 6]. Активность ИТМ выражали в ИЕ на 1 мл мочи или на 1 мг белка (за 1 ИЕ принимали такое количество ИТМ, которое тормозит расщепление 1 мкмоль BzArgOEt трипсином за 1 мин в стандартных условиях при 25 °С). ИТМ с M_r 44 000 имел удельную активность 58 ИЕ на 1 мг белка и с M_r 22 000—52 ИЕ/мг. При разработке ИФА использовали препарат ИТМ с M_r 44 000.

Молекулярную массу двух форм ИТМ определяли электрофорезом в 12 % ПААГ в присутствии 0,1 % додецилсульфата Na при pH 8,6 [22] с использованием стандартных белков-маркеров.

Кроличья моноспецифическая антисыворотка к ИТМ (суммарному препарату, не разделенному на формы) была получена ранее В. В. Карпицким [4] в Ялтинском НИИ физических методов лечения и медицинской климатологии им. И. М. Сеченова. 1 мл анги-ИТМ сыворотки содержал 740 мкг антител, зона эквивалентности соответствовала связыванию 99 мкг ИТМ 1 мл антисыворотки. Антисыворотка была лиофилизирована и хранилась при 4 °С. Исходное разведение анги-ИТМ-сыворотки готовили следующим образом: 100 мг сухой антисыворотки растворяли в 1 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ) pH 7,5 (12 мМ Na_2HPO_4 , 1,5 мМ KH_2PO_4 , 0,14 NaCl и 3 мМ KCl), содержащего 1 % альбумина и 0,05 % твин-20. Перед использованием готовили рабочие разведения антисыворотки 1:2000, 1:3000 и 1:4000.

Раствор конъюгата козьих антител к иммуноглобулинам кролика с пероксидазой готовили согласно инструкции, прилагаемой к препарату. Содержимое ампулы растворяли в 5 мл ФСБ pH 7,5. Этот раствор хранили при 4 °С не

более 3 нед. Антигенную и ферментную активность конъюгата определяли при разведениях последнего 1:200, 1:400, 1:800 и 1:1000.

Субстратная смесь для определения активности пероксидазы состояла из 0,01 % о-фенилендиамина и 0,0025 % раствора H_2O_2 в 0,05 М цитратном буфере pH 4,7; ее готовили непосредственно перед опытом.

Содержание ИТМ определяли в утренней моче здоровых лиц ($n=4$) и больных с латентной ($n=4$) и нефротической ($n=4$) формами ХГН. У больных латентным нефритом отсутствовали отеки, содержание белка и холестерина в сыворотке крови соответствовало норме; болезнь проявлялась в виде изменения состава мочи (умеренная протеинурия 0,05—3 г белка в сутки). При нефротической форме ХГН у всех больных были отеки, массивная протеинурия (4—25 г белка в сутки), гипоальбуминемия, гипопротенемия, гиперхолестеринемия.

Содержание белка в моче и препаратах ИТМ определяли методом О. Н. Lowry [15].

Рабочие разведения ИТМ, анги-ИТМ-сыворотки, конъюгата и исследуемых образцов мочи готовили в ФСБ, содержащем 1 % ЧСА и 0,05 % твин-20.

Для проведения иммуноферментного анализа ИФА (непрямой вариант) [1] в лунки планшета вносили по 0,1 мл раствора антигена (325 нг ИТМ в буфере, содержащем 0,7 мМ CH_3COOH , 6,7 мМ K_2HPO_4 и 0,12 М NaCl, pH 5,65). Планшет с внесенным раствором антигена инкубировали 5 ч при 4 °С. Избыток ИТМ смывали 3-кратной промывкой ФСБ с 1 % ЧСА. Затем в лунки планшета вносили по 0,15 мл ФСБ с 1 % ЧСА и планшет выдерживали при 37 °С в течение 2 ч для устранения неспецифической сорбции на поверхности твердой фазы; лунки промывали дважды тем же буфером. Исследуемые образцы мочи в нужном разведении (в контроле — буфер) в объеме 0,05 мл вносили в лунки, приливали по 0,05 мл раствора анги-ИТМ-сыворотки в разведении 1:2000 (конечное разведение 1:4000) и инкубировали 45 мин при 20 °С. Лунки планшета промывали 5-кратно ФСБ, содержащим 0,05 % твин-20. Далее в лунки вносили по 0,1 мл раствора конъюгата в рабочем разведении 1:800, инкубировали 45 мин при 20 °С. После отмывки планшета ФСБ, содержащим 0,05 % твин-20, в лунки вносили по 0,1 мл субстратной смеси. Через 30 мин инкубации при 20 °С реакцию останавливали добавлением 0,1 мл 12,5 % H_2SO_4 . Оптическую плотность растворов в лунках измеряли при 492 нм на микроспектрофотометре «Titertec Multiskan» фирмы «Flow Laborg» (Англия).

Для построения калибровочного графика использовали высокоочищенный ИТМ в концентрации от 15,6 до 1000 нг/мл в ФСБ с 1 % ЧСА и 0,05 % твин-20. Содержание ИТМ в исследуемых образцах мочи определяли по калибровочной кривой, которую строили для каждого планшета.

Результаты и обсуждение. Настоящая работа посвящена решению двух важных и взаимосвязанных задач — разработке эффективного способа выделения и очистки ИТМ из мочи с целью использования его в качестве антигена при решении второй задачи — разработке иммуноферментного метода определения ИТМ в биологических жидкостях.

При решении первой задачи мы использовали для извлечения из мочи ИТМ хитозан — продукт щелочного гидролиза хитина, который является слабым анионом и при pH 5,0—6,0 способен сорбировать сильно кислый белок ИТМ. Наши исследования показали, что для максимального извлечения (близкого к 100 %) ИТМ из мочи оптимальными являются следующие условия: разбавление мочи водопроводной водой в 2 раза, подкисление разбавленной мочи до pH 5,0—5,5, соотношение хитозана и мочи — 5—10 г хитозана на 1 л мочи, время сорбции — 2 ч при комнатной температуре. В условиях десорбции ИТМ с хитозана 1 н. NH_4OH выход ингибитора составляет около 90 % с очисткой в 10 раз (табл. 1).

Дальнейшую очистку ИТМ осуществляли методом афинной хроматографии на химотрипсин-сефарозе 4В, что позволило повысить удельную

Выделение и очистка ИТМ из мочи здоровых лиц

№ п/п	Стадия очистки	Белок, мг	АТА		Выход, %	Степень очистки
			ИЕ на 1 мг белка	общая, ИЕ		
1.	Моча (10 л)	780	0,7	540	100	1
2.	Хитозан (элюция 1 н. NH_4OH)	80	6,8	486	90	10
3.	Концентрирование элюата на мембране UM-10	60	7,4	443	82	11
4.	Химотрипсин-сефароза 4В (элюция 10^{-2} М HCl , 1 М NaCl , 15 % изопропанола)	8,5	48,5	410	76	54
5.	Диализ, гель-фильтрация на сефадексе G-100, лиофилизация:					
	пик I M_r 44 000 пик II M_r 22 000	3,1 3,8	58 52	378	70	64 58

Примечание. Кислотостабильная АТА мочи определена по методике [6] и равна 0,054 ИЕ на 1 мл мочи.

активность ИТМ в 6,5 раза по сравнению с предыдущей стадией; сравнительно незначительное увеличение удельной АТА ИТМ на стадии хроматографии на химотрипсин-сефарозе, вероятно, объясняется высокой избирательностью хитозана, использованного на первой стадии очистки. Хроматографию на химотрипсин-сефарозе для очистки ИТМ использовал ряд авторов [3, 12]; она дает возможность получить препарат ингибитора с сохраненным реактивным центром, ответственным за связывание ингибитора с эластазой гранулоцитов (в отличие от препаратов ИТМ, полученных при хроматографии на трипсин-сефарозе).

Дальнейшую очистку ИТМ мы проводили с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-100, в результате чего были получены 2 молекулярные формы ингибитора с различными M_r . При этом отделялась незначительная примесь низкомолекулярного компонента. Лиофилизированные препараты ИТМ имели удельные активности 58 ИЕ на 1 мг белка (M_r 44 000) и 52 ИЕ/мг (M_r 22 000).

Величины M_r форм ИТМ определены методом электрофореза в ПААГ в присутствии додецилсульфата Na (рис. 1) и равны 44 000 и 22 000. Препараты каждой из полученных форм ИТМ были однородны по M_r .

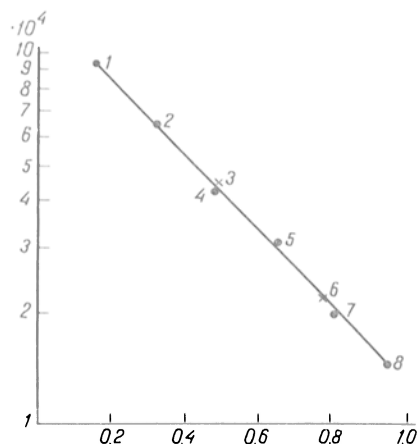


Рис. 1. Калибровочный график для оценки M_r двух форм ИТМ человека методом электрофореза в ПААГ.

1 — фосфорилаза, 2 — бычий сывороточный альбумин, 3 — ИТМ (M_r 44 000), 4 — овалбумин, 5 — угольная ангидраза, 6 — ИТМ (M_r 22 000), 7 — соевый ингибитор трипсина, 8 — α -лактоальбумин. По оси абсцисс — относительное расстояние миграции R_f по оси ординат — M_r .

К числу важнейших фактов, положительно характеризующих предлагаемый нами способ выделения и очистки ИТМ, следует отнести отсутствие на хитозане α_1 -протеиназного ингибитора при pH 5,0—5,5, содержание которого в моче здорового человека составляет 10—15 % от общей АТА мочи. Это подтверждается тем, что АТА элюата с хитозана не изменяется после прогревания при 80 °С и pH 4,0 в течение 50 мин; не выявлен α_1 -протеиназный ингибитор в элюате с хитозана при использовании специфичной антисыворотки к α_1 -протеиназному ингибитору.

Таким образом, предложенный нами способ выделения и очистки ИТМ, описанный в данной работе, позволяет, используя минимальное число операций, получить высокоочищенные препараты двух молекулярных форм ИТМ с максимальной удельной активностью 52 и 58 ИЕ/мг и выходом до 70 % от его содержания в исходной моче.

Для количественного определения ИТМ иммуноферментным методом мы разработали непрямой вариант ИФА, который позволяет использовать коммерческий препарат конъюгата вторичных антител с пероксидазой, что значительно упрощает подготовку анализа.

ИФА в непрямом варианте включал реакцию антигена (ИТМ) с первичными антителами (кроличья анти-ИТМ-сыворотка), затем комплекс антиген — антитело выявляли при помощи вторичных антител (козьих антител к иммуноглобулинам кролика), конъюгированных с пероксидазой. Содержание антигена в исследуемых образцах мочи определяли по его способности тормозить связывание первичных антител с ИТМ, сорбированным на твердой фазе [1].

Подбор оптимальных условий проведения ИФА по определению ИТМ в биологических жидкостях проводили в серии экспериментов. На первом этапе определяли оптимальную дозу антигена (ИТМ), сорбируемую на твердой фазе. Растворы ИТМ в разных концентрациях — от 0,2 до 6,5 мкг/мл инкубировали в лунках полистиролового планшета. Как видно из рис. 2, концентрация ИТМ, равная 3,5 мкг/мл, является оптимальной; дальнейшее увеличение содержания ИТМ в растворе не вызывает повышения оптической плотности, что свидетельствует о полном насыщении гидрофобных связей полистирола ИТМ при указанных концентрациях последнего. Одно-

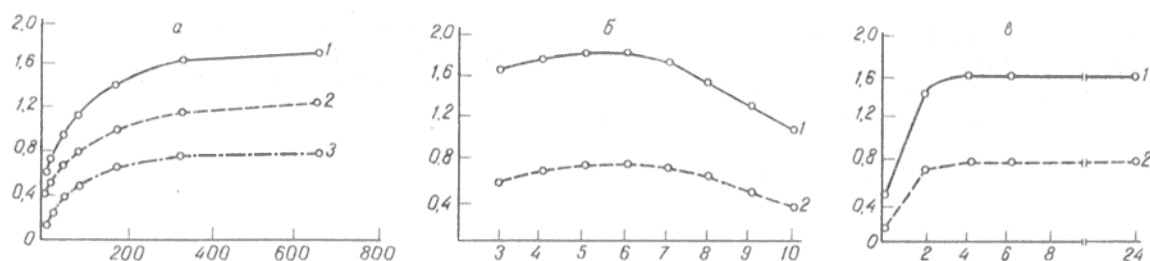


Рис. 2. Выбор оптимальных условий сорбции ИТМ на полистироловом планшете: количества ИТМ и разведения анти-ИТМ-сыворотки (а), рН буфера нанесения (б) и температурного и временного режима для инкубации планшетов с раствором ИТМ (в).

а: 1, 2, 3 — разведения анти-ИТМ-сыворотки 1:4000, 1:6000 и 1:8000 соответственно; б: 1, 2 — разведения анти-ИТМ-сыворотки 1:4000 и 1:8000 соответственно; в: 1, 2 — инкубация ИТМ в лунках планшета при 4 и 37 °С соответственно. По оси абсцисс: а — количество ИТМ в пробе (в нг), б — рН буфера нанесения; в — время (в ч); по оси ординат — оптическая плотность при 492 нм.

временно с выбором дозы ИТМ определяли рабочее разведение анти-ИТМ-сыворотки, которое обеспечивало наибольшую чувствительность метода. Рабочим разведением анти-ИТМ-сыворотки выбрано 1:4000, при котором оптическая плотность раствора в лунке при 492 нм равна 1,6—1,8.

На следующем этапе исследований определяли зависимость адсорбции ИТМ на полистироловом планшете от рН буфера нанесения, температуры и времени. Наибольшая адсорбция ИТМ происходит при рН 5,0—6,0 в 0,7 мМ CH_3COOH , 6,7 мМ K_2HPO_4 и 0,12 NaCl; максимальное связывание достигается через 5 ч инкубации ИТМ в лунках планшета при 4 °С (см. рис. 2). Оптимальное связывание ИТМ с полистироловым планшетом, обеспечивающее максимальную чувствительность теста, происходит при концентрации ИТМ 3,5 мкг/мл.

В работе использовали разведения анти-ИТМ-сыворотки, равное 1:4000, и конъюгата — 1:800 и для построения калибровочного графика растворы высокоочищенного препарата ИТМ в концентрациях 15,6; 31,3; 62,5; 125; 250; 500 и 1000 нг/мл. В контрольных лунках, которые вместо раствора ИТМ содержали ФСБ, определяли максимальную оптическую плотность при 492 нм (максимальное связывание анти-ИТМ-тел с сорбированным на твердой фазе ИТМ), которую принимали за 100 %. Оптическую плотность растворов, содержащих разные концентрации ИТМ, выражали в процентах от максимальной оптической плотности. Строили калибровочный график зависимости торможения связывания анти-ИТМ-тел с сорбированным ИТМ (выраженного в %) от концентрации ИТМ в полулога-

рифмических координатах (рис. 3). Линейная зависимость сохранялась при концентрации ИТМ от 31,3 до 1000 нг/мл. Чувствительность метода — 10—20 нг ИТМ в пробе.

Разработанная нами тест-система определения ИТМ иммуноферментным методом была апробирована с диагностической целью на образцах мочи здоровых людей и больных с латентной и нефротической формами ХГН. Готовили разведения мочи от 1:1 до 1:128 кратно 2. Оптимальным разведением мочи считали такое, при котором в 0,05 мл разведенной мочи (см. методику) содержалось количество ИТМ, достаточное для торможения связывания анти-ИТМ-тел с сорбированным ИТМ на твердой фазе приблизительно на 50 %. Было найдено, что моча здоровых лиц для определения содержания в ней ИТМ ИФА может быть использована как неразведенная, так и с 2- или 3-кратным разведением (1:1, 1:2); моча больных с латентной формой ХГН с нормальной клубочковой фильтрацией — при разведении в 2 и 3 раза, со сниженной клубочковой фильтрацией — в 9 и 17 раз (1:8, 1:16), а моча больных с нефротической формой ХГН с нормальной клубочковой фильтрацией — при разведении в 33 раза (1:32), со

Таблица 2

Концентрация ИТМ в моче здоровых лиц и больных латентной и нефротической формами ХГН

Диагноз	Обследуемый	Клубочковая фильтрация, мл/мин	ИТМ, мкг на 1 мл мочи	Оптимальное разведение мочи
Здоровый	А	98±6	1,84	1:2
	Б		0,80	1:1
	В		0,62	Без разведения
	Г		1,64	1:2
Латентная форма ХГН: нормальная функция почки	Д	94±6	0,81	1:1
	Е		1,60	1:2
	Ж	30±6	5,85	1:8, 1:16
	З		2,08	1:8
Нефротическая форма ХГН: нормальная функция почки	И	86±5	15,35	1:32
	К		13,20	1:32
	Л	30±4	28,17	1:64
	М		52,81	1:128

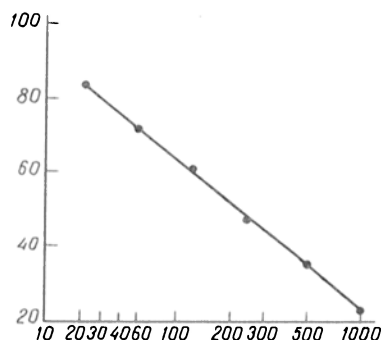


Рис. 3. Калибровочный график для количественного определения ИТМ.

По оси абсцисс — количество ИТМ в 1 мл пробы (в нг); по оси ординат — торможение связывания анти-ИТМ-тел с сорбированным ИТМ на полистироловом планшете (в %).

сниженной клубочковой фильтрацией в 65 и 129 раз (1:64, 1:128).

В табл. 2 представлены результаты определения ИТМ в моче обследованных лиц с помощью ИФА. Эти результаты близки к полученным нами ранее [6] данным о содержании ИТМ в моче здоровых лиц и больных ХГН различной тяжести при определении методами двойного перекрестного и ракетного иммуноэлектрофорезов, а также данным японских исследователей [21] по оценке ИТМ радиоиммунологическим методом.

Разработанный в представленной работе ИФА позволяет количественно определить содержание ИТМ в моче здоровых лиц и больных с высокой протеинурией. Предлагаемый метод может быть использован для диагностики ХГН, оценки тяжести нефрита.

Авторы благодарят ст. науч. сотр. Т. М. Чулкову за оказание консультативной помощи, ст. науч. сотр. Л. Р. Полянцеву (лаборатория нефрологии I ММИ им. И. М. Сеченова) за предоставление образцов мочи больных ХГН, ст. науч. сотр. Л. В. Аристовскую (Институт общей и коммунальной гигиены им. А. Н. Сысина АМН СССР) за техническую помощь и ст. науч. сотр. В. В. Карпицкого (Ялтинский НИИ физических методов лечения и медицинской климатологии им. И. М. Сеченова) за получение антисыворотки к ИТМ.

21. Usui T., Maehara S., Kawashita E. et al. // Enzyme.— 1984.— Vol. 31.— P. 11—16.
22. Weber K., Osborn M. // Biochem. J.— 1969.— Vol. 224, N 6.— P. 4406—4412.
23. Yoshida E., Sumi H., Maruyama M. et al. // Clin. chim. Acta.— 1987.— Vol. 167.— P. 155—164.

Поступила 28.04.89

IMMUNOENZYMATIC QUANTITATIVE ASSAY OF ACID-STABLE TRYPSIN INHIBITOR IN URINE APPLIED FOR EVALUATION OF GLOMERULONEPHRITIS SEVERITY

L. V. Platonova, T. S. Pashkina

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

Acid-stable trypsin inhibitor was isolated from urine of healthy persons; its homogenous preparation was obtained using absorption on chitosan, affinity chromatography on chymotrypsin-Sepharose 4B and gel filtration of Sephadex G-100. Two forms of the inhibitor were produced with $M_r=44,000$ and $22,000$; yield of the trypsin inhibitor was about 70 % of its content in urine. Indirect immunoenzymatic assay was developed for the inhibitor estimation; optimal conditions were chosen for sorption of the inhibitor on polystyrene plates as well as for dilution of rabbit anti-inhibitor blood serum and of goat antibodies to rabbit antibodies and horse radish peroxidase conjugates. The procedure developed was sensitive; 10-20 ng of the inhibitor was detected per a sample. Urine of healthy persons and of patients with latent and nephrotic forms of glomerulonephritis was studied using the test system developed. The results of estimation of the trypsin inhibitor were considered in diagnostics and evaluation of severity of glomerulonephritis.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иммуноферментный анализ / Под ред. Т. Н. Нго, Г. Ленхоффа: Пер. с англ.— М., 1988.
2. Партикова В. Ф., Паскина Т. С. // Биохимия.— 1969.— Т. 34, № 2.— С. 282—292.
3. Оглоблина О. Г., Белова Л. А., Малахов В. И. // Вопр. мед. химии.— 1987.— № 4.— С. 119—124.
4. Оглоблина О. Г., Галстян Н. А., Карпицкий В. В. и др. // Там же.— 1982.— № 4.— С. 86—93.
5. Парфенкова Г. А., Оглоблина О. Г., Ситина В. К. // Бюл. Всесоюз. кардиол. науч. центра.— 1988.— № 1.— С. 43—46.
6. Паскина Т. С., Платонова Л. В., Полянцева Л. Р. // Вопр. мед. химии.— 1988.— № 1.— С. 89—94.
7. Плиско Е. А., Нудьга Л. А., Данилов С. И. // Успехи химии.— 1977.— С. 1470—1487.
8. Astrup T. // Ann. N. Y. Acad. Sci.— 1968.— Vol. 146.— P. 601—611.
9. Franck C., Pedersen J. // Scand. J. Lab. Invest.— 1983.— Vol. 43.— P. 151—155.
10. Gebhard W., Leysath G., Scheitmüller T. // Biol. Chem. Hoppe-Seyler.— 1988.— Vol. 369, Suppl. 5.— P. 19—22.
11. Gebhard W., Hochstrasser K. // Proteinase Inhibitors / Eds A. J. Barrett, J. S. Salvesen.— Amsterdam, 1986.— P. 386—401.
12. Jönsson B. M., Löffler G., Ohlsson K. // Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.— 1982.— Bd. 363, N 10.— S. 1167—1175.
13. Kang S. H., Fuchs M. S. // Analyt. Biochem.— 1973.— Vol. 54.— P. 262—265.
14. Kohn J., Wilchek M. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1982.— Vol. 107, N 3.— P. 878—884.
15. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem.— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
16. Maruyama M., Simu H., Akazawa K., Mihara H. // Clin. chim. Acta.— 1984.— Vol. 138.— P. 205—213.
17. McKeehan W. L., Sakagami Y., Hoshi H., McKeehan K. A. // J. biol. Chem.— 1986.— Vol. 261, N 12.— P. 5378—5383.
18. Mizon C., Banduyck M., Bonnetterre J., Mizon J. // Bull. Cancer (Paris).— 1983.— Vol. 70.— P. 266—270.
19. Odum L., Hansen-Nord G., Byrjalsen I. // Clin. chim. Acta.— 1987.— Vol. 162.— P. 189—198.
20. Schreitmüller T., Hochstrasser K., Reisinger P. W. M. et al. // Biol. Chem. Hoppe-Seyler.— 1987.— Vol. 368.— P. 963—970.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 617-022.7-078

Б. Р. Гельфанд, В. П. Разживин, О. Н. Клейменов,
Е. А. Алексеева

ОПЫТ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В ХИРУРГИЧЕСКОЙ КЛИНИКЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОБОРУДОВАНИЯ ФИРМЫ «ЭББОТТ ЛЭБОРАТОРИЗ»

Кафедра факультетской хирургии с курсом анестезиологии и реаниматологии ФУВ П ММИ им. Н. И. Пирогова

Проблема инфекции в хирургии имеет особое значение. Это связано, во-первых, с тем, что гнойно-воспалительные заболевания занимают доминирующее положение в структуре хирургической патологии. Во-вторых, инфекционные осложнения после различных хирургических манипуляций развиваются достаточно часто, ликвидируя результаты самой блестящей хирургической работы, а иногда и приводя больного к гибели. В-третьих, именно в хирургических отделениях формируются полирезистентные госпитальные штаммы микроорганизмов, вызывающие различные позококмиальные заболевания и осложнения. И, наконец, именно хирургам и реаниматологам чаще всего приходится иметь дело с такими тяжелыми и нередко фатальными инфекционными процессами, как хирургический сепсис и инфекционно-токсический шок.

Появление антибиотиков позволило лишь на короткое время создать иллюзию победы над хирургической инфекцией, однако в настоящее время только грамотное, строго по показаниям применение антибиотиков позволяет рассчитывать на какой-то клинический эффект. Широкое распространение антибактериальных препаратов, успехи реаниматологии обусловили значительный патоморфоз инфекционных процессов в хирургической клинике. В связи с этим особое значение приобретает корректная микробиологическая диагностика, позволяющая определить вид возбудителя инфекции, его чувствительность к антибиотикам и направить лечебные мероприятия по правильному пути.

Успешная разработка проблемы инфекции в хирургии была бы невозможной без современной микробиологической диагностики, отвечающей запросам клинической медицины. Этим требованиям в достаточной степени удовлетворяет диагностическая аппаратура фирмы «Эбботт Лэбораториз» (США), которую мы используем уже более 6 лет, — система микробиологического анализа MS-2, и недавно приобретенная, более совершенная система «Авантаж», снабженная современным компьютером, существенно расширяющим ее возможности.

Длительная работа по проблеме инфекции в хирургии, проводившаяся с использованием современных диагностических средств, позволила сформулировать основные направления микробиологических методов в хирургической клинике. Эти методы дают возможность: 1) установить этиологический диагноз, 2) контролировать эффективность антибактериальной терапии, 3) определить факторы прогноза развития инфекционного процесса, 4) судить о степени депрессии иммунитета и 5) динамически контролировать резистентность госпитальной флоры.

Проведенные в клинике исследования позволили установить основную роль в развитии распространенного перитонита грамотрицательных энтеробактерий, реально оценить значение грамположительных микроорганизмов и неклостридиальных анаэробов (табл. 1). При этом в перитонеальном экссудате обнаружен практически весь спектр аэробной и анаэробной флоры, обитающей в кишечнике, определяются и такие редкие возбудители, как цитробактер и ацинетобактер. Следует отметить, что более чем в половине случаев инфицирование брюшной полости носит полимикробный характер.

Сложную проблему представляет собой идентификация гемокультуры у больных перитонитом. Решение этой задачи существенно упрощается при использовании системы для автоматизированного анализа. Бактериemia была выявлена у 43 % больных с перитонеальным инфекционно-токсическим шоком. В табл. 2 представлены основные возбудители, обнаруженные при этом.

Таблица 1

Структура микрофлоры перитонеального экссудата у больных с распространенным перитонитом

Возбудитель	Частота выделения, %
<i>Escherichia coli</i>	68,8
<i>Klebsiella</i> spp.	23,9
<i>Enterococcus</i>	17,4
<i>Pseudomonas</i> spp.	13,8
<i>Enterobacter</i> spp.	10,1
<i>Staphylococcus aureus</i>	10,1
<i>Proteus indol</i> —	9,2
<i>Bacteroides</i> spp.	9,2
<i>S. epidermidis</i>	4,6
<i>Serratia</i> spp.	3,7
<i>Proteus indol</i> +	3,7
<i>Citrobacter freundii</i>	3,7
<i>Acinetobacter</i> spp.	2,8
<i>Candida albicans</i>	0,9

Таблица 2

Возбудители, выделяемые из крови больных с перитонеальным инфекционно-токсическим шоком

Возбудитель	Частота выделения, %
Грамотрицательные бактерии	66,7
<i>E. coli</i>	30,7
<i>K. spp.</i>	8,0
<i>P. spp.</i>	8,0
<i>E. spp.</i>	5,3
<i>Pr. indol</i> —	4,0
<i>A. spp.</i>	4,0
<i>S. spp.</i>	2,7
<i>Pr. indol</i> +	2,7
<i>C. freundii</i>	1,3
Грамположительные бактерии	29,3
<i>St. aureus</i>	21,3
<i>St. epidermidis</i>	6,7
<i>Enterococcus</i>	1,3
Анаэробы	4,0

Была определена четкая корреляция между длительностью заболевания и частотой выделения микроорганизмов из крови (табл. 3).

Определены и основные ассоциации возбудителей, встречавшихся в нашей практике. Так, в $1/3$ случаев полимикробного инфицирования были выявлены ассоциации кишечной палочки и золотистого стафилококка.

Изучение длительной катетеризации сосудов и инфекционных осложнений при этом позволило идентифицировать возбудителей, вызывающих эти осложнения (табл. 4). Полученные данные позволили провести сравнения и сделать более широкие заключения, помогающие при дифференциальной диагностике источника инфицирования, что особенно важно в клинической практике. Так, при энтерогенном сепсисе преобладают стафилококки — эпидермальный и золотистый, а при абдоминальном — энтерихии и клебсиеллы.

Не вызывает сомнений и важность микробиологической диагностики нозокомиальной пневмонии, вызываемой полирезистентной госпитальной флорой (табл. 5). У 70 % больных с нозокомиальной пневмонией из трахеобронхиального дерева выделены аэробные микроорганизмы, часто в виде ассоциаций. Изучение микробиологических данных позволяет уточнить источник инфицирования легочной ткани и соответственно внести коррективы в лечебную тактику.

Изучение с помощью аппарата MS-2 структуры возбудителей инфекционных осложнений в хирургии, определение их чувствительности к антибиотикам позволили оптимизировать схемы антибактериальной терапии и начинать ее на основе вероятностного прогноза до выделения возбудителя с последующей коррекцией на основе микробиологических данных, что особенно важно при таких тяжелых заболеваниях, как перитонит.

Микробиологические методы позволяют не только установить микробиологический диагноз, выбрать соответствующее лечение и контролировать ее эффективность, но и прогнозировать течение патологического процесса, так как была выявлена тесная корреляция между тяжестью состояния и структурой возбудителя. К факторам неблагоприятного прогноза при перитоните мы относим: 1) полимикробное инфицирование перитонеального экссудата, 2) наличие bacteremia, особенно полимикробной, 3) выделение синегнойной палочки или протеев из перитонеального экссудата или крови.

Оказалось также, что характер bacteremia связан со степенью угнетения иммунитета. Так, персистирующая или лабильная bacteremia со сменой вида гемокультуры была обнаружена лишь при выраженной иммунодепрессии у больных с распространенным перитонитом, особенно осложненным инфекционно-токсическим шоком.

Следует еще раз подчеркнуть определяющую роль микробиологических исследований в оптимизации сложной антибактериальной терапии. Наиболее перспективными направлениями, по которым следует работать для улучшения результатов антимикробного лечения, нам представляются следующие: 1) организация службы антибактериальной терапии, 2) совершенствование методов антибактериальной терапии, 3) контроль фармакоки-

Таблица 3

Частота bacteremia в зависимости от длительности перитонита

Время от начала заболевания, ч	Частота bacteremia, %
До 24	16,9
24—72	40,2
Более 72	83,7

Таблица 4

Этиологическая структура «катетерного» сепсиса

Возбудитель	Число случаев	
	катетер верхней полой вены	катетер легочной артерии
<i>S. epidermidis</i>	2	1
<i>S. aureus</i>	1	—
<i>Klebsiella</i>	1	1
<i>Enterobacter</i>	1	—
<i>Serratia</i>	1	—
<i>Pseudomonas</i>	1	—
<i>Acinetobacter</i>	1	—

Таблица 5

Этиологическая структура нозокомиальной пневмонии

Возбудитель	Частота выделения, %
Синегнойная палочка	15,1
Клебсиеллы	12,8
Золотистый стафилококк	12,8
Энтеробактер	10,0
Кишечная палочка	7,1
Протей	5,8
Сerratia	5,6

нетики антибактериальных препаратов, 4) совершенствование микробиологической и серологической диагностики.

При этом трудно переоценить роль автоматизации исследований, позволяющей избавить врача от утомительной рутинной работы и дающей ему возможность определять стратегические направления антимикробной терапии.

Многолетняя работа по проблеме инфекции в хирургии позволила нам выделить основные факторы селекции резистентных госпитальных форм микроорганизмов: объем использования антибиотиков; чрезмерное использование некоторых препаратов: сульфаниламидов, ампициллина, гентамицина и тобрамицина; антисепдомонадных пенициллинов (карбенициллин, азлоциллин), тетрациклинов (кроме доксициклина), цефалоспоринов третьего поколения; необоснованное профилактическое применение антибиотиков; неоправданно широкое применение комбинированной антибактериальной терапии.

Учитывая эти факторы, мы смогли воздействовать на формирование антибиотикочувствительности госпитальной флоры. Прежде всего мы отказались от необоснованного назначения антибиотиков «просто так», изъяли из использования бензилпенициллин, стрептомицин, природные тетрациклины, сульфаниламиды в чистом виде. Кроме того, зарезервировали применение новых аминогликозидов для лечения перитонита или для терапии II—III очереди при других состояниях. Четко определили показания к профилактическому назначению антибиотиков и режимы. Применяют 3 режима профилактики гнойно-септических осложнений в хирургической клинике: удар-

Таблица 6

Чувствительность стафилококков к антибактериальным препаратам

Препарат	Процент чувствительных штаммов	
	1984 г.	1988 г.
Бензилпенициллин	8	39
Метициллин	26	76
Оксациллин	30	85
Ампициллин	11	25
Цефопин	31	70
Кефзол	36	92
Тетрациклин	42	17
Эритромицин	28	46
Бисептол	33	80
Канамицин	49	60
Гентамицин	53	82
Амикацин	47	98

Таблица 7

Чувствительность синегнойной палочки к антибактериальным препаратам

Препарат	Процент чувствительных штаммов	
	1984 г.	1988 г.
Карбенициллин	53	73
Левомецетин	6	11
Канамицин	9	12
Гентамицин	51	80
Тобрамицин	75	83
Амикацин	83	95
Полимиксин	69	86
Бисептол	8	8

Таблица 8

Режимы антибактериальной профилактики в сердечно-сосудистой хирургии

Режим профилактики	Вид операций
Интраоперационно и в течение всего периода пребывания больного в ОИТ	Операции на открытом сердце
Интраоперационно и в течение 2-3 сут после операции	Повторные операции на закрытом сердце, протезирование сосудов, имплантация каво-фильтров, окклюзия боталлова протока
Интраоперационно	Операции на закрытом сердце, операции на сосудах, имплантация ЭКС, катетерная ангиопластика и дилатация

Таблица 9

Антибактериальная профилактика в хирургии острого холецистита

Этап лечения	Профилактические воздействия
Перед операцией	Внутривенно струйно: цефамезин или цефатаксим 20-25 мг/кг, гентамицин 2-3 мг/кг или амикацин 7-8 мг/кг. Внутривенно капельно: метронидазол 500 мг
Во время операции	Посев желчи. Внутривенно струйно 1/2 исходной дозы антибиотиков (при операции более 2 ч)
После операции	Применение систем закрытого дренирования. Контроль антибиотикочувствительности микрофлоры желчи. Антибактериальная терапия холецистогенных или послеоперационных гнойно-септических осложнений

ный, или однократный, — одну дозу антибиотика вводят внутривенно во время операции; ультракороткий — первую дозу препарата вводят во время вводного наркоза, затем еще 1—2 дозы пре-

парата во время операции (в зависимости от ее длительности); кратковременный — за 2 ч до операции вводят первую дозу, затем в течение 24—48 ч после ее окончания продолжают введение антибиотика. Более длительное применение антибиотиков до операции и после нее не может быть названо профилактическим, так как обычно оно связано с лечением уже имеющейся инфекции. Разработаны также и рациональные схемы комбинированной антибиотикотерапии. Результаты такого подхода оказались достаточно убедительными (табл. 6, 7). Так, по сравнению с 1984 г. чувствительность стафилококков и пенициллину возросла более чем в 3 раза, в 2,5 раза реже стали выявляться его метициллинрезистентные формы. Значительно увеличилась активность цефалоспоринов, аминогликозидов, бисептола.

Примененная тактика способствовала повышению активности препаратов, действующих на синегнойную палочку, — карбенициллина, аминогликозидов, полимиксина.

Менее яркие, но также ощутимые результаты получены в отношении энтеробактерий. Разумеется, учитывая возможность развития у микроорганизмов этой группы хромосомной, плазмидной и транспортной резистентности, трудно было ожидать повышения активности каких-либо препаратов, кроме аминогликозидных, активность которых возросла в среднем на 13 %.

Микробиологические исследования позволили определить целесообразность и обосновать тактику профилактики антибиотиками в разных областях хирургии. Основу этого подхода составляет создание внутреннего антисептического фона организма в течение всего периода возможной контаминации. Концентрация антибиотика в это время должна превышать его минимальную подавляющую концентрацию. Продолжительность периода риска инфекционных осложнений зависит от характера оперативного вмешательства, анатомической зоны, особенностей ведения больного в послеоперационном периоде. Длительность периода риска колеблется от нескольких часов до нескольких суток. В зависимости от этого целесообразно применять тот или иной режим профилактики из разработанных в клинике.

Применяя эти общие закономерности к конкретным хирургическим ситуациям, были разработаны режимы антибактериальной профилактики в сердечно-сосудистой хирургии (табл. 8), в хирургии острого холецистита (табл. 9) и при некоторых других, наиболее часто встречающихся хирургических заболеваниях.

Подводя итог, следует отметить, что микробиологические исследования, проводимые в клинике, позволили не только расширить наши знания об инфекционных процессах у хирургических больных, не только контролировать эпидемическую ситуацию в хирургическом отделении, но и дали возможность получить значительный экономический эффект путем увеличения активности «старых» антибиотиков. Необходимо подчеркнуть, что такие масштабные исследования можно с успехом осуществить только с применением современных автоматизированных диагностических микробиологических систем, что реализуется на кафедре факультетской хирургии II ММИ им. Н. И. Пирогова с использованием оборудования фирмы.