

ТОМ 37

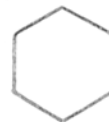
ВЫПУСК 1

ЯНВАРЬ — ФЕВРАЛЬ

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. И. ГЕРАСИМОВА, В. З. ГОРКИН, И. Б. ЗБАРСКИЙ,  
В. Л. КОЗЕЛЫЦЕВ (ответственный секретарь), А. Н. КЛИМОВ, Б. Ф. КОРОВКИН,  
Л. А. ЛОКШИНА, В. Н. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАНЧЕНКО, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ,  
Ю. А. РОМАКОВ, В. А. САКС, С. Е. СЕВЕРИН, В. Б. СПИРИЧЕВ, Е. А. СТРОЕВ

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

БАЕВ А. А. (Москва)  
БЫЧКОВ С. М. (Москва)  
КОНСТАНТИНОВ А. А. (Хабаровск)  
КУДРЯШОВ Б. А. (Москва)  
ЛЯХОВИЧ В. В. (Новосибирск)  
ПАСХИНА Т. С. (Москва)

ТРОИЦКИЙ Г. В. (Симферополь)  
ТУРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)  
ТЯХЕПЫЛД Л. Я. (Тарту)  
ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)  
ЯСЛАЙТИС А. А. (Вильнюс)



А. Е. Берман

## МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СОВРЕМЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАСТИ ИЗУЧЕНИЯ БИОСИНТЕЗА И РОЛИ БЕЛКОВ МЕЖКЛЕТОЧНОГО ВЕЩЕСТВА (ОБЗОР)

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Проблема изучения биосинтеза белков является одной из центральных проблем современной биохимии. Развитие исследований в этой области существенным образом зависит как от совершенствования традиционных методических приемов, применяемых в биохимии, так и от разработки новых подходов, открывающих такие возможности в изучении свойств и превращений компонентов живой материи, которые еще недавно были недоступны. Наиболее характерной особенностью методологии современной биохимии является использование методических подходов, разрабатываемых в смежных специальностях, таких как молекулярная генетика, иммунология, цитология и др.

Указанная особенность с наибольшей демонстративностью выявляется при анализе методологической базы, на которой основаны современные достижения в изучении биосинтеза, структуры и физиологической роли макромолекул соединительной ткани, в первую очередь белков межклеточного вещества [14]. Своеобразие методических подходов, используемых при исследовании структуры и биосинтеза белков соединительной ткани, определяется прежде всего свойственной им в большей степени, чем другим биополимерам данного класса, иерархичностью структурных и функциональных свойств. Многоступенчатый характер синтеза присущ всем белковым структурам. Однако в случае белков матрикса особую роль играет соподчиненность структурных образований, формирующихся на последовательных стадиях синтеза и интегрирующих результаты синтеза на предшествующих этапах [14, 17, 49].

Преобразование свойств и функций белкового продукта, которое осуществляется по мере его созревания, т. е. сборки полипептидной цепи, ко- и посттрансляционных модификаций, транспорта и секреции и, наконец, формирования надмолекулярных комплексов, наиболее четко прослеживается на примере белков межклеточного матрикса — коллагенов, фибронектина, ламинина и др. [6, 14, 17].

Во всех указанных превращениях, которые в широком понимании биосинтеза можно рассмат-

ривать как поэтапную реализацию потока информации, идущей от генома к белковой молекуле, а в рассматриваемом случае к надмолекулярной структуре, задействованы разнообразны вещества живого организма с весьма несходными биохимическими и физиологическими характеристиками: нуклеиновые кислоты, нуклеопротеидные комплексы, ферменты и белковые факторы, субклеточные органеллы, мембранные структуры и т. д. Изучение свойств этих компонентов составляет предмет отдельных направлений в биохимии и требует привлечения большого набора методических подходов, в то же время оно совершенно необходимо для изучения общих закономерностей белкового синтеза и выявления индивидуальных особенностей биосинтеза отдельных белков.

Из сказанного следует, что методология изучения белкового синтеза объединяет трудно поддающиеся какой-либо классификации, рубрикации наборы приемов, несходных между собой как по объекту исследования, так и по идеологии методических подходов.

Вместе с тем с учетом всех оговорок можно выделить несколько объединенных самими общими идейными предпосылками методических направлений, которые находят успешное применение в рассматриваемой области биохимии.

Прежде всего следует остановиться на методологии модельных систем. Известно, какую роль сыграло создание молекулярной модели комплементарного взаимодействия азотистых оснований в выяснении принципов построения и роли двойной спирали ДНК как хранителя и передатчика наследственной информации [62]. Модельные системы явились главным инструментом, с помощью которого был расшифрован генетический код. Выдвинутая Ниренбергом идея использования искусственных матриц и моделирования белкового синтеза в системе, содержащей отдельные компоненты белоксинтезирующего аппарата, оказалась очень плодотворной. Используя в качестве матриц трехчленные (состоящие из трех нуклеотидов) фрагменты, удалось установить комплементарность по антикодовым последовательностям тРНК, нагруженных соответствующими аминокислотами, и «прочитать» кодовые значения для каждой аминокислоты, т. е. наследственный код [45].

В настоящее время методология моделирования применяется для изучения всех этапов синтеза белков: выяснения структуры и роли различных участков генома; механизма считывания гена (его транскрипции) и факторов, контролирующих этот процесс; созревания информационных РНК и различные звенья трансляции; внутриклеточного транспорта белковых продуктов и их процессинга; секреции белков и их функционирования вне клетки и т. д. [2, 15, 22, 24, 29, 43, 50]. Поскольку речь идет о белках матрикса,

можно указать, что методология моделирования оказалась весьма успешной в изучении структурной организации надмолекулярных агрегатов, образуемых этими белками, а также, что особенно важно, процессов, в которых они участвуют [4, 17, 43, 49].

Особое значение имеет тот факт, что к этим процессам относятся ключевые свойства живой природы: деление и передвижение клеток, их дифференцировка, формообразование тканей, а при патологии процессы воспаления, иммунных реакций, злокачественного роста и связанных с ним нарушений, таких как метастазирование, инвазия и т. д. [38, 51, 57]. Механизмы, контролирующие эти процессы, и роль белковых компонентов матрикса в их реализации успешно исследуются с помощью их моделирования. Приведенные основные послылки можно проиллюстрировать конкретными примерами.

Исследование отдельных звеньев транскрипции и контролирующих их механизмов успешно осуществляется путем конструирования моделей, воспроизводящих конкретное звено транскрипции гена определенного белка. В частности, определение роли промотора — начального участка гена, с которого иницируется транскрипция, в регуляции синтеза коллагена было проведено путем конструирования химерной ДНК, состоящей из промотора гена коллагена и находящегося под контролем этого промотора бактериального гена, ответственного за синтез бактериального фермента — хлорамфениколацетилтрансферазы (ХАТ). Химерная ДНК была встроена в плазмиду, которую вводили в геном зародышевых клеток мыши. Выросшие из этих клеток животные (трансгенные мыши) содержат копии химерного гена в каждой из своих клеток. Однако совершенно чужеродная для мыши ферментативная активность была обнаружена только в тех тканях и на тех стадиях развития мыши, для которых характерен наиболее активный синтез коллагена. Из этих данных следует, что сигналы, включающие коллагеновый синтез в «нужном» месте и в «нужное» время, действуют на стадии инициации транскрипции генов коллагена [30].

Аналогичная методология с использованием модели химерной ДНК, содержащей промотор коллагенового гена, была применена для выяснения механизма действия одного из ростовых факторов —  $\beta$ -трансформирующего фактора роста [50]. Этот фактор, как ранее было установлено, стимулирует синтез коллагена, фибронектина и, по-видимому, некоторых других белков матрикса [46, 67]. В упомянутых экспериментах [50] химерный ген, состоящий из промотора  $\alpha$ -цепи коллагена, «сшитого» с геном ХАТ, вводили в фибробласты или клетки остеосаркомы. При добавлении в культуры этих клеток  $\beta$ -трансформирующего фактора обнаружено 5—10-кратное увеличение активности ХАТ. Небольшая модификация промотора гена  $\alpha$ -цепи, заключающаяся в том, что в нем заменили 3 пары оснований, полностью снимала эффект ростового фактора. Далее оказалось, что эта модификация сопровождается еще одним эффектом — препятствует взаимодействию с промотором одного из ядерных белков (фактора NF1), уча-

ствующего в регуляции транскрипции и репликации некоторых вирусных и клеточных генов. Если NF1-связывающий сайт промотора «сшить» с промотором вируса SV-40, то последний оказывается индуцируемым  $\beta$ -трансформирующим фактором роста. Таким образом, удалось не только доказать роль промотора коллагенового гена в механизме стимулирующего коллагеновый синтез действия фактора роста, но также локализовать в самом промоторе участок, ответственный за этот эффект.

Как видно, в приведенных исследованиях была применена не одна методологическая идея, а набор подходов, направленных на выяснение ряда вопросов: механизмов синтеза конкретного белка, механизмов действия определенного фактора роста и роли ядерных белковых посредников в регулировании функции гена.

Использование модели химерной ДНК в гене коллагена позволило локализовать участок, определяющий специфическое ингибирующее действие кортикостероидов на синтез коллагеновых мРНК [63]. В этом исследовании фибробласты, растущие в культуре, трансфецировали плазмидой, содержащей промотор  $\alpha_2(I)$ -цепи коллагена и ген ХАТ. Оказалось, что в присутствии дексаметазона в культуре резко снижается синтез бактериального фермента. Таким образом, эффект гормона реализуется на уровне промотора коллагенового гена.

Можно видеть, что реализация моделирования функции промотора потребовала применения изолированных генетических и вирусологических экспериментов, были использованы современная «технология» конструирования рекомбинантных ДНК, секвенирование нуклеотидных последовательностей и т. д.

Методология моделирования внутриклеточных механизмов находит применение также при анализе посттранскрипционных стадий белкового синтеза, например стадии трансляции. Важную роль в этом сыграли бесклеточные системы трансляции, содержащие информационные РНК отдельных белков, в том числе белков матрикса [1, 41, 42]. Такие системы оказались эффективным инструментом при выяснении внутриклеточной локализации синтеза конкретных белков, роли тех или иных факторов, модифицирующих белковый синтез на стадии считывания РНК, для характеристики структуры и функции отдельных компонентов белоксинтезирующего аппарата (рибосом, факторов трансляции, различных классов РНК) и т. д. [1, 41, 65].

Важным аспектом исследования белкового синтеза в бесклеточных системах явился анализ транслируемых *in vitro* пептидов, особенно тех участков, которые *in vivo* подвергаются быстрому процессингу и не обнаруживаются в белках, а следовательно, ускользают от анализа при изучении «зрелых» белковых форм. В этом отношении особенно ценна информация о трансляционных предшественниках белка, строении, составе и процессинге пептидов, механизмах последовательного протеолитического отщепления отдельных пептидных участков, выполняющих на стадии процессинга определенные функции. Например, при анализе трансляции коллагеновой мРНК в бесклеточной системе было установлено, что N-кон-

цевой пропептид, образовавшийся в результате ограниченного протеолиза из про- $\alpha$ -цепей коллагена I типа, при добавлении в систему специфически тормозит трансляцию коллагеновых матриц и не влияет на трансляцию неколлагеновых мРНК. В составе нативной молекулы (т. е. в составе про- $\alpha$ -цепи) указанный пептид не проявляет тормозящего эффекта [40].

При анализе продукта, синтезированного в бесклеточной системе, содержащей мРНК из хондроцитов, был идентифицирован биосинтетический предшественник соге-белка (сердцевинного белка) протеогликана хряща, молекулярная масса которого оказалась равной 340 кД [52], что соответствовало молекулярной массе частично гликозилированного соге-белка, выделяемого из хрящевых клеток. Однако оказалось, что соге-белки в составе протеогликанов, выделяемых из цельной хрящевой ткани, в которой эти полимеры локализованы в основном в матриксе, представлены гетерогенным набором молекул с молекулярной массой 200—250 кД [52]. Следовательно, гетерогенность протеогликанов матрикса обусловлена не синтезом различающихся по размеру соге-белков, а скорее всего их посттрансляционной деградацией в межклеточном веществе.

Модельные системы бесклеточного синтеза явились основным инструментом в выяснении механизмов внутриклеточного транспорта и секреции белков. Все основные этапы и характеристики внутриклеточной транслокации белковых продуктов в процессе их выведения из клетки или «адресовки» в те или иные органеллы были смоделированы в бесклеточных системах. Так, была установлена роль сигнального пропептида в селекции белков, предназначенных для секреции или транспортируемых во внутриклеточные отсеки; были открыты сигнализующие частицы (SRP-частицы) и определена их функция как основного материального носителя, реализующего сопряженные с трансляцией начальные стадии «движения» секретируемого продукта (контрансляционный транспорт белка) [19, 44, 54, 55, 60, 65].

Приведенные факты свидетельствуют о важном месте моделирования биологических процессов в общем методологическом арсенале исследований биосинтеза белковых продуктов, в том числе белков межклеточного вещества. К проблеме моделей мы еще вернемся при рассмотрении функциональных свойств белков матрикса.

Уже упоминалось, что характерной особенностью, объединяющей практически все исследования, посвященные биосинтезу белка, является соединение методических подходов из разных биологических дисциплин. Так, в описанных выше исследованиях по изучению промотора коллагеновых генов были использованы традиционно биохимические методы, методы генной инженерии, молекулярной генетики. Генетические подходы и направления играют важную роль в изучении структуры и синтеза белков матрикса. Среди этих направлений можно, в частности, указать цитогенетический анализ разновидовых клеточных гибридов с целью локализации в хромосомном наборе генов, кодирующих те или иные белки [20, 26, 48]. В случае коллагеновых белков эти исследования представляют особый

интерес, поскольку их полипептидные цепи кодируются не одним геном, а генным «семейством», состоящим примерно из 20 членов, которые определяют 13 генетически различных типов коллагена [32, 58], и с разных точек зрения важно определить, как организованы эти гены в геноме.

С этой целью получают гибриды соматических клеток разных видов (например, мыши и человека), которые, очевидно, содержат два набора хромосом. Гомологичные пары хромосом мыши и человека различаются между собой и легко идентифицируются микроскопически. Хромосомный набор в соматическом гибриде является неустойчивым и постепенно редуцирует, что приводит к получению клеточных клонов, содержащих делеции по разным хромосомам того или иного вида. Далее проводится сопоставление между видом делированной хромосомы и прекращением синтеза мРНК или белка с данной видоспецифичностью. С помощью такого подхода в геноме человека и других млекопитающих были локализованы гены, кодирующие  $\alpha$ -цепи коллагена [20, 26], ген фибронектина [48] и др. В частности, выяснилось, что гены, программирующие синтез  $\alpha_1(I)$ - и  $\alpha_2(I)$ -цепи (т. е. цепи, формирующие коллагеновые молекулы одного типа), локализованы в различных хромосомах [26]. В то же время гены  $\alpha_1(IV)$ - и  $\alpha_2(IV)$ -цепей коллагена IV типа сцеплены с одной хромосомой [20].

Особую роль в изучении биосинтеза, структуры и свойств белков межклеточного вещества играют подходы, применяемые в морфологических исследованиях, в первую очередь ультраструктурный и рентгеноструктурный анализ [8, 28, 47].

Можно утверждать, что морфологизация исследований является характерной особенностью методологии изучения структуры и биосинтеза белков матрикса. С помощью электронной микроскопии и анализа дифракции рентгеновых лучей под различными углами были установлены особенности спирализации цепей коллагена, формирование тройной спирали в мономерной молекуле, исследуются организация коллагеновых молекул в надмолекулярных структурах, механизмы фибриллообразования [8]. В биохимии коллагена электронная микроскопия применяется не только для анализа надмолекулярных комплексов, но и в совершенно специфическом аспекте, а именно при исследовании первичной структуры белка. Коллагеновые белки при определенных условиях образуют агрегаты из параллельно расположенных молекул, получившие название SLS-структур — Segment Long Spacing-агрегатов [8, 33]. В отличие от нативных коллагеновых волокон в SLS-структурах коллагеновые мономеры не сдвинуты относительно друг друга в параллельных рядах на период D, а находятся в «регистре», т. е. молекулы на всем протяжении прилегают друг к другу гомологичными участками. При прокрашивании солями тяжелых металлов аминокислотные остатки, несущие заряд, связывают анионы или катионы, содержащие атом тяжелого металла, в то время как нейтральные остатки их не связывают и остаются «прозрачными» для электронного луча. Определяемая на электронограмме исчерченность является, таким образом, «отпечатком» расположения заряженных

и незаряженных аминокислот вдоль  $\alpha$ -цепи. Спектр поперечной исчерченности уникален как для отдельных фрагментов молекулы, так и для коллагена различных типов.

SLS-агрегаты — один из уникальных случаев, когда детали первичной структуры белка обнаруживаются в электронном микроскопе. Этот подход широко применяется для быстрой локализации полипептидных фрагментов, полученных после расщепления  $\alpha$ -цепей, в исходных цепях, что особенно важно для «реконструкции» полной аминокислотной последовательности на основании первичной структуры пептидных фрагментов [33].

Ультраструктурный анализ нашел применение и для выяснения особенностей внутриклеточного транспорта и секреции белковых продуктов. SLS-агрегаты, впервые сформированные искусственным путем при создании условий, далеких от существующих в клетках [53], в более поздних исследованиях были обнаружены во внутриклеточных органеллах, участвующих в транспорте белка и его выведении из клеток: в шероховатом ретикулуме, области аппарата Гольджи, цитоплазматических гранулах [59]. Подобные структуры были также обнаружены в секрете, выделяемом растущими в культуре фибробластами, и в экстрацеллюлярном матриксе при анализе цельной ткани [10]. В связи с этим было высказано предположение, что надмолекулярные образования являются транспортной формой коллагена и, возможно, других белков [59].

Цели приведенных исследований и подходы к их реализации демонстрируют, насколько разнообразны, остроумны и изощренны методологические основы современной биохимии белкового синтеза.

Например, сборка SLS-агрегатов внутри клетки представляется трудно объяснимым феноменом, поскольку они, как указывалось, первоначально были открыты в виде искусственных структур, формирующихся в условиях, далеких от природных [53], в частности, для их образования необходимы относительно высокие концентрации коллагена, которые в клетке, по-видимому, не достигаются. Во всяком случае в среде культивируемых фибробластов эти структуры не обнаруживаются [25]. Однако можно было предположить, что локальное повышение концентрации коллагена, как и других белков, в клетке имеет место, например в так называемых «конденсирующих вакуолях», где происходит сгущение (конденсация) белкового секрета перед экзоцитозом. Проверка такой возможности была осуществлена в очень простом модельном опыте. Культуральную среду, содержащую мономеры коллагена, подвергли ультрацентрифугированию, т. е. имитировали своего рода конденсацию белкового материала. В результате в образованном осадке удалось обнаружить SLS-агрегаты [25].

Электронно-микроскопический анализ применяется для изучения структурной организации и физиологической роли всех белков матрикса [8, 23, 28, 47]. Так, в ультраструктурных исследованиях было установлено, что три полипептидные цепочки в молекуле ламинина образуют крестообразную структуру таким образом, что плечи «креста» на большей своей протяженности спирализованы и заканчиваются глобулярными

участками [68]. Спирализация центральной части молекулы и формирование глобул на ее концах характерны не только для ламинина, но и для другого важного компонента базальной мембраны — коллагена IV типа [34]. По-видимому, такая организация имеет существенное значение для межмолекулярных взаимодействий в базальной мембране, в то время как центральная часть важна для взаимодействия мембраны с клеточными элементами [35, 51, 56, 69]. Этот вывод подтверждается в работах, где использовалась иммуномикроскопическая техника, причем в качестве маркеров применялись моноклональные антитела [13, 56].

Важным и перспективным направлением в методологии исследований белкового синтеза являются иммунохимические подходы, получившие особое развитие в связи с разработкой гибридомной техники и возможностью получения моноклональных антител. С помощью этих высокоспецифических зондов была установлена доменная структура коллагена, фибронектина, ламинина и других макрокомпонентов бесклеточного вещества, выяснена локализация доменов — этих структурно и физиологически «обособленных» фрагментов — в нативных молекулах и в ряде случаев расшифрована их конкретная роль как в физиологических процессах, так и при определенных патологических состояниях [13, 51, 57, 68].

При исследовании про- $\alpha$ -цепей коллагена типа I, синтезированных *de novo* и связанных с полирибосомами (т. е. насцентных цепей, не прошедших процессирования и сохранивших концевые пропептиды), удалось установить принципиально важную особенность трансляции коллагеновых и, возможно, других мРНК, заключающуюся в том, что «считывание» этих матриц осуществляется не непрерывно, а в форме импульсов, разделенных временными паузами [31]. В методическом отношении указанный вывод основывался на анализе различающихся по размерам насцентных про- $\alpha$ -цепей с помощью электрофореза и выявления N- и C-концевых пропептидов в реакции иммуноблоттинга с использованием моноклональных антител к этим участкам молекулы.

Иммуноспецифическая локализация с помощью моноклональных антител отдельных доменов в молекулах фибронектинов, продуцируемых нормальными и онкотрансформированными клетками, показала, что различия между изоформами этих белков в норме и при трансформации обусловлена различиями в сплайсинге (так называемый альтернативный сплайсинг) фибронектиновых мРНК в указанных клетках [7].

Имунохимические подходы широко применяются при исследовании надмолекулярных форм белков межклеточного вещества. Известно, например, что образование надмолекулярных агрегатов коллагена IV типа, во многом определяющее структуру базальных мембран, обусловлено ковалентными межмолекулярными связями, в которых участвуют спирализованные домены 4 молекул, и нековалентным взаимодействием глобулярных участков 2 молекул коллагена [34]. С помощью иммуноэлектронной микроскопии была проведена локализация этих доменов в нативной молекуле, которая показала, что спирализованные фрагменты локализованы в N-концевой

области молекул и формирует так называемый 7S-домен, в то время как глобулярные участки (так называемые NC-1-домены) расположены в C-концевой области коллагена IV типа [34, 39].

Нарушение взаимодействий между макрокомпонентами базальной мембраны и других структур соединительной ткани может приводить к серьезным, иногда фатальным изменениям функции различных органов и тканей. К такой патологии можно отнести аутоиммунные заболевания, обусловленные выработкой антител к фрагментам коллагена и, по-видимому, других макромолекул соединительной ткани [9]. Взаимодействие аутоантител с соответствующим антигеном вызывает дезагрегацию соединительнотканых структур, что приводит к последствиям, тяжесть которых определяется локализацией антигена. Например, в случае синдрома Гудпасчера объектом аутоиммунной атаки являются упомянутые NC-1-домены коллагена IV типа — коллагена базальной мембраны, разрушение которой приводит к тяжелым поражениям почек и легких — органов, в функционировании которых роль базальных мембран исключительно важна [9, 12]. Диагностика синдрома Гудпасчера основана на обнаружении циркулирующего в крови антигена — фрагмента коллагена IV типа с помощью поли- или моноклональных антител [9, 12]. Иммунизация животных NC-1-фрагментом коллагена IV типа стимулирует развитие гломерулонефрита и поражений легких, характерных по клинике для синдрома Гудпасчера [16, 64].

Таким образом, иммунологическая «техника» во всем ее многообразии является важной и перспективной методологической основой изучения структуры, биосинтеза белков в норме и при различных заболеваниях.

В последнее время бурно развиваются исследования, направленные на выяснение роли белков межклеточного вещества в таких общебиологических процессах, как пролиферация и дифференцировка клеток, морфогенез органов и тканей, а также в возникновении на их основе патологических состояний, к которым относятся воспаление, нарушение регенерации, злокачественное перерождение клеток и др. [4, 6, 14, 17, 38, 49, 51, 57].

Для этих исследований в такой же степени, как для описанных выше, характерно применение очень разнообразных методических приемов. Вместе с тем объединяющей их методологической идеей является «вычлениение» из сложных и многоэтапных процессов отдельных звеньев и воспроизведение их *in vitro*. Таким образом, мы опять сталкиваемся с проблемой создания моделей.

Значительный прогресс достигнут, в частности, в изучении роли матрикса при дифференцировке клеток эпителия. В ряде работ, посвященных этой проблеме, с помощью конструирования *in vitro* трехмерных коллагеновых гелей моделируется пространственная организация эпителиальных клеток, которую вис клеточное вещество обеспечивает им в организме [3, 21, 37, 61]. Эпителий молочной железы в случае роста на плоских гелях утрачивает признаки дифференцировки. Если использовать денативированный, с тем сви-

детельствуют прекращение синтеза казеина и изменение морфологии клеток. Если такие клетки с четко выраженными признаками дедифференцированного фенотипа поместить в трехмерный гель, то можно наблюдать не только восстановление продукции специфического белка — казеина, но также появление характерных для молочной железы сегментированных гистологических структур — ацинусов [21, 37]. Другими словами, удается моделировать как процессы биохимической дифференцировки, так и влияние матрикса на морфогенетические функции.

В аналогичных по методическому подходу опытах с изолированными клетками поджелудочной железы удалось показать, что в условиях роста в трехмерном геле эти клетки восстанавливают характерные для исходной ткани поляризованные структуры. При том иммуноцитохимическая локализация инсулина и глюкагона — фенотипических маркеров клеток поджелудочной железы — соответствовала наблюдающейся *in vivo* [3].

Имунохимические подходы позволили установить физиологическую роль и других белков межклеточного вещества, как и значение их модификаций при тех или иных заболеваниях. В качестве примера можно указать на минорные коллагены и другие незначительные по содержанию, но весьма важные по функции компоненты матрикса — нидоген, энтактин, тенасцин и др. В исследовании структуры, биосинтеза этих биополимеров, определении их локализации в тканях ключевую роль играют методы, основанные на применении иммуноаффинной хроматографии, иммуноблоттинга, а также разнообразные иммуноморфологические методики [9, 18, 32, 36].

С помощью указанных подходов было, например, установлено, что нидоген, как и коллаген IV типа, локализован в плотной пластинке базальной мембраны (*lamina densa*), в то время как ламинин входит в состав «прозрачной» пластинки (*lamina lucida*) [18, 32]. Относительно недавно идентифицированный новый тип коллагена (VII) является составной частью так называемых заякоривающих фибрилл, участвующих в дермоэпидермальных контактах [32, 66]. Особенности локализации белков матрикса определяют своеобразие морфологических и клинических проявлений, молекулярная основа которых состоит в нарушении структуры и биосинтеза этих белков. Например, тяжесть клинической картины при синдроме Гудпасчера, обусловленном дезагрегацией коллагена IV типа, связана, очевидно, с деструкцией *lamina densa* — «сердцевинной» части базальной мембраны и вызванного этим глубоким нарушением ее функций, прежде всего тех, которые регулируют взаимодействие между эпителием и эндотелием, с одной стороны, и клетками мезенхимального происхождения — с другой.

Имуноморфологический анализ кожи больных, страдающих одной из форм кожного заболевания (*Epidermolys bullosa*), клинически сходного с пузырчаткой, показал, что дерма этих больных существенно слабее связывает антитела к коллагену VII типа по сравнению с дермой здоровых людей [32]. Снижение синтеза коллагена VII типа или усиление его распада (предполагается, что клетки дермы больных в отличие от здоровых лиц продуцируют коллагеназу, расщеп-

ляющую этот коллаген [5, 32]) способствует, по-видимому, деструкции «якорных» фибрилл и ослаблению дермоэпидермальных контактов с вытекающими патоморфологическими и клиническими проявлениями заболевания. Во всяком случае, хотя природа дефекта в продукции указанного коллагена не выяснена, приведенный пример показывает эффективность иммунологических подходов в расшифровке нарушений синтеза и обмена индивидуального белка, составляющих молекулярную основу конкретной патологии.

Взаимодействие клеток с матриксом определяет такие важные проявления их жизнедеятельности, как пролиферация, миграция, а в случае опухолевого роста инвазия и метастазирование [4, 14, 38]. Роль отдельных белков в этих процессах также успешно исследуется путем конструирования модельных систем. В такого рода экспериментах клетки выращивают в культуре на субстратах (подложках), содержащих отдельные белки матрикса или отдельные домены этих белков, в присутствии или в отсутствие антител к поверхностным белкам клетки — клеточным рецепторам, которые препятствуют взаимодействию соответствующего рецептора с определенным доменом белка. Изменение поведения клеток (открепление от субстрата, нарушение подвижности или пролиферации) указывает на роль конкретного домена в реализации функции определенного белка или матрикса в целом. Так, было установлено, что в адгезии клеток различного происхождения на фибронектине определяющую роль играет центральная часть его молекулы (центральный домен), в то время как домен, расположенный в N-концевой области, принимает участие в передвижении клеток по матриксу [11, 43, 51]. С применением такого подхода было показано, что пептидные участки фибро- и витронектина, ответственные за адгезию клеток, обладают рядом общих свойств, из которых наиболее существенным является наличие последовательности Arg — Gly — Asp (RGD-пептид), играющий роль универсальной детерминанты во взаимодействии клеток высших организмов с межклеточным веществом [11, 51]. Взаимодействие клеток с указанными белками опосредуется локализованными на плазматической мембране рецепторами, которые, с одной стороны, специфичны для каждого белка, а с другой — весьма сходны по структуре, характеру взаимодействия с лигандом и ряду других свойств.

Выделение и характеристика этих рецепторов успешно осуществляются в настоящее время с помощью описанного методологического арсенала, который включает и моделирование клеточных взаимодействий, и иммунохимические подходы, и методы молекулярной биологии, и ультраструктурный анализ, и многие другие приемы. В результате этих исследований было открыто удивительное явление в физиологии клеток, которое заключается в том, что такие на первый взгляд далекие процессы, как адгезия и движение клеток, реакции клеточного иммунитета, механизмы свертывания крови, осуществляются с участием очень похожих по структурной организации рецепторов клеточной поверхности [11, 27, 51]. Это один из примеров единства живой природы, которая умеет находить экономные приемы и методы для реализации своего великого многообразия.

1. Берман А. Е., Морозевич Г. Е., Оборотова Т. А., Мазуров В. И. // Биохимия.— 1987.— Т. 52, № 3.— С. 493—502.
2. Кавсан В. М. // Молекул. биол.— 1986.— Т. 20.— С. 5—20.
3. Amory B., Mourmeaux J.-L., Remacle C. // In Vitro Cell. Develop. Biol.— 1988.— Vol. 24.— P. 91—99.
4. Basement Membrane and Cell Movements.— London, 1984.
5. Bauer E. A. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1977.— Vol. 74.— P. 4646—4650.
6. Biology, Chemistry and Pathology of Collagen.— New York, 1985.
7. Borsi L., Carnemolla B., Castellani P. et al. // J. Cell. Biol.— 1987.— Vol. 104.— P. 595—600.
8. Brodsky B., Eikenberry E. F. // Meth. Enzymol.— 1982.— Vol. 82, Pt A.— P. 127—174.
9. Bruijn J. A., Hogendoorn P. C. W., Hoedemaeker P. J., Fleuren G. J. // J. Lab. clin. Med.— 1988.— Vol. 111.— P. 140—149.
10. Bruns R. R., Hulmes D. J. S., Therrien S. F., Cross J. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1979.— Vol. 76.— P. 313—317.
11. Buck C. A., Horwitz A. F. // Ann. Rev. Cell Biol.— 1987.— Vol. 3.— P. 179—205.
12. Bulkowski R. T., Wieslander J., Wisdom B. J., Barr J. F. // J. biol. Chem.— 1985.— Vol. 60.— P. 3739—3747.
13. Caterson B., Calabro T., Hampton A. // Biology of Proteoglycans.— Orlando, 1987.— P. 1—26.
14. Cell Biology of Extracellular Matrix.— New York, 1985.
15. Czaja M. J., Weiner F. R., Eghlali M. et al. // J. biol. Chem.— 1987.— Vol. 262.— P. 13348—13351.
16. Fouser L. S., Michael A. F., Kleppel M. M. et al. // Kidney int.— 1987.— Vol. 31.— P. 319.
17. Extracellular Matrix: Structure and Function.— New York, 1985.
18. Dziadek M., Paulsson M., Timpl R. // EMBO J.— 1985.— Vol. 4.— P. 2513—2518.
19. Gilmore R., Blobel G. // Cell.— 1985.— Vol. 42.— P. 497—505.
20. Griffin C. A., Emanuel B. S., Hansen J. R. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1987.— Vol. 84.— P. 512—516.
21. Hall H. J., Farson D. A., Bissel M. J. // Ibid.— 1982.— Vol. 79.— P. 4672—4676.
22. Hann S. R., King M. W., Bentley D. L. et al. // Cell.— 1988.— Vol. 52.— P. 185—195.
23. Hascall V. C., Hascall G. K. // Cell Biology of Extracellular Matrix.— New York, 1985.— P. 39—63.
24. Horsch M., Meyer D. I. // Int. Rev. Cytol.— 1986.— Vol. 102.— P. 215—242.
25. Hulmes D. J. S., Bruns R. R., Gross J. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1983.— Vol. 80.— P. 388—392.
26. Huerre C., Junien C., Weil D. et al. // Ibid.— 1982.— Vol. 79.— P. 6627—6630.
27. Hynes R. O. // Cell.— 1987.— Vol. 48.— P. 549—554.
28. Hynes R. // Ann. Rev. Cell Biol.— 1985.— Vol. 1.— P. 67—90.
29. Ibrahim I. // J. Cell Biol.— 1987.— Vol. 104.— P. 81—66.
30. Khillan J. S., Schmidt A., Overbeek P. A. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1986.— Vol. 83.— P. 725—729.
31. Kirk T. Z., Evans J. S., Veis A. // J. biol. Chem.— 1987.— Vol. 262.— P. 5540—5545.
32. Krieg T., Hein R., Hatamochi A., Aumailley M. // Europ. J. clin. Invest.— 1988.— Vol. 18.— P. 105—123.
33. Kuhn K. // Collagen Relat. Res.— 1982.— Vol. 2.— P. 61—82.
34. Kuhn K., Glanville R., Babel W. et al. // Ann. N. Y. Acad. Sci.— 1985.— Vol. 460.— P. 14—24.
35. Laurie G. W., Bing J. T., Kleinman H. K. et al. // J. molec. Biol.— 1986.— Vol. 189.— P. 205—216.
36. Laurie G. W., Leblond G. P., Inoue S. et al. // Amer. J. Anat.— 1984.— Vol. 169.— P. 463—481.
37. Lee E. J. H., Parry G., Bissel M. J. // J. Cell Biol.— 1984.— Vol. 98.— P. 146—155.
38. Liotta L. A., Rao C. N., Wewer U. M. // Ann. Rev. Biochem.— 1986.— Vol. 55.— P. 1037—1057.
39. Mayne R., Wiedemann H., Irwin M. II. et al. // J. Cell Biol.— 1984.— Vol. 98.— P. 1637—1644.
40. McPherson J. M., Horlein D., Bornstein P., Abbot-Brown D. // J. Biol. Chem.— 1982.— Vol. 257.— P. 8557—8561.
41. Mize N. K., Andrews D. W., Lingappa V. R. // Cell.— 1986.— Vol. 47.— P. 711—719.
42. Monson J. M. // Meth. Enzymol.— 1982.— Vol. 82, Pt A.— P. 218—225.

43. Newman S. A., Frenz D. A., Hasegawa E., Akiyama S. K. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1987.— Vol. 84.— P. 4791—4795.
44. Nguyen M., Argran C., Sheffield W. P. et al. // J. Cell Biol.— 1987.— Vol. 104.— P. 1193—1198.
45. Nirenberg M., Leder P. // Science.— 1964.— Vol. 245.— P. 1399—1407.
46. Penttinen R. P., Kobayashi S., Bornstein P. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1988.— Vol. 85.— P. 1105—1108.
47. Poole // Biochem. J.— 1986.— Vol. 236.— P. 1—14.
48. Prowse K. R., Tricoli J. V., Klebe R. J., Shows T. B. // Cytogenet. Cell Genet.— 1986.— Vol. 41.— P. 42—46.
49. Regulation of Matrix Accumulation.— New York, 1986.
50. Rossi P., Karsenty G., Roberts A. B., Roche N. S. // Cell.— 1988.— Vol. 52.— P. 405—414.
51. Ruoslahti E. // Ann. Rev. Biochem.— 1988.— Vol. 57.— P. 375—413.
52. Sandell L. J. // Biology of Proteoglycans.— Orlando, 1987.— P. 27—57.
53. Schmitt F. O., Gross J., Highberger J. H. // Exp. Cell Res.— 1955.— Vol. 3.— P. 306—312.
54. Simon K., Perare E., Lingappa V. R. // J. Cell Biol.— 1987.— Vol. 104.— P. 1165—1172.
55. Singer S. J., Maher P. A., Yaffe M. P. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1987.— Vol. 84.— P. 1015—1019.
56. Skubitz A. P. N., Charonis A. S., Tsilibary E. C., Furcht L. T. // Exp. Cell Res.— 1987.— Vol. 173.— P. 349—369.
57. Structural Glycoproteins in Cell-Matrix Interactions.— Basel, 1986.
58. Tikka L., Pihajaniemi T., Henttu P. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1988.— Vol. 85.— P. 7491—7495.
59. Trelstad R. L., Hayashi K. // Develop. Biol.— 1979.— Vol. 71.— P. 228—242.
60. Walter P., Blobel G. // Nature.— 1982.— Vol. 299.— P. 691—698.
61. Wasserman A. J., Berg R. A., Silver F. H. // J. Cell Biol.— 1986.— Vol. 103, N 5. Pt 2.— P. 248—260.
62. Watson J. D. The Double Helix.— New York, 1968.
63. Weiner F. R., Czaja M. J., Jefferson D. M. et al. // J. Biol. Chem.— 1987.— Vol. 262.— P. 6955—6958.
64. Wick J., von der Mark H., Dietrich H., Timpt R. // Lab. Invest.— 1986.— Vol. 55.— P. 308—317.
65. Wiedemann M., Kurzchalia T. V., Bielka H., Rapoport T. A. // J. Cell Biol.— 1987.— Vol. 104.— P. 201—208.
66. Woodley D. T., Briggman R. A., O'Keefe E. J. et al. // New Engl. J. Med.— 1987.— Vol. 16.— P. 1007—1013.
67. Wrana J. L., Maeno M., Hawrylyshyn B. et al. // J. Cell Biol.— 1988.— Vol. 106.— P. 915—924.
68. Yamada K. M. // Cell Biology of Extracellular Matrix.— New York, 1981.— P. 95—114.
69. Yurchenco P. D., Farthmayr H. // Biochemistry (Wash.).— 1984.— Vol. 23.— P. 1839—1850.

Поступила 24.03.89

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616.13-004.6-092-07:616.153.915

Е. Б. Яровая, В. А. Метельская, Н. В. Перова

## МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ОБМЕНА АПОЛИПОПРОТЕИНА В В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Всесоюзный кардиологический научный центр АМН СССР, Москва

Одной из причин развития атеросклероза является нарушение транспорта липидов в составе липопротеидов (ЛП) плазмы крови [5]. Для определения основных путей регуляции обмена ЛП и выявления патологии важно знать константы скоростей реакций поступления в плазму, транспорта, катаболизма ЛП и соотношения между ними [10]. На этом этапе целесообразно привлечение математического моделирования [8].

В работах [8, 10] константы скоростей реакций

определяли из результатов экспериментов с введением изотопных меток в аполипопротеин В (апо-В). Проведение гемосорбции или иммуносорбции, вносящих возмущение в биологическую систему обмена ЛП плазмы крови, позволяет предложить принципиально иной метод нахождения констант [4, 6, 7]. С целью снижения уровня холестерина (ХС) в ходе данных процедур у пациентов удаляются ЛП из плазмы крови. Вследствие этого система обмена ЛП, содержащих апо-В, выходит из стационарного состояния. Задача работы — разработка математической модели, на основе которой с использованием данных о содержании апо-В в плазме крови после проведения гемосорбции или иммуносорбции, с привлечением методов решения обратных задач [1] можно найти искомые константы при условии их неизменности в ходе процесса.

Методика. Предлагаемая модель метаболизма апо-В в плазме крови человека описывается системой линейных дифференцированных уравнений второго порядка с положительными коэффициентами:

$$\frac{dB_1}{dt} = -k_0 - k_4(B_1 + B_2) - (k_1 + k_2)B_1, \quad (1)$$

$$\frac{dB_2}{dt} = k_1B_1 - k_3B_2, \quad (2)$$

начальные условия которой  $B_1(0) = B_{01}$ ,  $B_2(0) = B_{02}$  удовлетворяют неравенствам

$$0 < B_{01} \leq B_{1cr}, \quad (3)$$

$$0 < B_{02} \leq B_{2cr},$$

где  $B_{1cr}$ ,  $B_{2cr}$  определяются из уравнения

$$\frac{dB_1}{dt} = \frac{dB_2}{dt} = 0.$$

Пункт 1. Из системы дифференциальных уравнений (1), (2) находим вид прямой, удовлетворяющей условию

$$\frac{d(B_1 + B_2)}{dt} = 0, \quad B_2 = -\frac{(k_2 + k_4)}{(k_3 + k_4)}B_1 + \frac{k_0}{k_3 + k_4}.$$

Прямая разделяет фазовую плоскость  $B_1B_2$  на 2 области, ограниченные неравенствами  $\frac{d(B_1 + B_2)}{dt} > 0$  и  $\frac{d(B_1 + B_2)}{dt} < 0$ .

Точка с координатами  $(B_{01}, B_{02})$ , удовлетворяющими неравенствам (3), принадлежит области, в которой  $\frac{d(B_1 + B_2)}{dt} > 0$ . Таким образом, сумма решений  $B_1(t) + B_2(t)$  дифференциальных уравнений (1), (2) в окрестности точки  $(B_{01}, B_{02})$  возрастает [3].

Введем ограничение на коэффициенты (смысл этого условия будет раскрыт в следующем разделе):

$$k_1 > k_3.$$

Пункт 2. Исследуем систему дифференциальных уравнений (1), (2) при  $k_4 = 0$ :

$$\frac{dB_1}{dt} = -k_0 - (k_1 + k_2)B_1, \quad (5)$$

$$\frac{dB_2}{dt} = k_1B_1 - k_3B_2. \quad (6)$$

Выпишем собственные значения матрицы А, составленной из коэффициентов правой части системы (5), (6):

$$A = \begin{pmatrix} -(k_1 + k_2) & 0 \\ k_1 & -k_3 \end{pmatrix}, \quad \lambda_1 = -k_3, \quad \lambda_2 = -(k_1 + k_2).$$



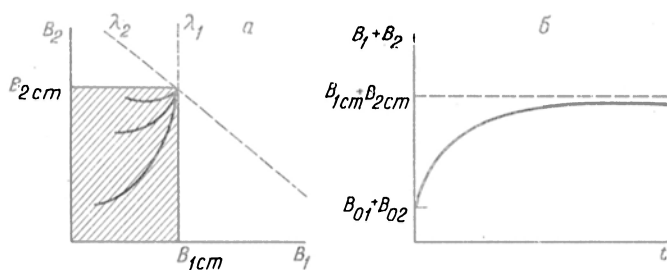


Рис. 1. Фазовый портрет системы дифференциальных уравнений (5), (6) (а) и поведение суммарной концентрации апо-В  $B_1(t) + B_2(t)$  после проведения иммуносорбции или гемосорбции при постоянной скорости поступления апо-В в кровоток (б).

$B_{01}+B_{02}$  — концентрация апо-В в плазме крови после проведения данных процедур;  $B_{1ст}+B_{2ст}$  — концентрация апо-В в кровотоке в стационарном состоянии;  $\lambda_1, \lambda_2$  — прямые, соответствующие собственным векторам  $\lambda_1, \lambda_2$ ;  $(B_{1ст}, B_{2ст})$  — координаты стационарного состояния (устойчивый узел); заштрихована область, в которой начинаются траектории решений системы (5), (6), на фазовой плоскости  $B_1, B_2$ .

В силу положительности констант  $k_1, k_2, k_3$  и ограничения (4) получаем

$$\lambda_2 < \lambda_1 < 0.$$

$\lambda_1, \lambda_2$  — различные действительные числа одного знака, следовательно, особая точка  $(B_{1ст}, B_{2ст})$  — устойчивый узел [2]. Собственные векторы при  $\lambda = -k_3$  и  $\lambda = -(k_1+k_2)$  имеют вид:

$$(0,1), \left( \frac{k_3 - (k_1+k_2)}{k_1}, 1 \right).$$

На фазовой плоскости  $B_1, B_2$  строим решения, направленные вдоль этих векторов, выходящих из точки  $(B_{1ст}, B_{2ст})$ . Остальные решения касаются той прямой, которая направлена вдоль собственного вектора, соответствующего  $\lambda = -k_3$ . Выделим траектории решений на фазовой плоскости  $B_1, B_2$ , начинающиеся в области, ограниченной неравенствами (3) (см. фазовый портрет на рис. 1). Поведение суммы решений  $B_1(t) + B_2(t)$  является строго возрастающим.

Пункт 3. Исследуем систему дифференциальных уравнений (1), (2). На фазовой плоскости  $B_1, B_2$  существует единственное стационарное состояние, координаты которого  $(B_{1ст}, B_{2ст})$ .  $B_{1ст}$  и  $B_{2ст}$  имеют вид:

$$B_{1ст} = \frac{k_0 k_3}{k_3(k_1+k_2+k_4) + k_4 k_1},$$

$$B_{2ст} = \frac{k_0 k_1}{k_3(k_1+k_2+k_4) + k_4 k_1}.$$

Для определения типа стационарного состояния найдем собственные значения матрицы  $A$ :

$$A = \begin{pmatrix} -(k_1+k_2+k_4) - k_4 & k_4 \\ k_1 & k_3 \end{pmatrix}.$$

Выпишем их

$$\lambda_{1,2} = \frac{-(k_1+k_2+k_3+k_4) \pm \sqrt{D}}{2},$$

где  $D = (k_1+k_2+k_4-k_3)^2 - 4k_1 k_4$  — дискриминант характеристического уравнения матрицы  $A$ .

Рассмотрим возможные комбинации значений  $\lambda_1$  и  $\lambda_2$ , учитывая введенное выше ограничение на коэффициенты (4).

1. Если  $D > 0$ , то  $\lambda_2 < \lambda_1 < 0$ , т. е. корни характеристического уравнения  $\lambda_1, \lambda_2$  различные действительные числа одного знака. Значит стационарное состояние — устойчивый узел [2]. Положительность  $D$  равносильна выполнению одного из следующих соотношений между коэффициентами:

$$\begin{aligned} k_2 > k_3; \\ k_2 = k_3, k_4 \neq k_1; \\ k_3 > k_2, k_1 > k_4, \sqrt{k_1} - \sqrt{k_4} > \sqrt{k_3} - k_2; \end{aligned}$$

$$k_3 > k_2, k_4 > k_1, \sqrt{k_4} - \sqrt{k_1} > \sqrt{k_3} - k_2.$$

2. При  $D = 0$  имеем  $\lambda_1 = \lambda_2 < 0$ . Отсюда, учитывая вид рассматриваемой системы (1), (2) можно заключить, что стационарное состояние — вырожденный узел [2]. Условие  $D = 0$  достигается при одном из соотношений:

$$\begin{aligned} k_2 = k_3, k_4 = k_1; \\ k_3 > k_2, \sqrt{k_4} - \sqrt{k_1} = \sqrt{k_3} - k_2. \end{aligned}$$

3. Пусть  $D < 0$ , тогда корни характеристического уравнения  $\lambda_1, \lambda_2$  — комплексно-сопряженные с отрицательной действительной частью. Следовательно, стационарное состояние — устойчивый фокус [2]. Неравенство  $D < 0$  выполняется при

$$k_3 > k_2, |\sqrt{k_4} - \sqrt{k_1}| > \sqrt{k_3} - k_2.$$

Перейдем к исследованию поведения суммы решений  $B_1(t) + B_2(t)$  системы дифференциальных уравнений в каждом из случаев. Учтем, что в окрестности точки  $(B_{01}, B_{02})$  сумма решений  $B_1(t) + B_2(t)$  может только возрастать (см. пункт 1).

Если стационарное состояние устойчивый или вырожденный узел, возможны 2 случая: а) на фазовой плоскости  $B_1, B_2$  фазовые траектории решений системы дифференциальных уравнений (1), (2) не выходят из области, ограниченной

неравенством  $\frac{d(B_1+B_2)}{dt} > 0$ , следовательно,  $B_1(t) + B_2(t)$  —

строго возрастающая функция; б) на фазовой плоскости  $B_1, B_2$  фазовые траектории решений системы дифференциальных уравнений (1), (2) начинаются в области, точки которой

удовлетворяют неравенству  $\frac{d(B_1+B_2)}{dt} > 0$ , пересекая прямую

$\frac{d(B_1+B_2)}{dt} = 0$ , попадают в область, ограниченную не-

равенством  $\frac{d(B_1+B_2)}{dt} < 0$ . Это означает, что, начиная с не-

которого  $t$ ,  $B_1(t) + B_2(t) > B_{1ст} + B_{2ст}$ . Значит функция  $B_1(t) + B_2(t)$  вначале строго возрастает, достигает своего максимума и затем строго убывает.

Определим, при каких соотношениях между коэффициентами выполняется неравенство  $B_1(t) + B_2(t) > B_{1ст} + B_{2ст}$ . Прямая  $B_2 = -B_1 + B_{1ст} + B_{2ст}$  разделяет фазовую плоскость на 2 области, удовлетворяющие неравенствам  $B_1 + B_2 < B_{1ст} + B_{2ст}$  и  $B_1 + B_2 > B_{1ст} + B_{2ст}$ . Траектории решений системы дифференциальных уравнений (1), (2) начинаются на фазовой плоскости в области, ограниченной условием  $B_1 + B_2 < B_{1ст} + B_{2ст}$  и касаются той прямой, которая направлена

вдоль собственного вектора  $\left( \frac{\lambda_1 + k_3}{k_1}, 1 \right)$ , исходящего из

точки  $(B_{1ст}, B_{2ст})$  [2]. Для того чтобы траектории решений системы дифференциальных уравнений (1), (2) попали в область, ограниченную неравенством  $B_1 + B_2 > B_{1ст} + B_{2ст}$ , необходимым и достаточным условием является

$$\frac{\lambda_1 + k_3}{k_1} < -1 \Leftrightarrow \frac{k_3 - (k_1 + k_2 + k_4)}{2k_1} < -1. \quad (7)$$

В случае устойчивого узла неравенства (7) выполняется при соотношении

$$k_3 > k_2, k_1 < k_4, \sqrt{k_4} - \sqrt{k_1} > \sqrt{k_3} - k_2;$$

в случае вырожденного узла при

$$k_3 > k_2, k_4 > k_1, \sqrt{k_4} - \sqrt{k_1} = \sqrt{k_3} - k_2.$$

Таким образом, установлено, при каких соотношениях между коэффициентами выполняются условия а) и б).

Если стационарное состояние — устойчивый или вырожденный узел, то случаю а) соответствуют фазовые портреты на рис. 2, а, б, в, г, случаю б) — фазовые портреты на рис. 2, в, д. Поведение суммы решений  $B_1(t) + B_2(t)$  системы дифференциальных уравнений (1), (2), отвечающее данному стационарному состоянию, может быть 2 типов. Первый тип — сумма решений  $B_1(t) + B_2(t)$  — строго возрастающая функция (рис. 3, а, 4, а); второй тип — сумма решений  $B_1(t) + B_2(t)$  представляет собой функцию, имеющую максимум в точке  $t_0 > 0$  (рис. 3, б, 4, б).

При стационарном состоянии — устойчивом фокусе, возникает третий тип поведения суммы решений  $B_1(t) + B_2(t)$ , представляющий собой затухающие колебания [2] (рис. 4, в).

Таким образом, проанализированы все возможные типы поведения суммы решений системы дифференциальных уравнений (1), (2), начальные условия которой удовлетворяют неравенствам (3).

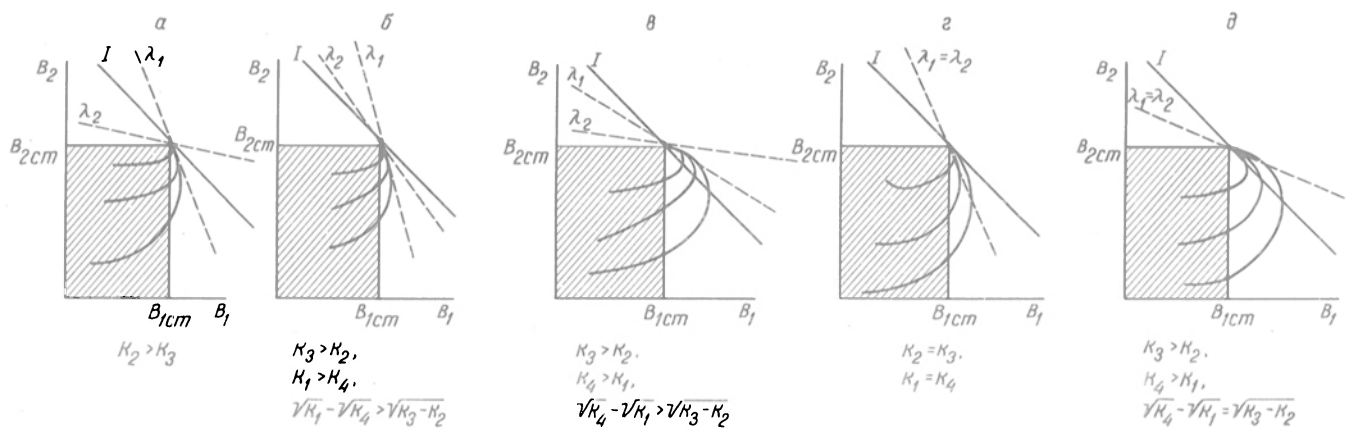


Рис. 2. Фазовый портрет системы дифференциальных уравнений (1), (2), если стационарное состояние устойчивый (а, б, в) или вырожденный (г, д) узел.

Прямая I имеет вид  $B_2 = -B_1 + B_{1ст} + B_{2ст}$ . Внизу приведены соотношения между коэффициентами, при которых наблюдается фазовый портрет.

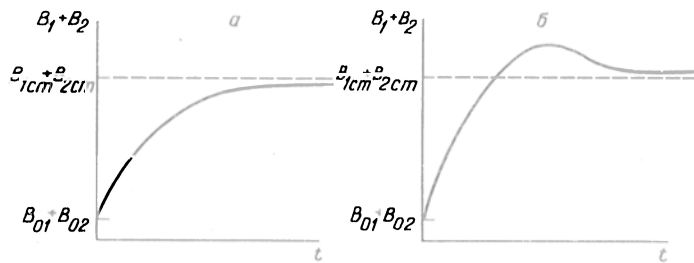


Рис. 3. Поведение суммарной концентрации апо-В после проведения иммуносорбции или гемосорбции, если скорость поступления апо-В в кровотоки зависит от концентрации апо-В в плазме крови и стационарное состояние — устойчивый или вырожденный узел.

а — тип поведения, соответствующий фазовым портретам на рис. 2, а, б, в; б — тип поведения соответствующий фазовым портретам на рис. 2, в, д.

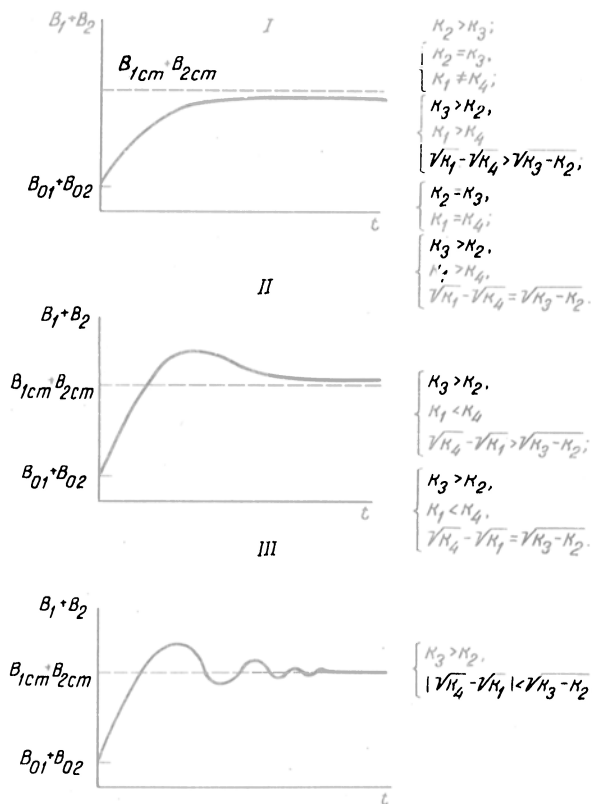


Рис. 4. Классификация типов поведения суммарной концентрации.

апо-В после проведения иммуносорбции и гемосорбции, если скорость поступления апо-В в кровотоки зависит от содержания апо-В в плазме крови. По оси ординат — концентрация апо-В; по оси абсцисс — время (в днях) после проведения процедур. I — первый тип, стационарное состояние: устойчивый или вырожденный узел; II — второй тип, стационарное состояние: устойчивый или вырожденный узел; III — третий тип, стационарное состояние — фокус (устойчивый).

Результаты и обсуждение. Остановимся на биологическом описании процесса, на основе которого построена математическая модель. Накопление ХС в стенках сосудов характерно для атеросклероза. ЛП, доставляющие ХС к стенкам сосудов, рассматриваются как атерогенные [5]. Атерогенными являются ЛП низкой и очень низкой плотности (ЛПНП и ЛПОНП). Основным белковым компонентом этих ЛП является апо-В. Апо-В проходит весь путь от места синтеза к месту катаболизма в составе той липопротеидной частицы, с которой он секретируется в плазму крови. Апо-В поступает в кровотоки в основном в составе ЛПОНП. В кровотоке ЛПОНП превращаются в ЛПНП, теряя часть липидов и «минорные» белковые компоненты, за исключением апо-В. Превращение происходит с участием фермента липопротеидлипазы, который катализирует расщепление гидрофобных липидных компонентов — триглицеридов ЛПОНП [11]. Удаление ЛП из плазмы крови осуществляется через взаимодействие ЛП с клеточными рецепторами или путем эндоцитоза.

Приступим к формализации, необходимой для построения модели. Пусть  $B_1$  — концентрация апо-В в плазме крови, находящегося в составе липопротеидных частиц, непосредственно поступающих в кровотоки (в основном в составе ЛПОНП). Обозначим через  $B_2$  концентрацию апо-В, содержащегося в частицах ЛПНП, образующихся в результате липопротеидлиполиза [11].

Описываемый процесс может быть представлен в виде схемы, изображенной на рис. 5. Здесь

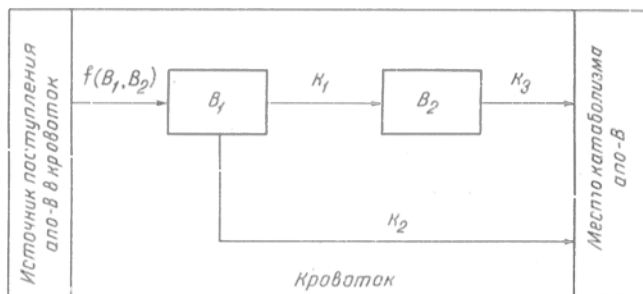


Рис. 5. Схема обмена апо-В в плазме крови, на основе которой построена модель (обозначения в тексте).

$k_1$  — константа скорости перехода апо-В ЛПОНП в апо-В ЛПНП, выражающая отношение скорости превращения апо-В ЛПОНП в апо-В ЛПНП к концентрации апо-В ЛПОНП;  $k_2, k_3$  — константы скорости удаления апо-В из кровотока в составе ЛПОНП и ЛПНП, соответственно, характеризующие отношение скорости удаления апо-В в составе определенного типа ЛП к концентрации апо-В этих ЛП в плазме крови. Данные константы имеют размерность (время)<sup>-1</sup> и положительны.

Предположим, что скорость поступления в кровоток зависит от общей концентрации апо-В в плазме крови и выражается функцией  $f(B_1, B_2)$ . Согласно приведенной схеме, изменение концентраций  $B_1$  и  $B_2$  во времени описывается дифференциальными уравнениями:

$$\frac{dB_1(t)}{dt} = f(B_1(t), B_2(t)) - (k_1 + k_2)B_1(t), \quad (8)$$

$$\frac{dB_2(t)}{dt} = k_1B_1(t) - k_3B_2(t). \quad (9)$$

Проведение иммуносорбции, позволяющей специфично извлечь содержащие апо-В ЛПНП и ЛПОНП, не изменяя содержания других компонентов плазмы крови, или гемосорбции, снижающей уровень ЛПНП и ЛПОНП, вносит возмущение в биологическую систему обмена ЛП плазмы крови [4, 9]. На основе предложенной схемы, используя данные о содержании апо-В в плазме крови после проведения этих процедур, с помощью стандартных методов решения обратных задач [1] можно найти искомые константы при условии их неизменности в ходе процесса.

Проведем качественный анализ модели. Учтем эмпирические факты, с помощью которых получим дополнительные условия, позволяющие упростить исследование дифференциальных уравнений (8), (9). Рассмотрим уравнение стационарного состояния:

$$\frac{dB_1(t)}{dt} = \frac{dB_2(t)}{dt} = 0. \quad (10)$$

Обозначим  $B_1$  и  $B_2$  в стационарном состоянии

через  $B_{1ст}$  и  $B_{2ст}$  соответственно. Из уравнений (9), (10) получаем:

$$\frac{B_{1ст}}{B_{2ст}} = \frac{k_3}{k_1}. \quad (11)$$

Из экспериментальных данных известно [5], что концентрация апо-В, содержащегося в ЛПНП, больше, чем концентрация апо-В, находящегося в составе ЛП, непосредственно поступающих в кровоток, т. е.  $B_{2ст} > B_{1ст}$ , поэтому из равенства (11) следует соотношение (4):

$$k_1 > k_3.$$

Пусть  $B_1(0) = B_{01}$ ,  $B_2(0) = B_{02}$ , где  $B_1(0)$  и  $B_2(0)$  концентрации апо-В в составе ЛПОНП и ЛПНП непосредственно после проведения иммуносорбции или гемосорбции. При проведении данных процедур уровень апо-В снижается вследствие удаления ЛП из плазмы крови, поэтому  $B_{01}$  и  $B_{02}$  удовлетворяют неравенствам (3):

$$\begin{aligned} 0 < B_{01} &\leq B_{1ст}, \\ 0 < B_{02} &\leq B_{2ст}. \end{aligned}$$

Отсюда следует, что траектории решений системы дифференциальных уравнений (8), (9) начинаются в области, ограниченной неравенствами (3) (см. заштрихованный участок на рис. 1, 2).

Для анализа поставленной задачи важен выбор функции  $f(B_1, B_2)$ . Следуя общепринятым представлениям о метаболической регуляции, можно предположить, что скорость поступления апо-В в кровоток и концентрация апо-В в кровотоке связаны нелинейной зависимостью вида [6]:

$$f(B_1, B_2) = \frac{K_1}{1 + K_2(B_1 + B_2)}$$

Однако для исследования устойчивости особых точек рассматривают линеаризованную систему дифференциальных уравнений, получаемую из исходной разложением правых частей системы по степеням  $B_1 - B_{1ст}$  и  $B_2 - B_{2ст}$  — малых отклонений от стационарных значений  $B_{1ст}$  и  $B_{2ст}$ , поэтому выбор функции  $f(B_1, B_2)$  линейного вида упростит аналитическое исследование системы (8), (9) и существенно не повлияет на результат [2]. Предположим, что скорость поступления апо-В в кровоток пропорциональна концентрации апо-В в плазме крови и имеет вид:

$$f(B_1, B_2) = k_0 - k_1(B_1 + B_2). \quad (12)$$

Коэффициент  $k_0$  выражает максимальную скорость, с которой апо-В может поступать в кровоток, и будет иметь размерность (концентрация) × (время)<sup>-1</sup>. Константа скорости  $k_1$  показывает, какова зависимость между общей концентрацией апо-В в плазме крови и скоростью поступления апо-В в кровоток, ее размерность — (время)<sup>-1</sup>. В этом случае дифференциальные уравнения (8), (9) примут вид (1), (2).

Теперь будем считать скорость поступления апо-В в кровоток постоянной. Значит функция  $f(B_1, B_2)$  выражается константой, имеющей размерность (концентрация) · (время)<sup>-1</sup>. При этом варианте выбора функции динамика концентраций  $B_1$  и  $B_2$  во времени может быть представлена дифференциальными уравнениями (5), (6), которые получаются из (1), (2), если  $k_1 = 0$ . Коэффициент  $k_0$  в данном предположении определяет скорость, с которой апо-В поступает в плазму крови.

Нас интересует поведение суммарной концентра-

ции апо-В  $B_1(t) + B_2(t)$  после проведения иммуносорбции и гемосорбции. Отметим, что непосредственно после данных процедур  $B_1(t) + B_2(t)$  начинает возрастать. Дальнейшее снижение уровня апо-В после проведения иммуносорбции или гемосорбции в рамках рассматриваемой модели невозможно. Это следует из уравнений (1), (2) и начальных условий, удовлетворяющих неравенствам (3) (см. пункт 1; рис. 1, 3, 4).

Если скорость поступления апо-В в кровотоки постоянна и выражается функцией  $f(B_1, B_2) = k_0$ , то суммарная концентрация апо-В после проведения иммуносорбции или гемосорбции строго возрастает (см. пункт 2; рис. 1).

В случае, когда функция  $f(B_1, B_2)$  имеет вид (12), из исследования дифференциальных уравнений (1), (2) с начальными условиями, удовлетворяющими неравенствам (3), и с полученным выше ограничением на константы (4) вытекает существование 3 типов поведения суммарной концентрации апо-В  $B_1(t) + B_2(t)$  после проведения данных процедур (см. пункт 3; рис. 4). Приведем соотношения между коэффициентами системы дифференциальных уравнений (1), (2), соответствующие каждому из этих типов. Первый тип определяется одним из условий (см. рис. 4):

$$(k_2 > k_3); (k_2 = k_3, k_1 \neq k_4); (k_2 < k_3, k_1 < k_4,$$

$$\sqrt{k_1 - \sqrt{k_4}} > \sqrt{k_3 - \sqrt{k_2}});$$

$$(k_2 = k_3, k_1 = k_4); (k_2 < k_3, k_1 > k_4, \sqrt{k_1 - \sqrt{k_4}} = \sqrt{k_3 - k_2}).$$

Второй тип может наблюдаться при (см. рис. 4):

$$(k_3 > k_2, k_1 < k_4, \sqrt{k_4 - \sqrt{k_1}} > \sqrt{k_3 - k_2}) \text{ или}$$

$$(k_3 > k_2, k_1 < k_4, \sqrt{k_4 - \sqrt{k_1}} = \sqrt{k_3 - k_2}).$$

Третьему типу соответствует соотношение (см. рис. 4):

$$(k_3 > k_2 \mid \sqrt{k_4 - \sqrt{k_1}} < \sqrt{k_3 - k_2}).$$

Кроме способа определения констант, изучение данной модели позволило сделать ряд выводов о механизме поступления апо-В в плазму крови и в связи с этим выделить случаи со стимулирующим влиянием иммуносорбции и гемосорбции на скорость поступления апо-В в кровотоки. Модель дала возможность предсказать существование затухающих колебаний в поведении суммарной концентрации апо-В после проведения данных процедур (третий тип, см. рис. 4).

В рамках исследуемой модели после проведения иммуносорбции или гемосорбции при постоянном поступлении апо-В в плазму крови суммарная концентрация апо-В может только строго возрастать (первый тип, см. рис. 1). Если скорость поступления апо-В в кровотоки пропорциональна содержанию апо-В в плазме крови, то возможно появление любого из 3 рассматриваемых типов поведения (см. рис. 4). Допустим, что при анализе экспериментальных данных динамика суммарной концентрации апо-В имеет максимум или представляет собой затухающие колебания (второй или третий тип, см. рис. 4), то в этих случаях можно предполагать существование зависимости между скоростью поступления апо-В в кровотоки и суммарной концентрацией апо-В в плазме крови. Итак, при втором и третьем типах поведения суммарной концентрации апо-В после проведения

иммуносорбции или гемосорбции следует говорить о стимулирующем влиянии данных процедур на поступление апо-В в кровотоки, иными словами, снижение содержания апо-В в плазме крови вызывает увеличение скорости поступления апо-В в кровотоки. Важность подхода заключается в том, что по характеру поведения  $B_1(t) + B_2(t)$  после иммуносорбции и гемосорбции у больных можно выделять различные типы реакций системы ЛП, содержащих апо-В, на проведение данных процедур и предсказывать, какие соотношения между коэффициентами будут им соответствовать, не проводя численный расчет констант.

Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории гемодиализа и плазмафереза ВКНЦ АМН СССР за предоставление ряда данных по результатам проведения иммуносорбции и гемосорбции.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Алгоритмы и программы восстановления зависимостей / Под ред. В. И. Вапника.— М., 1984.
2. Арнольд В. И. Обыкновенные дифференциальные уравнения.— М., 1984.
3. Кудрявцев Л. Д. Курс математического анализа.— М., 1981.— Т. 1.
4. Лопухин Ю. М., Арчаков А. И., Владимиров Ю. А., Коган Э. М. Холестериноз.— М., 1981.
5. Перова Н. В., Щербак И. А., Метельская В. А. // Стенка сосудов в атеро- и тромбогенезе. Исследования в СССР / Под ред. Е. И. Чазова, В. Н. Смирнова.— М., 1983.— С. 101—108.
6. Посицельский Е. Д., Яровая Е. Б., Козикин В. С., Метельская В. А. и др. // Всесоюзный семинар: Математические и вычислительные методы в биологии: Тезисы.— Пушкино, 1985.— С. 148—150.
7. Яровая Е. Б., Ружанская Т. В. // Бюл. Всесоюз. кардиол. науч. центра АМН СССР.— 1986.— № 2.— С. 110—111.
8. Berman M., Hall M., Levy R., Eisenberg S. et al. // J. Lipid Research.— 1978.— Vol. 19.— P. 38—56.
9. Kukharchuk V., Kononov Yu., Vedernikov Yu. et al. // Plasma Ther. Transf. Techn.— 1988.— Vol. 9, N 1.— P. 43—45.
10. Lipoprotein kinetics and Modelling/Ed. M. Berman.— New York, 1982.— P. 485.
11. Schaefer E. Y., Eisenberg S., Levy R. // J. Lipid Res.— 1978.— Vol. 19.— P. 667—687.

Поступила 20.03.90

#### MATHEMATICAL PATTERN OF APOB METABOLISM IN HUMAN BLOOD PLASMA

E. B. Yarovaya, V. A. Metel'skaya, N. V. Perova  
All-Union Cardiological Research Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Mathematical model was developed for transport of apo B in blood plasma, which allowed to estimate constants of metabolism of lipoproteins containing apo B, considering the alterations of apo B concentration in circulation followed by immuno- or hemosorption. Some cases were detected where stimulating effect of these procedures on the rate of apo B entering into circulation was found as well as definite ratios were shown between the constants using the parameters of alterations in apo B concentration after elimination of lipoproteins containing apo B from blood plasma. Existence of cases was predicted where fluctuations in apo B concentration attenuated after immuno- and hemosorption which were difficult to find in experiments.

А. Т. Адылова, Б. Д. Умарова, Б. А. Атаханова,  
Е. В. Шаркова, И. И. Никольская, С. С. Дебов

## ВЛИЯНИЕ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ НА МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК ПЕЧЕНИ КРЫС IN VIVO И VITRO

Институт биохимии АН Узбекской ССР, Ташкент, Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

В настоящее время в научной литературе уделяется большое внимание взаимозависимости между характером метилирования ДНК и функциональным статусом клетки [2, 5, 6, 8, 13, 24]. По единому мнению исследователей, метилирование ДНК у высших эукариот является одним из факторов, обеспечивающих регуляцию генной активности. При этом гиперметилирование ДНК приводит, как правило, к инактивации гена, тогда как недо- или деметилирование гена является фактором, разрешающим его экспрессию. В общей форме регуляторный механизм состоит в том, что количество  $m^5C$  в ЦГ-сайтах ДНК определяет и конфигурационную стабильность модифицированного участка гена, и возможность ДНК-белковых взаимодействий с репрессорами, активаторами, гормональными рецепторами и др. В то же время изменение уровня того или иного гормона может повлечь за собой и изменение характера метилирования ДНК. Поэтому вполне вероятно, что изменение гормонального статуса, обусловленного уровнем тиреоидных гормонов, может найти отражение и в изменении уровня метилирования ДНК. В перспективе проблема взаимозависимости между метилированием ДНК и различного рода патологическими состояниями может иметь и диагностическое значение. На пути разработки такой проблемы следует использовать два подхода: первый, связанный с системой *in vivo* и включающий определение содержания  $m^5C$  и активности ДНК-метилаз того или иного органа или ткани, второй — изучение возможности использования ДНК-метилазных зондов [2, 7, 11, 22] в экспериментах *in vitro* при разных типах патологии.

В настоящей работе определено содержание  $m^5C$  в суммарной ядерной ДНК печени крыс при различном уровне тиреоидных гормонов, проведено сравнительное изучение ДНК-метилазной активности в ядрах печени этих животных, а также исследована акценторная способность ДНК, хроматина и цельных ядер в реакции метилирования *in vitro* в присутствии бактериальных ДНК-метилаз Sso- и Mbu-типов, использованных в качестве зондов для выявления структурных изменений в ДНК, индуцированных гормоном.

**Методика.** В опытах использованы крысы-самцы линии Вистар (масса 100–150 г) интактные и с удаленной щитовидной железой. Тиреоидэктомию и введение гормона осуществляли внутрибрюшинно под эфирным наркозом. Триодтиронин ( $T_3$ ) в дозе 30 мкг на 100 г массы тела вводили животным, подвергнутым тиреоидэктомии. Крыс брали в опыт через 4 ч после введения  $T_3$  и через 48 ч после 2-кратной инъекции  $T_3$  с интервалом 24 ч. Легкий гипертиреоз вызывали введением интактным животным  $T_3$

### Влияние тиреоидного статуса крыс на уровень метилирования ДНК печени *in vivo*

Тиреоидный статус	Содержание $m^5C$ , %*	Активность эндогенных метилаз, %**
Норма	3,81	100
Тиреоидэктомия	4,14	165
Тиреоидэктомия после введения $T_3$ :		
через 4 ч	3,99	—
через 48 ч	3,76	112
Норма + $T_3$	2,47	90,5

\* Разброс данных не превышает 0,02 %.

\*\* ДНК-метилазная активность печени интактных крыс принята за 100 %.

в дозе 1 мг на 100 г массы тела в течение 4 дней.

В работе использовали индивидуальные ДНК-метилазы аденина и цитозина Sso- и Mbu-типов, полученные методом препаративного изоэлектрофокусирования на амфолипах («Pharmacia», Швеция), согласно рекомендациям [19], и суммарный препарат ДНК-метилаз из ядер печени крыс, полученный согласно работе [4].

Ядра печени крыс, выделенные по методу [23], использовали для получения свободной ДНК по методу [17] с дополнительной обработкой пропазой 100 мкг/мл («Serva», ФРГ). Ядра, полученные по методу [12] в модификации [1] и разрушенные в гипотонической среде [10], служили источником суммарного препарата хроматина.

Реакции гомо- и гетерологичного метилирования исследуемых ДНК проводили согласно данным работ [3] и [19]. Донором метильных групп служил S-аденозил-L-метионин ( $^3H$ -SAM) с удельной активностью 15 Ки/ммоль («Amersham», Англия). Содержание 5-метилцитозина определяли методом [9].

**Результаты и обсуждение.** В соответствии с поставленной задачей в ДНК ядер печени крыс определяли содержание  $m^5C$ . Моделями в этой серии экспериментов наряду с нормальными (контрольными) крысами служили тиреоидэктомированные животные, у которых функция щитовидной железы была полностью подавлена. Восстановление функции достигалось последующим введением гормона либо за 4 ч, либо за 48 ч до забоя животных. Гиперфункция щитовидной железы обеспечивалась введением  $T_3$  интактным животным. Как следует из табл. 1, содержание  $m^5C$  в ДНК ядер печени крыс у тиреоидэктомированных животных несколько выше, чем у интактных животных, что, естественно, объясняется подавлением гормональной функции и связанным с этим гиперметилированием ДНК. Процесс обратим, и восстановление функции сопровождается снижением уровня метилирования. Введение тиреоидэктомированным крысам  $T_3$  за 48 ч до забоя приводило к нормализации содержания  $m^5C$ . Различия в содержании  $m^5C$  у нормальных и тиреоидэктомированных крыс достоверны, но не превышают 0,3 % и не являются столь четкими и убедительными, как, например, при действии глюкокортикоидов [6, 8, 24]. В то же время незначительные различия в метилировании ДНК интактных и эктомированных животных могут косвенно указывать на то, что гиперметилированию подвергается ограниченный участок ДНК. Это допущение кажется тем более обоснованным, что, во-первых, согласно данным литературы, число известных индуцируемых  $T_3$  генов в печени невелико [15]; во-вторых,

локальное метилирование ДНК может, как известно, оказаться достаточным для выключения целого ряда генов [5]. Согласно данным табл. 1, значительное усиление генной активности наблюдается при введении Т<sub>3</sub> нормальным крысам, что сопровождается деметилированием ДНК и приводит к снижению содержания м<sup>5</sup>С до 2,4 %.

Известно, что степень метилирования ДНК *in vivo*, т. е. содержание м<sup>5</sup>С в эукариотической ДНК, является результатом двух противоположных процессов — метилирования и деметилирования, чередующихся в зависимости от функционального состояния гена.

Мы исследовали активность эндогенных ДНК-метилаз, ставя лишь задачу оценить корреляцию между изменением активности фермента и содержанием м<sup>5</sup>С у разных модельных животных при использовании гомологичного субстрата. Сопоставление данных табл. 1 свидетельствует, что корреляция между активностью фермента и содержанием м<sup>5</sup>С носит лишь общий качественный характер по принципу «больше — меньше». У тиреоидэктомированных животных и ДНК-метилазная активность, и содержание м<sup>5</sup>С выше, чем у интактных крыс. Однако строгой количественной корреляции в этом случае не наблюдается. Так, если разница в содержании м<sup>5</sup>С у интактных и тиреоидэктомированных животных составляет 10 %, то метилирующая активность у оперированных крыс увеличивается на 65 %. При последующем введении Т<sub>3</sub> снижается до нормы только содержание м<sup>5</sup>С, но не активность ДНК-метилаз. Таким образом, становится очевидным, что эндогенный фермент энзиматического метилирования ДНК *in vivo* не всегда может полностью реализовать свои возможности.

В ряде случаев после введения Т<sub>3</sub> тиреоидэктомированным крысам существенно увеличивается уровень ядерных рецепторов [18], которые в условиях выделения частично очищенных ДНК-метилаз также экстрагируются из ядер [16]. Согласно существующей точке зрения [14], гормон-рецепторные комплексы демонстрируют высокое сродство к недометилированным участкам генома и в этом случае присутствие рецепторного белка в ферментном препарате должно (или может) приводить к снижению удельной активности ДНК-метилаз за счет конкуренции за субстрат. При гормональной нагрузке у нормальных животных наблюдается резкое (почти в 2 раза) уменьшение содержания м<sup>5</sup>С, сопровождающееся весьма незначительным снижением метилирующей активности. Несоответствие этих цифр кажется вполне

объяснимым, поскольку снижение содержания м<sup>5</sup>С в данном случае является результатом активного воздействия деметилирующей системы и активность ДНК-метилаз вряд ли можно рассматривать как фактор, определяющий снижение уровня м<sup>5</sup>С в ДНК. Кроме того, теоретически нельзя исключить компарментализации ДНК-метилаз, препятствующей метилированию субстрата.

Таким образом, характеризуя метилирующую систему *in vivo* при том или ином типе патологии, трудно ориентироваться на активность метилирующих ферментов, особенно с учетом указанных выше факторов. В то же время изменение содержания м<sup>5</sup>С вполне определенно отражает происходящие *in vivo* процессы. Несоответствие в изменении содержания м<sup>5</sup>С и уровня ДНК-метилирующей активности, на наш взгляд, может рассматриваться как косвенная характеристика интенсивности процесса деметилирования на определенной стадии патологического процесса.

Другим подходом, позволяющим оценить изменение уровня метилирования эндогенной ДНК *in vivo*, отталкиваясь от акценторной способности субстрата, является использование бактериальных ДНК-метилаз с известным сайтомузнаванием (СУ) в качестве ферментативных зондов *in vitro* [2, 7, 11, 22]. Естественно, что наиболее зависимым от метилирования *in vivo* окажется тот ферментативный зонд, СУ которого перекрывается или совпадает с ЦГ-метилируемыми последовательностями эукариотического генома. Акценторную способность субстрата изучали для препарата свободной ДНК, для суммарного препарата хроматина, а также для ДНК в составе цельных ядер. В качестве ферментативных зондов использовали три ДНК-метилазы — Mb<sub>11</sub>7.0, Sso<sub>5.3</sub> и Mb<sub>11</sub>4.0 [20, 21], СУ которых содержит моно-, ди- и трипуриновые блоки соответственно (табл. 2). С помощью этих ферментов оценивали возможность детекции изменения уровня метилирования ДНК печени нормальных и тиреоидэктомированных крыс после введения Т<sub>3</sub> и тиреоидэктомированным, и нормальным животным.

При выборе срока инкубации ставили задачу сравнить акценторную активность трех видов субстратов (свободная ДНК, хроматин и ядра) за одинаковый промежуток времени. В соответствии с этим инкубацию проводили в течение 2 ч — периода, оптимального при исследовании хроматина [7], но недостаточного для полного насыщения метильными группами ДНК.

Максимальный уровень метилирования ДНК —

Таблица 2

Уровень метилирования ДНК, хроматина и цельных ядер печени крыс бактериальными метилазами *in vitro*

Фермент*	Метилируемая последовательность	Радиоактивность субстрата, %**			
		ДНК		хроматин	
		инкубация 24 ч	инкубация 2 ч		
Mb <sub>11</sub> 4.0	5'...ГГА...3'	180	100	40,1	47,8
Mb <sub>11</sub> 7.0	5'...Пир/Дипр...3'	200	100	34,8	46,0
Sso <sub>5.3</sub>	5'...ЦЦЦГГ...3'	170	100	54,0	58,3

\* Ферменты из *Mikobact. Butiricum*, *Shigella sonnei* 47 обозначены согласно принятой номенклатуре [19]. Цифра справа внизу обозначает изоэлектрическую точку фермента.

\*\* За 100 % принята радиоактивность свободной ДНК после 2-часовой инкубации с ферментом в присутствии <sup>3</sup>H-SAM.

Таблица 3

Влияние тиреоидных гормонов на метилирование ДНК, хроматина и цельных ядер печени крыс бактериальными метилазами

Субстрат	Физиологический статус животного	Радиоактивность субстрата (в %*) при использовании ферментативных зондов		
		I	II	III
		ГГА	ПирАПир	ЦЦНГГ
ДНК	ЭКТ**	75,5	86,5	100
	ЭКТ+Т <sub>3</sub> **	88,8	66,2	100
	Норма+Т <sub>3</sub>	155,5	152,0	300
Хроматин	КЭКТ	100,0	89,0	100
	ЭКТ+Т <sub>3</sub>	108,0	100,0	108
	Норма+Т <sub>3</sub>	100,0	100,0	70
Ядра	ЭКТ	77,5	100,0	50
	ЭКТ+Т <sub>3</sub>	100,0	127,3	102
	Норма+Т <sub>3</sub>	145,0	156,0	116

\* Радиоактивность (в %) по отношению к радиоактивности субстрата из печени нормальных животных.

\*\* Тиреоидэктомированные животные.

\*\*\* Т<sub>3</sub> введен за 48 ч до забоя животных.

24 ч инкубации — указан в табл. 2, где также приведена акцепторная активность свободной ДНК, суммарного препарата хроматина и ядер печени нормальных животных. Согласно данным этой таблицы, свободная ДНК в заведомо неоптимальных условиях метилируется в 2—2,5 раза эффективнее, чем ДНК в составе хроматина и цельных ядер для всех трех ферментативных зондов, при этом наиболее чувствительным к третиной структуре субстрата оказывается зонд II. Тем не менее в соответствии с данными табл. 2 все три зонда правомочно использовать для обнаружения разницы в акцепторной способности используемых субстратов в норме и при изменении тиреоидного статуса организма.

В табл. 3 приведены данные о влиянии тиреоидных гормонов на акцепторную способность свободной ДНК, ДНК в составе хроматина и цельных ядер из печени модельных животных. Задача суммированной в табл. 3 экспериментальной серии состояла, во-первых, в оценке субстрата, наиболее пригодного для тестирования различий акцепторной способности ДНК при разных физиологических состояниях, во-вторых, в выборе зонда, в наибольшей мере чувствующего эту разницу.

В верхней части табл. 3 приведены данные о метилировании *in vitro* свободной ДНК. Удаление щитовидной железы приводит к снижению акцепторной способности ДНК в отношении ферментов I и II, что должно быть связано с дополнительным метилированием ЦГ-последовательностей ДНК, соседствующих с сайтами метилирования ГГА и ПирАПир. Акцепторная активность ДНК по отношению к ферменту III в этих условиях не изменяется. По данным 2-часовой инкубации *in vitro*, введение Т<sub>3</sub> тиреоидэктомированным животным не обеспечивает восстановления акцепторной способности ДНК. Увеличение гормональной нагрузки при введении Т<sub>3</sub> нормальным животным заметно увеличивает акцепторную способность ДНК для всех трех ДНК-метилаз.

Сравнимые, хотя и не идентичные результаты, получены при использовании в качестве субстрата клеточных ядер. Необходимо отметить, что неметилированность ДНК при 2-часовой инкуба-

ции, с одной стороны, и сложные конформационные изменения ДНК в составе ядер — с другой, не дают возможность для проведения детального сравнительного анализа этих двух групп данных и позволяют ориентироваться только на общие закономерности.

Наиболее выраженным, как и в предыдущем случае, было увеличение уровня метилирования при гормональной нагрузке (норма + Т<sub>3</sub>), особенно для зондов I и II и в меньшей степени для зонда III. В то же время включение метильных групп в ДНК ядер при эктомии и последующем введении Т<sub>3</sub> вполне логично сначала уменьшается, затем восстанавливается до нормы для ГГА и ЦЦНГГ-зондов.

Что касается использования хроматина в качестве акцептора метильных групп *in vitro* для характеристики того или иного функционального состояния организма, то следует признать, что по крайней мере суммарный препарат хроматина не обеспечивает дифференцированной информацией о различиях включения метильных групп у разных модельных животных.

Суммируя данные табл. 3, можно отметить следующее. Акцепторная способность и свободной ДНК, и ДНК в составе цельных ядер по отношению к трем бактериальным ДНК-метилазам изменяется в зависимости от гормонального статуса крыс. Все использованные ДНК-метилазные зонды чувствительны к изменению предсуществующего метилирования *in vivo* или конформации субстрата. Для тестирования гормонального статуса с помощью свободной ДНК наиболее пригодны зонды I и II, хотя восстановление функции при добавлении Т<sub>3</sub> этим путем идентифицировать не удастся. При использовании цельных ядер и зондов I и III прослеживаются все этапы влияния тиреоидных гормонов на акцепторную способность ДНК, являющуюся отражением характера метилирования ДНК *in vivo*.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бубнов Н. В., Баснакьян А. Г., Вотрин И. И. // Бюл. эксп. биол.— 1985.— № 2.— С. 154—156.
2. Бурцева Н. Н., Демидкина Н. П., Азизов Ю. М., Ванюшин Б. Ф. // Биохимия.— 1978.— Т. 43.— С. 2082—2093.
3. Бурцева Н. Н., Гимадуддинов О. А., Бубенщикова С. Н., Ванюшин Б. Ф. // Биол. науки.— 1985.— № 2.— С. 37—54.
4. Бурцева Н. Н., Гимадуддинова О. А., Ванюшин Б. Ф. // Биохимия.— 1987.— Т. 52.— С. 290—296.
5. Бурьянов Я. И., Кирьянов Г. И. Структурно-функциональные основы энзиматического метилирования ДНК.— М., 1987.— Т. 23.— С. 219—232.
6. Ванюшин Б. Ф., Романенко Е. Б. // Биохимия.— 1978.— Т. 44.— С. 78—82.
7. Кирьянов Г. И., Смирнова Т. А., Исаева Л. В. и др. // Там же.— 1981.— Т. 46.— С. 1887—1892.
8. Ванюшин Б. Ф. // Успехи биол. химии.— 1983.— Т. 24.— С. 170—198.
9. Васильев В. К. // Биол. науки.— 1971.— № 9.— С. 118—120.
10. Лобаненков В. В., Миронов П. М. // Биохимия.— 1982.— Т. 47.— С. 999—1002.
11. Перепеленко С. Д., Бурьянов Я. И., Баев А. А. // Докл. АН СССР.— 1980.— Т. 250.— С. 1480—1482.
12. Alex R. // Biochemistry.— 1975.— Vol. 14.— P. 2921—2927.
13. Cedar H. // DNA methylation: Biochem. biol. Signif.— New York, 1984.— P. 147.
14. Geiser M., Mattaj J. W., Wieks A. // J. biol. Chem.— 1983.— Vol. 258.— P. 9024—9029.
15. Jump D. B., Oppenheimer J. H. // Molec. Cell Biochem.— 1983.— Vol. 55.— P. 159—163.

16. *Latham K. R., Ring J. C., Baxter J. D.* // *J. biol. Chem.*— 1976.— Vol. 251.— P. 7389—7393.
17. *Marmur J. J.* // *J. molec. Biol.*— 1961.— Vol. 3.— P. 208—212.
18. *Nakamura H., Hamada S., Imura H.* // *Biochem. J.*— 1979.— Vol. 182.— P. 377—379.
19. *Nikol'skay I. I., Sharkova E. V., Suchkov S. V. et al.* // *Biochem. Intern.*— 1983.— Vol. 7.— P. 605—609.
20. *Nikol'skay I. I., Lopatina N. G., Suchkov S. V. et al.* // *Ibid.*— 1984.— Vol. 9.— P. 771—775.
21. *Nikol'skay I. I., Lopatina N. G., Sharkova E. V. et al.* // *Ibid.*— 1985.— Vol. 10.— P. 405—409.
22. *Quint A., Cedar H.* // *Nucl. Acids Res.*— 1981.— Vol. 9.— P. 633—636.
23. *Tala J. R., Widnell C. C.* // *Biochem. J.*— 1966.— Vol. 98.— P. 604—608.
24. *Vanyshin B. F., Nemirovsky L. E., Klimenko V. V. et al.* // *Gerontologia.*— 1973.— Vol. 19.— P. 138—141.

Поступила 18.07.89

## INFLUENCE OF THYROID HORMONES ON METHYLATION OF DNA IN RAT LIVER TISSUE *IN VIVO* AND *IN VITRO*.

*A. T. Adylova, B. D. Umarova, B. A. Alakhanova, E. V. Sharkova, I. I. Nikol'skaya, S. S. Debov*

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Uzbek SSR, Tashkent, Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Methylation of rat liver DNA was studied *in vivo* and *in vitro* in presence of various content of thyroid hormones. Both administration of triiodothyronine into intact rats and thyroidectomy led to considerable alterations in activity of endogenous DNA-methylases and in content of  $m^3C$  in DNA although distinct correlation between these two factors was not detected. Alterations in the acceptor activity of endogenous DNA towards bacterial DNA-methylases of thy Mbu type demonstrated the processes occurring *in vivo*. The methylation probe 5'...GGA...3' proved to be the universal means for testing of all the types of thyroid status involving either free DNA or whole nuclei.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 576.343: [577.122.5 + 577.123.5]

*А. И. Свирновский, В. Г. Цыганков, В. М. Агейчик, Г. В. Шиманская*

## ПРОЧНОСТЬ НУКЛЕИНОВО-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ И СИНТЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И БЕЛКА В КЛЕТКЕ

НИИ гематологии и переливания крови Минздрава БССР, Минск

При анализе характера взаимодействия ДНК и белка в различных клетках с помощью метода, позволяющего регистрировать прочность их связи [4], установлено, что основная часть ДНК в пролиферирующих клетках может быть освобождена от связи с белком в жестких условиях (высокая концентрация соли и высокая температура), тогда как диссоциация при слабом типе взаимодействия, больше присущем непролиферирующим клеткам, не требует повышения температуры [3]. Предполагается, что наличие белковой глобулы внутри локально денатурированного участка ДНК и определяет прочность комплекса ДНК с ядерным матриксом [8]. Учитывая динамический характер топологической связи ДНК с ядерным матриксом и функциональную активность клетки, провели сопоставление изменений во времени прочности связи ДНК — белок и интенсивности макромолекулярного синтеза (ДНК, РНК, белок) в клетке.

Методика. Опыты выполнены на модели короткочесно культивируемых лейкозных клеток La, так как сохранение жизнеспособности этих клеток легко регистрируется не только по устойчивости к окраске некоторыми красителями, выходу из них хрома-51 или других изотопов, накоплению определенных продуктов, но и по их лейкозогенной активности в трансплантационном тесте. Клетки La, которые пассировали на мышь C57BL/6ju, выделяли из селезенки мышей с лейкозом La и переносили в среду RPMI 1640 ("Flow Lab.", Великобритания) или в среду 199 с 5% сыворотки крови человека, 2 мМ L-глутамина ("Flow Lab.", Великобритания) и антибиотиками. Концентрация клеток в среде  $5 \cdot 10^6$ /мл. Для определения синтеза ДНК в культуре на разное время вносили 74 кБк/мл  $^3H$ -тимидина (при пульсовой метке в течение 5 мин — 1850 кБк/мл), для определения синтеза РНК использовали  $^3H$ -УТР (кБк/мл), для определения синтеза белка —  $^{14}C$ -аминогидролизат (74 кБк/мл). Счет радиоактивности макромолекулярных компонентов клетки после перенесения кислотонерастворимых осадков на фильтры осуществляли на β-спектрометре "Mark-III" ("Nuclear Chicago", США).

Прочность связи ДНК — белок определяли методом нуклео-протеидцелитной хроматографии (НПЦХ) [4]. Ядра и лизаты клеток, меченных  $^3H$ -тимидином (получение лизатов и выделение ядер проводили в присутствии ингибиторов ДНКаз и протеиназ), наносили на термостатированные колонки, заполненные целитом-545 ("Schuchardt", ФРГ). Для элюции нуклеиновых кислот применяли буфер LiCl + мочевины в градиенте концентрации соответственно до 4 и 8 М при 4 °С. При этом диссоциирует комплекс ДНК — белок с менее прочной связью. При последующем повышении температуры до 98 °С при элюции буфером с максимальной концентрацией от связи с белком освобождается ДНК, более прочно с ним связанная. Скорость элюции поддерживали с помощью перистальтического насоса "Microgex" (ЛКВ, Швеция). Для создания градиента и сбора фракций использовали программатор "Ultrograd" и коллектор "Ultrorak" (ЛКВ, Швеция). ДНК в пробах осаждали и гидролизовали с последующим определением радиоактивности после добавления сцинтилляционной жидкости для гомогенных систем (на основе толуол-третона).

В качестве модификатора клеточных свойств применяли экстракт селезенки телят [5], содержащий естественный комплекс растворимых регулирующих веществ, с которыми клетка контактирует в организме. Выбор данного метода воздействия на клетки определялся еще и тем, что многие обычно применяемые препараты вызывают структурные изменения самой молекулы ДНК [1].

В опытах с использованием НПЦХ, где клетки обрабатывали экстрактом селезенки (1 мг/мл лиофилизированного препарата), их сначала метили в течение 1—2 ч  $^3H$ -тимидином (222 кБк/мл; удельная активность 148 гБк/ммоль) и отмывали от невключившегося изотопа. При анализе метаболизма клеток по включению предшественников клетки сначала обрабатывали экстрактом, а затем вносили изотопы или делали это одновременно.

Результаты и обсуждение. Клетки La при помещении их в питательную среду активно включают  $^3H$ -тимидин в течение первых часов культивирования, с каждым последующим часом интенсивность включения изотопа снижается, хотя суммарная радиоактивность продолжает нарастать. В течение последних часов при суточном культивировании в кислотонерастворимую фракцию клеток включается небольшое количество радиоактивных предшественников синтеза ДНК. Клетки, накопившие ДНК, в данных условиях культивирования (высокая плотность посева, отсутствие смены среды) обычно не выделяется, число их не увеличивается, часть ДНК экскретируется в окружающую среду, жизнеспособность клеток при этом не снижается. Динамика изменения синтеза РНК и белка в интактных клетках La имеет заметное сходство с картиной синтеза ДНК в описанных условиях культивирования.

Новообразованная ДНК (пульсовая метка 1 ч) постоянно оказывается прочно связанной с белком (рис. 1), что, по-видимому, не зависит от того, завершится этот синтез ДНК митозом или нет. Сходные результаты получены при времени пульса



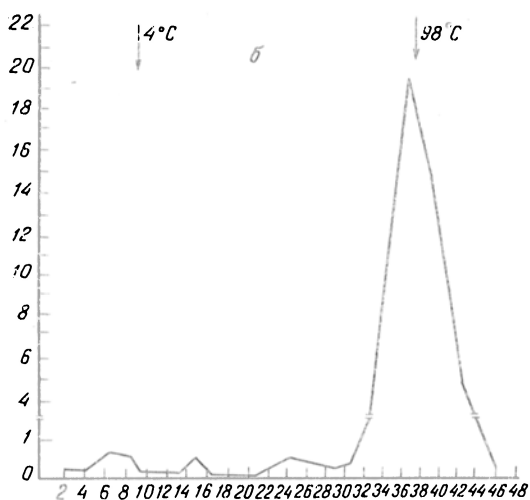
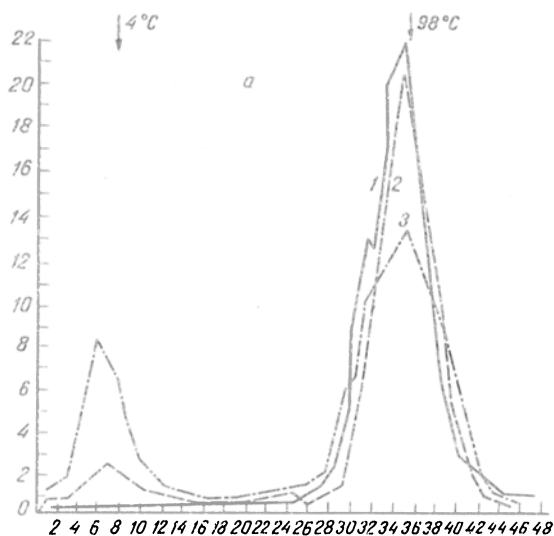


Рис. 1. Профиль НПЦХ ядер интактных клеток La в зависимости от времени метки их  $^3\text{H}$ -тимидином.

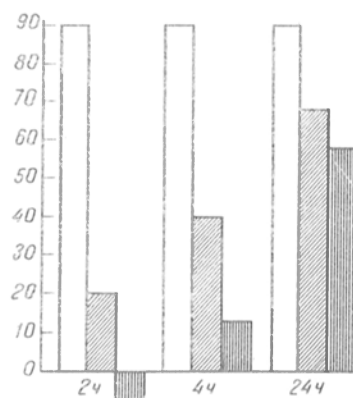
По оси абсцисс — номер фракции; по оси ординат — радиоактивность фракции, % по отношению к суммарной радиоактивности, элюированной с колонки. а: 1 — метка 1 ч, 2 — метка 4 ч, 3 — метка 16 ч; б: метка 5 мин.

5 мин. Это свидетельствует в пользу включения метки в реплицирующийся хроматин.

Однако если радиоактивный предшественник присутствует в среде культивирования постоянно, то общий профиль элюции ДНК с колонки показывает, что прочность связи ДНК — белок постепенно ослабевает и уже через 16 ч заметная часть ДНК элюируется в низкотемпературной области. Предполагается, что это обусловлено перемещением ДНК в процессе синтеза в направлении от прочного комплекса с матриksom (реликативная вилка) к слабому [3]. Следовательно, по мере созревания хроматина происходит ослабление прочности связи ДНК с белком [12, 13]. Скорость созревания хроматина может быть довольно высокой [10]. Свойства хроматина изменяются и на различных стадиях дифференцировки [11]. Поскольку изучаемые клетки обладают высокой пролиферативной активностью, то синтез ДНК продолжается и полного ослабления прочности связи ДНК — белок не происходит. Однако между препаратами в условиях метки  $^3\text{H}$ -тимидином в течение 1 и 16 ч различия воспроизводимы и достоверны.

Рис. 2. Динамика изменения синтеза ДНК, РНК и белка в клетках La в присутствии комплекса веществ, регулирующих рост.

По оси абсцисс — время обработки клеток, ч; по оси ординат — ингибирование синтеза, % по отношению к необработанным клеткам. Светлые столбики — включение  $^3\text{H}$ -тимидина, с косой штриховкой — включение  $^3\text{H}$ -УТР, с вертикальной штриховкой — включение  $^{14}\text{C}$ -аминогидролизата.



При культивировании, когда клетка не делится и не вступает в следующий клеточный цикл, менее выражена и интенсивность процессов синтеза в единицу времени по сравнению с тем периодом, когда клетка готовится к делению (первые часы культивирования). Естественная гибель клеток при этом минимальна. Функциональная активность клеток, регистрируемая по перевиваемости лейкозных клеток в течение 24 ч культивирования, практически не изменяется.

При введении в культуру выделенного из селезенки комплекса естественных регуляторов кроветворных клеток синтез ДНК подавляется очень быстро (в течение 1 ч) в максимальной степени (до 85—90 %) и постоянно остается на невысоком уровне в течение всего периода наблюдения (рис. 2). Синтез РНК в этих условиях вначале подавляется незначительно (на 19 %), однако через 4 ч его снижение становится заметным (на 40 %) и к 24 ч он ингибирован уже на 67 %. Более устойчивым к ингибированию оказывается синтез белка. Включение  $^{14}\text{C}$ -аминогидролизата вначале даже незначительно усиливается (на 11 %), затем также незначительно снижается (на 12 %) и только к 24 ч подавляется на 54 %. Сопоставление изменений в синтезе ДНК и белка в течение первых 2 ч в условиях воздействия на клетки может представлять интерес для специального исследования, если учесть, что ингибирование синтеза ДНК и повышение синтеза белка характерны для дифференцировки [7].

Таким образом, при стабильном угнетении синтеза ДНК наблюдается более раннее угнетение синтеза РНК, чем белка. При этом характерным было нарастание изменений в синтезе РНК и белка на фоне постоянного угнетения синтеза ДНК.

Взаимодействие ДНК — белок в течение первого часа воздействия препаратом может сохраняться на высоком уровне. Это заметно в том случае, если меченные  $^3\text{H}$ -тимидином клетки обрабатывать препаратом в течение 1 ч, затем их отмыть и поместить часть клеток в свежую среду без препарата (контрольные клетки), что приводит к восстановлению синтеза ДНК, а другую часть клеток (опытные) ввести в среду, содержащую препарат в той же (1 мг/мл) концентрации (рис. 3). Если в среде контрольных меченых клеток препарат отсутствует постоянно, то ослабление прочности связи ДНК — белок в опытных клетках происходит быстрее, чем в контроле, и нарастает со временем (рис. 4). Это, вероятно, в первом случае

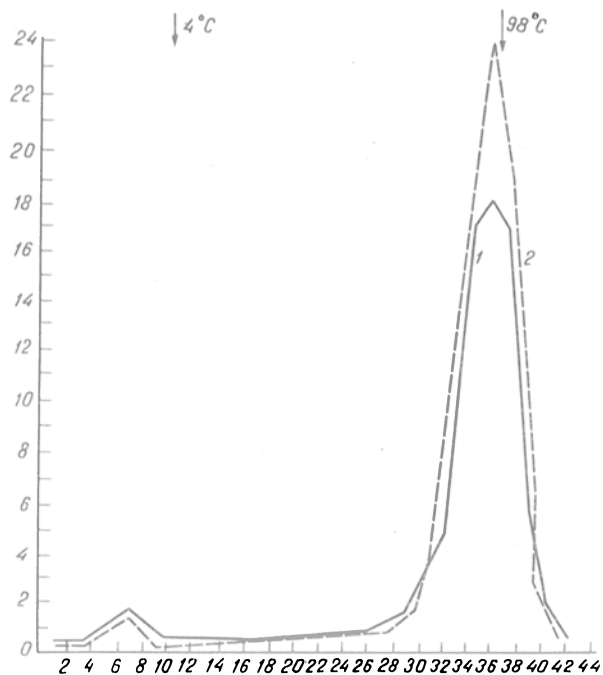


Рис. 3. Профиль НПЦХ ядер клеток La после кратковременной их обработки комплексом веществ, регулирующих рост.

Клетки метили  $^3\text{H}$ -тимидином 1 ч, затем обрабатывали их препаратом в концентрации 1 мг/мл в течение 1 ч, отмывали от препарата, одну часть отмытых клеток помещали в свежую среду без препарата (1), другую — в среду, содержащую препарат в той же концентрации (2). Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

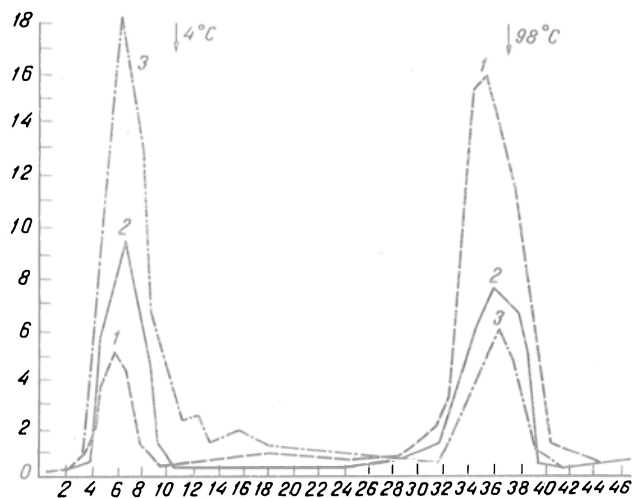


Рис. 4. Профиль НПЦХ ядер клеток La в зависимости от времени обработки их препаратом экстракта селезенки [5].

1 — обработка 2 ч; 2 — обработка 4 ч; 3 — обработка 24 ч. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

обусловлено задержкой созревания хроматина при остановке синтеза ДНК [13] с последующей дестабилизацией во втором случае. Поэтому ослабление прочности ДНК-белковых взаимодействий отстает во времени от подавления синтеза ДНК. Начало снижения синтеза РНК совпадает с ослаблением прочности взаимодействия ДНК — белок. Максимальное ослабление прочности связи происходит тогда, когда к подавлению синтеза ДНК и РНК присоединяется выраженное ингибирование синтеза белка (см. рис. 2 и 4). В этот момент регистрируются снижение жизнеспособности кле-

ток и частичная потеря ими лейкозогенных свойств. Изменения со стороны мембран лейкозных клеток возникают уже до истечения 1 ч воздействия эндогенными регуляторами из селезенки [6].

Для обсуждения полученных данных о последовательности изучаемых метаболических и структурных изменений в клетке можно привлечь результаты исследований изменения синтеза ДНК, белка и структуры хроматина в облученных клетках [2], которые оказываются сопоставимыми с приведенными нами, а также сведения о пикнозе ядер тимоцитов и деградации хроматина до полидиоксирибонуклеотидов у облученных крыс [9]. Вероятно, модификация свойств опухолевых клеток больше коррелирует с подавлением синтеза белка и изменениями структуры хроматина, чем просто с подавлением синтеза ДНК или конформационными изменениями мембран.

Таким образом, в интактных ДНК-синтезирующих клетках ослабление прочности ДНК-белковых взаимодействий совпадает во времени со спонтанным снижением синтеза макромолекул. В присутствии веществ регулирующих рост быстро подавляется синтез ДНК при отсроченном снижении синтеза РНК и еще более позднее уменьшение синтеза белка. Ослабление прочности ДНК-белковых взаимодействий вначале задерживается, а затем усиливается, что уже сказывается на функциональной активности клеток.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Горин А. И., Богомолова П. С., Ермаков А. В. и др. // Бюл. exper. биол.— 1987.— № 12.— С. 722—725.
2. Ермолаев Н. В., Чиркова Л. П. // Радиобиология.— 1987.— Вып. 27, № 4.— С. 468—472.
3. Забойкин М. М., Алехина Р. П., Лихтенштейн А. В., Шаповал В. С. // Докл. АН СССР.— 1985.— Вып. 284, № 2.— С. 506—509.
4. Лихтенштейн А. В., Алехина Р. П., Забойкин М. М. и др. // Вестн. АМН СССР.— 1980.— № 6.— С. 50—53.
5. Свирновский А. И., Шиманская Т. В., Агейчик В. М. и др. // Гематол. и трансфузиол.— 1983.— № 4.— С. 24—28.
6. Свирновский А. И., Шиманская Т. В., Цыганков В. Г. и др. // Цитология.— 1988.— Вып. 30, № 3.— С. 321—326.
7. Стрелкова Л. А., Степаненко Р. П., Михайлова А. А. // Бюл. exper. биол.— 1987.— № 12.— С. 703—706.
8. Съяксте Н. И., Забойкин М. М., Эренпрейса Е. А. и др. // Молекул. биол.— 1985.— Вып. 19, № 5.— С. 1231—1241.
9. Borisova E. A., Chukhlovina A. B., Seiliev A. A., Zherbin E. A. et al. // Int. J. Radiat. Biol.— 1987.— Vol. 51, N 3.— P. 421—428.
10. Chambers S. A., Rill R. L. // Biochim. Biophys. Acta.— 1984.— Vol. 782.— P. 202—209.
11. Kushch A. A., Niyazmatov A. A., Zelenin A. V. // Cell. Differentiation.— 1987.— Vol. 9, N 5.— P. 291—304.
12. Murphy R. F., Wallace K. B., Bonner J. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1980.— Vol. 77, N 6.— P. 3336—3340.
13. Schlager E. J., Pülm W., Knippers R. // FEBS Lett.— 1983.— Vol. 156, N 2.— P. 281—286.

Поступила 01.03.89

#### THE TIGHTNESS OF NUCLEIC ACID-PROTEIN INTERACTIONS AND SYNTHESIS OF NUCLEIC ACIDS AND PROTEIN IN CELL

A. I. Svirnovsky, V. G. Tsygankov, V. M. Ageichik, T. V. Shimanskaya

Institute of Hematology and Blood Transfusion, Ministry of Public Health of the Byelorussian SSR, Minsk

Nucleoprotein-celite chromatography of cultivated cells nuclei, where incorporation of  $^3\text{H}$ -thymidine,  $^3\text{H}$ -UTP and  $^{14}\text{C}$ -aminohydrolysate into the cells was studied, enabled to

detect that lowering of DNA-protein interactions in intact cells occurred simultaneously with a decrease in the rate of spontaneous macromolecular synthesis. The natural growth-regulating drugs, which inhibited distinctly DNA synthesis, inhibited RNA synthesis only slightly and stimulated protein synthesis within the first hours of the cells cultivation, prevented a decrease in tightness of DNA-protein bonds at the beginning of cultivation and then contributed to the reaction thus correlating with inhibition of RNA and protein synthesis. Definite interrelationship was found between alterations in the chromatin structural state and the cells functional activity. The cells lost their functional activity after pronounced decrease in tightness of DNA-protein bonds.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 615.31:547.473.21.03:616.831-005.4].015.4:616.831-008.921.85].076.9

Ст. С. Лиходий, С. Ст. Лиходий, Л. А. Сибельдина

## ВЛИЯНИЕ ГОМК НА ТЕМПЫ СНИЖЕНИЯ МАКРОЭРГИЧЕСКИХ ФОСФАТОВ МОЗГА КРЫС ВО ВРЕМЯ ИШЕМИИ ПО ДАННЫМ ПРИЖИЗНЕННОЙ $^{31}\text{P}$ -ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ

Целиноградский медицинский институт, Институт химической физики АН СССР, Москва

Механизмы антигипоксического влияния гамма-оксимасляной кислоты (ГОМК) на ткань мозга связывают с предупреждением под влиянием препарата отрицательных изменений в системе окислительного фосфорилирования [1, 10], цикле трикарбоновых кислот [2], обмене моноаминов [6, 8], пероксидации липидов [7], ГАМК-эргических процессах [9]. Подавляющее большинство данных получено при этом в условиях модельных систем (синантосомы, митохондрии, гомогенаты).

В связи с уникальными возможностями  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектроскопии в настоящей работе поставлена задача методом прижизненной неинвазивной  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектроскопии мозга изучить влияние ГОМК на изменения уровней фосфорсодержащих метаболитов и степень внутриклеточного ацидоза (pH) в динамике полной ишемии.

**Методика.** Исследования проведены на 27 белых беспородных крысах-самцах массой 150–200 г, содержащихся на обычном пищевом рационе вивария. Животные были разделены на 2 группы: контрольную (без введения препарата) и подопытную, в которой за 30–40 мин до ишемии крысам однократно вводили внутривенно ГОМК в дозе 400 мг/кг. За 12 ч до экспериментов животных лишили пищи.

Моделирование ишемии осуществляли электрофибрилляцией мышцы сердца под воздействием переменного электрического тока напряжением 27 В, который в течение 1–3 мин подавался на игольчатые электроды, закрепленные подкожно на грудной клетке в области сердца.

Полноту ишемии контролировали измерением напряжения кислорода (pO<sub>2</sub>) в ткани мозга (полярнографически), электрическую активность сердца и дыхания регистрировали с помощью электрокардиографа. Все манипуляции на животных выполняли в условиях тиопенталового наркоза (80–90 мг/кг внутривенно).

До и после полной остановки сердечной деятельности и дыхания через каждые 1–2 мин в течение 20–30 мин регистрировали  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектры мозга крысы на ЯМР-спектрометре фирмы "Bruker" (ФРГ) с резонансной частотой для ядер фосфора 162 МГц и B<sub>0</sub>=9,4 Тесла, используя датчик ЯМР с поверхностной катушкой специальной геометрии. Условия регистрации и обработки спектров описаны ранее [4, 5].

Результаты подвергали статистической обработке по критерию Стьюдента; всего обработано более 500 спектров.

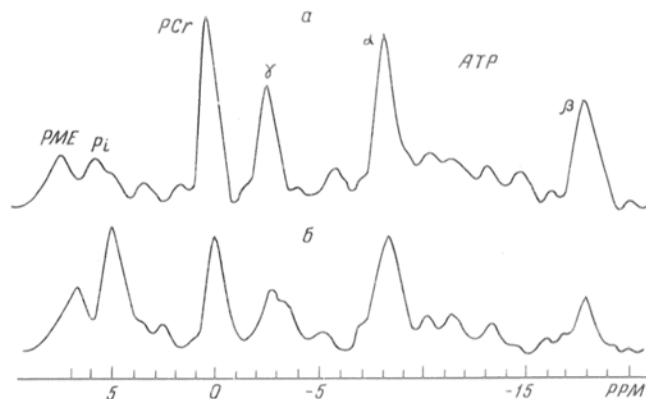


Рис. 1.  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектры мозга крысы до (а) и через 2 мин ишемии (б).

**Результаты и обсуждение.** На рис. 1 представлены типичные  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектры мозга крысы, демонстрирующие четкое разрешение сигналов большинства фосфорсодержащих метаболитов мозга, уровень которых во время ишемии подвергается быстрым и значительным изменениям.

Анализ полученных спектров выявил отчетливое влияние предварительного однократного введения ГОМК. В ЯМР-спектрах мозга как у интактных животных (до моделирования ишемии), так и у животных во время ишемии после введения препарата изменялись интенсивности большинства сигналов фосфорсодержащих метаболитов в сравнении с ЯМР-спектрами мозга контрольной группы крысы.

До остановки дыхания и сердечной деятельности введение ГОМК вызывало некоторое повышение уровня фосфокреатина (PCr) на фоне снижения интенсивностей сигналов фосфомоноэфиров и неорганического фосфата (P<sub>i</sub>), вследствие чего исходные среднестатистические показатели отношения интенсивностей сигналов фосфокреатина и фосфата (PCr/P<sub>i</sub>) в группе интактных леченых животных были достоверно выше в сравнении с таковыми у нелеченых крыс (соответственно  $2,78 \pm 0,08$  против  $2,38 \pm 0,07$ ;  $p < 0,001$ ). В то же время отношение сигналов  $\beta$  АТФ/P<sub>i</sub> в группах оставалось без изменений.

Более заметное действие препарата отмечено за 15 мин до ишемии. На рис. 2 представлена кинетика снижения уровня сигналов  $\beta$  АТФ во время ишемии у леченых и нелеченых животных. Ишемическое снижение уровней АТФ мозга в условиях лечения ГОМК оказалось менее значительным. Существенное торможение распада АТФ в группе леченых крыс выявлялось, начиная с 3–4 мин ишемии. Введение препарата, как видно из рис. 2, сдерживало быструю компоненту кинетики ишемического гидролиза АТФ, связанную, согласно ранее опубликованным данным [4], с нарушением энергетического метаболизма, в первую очередь нейронов.

В группе леченых ГОМК животных ЯМР-спектры мозга отличались, кроме того, заметно меньшим нарастанием уровней сигналов P<sub>i</sub> в те же сроки ишемии (см. рис. 2). В результате снижения скорости гидролиза АТФ и менее значительного повышения содержания неорганического фосфата отношение сигналов  $\beta$  АТФ/P<sub>i</sub> в спектрах мозга

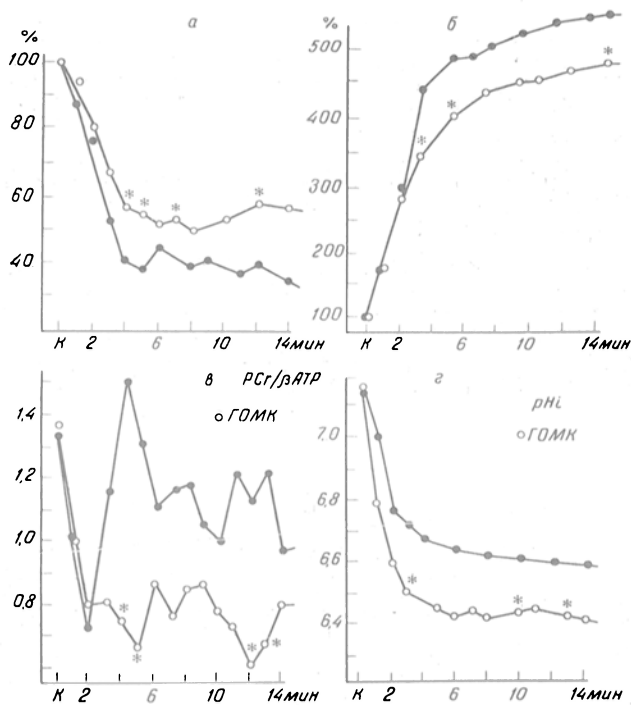


Рис. 2. Изменение интенсивностей (в % от контроля, К) сигналов  $\beta$ АТР и  $P_i$  в  $^{31}P$ -ЯМР-спектрах мозга крыс в течение 15 мин полной ишемии без лечения (темные точки) и после предварительного введения ГОМК (светлые точки).

Каждая точка указывает среднестатистическое значение ( $M \pm m$ ) по данным 10–15 опытов; по оси абсцисс — длительность ишемии (в мин); а — АТР; б —  $P_i$ ; в — РСг/АТР; г — показатель внутриклеточного ацидоза  $pH_i$ . Звездочка —  $p < 0,05$  по сравнению с группой крыс без лечения.

крыс с препаратом на протяжении 15 мин ишемии достоверно выше значения этого показателя в группе контрольных животных (см. таблицу).

Вместе с тем изменения уровней РСг, а также отношения сигналов РСг/ $P_i$  у леченых и нелеченых групп, за исключением показателей в первые 3 мин, отличались друг от друга незначительно. Таким образом, характер влияния ГОМК на биоэнергетику

**Влияние ГОМК (400 мг/кг, внутривенно) на изменение уровней макроэргических фосфатов в  $^{31}P$ -ЯМР-спектрах мозга крыс *in vivo* в динамике 15 мин ишемии ( $M \pm m$ )**

Группа животных	Отношения интенсивностей сигналов метаболитов	
	РСг/ $P_i$	$\beta$ АТР/ $P_i$
<b>I. Интактные:</b>		
контроль — К	2,38 ± 0,07	1,98 ± 0,10
Опыт (ГОМК) — О	2,78 ± 0,08*	1,96 ± 0,09
<b>II. Ишемия (мин):</b>		
2 К	0,42 ± 0,03	0,58 ± 0,06
О	0,54 ± 0,04*	0,68 ± 0,06*
4 К	0,24 ± 0,02	0,17 ± 0,02
О	0,30 ± 0,03*	0,46 ± 0,08*
6 К	0,21 ± 0,02	0,21 ± 0,02
О	0,21 ± 0,01	0,26 ± 0,02
8 К	0,18 ± 0,02	0,17 ± 0,02
О	0,22 ± 0,02	0,27 ± 0,03*
10 К	0,16 ± 0,02	0,18 ± 0,02
О	0,20 ± 0,02	0,27 ± 0,03*
12 К	0,17 ± 0,01	0,19 ± 0,02
О	0,20 ± 0,02	0,28 ± 0,02*
14 К	0,15 ± 0,01	0,16 ± 0,02
О	0,18 ± 0,03	0,24 ± 0,02*
15 К	0,18 ± 0,02	0,16 ± 0,02
О	0,18 ± 0,02	0,24 ± 0,02*

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

тику интактной и ишемической ткани мозга неоднозначен. Если в первом случае изменения обнаруживали в содержании РСг, то во время ишемии препарат действовал на скорость распада АТР. Однако в обоих случаях под влиянием ГОМК в ткани мозга регистрировали более низкие уровни  $P_i$ .

Преимущественный эффект ГОМК на ишемический распад АТР отражен также в динамике изменений отношения РСг/ $\beta$ АТР в спектрах. Показатели этого отношения у леченых крыс в течение 15 мин ишемии были ниже, чем в контрольной группе (см. рис. 2).

Полученные данные указывают на свойство ГОМК снижать ишемическую деградацию макроэргических фосфатов мозга. Характер изменений уровня макроэргических фосфатов подчеркивает преобладающее влияние ГОМК на митохондриальное звено синтеза АТР и ферменты цикла лимонной кислоты [1, 10].

В группе леченных ГОМК крыс неожиданным был более выраженный внутриклеточный ацидоз (см. рис. 2), что отчетливо проявлялось уже в течение 1-й минуты ишемии ( $pH_i$  6,79 ± 0,03 против 6,98 ± 0,08 в контроле;  $p < 0,05$ ). Ацидоз оставался повышенным до конца эксперимента. Отмеченный эффект ГОМК объясняется возможным стимулирующим влиянием препарата на пентозофосфатный путь окисления глюкозы и увеличением внутриклеточного уровня НАДФН<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, кетоновых тел [3]. Снижение показателя  $pH_i$  могло быть следствием смещения равновесия трансгидрогеназной реакции в сторону образования дефицитной в условиях ишемии окисленной формы НАД<sup>+</sup> и дополнительного накопления лактата при гликолитическом пути распада глюкозы. Последнее подтверждается данными о повышении уровня лактата у животных в состоянии шока при лечении ГОМК [3].

Таким образом, неинвазивным методом прижизненной  $^{31}P$ -ЯМР-спектроскопии мозга выявлено заметное защитное влияние ГОМК на процесс ишемической дезорганизации биоэнергетики нервной ткани. Однократное, за 30–40 мин до ишемии, внутривенное введение ГОМК в дозе 400 мг/кг достоверно снижало рост содержания неорганического фосфата и увеличивало степень внутриклеточного ацидоза ( $pH_i$ ). С учетом данных литературы полученные результаты согласуются с предположением о возможном положительном влиянии ГОМК на механизмы фосфорилирующих и гликолитических звеньев биоэнергетики мозга во время ишемии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Высоцкая Н. Б., Закусов В. В., Чумина З. Н. // Фармакол. и токсикол.— 1970.— № 5.— С. 515–517.
2. Кондрашова М. Н., Маевский Е. И., Бабалин Г. В. и др. // Биохимия и ультраструктура.— М., 1973.— С. 112–129.
3. Лабори А. // Регуляция обменных процессов.— М., 1970.— С. 58–59.
4. Лиходий С. Ст., Лиходий Ст. С., Сибельдина Л. А., Семенова Н. А. // Нейрохимия.— 1988.— № 3.— С. 415–424.
5. Лиходий С. Ст., Лиходий Ст. С., Сибельдина Л. А., Семенова Н. А. // Вопр. мед. химии.— 1988.— № 6.— С. 109–113.
6. Маликова Л. А., Арефолов В. А. // Фармакол. и токсикол.— 1981.— № 1.— С. 37–39.

7. Меерсон Ф. З., Каган В. Е., Прилипко Л. Л. и др. // Бюл. Экспер. биол.— 1980.— № 12.— С. 661—663.  
 8. Меерсон Ф. З., Павлова В. И., Бердышева Л. В. и др. // Физиол. журн. СССР.— 1981.— № 6.— С. 816—822.  
 9. Мирзоян Р. С., Ганьшина Т. С. // Бюл. Экспер. биол.— 1981.— № 10.— С. 456—458.  
 10. Хаатова Е. М., Сидоркина А. Н., Миронова Т. В. // Нуклеотиды мозга.— М., 1987.— С. 170—173.

Поступила 24.05.89

EFFECTS OF  $\gamma$ -HYDROXYBUTYRIC ACID ON THE REACTION RATE OF PHOSPHORUS-CONTAINING METABOLITES IN BRAIN OF RATS WITH ISCHEMIA ESTIMATED BY MEANS OF  $^{31}\text{P}$ -NMR SPECTROSCOPY *IN VIVO*

St. S. Likhody, S. St. Likhody, L. A. Sibeldina

Chair of Biochemistry, Medical School, Tselinograd, Institute of Chemical Physics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Protective effects of  $\gamma$ -hydroxybutyric acid on bioenergetic reactions were studied in brain of rats with ischemia using  $^{31}\text{P}$ -NMR spectroscopy *in vivo*. Intraperitoneal preadministration of  $\gamma$ -hydroxybutyric acid at a dose of 400 mg/kg within 30-40 min before ischemia led to a decrease in the ATP pool in ischemic brain tissue, to alteration in the PCr/ATP ratio in the  $^{31}\text{P}$ -NMR spectrum, to prevention of  $\text{P}_i$  concentration increase and to increase in the intracellular acidosis development rate. Possible mechanisms of the  $\gamma$ -hydroxybutyric acid effects on bioenergetic reactions in nervous tissue during ischemia are discussed.

© В. В. ЛЕЛЕВИЧ, 1991

УДК 612.82.015.32.014.46: [615.917:547.262

В. В. Лелевич

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ПЕНТОЗОФОСФАТНОГО ПУТИ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС ПРИ ОДНОКРАТНОМ ВВЕДЕНИИ РАЗЛИЧНЫХ ДОЗ ЭТАНОЛА

Гродненский медицинский институт

В головном мозге основная часть глюкозы метаболизируется нейронами в процессе аэробного гликолиза и лишь небольшое количество — по пентозофосфатному пути (ПФП) [8, 13]. Последнему отводится важная роль в снабжении структур нервной ткани восстановительными эквивалентами в липогенезе, а также пентозами в биосинтезе нуклеиновых кислот. Поражения центральной нервной системы (ЦНС), нарушение ее функциональной активности нередко сопровождаются изменениями интенсивности ПФП в мозге, усугубляющими патохимическую картину нарушений в нейронах [8, 14]. Этанол при однократном введении повышает уровень глюкозы в нервной ткани [16], что в большей степени связывают с торможением гликолиза. Функционирование ПФП в мозге при алкогольной интоксикации изучено в меньшей степени и требует дальнейшего исследования [5, 7]. При этом необходимо учитывать нарушения в обмене тиамин [17] и липидов [11] в нервной ткани, которые отмечаются в условиях острой алкоголизации. Эффекты этанола в отношении метаболизма глюкозы в мозге носят дозозависимый характер [18]. Кроме того, для ЦНС характерна региональность метаболических изменений при действии алкоголя [5]. В связи с этим мы изучали функционирование ПФП в некоторых от-

Активность гл-6-фДГ и 6-фгЛДГ (в нмоль на 1 мг белка в 1 мин) в головном мозге крыс при однократном введении разных доз этанола

Фермент	Группа животных	Кора	Таламическая область	Ствол мозга
Гл-6-фДГ	1-я	21,09±1,21	25,24±1,20	36,46±2,20
	2-я	24,80±2,04	30,20±1,76*	30,45±1,83*
	3-я	20,32±1,41	19,83±0,52*	27,51±1,20*
	4-я	23,42±2,1	29,34±2,04**	35,39±2,60**
6-фгЛДГ	1-я	14,20±2,01	15,09±1,78	28,31±2,55
	2-я	16,33±1,39**	18,71±2,15**	20,52±1,89*
	3-я	10,85±1,22	10,48±1,02*	16,37±1,95*
	4-я	14,99±1,52	14,83±0,79**	22,14±1,72*

\* Статистически значимые различия с контролем.

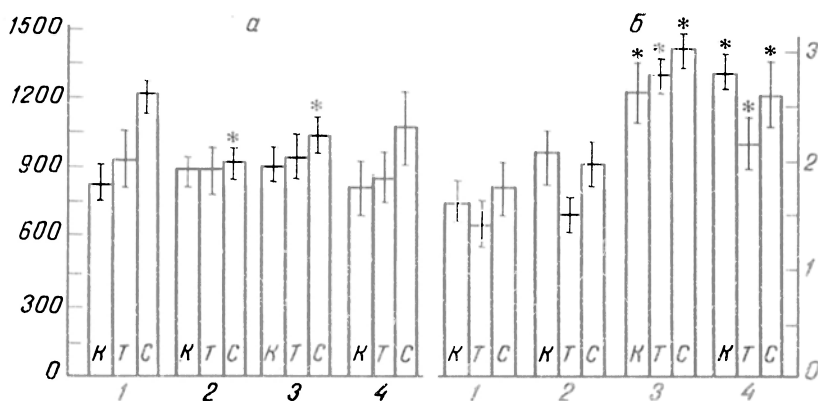
\*\* Статистически значимые различия с 3-й группой.

делах головного мозга крыс при однократном введении различных доз этанола.

Методика. Опыты выполнены на 75 крысах-самцах массой 160—200 г, разделенных на 4 группы. Перед исследованием животные голодали 12 ч при доступе к воде. Животным 1-й группы (контроль) внутривенно вводили физиологический раствор, крысам 2, 3 и 4-й групп — 25% раствор этанола в дозах 1, 2,5 и 5 г на 1 кг массы тела соответственно. Выбор доз основывался на данных литературы о малых, средних и больших количествах этанола для экспериментальных животных [10, 11, 18]. Крыс декалентировали через 1 ч после введения этанола и физиологического раствора. На холоду выделяли кору больших полушарий, таламическую область и ствол головного мозга [12]. Данные отделы мозга были избраны в связи с их высокой чувствительностью к токсическому действию этанола [5, 7]. В надосадочной фракции гомогенатов (10 000 г, 30 мин) определяли активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (гл-6-фДГ) (КФ1.1.1.49), 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (6-фгЛДГ) (КФ1.1.1.44) [6] и транскеолазы (ТК) (КФ2.2.1.1) [9]. Содержание глюкозы определяли в безбелковых центрифугатах из ткани, замороженной в жидком азоте. Инкубационная среда содержала гл-6-фДГ и гексокиназу [4]. Белок определяли по Лоури.

Результаты и обсуждение. В контрольной группе отмечают различия в активности ферментов ПФП между исследуемыми отделами мозга. В стволе активность гл-6-фДГ, 6-фгЛДГ и ТК достоверно выше, чем в таламической области и коре больших полушарий (см. таблицу и рисунок). Это указывает на более высокую скорость ПФП в стволовой части мозга и в определенной степени может быть обусловлено различным клеточным составом исследуемых регионов мозга, которые различаются по интенсивности и специализации метаболизма [19]. Содержание глюкозы в стволе мозга выше, чем в таламической области ( $p < 0,05$ ), что может быть связано с более высокой здесь активностью ферментов ПФП.

Введение этанола в дозе 1 г/кг сопровождается неоднозначными изменениями в исследуемых областях мозга. Уровень глюкозы не изменяется в сравнении с контролем (см. рисунок). Активность гл-6-фДГ повышается в таламической области и снижается в стволе мозга (см. таблицу). В стволовой части снижается также активность 6-фгЛДГ и ТК, что свидетельствует об ингибировании ПФП в этом регионе мозга при слабовыраженной алкогольной интоксикации. При введении 1 г этанола активность ферментов ПФП выравнивается между корой, таламической областью и стволом мозга.



Активность ТК (в нмоль/мг/ч) — а и содержание глюкозы (в мкмоль/г) — б в головном мозге крыс при однократном введении разных доз этанола.

1—4 — группы крыс. К — кора больших полушарий; Т — таламическая область; С — ствол мозга. Звездочкой отмечены статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) с соответствующим отделом мозга крыс контрольной группы.

Увеличение дозы этанола до 2,5 г/кг (3-я группа) изменяет метаболическую картину в ткани мозга. В сравнении со 2-й группой активность гл-6-фДГ резко снижается в таламической области и становится ниже контрольного уровня (см. таблицу). Трудно однозначно оценить, чем вызван такой резкий перепад активности гл-6-фДГ и его функциональная оперативность в этой области мозга при возрастании дозы вводимого этанола. По-видимому, это объясняется репрессией определенных изоферментов гл-6-фДГ, многие из которых уже выделены и охарактеризованы [2]. Ранее нами было показано, что этанол в аналогичной дозе повышает активность лимитирующих ферментов гликолиза только в коре больших полушарий [3]. Активность ферментов ПФП при этом здесь не изменяется. Такое соотношение активности различных путей катаболизма глюкозы в данном регионе мозга может быть связано в определенной степени с необходимостью энергетического обеспечения повышенной функциональной активности коры при алкогольной интоксикации средней степени. Более выраженные изменения активности дегидрогеназ ПФП в сторону снижения в сравнении с ТК связаны, очевидно, с изменением редокс-состояния при окислении этанола и ацетальдегида [7]. Понижение активности ТК в стволовой части мозга следует рассматривать с позиций регуляторной роли этого фермента между гликолизом и ПФП [2].

При алкогольной интоксикации средней степени (3-я группа) в стволе мозга активность гл-6-фДГ, 6-фгДГ и ТК ниже, чем в контроле, что свидетельствует об ингибирующем действии этанола на ПФП в этом отделе мозга. Активность гл-6-фДГ и ТК в стволе у крыс 3-й группы не отличается от таковой у крыс 2-й группы, что указывает на отсутствие дозозависимого эффекта алкоголя на показатели ПФП. В таламической области снижается активность обеих дегидрогеназ (см. таблицу). Содержание глюкозы при введении 2,5 г этанола повышается во всех исследуемых отделах мозга (см. рисунок), что свидетельствует о торможении катаболизма этого субстрата в мозге при острой алкогольной интоксикации [5]. Отсутствие взаимосвязи между изменениями активности ферментов ПФП и содержанием глюкозы согласуется с данными об ограниченной роли ПФП в метаболизме глюкозы в мозге [8, 13]. Степень ингибирующего действия этанола на активность ферментов ПФП возрастает в направлении кора — ствол. Так, у крыс 3-й группы их активность в ко-

ре соответствует контрольному уровню, в таламической области понижается активность дегидрогеназ, а в стволе мозга — дегидрогеназ и ТК (см. таблицу). Следует отметить, что у интактных животных именно ствол мозга характеризуется наибольшей активностью ферментов этого метаболического пути. Активность дегидрогеназ ПФП в мозге зависит от соотношения окисленной и восстановленной форм НАДФ [8]. Восстановленный НАДФ и глюкозо-6-фосфат вызывают диссоциацию гл-6-фДГ на субъединицы, понижая ее активность [2]. Содержание этих регуляторов возрастает в мозговой ткани при острой алкоголизации [5] и может обеспечивать ингибирующий эффект. Кроме того, при алкогольной интоксикации в ткани мозга замедляется утилизация АТФ с повышением ее уровня [1], что может быть одной из причин снижения активности гл-6-фДГ [2]. Представляют интерес данные [17] о наиболее выраженных нарушениях обмена тиамин в стволе мозга при алкогольной интоксикации. Это, очевидно, обуславливает ингибирование ТК именно в данном регионе мозговой ткани.

Введение токсической дозы этанола — 5 г/кг приводит к нормализации активности ферментов ПФП. Активность гл-6-фДГ в таламической области и стволе повышается в сравнении с таковой в 3-й группе на 48 % ( $p < 0,001$ ) и 28,6 % ( $p < 0,02$ ) соответственно, достигая значений в контроле (см. таблицу). Активность 6-фгДГ также нормализуется в таламической области, оставаясь пониженной в сравнении с контролем только в стволе мозга. Активность ТК в исследуемых мозговых образованиях у крыс 4-й группы соответствует таковой в контроле (см. рисунок). Содержание глюкозы при выраженной алкогольной интоксикации достоверно выше, чем в контроле, но оно не выше, чем в 3-й группе, а в таламической области — даже ниже.

Таким образом, степень изменений активности ферментов ПФП и содержания глюкозы в мозге при однократном введении этанола зависит от дозы. Слабовыраженная алкогольная интоксикация (1 г/мг) сопровождается снижением активности ферментов ПФП в стволе мозга и отсутствием изменений ее в коре больших полушарий. Региональность метаболических эффектов этанола может быть обусловлена неодинаковой плотностью адренорецепторов [15], разной скоростью накопления циклических нуклеотидов [10] и метаболизма тиамин [17] в изучаемых участках мозга. При средней степени алкогольной инток-

сикации (2,5 г/кг) ингибирующее действие этанола на активность ферментов ПФП также локализуется в стволе мозга, хотя увеличения степени ингибирования не происходит. Нормализацию активности ферментов при введении токсической дозы этанола следует, вероятно, рассматривать как переход на функционально новый механизм регуляции метаболизма, который включается в ткани мозга при достижении предельной степени депрессии определенных нервных структур. Отсутствие связи между степенью ингибирования ферментов ПФП и изменением содержания глюкозы в разных отделах мозга свидетельствует о незначительной роли этого пути в суммарном метаболизме данного субстрата. Изменение функционирования ПФП при алкогольной интоксикации различной тяжести подчеркивает его важную роль в реализации эффектов этанола в мозговой ткани. Это позволяет покрывать динамически меняющиеся потребности в восстановительных эквивалентах и фосфорных эфирах различных углеводов для локального биосинтетического и энергетического обеспечения клеток головного мозга.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Кораблев М. В., Лелевич В. В. // Фармакол. и токсикол.— 1989.— Т. 52, № 5.— С. 83—86.
2. Кудрявцева Г. В. // Успехи соврем. биол.— 1980.— Т. 89, № 1.— С. 74—89.
3. Лелевич В. В. // Вопр. мед. химии.— 1987.— Т. 33, № 5.— С. 139—142.
4. Мильман Л. С., Юровицкий Ю. Г., Ермолаева Л. П. // Методы биологии развития.— М., 1974.— С. 415—433.
5. Панченко Л. Ф., Лелевич В. В. // Пат. физиол. и экспер. терап.— 1989.— № 3.— С. 83—88.
6. Прохорова М. И. Методы биохимических исследований.— Л., 1982.— С. 168—171.
7. Сытинский И. А. Биохимические основы действия этанола на центральную нервную систему.— М., 1980.
8. Хачатрян Г. С. Биохимия головного мозга. Гексозомонофосфатный шунт в мозгу.— Ереван, 1967.
9. Bruns F., Dumvald E., Naltman E. // Biochem. Z.— 1959.— Vol. 330.— P. 497—508.
10. Ferko A., Bobyock E., Chernick W. // Toxicol. and Appl. Pharmacol.— 1982.— Vol. 64, N 3.— P. 447—455.
11. Frank O., Luisada-Opper A., Sorrell M. et al. // J. Nutr.— 1976.— Vol. 106, N 5.— P. 606—614.
12. Glowinski J., Iversen L. // J. Neurochem.— 1966.— Vol. 13.— P. 655—669.
13. Loreck D., Galarraga J., Vander Feen J. et al. // Metab. Brain. Disease.— 1987.— Vol. 2, N 1.— P. 31—46.
14. Martins R., Harper G., Stokes G., Masters C. // J. Neurochem.— 1986.— Vol. 46, N 4.— P. 1042—1045.
15. Rangara N., Kalant H. // J. Pharmacol. exp. Ther.— 1984.— Vol. 231, N 2.— P. 416—421.
16. Rawat A. // Biochemical Pharmacology of Ethanol.— New York, 1975.— P. 165—177.
17. Rindi G., Comincioli V., Reggiani C., Patrini C. // Brain. Res.— 1987.— Vol. 413, N 1.— P. 23—35.
18. Roach M., Reese W. // Biochem. Pharmacol.— 1971.— Vol. 20, N 10.— P. 2805—2812.
19. Rose S. // J. Neurochem.— 1968.— Vol. 15, N 12.— P. 1415—1429.

Поступила 24.01.90

#### ACTIVITY OF THE PENTOSEPHOSPHATE PATHWAY IN RAT BRAIN AFTER SINGLE ADMINISTRATION OF ETHANOL AT VARIOUS DOSES

V. V. Lelevich

Chair of Biochemistry, Medical School, Grodno

A rate of alterations in the enzymatic activity of pentose-phosphate pathway and content of glucose in rat brain depended on a dose of administered ethanol. The alcohol inhibitory

effect on the enzymatic activity was localized mainly in the brain stem. Impairment of the pentosephosphate pathway functions in alcohol intoxication demonstrated the pathway importance in realization of ethanol effects in nervous tissue.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 617-001.17-07:616-008.939.15-39-02:615.366.153.96-001.17

[Б. М. Вальдман], И. А. Волчегорский, А. С. Пу-  
 жевский, Б. Г. Яровицкий, Р. И. Лифшиц

#### СРЕДНЕМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПЕПТИДЫ КРОВИ КАК ЭНДОГЕННЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В НОРМЕ И ПРИ ТЕРМИЧЕСКИХ ОЖОГАХ

Челябинский медицинский институт

Компоненты безбелковой фракции крови, так называемые средние молекулы (СМ), рассматривают в настоящее время как универсальные признаки эндогенной интоксикации [12]. Основная часть СМ представлена веществами пептидной природы, молекулярная масса которых колеблется в пределах 300—5000 D [8]. Пептидные компоненты СМ — средномолекулярные пептиды (СМП) — обладают высокой биологической активностью, что определяет их патогенетическое значение при аутоинтоксикации. Нами установлена роль СМП в патогенезе нейросиндрома, поражения миокарда и нарушения микроциркуляции при ожоговой болезни [2—5, 7], что хорошо согласуется с данными о позитивной клинической динамике у обожженных при элиминации СМП из кровотока [13]. Вместе с тем появились сообщения о возможном компенсаторном значении гиперпептидемии при термических ожогах, поскольку СМ обладают антиоксидантным действием *in vitro* [16, 17]. Последнее предположение представляется важным, так как интенсификация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) является одним из ключевых механизмов патогенеза ожоговой болезни [1]. Однако распространение закономерностей, выявленных *in vitro* на организменный уровень, представляется спорным, поскольку известно, что антиоксиданты могут оказывать совершенно различное и зачастую противоположное действие на процессы ПОЛ *in vivo* в зависимости от дозы и времени после введения [9].

Целью настоящей работы явилось изучение влияния СМП при системном введении в организм на уровень продуктов ПОЛ в тканях, а также исследование взаимосвязи между эффектами СМП на ПОЛ *in vivo* и *in vitro*.

Методика. СМП были выделены и фракционированы по ранее описанной методике [2] из крови 4 интактных и 4 обожженных собак через 24 ч после ожога IIIA—IIIB степени площадью 20—25 % поверхности тела. Все манипуляции на животных выполняли при общей внутривенной анестезии тиопентал-натрием в дозе 30 мг/кг. СМ выделяли из плазмы крови последовательной ультрафильтрацией на мембранах УАМ-500М и УАМ-150М с последующим концентрированием на мембране УАМ-50М «Владипор». Фракционирование осуществляли на колонке размером 5,6×50 см, заполненной сефадексом G-15. Элюционные профили были идентичными для обеих групп животных. Фракции нумеровали в порядке выхода с колонки. Нами были изучены фракции СМП под номерами 2, 3 и 4 как обладающие наиболее выра-

женной биологической активностью [2—5, 7]. Исследование влияния СМП на индуцированную ультрафиолетом липопероксидацию эритроцитарных мембран *in vitro* проводили по методу [15]. СМП вносили в среду инкубации в количествах, эквивалентных их содержанию в 10 мл крови, объемом 0,1 мл. В этой серии экспериментов предусматривали дополнительный контроль за генерацией тиобарбитуровой кислоты (ТБК)-реактивных веществ при ультрафиолетовом облучении фракций СМП. Результаты контрольных исследований учитывали при расчете параметров антиокислительной активности (АОА). Эксперименты *in vivo* проведены на 180 белых беспородных мышках-самцах массой 18—22 г. Фракции СМП, растворенные на 0,9 % NaCl, вводили внутривенно в дозе, эквивалентной их содержанию в 10 мл крови, объемом 0,2 мл. Контрольным животным вводили равный объем изотонического раствора NaCl. В различных сериях эксперимента животных декапитировали через 30 мин или 24 ч после инъекции, извлекали головной мозг, сердце и печень и гомогенизировали их в 0,067 М Na-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем ЭДТА в концентрации 0,1 %. Содержание первичных и вторичных молекулярных продуктов ПОЛ определяли в фазах гептан-изопрональных экстрактов тканевых гомогенатов по соотношению оптических плотностей  $E_{232}/E_{220}$  и  $E_{278}/E_{220}$  соответственно [6]. Содержание продуктов ПОЛ в крови 29 доноров обоего пола также определяли по методу [6]. Достоверность различий оценивали при помощи критериев Стьюдента и Вилкоксона — Манна — Уитни; взаимосвязь между показателями исследовали путем расчета коэффициента линейной корреляции [14].

**Результаты и обсуждение.** На рис. 1 представлены данные о статистически достоверных (по отношению к контролю) изменениях относительного содержания продуктов ПОЛ в тканях мышшей после внутривенного введения изученных фракций СМП. Обращает внимание относительно

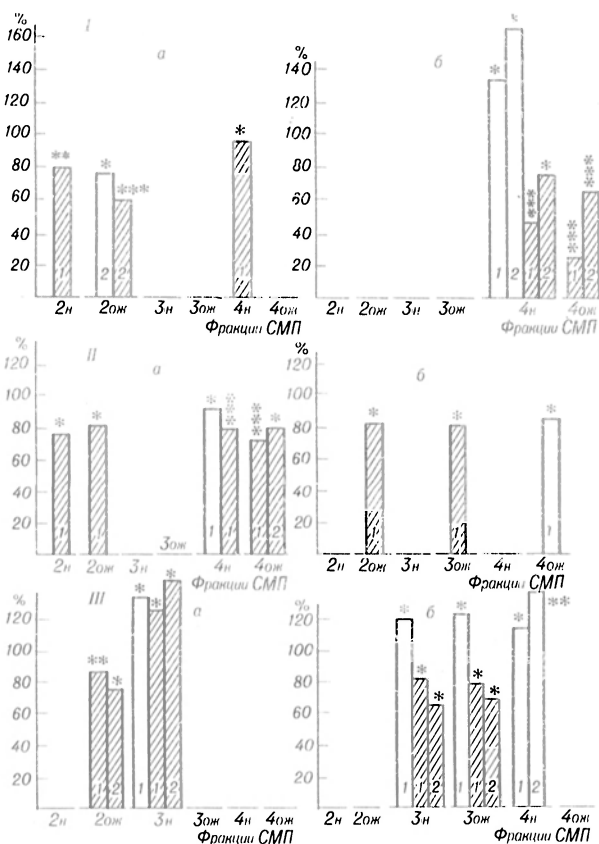
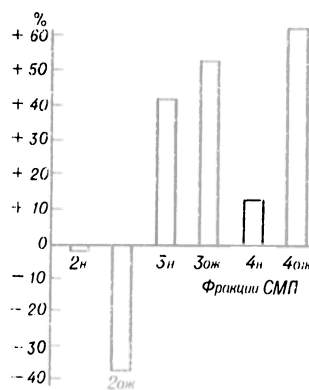


Рис. 1. Изменения содержания первичных и вторичных продуктов ПОЛ в тканях мышшей после внутривенного введения фракций СМП, выделенных из крови собак в норме (н) и при термической травме (ож).

Светлые столбики — через 30 мин, заштрихованные — через 24 ч после инъекции. I — первичных, 2 — вторичных продуктов. а — изопрональный; б — гептановая фаза липидного экстракта. Одна звездочка —  $p < 0,05$ , две —  $p < 0,01$ , три —  $p < 0,001$ . I — головной мозг; II — сердце; III — печень.

Рис. 2. Влияние фракций СМП, выделенных из крови собак в норме (н) и при термической травме (ож), на окисляемость липидов эритроцитарных мембран *in vitro*.

$$АОА = 100\% \frac{F_{on}(532)}{F_n(532)} \times 100\%$$



большая частота антиоксидантных эффектов СМП по сравнению с прооксидантными, а также преимущественная связь последних с фракциями СМП, выделенными из крови в норме. Антиоксидантные эффекты установлены и при исследовании влияния СМП на процессы ПОЛ *in vitro* (рис. 2). Лишь 2 фракции не обладали АОА. При этом фракция 2 из крови обожженных животных (фракция 2 — «ожог») существенно увеличивала накопление ТБК-реактивных веществ в эритроцитарных мембранах при ультрафиолетовом облучении, проявляя, таким образом, прооксидантное действие. Эти материалы, очевидно, уточняют описанный ранее феномен подавления ПОЛ *in vitro* суммарной фракцией СМ, выделенных из крови при термических ожогах [16, 17]. Представляется оправданным связать последнее прежде всего с АОА фракций 3 и 4 («ожог»). Обращает внимание, что эти фракции обладают антиоксидантным действием и в норме, но в меньшей степени. Существенно, что степень превышения АОА фракций СМП при ожоге по сравнению с антиокислительным действием СМП крови интактных собак практически совпадает с величиной прироста пептидного компонента. Так, для фракции (3 («ожог») АОА составляет по сравнению с таковой для фракции 3 («норма») 127 %, а содержание СМП — 147 % (при определении по методу Лоури) или 125 % (при определении биуретовым микрометодом), соответственно при сопоставлении АОА для фракций 4 («ожог») и 4 («норма») — 540 %, а содержание СМП — 420 или 650 %. Исходя из этого, можно думать, что ингибирующее действие указанных фракций СМП на процессы ПОЛ *in vitro* зависит от их концентрации и развивается по ряду неспецифических механизмов, одним из которых является способность подавлять каталитическую активность ионов  $Fe^{2+}$  [17]. Помимо этого, целесообразно учесть также способность пептидов разрушать липоперекиси за счет наличия SH-групп [11] и связывать вторичные (карбонильные) продукты ПОЛ за счет наличия свободных аминогрупп [10]. Следует подчеркнуть, что влияние СМП на процессы ПОЛ *in vitro* неоднозначно и, помимо антиоксидантных, включает прооксидантные эффекты. В условиях модельной системы, обеспечивающей полную пероксидацию доступных для окисления липидов эритроцитарных мембран [15], компоненты фракции 2 («ожог») повышают накопление ТБК-реактивных продуктов, что можно объяснить лишь «структурным» прооксидантным эффектом СМП данной



фракции [10], т. е. их способностью увеличивать доступность мембранных липидов для окисления.

Особый интерес представляет несопоставимость про- и антиоксидантных эффектов СМП *in vitro* и при системном введении в организм. Так, фракции 2 («норма») и 2 («ожог») *in vivo* снижали содержание продуктов ПОЛ в тканях, в то время как в модельной системе они соответственно либо практически не проявляли влияния на индуцированную липопероксидацию, либо существенно усиливали ее. Антиоксидантные по своим свойствам *in vitro* фракции 3 («норма»), 3 («ожог») и 4 («норма») вызывали разнонаправленные изменения содержания продуктов ПОЛ в условиях цельного организма. Только СМП фракции 4 («ожог») проявляли антиоксидантное действие как в модельной системе, так и *in vivo*. Очевидно, что СМП способны воздействовать на процессы ПОЛ как на уровне собственно цепных реакций, так и на уровне физиологической регуляции свободнорадикальных превращений липидов. Вероятно, механизмы этих видов регуляции могут существенно различаться. Особенно важно обратить внимание на длительность системных регуляторных эффектов СМП в отношении процессов липопероксидации. Действие СМП на содержание продуктов ПОЛ в тканях отмечается даже через 24 ч с момента введения в организм, несмотря на чрезвычайно низкую устойчивость соединений пептидной природы в биологических средах. Неоднозначность системного влияния СМП на липопероксидацию проявляется также в различной направленности изменений содержания продуктов ПОЛ в отдельных исследованных органах. Наблюдаемые при внутривенном введении СМП изменения ПОЛ зависят иногда и от характера исследуемых липидов: полярных — в изопропанольной фазе или неполярных — в гептановой фазе. Все перечисленное свидетельствует, что *in vivo* СМП оказывают влияние на процессы ПОЛ не только, а возможно, и не столько за счет своих собственно про- или антиоксидантных свойств, выявляемых в модельной системе. Для объяснения системного действия СМП на липопероксидацию представляется разумным привлечь данные о конкурентных взаимоотношениях эндо- и экзогенных антиоксидантов [9], что в условиях введения последних *in vivo* может повлиять на величину антиокислительного потенциала и интенсифицировать ПОЛ. Важными представляются также данные о кардиотропном действии СМП [5] и их влиянии на микрогемодинамику [4], поскольку изменения режима кровоснабжения тканей прямо связаны с их кислородным режимом, а значит, и с интенсивностью ПОЛ [10]. Известно также, что интенсивность процессов ПОЛ в центральной нервной системе возрастает по мере филогенетического усложнения и увеличения возбудимости ее отделов [11]. Этот факт можно привлечь для объяснения прироста содержания продуктов ПОЛ в ткани головного мозга под действием фракции 4 («норма»), которая активировала исследовательско-ориентировочную деятельность мышшей в «открытом поле» [7].

Представляются важными разработки, касающиеся антиокислительной активности диализуе-

мых компонентов сыворотки крови. Показано, что антиоксидантные эффекты небелковой фракции крови не обнаруживаются у рыб и земноводных, но проявляются у млекопитающих (крыс) и птиц (цыплят) [18]. Не удалось выявить соответствующую активность безбелковой фракции крови у человека [19]. Для разрешения очевидного противоречия в данных литературы мы исследовали взаимосвязь между содержанием СМП безбелковой фракции крови, содержанием продуктов ПОЛ в крови и АОА сыворотки крови у 29 доноров. Достоверная обратная коррелятивная связь установлена только между содержанием СМП и уровнем первичных продуктов ПОЛ в липидах изопропанольной фазы:  $r = -0,4 \pm 0,169$  ( $p < 0,05$ ). Остальные зависимости не были достоверно выражены. Представляется, что эти данные свидетельствуют об определенном участии СМП крови в регуляции процессов ПОЛ у человека.

Высказанная ранее мысль, что пептидемия при ожоговой интоксикации имеет компенсаторное значение в плане ингибирования процессов ПОЛ [16, 17], в основном подтверждается обладанием антиоксидантных эффектов у СМП, продемонстрированным как *in vivo*, так и *in vitro*. Вместе с тем данные о прооксидантном действии фракции 2 («ожог») *in vitro*, а также частое несоответствие результатов, получаемых в модельной системе и *in vivo*, делают очевидной необходимость дальнейшего изучения роли СМП как регуляторов липидной пероксидации при термических ожогах, тем более что содержание как СМП [13], так и продуктов ПОЛ [6] в крови больных с термическими ожогами прямо зависит от тяжести ожоговой травмы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Агаджанов М. И. Липидная пероксидация в патогенезе ожоговой болезни и влияние антиоксидантов на ее течение: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Ереван, 1979. — С. 49.
2. Вальдман Б. М., Волчегорский И. А., Лифшиц Р. И. // Пат. физиол. — 1985. — № 2. — С. 36—40.
3. Вальдман Б. М., Волчегорский И. А., Лифшиц Р. И. // Там же. — 1985. — № 6. — С. 39—42.
4. Вальдман Б. М., Хшиво А. Л., Волчегорский И. А. и др. // Там же. — 1986. — № 6. — С. 64—67.
5. Вальдман Б. М., Пужевский А. С., Волчегорский И. А. и др. // Там же. — 1988. — № 6. — С. 40—43.
6. Волчегорский И. А., Налимов А. Г., Яровицкий Б. Г., Лифшиц Р. И. // Вопр. мед. химии. — 1989. — № 1. — С. 127—131.
7. Волчегорский И. А., Вальдман Б. М., Пужевский А. С., Лифшиц Р. И. // Пат. физиол. — 1989. — № 1. — С. 45—49.
8. Галактионов С. Г., Николайчик В. В., Михнева Л. М. и др. // Биоорган. химия. — 1984. — № 1. — С. 5—17.
9. Журавлев А. И. // Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии: Сборник науч. труд. — М., 1982. — С. 3—36.
10. Каган В. Е., Орлов О. Г., Прилипко Л. Л. Проблема анализа эндогенных продуктов перекисного окисления липидов: Науч. обзор. — М., 1986.
11. Козлов Ю. П. Свободные радикалы и их роль в нормальных и патологических процессах. — М., 1973.
12. Николаев В. Г. Метод гемокорбонперфузии в эксперименте и клинике. — Киев, 1984.
13. Однопозов А. К. Вопросы биохимической оценки течения ожоговой болезни и эффективности ее лечения: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Челябинск, 1986.
14. Полков И. В., Соколова И. С. Практическое пособие по медицинской статистике. — Л., 1975.
15. Спектор Е. Б., Ананенко А. А., Политова Л. И. // Лаб. дело. — 1984. — № 1. — С. 26—28.

16. Туликова З. А. // Вопр. мед. химии.— 1983. — № 3.— С. 108—111.  
 17. Фархутдинов Р. Р., Юханова А. III. // Вопр. мед. химии.— 1986.— № 4.— С. 38—40.  
 18. Barber A. A. // Arch. biochem. Biophys.— 1961.— Vol. 92.— P. 38—43.  
 19. Placer Z., Slabochova Z. // Biochim. biophys. Acta.— 1961.— Vol. 48.— P. 427—428.

Поступила 09.06.89

#### MIDDLE MASS PEPTIDES AS REGULATING FACTORS OF LIPID PEROXIDATION UNDER CONDITIONS OF NORMAL STATE AND BURNS TRAUMA,

[B. M. Valdman], I. A. Volchegorsky, A. S. Pushevsky, B. G. Yarovinsky, R. I. Lifshitz

Medical School, Chelyabinsk

Influence of middle mass peptides upon red blood cell membrane lipid peroxidation was studied in the cells irradiated by ultraviolet *in vitro* as well as content of the lipid peroxidation products was estimated in mice tissues after intravenous administration of the peptide fraction. Dissimilar effects of the middle mass peptides *in vivo* and *in vitro* and role of these peptides in regulation of lipid peroxidation under conditions of burns are discussed. Negative correlation was found between content of middle mass peptides and products of lipid peroxidation in healthy volunteers.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616.831.9-008.84:[577.175.823]:824-577.175.859]-092:612.57

А. И. Кубарко, В. А. Переверзев, А. И. Балаклеевский, Н. Н. Гомолко

#### АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЙ СОДЕРЖАНИЯ СЕРОТОНИНА, ГИСТАМИНА И ПРОСТАГЛАНДИНА E<sub>2</sub> В СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ И ТКАНЯХ ОРГАНИЗМА ПРИ ГИПЕРТЕРМИЯХ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Минский медицинский институт

Экспериментальные и клинические исследования свидетельствуют о важной роли серотонина — С [18, 26, 29], гистамина — Г [16] и простагландина E<sub>2</sub> — ПГЕ<sub>2</sub> [17, 28] в нейроэндокринной регуляции температуры тела. Однако вопрос о взаимодействии этих веществ в центральных механизмах поддержания температурного гомеостаза организма исследован недостаточно [6, 29]. Учитывая важную роль спинномозговой жидкости (СМЖ) в центральных механизмах терморегуляции, изменения его химического состава и биологических свойств при действии на организм экстремальных внешних температур, пирогенов, а также сложный характер взаимодействия биогенных аминов и ПГ в регуляции температуры тела [6, 8, 9, 28, 29], представляло интерес провести сравнительное изучение содержания С, Г и ПГЕ<sub>2</sub> в структурах мозга, СМЖ и крови животных при гипертермиях различного происхождения с целью оценки возможной роли этих нейrogормональных соединений в механизме развития гипертермии.

Методика. Опыты проведены на 44 беспородных крыс массой 2,5—3,5 кг и на 36 белых беспородных крысах-самках массой 180—230 г. СМЖ получали у кроликов из большой цистерны мозга через предварительно (за 3—5 дней до опыта) вживленные под гексеналовым

паркозом (50 мг/кг внутривенно) химиотроды [3] или путем субокципитальной пункции под местной новокаиновой анестезией. Вместо взятого объема СМЖ (0,5 мл) животным вводили такой же объем искусственной апиrogenной СМЖ производства "ST. Thomas Hospital" (Англия). У крыс под местной новокаиновой анестезией проводили вентрикулоцистернальную перфузию желудочков мозга искусственной СМЖ [21, 23]. У тех же животных определяли содержание С, Г и ПГЕ<sub>2</sub> в возможных источниках их поступления в СМЖ: в гипоталамусе, общем мозге, венозной крови, полученной из сагиттального синуса, и в смешанной крови, полученной после декапитации животных.

Изучали содержание С, Г (у крыс и кроликов) и ПГЕ<sub>2</sub> (у кроликов) у интактных животных, а также при воздействии на них высокой внешней температуры (45 °С в течение 30 мин для крыс и 50 °С в течение 90 мин для кроликов) или пирогенала (5 минимально пирогенных доз (МПД) на 1 кг массы внутривенно кроликам). Экстракцию биогенных аминов из указанных жидкостей и тканей проводили бутанольно-гептановым методом [20]. Содержание С и Г определяли флуориметрическими методами с использованием ортофталового диальдегида [25, 27]. Флуоресценцию проб измеряли на спектрофлуориметре MRF-2A фирмы «Hitachi» (Япония). Экстракцию ПГ из СМЖ проводили по методу [22]. Содержание ПГЕ<sub>2</sub> определяли с помощью радиоиммунологических наборов фирмы «Clinical Assays» (США) с использованием жидкостного сцинтилляционного счетчика LS-5801 фирмы «Beckman» (США).

Полученные данные обработаны методами вариационной статистики с учетом критериев Стьюдента *t* и *p*.

Результаты и обсуждение. Обнаружено, что характер изменения содержания исследованных веществ в СМЖ при повышении температуры тела животных зависит от вида гипертермии. При перегревании организма, начиная с первых минут действия высокой внешней температуры, содержание С и СМЖ кроликов в отличие от приматов [29] значительно увеличивается по мере повышения температуры тела, и при достижении ректальной температуры 42 °С увеличивается в 16 раз (рис. 1). Еще более резкое увеличение уровня С (в 21,5 раза) наблюдается в перфузате желудочков мозга перегретых до 42 °С крыс (см. таблицу). Одним из источников поступления С в СМЖ, вероятно, является гипоталамус, так как в нем в этих условиях отмечается снижение содержания С на 30 % ( $p < 0,01$ ), в то время как в остальной части мозга крыс он достоверно не изменялся (см. таблицу). Другим важным источником по-

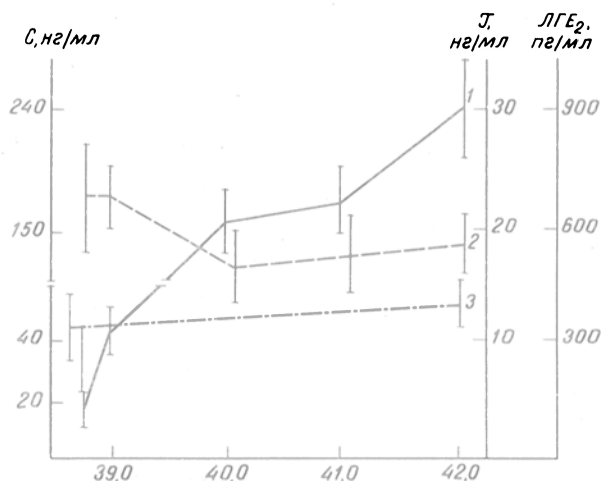


Рис. 1. Содержание С (1), Г (2) и ПГЕ<sub>2</sub> (3) в СМЖ кроликов в процессе их перегревания в термокамере при 50 °С.

По оси абсцисс — ректальная температура тела животных (в °С). Звездочка —  $p < 0,01$  по отношению к исходному содержанию веществ в СМЖ.

Содержание серотонина и гистамина в перфузате желудочков мозга, крови (в нг/мл) и мозге (в нг/г) интактных (К) и перегретых (О) крыс

Объект	Серотонин		Гистамин	
	К	О	К	О
Перфузат желудочков мозга	0,4±0,3	9,1±1,6*	1,3±0,5	1,8±0,2
Венозная кровь	96±9	220±14*	116±12	431±45*
Смешанная кровь	99±8	222±12*	118±13	157±7*
Гипоталамус	1349±97	948±63*	511±43	531±52
Общий мозг без гипоталамуса	605±47	703±44	110±7	130±8

\*  $p < 0,05$  по отношению к контролю.

Примечание. Ректальная температура интактных животных —  $37,0 \pm 0,1$  °С, перегретых —  $42,0 \pm 0,1$  °С.

ступления биоактивных веществ в СМЖ (кроме структур мозга) является кровь. Проведенные опыты показали, что С в крови не является источником увеличения его содержания в СМЖ у перегретых животных, так как повышение содержания и абсолютный уровень данного биогенного амина в смешанной и венозной крови были одинаковыми (см. таблицу). При перегревании животных отмечали значительное повышение содержания Г в крови, особенно в крови, оттекающей от мозга. Известно, что С и Г способны стимулировать функцию ряда желез наружной и внутренней секреции: слюнных, потовых, надпочечников и др. [10, 12], которые играют важную роль в адаптации организма к воздействию высокой температуры [7]. Установлено, что С и Г свойственна антиоксидантная активность [1, 2], а перегревание организма сопровождается активацией процессов свободнорадикального окисления липидов [15], для коррекции которых с успехом применяют  $\alpha$ -токоферол, ионол и другие антиоксиданты [13, 15]. Можно предполагать, что наблюдаемые при перегревании животных изменения содержания и баланса С и Г в жидкостях и тканях можно рассматривать как компенсаторно-приспособительную реакцию, направленную на поддержание температурного гомеостаза организма в изменившихся условиях окружающей среды.

На важную роль биогенных аминов в механизмах поддержания температурного гомеостаза указывают и данные по динамике изменения их содержания в СМЖ животных при пирогеналовой лихорадке. Содержание С в СМЖ кроликов при введении им пирогенала меняется фазно (рис. 2): на высоте повышения температуры тела он не изменяется или даже понижается у части животных, а при нормализации температуры тела значительно повышается. Это согласуется с представлениями о том, что выделение С из гипоталамуса при лихорадке угнетается [19], так как этот нейромедиатор способен восстанавливать измененную под действием пирогенов чувствительность гипоталамуса, повышая активность «тепловых» и угнетая активность «холодовых» нейронов [24] и тем самым стимулируя процессы теплоотдачи [18], угнетать процессы теплопродукции [26]. Об участии С и Г в механизмах терморегуляции как веществ, препятствующих изменению температуры тела при перегревании и лихорадке, свидетельствует и сопоставление активности серотонин- и гистаминерги-

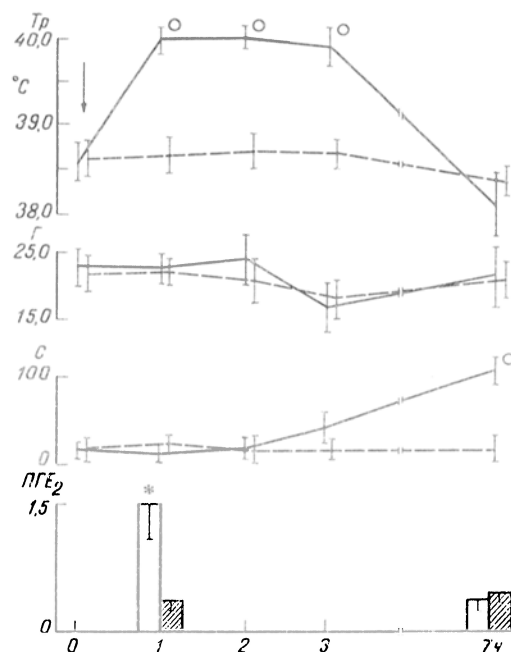


Рис. 2. Изменение ректальной температуры ( $T_r$ , °С), содержания (в нг/мл) С, Г и ПГЕ<sub>2</sub> в СМЖ кроликов после внутривенного введения им пирогенала в дозе 5 МПД/кг или апиригеновой воды для инъекций в дозе 0,5 мл/кг.

Пунктирная кривая и заштрихованный столбик — контроль; сплошная кривая и незаштрихованный столбик — опыт. Стрелкой обозначен момент введения пирогенала или воды для инъекций. Звездочка —  $p < 0,01$  по отношению к контролю; кружок —  $p < 0,01$  по отношению к исходному уровню.

ческих систем в организме с циркадными ритмами температуры тела у людей и у животных [4, 5], а также с изменениями температуры тела при некоторых заболеваниях: бронхиальной астме [14], нарколепсии [5], тиреотоксикозе [11] и др.

Сравнительное изучение изменения содержания ПГЕ<sub>2</sub> в СМЖ кроликов при перегревании и лихорадке показало, что они зависят от вида гипертермии и противоположны таковым для С. При действии высокой внешней температуры содержание ПГЕ<sub>2</sub> в СМЖ не изменялось (см. рис. 1), а на фоне пирогеналовой лихорадки значительно возрастало (см. рис. 2). При нормализации температуры тела через 7 ч после введения пирогенала содержание ПГЕ<sub>2</sub> не отличалось от такового у контрольных животных. Это согласуется с представлениями о роли ПГЕ<sub>2</sub> в развитии гипертермического компонента лихорадочной реакции [6, 17, 28] и указывает на его антагонистические отношения с С в центральных механизмах поддержания температурного гомеостаза организма.

Таким образом, можно предполагать, что С и Г могут выступать у животных и, возможно, у человека как составные части естественной антипиретической системы организма, в то время как ПГЕ<sub>2</sub> является фактором, способствующим повышению температуры тела.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Балаклеевский А. И., Смелюнская Г. Н., Гурло И. Г., Климович В. А. // Всесоюзная конф., посвящ. 85-летию Каштоянца, 4-я: Тезисы докладов.— М., 1985.— Ч. 1.— С. 32.
2. Барабой В. А., Коробова Л. М. // Фармац. журн. УССР.— 1987. № 1.— С. 65—67.

3. *Белявский Е. М.* // Методы исследования теплообмена и теплопродукции.— М., 1968.— С. 46—48.
4. *Вайсфельд И. Л., Ильичева Р. Ф.* // Циркадные ритмы человека и животных.— Фрунзе, 1975.— С. 21—23.
5. *Вейн А. М.* Нарушения сна и бодрствования.— М., 1974.
6. *Гурин В. И.* // Физиология и фармакология терморегуляции.— Минск, 1978.— С. 5—13.
7. *Кардыев К. М.* // Физиология адаптационных процессов.— М., 1986.— С. 303—347.
8. *Кубарко А. И., Переверзев В. А., Муравьев И. В.* // Съезд БФО им. Павлова, 7-й: Тезисы докладов.— Витебск, 1987.— С. 120.
9. *Лупакин Ю. В.* // Физиология терморегуляции.— Л., 1984.— С. 348—377.
10. *Сатоскар Р. С., Бандаркар С. Д.* Фармакология и фармакотерапия: Пер. с англ.— М., 1986.— Т. 1.— С. 523.
11. *Стоилов Л. Д.* // Эндокринология.— 1970.— № 2.— С. 35—39.
12. *Успенский В. И.* Гистамин.— М., 1963.
13. *Харламова А. И., Костюк В. А., Маслова Г. Т.* // Важнейшие теоретические и практические проблемы терморегуляции: Всесоюз. конф.: Тезисы докладов.— Минск, 1986.— С. 299.
14. *Царюк П. Б.* // Теоретические и практические вопросы терморегуляции: Тезисы докладов.— Л., 1974.— С. 146.
15. *Шепелев А. П.* // Вопр. мед. химии.— 1976.— Т. 22, вып. 1.— С. 47—51.
16. *Azmatullah S., Morris I. D.* // Brit. J. Pharmacol.— 1982.— Vol. 17.— P. 452.
17. *Bernheim H. A., Gilbert T. M., Stitt J. T.* // J. Physiol. (Gr. Brit.).— 1980.— Vol. 301.— P. 69—72.
18. *Bligh J., Cottle W. H., Mascrey M.* // J. Physiol. (Gr. Brit.).— 1970.— Vol. 20.— P. 97—102.
19. *Bubuianu Elisabeta, Galasanu Nicolescu Elena, Dimitriu S.* // Arch. Union med. Balkan.— 1974.— Vol. 12, N 1.— P. 92.
20. *Chang C. C.* // Int. J. Neuropharmacol.— 1965.— N 3.— P. 643—649.
21. *Dhumal V. R., Gulati J., Raghunath P. R., Sivaramakrishna N.* // Brit. J. Pharmacol.— 1974.— Vol. 50, N 4.— P. 513—524.
22. *Egg D., Herold M., Rimpl E.* // J. Neurology.— 1980.— Vol. 222, N 4.— P. 239—240.
23. *Gerard J. Boer, Tijtske P. van der Woude, Jenneke Kruisbrink Joop van Heerrikhuizen* // J. Neurosci. Meth.— 1984.— N 11.— P. 281—289.
24. *Hori T., Nakayama T.* // J. Physiol. (Gr. Brit.).— 1973.— Vol. 232, N 1.— P. 71—82.
25. *Kremzner L. T., Willson I. B.* // Biochem. biophys. Acta.— 1961.— Vol. 50.— P. 364—367.
26. *Lin M. T., Wa J. J., Tsay B. L.* // Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.— 1983.— Vol. 53, N 1.— P. 76—83.
27. *Maickel R. P., Cox R. H., Saillant J. J., Miller F. P.* // Int. J. Neuropharmacol.— 1968.— Vol. 7.— P. 275—281.
28. *Milton A. S., Wendlandt Sabine* // J. Physiol. (France).— 1971.— Vol. 63, N 3.— P. 340—342.
29. *Myers R. D.* // J. Physiol. (France).— 1981.— Vol. 77, N 2—3.— P. 505—513.

Поступила 17.05.89

#### ALTERATIONS OF SEROTONIN, HISTAMINE AND PROSTAGLANDIN E<sub>2</sub> CONTENT IN LIQUOR AND TISSUES UNDER HYPERTHERMIC CONDITIONS OF VARIOUS ORIGIN

*A. I. Kubarko, V. A. Pereverzev, A. I. Balakleevsky, N. N. Gomolko*

Medical School, Minsk

Physical hyperthermia caused distinct increase in content of serotonin in liquor and its decrease in hypothalamus of rabbits and rats, while histamine and PGE<sub>2</sub> were unaltered in liquor of these animals. Considerable increase of PGE<sub>2</sub> in liquor simultaneously with unaltered content of serotonin and histamine were detected in rabbits with pyrogenal-caused fever. A decrease in PGE<sub>2</sub> content and elevation of serotonin were found in animals liquor after normalization of body temperature within 7 hrs of the pyrogenal treatment. The biogenic amines studied appear to serve as constituents of the natural antipyretic body system in animals, whereas PGE<sub>2</sub> belongs to factors responsible for elevation of body temperature.

*Е. В. Зубарева, Р. И. Сеферова, Н. А. Денисова*

#### ИЗМЕНЕНИЕ ЛИПИДНОГО СОСТАВА МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ МЕМБРАН ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ КРЫС ПРИ АДАПТАЦИИ К ТЕПЛУ

Институт физиологии и экспериментальной патологии аридной зоны АН Таджикской ССР; Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова АН СССР, Ленинград

Температурные воздействия вызывают развитие адаптационных процессов, позволяющих организму сохранять жизнедеятельность в довольно широком диапазоне температур, далеко от оптимального. Адаптационные реакции захватывают все уровни организации живого, включая молекулярный. Основными молекулами, выполняющими адаптационную функцию, являются фосфолипиды. Именно в них обнаружены самые четкие и совершенные компенсаторные реакции при изменении температуры окружающей среды. «Молекулярное строение фосфолипидов... идеально приспособлено для этих целей, так как позволяет без каких-либо изменений структуры молекулы, ее сложных связей с мембранными белками, лишь заменой входящих в состав липида жирных кислот с присущими им качествами, менять физико-химические свойства липида, позволяет влиять на функциональные характеристики мембран и на условия деятельности мембранных белков...» [1].

К настоящему времени накоплен обширный материал об изменении физико-химических свойств липидов клеточных мембран под влиянием температурных воздействий [1, 3, 5]. Установлено, что вязкость биологической мембраны зависит от многих факторов, прежде всего от фракционного и жирнокислотного состава фосфолипидов и от содержания холестерина. Показателем, в определенной мере характеризующим жидкостные мембраны, является молярное отношение холестерина к фосфолипидам. Увеличение этого показателя свидетельствует о повышении вязкости мембраны [2, 7].

Все адаптационные процессы, происходящие в липидном бислое мембраны, направлены на поддержание определенной жидкостности, что позволяет мембраносвязанным ферментам сохранять активность при различных температурных воздействиях [3, 4, 13]. Сохранение функциональной активности ферментов очень важно для всех биохимических процессов, прежде всего для процессов окислительного фосфорилирования. Компенсаторные изменения в липидном матриксе митохондриальных мембран, основными компонентами которого являются фосфолипиды и холестерин, направлены на сохранение энергетического метаболизма организма при изменении температуры внешней среды.

Цель работы — исследование содержания и состава фосфолипидов и количества холестерина в митохондриальных мембранах внутренних органов животных, адаптированных к высокой температуре.

Методика Тепловую адаптацию проводили в холодное время года в термокамере при  $35 \pm 1$  °C по 3 ч ежеднев-

по в течение 30 дней на белых беспородных крысах массой 170—250 г. Контролем служили интактные животные такой же массы. Митохондрии из печени, почек и миокарда выделяли общепринятым методом в среде, содержащей 0,3 М сахарозы и 10 мМ трис-НСI pH 7,5. Липиды из митохондрий экстрагировали по методу Фолча [8]. Разделение фосфолипидов на индивидуальные фракции проводили методом двухмерной тонкослойной хроматографии на силикагеле марки КСК [10, 12]. Количество фосфолипидов определяли по содержанию общего липидного фосфора [13]. Суммарные фосфолипиды получали одномерной тонкослойной хроматографией в системе гексан — диэтиловый эфир — уксусная кислота (55:19:15). Полученные фосфолипиды подвергали щелочному метилированию [9]. Метилловые эфиры жирных кислот разделяли на газожидкостном хроматографе РУЕ-104 с пламенно-ионизационным детектором, модель 24 (Англия). Разделение вели на полярной фазе — 15 % диэтиленгликольсукцинат полиэфир (ФРГ) при 198—201 °С. Газом-носителем служил аргон со скоростью потока 50 мл/мин. Анализируемые пробы вводили шприцем Гамильтона в объеме 3—4 мкл. Для идентификации использовали хроматограммы стандартных смесей насыщенных, моноеновых и полиеновых кислот с длиной цепи от 10 до 25 атомов углерода. Качественной оценкой содержания каждой кислоты служила площадь соответствующего пика, вычисляемая как произведение высоты пика на его ширину при полувысоте. Содержание отдельных жирных кислот выражали в процентах от суммы. При этом содержание кислоты менее 0,1 % отмечали как следы. Индекс ненасыщенности определяли по сумме произведений процентного содержания отдельных жирных кислот на число двойных связей в их молекуле. Содержание холестерина в липидном экстракте определяли по методу [6]. Пробы фотометрировали на спектрофотометре "Specol II", длина волны 550 им. Количество митохондриального белка определяли по Лоури. Математическую обработку полученных результатов проводили на ЭВМ «Искра-226» по стандартным программам статистического анализа.

**Результаты и обсуждение.** Суммарное содержание фосфолипидов в митохондриях внутренних органов крыс при адаптации к теплу не изменялось, тогда как в их составе отмечались статистически достоверные изменения (табл. 1). Так, в митохондриях сердца возросло содержание фосфатидилсерина и фосфатидилхолин-плазмалогена, а в митохондриях почек увеличилось содержание фосфатидилэтаноламин-плазмалогена. При этом обращает на себя внимание повышение относительного содержания плазмалогенной формы двух основных фракций фосфолипидов (фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина) у адаптированных к теплу животных. Изменение содержания плазмалогенной и

диацильной форм фосфатидилэтаноламина и фосфатидилхолина в зависимости от внешней температуры установлено давно. В литературе имеются сведения о снижении относительного содержания плазмалогенных форм этих фосфолипидов в головном мозге холоднокровных рыб и их увеличении у тепловодных рыб, что рассматривали как один из механизмов адаптации к температурному фактору [1, 11]. Аналогичные данные в отношении млекопитающих нам не известны. Полученные нами результаты позволяют предположить, что этот механизм имеет значение при адаптации к температуре не только у пойкилоtherмов, но и у теплокровных животных.

При исследовании жирнокислотного состава суммарных фосфолипидов выявлено увеличение содержания насыщенных жирных кислот в митохондриях печени у адаптированных к теплу крыс (табл. 2). Увеличение степени насыщенности жирных кислот фосфолипидов при повышении температуры является наиболее характерной реакцией липидов на изменения температуры и рассматривается как фактор, регулирующий жидкость липидного матрикса мембраны [1, 5, 15]. Интересно отметить, что увеличенные количества насыщенных жирных кислот мы обнаружили только в митохондриях печени, где отсутствуют изменения фракционного состава фосфолипидов, тогда как в митохондриях почек и сердца, где выявлено нарастание плазмалогенных форм фосфолипидов, содержание насыщенных жирных кислот не отличается от контрольного уровня. Вместе с тем индекс ненасыщенности жирных кислот снижается в разной степени в митохондриях всех исследованных органов: в митохондриях печени и почек — незначительно, в митохондриях сердца — наиболее существенно. Однонаправленные, но неоднозначные изменения выявлены и при расчете отношения жирных кислот типа  $\omega$ -3 к типу  $\omega$ -6 — оно снижается у адаптированных к теплу животных, однако достоверным это снижение можно считать только в митохондриях сердца. Известно, что кислоты типа  $\omega$ -3 имеют более низкую температуру плавления и снижение их содержания способствует повышению температуры плавления.

Таблица 1

Содержание фосфолипидов в митохондриях внутренних органов адаптированных к теплу крыс (в % от суммы фосфолипидов,  $M \pm m$ )

Фосфолипид	Печень		Почки		Сердце	
	контроль (n=5)	опыт (n=6)	контроль (n=5)	опыт (n=6)	контроль (n=5)	опыт (n=6)
Фосфатидилсерин	2,38±0,46	2,66±0,45	4,86±0,42	5,08±1,01	2,33±0,50	3,54±0,4**
Фосфатидилинозит	6,73±0,32	6,59±0,37	6,35±0,53	7,58±0,81	4,53±0,98	4,46±0,22
Сфингомиелин	3,21±0,50	3,87±0,60	8,99±1,58	7,81±0,28	3,02±0,54	3,75±0,68
Фосфатидилхолин	44,68±0,26	45,05±1,57	36,3±1,04	34,89±1,48	38,79±3,69	35,25±2,01
Фосфатидилхолин-плазмалоген	3,10±1,0	2,91±0,49	3,31±0,38	2,79±0,80	2,06±0,37	4,96±0,85**
Фосфатидилэтаноламин	24,14±1,26	24,43±1,08	23,55±1,39	22,35±1,57	27,99±1,22	23,66±0,84
Фосфатидилэтаноламин-плазмалоген	4,15±0,81	3,39±0,53	5,83±0,42	8,99±0,86**	8,18±0,48	8,08±1,07
Дифосфатидилглицерин	7,69±1,03	6,50±0,88	9,63±0,88	10,78±0,35	10,93±0,90	13,16±0,56
Суммарные фосфолипиды, мкг Р на 1 г влажной массы	748±61	756±59	726±36	784±60	1013±63	1036±72

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3: n — число опытов; в каждый опыт брали митохондрии от 10 крыс. Достоверности отличий: две звездочки —  $p < 0,02$ , три —  $p < 0,01$ .

Жиринокислотный состав фосфолипидов митохондрий внутренних органов адаптированных к теплу крыс (в % от суммы,  $M \pm m$ )

Жирные кислоты	Печень		Почки		Сердце	
	контроль (n=4)	опыт (n=5)	контроль (n=5)	опыт (n=4)	контроль (n=6)	опыт (n=5)
13:0	—	—	0,1	—	—	сл.
14:0	0,2±0,03	0,1	0,1±0,02	0,1	сл.	сл.
15:0	0,2±0,1	0,1	0,3±0,1	0,1	сл.	сл.
16:0	17,0±1,0	17,3±0,9	20,8±0,7	18,1±0,3	15,3±0,8	13,6±0,6
16:1	0,6±0,1	0,4±0,1	0,6±0,04	0,4±0,1*	0,1±0,04	0,1±0,01
17:0	0,4±0,1	—	—	—	сл.	—
17:1	0,1	—	0,2±0,08	—	—	0,2
18:0	31,6±0,7	26,2±0,7*	15,7±1,2	19,2±0,2	24,9±1,2	24,1±0,4
18:1	5,8±0,6	7,3±0,5	13,9±1,3	12,9±0,7	7,5±0,7	7,4±0,4
18:2	11,0±0,6	—	14,5±0,7	15,3±0,2	19,5±1,3	18,7±1,6
18:3	—	—	—	—	0,3	0,2
20:0	—	14,1±0,8	—	—	—	—
20:1	—	—	0,7±0,2	0,3±0,1	—	—
21:1	—	—	1,2±0,3	—	—	—
22:0	2,7±1,3	—	—	—	0,2	—
24:1	0,3	—	—	—	2,0±0,5	1,0
20:3 ω6	—	—	1,1±0,1	1,2±0,2	0,4±0,1	0,2±0,1
20:4 ω3	—	—	—	—	0,2	—
20:4 ω6	28,2±1,1	28,1±0,9	32,7±1,6	31,1±0,2	22,1±2,7	23,5±0,5
22:4 ω6	—	0,1	—	—	1,4±0,1	—
22:5 ω3	0,2	—	0,1	—	1,2±0,06	0,7±0,1
22:6 ω3	5,8±0,3	5,6±0,2	1,6±0,1	1,8±0,3	10,0±0,9	8,2±0,3
24:0	—	—	—	—	—	1,6±0,1
Насыщенные	49,4±1,1	57,5±0,2**	37,3±1,1	37,4±0,4	40,5±1,6	39,29±0,5
Моноеновые	6,4±0,6	7,7±0,5	12,3±1,3	13,4±0,6	8,72±0,8	8,59±0,5
Полиеновые	44,2±1,1	34,8±0,4**	50,4±1,3	49,2±0,3	50,7±2,8	52,09±2,7
ω-3/ω-6	0,22	0,20	0,06	0,05	0,44	0,05
Индекс ненасыщенности	168	154	185	178	206	158

Примечание. Одна звездочка —  $p < 0,01$ , две —  $p < 0,001$ .

Данные о содержании холестерина в митохондриальных мембранах внутренних органов адаптированных к теплу животных приведены в табл. 3, из которой видно, что количество холестерина и молярное отношение холестерина к фосфолипидам в митохондриальных мембранах печени, почек и сердца крыс при адаптации к теплу имеют тенденцию к увеличению, однако выявленные различия статистически недостоверны.

Ряд авторов, изучавших влияние изменений температуры на соотношение холестерина и фосфолипидов, выявили увеличение этого показателя при повышении температуры окружающей среды [2, 7] и снижение его при холодовой адаптации [14].

Таким образом, при адаптации крыс к теплу в митохондриальных мембранах увеличивалось содержание плазмалогенных форм фосфолипидов (почки, сердце) и количество насыщенных жирных кислот (печень), снижался индекс ненасыщенности жирных кислот и отношение жирных кислот типа ω-3 к типу ω-6 (сердце). Очевидно, выявленные изменения носят адаптационный характер и предохраняют мембраны от

чрезмерной жидкости, что необходимо для сохранения функциональной активности митохондрий исследованных органов в условиях тепловой нагрузки на организм.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Krens E. M. Липиды клеточных мембран.— Л., 1981.
2. Ревин В. В., Лилыкин Ю. К., Кадималиев Д. А. и др. // Науч. докл. высш. школы. Биол. науки.— 1987.— № 2.— С. 51—54.
3. Cossins A. R. // J. therm. Biol.— 1983.— Vol. 8, N 4.— P. 433—434.
4. Cossins A. R., Bowler R., Prosser C. L. // Ibid.— 1981.— Vol. 6, N 4.— P. 183—187.
5. Cossins A. R., Prosser C. L. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1983.— Vol. 75, N 4.— P. 2040—2048.
6. Courhaine A. I., Miller W. H., Stein D. B. // J. clin. Chem.— 1959.— Vol. 5, N 6.— P. 609—614.
7. Dawner R. G. H., Kallapur V. L. // J. therm. Biol.— 1981.— Vol. 6, N 3.— P. 189—194.
8. Folch J., Lees M., Stanley G. H. // J. biol. Chem.— 1957.— Vol. 226, N 1.— P. 497—509.
9. Foote J. I., Allen R. J., Agranoff B. W. // J. Lipid Res.— 1965.— Vol. 6, N 4.— P. 518—524.
10. Horrocks I. A., Sun G. J. // Research Methods in Neurochemistry.— New York, 1972.— Vol. 1.— P. 223—231.
11. Johnston P. V., Roots B. I. // Comp. Biochem. Physiol.— 1964.— Vol. 11.— P. 303—309.

Т а б л и ц а 3

Содержание холестерина в митохондриях органов адаптированных к теплу крыс ( $M \pm m$ )

Показатель	Печень		Почки		Сердце	
	контроль (n=5)	опыт (n=6)	контроль (n=5)	опыт (n=6)	контроль (n=5)	опыт (n=6)
Содержание холестерина:	14,58±3,35	16,09±4,24	18,14±2,33	20,04±2,19	10,84±0,96	12,34±4,02
в мг на 1 мг белка	1,37±0,19	1,54±0,38	1,82±0,15	2,07±0,28	1,41±0,15	1,56±0,51
в мг на 1 г влажной массы	0,15	0,17	0,21	0,22	0,11	0,12
Молярное отношение холестерин/фосфолипиды	—	—	—	—	—	—

12. Rouser G., Siakotos A. N., Fleisher S. // Lipids.— 1966.— Vol. 1, N 1.— P. 83—96.
13. Vaskovsky V. E., Kostelsky E. Y., Vasendin I. M. // J. chromatogr.— 1975.— Vol. 114, N 1.— P. 129—141.
14. Wodtke E. // J. therm. Biol.— 1983.— Vol. 8, N 4.— P. 465—466.
15. Wodtke E., Schunke M. // Ibid.— P. 421—423.

Поступила 26.07.89

## ALTERATION OF LIPID COMPOSITION IN MITOCHONDRIAL MEMBRANES OF RAT INNER TISSUES DURING ADAPTATION TO HEATING

E. V. Zubareva, R. I. Seferova, N. A. Denisova

Institute of Physiology and Experimental Pathology of Arid Region, Academy of Sciences of the Turkmen SSR, Ashkhabad, I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Leningrad

Under conditions of adaptation to heating lipid composition in mitochondrial membranes of rat inner tissues was altered as follows: an increase in relative concentration of plasmalogenous forms of phospholipids (kidney, heart) and in content of saturated fatty acids (liver tissue), a decrease in the index of fatty acids unsaturation and in the ratio of fatty acids  $\omega$ -3/ $\omega$ -6. The alterations observed enabled the membranes to keep sufficient amount of liquidity essential for functional activity of mitochondria in heating.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616.36/366-036.12-092:616.36-008.931:577.152.11

А. С. Логинов, Б. Н. Матюшин, В. Д. Ткачев

## ЭНЗИМНАЯ СИСТЕМА ДИСМУТАЦИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА ПЕЧЕНИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПОРАЖЕНИИ ГЕПАТОБИЛИАРНОЙ СИСТЕМЫ

ЦНИИ гастроэнтерологии, Москва

Биоэнергетический обмен и проявление токсического действия кислорода связано с его активацией [20]. Активными формами кислорода являются супероксидный анион ( $O_2^-$ ), перекись водорода ( $H_2O_2$ ), гидроксильный радикал ( $OH^\cdot$ ) и синглетный кислород ( $^1O_2$ ). При одноэлектронном восстановлении молекулярного кислорода образуется супероксид. При дисмутации пероксида, а также в процессе тканевого дыхания и микросомального окисления образуется гидперекись, обладающая токсическими свойствами [7, 11]. Супероксидный анион, взаимодействуя с перекисью водорода, превращается в высокорезактивный гидроксильный радикал [13]. Синглетный кислород образуется из супероксида при его спонтанной дисмутации или реакции с гидроксидом [14]. Токсическое действие радикалов кислорода (прямое или опосредованное через пероксидацию липидов) вызывает повреждение мембран, деструкцию белков и инактивацию ферментов [12]. Клеточные механизмы защиты от реактивных форм кислорода и продуктов перекисного окисления липидов представляют комплекс систем, включающих энзимы перехвата свободных радикалов, природные антиоксиданты, прерывающие реакции свободнорадикального окисления, а также контроль концентрации металлов, проявляющих активность в качестве катализаторов пероксидации [20].

Супероксиддисмутаза (СОД, КФ 1.15.1.1) объединяет группу энзимов, содержащих металлы переменной валентности (Cu, Zn или Mn), и катализирует цикл взаимодействия двух супероксидных анионов с образованием молекулярного кислорода и перекиси водорода. Гидроперекиси расщепляются каталазой (КФ 1.11.1.6) или путем пероксидазной реакции в присутствии донора водорода — НАДФ·Н-пероксидазы (КФ 1.11.1.2) и глутатионпероксидазы (КФ 1.11.1.9).

Полагают, что ряд патологических состояний (воспаление, аутоиммунные болезни, действие ксенобиотиков, поражение печени этанолом и другими гепатотоксическими соединениями) зависит от влияния реактивных интермедиатов кислорода и других свободных радикалов [5, 8—10, 20]. Ранее нами была показана роль пероксидации для выявления острого нарушения липидного обмена, связанного с развитием хронизации патологического процесса и трансформацией жировой дистрофии печени в цирроз [4]. Установлено значение переокисления липидов при алкогольном поражении печени [3]. В настоящем сообщении представлены данные по функциональному статусу СОД и других энзимов антиоксидантной защиты в аспекте регуляции реакций свободнорадикального окисления при хронических заболеваниях печени.

**Методика.** Обследовано 49 больных в условиях стационара, включая морфологический анализ материала пункционной биопсии печени в сопоставлении с данными клинического, инструментального и биохимического исследования. Из части биоптата (10—20 мг) был получен, как описано [4], гомогенат, который центрифугировали 15 мин при 10 000 g. В надосадочной жидкости определяли энзимы, инактивирующие восстановленные формы кислорода. Дисмутацию супероксидных радикалов определяли спектрофотометрически по ингибированию скорости восстановления нитросинего тетразолия в присутствии феназинметасульфата и пикотициамидного кофермента [18]. Активность СОД выражали в условных единицах [17] в расчете на 1 мг белка и 1 г ткани. Об активности каталазы судили по расщеплению перекиси водорода (мкмоль/мин на 1 мг белка и 1 г ткани) [16]. НАДФ·Н-пероксидазную реакцию проводили в среде инкубации [19], в которой донор водорода глутатион заменен НАДФ·Н, по убыви которого [1] (в мкмоль на 1 мг белка и 1 г ткани) оценивали энзиматическую активность. Одновременно проводили контроль пероксидации липидов по окислению НАДФ·Н [6, 9] с искусственным акцептором электронов — феррицианидом калия и выражали в мкмоль  $K_3Fe(CN)_6$ , восстановленного за 1 мин в пересчете на 1 мг белка и 1 г ткани [2]. Содержание белка определяли с реактивом Фолина [15]. Статистическую обработку полученных результатов проводили параметрическим методом с применением критерия Стьюдента.

**Результаты и обсуждение.** Группы больных, их количественный состав и сводные данные, полученные при исследовании энзимной системы дисмутации активных форм кислорода, представлены в таблице. Корреляционный анализ рядов показателей, отличающихся способом выражения активности одного и того же энзима, выявил сильную степень связи ( $r=0,53—0,97$ ) для СОД, каталазы и НАДФ·Н-пероксидазы в группах больных с жировой дистрофией печени, хроническим активным гепатитом (ХАГ) и первичным билиарным циррозом (ПБЦ). При этом более низкая достоверность отмечена при ПБЦ, что связано с ростом вариабельности полученных данных и, вероятно, обусловлено уменьшением содержания функционально активных белков-ферментов отно-

	СОД		Каталаза		НАДФ·Н-пероксидаза		НАДФ·Н-феррицианидредуктаза	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Жировая дистрофия печени ( $n=11$ )	$19,6 \pm 1,4$ $r=+0,97^{*4}$	$333 \pm 22$	$83,1 \pm 3,2$ $r=+0,81^{*4}$	$1,15 \pm 0,05$	$0,205 \pm 0,020$ $r=+0,93^{***}$	$3,59 \pm 0,36$	$135 \pm 5,9$ $r=+0,63$	$4,70 \pm 0,22$
Хронический активный гепатит ( $n=17$ )	$16,2 \pm 0,99^{*}$ $r=+0,87^{*4}$	$298 \pm 20$	$73,8 \pm 2,2^{*}$ $r=+0,63^{*}$	$1,35 \pm 0,04$	$0,241 \pm 0,023$ $r=+0,94^{***}$	$4,34 \pm 0,43$	$124 \pm 6,0$ $r=+0,68^{**}$	$4,40 \pm 0,13$
Хронический перенстирующий гепатит ( $n=6$ )	$16,1 \pm 1,2$	$291 \pm 23$	$80,1 \pm 2,4$	$1,46 \pm 0,06$	$0,235 \pm 0,045^{***}$	$4,29 \pm 0,81$	$105 \pm 4,3$	$3,83 \pm 0,14$
Цирроз печени ( $n=4$ )	$15,7 \pm 3,8$	$260 \pm 51$	$64,7 \pm 12,6$	$1,05 \pm 0,16$	$0,291 \pm 0,075$	$4,89 \pm 1,26$	$139 \pm 17$	$4,53 \pm 0,41$
Первичный билиарный цирроз ( $n=11$ )	$14,7 \pm 1,1^{*}$ $r=+0,89^{**4}$	$255 \pm 28^{*}$	$57,9 \pm 2,8^{*4}$ $r=+0,75^{*}$	$1,04 \pm 0,09^{***}$	$0,295 \pm 0,027^{*}$ $r=+0,83^{***}$	$5,06 \pm 0,19^{*}$	$120 \pm 3,9$ $r=+0,53$	$4,25 \pm 0,32$

Примечание. Активность энзимов под цифрой 1: СОД в усл. ед. на 1 мг белка, остальные показатели — в мкмоль/мин на 1 мг белка; под цифрой 2: СОД — в усл. ед. на 1 г ткани, каталаза и НАДФ·Н-редуктаза — в мкмоль/мин на 1 г ткани и НАДФ·Н-пероксидаза — в мкмоль/мин на 1 г ткани. Звездочки при  $r$  — достоверность различий относительно жировой дистрофии печени: одна —  $p < 0,05$ , две —  $p < 0,02$ , три —  $p < 0,01$ , четыре —  $p < 0,001$ .

сительно массы ткани. Таким образом, оправдано применение обеих единиц измерения активности (на 1 мг белка и на 1 г ткани) энзимов, поскольку степень корреляции между ними достаточно высокая. Тем не менее более надежной оценкой является расчет на белок, поскольку достоверность различий между группами проявлялась, как правило, при выражении активности с учетом содержания белка.

Результаты, полученные по нозологическим формам, сопоставлены с показателями, найденными при жировой дистрофии печени, так как степень поражения в этой группе наиболее низкая.

У больных с жировой дистрофией печени отмечена высокая активность СОД и каталазы, что свидетельствует о значительном потенциале кислородной системы утилизации активных форм кислорода и сопряженности дисмутазной и каталазной реакции. Корреляционный анализ между показателями СОД и каталазы выявил их однонаправленный характер зависимости ( $r=+0,45$ ). Показана низкая НАДФ·Н-пероксидазная активность, которая обусловлена, вероятно, реципрокным отношением к каталазе ( $r=-0,53$ ) и эффективным действием СОД и каталазы — ключевых энзимов антиоксидантной защиты. НАДФ·Н-зависимое восстановление феррицианида имело тенденцию к увеличению, что соответствует данным о нарастании явлений перекисидации у больных с жировой дистрофией печени и признаками фиброза [4].

В группе больных хроническим активным гепатитом отмечено падение активности основных энзимов, инактивирующих реактивные интермедиаты кислорода. Снизилась супероксиддисмутазная и каталазная активность (17,4 и 11,2 % соответственно), т. е. ослабевает энзимная защита клетки от реакций свободнорадикального окисления в условиях выраженной активности патологического процесса. В связи с этим можно отметить появление дисбаланса между энзимами антиоксидантного действия как системы защиты, что проявилось в резком снижении коэффициента корреляции между показателями СОД и каталазы ( $r=+0,14$ ), а также каталазы и НАДФ·Н-пероксидазы ( $r=-0,17$ ).

Близкие изменения в сравнении с ХАГ получены в группе больных хроническим перенстирующим гепатитом. Недостоверный характер сдвигов вызван скорее всего ограниченным объемом выборки исследованного материала ( $n=6$ ). Статистически значимое увеличение НАДФ·Н-зависимого распада гидроперекиси в этих условиях имеет, вероятно, компенсаторное значение.

Значительные изменения в системе антиоксидантной защиты выявлены у больных циррозом. При первичном билиарном циррозе отмечен достоверный сдвиг активности всех изученных энзимов, участвующих в превращении реакционноспособных интермедиатов кислорода. Снизилась скорость ингибирования генерации супероксидных радикалов (25 %), распада перекиси водорода (30,3 %) и окисления НАДФ·Н в присутствии феррицианида. Противоположный эффект получен для пероксидазной реакции (прирост 43,9 %). Корреляционный анализ позволяет сделать заключение о нарушении взаимосвязи в системе антиоксидантных энзимов. Так, между каталазой и



НАДФ·Н-пероксидазой установлена прямая зависимость умеренной степени ( $r=+0,45$ ) в противоположность реципрокному отношению при жировой дистрофии печени. Изменилась направленность связи между СОД и НАДФ·Н-феррицианидредуктазой. В целом это свидетельствует о нарушении механизма энзимной регуляции реакций свободнорадикального окисления в условиях деструкции клеток паренхимы, нарастания явления холестаза и формирования соединительной ткани.

Обращает внимание степень варьирования параметров активности энзимов антиокислительного действия в зависимости от тяжести патологического процесса. Расчет коэффициентов вариации показал, что энзимы печени при хроническом поражении гепатобилиарной системы проявляют пластичность, а изменение их активности составляет 12—43 %. Относительно более жесткие показатели получены для каталазы, далее следуют СОД и НАДФ·Н-пероксидаза (коэффициенты вариации равны 12—16, 25—29 и 31—43 % соответственно). Примечательно, что вариабельность показателей зависит от степени хронизации патологического процесса: для СОД и каталазы меньшая изменчивость активности отмечена при жировой дистрофии, увеличилась вариабельность при ХАГ и особенно при ПБЦ. Для НАДФ·Н-пероксидазы максимальная вариабельность выявлена в группе больных ХАГ. Следовательно, увеличение вариабельности параметров активности энзимов дисмутации активного кислорода соответствует нарастанию процесса трансформации жировой дистрофии печени в цирроз.

Таким образом, при хронических болезнях печени нарушается процесс энзимной инактивации супероксидных радикалов. Более выраженные изменения выявлены при первичном билиарном циррозе, т. е. при глубоком поражении ткани печени. При прогрессировании патологического процесса увеличивается вариабельность показателей активности и разобщается взаимодействие антиокислительных энзимов как системы антиоксидантной защиты. Реципрокные отношения между СОД и НАДФ·Н-редуктазой при жировой дистрофии печени принимают противоположный характер при ХАГ и ПБЦ, что указывает на ослабление энзиматического контроля за развитием реакций свободнорадикального типа.

Выявленное снижение активности энзимов антиоксидантной защиты соответствует степени хронического поражения печени и способствует образованию реактивных интермедиатов кислорода, свободнорадикальному окислению, что может быть причиной деструктивных изменений.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Асатиани В. С. Ферментные методы анализа.— М., 1969.
2. Карузина И. И., Арчаков А. И. // Современные методы в биохимии.— М., 1977.— С. 57—58.
3. Логинов А. С., Магюшин Б. Н., Джалалов К. Д. // Клин. мед.— 1987.— № 2.— С. 114—117.
4. Логинов А. С., Магюшин Б. Н., Ткачев В. Д., Павлова Н. М. // Тер. арх.— 1985.— № 2.— С. 63—67.
5. Магюшин Б. Н., Логинов А. С., Лушва Л. Х. и др. // Бюл. экспер. биол.— 1983.— № 2.— С. 53—54.
6. Магюшин Б. Н., Логинов А. С., Ткачев В. Д. // Пат. физиол.— 1987.— № 3.— С. 73—75.

7. Bast A. // Trends Pharmacol. Sci.— 1986.— Vol. 7.— P. 266—270.
8. DiLuzio N. R., Kalish G. H. // Gastroenterology.— 1966.— Vol. 50.— P. 392—393.
9. Ernster L. // Chem. Scr.— 1986.— Vol. 26.— P. 525—534.
10. Fantone J. C., Ward P. A. // Amer. J. Path.— 1982.— Vol. 107.— P. 397—418.
11. Fridovich I. // Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.— 1983.— Vol. 23.— P. 239—257.
12. Halliwell B. // Med. Lab. Sci.— 1984.— Vol. 41.— P. 157—171.
13. Halliwell B., Gutteridge J. M. C. // Biochem. J.— 1984.— Vol. 219.— P. 1—14.
14. Kappus H. // Arch. Toxicol.— 1987.— Vol. 60.— P. 144—149.
15. Lowry O. et al. // J. Biol. Chem.— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
16. Marklund S. et al. // J. Gerontol.— 1981.— Vol. 36.— P. 405.
17. McCord J. M., Fridovich I. // J. Biol. Chem.— 1969.— Vol. 244.— P. 6049—6055.
18. Nishikimi M., Rao N. A., Yagi K. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1975.— Vol. 46.— P. 849.
19. Pinto R., Barley W. // Biochem. J.— 1969.— Vol. 112.— P. 109—115.
20. Ursini F. // International Workshop on oxygen free radicals in shock.— Florence, 1985.— P. 9—14.

Получила 07.06.89

#### THE ENZYMIC SYSTEM FOR DISMUTATION OF OXYGEN ACTIVE FORMS IN CHRONIC IMPAIRMENT OF HEPATOBILIARY SYSTEM

A. S. Loginov, B. N. Matyushin, V. D. Tkachev

Central Institute of Gastroenterology, Moscow

A decrease in activity of main enzymes responsible for inactivation of reactive intermediates of oxygen was found in patients with chronic impairments of liver tissue. In chronic active hepatitis superoxide dismutase and catalase activities were decreased, while more pronounced alterations in the enzymatic activity were observed in primary biliary cirrhosis. Alterations in the rate of antioxidation enzymes activity correlated with severity of pathological process: less distinct alterations in superoxide dismutase and catalase activities were detected in adipose degeneration of liver tissue as compared with those in active chronic hepatitis, and, especially, in primary biliary cirrhosis. The data obtained by means of correlation analysis suggest that interrelationship of the antioxidation system components was deteriorated. The decrease in activity of these enzymes appears to be related to destructive alterations developed in chronic impairments of liver tissue.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616.36-002-022.7:578.891]-079.4:616.361-007-07:[616.153.1]+  
+616.36-008.831]:577.152.313]-074

М. А. Андрейчин, М. А. Погорела, Н. А. Васильева,  
Б. З. Шенкман

#### ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ $\gamma$ -ГЛУТАМИЛТРАНСПЕПТИДАЗЫ И ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И ЖЕЛЧИ ПРИ ВИРУСНОМ ГЕПАТИТЕ В И ВОСПАЛЕНИИ ЖЕЛЧНЫХ ПУТЕЙ

Тернопольский медицинский институт, Саратовский медицинский институт

Дифференциальная диагностика вирусных гепатитов и воспалительных заболеваний желчных протоков и пузыря представляет большие трудности. Научный поиск в этой области традиционно ведется в направлении исследования биохимиче-

ских показателей крови и их динамики. Это вызвано тем, что изменения многих компонентов крови тесно связаны с морфофункциональным состоянием печени [1, 10, 15, 18]. Кроме того, практически не существует затруднений в получении необходимого объема крови для исследования.

При сочетании вирусного гепатита с воспалением желчных путей диагностика часто затруднена из-за маловыраженной симптоматики холецистохолангита и, как правило, требует дополнительного лабораторного исследования. Ценную информацию можно получить при определении химического состава желчи, в частности содержания в ней экскреторных ферментов [6, 13].

Целью работы было улучшение диагностики острой формы вирусного гепатита В (ВГВ) с сопутствующим воспалением желчных путей при помощи определения активности  $\gamma$ -глутамилтранспептидазы (ГГТП) и щелочной фосфатазы (ЩФ) в сыворотке крови и желчи больных.

**Методика.** Наблюдала 85 больных с заболеваниями печени и желчных путей. У 56 больных была желтушная форма ВГВ со среднетяжелым и тяжелым течением, из них у 17 в сочетании с хроническим холециститом и у 19 — с холецистохолангитом. Контрольную группу составили 16 больных хроническим холециститом и 13 — хроническим холецистохолангитом. Диагноз ВГВ устанавливали на основании типичной клинической картины, данных биохимического и иммунологического исследований; у всех больных был выражен цитолитический синдром (высокая активность аланинаминотрансферазы в сыворотке крови), обнаружены HBsAg, HBeAg или антитела к ним. Холецистохолангит диагностировали при выявлении соответствующих объективных данных — пузырных симптомов, лихорадочной реакции, воспалительных изменений крови, лейкоцитов в слизи и эпителии желчных протоков и пузыря в порциях желчи при фазово-контрастной микроскопии, низкого холато-холестеринового коэффициента желчи, характерных термограмм и ультразвуковых сканограмм (аппараты «Рубин-2» и «Sal-32B» фирмы «Toshiba»).

Активность ферментов определяли в сыворотке крови и желчи, полученной методом фракционного дуоденального зондирования в период ранней реконвалесценции, спектрофотометрическим способом с помощью стандартных наборов «Lachema» (Чехословакия): ГГТП — по переносу  $\gamma$ -глутамилового остатка на дипептидный акцептор, в результате чего освобождается *p*-нитроанилин [24], ЩФ — по расщеплению 4-нитрофенилфосфата до 4-нитрофенола и ортофосфата [20].

Для определения ЩФ в желчи последнюю предварительно разводили в 5 раз.

За нормальные показатели приняты результаты определения активности ферментов у практически здоровых лиц (у 30 в сыворотке крови, у 9 в желчи).

**Результаты и обсуждение.** В разгар желтушного периода ВГВ (см. таблицу) у всех больных активность ГГТП и ЩФ сыворотки крови была выше, чем у здоровых лиц ( $p < 0,001$ ). Степень повышения не зависела от тяжести течения ВГВ и наличия сопутствующих воспалительных заболеваний желчных путей. У больных хроническим холецистохолангитом без ВГВ активность исследованных ферментов также была повышена, но в значительно меньшей степени. Так, кратность увеличения у больных ВГВ и у больных хроническим холецистохолангитом по сравнению с нормой составила соответственно для ГГТП 12,5 и 6,5 раза, для ЩФ 3,2 и 1,6 раза. Сходные данные при изучении активности указанных ферментов в сыворотке крови получены и другими авторами [2, 3, 8, 9, 17, 18].

Показатели активности каждого экскреторного фермента в пузырной и печеночной порциях желчи у здоровых лиц были одинаковыми, несмотря на разницу в ее концентрации. При этом активность ЩФ была выше, чем активность ГГТП. Активность обоих ферментов у больных ВГВ в желчи не отличалась от таковой у здоровых лиц.

При сочетании ВГВ с хроническим холециститом активность ГГТП в пузырной порции была повышена у всех больных, активность ЩФ — у 12 из 17 при нормальных показателях их в печеночной порции желчи. В среднем активность ГГТП составила  $182,6 \pm 21,7$  Е/л, ЩФ —  $658,1 \pm 115,3$  Е/л ( $p < 0,05 - 0,01$ ), кратность повышения — соответственно 1,6 и 2,7 раза по сравнению с больными ВГВ без поражения желчных путей.

В группе больных ВГВ с сопутствующим хроническим холецистохолангитом активность ГГТП увеличивалась в обеих порциях желчи у 13 из 15 и ЩФ — у 15 из 19; кратность увеличения

**Активность (в Е/л) ГГТП и ЩФ в сыворотке крови и желчи у обследованных больных**

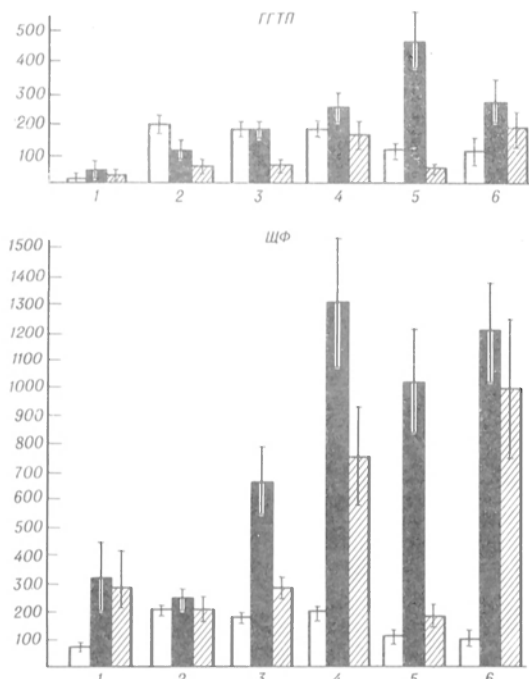
Диагноз	ГГТП			ЩФ		
	пузырная порция желчи	печеночная порция желчи	сыворотка крови	пузырная порция желчи	печеночная порция желчи	сыворотка крови
Хронический холецистит ( $n=16$ )	$475,1 \pm 91,0$	$44,3 \pm 9,7$	$104,2 \pm 25,3$	$1022,5 \pm 219,4$	$190,2 \pm 37,5$	$107,7 \pm 22,7$
$p_1$	$<0,001$	$>0,05$	$<0,001$	$<0,01$	$>0,05$	$>0,05$
$p_2$	$<0,001$	$>0,05$	$<0,05$	$<0,001$	$>0,05$	$<0,001$
Хронический холецистохолангит ( $n=13$ )	$317,5 \pm 73,1$	$179,8 \pm 59,6$	$100,7 \pm 44,2$	$1202,6 \pm 183,2$	$1086,8 \pm 230,1$	$99,0 \pm 14,9$
$p_1$	$<0,001$	$<0,05$	$<0,001$	$<0,001$	$<0,05$	$<0,05$
$p_2$	$<0,01$	$<0,05$	$>0,05$	$<0,001$	$<0,001$	$<0,001$
Острый ВГВ и хронический холецистит ( $n=17$ )	$182,6 \pm 21,7$	$58,9 \pm 13,3$	$182,3 \pm 18,5$	$658,1 \pm 115,3$	$290,1 \pm 41,3$	$181,8 \pm 12,6$
$p_1$	$<0,01$	$>0,05$	$<0,001$	$<0,05$	$>0,05$	$<0,001$
$p_2$	$<0,05$	$>0,05$	$>0,05$	$<0,01$	$>0,05$	$>0,05$
Острый ВГВ и хронический холецистохолангит ( $n=19$ )	$295,8 \pm 55,4$	$160,9 \pm 49,9$	$177,4 \pm 23,5$	$1307,5 \pm 226,8$	$748,1 \pm 166,0$	$198,7 \pm 22,7$
$p_1$	$<0,001$	$<0,01$	$<0,001$	$<0,001$	$<0,05$	$<0,001$
$p_2$	$<0,01$	$<0,05$	$>0,05$	$<0,001$	$<0,01$	$>0,05$
Острый ВГВ без поражения желчных путей ( $n=20$ )	$113,8 \pm 26,0$	$50,6 \pm 13,4$	$197,1 \pm 25,4$	$247,5 \pm 41,8$	$208,2 \pm 47,6$	$205,8 \pm 12,7$
$p_1$	$<0,001$	$>0,05$	$<0,001$	$>0,05$	$>0,05$	$<0,001$
Здоровые лица (контроль; $n=9$ )	$<45,8 \pm 27,2$	$27,4 \pm 6,3$	$15,9 \pm 4,4$	$319,8 \pm 134,6$	$286,5 \pm 129,5$	$57,2 \pm 5,0$

**П р и м е ч а н и е.**  $n$  — число обследованных,  $p_1$  — достоверность различий по сравнению со здоровыми,  $p_2$  — с больными острым вирусным гепатитом без поражения желчных путей.

по сравнению с больными ВГВ без поражения желчных путей составила для ГГТП 3,6 и 3,2 раза соответственно в пузырной и печеночной порциях, для ЩФ — 5,3 и 3,6 раза. У больных хроническим холециститом без ВГВ отмечена высокая активность ферментов только в пузырной порции желчи, у больных холецистохолангитом — в обеих порциях ( $p < 0,01 - 0,001$ ). Эти показатели активности не отличались от таковых при вирусном гепатите микст и значительно превышали уровень активности у больных ВГВ и здоровых. Энзимологические показатели желчи у больных хроническим калькулезным и некалькулезным холециститом не различались.

При изучении ряда цитоплазматических, митохондриальных и экскреторных ферментов (в том числе ГГТП) у крыс, отравленных четыреххлористым углеродом, выявлено повышение их активности в желчи. Сроки изменения показателей биохимического состава желчи, в том числе исследованных ферментов, и сыворотки крови, по данным разных авторов [4, 21, 23], не совпадают. Имеются сообщения об информативности ферментных тестов желчи при хронических гепатитах и холецистохолангитах [14, 15], однако у ряда больных заметных различий в активности ЩФ не обнаружено [12].

Лишь у 42 % больных вирусным гепатитом с сопутствующим хроническим холецистохолангитом обнаружено повышенное количество эпителия желчного пузыря и протоков в порциях желчи. Между тем активность ГГТП желчи была повышена у 94 % обследованных. Воспаление желчного пузыря было подтверждено результатами дополнительных исследований (термография, ультразвуковое сканирование). Поэтому можно считать, что предложенный метод более чувствителен.



Активность (в Е/л) ферментов сыворотки крови и желчи при заболеваниях гепатобилиарной системы.

Светлые столбики — кровь, темные — пузырная желчь, заштрихованные — печеночная желчь, 1 — контроль, 2 — острый ВГВ, 3 — острый ВГВ с сопутствующим хроническим холециститом, 4 — острый ВГВ с сопутствующим хроническим холецистохолангитом, 5 — хронический холецистит, 6 — хронический холецистохолангит.

Сопоставление активности исследованных ферментов в сыворотке крови и желчи (см. рисунок) показывает, что ГГТП и ЩФ желчи более точно отражают наличие воспаления желчных путей, а также его локализацию.

ГГТП и ЩФ, по-видимому, попадают в желчь из эпителия протоков и пузыря [5, 22, 25]. Повышение их активности в порциях желчи при наличии холецистохолангита отражает топографию процесса. При этом поражение печеночных клеток непосредственно на содержание экскреторных ферментов, вероятно, не влияет.

Сопоставление активности изучаемых ферментов в сыворотке крови и желчи увеличивает информативность энзимологического исследования и позволяет, с одной стороны, провести дифференциальную диагностику между хроническим холецистохолангитом (по сыворотке крови), а с другой — выявить воспаление желчных путей на фоне вирусного гепатита (по ферментам желчи).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Авдей Л. В., Раццкая И. Т., Витько И. М. // Вестн. хир. — 1976. — Т. 117, № 1. — С. 35—41.
2. Брагинский Д. М., Пакторис Е. А., Синайко Г. А., Шахгильдия И. В. // Клини. мед. — 1981. — № 1. — С. 73—76.
3. Бунин К. В., Буробин В. А., Касимовский А. Б., Пономаренко О. В. // Сов. мед. — 1983. — № 11. — С. 17—19.
4. Вавилова Т. П., Лемнина Л. М. // Результаты клинических и экспериментальных исследований. — М., 1973. — С. 48—50.
5. Видакинсон Д. Принципы и методы диагностической энзимологии: Пер. с англ. — М., 1981.
6. Громашевская Л. Л. // Новое в лабораторной диагностике хронических болезней внутренних органов. — Ужгород, 1983. — С. 103—103.
7. Епихин П. В., Вавилова Т. П. // Актуальные проблемы патологии и хирургии желчевыводящих путей. — Свердловск, 1976. — С. 53—54.
8. Карлинский В. М., Богомолова Г. Г., Гарина Е. Г. // Здравоохран. Казахстана. — 1983. — № 11. — С. 40—44.
9. Карлинский В. М., Баранов П. П. // Клини. мед. — 1984. — № 5. — С. 66—70.
10. Крекнин А. Ф., Ярошевская И. П., Воробьева Е. Г. // Гастроэнтерология. — Киев, 1985. — Вып. 17. — С. 46—48.
11. Петрашенич П., Захарова Е. // Всероссийская конференция студенческого науч. о-ва: Тезисы докладов. — М., 1976. — С. 42—43.
12. Савельева Л. А., Дроздова Г. А., Котова Т. Г. и др. // Сов. мед. — 1982. — № 3. — С. 35—38.
13. Синицына П. М. // Гастроэнтерология-78. — Вильнюс, 1978. — С. 225—227.
14. Синицына П. М. Клинико-диагностическое значение изменения состава желчи при хронических заболеваниях печени и желчевыводящих путей: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Ганкент, 1983.
15. Скуя П. А. // Изв. АН Латв. ССР. — 1960. — № 8. — С. 139—144.
16. Сперанский М. Д., Лебедева Е. П., Алексеев В. Ф. // Заболевания печени и желчевыводящих путей. — М., 1982. — С. 112—116.
17. Сухотерина Л. А. // Мед. журн. Узбекистана. — 1982. — № 1. — С. 27—30.
18. Терлецкая Л. М. // Врач. дело. — 1983. — № 3. — С. 27—30.
19. Цыркина А. С. // Лаб. дело. — 1982. — № 6. — С. 53—56.
20. Bessey O. A., Lowry O. H., Brock M. J. // J. biol. Chem. — 1948. — Vol. 164. — P. 321—321.
21. Ideo G., Delnino F., Franchi S. R. de // Enzyme. — 1971. — Vol. 12. — P. 242—254.
22. Kokot F. // Z. arztl. Fortbild. — 1966. — Bd 60. — S. 985—989.
23. Ohlen J., Jey H. // Klin. Wschr. — 1970. — Bd 48. — S. 1556—1558.
24. Orłowski M. // Arch. Immunol. Ther. exp. — 1965. — Vol. 13. — P. 538—538.

DIAGNOSIS OF VIRAL HEPATITIS AND BILIARY DUCTS INFLAMMATION USING ESTIMATION OF  $\gamma$ -GLUTAMYL TRANSPEPTIDASE AND ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITIES IN BLOOD SERUM AND BILE

*M. A. Andreichin, M. A. Pogorila, N. A. Vasil'eva, B. Z. Shenkman*

Medical School, Ternopol, Medical, School, Saratov

Diagnostic importance of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase activities estimation in bile was demonstrated during inflammation of biliary ducts and gallbladder. Activation of these enzymes in B-bile in cholecystitis and in B- and C-biles — in cholecystocholangitis enabled to perform topical diagnosis. Correlation between the enzymatic activity in bile and blood allowed to diagnose acute viral hepatitis B and its combination with inflammation of biliary ducts.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 615.9.015.2:615.356:577.161.11].015.4.076.9+  
+616-008.949.5-02:615.356:577.161.11

*А. А. Пентюк, В. И. Гуцол, Н. Г. Богданов*

**БИОТРАНСФОРМАЦИЯ И ТОКСИЧНОСТЬ КСЕНОБИОТИКОВ ПРИ РАЗЛИЧНОМ ПОСТУПЛЕНИИ ВИТАМИНА А В ОРГАНИЗМ КРЫС**

Випницкий медицинский институт им. Н. И. Пирогова, Институт питания АМН СССР, Москва

Биотрансформация является необходимым этапом для реализации биологических эффектов многих ксенобиотиков. Подвергаясь ферментативной конверсии, чужеродные соединения могут превращаться как в биологически неактивные метаболиты, так и в интермедиаты с высокой реакционной способностью, которые обезвреживаются благодаря конъюгации с глутатионом или другими эндогенными молекулами [7—10]. В этой связи разработка способов направленной регуляции активности фермента и соответственно скорости и направления биотрансформации чужеродных веществ может позволить модифицировать фармакологические свойства лекарственных препаратов и изменять токсичность многих ксенобиотиков. Значительный интерес в этом отношении представляет витамин А, который контролирует активность многих ферментов метаболизма ксенобиотиков [1—4, 12].

Целью исследования явилось изучение влияния дефицита, избытка и гипердозы витамина А на биотрансформацию ксенобиотиков, подвергающихся метаболической активации (ацетанилид и его метаболит парацетамол) или образующих неактивные метаболиты (вольтарен).

Методика. Опыты проведены на 337 крысах обоего пола линии Вистар с начальной массой тела 50—70 г. Животные в течение 2 мес получали полусинтетический рацион, сбалансированный по всем нутриентам [6] и содержащий 2000 МЕ/кг корма витамина А в виде ретинила пальмитата или ретинила ацетата (норма) или недостаточное его количество — 150 МЕ/кг (дефицит). Для более точного контроля за поступлением витамина А последние 7 дней крысы содержались на рационе, не содержащем витамина А, но витамин

вводили внутривенно через зонд каждому животному в дозе 300 МЕ/кг (норма) или 30 МЕ/кг (дефицит). Избыток создавали введением в течение последней недели 3000 МЕ/кг витамина А, а гипервитаминоз — 30 000 МЕ/кг. У дефицитных животных содержание витамина А в печени, определенное по реакции с трифторуксусной кислотой [13], составляло  $29,7 \pm 1,46$  мкг/г против  $126 \pm 9,7$  мкг/г в норме, в группе животных, получавших избыток витамина А, —  $993 \pm 39$  мкг/г, а при введении гипердозы витамина А —  $5530 \pm 229$  мкг/г.

Биотрансформацию ксенобиотиков оценивали по экскреции с мочой метаболитов ацетанилида, который вводили внутривенно в дозе 74 мкмоль на 100 г массы на фоне водной нагрузки (2 мл на 100 г). Для определения связанных метаболитов мочу гидролизовали соляной кислотой. Общее количество всех метаболитов ацетанилида определяли по реакции диазотирования с последующим сочетанием, а долю аминифенольных метаболитов — по реакции образования индофенолового красителя. Содержание глюкуроновых метаболитов оценивали по реакции с карбазолом, сульфатов и меркаптуровых кислот — турбидиметрическим методом. Ссылки на методы определения приведены нами ранее [4].

Элиминацию вольтарена из крови оценивали после его внутривенного введения в дозе 30 мг/кг. Количество вольтарена определяли по реакции с феррицианидом калия [5].

Токсичность парацетамола и вольтарена оценивали по выживаемости крыс после их внутривенного введения (парацетамол — 3 г/кг, 1 раз в сутки, 5 дней; вольтарен — 30 мг/кг, 1 раз в сутки, 4 дня).

В печени определяли содержание глутатиона, глюкуроноидов, сульфатов, белка и активность ферментов — микросомальных монооксигеназ (деминтазы и гидроксилазы), NADPH-редуктазы (КФ 1.6.2.4), арилэстераз (КФ 3.1.1.2) и алиэстераз (КФ 3.1.1.1), глутатион-S-трансферазы (КФ 2.5.1.18), гамма-глутамилтрансферазы (КФ 2.3.2.2), как описано нами ранее [1, 3].

В работе использованы NADPH, восстановленный глутатион («Reanal», Венгрия). Остальные реактивы были отечественного производства.

**Результаты и обсуждение.** Ацетанилид подвергается многочисленным биопревращениям, что дает возможность оценить многие пути метаболизма ксенобиотиков — ароматическое гидроксильрование в парацетамол, N-окисление, гидролиз амидной связи, конъюгация с сульфатом, глюкуроном, глутатионом. Недостаточность витамина А вызывает значительное снижение скорости метаболизма ацетанилида, о чем свидетельствует уменьшение экскреции всех его метаболитов (табл. 1). Избыток витамина А и его гипердоза стимулируют этот процесс.

Экскреция аминифенольных (гидроксилированных) метаболитов у ретинолдефицитных крыс оказалась заметно сниженной, чему соответствует падение активности монооксигеназ и редуктазы в микросомах (табл. 2). Избыток витамина А и его гипердоза повышают выведение аминифенольных метаболитов и активность микросомальных ферментов.

Дефицит витамина А ослабляет интенсивность гидролиза ацетанилида по амидной связи, о чем свидетельствует уменьшение экскреции свободных анилидов с мочой, тогда как дополнительное введение витамина стимулирует процессы гидролиза препарата. Активность микросомальных эстераз также проявляет зависимость от обеспеченности организма крыс витамином А.

Аминифенольные метаболиты обнаруживаются преимущественно в связанной форме, т. е. в виде конъюгатов с сульфатом и глюкуроном. При недостаточности витамина А уменьшается выведение связанных аминифенолов и соответственно увеличивается экскреция свободного пара-аминофенола и пара-ацетиламинофенола (парацетамола), тогда как дополнительное введение ретинила

Экскреция метаболитов ацетанилида (в мкмоль/100 г за сутки) при разных способах введения витамина А в организм крыс ( $M \pm m$ ;  $n=5$ )

Метаболиты	Обеспеченность витамином А, МЕ/кг			
	30	300	3000	30 000
Все ацетанилида	60,3±0,87*	65,5±0,50	70,3±0,98*	68,7±0,50*
Аминофенольные	39,3±0,76*	47,2±0,98	56,0±0,97*	52,9±0,59*
Анилидные	21,0±0,55*	18,3±0,44	14,3±0,27*	15,8±0,53*
свободные	7,90±0,32*	10,7±0,44	12,5±0,19*	12,8±0,52*
связанные	13,1±0,47*	7,60±0,40	1,85±0,08*	2,97±0,35*
свободные, % к общим	37,8±1,39*	58,7±2,49	87,2±0,45*	81,2±2,45*
Свободный пара-аминофенол	0,36±0,017*	0,19±0,022	0,24±0,021	0,24±0,018
Пара-ацетиламинофенол (парацетамол):				
свободный	3,77±0,077*	2,00±0,129	0,94±0,086*	1,28±0,107*
связанный	35,2±0,84*	45,1±0,87	54,8±0,91*	51,4±0,64*
связанный, % ко всем аминофенольным метаболитам	89,5±0,39*	96,0±0,30	97,9±0,13*	97,1±0,28*
Сульфат:				
свободный	19,1±0,79*	11,4±1,09	7,22±0,61*	4,41±0,57*
связанный	13,1±0,26*	17,5±0,85	25,1±0,44*	19,4±0,72*
Свободная глюкуроновая кислота	121,6±7,7*	77,9±5,6	63,2±6,2	65,9±3,6
Связанные глюкурониды	34,4±1,1*	39,0±0,5	42,1±1,4	43,1±1,1*
Меркаптуровые кислоты	4,05±0,21*	1,74±0,087	0,84±0,03*	1,14±0,034*

Примечание. Здесь и в табл. 2: звездочка —  $p < 0,05$  относительно группы животных, получавших 300 МЕ/кг витамина А (норма).

Таблица 2

Активность ферментов (в нмоль/мин на 1 мг белка) и содержание восстановленного глутатиона, глюкуронидов, сульфатов (в мкмоль/г) в печени крыс при разных способах введения витамина А ( $M \pm m$ ;  $n=11-28$ )

Показатель	Обеспеченность витамином А, МЕ/кг			
	30	300	3000	30 000
Гидроксилаза анилина	0,38±0,013*	0,56±0,011	0,72±0,029*	0,63±0,022*
Деметилаза диметиланилина	3,76±0,17*	5,57±0,11	7,23±0,22*	6,39±0,20*
NADPH-редуктаза дихлорфенолиндофенола	40,9±1,86*	64,2±1,95	78,2±1,72*	68,9±2,75
Арилэстераза (фенилацетат)	784±23*	1093±27	1358±50*	1228±27*
Алиэстераза:				
этилацетат	244±11*	323±7,4	420±17*	351±21
ацетанилид	140±6,7*	184±4,2	247±6,2*	207±9,8
Сульфат:				
свободный	0,34±0,015*	0,24±0,019	0,18±0,009*	0,22±0,030
связанный	0,87±0,083*	1,09±0,057	1,20±0,040	0,74±0,060*
Свободная глюкуроновая кислота	21,2±0,91*	41,7±1,58	35,1±0,78*	38,3±3,25
Связанные глюкурониды	26,3±1,32*	42,1±1,46	53,2±2,27*	37,9±3,05
Восстановленный глутатион	8,06±0,12*	6,24±0,14	5,34±0,11*	5,11±0,20*
Глутатион-S-трансфераза:				
хлординитробензол	279±9,0*	224±5,1	182±9,5*	164±11,6*
нитроглицерин	22,9±0,51*	17,3±0,39	14,6±0,57*	12,4±0,54*
Гамма-глутамилтрансфераза	1,66±0,050*	1,30±0,060	1,35±0,064	1,67±0,071*

Примечание. Активность гидроксилазы, деметилазы, редуктазы определяли в микросомальной фракции печени, активность остальных ферментов — в постмитохондриальной фракции.

стимулирует экскрецию связанных аминофенолов. Это указывает на зависимость процессов конъюгации от витамина А и подтверждается уменьшением экскреции связанных сульфатов и глюкуронидов (соответственно возрастает выведение их свободных форм) у ретинолдефицитных животных и повышением экскреции связанных сульфатов и глюкуронидов у крыс, получавших 3000 и 30 000 МЕ/кг витамина А. Можно думать, что при дефиците витамина А страдает активность ферментов конъюгации. Известно, что недостаточность витамина А приводит к снижению активности ферментов, использующих активный сульфат, и активности УДФ-глюкуронилтрансфераз [2, 11, 12]. Определенную роль в эффекте ретинола играет доступность кофакторов конъюгации. При недостаточности витамина А в печени снижается количество связанного сульфата (но не свободного), связанных и свободных глюкуронидов. При введении 3000 МЕ/кг витамина А (но

не в гипердозе) содержание связанных сульфатов и глюкуронидов возрастает.

Дефицит витамина А усиливает выведение меркаптуровых кислот, тогда как избыток витамина А (в меньшей степени его гипердоза) уменьшает их экскрецию. Известно, что меркаптуровые кислоты являются продуктами деградации глутатионовых конъюгатов реакционноспособных метаболитов ацетанилида — N-гидроксиацетиламинофенола и N-ацетилбензохинонимина [7—9]. Можно думать, что у ретинолдефицитных крыс активируются метаболические пути, ведущие к образованию токсических метаболитов. Избыток витамина А и в меньшей степени гипердоза, судя по уменьшению экскреции меркаптуровых кислот, препятствуют образованию таких интермедиатов. Поскольку известно, что токсические и нетоксические метаболиты парацетамола образуются различными формами цитохрома P-450 [7], можно предположить, что витамин А избирательно контролирует био-

синтез множественных форм этого гемопротейна.

При дефиците витамина А возрастает активность глутатион-S-трансферазы, гамма-глутамил-трансферазы и содержание глутатиона, что, по видимому, является компенсаторным процессом, направленным на обезвреживание реакционноспособных метаболитов эндогенной природы, скорость образования которых при дефиците витамина А может возрастать. Так, например, при недостаточности ретинола резко снижается активность глутатионпероксидазы [3], что может привести к накоплению пероксидов.

Биотрансформация вольтарена имеет значительное сходство с метаболизмом ацетанилида. Препарат подвергается ароматическому гидроксигированию, а метаболиты конъюгируются с сульфатом и глюкуронатом, но в отличие от ацетанилида метаболиты вольтарена обладают низкой биологической активностью [10]. Дефицит витамина А замедляет элиминацию неизменной (активной) формы препарата из плазмы крови крыс (период полувыведения составил  $3,0 \pm 0,18$  ч против  $2,0 \pm 0,07$  ч у животных контрольной группы). Избыток витамина А ускорял выведение вольтарена из крови (период полувыведения составил  $1,4 \pm 0,05$  ч).

Изменения биотрансформации ацетанилида и вольтарена, возникающие под влиянием различной обеспеченности витамином А, существенно отражаются на токсичности соединений. При недостаточности витамина А уменьшается продолжительность жизни крыс, отравленных парацетамолом (с  $3,47 \pm 0,49$  дня у контрольных животных до  $2,38 \pm 0,36$  дня у ретинолдефицитных крыс), возрастает гепатотоксический эффект. Так, активность аланинаминотрансферазы в сыворотке крови животных, оптимально обеспеченных витамином А, составила  $309 \pm 24$  ед/л, тогда как у ретинолдефицитных крыс —  $496 \pm 60$  ед/л при  $17,5 \pm 1,8$  ед/л у животных, не получавших парацетамол. Введение витамина А в дозе 3000 МЕ/кг увеличивает продолжительность жизни крыс до  $5,0 \pm 0,42$  дня, активность аланинаминотрансферазы под влиянием парацетамола увеличивалась не столь значительно — до  $193 \pm 11$  ед/л. Гипердоза витамина А усиливает токсичность парацетамола (продолжительность жизни крыс оказалась равной  $2,76 \pm 0,49$  дня, а активность аланинаминотрансферазы достигала  $539 \pm 55$  ед/л). Дефицит витамина А усиливает токсичность вольтарена, что проявляется уменьшением продолжительности жизни до  $2,60 \pm 0,62$  дня (при  $4,45 \pm 0,55$  дня в контроле). Избыток витамина А (3000 МЕ/кг) несколько повышал длительность жизни крыс, отравленных вольтареном ( $5,45 \pm 0,55$  дня), тогда как гипердоза витамина А достоверно уменьшала выживаемость животных ( $2,53 \pm 0,63$  дня).

На наш взгляд, усиление токсичности вольтарена при дефиците витамина А связано с замедлением биотрансформации препарата и соответственно с увеличением срока жизни его активной (неизменной) формы. Избыток витамина А, усиливая метаболизм вольтарена, вызывает противоположный эффект.

Что же касается увеличения токсичности парацетамола при дефиците витамина А, то, судя по биотрансформации ацетанилида, хотя и имеет место ослабление многих реакций метаболизма ксенобиотиков у ретинолдефицитных крыс, однако

при этом одновременно активизируется образование реакционноспособных метаболитов. Избыток витамина А, хотя и усиливает биотрансформацию анилидов, но одновременно тормозит образование токсических метаболитов, что приводит к ослаблению токсического действия парацетамола.

Повышение токсичности вольтарена и парацетамола под влиянием гипердозы витамина А, очевидно, связано не столько с влиянием ретинола на биотрансформацию этих соединений, сколько с высокой токсичностью больших количеств самого витамина А.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Богданов Н. Г., Пентюк А. А., Гуцол В. И., Луцок П. Б. // Биохимия.— 1986.— Вып. 51. № 2.— С. 242—248.
2. Ковь И. Я. // Вестн. АМН СССР.— 1986.— № 12.— С. 23—31.
3. Пентюк А. А., Яковлева О. А., Коновалова Г. Г., Ланкин В. З. // Биохимия.— 1987.— Т. 52, № 6.— С. 1009—1012.
4. Пентюк А. А., Гуцол В. И., Хадур Р. и др. // Рациональное питание.— Киев, 1988.— Вып. 23.— С. 82—85.
5. Станиславчук Н. А., Пентюк А. А., Лычко А. П. и др. А. с. 1469458 СССР, МКИ 01 33/48. Способ определения вольтарена в биологической жидкости // Опубл. 30.03.89. Бюл. № 12.
6. Экспериментальная витаминология / Под ред. Ю. М. Островского.— Минск, 1979.—
7. Harvinson P. I., Guenrich F. R., Rashed M. S., Nelson S. D. // Chem. Res. Toxicol.— 1988.— Vol. 1.— P. 47—52.
8. Holme G. H., Dahlin D. C., Nelson S. D., Dybing E. // Biochem. Pharmacol.— 1984.— Vol. 33, N 3.— P. 401—406.
9. Louw G. H., Goldlum A. // Mol. Pharmacol.— 1985.— Vol. 27, N 3.— P. 375—386.
10. Menasse R., Hedwall P. R., Kraetz I. et al. // Scand. J. Rheum.— 1978.— Suppl. 22.— P. 5—16.
11. Mohan P. S., Jaga R. K. S. // J. Nutr.— 1980.— Vol. 110, N 5.— P. 868—875.
12. Nair C. R., Chauhan D. P., Gupta P. H., Manta S. K. // Digestion.— 1982.— Vol. 24, N 3.— P. 190—194.
13. Wang Chin-Cheng, Hodges R. E. J., Hill D. L. // Anal. Biochem.— 1978.— Vol. 89, N 1.— P. 220—224.

Получила 20.03.90

#### BIOTRANSFORMATION AND TOXICITY OF XENOBIOTICS IN RATS UNDER CONDITIONS OF VARIOUS AVAILABILITY WITH VITAMIN A

A. A. Pentjuk, V. I. Gutsol, N. G. Bogdanov

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

Deficiency of vitamin A in rats caused a decrease in metabolic rate of acetanilide as well as in elimination of voltaren from blood plasma, while excess of the vitamin (3,000 IU/kg) stimulated voltaren elimination and increased excretion with urine of aminophenol conjugates of acetanilide with sulfuric and glucuronic acids. Under conditions of vitamin A deficiency formation of acetanilide toxic metabolites was increased as a result of which excretion of mercapturic acids with urine was elevated but excess of vitamin A and its hyperdose inhibited these reactions. At the same time, deficiency of vitamin A amplified the paracetamol and voltaren toxicity and its excess exhibited protective effects.

О. А. Моденова, А. А. Королев, З. К. Никитина,  
А. А. Докторов

## ИЗУЧЕНИЕ РЯДА ФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ И УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ЖЕЛЕЗО-МАРГАНЦЕВОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

1 ММИ им. И. М. Сеченова, Научно-исследовательская лаборатория биологических структур Минздрава СССР, Москва

Многие микроэлементы являются необходимыми для нормального осуществления ряда метаболических реакций и физиологических функций [10, 16].

Одним из представителей биогенных микроэлементов является марганец, играющий важную роль в развитии скелета, в реакциях иммунитета, в кроветворении, репродуктивной функции, активации многих ферментативных процессов [5, 8].

Вместе с тем марганец относят к промышленным ядам с резко выраженными токсическими свойствами, которые проявляются в развитии мanganоконииоза, токсической энцефалопатии и марганцевого паркинсонизма [7, 11, 13, 17, 18].

Известно также, что избыточное поступление марганца в организм животных ведет к повышению его концентрации в костях и появлению в них изменений, идентичных изменениям в костях при рахите (так называемый марганцевый рахит [13]).

Целью работы явились изучение изменения активности ряда ферментных систем печени крыс и характеристика ее ультраструктуры при поступлении в организм с питьевой водой марганца и железа в среднетоксических концентрациях.

При этом особое внимание было уделено изучению содержания и активности цитохромов  $b_5$  и P-450, так как известно, что они участвуют в метаболизме как субстратов эндогенного происхождения [2, 14, 29], так и ксенобиотиков [22, 26, 30]. Процессы окисления в указанных системах, как правило, не решают никаких энергетических задач, а выполняют защитную и пластическую функции. Введение животным токсичных веществ часто приводит к изменению активности и содержания цитохромов  $b_5$  и P-450 в микросомах печени [27, 28]. Способность же ионов  $Fe^{2+}$  и  $Mn^{2+}$ , поступающих в организм с питьевой водой, вызывать индукцию или инактивацию оксигеназных систем печени до настоящего времени не изучалась.

**Методика.** Подострый эксперимент был проведен на 7 группах белых крыс-самцов, получавших в течение 30 дней марганец в дозах 7 и 35 мг/кг и железо в дозах 19 и 97 мг/кг при раздельном и комбинированном пероральном введении с помощью зонда 2 мл водных растворов  $MnCl_2$  и  $FeCl_2$ . Указанные концентрации марганца и железа составляли соответственно 1/50 и 1/10 ДЛ<sub>50</sub>. Через каждые 10 дней из подязычной вены животных брали 5 мл крови для проведения соответствующих анализов. По окончании эксперимента животных забивали, извлекали печень и использовали ее для гистологических и биохимических исследований.

Определение активности (в МЕ/л) щелочной фосфатазы в сыворотке крови и в гомогенате печени проводилось на биохимическом анализаторе FP-5 (Финляндия).

Содержание SH-групп в крови изучали спектрофотометрическим методом [19].

Содержание общих липидов в сыворотке крови определяли с помощью стандартного тест-набора производства "Lachema" (ЧССР) и выражали ее в единицах оптической плотности при 540 нм.

Содержание цитохромов  $b_5$  и P-450 в микросомной фракции печени определяли по методу [3, 4] с использованием спектрофотометра "Shimadzu MP-200". Коэффициенты для расчета содержания цитохромов были взяты из работ [24, 25]. Содержание белка в препаратах микросом определяли по методу Лоури [23], предварительно растворяя их в 0,25 М NaOH.

Для проведения гистологических исследований кусочки печени быстро помещали в 25% раствор глутарового альдегида на 0,13М какодильном буфере pH 7,4 и измельчали на образцы размером около 1 мм<sup>3</sup>. Затем образцы переносили в свежий фиксатор на 4 ч при 4 °С. После отмывки в какодильном буфере образцы фиксировали 1% раствором  $OsO_4$  на 0,1М какодильном буфере pH 7,4 в течение 2 ч при 4 °С. После обезвоживания образцы заключали в эпон. Полутонкие и ультратонкие срезы получали на ультратоме фирмы LKB. После контрастирования уранилацетатом и цитратом свинца срезы изучали в электронном микроскопе JEM-100.

Статистическую обработку результатов проводили, используя распределение Стьюдента для малых выборок [12].

**Результаты и обсуждение.** Как видно из табл. 1, при поступлении в организм животных с питьевой водой марганца, а также комбинации марганца с железом отмечалось изменение ряда биохимических показателей в сыворотке крови и печени животных. Во-первых, наблюдается выраженное снижение содержания SH-групп в крови как при раздельном, так и при совместном присутствии в питьевой воде марганца и железа в дозе 1/10 ДЛ<sub>50</sub>. Во-вторых, при содержании в питьевой воде марганца и железа в концентрациях 1/10 и 1/50 ДЛ<sub>50</sub> отмечалось увеличение содержания общих липидов в сыворотке крови. И, наконец, в-третьих, при добавлении к воде марганца и железа в количестве, составляющем 1/50 ДЛ<sub>50</sub>, активность щелочной фосфатазы в сыворотке крови заметно увеличивалась, а в печени снижалась.

Выявленные изменения ряда биохимических показателей в зависимости от различных концентраций марганца и железа в питьевой воде, по-видимому, отражают общетоксическое действие указанных металлов на организм животных и не связаны с их прямым действием на ферментные системы. Известно, что щелочная фосфатаза не является Mn- или Fe-зависимым ферментом [15], и в этой связи изменения активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови и в печени, а также изменение содержания общих липидов в сыворотке крови под действием марганца и железа позволяют предполагать, что при марганцевой (или железо-марганцевой) интоксикации могут повреждаться мембранные структуры печени.

Морфологические исследования печени животных, принимавших с питьевой водой марганец и железо, показали, что в печени имеются очаговые изменения структуры гепатоцитов, которые являются следствием токсического действия вводимых веществ. Изменения носят неспецифический характер и заключаются в уменьшении объема зернистой эндоплазматической сети, нарушении ориентации ее элементов, снижении числа рибосом на ее мембранах. Цистерны и трубочки неравномерно расширены. Количество профилей незернистой эндоплазматической сети

Биохимические показатели в печени и сыворотке крови крыс при введении различных концентраций марганца и железа

Показатель	Концентрация марганца и железа, части от ДЛ <sub>50</sub>					
	Контроль	1/10 Mn	1/10 Fe	1/10 Mn+1/10 Fe	1/50 Mn	1/50 Fe
Активность щелочной фосфатазы, МЕ/л:	Контроль					
	20,9±0,73 378,45±23,18	8,73±2,22 358,16±17,49	13,45±2,1 356,53±41,01	14,1±1,75 358,72±43,04	13,73±2,55 1036,7±80,42	21,38±0,63 1079,42±76,87
Содержание SH-групп в крови, усл. ед.	446,66±10,89	220,0±32,6	192,5±8,66	182,5±43,3	355,0±40,41	231,66±39,46
Содержание общих липидов в сыворотке крови, усл. ед.	0,303±0,002	0,337±0,02	0,396±0,01	0,344±0,003	0,389±0,011	0,373±0,028
						1/50 Mn+1/50 Fe
						10,15±1,67 1030,2±129,1
						2±2,0±21,15
						0,41±0,024

Таблица 2

Содержание цитохромов b<sub>5</sub> и P-450 (в нмоль/мг белка) в микросомной фракции печени крыс при введении различных концентраций марганца и железа

Условия эксперимента	b <sub>5</sub>	P-450
1/50 ДЛ <sub>50</sub> Mn <sup>2+</sup>	0,57	0,26
1/50 ДЛ <sub>50</sub> Fe <sup>2+</sup>	0,55	0,30
1/50 ДЛ <sub>50</sub> Mn <sup>2+</sup> +1/50 ДЛ <sub>50</sub> Fe <sup>2+</sup>	0,71	0,33
1/10 ДЛ <sub>50</sub> Mn <sup>2+</sup>	0,79	0,38
1/10 ДЛ <sub>50</sub> Fe <sup>2+</sup>	0,79	0,37
1/10 ДЛ <sub>50</sub> Mn <sup>2+</sup> +1/10 ДЛ <sub>50</sub> Fe <sup>2+</sup>	0,44	0,20
Контроль	0,58	0,31

несколько увеличивается. Аппарат Гольджи располагается в билиарном отделе клетки и иногда заполнен электронно-плотными частицами. Изменяется структура митохондрий, что проявляется в нарушениях их формы, локальном или общем просветлении матрикса, уменьшении количества митохондриальных гранул, декомпенсации крист, увеличении межмембранных промежутков.

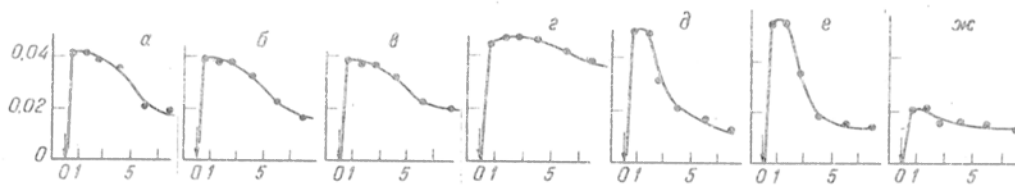
Нарушение внутриклеточного обмена выразилось в значительном увеличении количества липидных капель, жировой дистрофии отдельных клеток. Увеличено число миелоподобных телец; гранулы гликогена располагаются в крупных розетках. В некоторых случаях определяли расширение пространства Диссе, где располагались значительные сплетения микроворсинок гепатоцитов. Отмечены дистрофические изменения купферовых клеток. В ряде участков обнаружена глубокая деструкция небольших групп гепатоцитов или отдельных клеток, что выразилось в уменьшении размеров клетки, деформации ее ядра, маргинации хроматина в нем, очаговом опустошении цитоплазмы и заполнении ее жировыми каплями. Наиболее значительные указанные изменения гепатоцитов отмечены в опыте с одновременным использованием 1/10 ДЛ<sub>50</sub> Mn и 1/10 ДЛ<sub>50</sub> Fe. В случае отдельного использования 1/10 ДЛ<sub>50</sub> Mn и 1/10 ДЛ<sub>50</sub> Fe изменения менее значительны. И, наконец, они минимальны в опыте с 1/50 ДЛ<sub>50</sub> Mn + 1/50 ДЛ<sub>50</sub> Fe.

Введение животным с питьевой водой марганца и железа в подостром эксперименте приводило к изменению содержания цитохромов b<sub>5</sub> и P-450 в печени.

При получении животными с водой марганца и железа в концентрациях от 1/50 до 1/10 ДЛ<sub>50</sub> характер спектров поглощения для цитохромов b<sub>5</sub> и P-450 в области 400—500 нм практически не менялся. В то же время содержание указанных цитохромов в микросомной фракции печени животных, получавших ионы металлов, отличалось от аналогичных показателей для контрольных крыс (табл. 2). При этом индукция оксигеназных систем существенно зависела от дозы вводимого токсичного вещества. Так, данные типичного опыта, представленные в табл. 2, показывают, что при введении животным 1/50 ДЛ<sub>50</sub> марганца или железа не наблюдалось увеличения содержания цитохромов b<sub>5</sub> и P-450.

Совместное введение марганца и железа или увеличение дозы их до 1/10 ДЛ<sub>50</sub> приводило к увеличению содержания цитохромов b<sub>5</sub> и P-450, однако последнего в несколько меньшей степени. Дальнейшее увеличение общего количества полу-





Восстановление-окисление цитохрома  $b_5$  в микросомах печени крыс, получивших марганец и железо.

а — контроль; б —  $1/50$  ДЛ $_{50}$   $Mn^{2+}$ ; в —  $1/50$  ДЛ $_{50}$   $Fe^{2+}$ ; г —  $1/50$  ДЛ $_{50}$   $Mn^{2+}$  +  $1/50$  ДЛ $_{50}$   $Fe^{2+}$ ; д —  $1/10$  ДЛ $_{50}$   $Mn^{2+}$ ; е —  $1/10$  ДЛ $_{50}$   $Fe^{2+}$ ; ж —  $1/10$  ДЛ $_{50}$   $Mn^{2+}$  +  $1/10$  ДЛ $_{50}$   $Fe^{2+}$ . По оси ординат — разница оптической плотности суспензии микросом при 424 и 408 нм на 1 мг микросомального белка; по оси абсцисс — время, мин.

чаемых животными металлов при совместном введении марганца и железа в  $1/10$  ДЛ $_{50}$  приводило к снижению содержания цитохромов в микросомах печени, которое может быть следствием так называемого «истощения» ферментных систем при нарушении проницаемости мембран печеночных клеток в случае их некроза [21].

Анализ динамики восстановления-окисления цитохрома  $b_5$  показал, что при дозах марганца и железа, равных  $1/50$  ДЛ $_{50}$ , временная зависимость  $A_{224}$ — $A_{208}$  для микросом подопытных животных мало отличалась от контроля, тогда как совместное введение ионов металлов при увеличении их доз до  $1/10$  ДЛ $_{50}$  вызывало некоторые изменения (см. рисунок).

Таким образом, введение животным марганца и железа в дозах, равных  $1/10$  ДЛ $_{50}$ , или их совместное использование в меньших дозах вызывало как качественное, так и количественное изменение оксигеназных систем микросом печени.

Как известно, индукция оксигеназных систем микросом печени имеет место при введении животным целого ряда ксенобиотиков [27, 28]. Однако обычно для катаболизма таких веществ характерно увеличение их полярности за счет окисления оксигенажными системами с последующим удалением окисленных, водорастворимых продуктов экскреторными органами [1]. По-видимому, трудно предположить такой механизм индукции для ионов железа и марганца. Вторая возможность увеличения активности цитохромов в ответ на введение металлов может быть связана с изменением фосфолипидного состава эндоплазматического ретикулума. Так, с одной стороны, показано существенное влияние фосфолипидного состава мембран на активность оксигеназных систем микросом [6, 9], а с другой — известно влияние введения марганца и железа на липидный обмен [20]. Однако для окончательного вывода о механизмах действия марганца и железа на активность оксигеназных систем микросом печени нужны дальнейшие исследования.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Арчаков А. И. // Оксигеназы биологических мембран.— М., 1983.
2. Арчаков А. И. // Микросомальное окисление.— М., 1975.
3. Арчаков А. И., Девиченский В. Н., // Биохимия.— 1974.— Т. 39.— № 4.— С. 691—699.
4. Арчаков А. И., Девиченский В. Н., Карузина И. И. и др. // Биохимия.— 1968.— Т. 3. № 3.— С. 479—487.
5. Бабенко Г. А., Решеткина Л. П. // Применение микроэлементов в медицине.— Киев, 1971.
6. Бородин Е. А., Добрецов Г. Е., Карасевич Е. И. // Биохимия.— 1981.— Т. 46.— С. 1109—1118.
7. Вредные вещества в промышленности / Под ред

- И. В. Лазарева, Н. Д. Гадаскиной.— Л., 1977.— Т. 3.— С. 508.
8. Гигиенические критерии состояния окружающей среды 17. Марганец. ВОЗ.— Женева— 1985.
9. Дятловицкая Э. В., Леменовская А. Ф., Арчаков А. И. и др. // Биохимия.— 1977.— Т. 42. № 1.— С. 139—142.
10. Коломийцева М. Г., Габович Р. Д. // Микроэлементы в медицине.— М., 1970.— С. 274.
11. Крыжановская И. В. // Смертельное отравление кристаллами марганцево-кислого калия.— Алма-Ата, 1963.— Вып. 5.— С. 103.
12. Лакин Г. Ф. // Биометрия.— Л., 1961.
13. Лопина О. Д., Аврукина Г. А., Воронцова Е. И. и др. // Марганец.— М., 1981.— Т. 13.— С. 417—420.
14. Лопухин Ю. М., Арчаков А. И., Халилов Э. М., Бородин Е. А. // Кардиология.— 1980.— Т. 20. № 1.— С. 111—115.
15. Мецлер Д. // Биохимия.— М., 1980.— Т. 2.
16. Микроэлементы в питании человека: Доклад комитета экспертов ВОЗ. Сер. техн. докл. № 532.— М., 1975.
17. Навроцкий В. К. // Гигиена труда.— М., 1974.— С. 198.
18. Профессиональные болезни / Под ред. Летавета А. А. и др.— М., 1973.— С. 149.
19. Рубина Х. М., Романчук Л. А. // Вопр. мед. химии.— 1961.— Т. 7. вып. 6.— С. 652.
20. Судяков Н. М. // Медико-биологическая конф., 7-я: Материалы.— Петрозаводск, 1974.— С. 132—133.
21. Хашен Р., Шейх Д. // Очерки по патологической биохимии.— М., 1981.
22. Dagawa M., Hishimura T., Yoshida H., Hashimoto Y. // Carcinogenesis.— 1987.— Vol. 8, N 12.— P. 1913—1918.
23. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. Biol. Chem.— 1951.— Vol. 193.— P. 265.
24. Omura T., Sato R. // ibid.— 1964.— Vol. 239, N 7.— P. 2370—2378.
25. Omura T., Sato R. // Ibid.— P. 2379—2385.
26. Rouch P., Puttmann M., Oesch F., Oramoto Y. // Biochem. Pharmacol.— 1987.— Vol. 36, N 24.— P. 4355—4359.
27. Siest G., Bett A. M., Fonvel-Gigleux S. // Xenobiotica.— 1988.— Vol. 18, Suppl. 1.— P. 21—23.
28. Tamura S., Kawata S., Sugiyama T., Tarui S. // Biochem. biophys. Acta.— 1987.— Vol. 926, N 3.— P. 231—238.
29. Waxman D. J. // Biochem. Pharmacol.— 1988.— Vol. 37.— N 1.— P. 71—84.
30. Yamazaki Y., Shimada M., Muvagama N., Kato R. // J. Biol. Chem.— 1984.— Vol. 262, N 15.— P. 7323—7428.

Поступила 20.03.90

#### SOME ENZYMATIC SYSTEMS AND ULTRASTRUCTURE OF RAT LIVER TISSUE IN FERRUM-MANGANIC INTOXICATION

O. A. Modenova, A. A. Korolev, Z. K. Nikitina, A. A. Doktorov  
I Medical School, Research Laboratory of Biological Structures, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

During consumption of drinking water containing manganese or combination of iron and manganese several biochemical patterns were altered in animal blood and liver tissue: content of SH-groups, total lipids, activity of alkaline phosphatase, content of cytochromes  $b_5$  and P-450 in liver microsomal fractions. Light and electron microscopy showed that local unspecific alterations of hepatocytes structure occurred in liver tissue. Activation of cytochromes in response to administration of the metals appears to involve alterations in phospholipid composition of endoplasmic reticulum.

К. О. Блох, В. В. Полторак, О. В. Блох

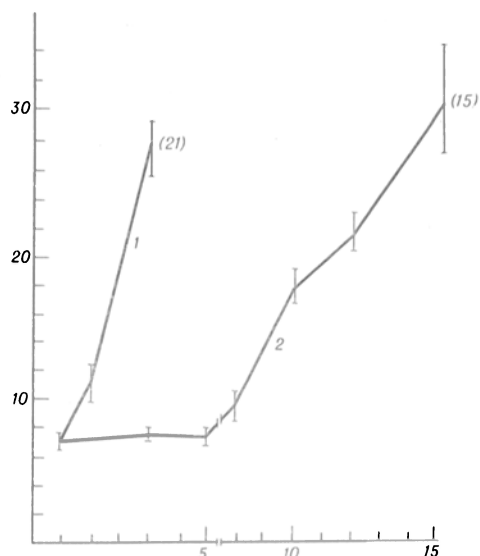
## ИССЛЕДОВАНИЕ ДИАБЕТОГЕННЫХ И ЛИМФОЛИТИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ПРИ ОДНОКРАТНОМ И ДРОБНОМ ВВЕДЕНИИ СТРЕПТОЗОЦИНА МЫШАМ МУТАНТНОЙ ЛИНИИ C57BL/KsJY — db/m

Харьковский НИИ эндокринологии и химии гормонов, Харьковский НИИ медицинской радиологии

Согласно современным представлениям, развитие инсулинзависимого сахарного диабета (ИЗСД) сопровождается иммунопатологией, одним из проявлений которой являются аутоиммунные реакции к клеткам инсулярного аппарата [2]. В экспериментальных исследованиях показано, что тяжесть диабетического синдрома и нарушений иммунной системы, развивающихся под влиянием диабетогенных факторов, в значительной мере зависит от генетических особенностей организма [9]. Среди известных в настоящее время диабетогенных агентов наибольший интерес представляет стрептозотцин (СЦ) — N-метилнитрозокарбаминглюкозамин. С его помощью у мышей чувствительных линий удается моделировать абсолютную инсулиновую недостаточность, которая имеет место у больных сахарным диабетом I типа. При однократном введении в организм СЦ в высокой дозе (200 мг на 1 кг массы тела) наблюдается разрушение инсулинпродуцирующих клеток в результате прямого цитотоксического действия препарата [11], тогда как диабет аутоиммунного генеза развивается под влиянием низких доз СЦ (40 мг на 1 кг массы тела), вводимых ежедневно на протяжении 5 дней [8]. При однократной инъекции СЦ выявляются массивная инволюция лимфоидных тканей и нарушение функций иммунной системы [10]. В значительно меньшей степени исследовано состояние лимфоидных тканей при дробном введении СЦ. Имеются данные о том, что однократная инъекция СЦ в субдиабетогенной дозе снижает содержание тимоцитов у мышей линии BALB/c [12]. Удобную модель для сопоставления диабетогенных и лимфолитических эффектов СЦ представляют мыши мутантной линии C57BL/KsJY, гетерозиготные по гену db (diabetes) и характеризующиеся высокой чувствительностью инсулинпродуцирующих клеток к СЦ [1].

Цель настоящего исследования состояла в сравнительной оценке метаболических нарушений, отражающих состояние инсулинпродуцирующего аппарата и лимфоидных тканей, при ИЗСД, индуцированном у мышей, гетерозиготных по гену db, однократным и дробным введением СЦ.

**Методика.** Опыты проведены на самцах мышей мутантной линии C57BL/KsJY — db/m в возрасте 8—12 нед. Аутосомно-рецессивный ген db локализован на 4-й хромосоме и в гомозиготном состоянии детерминирует развитие спонтанного инсулиннезависимого сахарного диабета, который впоследствии трансформируется в инсулинзависимую форму (7). Аутосомно-рецессивный ген m (misty) в гомозиготном состоянии осветляет окраску шерсти мышей. У гетерозигот db/m сахарный диабет спонтанно не развивается. У этих живот-



Концентрация глюкозы в крови мышей после воздействия СЦ.

1 — однократное введение СЦ в дозе 200 мг/кг; 2 — дробное введение СЦ по 40 мг/кг на протяжении 5 дней. В скобках — число животных. По оси абсцисс — время (в днях) после введения СЦ; по оси ординат — концентрация глюкозы (в мМ).

ных ИЗСД индуцировали однократной внутривнутрибрюшинной инъекцией СЦ в дозе 200 мг/кг и дробными внутривнутрибрюшинными инъекциями препарата по 40 мг/кг ежедневно на протяжении 5 дней. Использовали СЦ фирмы "Upjohn" (США), который растворяли в цитратном буфере (рН 4,5) непосредственно перед инъекцией. Концентрацию глюкозы в крови определяли ортоголуидиновым методом, содержание инсулина в крови — радиоиммунологически. Выделение ДНК и продуктов ее распада — полидезоксирибонуклеотидов (ПДН) из тимуса и селезенки — проводили по методу [4]. Количество ДНК в пробах оценивали дифениламиновым методом [6]. Подсчет лейкоцитов и расчет лейкоцитарной формулы проводили общепринятыми методами. Образцы крови брали в утренние часы. Статистическую обработку полученных данных проводили по методу Стьюдента—Фишера.

**Результаты и обсуждение.** При дробном введении низких доз СЦ у мышей выявлялась гипергликемия начиная с 8-го дня после 1-й инъекции. Впоследствии гипергликемия усиливалась, достигая максимальных значений на 15-е сутки эксперимента (см. рисунок). К этому времени у животных отмечали снижение содержания инсулина в крови до  $20,0 \pm 2,7$  мкЕД/мл по сравнению с  $59,0 \pm 7,7$  мкЕД/мл в контроле. Развивающуюся в этот период абсолютную инсулиновую недостаточность связывают с аутоиммунным разрушением инсулинпродуцирующих клеток островкового аппарата [2, 8]. Однократная инъекция высокой дозы СЦ вызывала повышение уровня глюкозы в крови мышей уже через 24 ч, а к исходу 3-х суток у них развивалась тяжелая гипергликемия (см. рисунок) и инсулинопения ( $25,3 \pm 4,6$  мкЕД/мл). В более отдаленные периоды исследования не проводили, поскольку при однократном введении высокой дозы СЦ животные без инсулинотерапии погибали.

Наряду с диабетогенным эффектом СЦ проявлял лимфолитическое действие, выраженность которого в значительной мере зависела от схемы введения препарата (см. таблицу). Так, при однократной инъекции СЦ в дозе 200 мг/кг у мышей на 3-и сутки обнаруживали глубокую лимфопению и инволюцию тимуса, что сопровождалось снижением в нем уровня ДНК и возрастанием концентрации продуктов ее распада. В этот же

Содержание ДНК и ПДН в лимфоидных тканях, количество лимфоцитов в крови после однократного и дробного введения СЦ мышам

Группа	Количество лимфоцитов, $\cdot 10^9/\text{л}$	ДНК, мкг/орган		ДНК, мкг на 1 мг ткани		ПДН, %	
		тимус	селезенка	тимус	селезенка	тимус	селезенка
1 — контроль	$6,20 \pm 0,47$ (16)	$1521 \pm 121$ (12)	$1592 \pm 105$ (12)	$27,2 \pm 2,4$ (12)	$18,5 \pm 1,7$ (12)	$0,24 \pm 0,14$ (6)	$1,06 \pm 0,25$ (6)
2 — однократная инъекция СЦ (200 мг/кг)	$0,80 \pm 0,33$ (10)	$150 \pm 32$ (6)	$1193 \pm 145$ (6)	$10,3 \pm 2,0$ (6)	$18,4 \pm 1,8$ (6)	$5,90 \pm 0,71$ (6)	$1,99 \pm 0,22$ (6)
$p_{1-2}$	<0,001	<0,001	<0,05	<0,001	—	<0,001	<0,05
3 — дробные инъекции СЦ (40 мг/кг, 5 дней)	$9,83 \pm 2,15$ (6)	$942 \pm 73$ (11)	$1603 \pm 163$ (11)	$35,7 \pm 1,6$ (11)	$19,4 \pm 0,9$ (11)	$0,12 \pm 0,03$ (5)	$0,86 \pm 0,15$ (5)
$p_{1-2}$	—	<0,01	—	<0,05	—	—	—
$p_{2-3}$	<0,001	<0,001	—	<0,001	—	<0,001	<0,05

Примечание. В скобках — число животных; показатели 2-й и 3-й групп определяли соответственно на 3-и и 15-е сутки стрептозотоцинового диабета.

период в селезенке отмечали лишь незначительное снижение содержания ДНК и некоторое повышение содержания ПДН. В отличие от селезенки в тимусе наблюдали почти 3-кратное уменьшение количества ДНК на единицу массы органа. Последнее обстоятельство, а также накопление в тимусе ПДН позволяют полагать, что инволюция тимуса при стрептозотоциновом диабете, вызванном однократной инъекцией высокой дозы препарата, обусловлена не процессами миграции клеток из этого органа, а скорее интерфазной гибелью тимоцитов с характерным для этого типа гибели образованием ПДН [5]. Оказывая токсическое действие на тимус, СЦ, вероятно, тем самым прерывает развитие аутоиммунных инсулитов, т. е. лимфоцитарной инфильтрации (преимущественно Т-лимфоцитами) панкреатических островков. У людей, больных диабетом I типа, инсулиты, как правило, выявляются на ранних стадиях заболевания [2].

При тяжелом диабете, развившемся после дробного введения низких доз СЦ, изменения в лимфоидных тканях выражены в меньшей степени. Это подтверждается отсутствием лимфопении, а также сохранением содержания ДНК и ПДН в селезенке на уровне контрольных значений. Наблюдаемое при этой модели диабета снижение содержания ДНК в тимусе не столь значительно, как при модели с однократным введением СЦ, и не сопровождается повышением уровня ПДН и уменьшением количества ДНК, приходящегося на единицу массы органа (см. таблицу).

Таким образом, установлено, что у мышей мутантной линии C57BL/KsJY в период выраженной гипергликемии инволюция лимфоидных тканей при однократном введении СЦ более глубокая, чем при дробном. Это обстоятельство следует учитывать при оценке соответствия исследуемых стрептозотоциновых моделей сахарного диабета аналогичной патологии у человека. По-видимому, более адекватной является модель с применением дробных инъекций СЦ, поскольку для больных сахарным диабетом I типа не характерно развитие глубокой лимфопении и массивной деструкции лимфоидных тканей [3], а манифестация заболевания сопровождается формированием аутоиммунных реакций к клеткам инсулярного аппарата [2]. Вместе с тем модель ИЗСД, который

вызывается однократным введением высокой дозы СЦ, имеет несомненное значение для выяснения роли абсолютной инсулиновой недостаточности в возникновении метаболических и гормональных нарушений при сахарном диабете I типа.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Блох К. О., Полторак В. В., Бриндак О. И. // Актуальные вопросы стандартизации лабораторных животных для медико-биологических исследований.— М., 1988.— Ч. 1.— С. 66—68.
2. Ефимов А. С., Полторак В. В. // Пробл. эндокринол.— 1987.— № 6.— С. 80—88.
3. Козлов Ю. А., Лавров В. С. // Успехи соврем. биол.— 1988.— Т. 105.— С. 505—520.
4. Рябенко Н. И., Иванник Б. П. // Радиобиология.— 1978.— Вып. 6.— С. 803—807.
5. Хансон К. П. // Там же.— 1979.— Вып. 6.— С. 814—820.
6. Шапкин А. // Методы вирусологии и молекулярной биологии.— М., 1972.— С. 184—186.
7. Coleman D. L. // Metabolism.— 1983.— Vol. 32.— P. 162—164.
8. Like A. A., Rossini A. A. // Science.— 1976.— Vol. 193.— P. 415—417.
9. Nakamura M., Nagafuchi S., Yamaguchi K. et al. // Diabetes.— 1984.— Vol. 33.— P. 894—900.
10. Nichols W. K., Vann L. L., Speilman J. B. // Clin. exp. Immunol.— 1981.— Vol. 46.— P. 627—632.
11. Rakieta N., Rakieta M., Nadkarni M. // Cancer Chemother. Rep.— 1963.— Vol. 29.— P. 91.
12. Welihausen S. R. // Diabetes.— 1986.— Vol. 35.— P. 1404—1411.

Поступила 18.07.89

#### DIABETOGENIC AND LYMPHOLYTIC EFFECTS OF STREPTOZOTOCIN DEVELOPED AFTER SINGLE AND FRACTIONAL ADMINISTRATION OF THE DRUG INTO MICE OF THE C57BL/KSJV DB/M STRAIN

K. O. Blokh, V. V. Poltorak, O. V. Blokh

Institute of Endocrinology and Hormone Chemistry, Institute of Medical Radiology, Kharkov

Single administration of streptozotocin at a dose of 200 mg/kg into mice males of the C57BL/KsJV db/m strain induced severe form of insulin-dependent diabetes within the earlier periods as compared with fractional injection of the drug (40 mg/kg daily within 5 days). Streptozotocin-induced diabetes, developed after single administration of the drug, caused pronounced destructions in lymphoid tissue, primarily in thymus as content of DNA was drastically decreased in the tissue and level of DNA breakdown products was increased. The lympholytic effect of streptozotocin was less distinct after fractional administration.

К. П. Веремеенко, Т. В. Варецкая, А. И. Кизим,  
Л. А. Свигальская

## ПОЛУЧЕНИЕ КОНЦЕНТРАТА ФИБРИНОГЕНА ИЗ НЕБОЛЬШИХ КОЛИЧЕСТВ ПЛАЗМЫ АУТОГЕННОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА И ЕГО КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

НИИ отоларингологии Минздрава УССР, Институт биохимии АН УССР, Киев

Фибриноген является мультифункциональным белком. Он играет главную роль в процессе свертывания крови и участвует в воспалительных реакциях организма, формировании защитных механизмов, направленных против бактериальных инфекций. Фибриноген обладает сродством к поверхностным рецепторам тромбоцитов и связывается с такими белками плазмы, как фибронектин, XIII фактор свертывания крови, плазминоген и др. [6, 9, 12]. После превращения в фибрин он служит основным матриксом для регуляции фибринолиза и опосредует прикрепление клеток в процессе заживления ран. Благодаря этим свойствам препараты фибриногена нашли широкое применение в медицинской практике.

В последнее время в хирургических клиниках используют фибриновые композиции в качестве адгезивных, гемостатических средств и смесей, ускоряющих заживление ран [5, 7, 8]. Основным их компонентом является фибриноген. Для выделения последнего из плазмы крови человека предложены различные методы. Фибриноген, наименее растворимый среди белков плазмы, легко осаждается эфиром, ацетоном, этанолом, глицерином, нейтральными солями, высокомолекулярными линейными полимерами, путем охлаждения и др. Каждый из этих способов имеет свои достоинства и недостатки [8]. Для практических целей, в частности для создания фибриновых композиций, нужны простые, легковыполнимые, обеспечивающие высокий выход фибриногена методы. Обычно в качестве исходного материала используют донорскую плазму крови, что не исключает риска передачи таких заболеваний, как гепатит В и СПИД. В связи с этим возникает необходимость получения фибриногена из аутогенной крови, а это создает ограничения в доступности и количестве исходного материала.

Цель настоящей работы — разработать простой метод получения концентратов фибриногена из небольших количеств крови человека, изучить их белковый состав, изыскать способ предохранения от быстрого расщепления фибриногена протеолитическими ферментами.

Методика. Фибриноген выделяли из свежеполученной плазмы крови человека путем осаждения полиэтиленгликолем (ПЭГ) или сернокислым аммонием. Предпочтительное использование этих осадителей определялось их доступностью и отсутствием токсичности [7, 8]. Для получения плазмы кровь (обычно 18 мл), взятую из локтевой вены, помещали в полиэтиленовые пробирки, содержащие 2 мл антикоагулянта (3,8 % раствора цитрата натрия). Во избежание фибринолиза *in vitro* к антикоагулянту прибавляли  $\epsilon$ -аминокапроновую кислоту до концентрации 0,2 М и

4000 АТрЕ контрикала. Кровь с антикоагулянтом тщательно и быстро перемешивали, а затем центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин. Плазму отделяли.

К 10 мл плазмы добавляли 0,1 мл (20 мг)  $\epsilon$ -аминокапроновой кислоты и 0,1 мл (200 АТрЕ) контрикала. Затем вносили ПЭГ или нейтрализованный аммиаком сернокислый аммоний в количестве, равном объему плазмы. Смеси оставляли при комнатной температуре на 30 мин, после чего центрифугировали 15 мин при 2500–3000 об/мин. Надосадочную жидкость удаляли, осадки растворяли в минимальном объеме 0,06 М цитрата натрия. Полученный раствор представляет собой концентрат фибриногена, содержащий и другие белки плазмы крови.

Суммарное количество белков определяли по методу [11], содержание фибриногена — спектрофотометрическим методом [1]. XIII фактор свертывания крови определяли по [10],  $\alpha_1$ -ингибитор протеиназ и  $\alpha_2$ -макроглобулин — по методу [2], фибронектин — иммуноферментным методом [3].

Электрофоретическое исследование концентратов фибриногена проводили в 5 % растворе полиакриламидного геля (ПАГ). В качестве маркеров использовали фибриноген, сывороточный альбумин, яичный альбумин, химотрипсиноген, РНК.

Результаты и обсуждение. В I серии опытов подбирали оптимальные условия для максимального осаждения фибриногена. Использовали различной концентрации ПЭГ разных молекулярных масс и сернокислый аммоний. К порциям плазмы крови по 5 мл прибавляли равный объем ПЭГ с мол. массой 1000, 2000 и 6000, создавая конечные концентрации 10, 7 и 3,6—4,5 % соответственно, или сернокислый аммоний — 0,19 и 0,26 с долей насыщения. После 30 мин инкубации при комнатной температуре образовавшийся осадок отделяли центрифугированием при 2500—3000 об/мин и растворяли в 0,25—0,3 мл 0,06 М цитрата натрия. Данные о содержании фибриногена в препаратах, полученных при помощи различных осадителей, приведены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, выход фибриногена зависит от осадителя и колеблется в значительных пределах для различных образцов плазмы. Наибольший выход этого белка (57 и 64 %) наблюдается при использовании ПЭГ с мол. массой 2000 в концентрации 7 % и ПЭГ с мол. массой 6000 в концентрации 4,5 %. Содержание других белков в этих препаратах было примерно одинаковым, составляя 48 % от общего содержания белка (включая и фибриноген).

Таблица 1

Содержание фибриногена в препаратах, полученных из плазмы крови человека с помощью различных осадителей (M±m)

Осадитель	Конечная концентрация осадителя*	Выход фибриногена, %	Содержание фибриногена по отношению к общему содержанию белка в препарате, %
ПЭГ, мол. масса:			
1000	10,0	42,5±2,0	48,0±3,2
2000	7,0	57,0±2,2	52,0±7,5
6000	3,6	55,0±4,2	49,0±3,4
6000	4,0	53,0±3,0	40,0±1,9
6000	4,5	64±3,1	52,0±2,2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,19	50,0±2,7	51,0±6,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,26	45,0±2,2	19,0±9,0

\* Концентрация ПЭГ приведена в %, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> — в долях насыщения.

Примечание. Здесь и в табл. 2 представлены средние данные 8—15 опытов.



Электрофореграмма концентратов фибриногена, полученных из донорской плазмы крови человека.

1, 2 — осаждение фибриногена при помощи ПЭГ с мол. массой 2000 и 6000 соответственно; 3 — осаждение фибриногена  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 4 — донорская плазма; 5 — сывороточный альбумин (мол. масса 67 000), яичный альбумин (мол. масса 45 000), химотрипсиноген (мол. масса 25 000), РНКаза (мол. масса 13 000); 6 — фибриноген (мол. масса 340 000).

Полученные концентраты фибриногена были охарактеризованы с помощью электрофореза в ПАГ, определения в них фибронектина, ингибиторов протеиназ, плазминогена, XIII фактора свертывания крови. Наличие этих компонентов важно для практического использования фибриновых композиций: одни из них обеспечивают образование фибрина из фибриногена с определенными качествами, присутствие других необходимо для его устойчивости. Так, наличие XIII фактора свертывания крови обеспечивает образование прочного сгустка фибрина. Ингибиторы протеиназ предохраняют его от быстрого лизиса.

На рисунке приведена электрофореграмма концентратов фибриногена, полученных из донорской крови осаждением с помощью ПЭГ и сернокислого аммония. Как видно из рисунка, все препараты отличаются от исходной плазмы резким обогащением фибриногеном и уменьшением содержания других белков.

Данные табл. 2 свидетельствуют о наличии в исследованных концентратах фибриногена, фибронектина,  $\alpha_1$ -ингибитора протеиназ и  $\alpha_2$ -макроглобулина. Содержание фибронектина варьировало от 0,12 до 0,38 мг/мл (в плазме крови оно составляет 0,1—0,4 мг/мл), количество  $\alpha_1$ -ингибитора протеиназ колебалось от 0,37 до 0,51 мг/мл (в плазме крови 1,8—2,6 мг/мл), а  $\alpha_2$ -макроглобулина — от 0,10 до 0,39 мг/мл (в плазме крови 1,3—2,4 мг/мл).

В концентратах фибриногена, полученных разными способами, содержится примерно оди-

Содержание фибронектина и ингибиторов протеиназ в концентратах фибриногена ( $M \pm m$ )

Концентраты фибриногена	Фибронектин, мг/мл	$\alpha_1$ -Ингибитор протеиназ, мг/мл	$\alpha_2$ -Макроглобулин, мг/мл
Полученные осаждением ПЭГ с мол. массой:			
1000	$0,27 \pm 0,07$	$0,44 \pm 0,07$	$0,32 \pm 0,06$
2000	$0,35 \pm 0,10$	$0,37 \pm 0,04$	$0,11 \pm 0,04$
6000	$0,38 \pm 0,04$	$0,51 \pm 0,02$	$0,39 \pm 0,04$
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,19 долей насыщения	$0,12 \pm 0,04$	$0,49 \pm 0,02$	$0,10 \pm 0,08$

наковое количество XIII фактора свертывания крови (0,4—0,6 мкмоль ДНС кадаверина). В наличии XIII фактора в концентратах фибриногена мы убедились также в опытах по растворению сгустков фибрина. Последние после прибавления к ним хлорида кальция и тромбина и инкубации в течение 30 мин при 37 °С не растворялись в 1,5 % уксусной кислоте, т. е. имело место образование стабилизированного фибрина.

Известно, что даже высокоочищенный фибриноген прочно удерживает плазминоген, который способен превращаться в плазмин под действием активаторов и осуществлять фибринолиз [4]. В связи с этим в последующих опытах мы выясняли вопрос о присутствии плазминогена в концентратах фибриногена. К полученным концентратам прибавляли стрептокиназу (50—100 МЕ) и тромбин, инкубировали при 37 °С. После образования сгустков фибрина визуально фиксировали время лизиса. Оказалось, что фибриновые сгустки из концентратов фибриногена, полученных из плазмы без прибавления  $\epsilon$ -аминокапроновой кислоты и контрикала, лизировались за 5—10 с; в сгустках фибрина из концентратов фибриногена, полученных из плазмы с прибавлением этих ингибиторов протеиназ, не выявлено лизиса при наблюдении более 5 ч. Полученные данные свидетельствуют, что в первом случае — в отсутствие ингибиторов — имеющийся в препарате плазминоген активируется стрептокиназой с образованием плазмина, который быстро лизирует сгустки фибрина, во втором случае из-за присутствия ингибиторов фибринолиз не происходит. Результаты этих экспериментов явились прямым указанием на необходимость внесения ингибиторов протеолиза и фибринолиза при взятии крови и в плазму перед получением концентратов фибриногена.

Таким образом, полученные концентраты фибриногена содержат фибронектин,  $\alpha_1$ -ингибитор протеиназ,  $\alpha_2$ -макроглобулин, XIII фактор свертывания крови, плазминоген.

На основании результатов исследования можно заключить, что для получения концентратов фибриногена из небольших количеств аутогенной крови в качестве осадителей могут быть рекомендованы ПЭГ с мол. массой 2000 и 6000 (конечная концентрация 7 и 4,5 % соответственно) и сернокислый аммоний (0,19 долей насыщения). С целью предотвращения протеолиза фибриногена и фибрина в концентратах фибриногена при взятии крови и к исходной плазме необ-

ходимо прибавлять ингибиторы фибринолиза  $\epsilon$ -аминокапроновую кислоту и природный ингибитор протеолиза контрикал или его аналоги.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Белицер В. А., Варецкая Т. В., Бутылин Ю. П. и др. // Лаб. дело.— 1983.— № 4.— С. 38—42.
2. Веремеенко К. П., Голобородько О. П., Кизим А. И. Протеолиз в норме и при патологии.— Киев, 1988.
3. Ермолин Г. А., Ефремов Е. Е., Филимонова Е. В. и др. // Вопр. мед. химии.— 1986.— № 6.— С. 123—124.
4. Кудинов С. А. // Биохимия животных и человека.— 1982.— Вып. 6.— С. 73—84.
5. Федоров В. Д., Ривкин В. Л., Морозов Н. В., Смирнова В. И. // Хирургия.— 1988.— № 11.— С. 122—124.
6. Colwin R. B. // Molecular Biology of Fibrinogen and Fibrin / Eds M. W. Mosesson, R. F. Doolittle.— New York, 1985.— P. 621.
7. Epstein G. H., Zwillenberg S., Weisman R. A., Schreiber A. D. // Ann. Otol. (St. Louis).— 1986.— Vol. 95, N 1.— Pt 1.— P. 40—45.
8. Harris D. M., Siedentop K. H., Sancher B. // Laryngoscope.— 1985.— Vol. 95, N 9.— P. 1074—1076.
9. Hermas J., McDonagh J. // Seminars Thrombos. Hemostas.— 1982.— Vol. 8, N 1.— P. 11—24.
10. Lorand L., Goton T. // Meth. Enzymol.— 1970.— Vol. 19.— P. 770—782.
11. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. Biol. Chem.— 1951.— Vol. 193, N 1.— P. 265—275.
12. Schlag G. // Fibrin Sealant in Operative Medicine / Eds G. Schlag, H. Redl.— Berlin, 1986.— P. 3—12.

Поступила 15.08.89

#### PRODUCTION OF FIBRINOGEN CONCENTRATE FROM SMALL AMOUNTS OF AUTOGENOUS BLOOD PLASMA AND ITS CHARACTERISTICS

K. N. Veremeenko, T. V. Varetskaya, A. I. Kizim, L. A. Svitlitskaya

Institute of Otorhinolaryngology, Ministry of Public Health of the Ukrainian SSR, Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Simple procedure was developed for production of fibrinogen concentrate from small amounts of human autogenous blood using precipitation with polyethylene glycol and ammonium sulfate. Maximal yield of fibrinogen was obtained using polyethylene glycol 2,000 and 6,000 daltons at concentrations 7% and 4.5%, respectively. The fibrinogen preparations included fibronectin, inhibitors of proteinases, factor XIII of blood coagulation, plasminogen.  $\Sigma$ -Aminocaproic acid and contrical should be added during bloodletting as well as into blood plasma before isolation of fibrinogen to avoid possible fibrinogen proteolysis.

© Н. М. ШИЛИНА, И. Я. КОНЫ, 1991

УДК 612.12:577.112.853].015.6:[577.161.11]+  
+ 615.356:577.161.11].015.42:612.12:577.112.853

Н. М. Шилина, И. Я. Конь

#### ВЛИЯНИЕ ВИТАМИНА А НА СОСТАВ ГЛИКОПРОТЕИДНЫХ ФРАКЦИЙ ПЛАЗМЫ КРОВИ КРЫС

Институт питания АМН СССР, Москва

Одним из важнейших звеньев в механизме системного действия витамина А является, по-видимому, его влияние на синтез гликопротеидов (ГП) [2, 10, 21] — соединений, широко распространенных в организме и играющих важную роль в процессах биологического развития и узнавания [1, 5, 13]. Полагают, что витамин А

в виде своего фосфорилированного производного ретинилфосфата выступает в роли липидного переносчика сахаров через гидрофобные мембраны к месту синтеза олигосахаридов [10, 11, 21]. Однако остается неясной биологическая значимость влияния витамина А на синтез ГП. Большинство данных, свидетельствующих в пользу этой теории, были получены при изучении биосинтеза ГП с помощью меченых предшественников [10, 16, 21]. В то же время прямые данные о влиянии витамина А на содержание и состав отдельных ГП, полученные с помощью химических и электрофоретических методов, крайне немногочисленны [18, 20].

Среди различных классов ГП живого организма важное место принадлежит ГП крови, которые участвуют в иммунных процессах, свертывании крови, ингибировании активности протеаз, осуществляют многочисленные транспортные функции, включая перенос липидов, гормонов, металлов и лекарственных веществ и т. д. Они относятся к ГП с N-гликозидной связью, в отношении которых имеется наибольшее количество экспериментальных данных, согласующихся с представлениями о роли витамина А в их синтезе [10, 12, 21].

Задача настоящей работы — исследование влияния авитаминоза А и субнормальной обеспеченности этим витамином на состав ГП фракций плазмы крови крыс. При этом основным методическим подходом явились электрофоретическое разделение белков сыворотки крови в полиакриламидном геле с последующим выявлением фракций ГП и общих белков путем окрашивания по Шиффу и амидо черным соответственно и параллельная оценка их уровня в зависимости от различий в обеспеченности животных витамином А.

Методика. Опыты были проведены на крысах линии Вистар. Авитаминоз А вызывали у растущих животных самцов путем длительного (5—6 нед) содержания их на полусинтетическом рационе, свободном от витамина А, как описано ранее [3]. Для воспроизведения модели субнормальной обеспеченности витамином А половинные подопытных животных вводили дополнительно к этому рациону 1 раз в неделю внутривенно, по 0,2 мл раствора ретинилпальмитата (в подсолнечном масле), содержавшего 100 МЕ витамина А в 1 мл (против 1000 МЕ в контроле).

Крыс забивали декапитацией и немедленно извлекали печень. Кровь собирали в пробирки, содержавшие по 2 мл 5% цитрата натрия, и получали плазму центрифугированием. Белки плазмы разделяли с помощью горизонтального электрофореза в 3,5% полиакриламидном геле на приборе фирмы «Мультифор» (ЛКВ, Швеция), используя 0,2 М трис-глициновый буфер pH 8,9 [4].

Фракции ГП выявляли путем окраски по Шиффу [14], а общие белковые фракции — окраской амидо черным.

Количественную оценку содержания этих фракций проводили с помощью денситометрии фотографий гелей на приборе фирмы «Chromoscan» (Англия).

Содержание витамина А в печени определяли в экстрактах, полученных при гомогенизации ткани печени в смеси вода — этанол — петролейный эфир (9:18:60) [3].

Содержание белка в плазме крови определяли по Лоури. Полученные данные обрабатывали методом вариационной статистики, используя для оценки степени различий по группам *t*-критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Полное лишение животных витамина А приводило спустя 4—5 нед после начала опыта к появлению у них симптомов А-витаминной недостаточности — задержке роста, снижению аппетита, светобоязни,

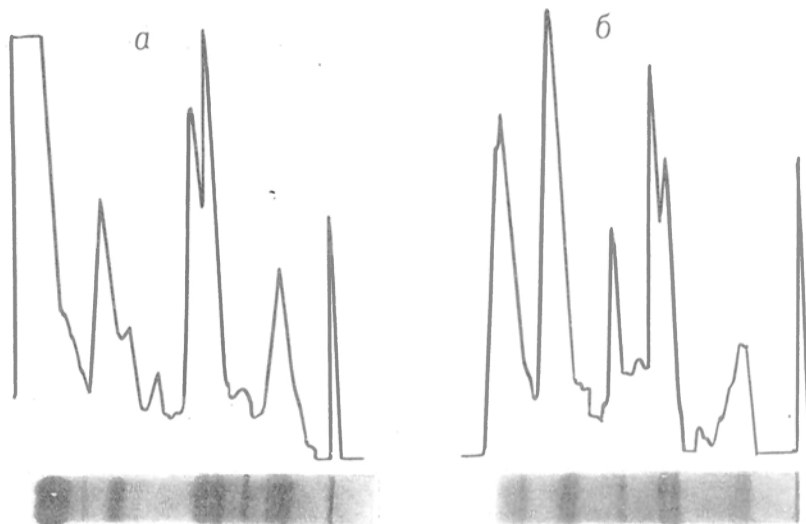


Рис. 1. Типичные электрофорезграммы и денситограммы белков (а) и гликопротеидов (б) плазмы крови контрольных животных.

изменению шерстного покрова. Витамин А в печени этих животных не обнаружен. Субнормальная обеспеченность крыс ретинолом не сопровождалась появлением каких-либо выраженных клинических симптомов, однако приводила к значительному снижению витамина А в печени (до 3 мкг/г против 53,8 мкг/г в контроле).

В плазме крови контрольных животных постоянно выявляли 6 основных белковых зон, обозначенных как альбуминовая;  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - и  $\gamma$ -глобулиновая и 5 фракций ГП, соответствовавших по своей подвижности глобулинам (рис. 1).

Глубокая недостаточность ретинола (авитаминоз А) и сниженная обеспеченность животных этим витамином (14 МЕ в сутки против 140 МЕ в контроле) вызывали изменения как абсолютного содержания отдельных фракций ГП, выражавшегося в условных единицах оптической плотности, так и их относительного (удельного) содержания, выражавшегося как отношение оптической плотности данной фракции ГП к содержанию общих белков в данной зоне (рис. 2 и табл. 1 и 2). Эти изменения были неоднозначны и характеризовались избирательным уменьшением содержания одних ГП на фоне увеличением содержания других фракций ГП.

Авитаминоз А сопровождался значительным снижением содержания в плазме всех  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобулиновых фракций общих белков, указывающим на нарушение их синтеза в гепатоцитах и, напротив, резким увеличением содержания  $\gamma$ -глобулинов, отражающим, очевидно, реактивное усиление их синтеза в клетках ретикулоэндотелиальной системы в ответ на вторичную инфекцию или интоксикацию.

В этих условиях было обнаружено значительное снижение как абсолютного количества, так и особенно удельного содержания  $\gamma$ -ГП в плазме, которое можно, по-видимому, рассматривать как проявление относительной недостаточности гликозилирования  $\gamma$ -глобулинов в условиях резкого усиления их синтеза у крыс с авитаминозом. Авитаминоз А сопровождался также достоверным снижением абсолютного уровня  $\alpha_1$ -ГП и тенденцией к снижению  $\alpha_2$ -ГП. Однако вследствие одновременного снижения содержания белков в  $\alpha_1$ -

и  $\alpha_2$ -глобулиновых зонах изменения относительного уровня этих ГП были недостоверны по сравнению с контролем. В то же время, хотя абсолютное содержание  $\beta_1$ - и  $\beta_2$ -ГП изменялось недостоверно (см. табл. 2) вследствие выраженного снижения уровня  $\beta_1$ - и  $\beta_2$ -глобулинов в плазме (см. табл. 1, рис. 1 и 2), удельное содержание белково-связанных сахаров в зоне  $\beta_1$ - и  $\beta_2$ -глобулинов возрастало по сравнению с контролем. Это объясняется, по-видимому, более значительным нарушением синтеза полипептид-

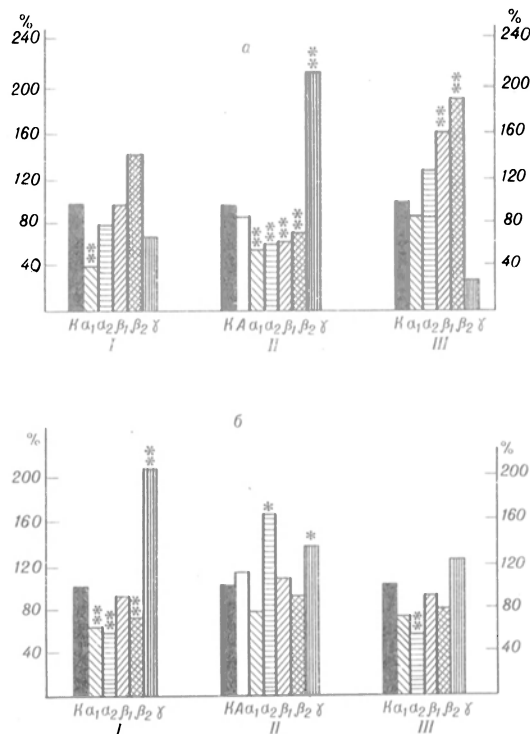


Рис. 2. Влияние глубокой недостаточности витамина А и субнормальной обеспеченности этим витамином на содержание электрофоретических фракций гликопротеидов (ГП) и общих белков в плазме крови.

а — глубокая недостаточность ретинола; б — субнормальная обеспеченность ретинолом. I — содержание фракций ГП (в усл. ед. опт. пл. на 1 мл); II — содержание фракций общих белков (в мг/мл); III — удельное содержание ГП (в усл. ед. опт. пл. на 1 мг белка); А — альбумины;  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ -,  $\gamma$ -фракции глобулинов; К — контроль. \* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,01$ . По оси ординат — содержание фракций ГП и белков (в % от контроля).

Влияние недостаточности витамина А на содержание белковых фракций в крови у крыс

Белковые фракции, мкг	Тяжелая недостаточность		Субнормальная обеспеченность	
	контроль	опыт	контроль	опыт
1 — $\gamma$ -глобулиновая	71,0±6,0	149,0±14,0**	58,0±9,0	80,0±4,0*
2 — $\beta_2$ -глобулиновая	108,0±5,0	81,0±5,0**	59,0±5,0	52,0±5,0
3 — $\beta_1$ -глобулиновая	143,0±12,0	90,0±12,0**	79,0±6,0	83,0±8,0
4 — $\alpha_2$ -глобулиновая	21,0±1,0	13,0±1,0**	8,0±0,4	13,6±2,0*
5 — $\alpha_1$ -глобулиновая	127,0±8,0	77,0±10,0**	45,0±6,0	33,0±3,0
6 — альбумин	297,0±59,0	256,0±21,0	230,0±14,0	260,0±6,0

Примечание. Здесь и в табл. 2 представлены средние данные ( $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$ ) из 5—6 опытов.

\* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,02$ , в остальных случаях —  $p > 0,05$ .

Т а б л и ц а 2

Влияние недостаточности витамина А на содержание гликопротеидных фракций в крови крыс

Гликопротеидные фракции	Тяжелая недостаточность				Субнормальная обеспеченность			
	усл. ед. опт. пл.		усл. ед. опт. пл. на 1 мкг белка фракции		усл. ед. опт. пл.		усл. ед. опт. пл. на 1 мкг белка фракции	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
1- $\gamma$	3,3±0,8	2,4±0,5	0,05±0,002	0,02±0,001**	4,9±0,9	10,9±0,4**	0,11±0,03	0,13±0,01
2- $\beta_2$	3,2±0,3	4,6±0,9	0,03±0,003	0,06±0,007**	5,7±0,4	3,8±0,2**	0,10±0,01	0,08±0,007
3- $\beta_1$	5,2±0,4	5,4±0,8	0,04±0,005	0,06±0,006**	6,3±0,3	5,9±0,5	0,08±0,008	0,07±0,009
4- $\alpha_2$	1,4±0,2	1,1±0,2	0,07±0,001	0,09±0,008	2,0±0,3	1,2±0,2**	0,28±0,05	0,09±0,01
5- $\alpha_1$	7,4±0,5	3,1±0,5**	0,06±0,003	0,05±0,009	12,8±0,5	7,9±1,1**	0,31±0,05	0,22±0,02

ных цепей  $\beta$ -глобулинов, чем их гликозилирования.

Нельзя, однако, исключить возможность иного механизма наблюдавшихся изменений содержания ГП в крови крыс с авитаминозом А. Поскольку это состояние сопровождается значительными нарушениями роста и аппетита животных, можно предположить, что в этих условиях значительно усиливается катаболизм белков, и в частности белков крови, причем гликозилированные белки оказываются более устойчивыми к протеолизу, чем белки, лишенные олигосахаридных цепей. В связи с этим относительная доля гликозилированных белков будет увеличиваться, следствием чего и являются обнаруженное достоверное увеличение удельного содержания ГП, передвигающихся в зоне  $\beta$ -глобулинов, а также тенденция к увеличению уровня  $\alpha_1$ -ГП.

С учетом данного предположения представляют особый интерес результаты изучения содержания фракций белков и ГП плазмы при субнормальной обеспеченности крыс ретинолом, не сопровождающейся нарушением общего состояния и питания животных.

Субнормальная обеспеченность крыс ретинолом в отличие от авитаминоза А не сопровождалась достоверными изменениями содержания большинства белковых фракций в плазме, но вызывала достоверное снижение абсолютного содержания  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ - и  $\beta_2$ -ГП и относительного уровня  $\alpha_2$ -ГП, а также тенденцию к выраженному снижению относительного уровня  $\alpha_1$ - и  $\beta_2$ -ГП. Снижение обеспеченности крыс витамином А вело к повышению в крови относительного содержания недогликозилированных белков, в особенности в  $\alpha_2$ -, а также  $\alpha_1$ - и  $\beta_2$ -глобулиновых зонах. Полученные данные позволяют полагать, что недостаточность витамина А ведет к нарушению гли-

козилирования белка в гепатоцитах крыс. Вместе с тем резкое увеличение у этих животных содержания в крови  $\gamma$ -ГП сочеталось с одновременным повышением уровня белков  $\gamma$ -глобулиновой зоны (см. рис. 2, табл. 1 и 2) и отражало скорее усиленный синтез этих белков в клетках ретикулоэндотелиальной системы, чем повышение их гликозилирования. Следовательно, субнормальная обеспеченность крыс витамином А в отличие от глубокого дефицита этого витамина не сопровождается угнетением гликозилирования  $\gamma$ -глобулинов в лимфоидной ткани.

Наши данные о снижении содержания в плазме ГП, передвигающихся в зоне  $\alpha$ -глобулинов при дефиците ретинола, согласуются с результатами радиоиммунологических исследований [15, 17], обнаруживших снижение уровня  $\alpha_1$ -макроглобулина в крови крыс с тяжелой недостаточностью витамина А, а также  $\alpha_2$ -макроглобулина в крови детей с дефицитом ретинола. Они коррелируют также с данными о снижении уровня сиаловых кислот в крови крыс при недостаточности витамина А [6]. Данных об электрофоретическом изучении состава ГП крови при недостаточности витамина А в литературе мы не обнаружили. Что касается полученных нами данных о влиянии дефицита витамина А на состав белковых фракций крови (окрашиваемых амидо черным), то они согласуются с результатами исследований других авторов, выявивших снижение относительного уровня альбуминов и повышение  $\gamma$ -глобулинов у крыс, содержащихся на рационе, свободном от витамина А [7].

Таким образом, полученные результаты подтверждают представление о необходимости ретинола для обеспечения синтеза ГП, в частности ГП, синтезируемых в гепатоцитах и лимфоидной ткани и секретируемых в кровь, и физиологической значимости этой функции витамина [10, 21]. В то же время они указывают на избиратель-



ное участие ретинола в синтезе отдельных, но не суммарных ГП, а также на неоднозначность действия этого витамина на гликозилирование белков, синтезируемых в печени ( $\alpha$ - и  $\beta$ -глобулины) и в лимфоидной ткани ( $\gamma$ -глобулины).

Предлагаемая нами трактовка полученных данных об изменениях состава ГП крови при авитаминозе А согласуется с выводами других авторов о том, что витамин А оказывает весьма селективное действие на синтез отдельных, но не суммарных ГП в слизистой кишечника [10, 19, 20], трахее [8, 9], крови [15, 17], причем его эффекты направлены преимущественно на процессы гликозилирования белков, а не на синтез их полипептидных цепей [9, 21].

Таким образом, результаты работы подтверждают положение о необходимости витамина А для образования ГП, дополняя его экспериментальными доказательствами, полученными: а) в условиях неглубокого дефицита витамина А, не осложненного вторичными неспецифическими нарушениями метаболизма; б) с помощью оценки содержания отдельных фракций ГП, а не скорости их синтеза, изучавшегося в большинстве работ с помощью оценки включения в ГП меченых сахаров. Тем самым наши данные служат указанием на важное физиологическое значение участия ретинола в метаболизме ГП.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Видершайн Г. Я. Биохимические основы гликозидозов.— М., 1980.
2. Ковь И. Я. // Теоретические и клинические аспекты науки о питании. Т. 4. Актуальные проблемы витаминологии.— М., 1983.— С. 42—50.
3. Ковь И. Я., Горгоцидзе Л. Ш., Кулакова С. П., Васильева О. П. // Биохимия.— 1986.— № 1.— С. 70—76.
4. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование.— М., 1981.
5. Хьюз Р. Гликопротеины.— М., 1985.
6. Чадаева П. И. Изменение содержания некоторых углеводных компонентов гликопротеидов в сыворотке крови и печени крыс в условиях А-витаминной недостаточности и при гипервитаминозе А: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— Горький, 1974.
7. Шарманов Т. Ш. Витамины А и белковое питание.— М., 1979.
8. Boniani F., Levinson S., Wolf G. et al. // Biochim. biophys. Acta.— 1973.— Vol. 297.— P. 441—451.
9. Boniani F., De Luca L. // Ibid.— 1974.— Vol. 343.— P. 632—637.
10. De Luca L. M. // Vitam. and Horm.— 1977.— Vol. 35.— P. 1—57.
11. De Luca L. M., Amado S., Bhat P. V. et al. // Pure appl. Chem.— 1979.— Vol. 51.— P. 581—585.
12. De Luca L. M., Creek K., Moore D. et al. // Structural Carbohydrates in the Liver / Ed. H. Proper.— Boston, 1983.— P. 33—49.
13. Fabricius H. A., Kottgen E. // Ibid.— P. 319—324.
14. Glossman K., Neville L. // J. biol. Chem.— 1971.— Vol. 246.— P. 6339—6346.
15. Kiorpes T., Molica S., Wolf G. // J. Nutr.— 1976.— Vol. 106.— P. 1659—1667.
16. Kiorpes T., Wolf G., Arroyave G. et al. // Amer. J. clin. Nutr.— 1979.— Vol. 32.— P. 1842—1849.
17. Kiorpes T., Andersen R., Wolf G. // J. Nutr.— 1981.— Vol. 111.— P. 2059—2067.
18. Krishnakanth T., Srinivas L., Lingh K. // Nutr. Rep. int.— 1981.— Vol. 24.— P. 901—907.
19. Olson J. A., Rojanapo W., Lamb A. // Ann. N. Y. Acad. Sci.— 1981.— Vol. 359.— P. 189—195.
20. Rojanapo W., Olson J., Lamb A. // Biochim. biophys. Acta.— 1980.— Vol. 633.— P. 386—400.
21. Wolf G. // Physiol. Rev.— 1984.— Vol. 64.— P. 873—931.

Поступила 19.12.89

#### EFFECT OF VITAMIN A ON COMPOSITION OF GLYCOPROTEIN FRACTIONS IN RAT BLOOD PLASMA

N. M. Shilina, I. Ya. Kon'

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

Content of main glycoprotein fractions was studied in rat blood plasma under conditions of vitamin A avitaminosis and of subnormal consumption of the vitamin. Main protein fractions were estimated simultaneously with relative content of glycoproteins which was calculated per mg of total proteins. Relative content of  $\gamma$ -glycoproteins was increased in avitaminosis A, which appears to occur due to elevation of  $\gamma$ -globulin synthesis in response to secondary infection or intoxication, while the level of  $\alpha_1$ - and  $\alpha_2$ -glycoproteins was decreased simultaneously as a result of possible impairment of protein glycosylation in liver tissue. Subnormal consumption of retinol did not alter content of many protein fractions in blood, however under these conditions absolute content of  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ - and  $\beta_2$ -glycoproteins as well as relative content of  $\alpha_2$ -glycoproteins were decreased, thus leading to increase in relative content of underglycosylated proteins in blood. Vitamin A appears to be essential for biosynthesis of individual but not of total blood glycoproteins.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 615.384:547.963.41.012.1.076.9

Н. П. Кузнецова, Л. Р. Гудкин, Р. П. Мишаева, Л. М. Страгович, Г. В. Самсонов, Е. А. Селиванов, И. М. Быстрова, К. А. Гербут, И. Е. Молоковская, П. И. Кочетыгов

#### ИССЛЕДОВАНИЕ РАСТВОРОВ ОЛИГОГЕМОГЛОБИНА IN VITRO И IN VIVO

Институт высокомолекулярных соединений АН СССР, Ленинград, Ленинградский НИИ гематологии и переливания крови Минздрава РСФСР

Значительное количество исследований в настоящее время связано с изучением растворов полигемоглобина, полученного поликонденсацией гемоглобина с глутаровым альдегидом [4, 7, 8]. Увеличение размеров макромолекулы гемоглобина приводит к более длительной циркуляции полигемоглобина в кровеносном русле, тогда как нативный гемоглобин быстро выводится из кровотока почками, необратимо повреждая их функцию. Увеличение эффективного размера макромолекулы гемоглобина приводит к ликвидации нефротоксичности и пролонгированию времени нахождения его в кровеносном русле [1, 5].

Целью настоящей работы является изучение поведения растворов олигогемоглобинов (ОГб) — конъюгатов гемоглобина с глутаровым альдегидом со средними молекулярными массами ( $M_w$ )  $100 \cdot 10^3$ — $400 \cdot 10^3$  in vitro, а также в экспериментах на животных при плеторическом введении, изоволюметрическом обменном замещении крови и геморрагическом шоке. Исследовали растворы ОГб, модифицированного пиридоксаль-5-фосфатом (ОГб-ПФ) [9].

Методика. Молекулярно-массовое распределение ОГб определяли методом гельпроникающей хроматографии на сефарозе-6В (колонка  $1,8 \times 50$  см, элюция 0,04 М фосфатным буфером рН 7,4 со скоростью 12 мл/ч, регистрация при 274 нм). Величину средневесовой молекулярной массы ( $M$ ) рассчитывали на основе молекулярно-массового распределения ОГб с использованием калибровочной зависимо-

Количество гемоглобина и ОГб, циркулирующих в плазме кролика

Раствор	Число экспериментальных животных	Количество гемоглобина или ОГб в плазме, % от введенного			
		1 ч	3 ч	5 ч	24 ч
Гемоглобин	2	40±3	26±4	15±4	—
ОГб ( $M_w 110 \cdot 10^3$ )	4	47±5	38±3	32±3	12±3
ОГб ( $M_w 260 \cdot 10^3$ )	3	71±7	59±7	47±5	21±2

сти методом, описанным в литературе [2]. Концентрацию ОГб определяли спектрофотометрически с ацетонциангидрином при 540 нм, степень автоокисления ОГб (количество метгемоглобина в % от общего количества гемоглобина) — при 635 нм [3].

Микроэлектрофорез проводили в термостатированной ячейке прямоугольного типа при 20 °С, увеличение 200 раз, градиент потенциала 10 В/см [4, 10].

Исследования по внутривенному введению растворов ОГб экспериментальным животным проводили при плеторическом введении кроликам (порода шиншилла, масса 2,0—2,5 кг) в ушную вену; при изоволемической замене крови крыс на растворы ОГб (~50 % от общего объема циркулирующей крови)<sup>1</sup>; на модели геморрагического шока у собак при 50 % кровопотере с 1-часовой гипотензией. После внутривенного введения растворов ОГб экспериментальным животным через определенные промежутки времени отбирали пробы крови, центрифугированием отделяли форменные элементы и в плазме определяли концентрацию гемоглобина и метгемоглобина, а также молекулярно-массовое распределение ОГб и величину  $M_w$ .

**Результаты и обсуждение.** Вопросы совместимости растворов ОГб с кровью связаны прежде всего с электрохимическими свойствами их макромолекул. В связи с этим методом микроэлектрофореза определяли подвижность эритроцитов человека в электрическом поле, в среде, представляющей растворы ОГб ( $M_w = 350 \cdot 10^3$ — $390 \cdot 10^3$ ) различных концентраций в физиологическом растворе. Подвижность эритроцитов в физиологическом растворе составляет около —1,1 мкм/с/В/см [6]. На рис. 1 представлены зависимости экспериментально измеряемой величины подвижности ( $\mu$ ) и величины подвижности эритроцитов с поправкой на изменение относительной вязкости среды  $\mu\eta$  от концентрации ОГб. Видно, что до концентрации ОГб 4—5 г/дл величина  $\mu\eta$  изменяется слабо; при увеличении концентрации до 10 г/дл эта величина возрастает в 2,5 раза.

Размеры макромолекул ОГб (его средняя величина  $M_w$ ) могут оказывать влияние на время циркуляции ОГб в кровеносном русле экспериментальных животных. Проводилось сопоставление времени функционирования в кровеносном русле растворов ОГб с  $M_w = 260 \cdot 10^3$ ;  $110 \cdot 10^3$  и раствора нативного гемоглобина с  $M_w = 65 \cdot 10^3$  при плеторическом введении кроликам в дозах 0,8—1 г/кг массы тела (табл. 1).

<sup>1</sup> Выражаем благодарность Е. И. Розовой за помощь в проведении биологических испытаний на крысах.

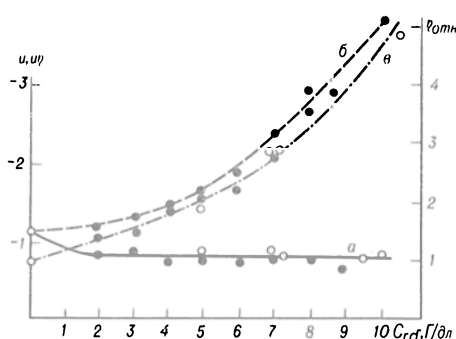


Рис. 1. Результаты микроэлектрофореза эритроцитов крови человека в растворах ОГб (черные кружки —  $M_w = 390 \cdot 10^3$ , светлые —  $M_w = 340 \cdot 10^3$ ) разных концентраций.

$\mu$  — электрофоретическая подвижность эритроцитов, ( $\mu\eta$ ) мкм/с/в/см;  $\eta_{отн}$  — электрофоретическая подвижность с учетом относительной вязкости среды  $\eta_{отн}$ ;  $\eta_{отн}$  — величина относительной вязкости растворов ОГб,  $\eta_{отн}$ .

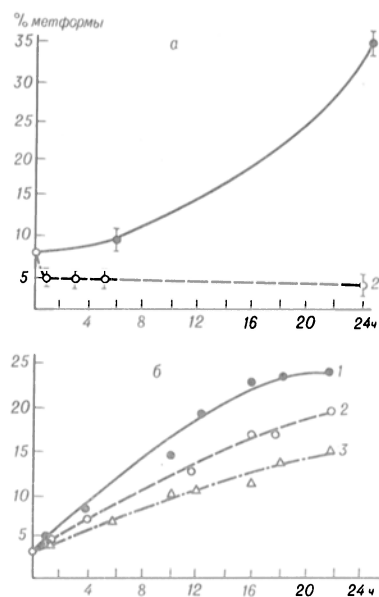


Рис. 2. Автоокисление растворов.

$\alpha$  — ОГб-ПФ; 1 — при инкубации *in vitro* в физиологическом растворе (37 °С); 2 — в плазме крови кролика при плеторическом введении (4 кролика);  $\beta$  — ОГб при инкубации *in vitro* (37 °С); 1 — в изотоническом растворе натрия хлорида; 2 — в присутствии плазмы крови человека, плазма: ОГб=1:2 (по объему); 3 — плазма: ОГб=1:1.

Из табл. 1 видно, что повышение  $M_w$  растворов ОГб увеличивает время его пребывания в кровеносном русле. При этом установлено, что плазма стабилизирует ОГб от автоокисления по сравнению с инкубированием того же раствора ОГб в физиологическом растворе при 37 °С (рис. 2). Скорость автоокисления зависит от исходной степени окисления растворов ОГб. Снижение степени окисления ОГб-ПФ в плазме может быть связано с быстрым выведением из кровотока окисленного продукта или даже восстановлением метформы в результате действия окислительно-восстановительных систем организма.

В модели геморрагического шока у собак в результате 50 % кровопотери и часовой гипотензии проводили введение растворов ОГб-ПФ с  $M_w = 260 \cdot 10^3$ — $290 \cdot 10^3$  в дозах 0,5—1,8 г/кг массы тела в сочетании с предварительным вливанием изотонического раствора хлорида натрия как самого по себе, так и с реополиглиукином в соотношении 1:1. Данные рис. 3 указывают, что через 1 сут в плазме собак сохраняется от 20 до 45 % циркулирующего ОГб-ПФ, через 2 сут — 10—15 %. Время полувыведения ОГб-ПФ составляет 12—18 ч. Следует отметить, что кривые имеют двустадийный характер: в первые

Изменение  $M_w$  и автоокисление растворов ОГб и ОГб-ПФ в плазме животных (при 50 % обменном замещении крови у крыс и возмещении 50 % кровопотери при геморрагическом шоке у собак)

Кровезамещающий раствор	Время циркуляции в крови, ч	$M_w \cdot 10^{-3}$	Метформа, % от количества гемоглобина
Собаки			
ОГб-ПФ (исх)	0	250	3,3
	1	260	5,4 — 7,5
	2	—	5,8 — 7,6
	24	340	10 — 18
	48	>400	—
Крысы			
ОГб (исх)	0	190	7
	1	210	0 — 2
	3	260	5 — 7
	5	300	9
ОГб (исх)	0	320	11
	2	360	—
	5	380	10 — 11
	8	>400	15

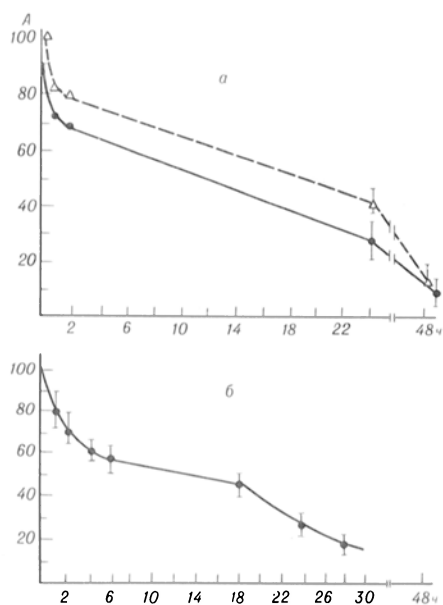


Рис. 3. Количество циркулирующего в плазме собак ОГб-ПФ.

а: 1 — введенного в изотоническом растворе натрия хлорида для лечения геморрагического шока (50 % кровопотери, 6 собак); 2 — введенного при геморрагическом шоке в сочетании с 5% раствором хлорида натрия и реополиглобина (50 % кровопотери, 2 собаки); б — количество циркулирующего ОГб ( $M_w = 320 \cdot 10^3$ ) в плазме крови при изоволемическом 50 % замещении крови на растворы ОГб (каждая точка — средняя для 3–5 животных). А — количество ОГб в плазме крыс (в % от введенного).

2 ч после введения раствора наблюдается наиболее интенсивное его удаление из кровеносного русла — до 20–30 % от введенного количества, дальнейшее выведение более замедленно. Это может быть связано с экскрецией почками фракции модифицированного низкомолекулярного гемоглобина, что отмечалось и ранее [1, 5]. Интересным сопоставлением является изоволемическое обменное замещение (50–60 %) крови крыс растворами ОГб в дозе 2 г/кг. Кривая выведения (каждая точка является результатом эксперимента с 3–5 животными) (см. рис. 3) практически совпадает с кривой выведения ОГб-ПФ при геморрагическом шоке у собак: кривая выведения имеет двухступенчатый характер, и величии периодов полувыведения совпадают. В отобранных пробах плазмы определялось молекулярно-массовое распределение ОГб и количество метформы (в %) по отношению к общему количеству ОГб в плазме. При сравнении с исходными данными продемонстрировано молекулярно-массовое перераспределение в растворах ОГб в плазме: удаление низкомолекулярной фракции и накопление макромолекул с высокими молекулярными массами. В табл. 2 представлены результаты изменения величины  $M_w$  в растворах ОГб в крови крыс (при 50 % изоволемическом обменном замещении) и ОГб-ПФ в крови собак (после возмещения 50 % кровопотери при геморрагическом шоке).

На основании исследования циркуляции растворов ОГб и ОГб-ПФ при плеторическом введении кроликам, изоволемической замене 50 % кровопотери у крыс и лечении геморрагического шока у собак (50 % кровопотери) показано продолжительное функционирование растворов ОГб и ОГб-ПФ в организме животных и незначительная его степень окисления в плазме.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Богомолова Л. Г., Самсонов Г. В., Щерба М. М. и др. // Проблемы гематологии и переливания крови. — 1979. — № 8. — С. 10–14.
2. Кузнецова Н. П., Самсонов Г. В. // Высокомолекул. соедин. — 1985. — Т. А27, № 12. — С. 2611–2614.
3. Кушаковский М. С. // Клинические формы повреждения гемоглобина. — Л., 1968. — С. 23.
4. Розенберг Г. Я., Макаров К. П. // Журн. Весоюз. хим. о-ва. — 1985. — Т. 30, № 4. — С. 387–394.
5. Самсонов Г. В., Щерба М. М., Богомолова Л. Г. и др. // Докл. АН СССР. — 1979. — Т. 248, № 1. — С. 254–256.
6. Харамоненко С. С., Ракитянская С. А. Электрофорез клеточек крови в норме и патологии. — Минск, 1974.
7. Fricova V., Pristupil T. J., Kramlova M. et al. // Coll. Czech. Chem. Commun. — 1981. — Vol. 46, N 8. — P. 1990–1993.
8. Keipert P. E., Chang T. M. S. // Appl. biochem. Biotechnol. — 1984. — N 10. — P. 133–141.
9. Sehgal L. R., Rosen A. L., Gould S. A. et al. // Transfusion. — 1983. — N 23. — P. 148–152.
10. Tenford T. // Advances in Biological and Medical Physics / Eds J. H. Lawrence, J. W. Gofman, T. L. Hayes. — London, 1970. — Vol. 13. — P. 43–107.

Поступила 26.07.89

## PROPERTIES OF OLIGHEMOGLOBIN SOLUTIONS IN VIVO AND IN VITRO

N. P. Kuznetsova, L. R. Gudkin, R. N. Mishaeva, L. M. Stragovich, G. V. Samsonov, E. A. Selivanov, I. M. Bystrova, K. A. Gerbut, I. E. Molokovskaya, N. I. Kochelygov

Institute of High Molecular Substances, Academy of Sciences of the USSR, Institute of Hematology and Blood Transfusion, Ministry of Public Health of the RSFSR, Leningrad

Solutions of oligohemoglobins (OHB) with middle molecular mass  $100 \cdot 10^3 = 400 \cdot 10^3$ , obtained after polycondensation of hemoglobin with glutaric aldehyde as well as oligohemoglobin modified with pyridoxal-5-phosphate, were studied *in vivo* and *in vitro* (plethoric administration, isovolemic metabolic substitution, hemorrhagic shock; at a dose of 0.5–1.8 g/kg of body mass; dogs, rabbits, rats). With increase of the OHB molecular mass period of its circulation in blood was elevated; blood plasma protected OHB from autooxidation; half-life of OHB was about 12–18 hrs in isovolemic metabolic substitution and in hemorrhagic shock and about 5 hrs — in plethoric administration. During circulation molecular mass selection of OHB occurred, where low molecular fraction decreased and high molecular fraction — accumulated; sign and value of human erythrocyte charge were similar both in OHB solutions with concentration up to 5 % and in physiological solution.

Е. В. Рюмина, Л. В. Галевская, И. Г. Щербак

## ВЛИЯНИЕ ПЛАЗМИНА НА КОМПЛЕМЕНТ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

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

В последнее время большой интерес исследователей привлекает проблема взаимодействия компонентов протеолитических систем крови. Фермент, занимающий центральное место в процессе фибринолиза, плазмин (КФ.3.4.21.7) благодаря своей широкой субстратной специфичности способен катализировать гидролиз многих белков крови, таких как фибрин, фибриноген,  $\gamma$ -глобулин, факторы свертывания крови (V, VII), факторы комплемента [1].

Активный плазмин постоянно образуется в кровяном русле из плазминогена под действием протеаз, получивших название «активаторы плазминогена», и находится под контролем эндогенных белковых ингибиторов:  $\alpha_2$ -макроглобулина,  $\alpha_1$ -антитрипсина, интер- $\alpha$ -трипсинового ингибитора, С1-ингибитора, комплекса антитромбин III — гепарин [4].

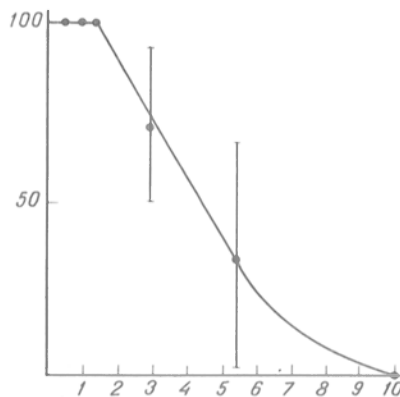
Однако при некоторых состояниях организма активность плазмينا может значительно возрастать, что приводит к выходу его из-под контроля регуляторных систем и сопровождается катализируемым им расщеплением ряда белков [1]. Кроме того, препараты плазмина и активаторов плазминогена широко используются в клинической практике. При воздействии плазмина на белки крови, помимо тромболитического эффекта, наблюдается разрушение других белков крови, что приводит к возникновению осложнений.

Мы исследовали влияние высоких доз активного плазмина на общую гемолитическую активность сыворотки крови человека, а также активность комплемента по классическому (КПК) и альтернативному (АПК) пути.

**Методика.** Объектом исследования служила сыворотка крови здоровых доноров. В качестве источника плазмина использовали коммерческий препарат фибринолизина (НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова АМН СССР).

Гемолитическую активность комплемента определяли кинетическим методом [6]. В качестве активатора комплемента и объекта проявления его литической активности использовали эритроциты кролика. Эритроциты трижды отмывали в физиологическом растворе и один раз в вероналовом буфере рН 7,2, содержащем 0,1 % желатин (GVB). Готовили стандартную взвесь эритроцитов в GVB, содержащую  $1,2 \cdot 10^7$  клеток в 1 мл. Скорость лизиса клеток определяли в термостатированной при 37 °С кювете спектрофотометра СФ-46 по снижению оптической плотности при 800 нм. При исследовании активности комплемента инкубационная смесь состояла из сыворотки крови (0,02–0,1 мл), 0,2 мл GVB, содержащего 5 мМ  $MgCl_2$ , 0–0,2 мл раствора фибринолизина (1 мг/мл), GVB до объема 0,7 мл. Смесь инкубировали 3 мин. Реакцию комплементзависимого лизиса начинали добавлением 0,1 мл стандартной взвеси эритроцитов. Влияние плазмина на АПК исследовали аналогичным образом. Ингибирование КПК осуществляли путем хелатирования ионов кальция этилендиолтетраацетатом (ЭГТА). Для этого в инкубационную смесь добавляли 0,4 мл 10 мМ раствора ЭГТА.

Для изучения влияния плазмина на КПК получали сыворотку, дефицитную по компоненту альтернативного пути — фактору D [5].



Зависимость общей активности комплемента сыворотки крови человека от концентрации препарата плазмина.

По оси абсцисс — концентрация плазмина (в мг на 1 мл сыворотки); по оси ординат: активность комплемента (в % от исходной в отсутствие плазмина). Каждая точка на графике — среднее из 7 определений.

Выделение и очистку компонента С3 осуществляли из смешанной донорской сыворотки по методу [3]. Метод включал осаждение эуглобулиновой фракции сыворотки при рН 5,6, ионообменную хроматографию отмывого ресуспендированного осадка на колонке с ДЭАЭ-сефацелом и гель-фильтрацию с использованием ультрагеля АСА-34. Степень очистки С3 — 30 раз, содержание белка в препарате около 1,5 мг/мл.

Тестирование С3 во фракциях и определение его гемолитической активности проводили методом реагентов. Препарат, дефицитный по С3, получали следующим образом: в донорскую сыворотку добавляли монометиламин (ММА) до концентрации 100 мг/мл; смесь инкубировали 1 ч при 37 °С, избыток ММА удаляли путем диализа против физиологического раствора при 4 °С в течение 24 ч. С помощью полученного препарата и очищенного компонента С3 исследовали влияние плазмина на данный компонент комплемента.

**Результаты и обсуждение.** Результаты исследования влияния различных концентраций плазмина на общую гемолитическую активность комплемента сыворотки крови человека представлены на рисунке. Добавление к сыворотке крови плазмина до концентрации 1,5 мг/мл не приводило к изменению активности комплемента. Это может быть связано как с существованием антипротеолитической активности в сыворотке крови, так и с воздействием плазмина на компоненты комплемента, не являющимися лимитирующими в условиях цельной сыворотки. Первое объяснение является бесспорным, так как в плазме крови имеется определенный антипротеолитический потенциал. Повышение концентрации плазмина приводило к дозозависимому снижению гемолитической активности комплемента. Плазмин в концентрациях 10 мг/мл и выше полностью инактивировал комплемент. Обращает на себя внимание то, что эффект плазмина в концентрациях, инактивирующих комплемент частично, сильно различается в разных индивидуальных сыворотках. В литературе описан аналогичный характер зависимости активности комплемента от концентрации добавляемого в сыворотку крови трипсина [9]. Несмотря на то что трипсин способен осуществлять гидролиз практически любого из изолированных компонентов комплемента, в цельной сыворотке основной мишенью его воздействия является компонент С3. Белок С3 занима-

ет центральное положение в протеолитическом каскаде комплемента; принимает участие в активации комплемента как по классическому, так и по альтернативному пути. При исследовании влияния эффективной дозы плазмина отдельно на активацию комплемента по АПК и КПК, а также на общий комплемент достоверных отличий не обнаружено. Это может являться свидетельством того, что плазмин разрушает компонент комплемента, участвующий как в классическом, так и альтернативном пути активации системы комплемента. Такими белками, общими участниками КПК и АПК, являются компонент С3 и компоненты мембранной атаки (С6, С7, С8, С9). Гемолитическую активность С3 мы определяли с помощью препарата, дефицитного по С3, но содержащего все конечные компоненты комплемента. При использовании этого метода, как нами было показано ранее [2], скорость комплементзависимого лизиса чужеродных эритроцитов — активаторов комплемента — зависела не только от активности компонента комплемента, но и от свойств полученного препарата. Регистрацию комплементинактивирующего эффекта плазмина мы производили при постоянной концентрации С3-дефицитного препарата и разных концентрациях добавляемого к препарату очищенного С3, а также при заданной концентрации С3 и изменении содержания в инкубационной смеси препарата, дефицитного по С3.

Степень снижения гемолитической активности комплемента под действием плазмина мало зависела от начальной (полученной в контрольных опытах) скорости комплементзависимого гемолиза ( $r=0,33$ ). Вместе с тем обнаружена выраженная отрицательная корреляция ( $r=-0,8$ ) между степенью инактивирующего комплемент воздействия плазмина и концентрацией С3.

Плазмин, подобно трипсину, обладает широкой субстратной специфичностью. Имеются данные о гидролизе плазмином компонентов С1, В, С3 [7, 8]. Результаты наших экспериментов свидетельствуют, что при повышении концентрации плазмина в сыворотке крови снижение ее гемолитической активности обусловлено в первую очередь разрушением С3.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Веремеенко К. П., Голобородько О. П., Кизим А. И. Протеолиз в норме и при патологии. — Киев, 1988.
2. Галебская Л. В., Бельтюков П. П., Рюмина Е. В. Влияние аргинина и его производных на активность протеиназ альтернативного пути комплемента человека. Деп. в ВИНТИ. № 2648-В88, С. 33—54.
3. Козлов Л. В., Шибанова Е. Д., Зинченко А. А. // Биохимия. — 1987. — Т. 52. № 4. — С. 660—666.
4. Коллени Д., Уимэн Б. // Фибринолиз. Современные фундаментальные и клинические концепции. — М., 1982. — С. 28—37.
5. Соляков Л. С., Козлов Л. В. // Биоорганическая химия. — 1983. — Т. 9, № 4. — С. 462—469.
6. Халыпин Б. Д., Проконьев А. П. // Иммунология. — 1986. — № 3. — С. 66—69.
7. Cooper N. R. // *Advanc. Immunol.* — 1985. — Vol. 37. — P. 151—216.
8. Ikari N., Niinobe M., Fujii S. // *FEBS Lett.* — 1981. — Vol. 131, N 1. — P. 143—146.
9. Lassin A., Ohlsson K. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1982. — Vol. 709, N 2. — P. 227—233.

Поступила 20.03.90

#### INFLUENCE OF PLASMIN ON HUMAN BLOOD SERUM COMPLEMENT SYSTEM

E. V. Riumina, L. V. Galebskaya, I. G. Scherbak

I. P. Pavlov I Medical School, Leningrad

Plasmin exhibited the dose-dependent inactivating effect on human blood serum hemolytic complement both in classic and alternative pathways. Negative correlation ( $r=-0.8$ ) was found between the rate of complement inactivation and content of C<sub>3</sub> component. Plasmin appears to hydrolyze mainly the C<sub>3</sub> component of complement as a result of which hemolytic activity of complement is decreased.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616.151.4-02:616.155.1-008.939.6+  
+616.155.1-008.939.15-02:616-008.6-001.361-092.9

И. Б. Захарова, И. В. Хвостова, Р. Ф. Шведова

#### ЗНАЧЕНИЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ БЕЛКОВОГО И ЛИПИДНОГО СОСТАВА ЭРИТРОЦИТНЫХ МЕМБРАН В РАЗВИТИИ СНИЖЕНИЯ ТЕКУЧИХ СВОЙСТВ КРОВИ ПРИ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ СОСТОЯНИЯХ

Саратовский медицинский институт

Изменение структурно-функциональных свойств цитоплазматических мембран считают основным признаком повреждения тканевых структур при экстремальных состояниях [1, 2], формирующим «необратимые» нарушения клеточного метаболизма [4].

Моделью цитоплазматической мембраны, активно участвующей в развитии ответной реакции организма на экстремальные воздействия, выбрана мембрана эритроцитов. Основным признаком ее повреждения при экстремальных состояниях становится потеря эритроцитами текучих свойств [5, 7]. Целью исследования явилось определение типичных изменений липидного и белкового состава эритроцитных мембран, сопровождающих при экстремальных состояниях потерю эритроцитами деформируемости.

Методика. Анализ изменений состава белков и липидов эритроцитных мембран проведен при двух видах экспериментальных экстремальных состояний с известными различиями в механизмах повреждения цитоплазматических мембран: стафилококковом токсикозе и постишемическом синдроме. В процессе развития стафилококкового токсикоза происходит избирательное поражение эритроцитных мембран стафилококковым токсином [3], а при постишемическом синдроме повреждение эритроцитов связано с поступлением в общий кровоток продуктов аутолиза из ишемизированной конечности [8].

При воспроизведении модели экспериментального стафилококкового токсикоза животным вводили внутривенно стафилококковый токсин (НИИЭМ АМН СССР им. П. Ф. Гамалеи, серия 19—4). При воспроизведении модели постишемического синдрома на переднюю и заднюю конечности кролика накладывали кровоостанавливающие жгуты на 6—7 ч. Предварительно животных наркотизировали тиопенталом натрия (1,5—2 мл 1% раствора на 1 кг массы кролика, внутривенно). Степень ишемии конечностей контролировали по показателям электромиолической возбудимости.

Кровь для исследования получали из вены уха животных до воспроизведения модели, на ранней (через 15 мин после введения токсина или через 1—2 ч после снятия жгутов) и на поздней (через 180 мин после введения токсина или через 20—22 ч после снятия жгутов) фазах раз-

вития интоксикации. Кровь собирали в силиконовую посуду с 3,8 % раствором цитрата натрия (1:9).

Свойства эритроцитов изучали методом фильтрации [11, 12]. Кровь разводили до величины гематокрита 20 % и определяли способность эритроцитов за 20 мин проходить через фильтр «Сынпор-1» с порами диаметром 3—5 мкм. Результаты выражали в процентах объема эритроцитов, прошедших за 20 мин через фильтр «Сынпор-1», и обозначали как показатель фильтруемости (Ф).

Для изучения функциональных свойств эритроцитных мембран клетки выделяли из крови путем центрифугирования в течение 15 мин при 1000 g при 5 °С.

Липидный состав эритроцитов изучали после двукратного отмывания клеток от плазмы 0,2 М фосфатным буфером (рН 7,4). Проводили экстракцию липидов из эритроцитов смесью хлороформ — метанол (2:1) в соотношении 1:20. Из хлороформного слоя с помощью вакуумного испарителя получали пленку липидов, из которой готовили раствор в хлороформе, в котором определяли содержание холестерина (ХС) и фосфолипидов (ФЛ) [9, 13].

Белковый состав эритроцитных мембран изучали после гемолиза клеток в пятикратном объеме 30 мМ раствора трис-НСI-буфера (рН 7,4). Гемолизат центрифугировали при 12 000 g в течение 20 мин при 4 °С. После удаления надосадочной жидкости осадок промывали в гемолизирующем буфере при том же режиме центрифугирования до получения светло-розового осадка теней эритроцитов.

Содержание белка и молекулярную массу белковых фракций эритроцитных мембран изучали после растворения осадка «теней» клеток в растворе, содержащем 1 % додецилсульфата натрия, 5—10 % сахарозы, 10 мМ трис-НСI-буфера (рН 7,4), 1 мМ ЭДТА-Na, 40 мМ β-меркаптоэтанол, до концентрации белка в растворе 200 мкг в 0,1 мл. Разделение белков эритроцитных мембран проводили в 7,5 % полиакриламидном геле, содержащем 1 % додецилсульфата натрия [10, 14]. В качестве стандартов при электрофорезе использовали альбумин крови быка, пируваткиназу, алкоголь-дегидрогеназу, пероксидазу, трипсин, трипсин ингибитор («Reanal», Венгрия). После проведения электрофореза гели отмывали от додецилсульфата натрия и окрашивали амидо черным. В выбранной системе растворителей для электрофореза подвижность 6 фракций белков мембраны оставалась устойчивой и рассчитывалась по отношению пути миграции фракции к фронту бромфенолового свидетеля.

Для изучения изменения деформируемости (Д) эритроцитов проведено 46 экспериментов, в которых кровь для исследования брали у 13 животных на ранней фазе стафилококкового токсикога, у 11 — на поздней фазе, у 12 — в раннем периоде постинемического синдрома, у 12 — в позднем периоде.

Изменения липидного спектра эритроцитных мембран изучали в 16 экспериментах (в 6 — стафилококковый токсикоз, в 10 — постинемический синдром). Белковый состав эритроцитных мембран изучали в 28 экспериментах (в 14 — стафилококковый токсикоз, в 14 — постинемический синдром).

Результаты исследования обработаны с использованием обычных методов альтернативного и вариационного анализа. Различия считали значимыми при уровне надежности 0,05 и выше.

**Результаты и обсуждение.** Анализ результатов исследования показал, что в процессе развития ответной реакции организма на экстремальные воздействия снижаются текущие свойства эритроцитов (табл. 1). Клетки отличаются увеличением показателя Д ( $p < 0,001$ ) и снижение процента фильтруемых эритроцитов (до 29,7—39,7). Полное снижение способности проходить через фильтр имеют клетки, полученные у животных в позднем периоде стафилококкового токсикога. При фильтрации эти клетки вызывают «реологическую закупорку» фильтра.

Степень изменения липидного состава эритроцитных мембран в процессе развития ответной реакции организма также зависит от вида использованного токсина (табл. 2). При стафилококковом токсикоге в мембранах эритроцитов снижается содержание ФЛ и ХС. При постинемическом синдроме на ранней фазе процесса снижается только уровень ХС (до 54,1 % от уровня

Изменение деформируемости эритроцитов при экстремальных состояниях

Время опыта	Д, ед.	Ф, %
Контрольная группа ( $n=17$ )	$1,64 \pm 0,02$	$51,9 \pm 1,97$
Ранний стафилококковый токсикоз ( $n=13$ )	$1,87 \pm 0,04^*$	$34,5 \pm 2,13^*$
Поздний стафилококковый токсикоз ( $n=11$ )	$3,25 \pm 0,07^*$	Реологическая закупорка фильтра
Ранний постинемический синдром ( $n=12$ )	$1,83 \pm 0,02^*$	$29,7 \pm 1,42^*$
Поздний постинемический синдром ( $n=12$ )	$2,69 \pm 0,07^*$	$39,7 \pm 2,09^*$

\*  $p < 0,001$ .

Таблица 2

Изменения содержания ХС и ФЛ эритроцитов при экстремальных состояниях

Вариант опыта	ХС, ммоль/л	ФЛ, ммоль/л
Контрольная группа ( $n=7$ )	$3,48 \pm 0,31$	$6,98 \pm 0,21$
Ранний стафилококковый токсикоз ( $n=7$ )	$1,01 \pm 0,18^*$	$1,5 \pm 0,33^*$
Поздний стафилококковый токсикоз ( $n=6$ )	$0,98 \pm 0,22^*$	$1,2 \pm 0,23^*$
Ранний постинемический синдром ( $n=10$ )	$2,07 \pm 0,26^{**}$	$7,08 \pm 0,33$
Поздний постинемический синдром ( $n=8$ )	$2,03 \pm 0,24^{**}$	$1,99 \pm 0,23^*$

\*  $p < 0,001$ .

\*\*  $p < 0,01$ .

нормы;  $p < 0,01$ ), количество ФЛ уменьшается в позднем периоде ответной реакции организма на действие продуктов клеточного аутолиза. Содержание ФЛ в эритроцитах снижается более значительно, чем уровень ХС. Это приводит к увеличению соотношения ХС/ФЛ (до 133—225 % от уровня нормы). Такое увеличение содержания ХС в эритроцитных мембранах способствует сближению остатков жирных кислот в фосфолипидном бислое и понижению его жидкостных и микровязкостных свойств.

Анализ белкового состава эритроцитных мембран интактных животных выявил 6 основных белковых фракций с довольно устойчивой подвижностью (табл. 3). Содержание белка в них определено одновременно с расчетом их молекулярной массы. Фракции 1 и 2 отнесены к спектринным белкам с мол. м. 75 000 и 70 000, фракция 3 — к белку III фракции с мол. м. 66 000, фракция 4 — к белкам IV фракции с мол. м. 55 000, фракция 5 — к актину с мол. м. 33 000, фракция 6 — к дегидрогеназе-3-фосфоглицеринового альдегида с мол. м. 13 000.

При токсикогах изменяются содержание фракций и их подвижность. Наиболее выраженные изменения в составе белковых фракций определяются в мембранах, выделенных из эритроцитов животных в позднем периоде ответной реакции организма на действие токсинов. В позднем периоде стафилококкового токсикога в мембранах снижается содержание белков в спектринных

Белковый спектр стромы эритроцитов при экстремальных состояниях

Фракция и молекулярная масса	Контрольная группа (n=17)	Поздний стафилококковый токсикоз (n=14)	Поздний постишемический синдром (n=14)
I (спектрин), 75 000	23,8±0,16	18,9±1,19	32,67±2,23**
II (спектрин) 70 000	27,5±2,36	16,4±1,41**	21,58±3,02
III, 66 000	16,5±1,32	6,4±2,31**	11,2±1,50*
IV, 55 000	10,4±0,93	27,9±2,42	8,04±1,97***
V (актин), 33 000	9,95±1,35	Приходится на 2 фракции Мол. м. от 39 800 до 17 000	Приходится на 2 фракции Мол. м. от 39 800 до 31 000
VI, 13 000	11,3±2,55	30,4±2,64***	26,24±4,44*

\*  $p < 0,05$ .\*\*  $p < 0,01$ .\*\*\*  $p < 0,001$ .

фракциях и белке III фракции. Одновременно увеличивается количество белка в низкомолекулярных фракциях. Вместо 4-й и 5-й фракций мембранных белков определяется комплекс протеинов с мол. м. 39 800 и 17 600. Содержание белка в нем в 2,4 раза превышает его количество у интактных кроликов. Кроме того, в 2,69 раза нарастает содержание белка в VI фракции. При постишемическом синдроме изменение состава белковых фракций эритроцитных мембран менее выражено. В 1-й спектриновой фракции количество белка повышается в 1,41 раза ( $p < 0,01$ ). Содержание белка в 3-й фракции снижается, почти в 2 раза уменьшается его уровень в 4-й и 5-й фракциях вместе. Последние выявляются в виде одной фракции с мол. м. от 39 800 до 31 000. В 6-й фракции количество белка увеличивается в 1,87 раза ( $p < 0,001$ ).

Наиболее значимым среди выявленных изменений в составе белковых фракций эритроцитных мембран является снижение содержания белков ее высокомолекулярных фракций, таких как белок III фракции и спектрин. Изменения в содержании этих белков характеризуют степень повреждения основных структур, входящих в состав белковых доменов мембраны и определяющих их функциональную активность.

Изменение состава белков и липидов эритроцитной мембраны при каждом из изучаемых токсикозов является одной из важных составляющих снижения текущих свойств эритроцитов. Разрушение липопротеидных структур оболочек эритроцитов начинается с процессов, вызывающих разрушение липидного бислоя клеток. Это происходит в начальном периоде ответной реакции организма на действие токсинов. Процессы разрушения липидного матрикса эритроцитных мембран, по-видимому, возникают в результате активации реакций перекисного окисления липидов и снижения антиоксидантной защиты эритроцитов, повышения активности фосфолипаз и эстерификации ХС. Они становятся причиной изменения структурной организации липидного бислоя оболочки и повреждения белкового скелета мембраны. Его разрушение затрагивает все белки, формирующие мембранные домены, от основных интегральных протеинов до спектрин-актиновой сети, и становится причиной снижения эластичности эритроцитов. В итоге эритроциты в позднем периоде токсикозов превращаются в ригидные клетки, застревающие в капиллярном русле.

Изменения липопротеидного состава эритроцитных мембран определяет степень снижения Д эритроцитов. Так, при стафилококковом токсикозе быстрое разрушение липидного матрикса эритроцитных мембран приводит к повреждению значительной части белковых доменов оболочки, интегральных белков и спектрин-актиновой сети. Этот процесс лежит в основе полной потери популяций циркулирующих эритроцитов Д, превращения их в ригидные формы, блокирующие микрососудистое русло. При постишемическом синдроме постепенное изменение липидного и белкового состава эритроцитных оболочек, сохранение их спектрин-актинового скелета вызывают частичное снижение Д-эритроцитов.

Таким образом, при воздействии на организм стафилококкового токсина и комплекса продуктов клеточного аутолиза из ишемизированных тканей одной из важных составляющих ответной реакции организма становится процесс разрушения липопротеидных структур эритроцитных оболочек. Его можно отнести к проявлению неспецифического адаптационного синдрома клеточных систем организма при экстремальных состояниях.

Эритроциты становятся одной из первых клеточных структур, включающихся в ответную реакцию организма на повреждение. В начальном периоде экстремальных состояний повреждение липидного бислоя оболочки, по-видимому, представляет собой приспособительную реакцию эритроцитов на действие токсинов. Лишаясь части своего липидного матрикса, клетки способствуют нейтрализации действия токсинов. Дальнейшее разрушение оболочки эритроцитов, захватывающее белковые домены мембраны и спектрин-актиновую сеть, вызывает трансформацию клеток в ригидные формы, застревающие в капиллярном русле. В нем продолжается дальнейшее разрушение оболочки эритроцитов, которое становится источником повышенного выброса в кровотоке липопротеидных структур, обладающих тромбопластиновой активностью, закупорки микрососудов, увеличения периферического сопротивления кровотоку. Появление признаков разрушения цитоскелета эритроцитов означает включение клеток в формирование явлений гемореологического синдрома, способствующего переводу ответной реакции организма при экстремальных состояниях в позднюю фазу.

Знание механизмов развития повреждения эритроцитных оболочек при экстремальных состояниях может быть использовано при разработке

методов лечения «критических состояний», основой развития которых считается появление в кровотоке большого количества токсичных веществ. Методы, способствующие сохранению липидного и белкового матрикса эритроцитных мембран или его освобождению от токсичных продуктов, в комплексе с интенсивной терапией могут значительно повысить эффективность лечения «критических состояний».

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Владимирова Ю. А., Коган Э. М. // Кардиология. — 1981. — Т. 21, № 1. — С. 82—85.
2. Владимирова Ю. А. // Труды 2-го Моск. мед. ин-та. — 1987. — Т. 72, вып. 1. — С. 129.
3. Иванов П. Р., Бриль И. Е. Молекулярно-клеточные аспекты патогенного действия альфа-токсина. — Саратов, 1985.
4. Лопухин Ю. М., Коган Э. М., Караганов Я. Л. Ультраструктурные основы жизнеспособности печени, почек, сердца. — М., 1977.
5. Маркин В. С., Козлов М. М. // Биомембраны. — 1986. — Т. 3, № 5. — С. 519—535.
6. Мачабели М. С., Крымский Л. Д. // Анест. и реаниматол. — 1984. — № 4. — С. 68—73.
7. Селезнев С. А., Назаренко Г. И., Зайцев В. С. Клинические аспекты микроциркуляции. — Л., 1985.
8. Шальнев А. П., Левандовский И. В., Оксман Т. М. // Бюл. экпер. биол. — 1979. — Т. 87, № 6. — С. 536—539.
9. Abell L. L., Brodic B. B., Kendall F. E. // Standard Methods of Clinical Chemistry. — New York, 1958. — Vol. 2. — P. 26—33.
10. Freibanks G., Palet V., Dino J. // Scand. J. clin. Lab. Invest. — 1981. — Vol. 41, Suppl. 566. — P. 139—144.
11. Tannert C., Lux W. // Acta biol. med. germ. — 1981. — Vol. 40, N 6. — P. 739—742.
12. Teitel P. // Nouv. Rev. franç. Hemat. — 1984. — Vol. 4. — P. 68—73.
13. Vaskowsky V. E., Kostetsky E. Y., Vasedin J. M. // J. Chromatogr. — 1975. — Vol. 114. — P. 129—141.
14. Weber K., Osborn M. // J. biol. Chem. — 1963. — Vol. 244. — P. 4408—4410.

Поступила 21.09.88

#### IMPAIRMENT OF ERYTHROCYTE MEMBRANE PROTEIN AND LIPID COMPOSITION AS A FACTOR OF DECREASE IN BLOOD FLOW PROPERTIES UNDER EXTREME CONDITIONS

N. B. Zakharova, N. V. Khvostova, R. F. Shvedova

Medical School, Saratov

Protein and lipid composition of erythrocyte membranes as well as loss of erythrocyte filtrability were studied in two experimental models: staphylococcal toxicosis and post-ischemic syndrome. Lipid spectrum of erythrocytes was studied in 16 experiments, protein composition — in 28 experiments and deformation of erythrocytes — in 46 experiments. Considerable destruction of erythrocyte membrane protein moiety and of lipid composition were found under extreme conditions involving distinct loss of phospholipid bilayer and decrease in content of main high molecular proteins. These impairments of erythrocyte membranes and a decrease in erythrocyte flow properties may be referred as principal reasons for development of microcirculation disturbance and of microvascular channel blockade. The alterations observed appear to be responsible for occurrence of components with various ability to aggregation in body fluid media as well as for development of disseminated intravascular coagulation in microcirculation.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616.24-036.12-085.38.015.2:615.831.4]-036.8-07:616.155.34-008.9

Е. Б. Меньщикова, Н. К. Зенков, Д. И. Азбель, И. Д. Сафронов

#### ВЛИЯНИЕ УФ-ОБЛУЧЕНИЯ НА МЕТАБОЛИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ГРАНУЛОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Институт клинической и экспериментальной медицины СО АМН СССР, Новосибирск

В последние годы широко применяются немедикаментозные методы терапии, к которым относится аутотрансфузия УФ-облученной крови (ЛУФОК) с использованием аппарата «Изольда». Метод эффективен при целом ряде заболеваний, особенно гнойно-воспалительной природы (перитонит, гнойный парапроктит, фурункулез, пневмония), что подтверждается выраженным влиянием ЛУФОК-терапии на функциональное состояние гранулоцитов крови — важного звена неспецифической резистентности. После курса ЛУФОК-терапии показано повышение содержания катионных белков в нейтрофильных гранулоцитах, вне- и внутриклеточной бактерицидной активности, фагоцитарной активности [2, 3].

Действие УФ-облучения крови на гранулоциты может осуществляться посредством нарушения мембран и активации дегрануляции в самих клетках [4] либо влияния УФ-облученных липид-белковых структур сыворотки и других клеточных элементов на функциональное состояние гранулоцитов [1]. Однако в этом вопросе много неясного и на практике многие исследователи отмечают неоднозначность действия ЛУФОК-терапии в зависимости от начального состояния полиморфно-ядерных лейкоцитов крови и количества сеансов УФ-облучения [2].

Одной из важнейших характеристик полиморфно-ядерных лейкоцитов крови является активность метаболического «взрыва», т. е. способность к ряду метаболических изменений при стимуляции клеток, которые приводят к наработке высокореакционных активированных кислородных метаболитов (АКМ):  $O_2$ ,  $O_3$ ,  $OH$ ,  $OH^+$ ,  $H_2O_2$ ,  $HOCl$  и др. В настоящей работе мы исследовали влияние УФ-облучения *in vitro* и ЛУФОК-терапии на метаболическую активность гранулоцитов крови, определяемую по хемилюминесценции (ХЛ).

Методика. ЛУФОК-терапию проводили 15 больным с хроническими неспецифическими заболеваниями легких (ХНЗЛ) по общепринятой схеме на аппарате «Изольда» (объем крови 2 мл на 1 кг массы тела). Кровь для анализа брали из вены в пробирки с гепарином (10 ЕД на 1 мл крови) непосредственно перед УФ-облучением и сразу после сеанса.

УФ-облучение крови *in vitro* проводили в полиэтиленовых пробирках диаметром 5 мм лампой ДРШ-250, световая мощность излучения с учетом поглощения пробирок составляла 8 Вт/см<sup>2</sup>. После экспозиции в течение определенного времени кровь из пробирки без промедления брали в измерительную кювету блока регистрации.

Наработку АКМ гранулоцитами крови определяли по ХЛ с люминолом ( $10^{-5}$  М) в разведенных (1:10) образцах цельной крови при стимуляции зимозаном (2 мкг/мл) по методике [5]. Интенсивность ХЛ измеряли при 37 °С на установке «Фотон» производства СОПКТБ СО ВАСХНИЛ.

При статистической обработке материала использован критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение. При стимуляции гранулоцитов неопсонизированными части-



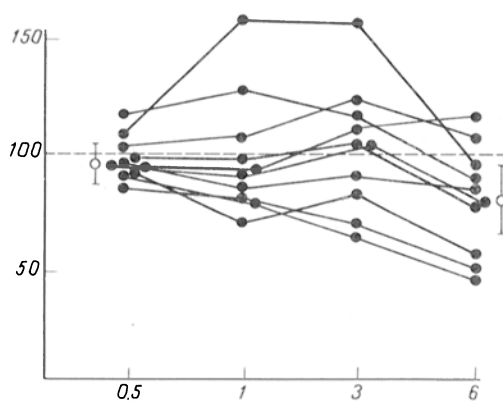


Рис. 1. Зависимость интенсивности ХЛ гранулоцитов периферической крови от времени УФ-облучения *in vitro*.

По оси абсцисс — время облучения (в мин); по оси ординат — интенсивность ХЛ (в % от исходного значения, принятого за 100 %).

цами зимозана в образцах разведенной крови наблюдается усиление интенсивности ХЛ с максимумом в пределах 10—25 мин после стимуляции. Время наступления максимума свечения характеризует опсоническую активность сыворотки крови, интенсивность при максимуме свечения — суммарную метаболическую активность гранулоцитов [5].

После УФ-облучения в разных дозах крови больных с ХНЗЛ *in vitro* время наступления максимума свечения не изменялось, что указывает на сохранение опсонических свойств плазмы. Однако интенсивность свечения гранулоцитов периферической крови у разных людей варьировала в зависимости от индивидуальных особенностей и дозы облучения (рис. 1). При экспозиции УФ-светом в течение 30 с (доза облучения соответствует значению, которое получает кровь за сеанс ЛУФОК-терапии) изменение интенсивности ХЛ гранулоцитов не превышает 10 % от значения для необлученной крови ( $97,4 \pm 3,1$  %). При увеличении дозы облучения интенсивность ХЛ-ответа крови разных людей может как возрастать, так и снижаться, однако экспозиция УФ-светом в течение 6 мин приводила к достоверному уменьшению интенсивности ХЛ-ответа ( $78,3 \pm 7,7$  %).

При ЛУФОК-терапии статистически значимых различий метаболической активности гранулоцитов до и после сеанса не обнаружено, поэтому с целью снижения методической ошибки эти показатели были объединены в одну группу. Время наступления максимума свечения в ходе процедуры ЛУФОК также не изменялось, хотя у 4 больных наблюдалось стойкое увеличение этого показателя сразу после окончания каждого сеанса в среднем в течение 3 мин, что указывает на снижение у них количества опсоинов в сыворотке крови.

В динамике ЛУФОК-терапии наблюдалась высокая гетерогенность изменений метаболической активности гранулоцитов больных с ХНЗЛ от сеанса к сеансу. Однако на первый сеанс ЛУФОК реакция была однозначной и проявлялась в достоверном ( $p < 0,01$ ) снижении интенсивности ХЛ до значений, полученных у здоровых людей (рис. 2,а). Во время третьего и четвертого сеан-

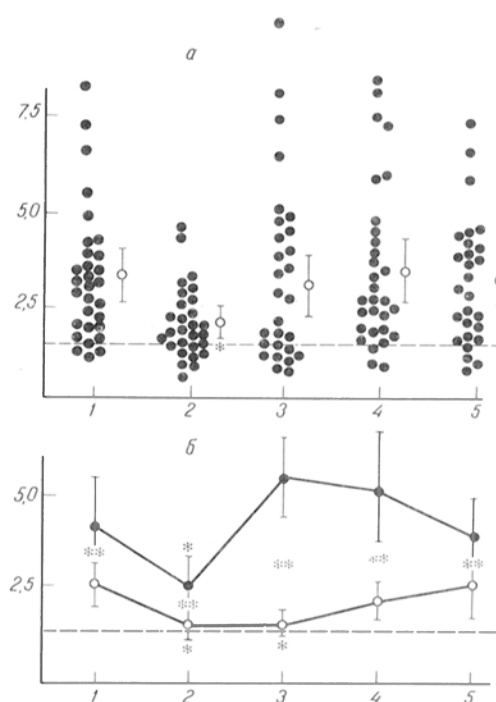


Рис. 2. Интенсивность ХЛ гранулоцитов периферической крови больных с ХНЗЛ в динамике ЛУФОК-терапии (а) и после разделения больных на 1-ю и 2-ю группы (б).

По оси абсцисс — сеансы ЛУФОК; по оси ординат — интенсивность ХЛ (в  $\text{имп/с} \times 10^3$ ). Одна звездочка — достоверность различий по сравнению с показателями при первом сеансе облучения, две — между показателями больных 1-й и 2-й группы по время сеанса. Темные кружки — 1-я, светлые — 2-я группа. Пунктирная линия — среднее значение интенсивности ХЛ гранулоцитов крови здоровых людей.

сов у одних больных интенсивность ХЛ сохранялась на низком уровне, у других возрастала до исходных значений и даже выше. В зависимости от типологии реагирования больные были разделены на 2 группы. Для 1-й группы ( $n=6$ ) были характерны высокая первоначальная интенсивность ХЛ-ответа гранулоцитов и резкие ее колебания от сеанса к сеансу, для 2-й группы ( $n=9$ ) — более низкие исходные значения и более плавное изменение метаболической активности фагоцитирующих клеток крови; при этом показатели больных разных групп достоверно различались на протяжении всего курса ЛУФОК-терапии. Интенсивность ХЛ-ответа гранулоцитов больных 1-й группы снижалась ко второму сеансу, после чего возрастала, достоверно отличаясь от начального уровня вплоть до пятого сеанса (рис. 2,б). В то же время у больных 2-й группы обнаружено статистически значимое ( $p < 0,01$ ) снижение метаболической активности гранулоцитов ко второму и третьему сеансам с последующим повышением ее до исходных значений к пятому сеансу.

Таким образом, полученные результаты показывают высокую гетерогенность изменения метаболической активности гранулоцитов крови в зависимости от индивидуальных особенностей больного как при ЛУФОК-терапии, так и после УФ-облучения *in vitro*. Увеличение этого параметра у больных к третьему — пятому сеансам, по-видимому, определяет активацию воспалительного процесса, которая отмечается многими исследователями [2]. Снижение метаболической активности гранулоцитов после первого сеанса и повышение

ее в результате последующих сеансов позволяют рекомендовать два подхода проведения АУФОК-терапии при воспалительных процессах: однократное облучение в острой фазе воспаления с целью снижения воспалительной реакции и многосеансовое облучение при хронических процессах с целью активации воспалительной реакции. В данном случае ХЛ гранулоцитов служит удобным методом контроля эффективности терапии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю. А., Крейна М. В., Клебанов Г. И. и др. // Биол. мембраны. — 1988. — Т. 5. № 11. — С. 1192—1198.
2. Олейникова Е. А., Морозов Н. Т., Цыбусов А. П. и др. // Механизмы влияния облученной ультрафиолетовыми лучами крови на организм человека и животных. — Л., 1986. — С. 103—109.
3. Поташов Л. В., Чеминава Р. В., Перельгин В. Г. // Там же. — С. 25—30.
4. Bredberg A., Forsgren A. // Photochem. Photobiol. — 1985. — Vol. 41, N 3. — P. 337—341.
5. Tatsuhito T.-O., Takahide M., Norihiri U. et al. // Clin. Immunopath. — 1983. — Vol. 29. — P. 333—340.

Поступила 28.04.89

#### EFFECT OF UV IRRADIATION ON METABOLIC ACTIVITY OF HUMAN BLOOD GRANULOCYTES.

E. B. Mentschikova, N. K. Zenkov, D. I. Azbel, I. D. Safronov

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

Influence of UV irradiation (254 nm) on chemoluminescence of blood granulocytes was studied in patients with chronic unspecific lung impairments. Chemoluminescence of leukocytes was decreased after blood irradiation at the rate 10 J/ml as well as after the first course of the UV irradiated blood transfusion. At the same time, high dissimilarity of reactions to the irradiation was found in individual patients: in patients with low initial parameters of metabolism a stable decrease of chemoluminescence was observed to the 2<sup>nd</sup>, 3<sup>d</sup> and 4<sup>th</sup> courses of the irradiation, while in patients with high parameters — only to the 2<sup>nd</sup> course. This suggests that functional activity of phagocytes may be altered due to UV irradiation effects.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616.12-009.72-07:616.155.1-008.93:577.12.17

А. Б. Чещевик, С. М. Шуляковская, Н. С. Иванова, П. А. Манак, Е. С. Атрощенко, И. С. Карпова, Е. В. Ланко

#### БИОЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В ЭРИТРОЦИТАХ БОЛЬНЫХ СТАБИЛЬНОЙ СТЕНОКАРДИЕЙ

Белорусский НИИ кардиологии, Минск

Одной из актуальных проблем молекулярной кардиологии является познание механизмов нарушения функционирования эритроцитов, определяющих развитие многих сердечно-сосудистых заболеваний. В комплексе исследований по данной проблеме рассматриваются преимущественно отдельные звенья, характеризующие процессы энергетической обеспеченности эритроцитов при ишемической болезни сердца (ИБС) [1, 5, 6]. К сожалению, нет единой точки зрения не только на закономерности процессов синтеза и утилизации макроэргических соединений в красной кровяной

Таблица 1

#### Активность ПК, Г-6-ФДГ, концентрация МК в эритроцитах больных стабильной стенокардией ( $\bar{X} \pm S_x$ )

Обследуемые группы	ПК, ммоль/(с·л)	Г-6-ФДГ, мкмоль/(с·л)	МК, ммоль/л
Доноры (n=26)	0,99±0,02	216±21,5	0,87±0,14
I ФК (n=10)	0,78±0,05	255±34,2	1,29±0,47
<i>p</i>	<0,05	>0,05	>0,05
II ФК (n=36)	0,77±0,03	214±16,8	1,36±0,12
<i>p</i>	<0,001	>0,05	<0,05
III ФК (n=53)	0,83±0,03	176±10,0	1,76±0,21
<i>p</i>	<0,001	>0,05	<0,001

Таблица 2

#### Активность аденозинтрифосфатаз в мембранах эритроцитов больных стабильной стенокардией ( $\bar{X} \pm S_x$ )

Обследуемые группы	Mg <sup>2+</sup> -АТФаза	Ca <sup>2+</sup> -АТФаза	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -АТФаза
	ммоль на 1 мг белка за 1 ч		
Доноры (n=17)	1,39±0,17	0,84±0,13	1,56±0,15
I ФК (n=20)	0,65±0,13	0,54±0,19	0,50±0,11
<i>p</i>	<0,05	>0,05	<0,001
II ФК (n=14)	1,19±0,32	1,43±0,55	1,24±0,33
<i>p</i>	>0,05	>0,05	>0,05
III ФК (n=20)	1,32±0,21	1,08±0,19	0,78±0,12
<i>p</i>	>0,05	>0,05	<0,001

клетке при ИБС, но и на характер изменения активности ферментов, участвующих в энергообеспечении эритроцита.

В настоящем сообщении представлены данные по исследованию ферментов и концентрации субстратов гликолиза, АТФ, АДФ, АМФ, активности Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазы, Mg<sup>2+</sup>-АТФазы, Ca<sup>2+</sup>-АТФазы в эритроцитах больных стабильной стенокардией.

Методика. Определение активности аденозинтрифосфатаз (АТФаз) осуществляли в мембранах эритроцитов [4], а пируваткиназы (ПК) [7] и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) [3] — в суспензии эритроцитов. Концентрацию АТФ, АДФ, АМФ, молочной кислоты (МК) исследовали ферментативным методом с помощью наборов фирмы «Boehringer». Исследование биоэнергетических процессов проводили в эритроцитах венозной крови больных стабильной стенокардией I—III функционального класса (ФК). В качестве антикоагулянта использовали гепарин в соотношении 500 ЕД на 10 мл крови. Центрифугированием при 1000 g в течение 10 мин отделяли плазму от эритроцитов. Взвесь эритроцитов, дважды отмытую охлажденным физиологическим раствором, использовали для проведения анализа.

Полученные данные по исследованию биоэнергетических процессов оценивали по отношению к соответствующим показателям эритроцитов практически здоровых лиц. Все цифровые значения обработаны методом вариационной статистики с использованием пакета программ на управляемом вычислительном комплексе СМ-4.

Результаты и обсуждение. В результате проведенных исследований установлено, что в эритроцитах больных стабильной стенокардией происходит нарушение процессов катаболизма глюкозы (табл. 1).

Активность ферментов, участвующих в утилизации макроэргических соединений в эритроцитах больных стабильной стенокардией, значительно изменяется, активность АТФаз преимущественно снижается (табл. 2).

Нарушение процессов, участвующих в синтезе и утилизации макроэргических соединений в эритроцитах больных стабильной стенокардией, влечет за собой снижение энергетического потенциала клетки, что выражается в снижении концентрации

Таблица 3

Концентрация адениловых нуклеотидов мкмоль/мл в эритроцитах больных стабильной стенокардией ( $\bar{X} \pm S_x$ )

Обследуемые группы	АТФ	АДФ	АМФ
Доноры (n=23)	484±21,34	191±15,13	38±3,74
I ФК (n=26)	391±50,77	276±11,52	38±6,31
p	>0,05	<0,001	=0
II ФК (n=65)	269±28,04	273±14,66	47±4,34
p	<0,001	<0,001	>0,05
III ФК (n=54)	319±29,30	255±12,69	30±3,03
p	<0,001	<0,05	>0,05

АТФ в клетке. При этом значительно повышается уровень АДФ в эритроцитах (табл. 3).

Таким образом, в эритроцитах больных хронической ИБС и, в частности, стабильной стенокардией происходят выраженные нарушения процессов гликолиза и утилизации АТФ. Полученные результаты указывают на существование сложных механизмов нарушения биоэнергетических процессов в красной кровяной клетке при ИБС. Так, активность ПК, одного из ключевых ферментов гликолиза в эритроцитах больных, снижалась. В то же время концентрация МК, уровень которой является показателем скорости гликолиза [8] в эритроцитах обследуемых больных, увеличивается. Мы склонны считать, что содержание МК более достоверно характеризует интенсивность катаболизма глюкозы в гликолизе, ибо МК является конечным продуктом гликолиза в безъядерной клетке. Из указанного следует, что в эритроцитах больных стабильной стенокардией происходит активация процессов гликолиза. Это коррелирует с данными, согласно которым активация гликолиза является одним из компенсаторно-приспособительных процессов, характерных для гипоксического состояния организма [2]. Поскольку недостаточное снабжение тканей кислородом является патогенетическим звеном при ИБС, такой механизм активации гликолиза представляется логичным. В связи с тем что анаэробный гликолиз в красной кровяной клетке является основным процессом синтеза макроэргов, можно предположить, что интенсификация гликолиза представляет собой приспособительную реакцию. Компенсаторное усиление скорости гликолиза способствует функциональной активации эритроцитов, направленной на увеличение снабжения тканей кислородом.

Активация гликолиза во многом определяется уровнем адениловых нуклеотидов и, в частности, низким содержанием АТФ [10]. Исследования показали, что в эритроцитах больных ИБС происходит снижение уровня АТФ и увеличение концентрации АДФ. Изменение содержания адениловых нуклеотидов в эритроцитах при ИБС в значительной степени может быть связано с нарушением структуры и функции клеточных мембран. Это подтверждается снижением активности мембрано-связанного фермента  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы, изменение активности которой отражает структурно-функциональную организацию клетки [11]. В свою очередь высокое содержание АДФ может конкурентно ингибировать АТФазу [9].

Таким образом, в эритроцитах больных ишемической болезнью сердца происходят выраженные изменения биоэнергетических процессов. При

этом нарушение энергетической обеспеченности эритроцитов отмечается на уровне как процессов синтеза макроэргических соединений, так и их утилизации.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Борец В. М., Мирончик В. В., Аргасва Л. П. и др. Межвитаминные отношения при ишемической болезни сердца и гипертонической болезни. — Минск, 1988.
2. Гасилин В. С., Сидоренко Б. А. Стенокардия. — М., 1987.
3. Захарьин Ю. Л. // Лаб. дело. — 1967. — № 6. — С. 327—330.
4. Казенов А. М., Маслова М. П., Шалободов А. Д. // Биохимия. — 1984. — № 7. — С. 1089—1095.
5. Гарховская Т. И., Хаджакулиев Б. Г., Халимов Э. М. и др. // Вопр. мед. химии. — 1983. — № 5. — С. 69—73.
6. Халиев Э. М., Лу В. С., Азизова О. А. // Там же. — 1982. — № 1. — С. 81—86.
7. Шеклик Э. Клиническая ферментология. — Варшава, 1966.
8. Ужаский Я. Г. // Пат. физиол. — 1970. — № 3. — С. 3—8.
9. Low P. S., Brands J. F. // Arch. biochem. Biophys. — 1978. — Vol. 190, N 2. — P. 640—646.
10. Rossi I. P., Garrahan P. I., Rega A. F. // J. Membrane Biol. — 1978. — Vol. 44, N 1. — P. 37—46.
11. Sheetz M. P., Casoli J. // Europ. J. cell. Biol. — 1980. — Vol. 22, N 1. — P. 339.

Поступила 03.08.89

## BIOENERGETIC PROCESSES IN ERYTHROCYTES OF PATIENTS WITH PERSISTENT STENOCARDIA

A. B. Cheshtcevik, S. M. Shulyakovskaya, N. S. Ivanova, M. A. Manak, E. S. Atroshchenko, I. S. Karpova, E. V. Lapko  
Byelorussian Institute of Cardiology, Minsk.

Distinct impairments in energy metabolism were detected in erythrocytes of patients with persistent stenocardia. These impairments occurred both in the rate of high-energy substances synthesis and in their utilization. Possible mechanisms for regulation of bioenergetic processes in red blood cells under conditions of ischemic heart disease are discussed.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616.12-008.331.1-021.3-092.9-07; 616-018.1:576.347-008.94:577.175.823

Д. И. Иоффина, И. Е. Смирнов, В. З. Горкин

## ИЗМЕНЕНИЯ КИНЕТИКИ ДЕЗАМИНИРОВАНИЯ БИОГЕННЫХ АМИНОВ ПРИ СПОНТАННОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, НИИ педиатрии АМН СССР, Москва

В последние годы установлено, что на разных стадиях развития артериальной гипертензии нарушены процессы нейронального захвата и утилизации норадреналина, в результате чего создаются условия для поступления больших количеств норадреналина к специфическим адренорецепторам [6]. Показано также, что развитие наследственной гипертензии у животных связано с изменением соотношения адренорецепторов  $\alpha_1$  и  $\alpha_2$  в прессорных и депрессорных районах мозга, в частности — с увеличением числа  $\alpha_1$ -адренорецепторов [11, 15].

Предполагается, что на стадии хронической гипертензии в действие вступает компенсаторный механизм, который нормализует концентрацию свободного норадреналина и тем самым предотвращает дальнейшее повышение артериального

давления — АД [5]. Возможно, что в основе действия компенсаторного механизма лежит ускорение захвата норадреналина и увеличение активности моноаминоксидазы (МАО) и катехоламин-О-метилтрансферазы. Показано, что введение кроликам очищенных препаратов МАО снижает кровяное давление, повышенное в результате предварительного введения норадреналина [9]. В гомогенатах ряда тканей крыс со спонтанной гипертензией активность МАО, как правило, выше, чем у контрольных животных [12]. Ранее нами было показано значительное увеличение активности МАО типов А и Б в митохондриальной фракции печени крыс со спонтанной гипертензией по сравнению с таковой у нормотензивных животных [4].

Цель работы — определение кинетических констант дезаминарования серотонина и бензиламина МАО митохондрий некоторых органов гипертензивных и нормотензивных животных, проведение ингибиторного анализа для идентификации типов МАО и определение концентраций их активных центров, что позволит получить новые данные о состоянии активности МАО при гипертензии.

**Методика.** В опытах использовали крыс-самцов линии Окамото — Локи (SHR) массой  $308 \pm 12,0$  г с АД  $196 \pm 2,4$  мм рт. ст. [17]. Контрольными животными были крысы Вистар — Киото массой  $300 \pm 17,1$  г с АД  $125 \pm 8,2$  мм рт. ст. Каждая группа состояла из 10 животных. Давление измеряли плетизмографическим методом на автоматическом сфигмоманометре «Natsume KN-209» (Япония).

После декапитации у животных быстро извлекали мозг, сердце, печень и почки. Ткани промывали охлажденным физиологическим раствором и готовили 10 % гомогенаты на 0,25 М сахарозе. Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования [3], промывали 0,1 М фосфатным буфером pH 7,4, суспендировали в объеме того же буфера, равном массе ткани, взятой для приготовления гомогената, и хранили до использования при  $-20^\circ\text{C}$ . Перед использованием суспензию митохондрий оттаивали в 10-кратном объеме 0,1 М фосфатного буфера pH 7,4 и осаждали центрифугированием при 12 000 g. Осадок, представляющий собой фрагменты митохондриальных мембран, использовали в качестве биологического материала, содержащего МАО.

Активность МАО определяли модифицированным радиометрическим методом [7]. В качестве субстратов использовали  $^{14}\text{C}$ -серотонин и  $^{14}\text{C}$ -бензиламин фирмы «Amersham» (Англия).

В пробы объемом 0,1 мл вносили суспензию митохондрий (10–60 мкг белка), радиоактивный субстрат (конечная концентрация  $3 \cdot 10^{-5}$  М) и 0,05 М фосфатный буфер pH 7,4. При определении кинетических констант концентрация суб-

страта в пробах варьировала от  $1,5 \cdot 10^{-5}$  до  $1,2 \cdot 10^{-4}$  М. Удельная радиоактивность  $^{14}\text{C}$ -серотонина составляла 2,64 Ки/моль,  $^{14}\text{C}$ -бензиламина — 5,5 Ки/моль. В контрольные пробы вместо субстрата вносили равный объем 0,05 М фосфатного буфера pH 7,4.

Образцы инкубировали 30 мин при  $37^\circ\text{C}$  в атмосфере воздуха. Реакцию останавливали добавлением 0,02 мл 2 М лимонной кислоты или 0,5 М HCl в пробы с серотонином или бензиламином соответственно. После добавления в образцы сцинтиллятора в объеме 2 мл проводили экстракцию радиоактивных продуктов дезаминарования субстратов путем встряхивания в течение 3 мин. В качестве сцинтиллятора использовали сцинтилляционную жидкость ЖС-106 (3,5 г 2,5-дифенилоксазола и 0,1 г 1,4-Ди-(5-фенил-2-оксазолил)-бензола в 1 л сцинтилляционного толуола или смесь ЖС-106 — этилацетат (1:1) в опытах с бензиламином и серотонином соответственно. Радиоактивность (в имп/мин) определяли на счетчике Marek-II («Nucleag Chicago», США).

При выполнении ингибиторного анализа проводили преинкубацию с разными концентрациями ингибиторов МАО типа А хлоргидина — Поттера [10], используя в качестве ингибитора МАО типа Б депренила [2, 12, 13], после чего аликвоту преинкубационной смеси использовали в опытах.

Титрование активных центров фермента проводили по методу Аккермана — Поттера [10], используя в качестве ингибиторов МАО типов А и Б хлоргидин и паргалин соответственно. Так как паргалин не является специфическим ингибитором МАО типа Б, то в опытах по титрованию активных центров этого типа МАО использовали препараты митохондрий, предварительно обработанные специфическим ингибитором МАО типа А хлоргидином в концентрации  $1 \cdot 10^{-7}$  М в течение 30 мин при  $37^\circ\text{C}$  [13].

При статистической обработке данных для оценки достоверности различий между средними арифметическими использовали критерий Стьюдента [1].

**Результаты и обсуждение.** В табл. 1 приведены определенные графическим методом Лайнувера и Берка величины  $K_m$  и  $V_{\max}$  для серотонина и бензиламина в пробах с митохондриальными фракциями разных органов нормотензивных и гипертензивных крыс. На рис. 1 в качестве примера представлен график зависимости  $1/V$  от  $1/[S]$  при дезаминации серотонина в пробах с митохондриями печени крыс линий WKY и SHR.

Как видно из представленных данных, величина  $K_m$  для бензиламина в опытах с митохондриями печени крысы линии SHR значительно и статистически достоверно увеличена по сравнению с соответствующей величиной для крыс линии WKY.

Величины  $V_{\max}$  статистически достоверно увеличены для серотонина при его дезаминации в пробах с митохондриями печени и почек крыс линии SHR по сравнению с соответствующими

Таблица 1

Кинетические параметры МАО типов А и Б митохондрий разных органов нормотензивных и гипертензивных крыс

Орган	Серотонин		Бензиламин	
	$K_m$ , $1 \cdot 10^{-5}$ М	$V_{\max}$ имп/мг/мин $\cdot 10^{-3}$	$K_m$ , $1 \cdot 10^{-5}$ М	$V_{\max}$ имп/мг/мин $\cdot 10^{-3}$
Печень	$204 \pm 67,9$	$27,2 \pm 4,5^{***}$	$41 \pm 18,6^*$	$8,1 \pm 1,3^*$
	$286 \pm 44,5$	$66,7 \pm 9,4$	$144 \pm 11,2$	$38,1 \pm 4,8$
Мозг	$143 \pm 12,1^*$	$8,73 \pm 1,9$	$411 \pm 152$	$17,6 \pm 5,2$
	$73 \pm 13,8$	$9,06 \pm 1,5$	$292 \pm 76$	$11,3 \pm 3,1$
Сердце	$270 \pm 29,9$	$85,2 \pm 23,3$	$28,7 \pm 6,1$	$0,77 \pm 0,14$
	$333 \pm 71$	$96,3 \pm 16,4$	$12,5 \pm 5,0$	$1,05 \pm 0,44$
Почки	$108 \pm 8,5$	$5,08 \pm 0,28^{**}$	$37,9 \pm 6,6$	$2,01 \pm 0,07$
	$151 \pm 25,5$	$9,11 \pm 1,93$	$18,3 \pm 9,9$	$2,23 \pm 0,44$

**Примечание.** Инкубационные пробы содержали 0,05 М фосфатный буфер pH 7,4, 0,01, 0,02, 0,04 и 0,06 мг белка митохондриальной фракции печени, сердца, мозга и почек соответственно и один из субстратов в пределах концентраций от  $1,5 \cdot 10^{-5}$  до  $1,2 \cdot 10^{-4}$  М. Приведены величины для митохондрий органов нормотензивных (числитель) и гипертензивных (знаменатель) крыс. Представлены средние арифметические и средние ошибки средних арифметических по данным 3 опытов с 3 параллельными определениями в каждом. Статистическая достоверность различий между средними величинами, характеризующими контроль и гипертензию: одна звездочка —  $p < 0,01$ ; две —  $p < 0,005$ , три —  $p < 0,001$ .

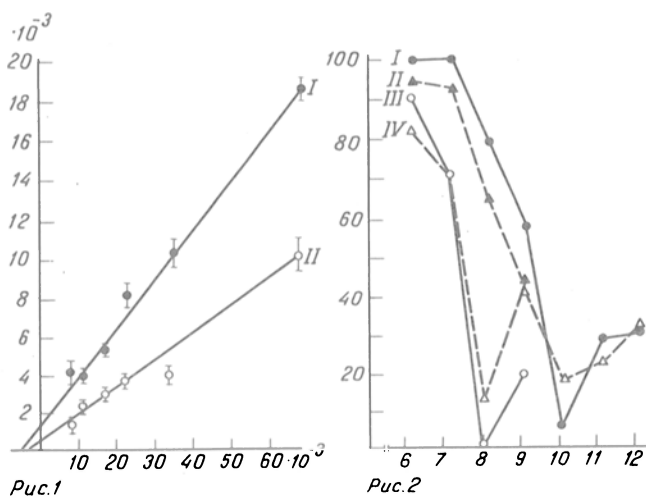


Рис. 1. Графики зависимости двойных обратных величин скорости дезаминирования серотонина от его концентрации в пробах с митохондриями печени крыс линий WKY (I) и SHR (II).

По оси абсцисс — величины, обратные концентрации серотонина в пробе (в М); по оси ординат — величины, обратные скорости дезаминирования (в импульсах на 1 мг белка за 1 мин). Представлены средние арифметические величины и средние ошибки средних арифметических по данным 3 опытов с 3 параллельными определениями в каждом.

Рис. 2. Графики ингибирования хлорпропином (I и II) и депренилом (III и IV) реакций дезаминирования серотонина и бензиламина соответственно, катализируемых MAO митохондриальных фракций печени крыс линий WKY (пунктирные линии) и SHR (сплошные линии).

По оси абсцисс — отрицательные десятичные логарифмы конечных концентраций (в мкМ) ингибиторов в пробах; по оси ординат — величины ингибирования активности MAO (в % к контролю без ингибитора). Представлены средние арифметические величины по данным трех опытов с тремя параллельными определениями в каждом. Величины средних ошибок не превышали 10 % от средних арифметических величин.

величинами для крыс линии WKY. Наблюдается также достоверное увеличение  $V_{\text{макс}}$  для бензиламина при его дезаминировании в пробах с митохондриями печени крыс линии SHR по сравнению с соответствующей величиной для контрольных животных.

При титровании активных центров MAO типов А и Б по данным 3 параллельных опытов (с 3 параллельными определениями в каждом) отмечено относительное увеличение у гипертензивных животных числа активных центров MAO типа Б (от  $0,81 \cdot 10^{-9}$  до  $1,33 \cdot 10^{-9}$  моль на 1 мг белка;  $p < 0,01$ ), в то время как концентрация активных центров MAO типа А ( $2 \cdot 10^{-11}$  моль на 1 мг белка) не изменяется.

В табл. 2 представлены данные ингибиторного анализа MAO митохондриальных фракций разных органов нормотензивных и гипертензивных крыс. В качестве избирательных ингибиторов MAO типа А использовали хлоргилин [13] и пиразидол [2], MAO типа Б — депренил [14]. На основании графиков зависимости степени ингибирования активности MAO типов А и Б от концентрации ингибиторов определены величины  $I_{50}$  для хлоргилина, депренила и пиразидола.

На рис. 2 в качестве примера представлены графики зависимости степени ингибирования дезаминирования серотонина от концентрации хлоргилина для опытов с митохондриями печени крыс линий WKY и SHR. Как видно из рис. 2 и табл. 2, статистически достоверного изменения чувствительности MAO к избирательным ингибиторам MAO типов А и Б в тканях крыс со спонтанной гипертензией по сравнению с нормотензивными крысами обнаружить не удалось.

Изменение активности MAO, обнаруженное нами в тканях гипертензивных крыс [4], может быть связано с изменением  $K_m$  фермента по отношению к данному субстрату с изменением числа оборотов фермента либо с изменением концентрации его активных центров. Может иметь место сочетание этих факторов [15]. Исходя из этого для выяснения природы изменения активности MAO необходимо сопоставить как значения кинетических параметров реакции дезаминирования аминов в норме и при экспериментальной гипертензии, так и концентрации активных центров MAO.

Ранее было показано, что активность MAO типов А и Б митохондрий печени крыс линии SHR в 2,6—2,7 раза выше соответствующей величины для контрольных животных [4]. В настоящей работе мы показали, что  $V_{\text{макс}}$  для дезаминирования серотонина и бензиламина MAO митохондрий печени гипертензивных крыс соответственно в 2,5 и 4,75 раза выше, чем у нормотензивных животных. Для MAO типа А показано, что в печени гипертензивных крыс ни концентрация активных центров, ни значение  $K_m$  по отношению к серотонину существенно не изменены. На основании этого можно предположить, что изменение активности MAO типа А в печени крыс линии SHR по сравнению с нормой связано с увеличением числа оборотов MAO. Что касается MAO типа Б,

Таблица 2

Величины  $I_{50}$  (в М) для ингибиторов MAO типов А и Б

Ткань	Хлоргилин	Пиразидол	Депренил
Печень	$1,1 \pm 0,24 \times 10^{-9}$	$9,0 \pm 4,1 \pm 10^{-9}$	$8,3 \pm 2,8 \times 10^{-8}$
	$8,0 \pm 4,1 \times 10^{-9}$	$1,9 \pm 0,14 \times 10^{-5}$	$4,6 \pm 1,1 \times 10^{-8}$
Мозг	$6,5 \pm 2,0 \times 10^{-10}$	$6,0 \pm 2,1 \times 10^{-6}$	$3,0 \pm 0,2 \times 10^{-8}$
	$1,15 \pm 0,75 \times 10^{-9}$	$11,0 \pm 7,3 \times 10^{-6}$	$2,8 \pm 0,2 \times 10^{-8}$
Сердце	$0,9 \pm 0,44 \times 10^{-8}$		
	$1,1 \pm 0,25 \times 10^{-9}$		

Примечание. Суспензию митохондрий, содержащую 2 мг белка в 1 мл, преинкубировали с хлорпропином в концентрации  $1 \cdot 10^{-7}$ — $1 \cdot 10^{-11}$  М и пиразидолом в концентрации  $1 \cdot 10^{-3}$ — $1 \cdot 10^{-6}$  М в течение 30 мин при 20 °С. Преинкубацию суспензии митохондрий с депренилом в концентрации  $1 \cdot 10^{-6}$ — $1 \cdot 10^{-9}$  М проводили в течение 3 ч при 37 °С. Аликвоту суспензии обработанных таким образом митохондрий вносили в инкубационные пробы для определения остаточной активности MAO типа А в опытах с хлорпропином или пиразидолом (субстрат — серотонин) и MAO типа Б в опытах с депренилом (субстрат — бензиламин). Представлены средние арифметические и средние ошибки средних арифметических величин  $I_{50}$  по данным 3 опытов с 3 параллельными определениями в каждом (числитель — для MAO митохондрий крыс линии WKY, знаменатель — для крыс линии SHR).

то для этого фермента  $K_m$  по отношению к бензиламину существенно (в 3,5 раза) увеличена по сравнению с контролем, что указывает на снижение сродства к субстрату. Однако это снижение сродства МАО типа Б к бензиламину компенсируется повышением концентрации активных центров этого типа МАО в митохондриях печени гипертензивных крыс. Таким образом, обнаруженное нами изменение активности МАО типа Б в митохондриях печени крыс линии SHR может быть связано с изменением ряда факторов, в частности с увеличением значения  $K_m$  и повышением концентрации активных центров фермента. Так как активность этого типа МАО у гипертензивных крыс повышена, можно предположить, что в этом суммарном процессе доминирует увеличение числа активных центров МАО типа Б.

В настоящей работе показано, что у подопытных крыс чувствительность к ингибиторам не изменена по сравнению с контрольными. Следовательно, в митохондриях печени гипертензивных крыс также преобладает МАО типа Б. Полагают, что физиологическая роль этого типа МАО состоит в инактивации таких ароматических аминов, как 2-фенилэтиламин, триптамин и тирамин, которые, очевидно, не являются нейротрансмиттерами [20]. Однако в условиях спонтанной гипертензии инактивация тирамина будет препятствовать высвобождению из тканевых резервов дополнительных количеств норадреналина и тем самым способствовать нормализации АД [11].

Ранее нами показано повышение активности МАО типа А митохондрий мозга гипертензивных крыс [4]. Возможно, одной из причин этого является повышение сродства данного типа МАО к серотонину, так как в настоящей работе выявлено снижение величины  $K_m$  для серотонина в опытах с МАО митохондрий мозга гипертензивных крыс по сравнению с соответствующей величиной для контрольных животных. Однако значительного изменения активности МАО мозга выявить не удалось. По данным [12, 21], активность МАО типа А мозга подопытных крыс была статистически достоверно увеличена лишь в стволовой части мозга и мозжечке. Мы для получения митохондрий использовали весь мозг. Видимо, по этой причине наблюдалась лишь тенденция к увеличению активности МАО.

В предыдущей работе [4] было отмечено значительное (в 1,5 раза) повышение активности МАО типа А в митохондриях сердца гипертензивных крыс. В настоящей работе также выявлена тенденция к повышению  $v_{\max}$  для МАО обоих типов в сердце гипертензивных крыс по сравнению с нормой. В гомогенатах сердца крыс этой линии также было установлено повышение активности МАО [12, 21].

В митохондриях почек крыс линии SHR мы обнаружили повышение  $v_{\max}$  для дезаминирования серотонина по сравнению с контролем. Наши результаты согласуются с данными работы [12], в которой было показано, что активность МАО в гомогенатах почек гипертензивных крыс увеличена по сравнению с таковой в контроле. Однако в этой работе мы произвели перерасчет активности на массу тела, причем у подопытных крыс масса почек была значительно больше, чем у контрольных. В нашем случае средняя масса почек одной

крысы как подопытной, так и контрольной группы равнялась 3,3 г.

Необходимо отметить, что МАО — не единственный мембранный фермент, активность которого изменяется при гипертензии. Так, обнаружено значительное (на 87 %) повышение активности фосфолипазы С стенки аорты гипертензивных крыс, причем  $K_m$  была снижена по сравнению с контролем (WKY) в 4 раза [19].

В настоящее время существует взгляд на гипертензию как на генерализованную мембранную патологию [18]. Согласно этой гипотезе, при гипертензии происходит снижение мембранного потенциала, что в свою очередь ведет к уменьшению скорости поглощения нейромедиаторов в синапсах и увеличению времени их контакта с постсинаптической мембраной. По-видимому, этот механизм лежит в основе повышенной активности симпатико-адреналовой системы. Увеличение ее активности вследствие повышения концентрации нейромедиаторов, в частности катехоламинов в синаптической щели, приводит к возникновению местных компенсаторных реакций, выражающихся, очевидно, в возрастании активности ферментов катаболизма катехоламинов, в том числе МАО [5].

Таким образом, полученные нами данные об изменении активности МАО типов А и Б в митохондриальной фракции гипертензивных крыс линии SHR можно связать со значительным повышением  $v_{\max}$  МАО обоих типов в печени и  $v_{\max}$  в почках гипертензивных крыс по сравнению с соответствующими величинами контрольных животных линии WKY. Обнаружено также повышение  $K_m$  для реакции дезаминирования бензиламина в печени и снижение для реакции дезаминирования серотонина в мозге гипертензивных животных. Гитрование активных центров показало статистически достоверное повышение числа активных центров МАО типа Б в митохондриях печени крыс с экспериментальной гипертензией, что имеет патогенетическое значение.

Авторы выражают глубокую благодарность старшему научному сотруднику И. В. Вережкиной за ценные советы и помощь при выполнении работы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бельский М. Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. — М., 1963.
2. Вережкина И. В., Аснина В. В., Горкин В. З., Машковский М. Д. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 5. — С. 118 — 123.
3. Горкин В. З. и др. // Современные методы в биохимии. — М., 1968. — Т. 2. — С. 155 — 157.
4. Макарова Т. А., Смирнов И. Е., Вережкина И. В. и др. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 1. — С. 93 — 97.
5. Маркель А. Л. // Успехи физиол. наук. — 1983. — Т. 14, № 1. — С. 67 — 84.
6. Марков Х. М., Полецук В. С. // Кардиология. — 1977. — № 10. — С. 93 — 98.
7. Пеккель В. А., Аксенова Л. П., Боймирзаев М. И. // Лаб. дело. — 1987. — № 7. — С. 491 — 496.
8. Постнов Ю. В., Орлов С. П. Первичная гипертензия как патология клеточных мембран. — М., 1987.
9. Чикваидзе В. П., Гаришвили Т. Г., Гонгадзе Н. В., Канделак Е. П. // Сообщ. АН Груз. ССР. — 1983. — Т. 112, № 1. — С. 429 — 433.
10. Ackerman W. W., Potter V. P. // Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.). — 1949. — Vol. 72, N 1. — P. 1 — 9.
11. Feldstein E. A. // J. Neurochem. — 1986. — Vol. 47, N 4. — P. 1190 — 1193.

12. Guffrow C., Strolin-Benedetti M. H. // Life Sci.— 1984.— Vol. 34, N 2.— P. 535—546.
13. Johnston G. P. // Biochem. Pharmacol.— 1968.— Vol. 17, N 10.— P. 1985—1997.
14. Knoll G. // Horisonts Biochem. Biophys.— 1978.— Vol. 5.— P. 37—64.
15. Markel A. L. // Biogen. Amines.— 1987.— Vol. 4, N 4—6.— P. 329—333.
16. Monoamine Oxidase Inhibitors: The State of Art / Ed. M. B. H. Youdim, E. S. Paykel.— 1981.— P. 77—85.
17. Okamoto K., Aoki K. // Jap. Circulat. J.— 1963.— Vol. 27.— P. 282—285.
18. Postnow Yu. V., Orlov S. N., Pokudin N. I. // Hypertension.— 1984.— Vol. 5928, N 2.— P. 1—6.
19. Uehara Y., Ishii M., Ishimitsu T., Sugimoto T. // Hypertension.— 1988.— Vol. 11.— P. 28—33.
20. Waldmeier P. C., Delini-Stula A., Maitre L. // Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmakol.— 1976.— Bd 292.— S. 9—14.
21. Yasuhara H., Tonooka M., Wada J. et al. // Jap. J. Pharmacol.— 1983.— Vol. 33.— P. 1057—1064.

Поступила 12.06.89

## ALTERATIONS IN KINETICS OF BIOGENIC AMINES DEAMINATION UNDER CONDITIONS OF SPONTANEOUS HYPERTENSION

D. I. Ioffina, I. E. Smirnov, V. Z. Gorkin

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

Rate of serotonin and benzylamine deamination was increased in liver tissue of rats with spontaneous hypertension. The increase was due to elevation in  $V_{max}$  value for monoamine oxidases of the A and B types as compared with the corresponding values of control animals. The  $V_{max}$  value was increased in kidney of hypertensive animals for MAO of the B type (benzylamine as a substrate). At the same time,  $K_m$  for MAO of the B type was increased in liver tissue, while  $K_m$  for MAO of the A type was decreased in brain of hypertensive animals. Titration of the MAO active sites exhibited their increased concentration in the B type MAO in liver mitochondria of experimental animals. The data obtained suggest an important role of alterations in the MAO catalytic activity in pathogenesis of spontaneous hypertension.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 612.173.1.015.348.017.2:613.8631.06:612.822.1:[547.95:547.943

Л. В. Маслова, Ю. Б. Лишманов, Г. Н. Смагин

## УЧАСТИЕ ОПИОИДНЫХ ПЕПТИДОВ В РЕГУЛЯЦИИ БИОСИНТЕЗА МИОКАРДИАЛЬНОГО БЕЛКА ПРИ СТРЕССЕ И АДАПТАЦИИ

НИИ кардиологии Томского научного центра АМН СССР

Известно, что длительная нагрузка на функциональные системы организма, вызванная действием факторов среды, приводит к увеличению синтеза белков и нуклеиновых кислот [6] и как следствие к формированию «структурного следа» в системах, ответственных за адаптацию к данному фактору [6].

В наших работах [4, 16] и в исследованиях других авторов [9] была показана активация звеньев эндогенной опиоидной системы под влиянием адаптирующих воздействий. Кроме того, в литературе появились данные о стимулирующем влиянии лей-энкефалина и его аналогов на биосинтез белков в ЦНС [5] и на содержание их в кишечном эпителии [1].

Однако вопрос о взаимосвязи опиоидной си-

стемы и белково-синтезирующего аппарата в миокарде при стрессе в настоящее время остается неизученным.

Целью настоящей работы явилось исследование участия опиоидных пептидов в регуляции биосинтеза миокардиальных белков при стрессе и адаптации.

**Методика.** Эксперименты выполнены на белых крысах-самцах массой 160—180 г. Эмоционально-болевым стрессом (ЭБС (6-часовой) моделировали по методу [14].

Часть животных предварительно адаптировали путем проведения серии коротких («тренировочных») иммобилизаций [8] или курсовым (8 дней) введением экстракта золотого корня (по 1 мл/кг, ежедневно per os) — адаптогенного препарата, получаемого из растения *Rhodiola rosea*. Животным другой группы в течение 5 дней вводили внутривенно по 100 мкг/кг синтетический энзимостойчивый аналог лей-энкефалина — D-ала<sup>2</sup>-лей<sup>5</sup>-арг<sup>6</sup>-энкефалин (даларгин), животные контрольной группы получали физиологический раствор в эквивалентном объеме.

Интенсивность биосинтеза миокардиальных белков оценивали по скорости включения <sup>3</sup>H-лейцина (отечественное производство) в белки [11]. Количество белка определяли по методу [15]. Радиоактивность проб измеряли на бета-сцинтилляционном счетчике «Марк-3» (США). Содержание нуклеиновых кислот в ткани миокарда определяли спектрофотометрически [10].

В плазме крови крыс радиоиммунологическим способом определяли уровень глюкогона при помощи наборов фирмы «Serono Diagnostics» (Италия) и инсулина отечественными наборами. Радиометрию проб проводили на γ-спектрометре «Tracor Analytic» (США).

Данные обработаны статистически с применением *t*-критерия Стьюдента и представлены в таблице.

**Результаты и обсуждение.** Из таблицы следует, что при 6-часовом ЭБС включение меченого лейцина в миокард подопытных животных уменьшалось на 48 % ( $p < 0,01$ ) по сравнению с группой интактных крыс. Исследование содержания нуклеиновых кислот в ткани миокарда при этом показало достоверное снижение (на 44 %) концентрации РНК ( $p < 0,001$ ), тогда как концентрация ДНК, определяемая сразу после окончания стрессорного воздействия, не изменялась. Увеличение скорости распада белка и сокращение времени полужизни РНК в миокарде после 6-часового стресса обнаружено также другими авторами и, по-видимому, обусловлено выраженной мобилизацией пластических ресурсов в катаболической фазе стресса для поддержания функционирования сердечной мышцы в экстремальных условиях [7].

Изменение гормонального спектра крови при ЭБС, заключающееся в значительном повышении (на 220 %) уровня глюкогона при одновременном угнетении (на 50 % по сравнению с группой интактных крыс) инсулярной функции поджелудочной железы, может служить дополнительным подтверждением преобладания катаболических процессов в миокарде. Указанные гормональные сдвиги при стрессе обусловлены скорее всего значительным выбросом катехоламинов, ингибирующих секрецию инсулина [13] и повышающих содержание глюкогона в плазме крови [13].

Введение даларгина интактным крысам на 45 % увеличивало интенсивность биосинтеза белков в сердечной мышце. Одновременно у крыс, получавших данный препарат, увеличивалась на 39 % концентрация РНК в сердце, тогда как содержание ДНК достоверно не изменялось.

Влияние даларгина и предварительной адаптации на интенсивность биосинтеза белка, содержание нуклеиновых кислот в миокарде, концентрацию инсулина и глюкагона в плазме крови ( $M \pm m$ )

Условие эксперимента	Удельная радиоактивность белка, $\text{имп/мин/мг} \cdot 10^{-1}$	Содержание нуклеиновых кислот, мг на 1 г ткани		Инсулин, $\text{мкЕД/мл}$	Глюкагон, $\text{нг/мл}$
		РНК	ДНК		
Интактные крысы	$333 \pm 11$	$3,51 \pm 0,28$	$0,29 \pm 0,01$	$15,61 \pm 2,58$	$76,98 \pm 2,62$
ЭБС, 6 ч	$172 \pm 13$	$1,96 \pm 0,24$	$0,24 \pm 0,05$	$8,27 \pm 1,10$	$246,35 \pm 27,15$
$p_1$	$<0,001$	$<0,001$	$>0,05$	$<0,05$	$<0,001$
Курс роднолы	$476 \pm 19$	$5,81 \pm 0,35$	$0,40 \pm 0,03$	$12,40 \pm 1,36$	$78,90 \pm 5,32$
$p_1$	$<0,001$	$<0,001$	$<0,001$	$>0,05$	$>0,05$
$p_2$	$<0,001$	$<0,001$	$<0,05$	$<0,05$	$<0,001$
Курс роднолы + 6 ч ЭБС	$288 \pm 18$	$4,03 \pm 0,29$	$0,34 \pm 0,03$	$12,13 \pm 1,58$	$132,60 \pm 14,12$
$p_1$	$>0,05$	$>0,05$	$>0,05$	$>0,05$	$<0,01$
$p_2$	$<0,01$	$<0,001$	$>0,05$	$>0,05$	$<0,001$
Серия иммобилизаций	$392 \pm 12$	$6,19 \pm 0,40$	$0,33 \pm 0,01$	$13,34 \pm 1,75$	$80,92 \pm 3,12$
$p_1$	$<0,01$	$<0,001$	$>0,01$	$>0,05$	$>0,05$
$p_2$	$<0,001$	$<0,001$	$>0,05$	$<0,05$	$<0,001$
Серия иммобилизаций + 6 ч ЭБС	$316 \pm 22$	$5,10 \pm 0,28$	$0,30 \pm 0,01$	$13,00 \pm 1,68$	$150,10 \pm 7,32$
$p_1$	$>0,05$	$<0,001$	$>0,05$	$>0,05$	$<0,01$
$p_2$	$<0,001$	$<0,001$	$>0,05$	$<0,05$	$<0,01$
Курс даларгина	$482 \pm 15$	$4,89 \pm 0,31$	$0,31 \pm 0,02$	$16,62 \pm 1,05$	$67,03 \pm 8,63$
$p_1$	$<0,001$	$<0,01$	$>0,05$	$>0,05$	$>0,05$
$p_2$	$<0,001$	$<0,001$	$>0,05$	$<0,001$	$<0,001$
Курс даларгина + 6 ч ЭБС	$309 \pm 8$	$3,28 \pm 0,33$	$0,28 \pm 0,01$	$13,87 \pm 0,78$	$133,54 \pm 19,49$
$p_1$	$>0,05$	$>0,05$	$>0,05$	$>0,05$	$>0,05$
$p_2$	$<0,001$	$<0,01$	$>0,05$	$<0,001$	$<0,01$

Примечание.  $p_1$  — достоверность по отношению к группе интактных крыс;  $p_2$  — достоверность по отношению к группе стресс-контроля. В каждой группе по 12 крыс.

Уровень исследуемых гормонов у интактных животных под влиянием даларгина также достоверно не изменялся.

Последующее стрессирование животных, получавших даларгин, вызывало уменьшение накопления  $^3\text{H}$ -лейцина и концентрации РНК в миокарде не ниже уровня, характерного для интактных крыс, что свидетельствует о менее выраженных явлениях стрессорного катаболизма. Это подтверждали и исследования гормонального спектра крови у животных данной группы. Так, содержание катаболического гормона — глюкагона — у крыс, получавших предварительно даларгин, хотя и увеличивалось при стрессировании на 99 %, однако этот подъем был в 1,8 раза менее выраженным, чем в стресс-контроле. Кроме того, в плазме крови крыс на фоне введения даларгина мы не наблюдали развития гипoinsулинемии, характерной для фазы тревоги стресса, что согласуется с полученными ранее данными [2].

В отдельной серии экспериментов нами было обнаружено, что уже через 2 ч после окончания ЭБС уровень глюкагона в плазме крови крыс, получавших даларгин, снижался до исходных значений, а к 6-часовому сроку после окончания стресса составил 56 % от нормы, тогда как в стресс-контроле уровень исследуемого гормона нормализовался только к 6-часовому сроку после ЭБС.

Предварительная адаптация животных как с помощью экстракта роднолы, так и путем тренировочных иммобилизаций сопровождалась выраженной стимуляцией процессов белкового синтеза в миокарде. Так, скорость включения  $^3\text{H}$ -лейцина в сердечную мышцу повышалась соответственно на 43 и 18 %. Одновременно мы отмечали увеличение концентрации РНК в сердце на 65 и 76 %, ДНК — на 38 и 14 % соответственно. Достоверных изменений уровня исследуемых

гормонов при данных адаптирующих воздействиях не обнаружено.

При последующем эмоционально-болевым воздействием на адаптированных животных стрессорное угнетение процессов биосинтеза белка было значительно меньше, чем в стресс-контроле, и скорость включения меченого лейцина в миокард не отличалась от нормы. При этом достоверных изменений концентрации ДНК не обнаружено, а содержание РНК хотя и снижалось по сравнению с соответствующими группами без стресса, но достоверно не отличалось от такового у интактных животных.

Уровень катаболического гормона — глюкагона — в плазме крови у адаптированных крыс при ЭБС был достоверно меньшим, чем в стресс-контроле, тогда как содержание инсулина было, напротив, выше и не отличалось от соответствующих значений в группе интактных крыс. Это является еще одним подтверждением торможения катаболических эффектов стресса у адаптированных животных.

В предыдущих исследованиях нами было показано, что предварительная адаптация животных к стрессу сопровождается умеренным повышением концентрации  $\beta$ -эндорфина и лей-энкефалина в крови и тканях [4, 16]. Известно также, что введение даларгина, как и использование указанных способов адаптации, повышает резистентность миокарда к стрессорному повреждению [3]. Эти данные, а также сходные данные о влиянии даларгина и адаптирующих воздействий на соотношение катаболических и анаболических процессов позволяют предположить наличие взаимосвязи системы эндогенных опиоидов и интенсивности биосинтеза белков в сердечной мышце.

По-видимому, активация эндогенной опиоидной системы при состояниях напряжения [12, 17] оказывает стресс-лимитирующее действие, нап-



равненное на уменьшение стрессорных поврежденных сердца избытком катаболических агентов в стадии тревоги [18], а при адаптации к кратким повторяющимся воздействиям стрессоров малой интенсивности она направлена в определенной мере на стимуляцию анаболических процессов в миокарде.

Таким образом, имеются определенные основания считать, что эндогенные опиатоподобные пептиды могут явиться фактором, индуцирующим формирование «структурного следа» в соответствующих функциональных системах в процессе неспецифической адаптации организма к экстремальным воздействиям.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Крицкая Н. Г. Влияние даларгина на морфофункциональное состояние желудка и кишечника при недостаточности кровообращения в эксперименте: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Новосибирск, 1987.
2. Лишманов Ю. Б., Лисина Т. И. // Пат. физиол.— 1985.— № 5.— С. 14—17.
3. Лишманов Ю. Б. // Бюл. exper. биол.— 1986.— № 9.— С. 271—272.
4. Лишманов Ю. Б., Маслова Л. В., Цибин А. И., Трифонова Ж. В. // Пат. физиол.— 1987.— № 6.— С. 51—53.
5. Майзелис М. Я., Заблудовский А. Л., Шихов С. Н. // Психическая эндокринология.— М., 1988.— С. 74.
6. Меерсон Ф. З. Адаптация, стресс и профилактика.— М., 1981.
7. Меерсон Ф. З., Павлова В. И., Сухих Г. Т. и др. // Пат. физиол.— 1982.— Вып. 5.— С. 3—14.
8. Меерсон Ф. З., Белкина Л. М., Дюсенов С. С. и др. // Кардиология.— 1985.— № 10.— С. 29.
9. Орлова Э. Х., Пшеничкова М. Г., Дмитриев А. Д., Меерсон Ф. З. // Бюл. exper. биол.— 1988.— № 2.— С. 145—148.
10. Спириц А. С. // Биохимия.— 1958.— № 5.— С. 645.
11. Шитов Г. Д., Рапопорт Э. А., Казарян В. А. // Пат. физиол.— 1984.— Вып. 4.— С. 36—40.
12. Amir S., Brown L., Amit L. // Neurosci. Biobehav. Res.— 1980.— Vol. 4, N 1.— P. 77—86.
13. Bloom S. R., Edwards A. V., Janhan N. S. // J. Physiol. (Lond.).— 1973.— Vol. 233.— P. 457—466.
14. Desiderato O., MacKinnon J. R., Hisson H. // J. comp. Physiol.— 1974.— Vol. 87.— P. 208.
15. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem.— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
16. Maslova L. V., Lishmanov Yu. B., Smagin G. N. // Cellular Pathology and Pharmacology.— Budapest, 1988.— P. 69.
17. Millan M. J., Emrich H. M. // Psychother. and Psychosom.— 1981.— Vol. 36, N 1.— P. 43—56.
18. Selye H. // Stress.— 1981.— Vol. 2, N 3.— P. 4.

Поступила 12.07.89

## PARTICIPATION OF OPIOID PEPTIDES IN REGULATION OF PROTEIN SYNTHESIS IN MYOCARDIUM UNDER CONDITIONS OF STRESS AND ADAPTATION

L. P. Maslova, Yu. B. Lishmanov, G. N. Smagin

Institute of Cardiology, Siberian Branch of the Academy of Medical Sciences of the USSR, Tomsk

After adaptation of rats to extreme conditions treatment of the animals with dalgargin (Leu-enkephaline derivative resistant to enzymatic hydrolysis) caused a decrease of catabolism rate in myocardium under stress conditions. Involvement of endogenous opioid peptides in formation of "structure track" during body adaptation to extreme conditions is discussed.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 612.433.018.06:612.826.4.018:1577.175.82:577.175.324

А. А. Карелин, Е. А. Шумова, А. Г. Глоба, Н. В. Зайцева, М. И. Титов

## НАКОПЛЕНИЕ АТФ ПРЕПАРАТАМИ ОБОГАЩЕННЫХ ПЛАЗМАТИЧЕСКИМИ МЕМБРАНАМИ ЧАСТИЦ ИЗ КЛЕТОК ГИПОФИЗА ПОД ВЛИЯНИЕМ ТИРЕОТРОПИН-РЕЛИЗИНГ-ГОРМОНА

Институт хирургии им. А. В. Вишневского АМН СССР, Москва

Тиреотропин-релизинг-гормон (тиролиберин — TRH) является эндогенным трехчленным пептидом; который синтезируется в гипоталамусе, оказывает воздействие на центральную нервную систему [9, 19].

Одной из основных доказанных в настоящее время функций TRH является его участие наряду с вазоактивными интестинальными полипептидами (гистидин-изолейцин-пептидом и другими компонентами) в мультигормональной регуляции синтеза и секреции гормонов передней доли гипофиза (пролактина, соматотропного гормона и др.) [12, 21]. Изучены некоторые механизмы, лежащие в основе стимулируемой TRH секреции гормонов аденогипофиза. Так, доказано, что одной из начальных стадий ответа клеток гипофиза на стимуляцию TRH является взаимодействие рецепторов, чувствительных к гормону, с GTP-связывающими белками [9, 11, 12]. Ряд данных свидетельствует также о тесном сопряжении занятости рецепторов TRH и опосредуемого фосфолипазой C гидролиза фосфоинозитидов в клетках гипофиза, результатом которого является АТФ-зависимый транспорт внутриклеточного кальция через цитоплазматические и клеточную мембраны, сопряженный с перераспределением активности протеинкиназы C (транслокация растворимой формы в мембраны) [13, 18, 19, 23]. Кроме того, наблюдали активирующее влияние TRH на процессы метаболизма в клетках гипофиза крысы [16].

Наиболее ранним ответом клеток различных тканей на опосредованное рецепторами действие инсулина, полипептидных факторов роста (ПФР), митогенов и продуктов онкогенов может быть быстрое изменение фосфорилирования мембранных компонентов посредством генерации мембраносвязанного короткоживущего АТФ [1—8], синтез которого предположительно осуществляется электрохимическим  $[Na^+]$  градиентом  $\Delta\mu_{Na^+}$  в ходе  $Na^+/H^+$  обменного нонтранслоцирующего фосфорилирования [20].

Для роста культивируемых клеточных линий GН-клеток, происходящих из опухоли гипофиза крысы, в качестве обязательного фактора роста клеток в бессывороточной среде требуется TRH [10]. В этой связи было выдвинуто предположение, что на пострецепторном участке передачи и усиления сигнала от рецепторов TRH к мембранным эффекторам (киназам) роль вторичного «мембранного мессенджера» для TRH может выполнять АТФ, генерируемый на плазматической мембране клетки подобно действию многих других ПФР [3, 5, 7, 8].

Методика. Использованные реактивы: аденозин-5'-монофосфата натриевая соль (АМФ), аденозин-5'-дифосфата натриевая соль (АДП), аденозин-5'-трифосфата натриевая соль (АТФ), (NADH) («Reanal», Венгрия);  $\beta$ -оксибутират («Lobe-chemi», Австрия); ротенон (BDH, Англия);  $\beta$ -никотинамидадениннуклеотидфосфата натриевая соль (NaDP); глицил-глицин, D-глюкоза, трис (оксиметил)-аминометан, бычий сывороточный альбумин (БСА) (фракция V), антимицин А, нафталин, ионит Дауэкс 1×8 (100—200 меш), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.49) («Serva», ФРГ); гексокиназа (КФ 2.7.1.1), дифенилоксазол (ППО) — («Fluka», США); цитохром с из сердца лошади, тиролиберин (TRH) — («Sigma», США); 5'-фторсульфонилбензоиладенозин (ФСБА) («Calbiochem», США); аденозин-5'-трифосфат  $^{14}\text{C}$ (U), ( $^{14}\text{C}$ -АТФ) (удельная радиоактивность 17,02 ГБк/ммоль) (ЧСФР); цитрат натрия; дифенилоксазолилбензол (ПОПОП); диоксан и другие отечественного производства (квалификация не ниже химически чистой), TRH был синтезирован в лаборатории химии пептидов ВКНЦ АМН СССР.

Эксперименты проводили на препаратах, обогащенных плазматическими мембранами частиц (ОПМЧ) клеток передней доли гипофиза крупного рогатого скота. Выделение ОПМЧ проводили по методу [25], как описано в работе [26], с некоторыми модификациями. Передние доли гипофиза (обычно в количестве 80—100 г), изъятые при забое крупного рогатого скота, доставляли с мяскокомбината в термосе со льдом. Все дальнейшие операции по изоляции ОПМЧ проводили при 0—4°C (на льду); используемые реактивы, инструменты, центрифуги, посуда были предварительно охлаждены. Гипофизы промывали в ледяном физиологическом растворе, освобождали от фиброзной капсулы и измельчали ножницами в чашках Петри. Кусочки ткани размером 2—4 мм повторно отмывали физиологическим раствором от примеси крови и подвергали дальнейшему измельчению в Уорринг-Блендере в течение 30 с в 3—4 объемах 0,001 М бикарбонатного буфера (рН 7,4). Затем клетки разрушали в гомогенизаторе Даунса с большим затором. Оставшиеся неразрушенными частички осаждали на центрифуге ЦЛР-1 при 1500 об/мин в течение 2 мин и удаляли, а супернатант, профильтрованный через 4 слоя марли, центрифугировали в течение 45 мин на ЦЛР-1 при 2800 об/мин. Осадок отбрасывали, супернатант подвергали скоростному центрифугированию на ультрацентрифуге Spinco L-8 («Beckman», США) при 17000 об/мин в течение 30 мин. Полученный осадок ОПМЧ тщательно гомогенизировали в 50—100 мл (в зависимости от исходного количества ткани) 0,25 М раствора сахарозы в гомогенизаторе Даунса путем многократных (до 30—100) ударов пестика и использовали в качестве стартового материала.

Обогащение полученного препарата плазматическими мембранами контролировали путем определения активности 5''-мононуклеотидазы на каждой стадии выделения [17].

Реакцию TRH с ОПМЧ, изолированными из бычьих гипофизов, проводили по аналогии с предыдущими работами [2—4, 7, 8]. Суспензию ОПМЧ вносили в 20-миллилитровые сосудики Эрленмейера (по 1,5 мл в каждый сосудик), содержащие 2,1 мл инкубационной смеси, в состав которой входили следующие компоненты (конечные концентрации): 0,04 М трис-НСl-буфер (рН 7,5),  $\text{MgSO}_4$  2,5 мМ, АДР 2 мМ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 мМ, NaF 20 мМ, NADH 0,01 мМ,  $\beta$ -оксимасляной кислоты натриевая соль 10 мМ, БСА 277 мкг/мл, цитохром с 0,1 мМ, антимицин А 0,0015 мМ, KCN 1 мМ, ротенон 7,61 мМ, 5'-фторсульфонилбензоиладенозин 0,002 мМ, сахаразы 76 мМ.

Вслед за суспензией ОПМЧ в каждый опытный сосудик вносили TRH в количестве 100—130 мкг, растворенный в 50 мкл 0,04 М трис-НСl-буфера (рН 7,5).

Сосудики помещали в водяную баню аппарата Варбурга. Инкубацию проводили при 30°C в течение 60 с в условиях постоянного продувания инкубационной смеси кислородом под давлением. Перемешивание смеси осуществляли путем непрерывного встряхивания. Реакцию останавливали замораживанием проинкубированных объединенных проб в жидком азоте.

АТФ из проб выделяли методом ионообменной хроматографии на колонках с ионитом Дауэкс 1×8 (Cl<sup>-</sup> форма, 100—200 меш) с последующей лиофилизацией [2—5, 7, 8]. Контроль за полнотой элюции АТФ с колонок осуществляли путем внесения в элюируемые образцы  $^{14}\text{C}$  — АТФ (20 мкл) с последующей радиометрической проб, отобранных до и после хроматографии, на сцинтилляционном счетчике SL-4000 («Rohse Bioelectronique», Франция).

Количество АТФ в продуктах лиофилизации элюата оп-

## Накопление АТФ препаратами обогащенных плазматическими мембранами частиц из клеток гипофиза под влиянием тиреотропин-рилизинг-гормона

№ эксперимента	Количество образовавшегося АТФ, нмоль на 1 мг белка ОПМЧ за 1 мин при 30 °С	
	-TRH	+TRH
1	2,23	8,73
2	4,21	6,41
3	0,5	8,8
4	1,25	1,53
5	1,74	2,21
6	0,8	1,08
7	5,0	16,7
8	0,69	0,91
9	0,08	0,29
10*	0,02	2,01
11*	0,03	1,9

Примечание. Состав инкубационной среды и экспериментальные условия описаны в тексте. После остановки реакции образцы обычно от 4 сосудиков объединяли, нагревали при 100°C 1 мин, охлаждали на ледяной бане до 4°C и затем центрифугировали при 6000 g в течение 20 мин. Супернатанты подвергали ионообменной хроматографии на колонках Дауэкс 1×8 (Cl<sup>-</sup>, 100—200). АТФ элюировали 6 мл 0,1 н. HCl. Элюаты лиофилизовывали, растворяли в 1 мл 0,04 М трис-НСl-буфера (рН 7,5) и содержание АТФ определяли согласно [22] на флуоресцентном спектрофотометре.

ределяли методом [22], флуоресценцию восстановленного NADP измеряли на спектрофлуориметре MPF-4A («Hitachi», Япония). Исходное количество АТФ в контрольных и подопытных образцах рассчитывали с учетом выхода при элюции на 1 мг белка стартовой суспензии ОПМЧ. Концентрацию белка определяли методом [23].

Результаты и обсуждение. Результаты проведенных экспериментов представлены в таблице.

Всего проделано 9 экспериментов с использованием TRH, синтезированного в лаборатории химии пептидов ВКНЦ АМН СССР, и 2 эксперимента с использованием TRH «Serva» (в таблице отмечены звездочкой). Как видно из таблицы, и в том и в другом случае во всех экспериментах наблюдали прирост величины АТФ в подопытных образцах по сравнению с контрольными (различия достоверны с вероятностью  $p < 0,05$ ). Несмотря на то что величина этого АТФ непостоянна и колеблется в пределах 0,21—11,6 нмоль/мин·мг белка, факт обнаружения синтеза АТФ в образцах после добавления TRH к инкубационной среде является несомненным. Колебания синтеза плазмомембранного АТФ обусловлены, возможно, различным возрастом, полом животных и др.

Учитывая результаты предыдущих работ [1—8], можно предположить, что синтезируемый на плазматической мембране (ПМ) в ответ на стимуляцию TRH сигнальный АТФ участвует в механизмах трансмембранной передачи или усиления тиролиберинового сигнала к секреции гипофизарных гормонов или сигнала к поддержанию роста клеток гипофиза в культуре.

Изучение процесса высвобождения пролактина, гормона роста и других гормонов, синтезируемых в гипофизе, а также исследование роста клеток GN-типа является важным с точки зрения эндокринологии, фармакологии и онкологии. Представляет значительный интерес дальнейшее исследование механизма генерации TRH-стимулируемого короткоживущего сигнального АТФ на

ПМ клеток гипофиза и выявление его участия в процессе трансдукции сигнала тиреотропин-рилизинг-гормона.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Карелин А. А. // Вопр. мед. химии.— 1980.— № 2.— С. 220—227.
2. Карелин А. А. // Там же.— 1981.— № 5.— С. 679—685.
3. Карелин А. А. // Вестн. АМН СССР.— 1983.— № 7.— С. 74—85.
4. Карелин А. А., Глоба А. Г., Демидова В. С. и др. // Вопр. мед. химии.— 1985.— № 2.— С. 111—117.
5. Карелин А. А. // Вестн. АМН СССР.— 1986.— № 8.— С. 77—90.
6. Карелин А. А. // Там же.— 1987.— № 7.— С. 35—41.
7. Карелин А. А., Демидова В. С., Глоба А. Г. и др. // Вопр. мед. химии.— 1989.— № 3.— С. 120—124.
8. Карелин А. А., Николаева Л. Ю., Николаев В. И., Писаржевский С. А. // Бюл. экпер. биол.— 1986.— Т. 102, № 12.— С. 709—712.
9. Beretta L., Boulterin M., Sobel A. // Endocrinology.— 1988.— Vol. 122, N 1.— P. 40—51.
10. Bollenstein I., Hayashi T., Hutchings S. et al. // Meth. Enzymol.— 1987.— Vol. 58.— P. 94—109.
11. Drummond A. H. // Nature (Lond.).— 1985.— Vol. 315.— P. 752—755.
12. Drummond A. H. // J. exp. Biol.— 1986.— Vol. 124.— P. 337—358.
13. Fearon C. W., Tashjian A. H. // J. biol. Chem.— 1987.— Vol. 262, N 20.— P. 9515—9520.
14. Gershengorn M. C., Yeras B., Purrello V. S., Rebecchi M. Y. // Ibid.— 1984.— Vol. 259.— P. 10675—10681.
15. Gershengorn M. C., Paul M. E. // Endocrinology.— 1986.— Vol. 119, N 2.— P. 833—839.
16. Hallam T. Y., Tashjian A. H. // Biochem. J.— 1987.— Vol. 242, N 2.— P. 411—416.
17. Heppel L., Hilmo R. // Meth. Enzymol.— 1955.— Vol. 2.— P. 546—550.
18. Hinkle P. M., Hewlett E. L., Gershengorn M. C. // Biochem. J.— 1986.— Vol. 237, N 1.— P. 181—186.
19. Ishizuka T., Ito Y., Murayama M. et al. // Clin. chem. Acta.— 1987.— Vol. 170, N 2—3.— P. 351—354.
20. Karelin A. A., Globa A. G., Demidova V. S. // 19th Meeting FEBS, Abstract book.— Rome, 1989.— P. 391.
21. Koiwai K., Kikuyama S., Seki T. et al. // Gen. comp. Endocr.— 1986.— Vol. 64, N 2.— P. 254—259.
22. Kornberg A. // J. biol. Chem.— 1950.— Vol. 182.— P. 779—793.
23. Lagast H., Porran T., Waldvogel F. et al. // J. clin. Invest.— 1984.— Vol. 73.— P. 878—883.
24. Lowry O., Rosebrough N., Farr A. et al. // J. biol. Chem.— 1951.— Vol. 193.— P. 265.
25. Neville D. // J. Biophys. Biochem. Cytol.— 1960.— Vol. 8.— P. 413.
26. Poirier G., Labrie F., Barden N. et al. // FEBS Lett.— 1972.— Vol. 20, N 3.— P. 283—286.

Поступила 09.01.90

#### EFFECT OF THYROTROPIN-RELEASING HORMONE ON ACCUMULATION OF ATP IN THE PREPARATIONS OF PARTICLES ENRICHED WITH PLASMATIC MEMBRANES FROM HYPOPHYSIAL CELLS

A. A. Karelin, E. A. Shumova, A. G. Globa, N. V. Zaitseva, M. I. Titov

A. V. Vishnevsky Institute of Surgery, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Thyrotropin-releasing hormone (TRH, thyroliberine) is endogenous tripeptide, which is synthesized in hypothalamus and is responsible for multihormonal regulation of synthesis and secretion of hormones in the anterior lobe of the hypophysis. TRH is required as an obligatory factor stimulating the GH cell lines growing in cell culture. As indicated in previous studies activation of target cells (in response to effects of insulin, growth hormone, polypeptide factors of

growing, mitogenes, chemostimulators) followed by fast alterations in phosphorylation of membrane components which is realized via generation of "signal" ATP in plasmatic membranes. This type of ATP was synthesized within 1 min in the preparations of particles enriched with plasmatic membranes isolated from bovine hypophyses and washed in 0.25 M sucrose, if the particles were incubated in the mixture containing TRH 30-40 mg/ml, Tris-HCl buffer, pH 7.5, ADP-Na salt  $Mg^{2+}$ , inorganic phosphate, NaF, under conditions of NADH oxidation in presence of cytochrome c and oxygen. Accumulation of TRH-stimulated ATP in plasmatic membranes was detected, after addition of the kinases inhibitor 5'-fluorosulfonyl benzoyladenine into the incubation mixture, in 11 large scale experiments. The rate of TRH-stimulated synthesis of ATP was dissimilar in various preparations of hypophyses and was equal to 0.21-11.6 nmole/min/mg of protein at 30°. Plasmatic membrane signal ATP appears to serve as a secondary "membrane messenger" for TRH during transfer of a signal and its acceleration from the TRH receptors along the cell surface to membrane effectors — kinases.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616.12-008.331.4-02:616-008.921.727.71-092.9-074

М. Е. Галаган, А. В. Широколава, А. Ф. Ванин

#### ГИПОТЕНЗИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ ОКСИДА АЗОТА, ПРОДУЦИРУЕМОГО ИЗ ЭКЗО- И ЭНДОГЕННЫХ ИСТОЧНИКОВ

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

Установлено, что агент, определяющий вазодилаторное, а следовательно, и гипотензивное действие ряда экзогенных нитро- и нитрозосоединений, таких, как нитропруссид (НП), нитроглицерин (НГ) и др., имеет ту же природу, что и вещество, вырабатываемое в стенках сосудов из эндогенных источников и оказывающее такое же физиологическое действие. Им является оксид азота [6, 9—11]. Его физиологический эффект обусловлен способностью активировать один из важнейших внутриклеточных регуляторных ферментов — гуанилатциклазу [6, 8]. Последняя, катализируя продукцию циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ), через него инициирует сложную, еще до конца не изученную систему биохимических процессов, приводящих к вазодилатации [1, 6].

Оксид азота — высокорекреационное соединение, он легко реагирует, например, с супероксидным радикалом, окисляясь до нитрата [7]. Поэтому в организме он должен быстро исчезать; этим, очевидно, обусловлено быстрое прекращение гипотензивного действия многих продуцентов оксида азота при их одноразовом введении [4].

В настоящей работе прослежена корреляция между артериальным давлением (АД) у животных и содержанием в их организме оксида азота, образующегося из НП и НГ, а также из эндогенных его источников, продуцирующих оксид азота после введения в организм цитратных комплексов железа. Возникает вопрос: действительно ли гипотензия развивается и поддерживается только при наличии в тканях оксида азота?

Методика. В опытах использовали белых беспородных нормотензивных крыс массой 100—110 г. АД измеряли манометром МНП-60 через катетер, введенный в сонную артерию крыс, наркотизированных этиминал-нарием

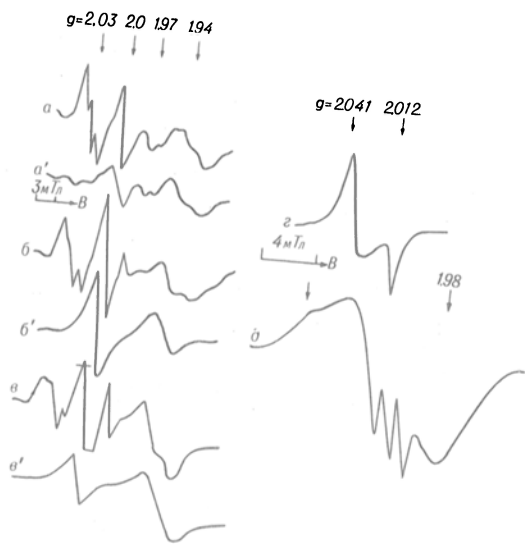


Рис. 1. Спектры ЭПР печени (*a, a'*), почек (*б, б'*) и сердца (*а, а'*) мышей контрольных (*а'-а'*) и подопытных (*а-а'*) после внутриа­териального введения последним ДЭТК (200 мг/кг) и НП (300 мг/кг).

Наблюдаются триплетный сигнал МНКЖ с ДЭТК при  $g \sim 2,03$ , сигнал свободных радикалов при  $g \sim 2,0$ , сигнал комплексов молибдена при  $g \sim 1,97$  и сигнал восстановленных железо-серных белков при  $g \sim 1,94$ ;  $\varepsilon$  — сигнал ЭПР ДНКЖ с тиосульфатом;  $\delta$  — сигнал нитрозильных комплексов гемоглобина в печени. Запись при 77 К.

(40 мг/кг). Цитратные комплексы  $Fe^{2+}$  получали путем смешивания в физиологическом растворе  $FeSO_4$  ( $2 \cdot 10^{-2}$  М) и цитрата натрия (1:5). Эти комплексы, а также НП («Chemapol», Чехословакия) в физиологическом растворе и НП в смеси физиологического раствора и спирта (1:1) вводили в сонную артерию через катетер в дозах, указанных ниже. Для выявления оксида азота в тканях животных использовали его способность образовывать парамагнитные мононитрозильные комплексы железа (МНКЖ) с диэтилдитиокарбаматом (ДЭТК) — Na [1], вводившимся внутриа­териально или внутривенно. Попадая в ткани, ДЭТК связывался с эндогенным железом, образуя «ловушки» оксида азота — комплексы  $Fe^{2+}$  — ДЭТК. Через 10—30 мин после введения ДЭТК животных забивали и их ткани замораживали в жидком азоте. Концентрацию МНКЖ с ДЭТК в тканях оценивали методом ЭПР по интенсивности их сигнала ЭПР, приведенного на рис. 1. Сигналы регистрировали на радиоспектрометре ЭПР-В при 77 К.

Результаты и обсуждение. НП продуцировал оксид азота в организме крыс эффективнее, чем НП. Чувствительность используемого нами радиоспектрометра позволяла четко регистрировать образование МНКЖ с ДЭТК в печени крыс при внутриа­териальном введении животным на «фоне ДЭТК» 300 мкг НП на 1 кг массы тела. ДЭТК вводили внутриа­териально за 5 мин до инъекции НП в дозе 200 мг/кг. Интенсивность сигнала ЭПР МНКЖ с ДЭТК в печени соответствовала включению в комплексы до 6 мкг оксида азота, т. е. до 50 % его количества, содержавшегося в НП. В остальных органах: почках, сердце, легких, селезенке — концентрация комплекса была в 5—10 раз ниже, чем в печени (см. рис. 1). В отсутствие ДЭТК введение НП в дозе 300 мкг/кг вызывало резкое снижение АД на 50—60 мм рт. ст. (рис. 2) с последующим его возвращением к исходному уровню за 7—10 мин. При снижении дозы НП до 20—30 мкг/кг скорость восстановления АД была выше (см. рис. 2), но в этом случае количество образующихся МНКЖ с ДЭТК было недостаточно для уверенной их регистрации мето-

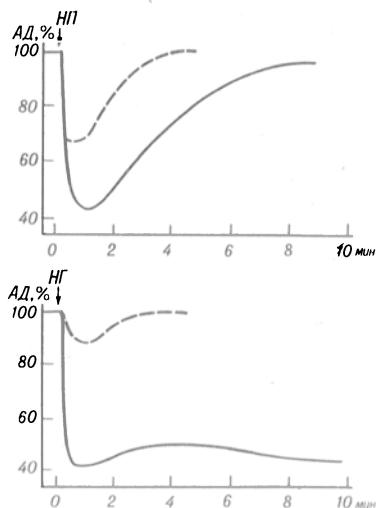


Рис. 2. Изменение АД у наркотизированных крыс после введения им НП и HP.

Вверху: введение НП в дозе 30 мкг/кг (пунктирная линия) или 300 мкг/кг (сплошная линия); внизу — введение HP в дозе 200 мкг/кг (пунктирная линия) или 800 мкг/кг (сплошная линия).

дом ЭПР. Использование комплексов  $Fe^{2+}$  — ДЭТК в качестве «ловушки» оксида азота позволило проследить корреляцию между его содержанием в организме после введения НП и его гипотензивным действием. Как следует из рис. 3, гипотензивный эффект НП четко коррелировал с наличием оксида азота, продуцируемого из НП, в печени и, очевидно, во всем организме. Уже через 7—10 мин после введения НП количество оксида азота снижалось до нуля, при этом АД восстанавливалось до исходного уровня. Таким образом, гипотензия, вызванная НП, сохранялась только при наличии в организме оксида азота, его исчезновение коррелировало с нормализацией АД.

О роли оксида азота как гипотензивного компонента НП свидетельствует и тот факт, что при обработке 0,02 % раствора НП, вводившегося животным, дитионитом (1 %) и тиосульфатом-Na (отношение НП/тиосульфат равно 1:5) гипотензивное действие раствора НП снималось. При этом в растворе возникали динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) с тиосульфатом, регистрируемые методом ЭПР (см. рис. 1). В них включалось до 30 % железа и 60 % оксида азота, входивших в состав НП. Ранее было показано, что ДНКЖ с тиосульфатом и другими анионными лигандами вызывают заметное снижение АД в дозах, в десятки раз превышающих количество НП, оказывающего такое же гипотензивное действие [4]. Этим и объясняется резкое ослабление

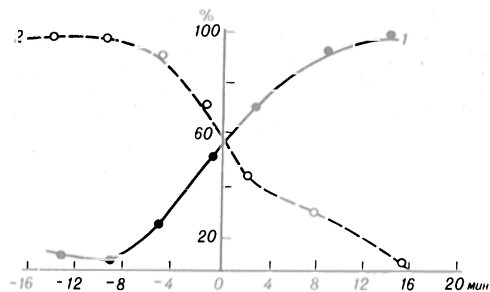


Рис. 3. Изменение количества МНКЖ с ДЭТК, образующихся в печени наркотизированных крыс (1), и АД у этих же животных (2) в зависимости от периода между введением ДЭТК (200 мг/кг) и НП (300 мг/кг).

Положительная величина этого периода — НП введен после ДЭТК, отрицательная — НП введен до ДЭТК.

гипотензивного эффекта раствора НП после его обработки дитионитом и тиосульфатом. Таким образом, именно включение оксида азота из НП в менее активные ДНКЖ снижало гипотензивное действие НП, другие же его компоненты — железо и ионы цианида — очевидно, не влияли на это свойство НП.

Внутриартериальное введение крысам НГ в дозе 200 мкг/кг вызывало кратковременное обратимое снижение АД. Оно было существенно слабее, чем при введении той же молярной дозы НП — 300 мкг/кг (см. рис. 2). При этом образующегося из НГ оксида азота было недостаточно для появления заметного количества в печени МНКЖ с ДЭТК; последний вводили внутриартериально (200 мкг/кг) или внутрибрюшинно (0,5 г/кг) до или после НГ. МНКЖ с ДЭТК возникали в печени при повышении дозы НГ до 800 мкг/кг и выше при внутрибрюшинном введении ДЭТК (0,5 г/кг). Кроме того, в тканях методом ЭПР обнаруживали и нитрозильные комплексы гемоглобина (см. рис. 1). Внутриартериальное введение этой повышенной дозы НГ вызывало пролонгированную гипотензию (см. рис. 2). Восстановления АД до исходного уровня в этом случае не наблюдалось, так что для НГ не удалось оценить количество оксида азота в тканях после окончания его гипотензивного действия.

Образование оксида азота из эндогенных источников [2] можно наблюдать, вводя животным цитратные комплексы  $Fe^{2+}$ . Предполагается, что последние, вызывая перекисидацию липидов и жирных кислот, при посредстве образующихся пероксидов инициируют окисление до нитрозоформы аминогрупп органических соединений, например аргинина, с последующим высвобождением оксида азота. Внутриартериальное введение крысам  $Fe^{2+}$ -цитрата вызывало образование МНКЖ с ДЭТК в печени и других органах, а также снижение АД у этих животных (см. рис. 1 и 2). Гипотензивное действие  $Fe^{2+}$ -цитрата было кратковременным — 10—15 мин. Что касается образования МНКЖ с ДЭТК, то их можно было получить, вводя ДЭТК внутрибрюшинно в дозе 250 мкг/кг спустя 30 или 60 мин после внутриартериальной инъекции  $Fe^{2+}$ -цитрата (1 мг  $Fe^{2+}$  на 1 кг), когда гипотензивное действие последнего уже заканчивалось.

В этих опытах МНКЖ с ДЭТК возникали в большем количестве в печени не наркотизированных, а бодрствующих животных. При одновременном введении им  $Fe^{2+}$ -цитрата внутрибрюшинно в дозе 15 мг  $Fe^{2+}$ /кг и ДЭТК подкожно в бедро в дозе 300 мкг/кг в МНКЖ с ДЭТК в печени через 30 мин включалось до 0,5 мкг оксида азота на 1 г ткани. Если же ДЭТК вводили бодрствующим животным через 1,5 ч после внутрибрюшинного введения им  $Fe^{2+}$ -цитрата, количество оксида азота, связанного с МНКЖ, повышалось до 1,5—2 мкг на 1 г ткани. При введении ДЭТК спустя 5—6 ч количество МНКЖ с ДЭТК в печени крыс снижалось в 3—4 раза. Таким образом, количество оксида азота, образующегося в организме бодрствующих животных, коррелировало с содержанием в печени свободного железа, сначала возрастающим, затем снижающимся [5] до исходного уровня после

внутрибрюшинного введения животным цитратного комплекса железа.

Такое же изменение во времени количества оксида азота наблюдалось и в опытах на наркотизированных животных. В связи с этим возникает вопрос: почему у этих животных оно не коррелировало со снижением АД? Ответ на него требует дальнейших исследований. Вполне возможно, что оксид азота, обнаруживаемый через 1—1,5 ч после введения  $Fe^{2+}$ -цитрата главным образом в печени и почках, не доходил до кровеносных сосудов и поэтому не влиял на их тонус. Такое влияние имело место лишь вначале после инъекции комплекса железа, когда последний поступал в кровь и мог инициировать образование оксида азота в стенках сосудов. Затем эти комплексы локализовались главным образом в печени и почках, в клетках которых они и инициировали образование оксида азота.

Феномен блокирования рибофлавином гипотензивного действия использованных агентов ранее был продемонстрирован для НП, НГ и ДНКЖ с тиосульфатом [3]. Оно объясняется ингибирующим влиянием рибофлавина на мишень действия оксида азота — гуанилатциклазу. Рибофлавин снимал и гипотензивное действие  $Fe^{2+}$ -цитрата. При внутриартериальном введении последнего сразу после внутриартериальной инъекции рибофлавина (3 мг/кг) гипотензии не наблюдалось. Этот факт согласуется с предположением о том, что гипотензивная активность  $Fe^{2+}$ -цитрата обусловлена его способностью продуцировать в организме из эндогенных источников оксид азота, воздействие которого на гуанилатциклазу в стенках сосудов вызывает их дилатацию и как ее следствие гипотензию.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ванин А. Ф., Мордвицев П. И., Клещев А. Л. // *Studia biophysica*.— 1984.— Bd 102.— S. 135.
2. Ванин А. Ф., Кубрина Л. П., Курбанов И. С. и др. // *Биохимия*.— 1989.
3. Галаган М. Е., Мордвицев П. И., Ванин А. Ф. // *Бюл. экпер. биол. мед.*— 1989.
4. Клещев А. Л., Мордвицев П. И., Ванин А. Ф. // *Studia biophysica*.— 1985.— Bd 105.— S. 93.
5. Тарасова П. И., Коваленко О. А., Ванин А. Ф. // *Биофизика*.— 1981.— Т. 26.— С. 678.
6. Arnold W. P., Mittal C. K., Katsuca S., Murad F. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA*.— 1977.— Vol. 74.— P. 3205.
7. Doule M. R., Palmer W. // *J. inorg. Biochem.*— 1981.— Vol. 14.— P. 351.
8. Gerzer R., Hofmann F., Schultz G. // *Europ. J. Biochem.*— 1981.— Vol. 116.— P. 79.
9. Ignarro L. J., Buga G. M., Wood K. S. et al. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA*.— 1987.— Vol. 84.— P. 9265.
10. Murad F., Arnold W. P., Mittal C. K. // *Advanc. cycl. Nucleotid. Res.*— 1979.— Vol. 11.— P. 175.
11. Palmer R. M., Ferrige A. G., Moncada S. // *Nature*.— 1987.— Vol. 327.— P. 524.

Поступила 12.07.89

#### HYPOTENSIVE EFFECT OF NITROGEN OXIDE OBTAINED FROM EXOGENOUS AND ENDOGENOUS SOURCES

M. E. Galagan, A. V. Shirokolava, A. F. Vanin

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

Correlation was studied between content of nitrogen oxide, developed in rat tissues after administration of nitroprusside, nitroglycerol or  $Fe^{2+}$ -citrate, and the rate of these

agents hypotensive effect. Content of nitrogen oxide in tissues was measured using EPR procedure by calculation of paramagnetic mononitrosyl ferrum complexes and exogenous ligand sodium diethyl thiocarbamate. After administration of nitroprusside these complexes developed only within several minutes when the drug exhibited hypotensive effect on animals as a result of nitrogen oxide production. The correlation was not found for nitroglycerol effect due to low level of nitrogen oxide obtained from this drug. Administration of  $Fe^{2+}$ -citrate enabled to detect the mononitrosyl ferrum-ligand complexes in liver tissue within 1 hr after termination of these complexes hypotensive effect.

© С. А. ОСТРОВЦОВА, С. А. СТРУМИЛО, 1991

УДК 612.173.1.015.1:577.152.1

С. А. Островцова, С. А. Струмило

### КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛИПОАМИДДЕГИДРОГЕНАЗЫ ОКСОГЛУТАРАТДЕГИДРОГЕНАЗНОГО КОМПЛЕКСА СЕРДЦА ЧЕЛОВЕКА

Институт биохимии АН БССР, Гродно

Исследование путей регуляции оксоглутаратдегидрогеназного комплекса (ОГДК) сердца человека предпринято нами с учетом важной роли ОГДК в метаболизме и биоэнергетике миокарда [4]. Для раскрытия тонких регуляторных механизмов полиферментного ОГДК необходимо иметь четкое представление о функционировании составляющих его индивидуальных ферментов. В предыдущей публикации были показаны возможности и особенности регуляции ОГДК различными эффекторами на уровне пускового компонента комплекса, осуществляемые по аллостерическому типу [4]. Цель настоящей работы — кинетическое изучение липоамиддегидрогеназы (КФ 1.6.4.3), которая, являясь терминальным функциональным компонентом ОГДК, может также служить объектом регуляции активности целостного комплекса [2].

**Методика.** Очистку ОГДК из сердечной мышцы человека, погибшего в результате автокатастрофы, осуществляли ранее описанным методом [4]. Начальную скорость реакции, катализируемой липоамиддегидрогеназой, входящей в состав ОГДК, регистрировали при 340 нм и 30 °С на спектрофотометре «Spectord UV VIS» с термостатируемым кюветодержателем. Реакционная среда содержала 50 мМ калийфосфатный буфер (рН 7,5), 0,5 мМ  $MgCl_2$ , 0,1 мМ ЭДГА и различные концентрации дигидролипоамида (ДЛА) и НАД, как это указано в подписях к рисункам. Реакцию начинали внесением в кювету с реакционной средой 0,5–2 мкг ОГДК, который обладал удельной липоамиддегидрогеназной активностью 20 ед. на 1 мг белка. За единицу принимали то количество фермента, которое катализирует образование 1 мкмоль НАДН в 1 мин при 30 °С.

**Результаты и обсуждение.** Липоамиддегидрогеназа катализирует обратимую реакцию НАД-зависимого окисления дигидролипоильных групп центрального компонента ОГДК (при функционировании комплекса) или вносимого в среду экзогенного дигидролипоамида [10]. Двухсубстратная реакция предполагает кинетическое изучение зависимости начальной ее скорости от концентрации одного из субстратов при нескольких фиксированных концентрациях второго субстрата — кофермента [1]. Как видно на рис. 1, зависимость скорости реакции, катализируемой липоамиддегидрогеназой ОГДК сердца человека, от концентрации НАД в координатах Лайнуиве-

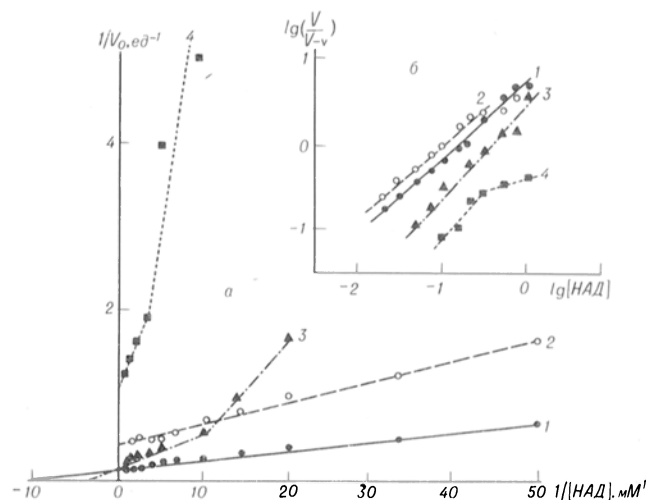


Рис. 1. Зависимость скорости липоамиддегидрогеназной реакции от концентрации НАД в координатах Лайнуивера — Берка (а) и координатах Хилла (б).

1 — 1 мМ дигидролипоамид (ДЛА); 2 — 0,1 мМ ДЛА; 3 — 1 мМ ДЛА и 0,1 мМ НАДН; 4 — 0,1 мМ ДЛА и 0,1 мМ НАДН.

ра — Берка является линейной. Прямолинейность графика сохраняется в широком концентрационном диапазоне и при разных уровнях дигидролипоамида. Это указывает на выполнимость уравнения Михаэлиса—Ментен, отражающего гиперболический характер кинетики [1]. Эффективная величина  $K_m$  для НАД при 1 мМ концентрации ДЛА составляет 0,11 мМ (см. рис. 1).

Следует отметить, что для липоамиддегидрогеназы из почек показана отрицательная кооперативность взаимодействия центров, связывающих НАД, при низких концентрациях ДЛА [9]. В аналогичных условиях липоамиддегидрогеназа из сердца человека не проявляет таких свойств (см. рис. 1): коэффициент Хилла как при 1 мМ, так и при 0,1 мМ концентрации ДЛА близок к единице ( $n_H=0,9$ ).

В плане регуляции липоамиддегидрогеназы особый интерес представляет ингибирование ее продуктом реакции — НАДН. Кинетическое изучение липоамиддегидрогеназы ОГДК из сердца человека показало, что НАДН ингибирует фермент по смешанному типу в отношении НАД (см. рис. 1). Константа ингибирования для НАДН, рассчитанная из графических данных с помощью известных уравнений [1], равна 0,08 мМ.

В еще большей степени ингибирование липоамиддегидрогеназы НАДН проявляется при низкой концентрации ДЛА, что может свидетельствовать о наличии определенных стерических противодействий и на уровне центров, связывающих ДЛА.

Примечательно, что в присутствии НАДН график зависимости  $V^{-1}$  от  $НАД^{-1}$  становится криволинейным (см. рис. 1). Те же данные в координатах  $\left\{ \lg \frac{V}{V-v} ; \lg S \right\}$  позволяют, исходя из наклонов прямолинейных участков зависимости (см. рис. 1), определить коэффициент Хилла ( $n_H$ ).

Так, при 1 мМ концентрации ДЛА величина  $n_H$  повышается до 1,2, что служит кинетическим признаком положительной кооперативности взаи-

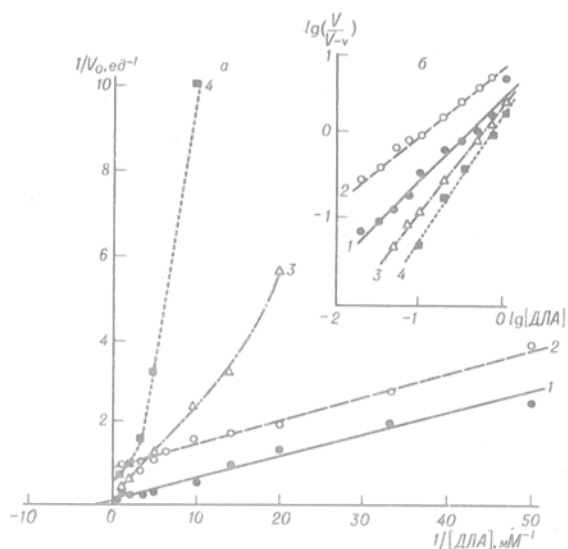


Рис. 2. Зависимость скорости липоамиддегидрогеназной реакции от концентрации дигидролипоамида (ДЛА) в двойных обратных координатах (а) и координатах Хилла (б).

1 — 1 мМ НАД; 2 — 0,05 мМ НАД; 3 — 1 мМ НАД и 0,1 мМ НАДН; 4 — 1 мМ НАД и 0,2 мМ НАДН.

модействия НАД-связывающих центров. При низкой концентрации ДЛА (0,1 мМ) график в координатах Хилла состоит из 2 участков с разными наклонами, соответствующими величинам  $n_H$  1,4 и 0,2. Можно предположить, что в этих условиях с повышением концентрации НАД происходит трансформация положительной кооперативности в отрицательную.

В присутствии НАДН наблюдаются также кинетические проявления положительной кооперативности связывания другого субстрата — ДЛА (рис. 2). Коэффициент Хилла в этом случае достигает величины 1,4—1,5 (см. рис. 2). Ингибирование липоамиддегидрогеназы НАДН заключает в себе элемент конкуренции не только по отношению к НАД, но и по отношению к ДЛА, поскольку степень ингибирования уменьшается при повышении концентрации ДЛА. Значение  $K_i$  для НАДН составляет 0,1 мМ и по величине близко к аналогичному показателю ( $K_i$ ) в отношении НАД.

В отсутствие НАДН прямые, отражающие зависимость  $V^{-1}$  от ДЛА при 2 уровнях НАД, являются параллельными. Эффективная  $K_m$  для ДЛА при концентрации НАД, близкой к насыщающей, равна 0,5 мМ.

Параллельность графиков (см. рис. 2) свидетельствует о кинетическом механизме типа пинг-понг [5]. Однако в случае липоамиддегидрогеназы из сердца человека в отличие от одноименного фермента из некоторых других источников [3] параллельный тип кинетических графиков наблюдается лишь для зависимости  $V^{-1}$  от ДЛА $^{-1}$ , а не для зависимости  $V^{-1}$  от НАД $^{-1}$  (см. рис. 1) при различных концентрациях ДЛА. К тому же классические представления о механизме пинг-понг предусматривают конкурентный характер ингибирования конечным продуктом реакции в отношении первого субстрата [6].

В нашем случае НАДН противодействует связыванию как НАД, так и ДЛА. Это объяснимо, если принять во внимание предположение о том, что субъединицы липоамиддегидрогеназы могут

акцептировать субстраты в одном локусе, который структурно не изменяется при окисленном и восстановленном состоянии фермента [7].

Что касается отклонений кинетики липоамиддегидрогеназы от гиперболического типа в присутствии НАДН, то это может быть, по мнению некоторых авторов [8], следствием трансформации фермента из восстановленной формы (EH<sub>2</sub>) в сверхвосстановленную (EH<sub>4</sub>) неактивную форму, содержащую полностью редуцированный флаavin. Вместе с тем нельзя исключать и обсуждавшуюся выше возможность кооперативных взаимодействий центров, акцептирующих НАД и ДЛА, при аллостерическом действии НАДН.

Во всяком случае бесспорно то, что НАДН оказывает существенное регуляторное влияние на функционирование липоамиддегидрогеназы ОГДК сердца человека.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики.— М., 1979.
2. Струмило С. А. // Вопр. мед. химии.— 1988.— № 2.— С. 2—7.
3. Струмило С. А., Виноградов В. В. Витаминзависимые ферменты надпочечников (дегидрогеназы 2-оксоислот).— Минск, 1988.
4. Струмило С. А., Островцова С. А., Киселевский Ю. В. и др. // Бюл. exper. биол.— 1989.— № 5, С. 23—28.
5. Cleland W. W. // Biochim. biophys. Acta.— 1963.— Vol. 67, N 1.— P. 104—137.
6. Ngo T. T., Barbean A. // J. Neurochem.— 1978.— Vol. 31, N 1.— P. 69—75.
7. Reed J. K. // J. biol. Chem.— 1973.— Vol. 248, N 13.— P. 4834—4839.
8. Schminke-Ott E., Bisswanger H. // Europ. J. Biochem.— 1981.— Vol. 114, N 2.— P. 413—420.
9. Tsai C. S. // Arch. Biochem.— 1973.— Vol. 159, N 1.— P. 453—457.
10. Tsai C. S., Redman J., Templeton D. M. // Ibid.— 1981.— Vol. 209, N 1.— P. 291—297.

Поступила 15.08.89

#### KINETIC PROPERTIES OF THE LIPOAMIDE DEHYDROGENASE COMPONENT CONTAINING IN OXOGLUTARATE DEHYDROGENASE COMPLEX OF HUMAN HEART TISSUE

S. A. Ostrovtsova, S. A. Strumilo

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

Kinetics of lipamide dehydrogenase catalyzed reaction is described by Michaelis-Menten equation if concentrations of NAD and dihydroliipoamide (DLA) varied. Effective  $K_m$  values were equal to 0.11 mM for NAD and 0.50 mM for DLA, respectively. Kinetic indications of positive cooperation between sites binding both NAD and DLA were manifested in presence of NADH. Apparent  $K_i$  value for NADH constituted 0.88-0.10 mM, thus demonstrating the effective regulation of the lipamide dehydrogenase activity by end products.

Н. Н. Прозоровская, Е. А. Козлов, Т. А. Прохорова, Т. А. Горохова, В. Н. Прозоровский, А. А. Дельвиц

## ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСКРЕЦИИ ПИРИДИНОЛИНА С МОЧОЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВОЗРАСТА И ПОЛА

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Пиридинолин является производным 3-гидроксипиридина с тремя боковыми цепями и играет роль трифункциональной стабильной поперечной связи, специфичной для фибриллярных коллагенов [4, 8]. В настоящее время идентифицированы следующие поперечные связи со структурой пиридинолина: гидроксипиридинолин и его аналог, у которого отсутствует 3-гидроксильная группа (лизилпиридинолин). Предполагается существование еще одного дезоксианалога, у которого отсутствует фенольная гидроксильная группа и который в отличие от первых двух соединений не обладает естественной флюоресценцией [10]. Гидроксипиридинолин широко распространен в соединительных тканях, исключая кожу и роговицу, превалируя в коллагенах хрящевой ткани и связок; лизилпиридинолин в значительных количествах присутствует в коллагене костной ткани [4], тогда как нефлюоресцирующий аналог гидроксипиридинолина обнаружен в основном в коже [10].

Установлено, что пиридинолин экскретируется с мочой [2, 6, 7, 11], тем самым продемонстрирована возможность использования определяемого в моче пиридинолина в качестве специфического маркера деградации зрелого коллагена.

Имеющиеся в литературе [6, 7] данные позволяют предполагать существование возрастных различий в уровне пиридинолина, но не дают полного представления о физиологических изменениях экскреции с мочой этой специфичной для фибриллярных коллагенов поперечной сшивки. Между тем для выявления нарушений катаболизма коллагена необходимо знание физиологических пределов возрастных изменений экскреции пиридинолина.

Настоящая работа посвящена выявлению закономерностей изменений экскреции пиридинолина (суммарно гидроксипиридинолина и лизилпиридинолина) с мочой у детей и взрослых в зависимости от возраста и пола.

**Методика.** Экскрецию пиридинолина (суммарно гидроксипиридинолин и лизилпиридинолин) определяли у 115 человек в возрасте от 1 года до 86 лет, которые были условно разделены на 13 возрастных групп. В первые 10 возрастных групп (1—3, 4—6, 7—9, 10—12, 13—15, 16—18, 19—21, 22—30, 31—40, 41—50 лет) входило по 10 человек (5 женского и 5 мужского пола), в остальные 3 группы (51—60, 61—70 и 71—86 лет) — по 5 (только женщины). Для анализа использовали утреннюю порцию мочи, собранную после соблюдения бесколлагеновой диеты на протяжении предшествующих суток.

Стандартный препарат гидроксипиридинолина был получен из бычьего ахиллова сухожилия [3] с последующим фракционированием на сефадексе G-15 и хроматографированием на фосфоцеллюлозе и ионообменной смоле Аминекс-Q150S. После экстракции 4M раствором гуанидин-HCl в 0,05 M трис-HCl pH 7,5 (48 ч при 4 °C) ткань промывали

водой и гидролизовали кипячением с обратным холодильником в 3 н. HCl в течение 48 ч. Гидролизат концентрировали и четырежды экстрагировали равным объемом ледяной уксусной кислоты и 4 объемами n-бутанола. Образовавшееся в течение ночи на холоде коричневое масло высушивали в вакууме, растворяли в 10 % уксусной кислоте и фракционировали на колонке (2,5×32 см) с сефадексом G-15 («Pharmacia», Швеция), используя в качестве элюента этот же раствор. Фракции, содержащие флюоресцирующий материал (флюоресценцию измеряли на спектрофлуориметре «Элюмин-300» отечественного производства, используя длины волн возбуждения 297 нм и эмиссии 395 нм), высушивали в вакууме, растворяли в воде и наносили на колонку (0,9×12,5 см) с фосфоцеллюлозой (H<sup>+</sup>-форма; «Whatman», Англия). Хроматографию проводили градиентным элюированием (100 мл H<sub>2</sub>O+100 мл 1 н. HCl). Фракции, содержащие флюоресцирующий материал (центральная часть пика), объединяли, высушивали, растворяли в 0,1 н. HCl и хроматографически фракционировали на колонке (0,9×60 см) со смолой Аминекс-Q150S («Bio-Rad», США). В качестве элюента использовали 0,38 н. раствор натрий-цитратного буфера, pH 4,26. Скорость элюции 72 мл/ч, объем фракций 3 мл. Флюоресцирующий материал был сосредоточен во фракциях 19—23 и имел характерные для пиридинолина УФ-спектр и спектр флюоресценции.

Чистоту стандартного препарата гидроксипиридинолина определяли методом ЖХВД (жидкостной хроматограф «Алтех», модель 324, США) на колонке C18 (10 мм×25 см; «Altech Ultrasphere ODS») в изократическом режиме растворителей: 15 % раствор этанола в 0,1 % растворе гексафтормасляной кислоты с регистрацией УФ-поглощения. Время задержки гидроксипиридинолина 14 мин.

Для определения концентрации гидроксипиридинолина использовали 0,1 M стандартный раствор N-этил-3-пиридинола («Aldrich Chemical Co.», США), основываясь при расчетах на допущении, что оба соединения имеют одинаковые молярные коэффициенты экстинкции [3].

Для определения пиридинолина (гидроксипиридинолин+лизилпиридинолин) использовали 50 мл утренней порции мочи. После фракционирования на колонке (5×70 см) с сефадексом G-10 с регистрацией поглощения при 280 нм собирали материал 1-го пика, лиофилизировали и гидролизовали 6 н. HCl в течение 22 ч при 105 °C. Гидролизат высушивали, растворяли в 10 % растворе уксусной кислоты и фракционировали последовательно на колонке с сефадексом G-15 и Аминексом-Q150S, как описано выше для получения стандарта. Фракции, содержащие флюоресцирующий материал (19—23), объединяли. Концентрацию пиридинолина определяли флюориметрически, сопоставляя со стандартным раствором гидроксипиридинолина известной концентрации. Количество пиридинолина относили к количеству креатинина (Пир/Кр) и выражали в нмоль/мкмоль.

Креатинин определяли методом [1], основанным на цветной реакции Яффе.

**Результаты и их обсуждение.** Полученные данные свидетельствуют, что изменения отношения Пир/Кр с возрастом имеют, по-видимому, четырехфазный характер (рис. 1): увеличение экскреции пиридинолина в первые 15 лет жизни ( $r=0,796$ ), снижение ее в последующие 15 лет ( $r=-0,731$ ), стабилизация уровня экскреции пиридинолина в период от 30 до 50—60 лет и возможное повторное повышение после 50 лет ( $r=0,652$ ).

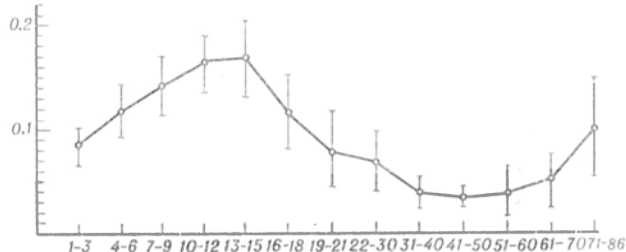


Рис. 1. Возрастные изменения экскреции пиридинолина с мочой.

Здесь и на рис. 2 каждая точка на графике обозначает среднюю арифметическую величину отношения Пир/Кр для данной возрастной группы; вертикальные линии — стандартное отклонение. Число индивидов в возрастных группах указано в «Методике». По оси абсцисс — возрастные группы (в годах); по оси ординат — Пир/Кр (в нмоль/мкмоль).



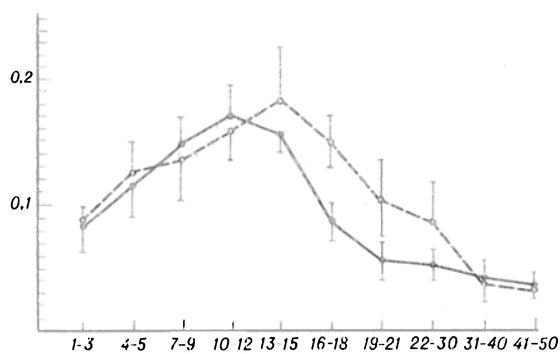


Рис. 2. Возрастные изменения экскреции пиридинолина с мочой в зависимости от пола

Сплошная линия — женщины; пунктирная линия — мужчины

Максимальная экскреция пиридинолина приходится на возрастной период 10—15 лет и свидетельствует об ускоренном метаболизме коллагена в период активного роста. Высокая величина отношения Пир/Кр в моче детей указывает на активный процесс ремоделирования костной и хрящевой ткани, а повторное увеличение этого показателя отражает, очевидно, потерю костной массы, наблюдаемую в старости, и может быть обусловлено развитием остеопороза [6]. Относительно низкая величина отношения Пир/Кр в первые годы жизни свидетельствует, по-видимому, не о менее активном процессе реорганизации соединительной ткани, а скорее о меньшем содержании зрелых спивок со структурой пиридинолина в коллагенах соединительной ткани. В литературе имеются данные, указывающие на низкое содержание гидропиридинолина в соединительной ткани суставного и реберного хряща, а также ахиллова сухожилия в ранний период жизни человека и максимальное содержание в период 15—25 лет [5, 9].

Возрастные изменения экскреции пиридинолина в зависимости от пола представлены на рис. 2. Можно отметить следующие характерные особенности этих изменений: 1) различия в величине отношения Пир/Кр между лицами женского и мужского пола начинают проявляться после 12 лет, наиболее резко они выражены в период 16—18 лет ( $p < 0,01$ ), сохраняются в период 19—21 год ( $p < 0,05$ ) и далее идут на убыль, исчезая после 30 лет; 2) максимальная экскреция пиридинолина у девушек наблюдается в возрастной период 10—12 лет, тогда как у юношей — в 13—15 лет, оставаясь достаточно высокой до 21 года; 3) нарастание экскреции пиридинолина и последующее ее снижение у лиц женского пола носят более резкий характер, чем у лиц мужского пола, и величины отношения Пир/Кр достигают уровня, характерного для взрослых, уже к 19 годам, тогда как у мужчин это происходит ближе к 30 годам.

Полученные данные можно суммировать следующим образом (табл. 1). Между средними величинами отношения Пир/Кр смешанных (девочки + мальчики) возрастных групп 1—6 и 7—15 лет есть значимое различие ( $p < 0,001$ ). В период от 16 лет до 21 года средние показатели экскреции пиридинолина для девушек и юношей различны ( $p < 0,001$ ). В возрасте от 22 до 70 лет уровень экскреции пиридинолина составляет в среднем  $0,047 \pm 0,025$  нмоль как для женщин, так и

Величины отношения Пир/Кр в зависимости от возраста и пола

Возрастной диапазон, годы	Пол	Число обследованных	Пир/Кр, нмоль/мкмоль ( $M \pm \sigma$ )
1—6	Ж. + м.	20	$0,100 \pm 0,027$ (0,073—0,127)
7—15	Ж. + м.	30	$0,156 \pm 0,032$ (0,124—0,188)
16—21	Ж.	10	$0,070 \pm 0,021$ (0,049—0,091)
	М.	10	$0,124 \pm 0,034$ (0,090—0,158)
22—70	Ж. + м.	40	$0,047 \pm 0,025$ (0,022—0,072)
71—86	Ж.	5	$0,099 \pm 0,046$ (0,053—0,145)

Примечание. В скобках — границы стандартного отклонения.

Таблица 2

Величины отношения Пир/Кр у взрослых (данные литературы)

Возрастной диапазон, годы	n	Пир/Кр		Ссылка
		исходные данные	после пересчета на нмоль/мкмоль	
30—45	8	$0,85 \pm 0,17$ нмоль/мг*	$0,096 \pm 0,019$	[11]
23—70	20	$0,130 \pm 0,08$ нмоль/мг**	$0,015 \pm 0,009$	[6]
Взрослые	5	40,3 (25,1—68,7)	0,046	[2]
		нмоль/мкмоль гидроксипиридинолин,	(0,028—0,080)	
		5,9 (3,0—11,2) нмоль/мкмоль лизилпиридинолин***	суммарно	

Примечание. n — число индивидуальных проб мочи; одна звездочка — использован иммуноферментный метод, две звездочки — фракционирование на фосфоцеллюлозе с последующим использованием ЖХВД, три звездочки — использован метод ионной обратной-фазовой ЖХВД.

для мужчин. Эта величина в общем сходна с величинами, приведенными в литературе (табл. 2). Нам удалось найти только одну работу, в которой были приведены результаты исследования экскреции пиридинолина у детей и подростков [6]. Результаты в ней представлены графически и выражены в наномолях пиридинолина на 1 мг креатинина; выполненные перерасчеты показывают, что величина отношения Пир/Кр до 20 лет колеблется от 0,057 до 0,230 нмоль/мкмоль.

Таким образом, очевидно, что показатель экскреции пиридинолина с мочой находится в прямой зависимости от интенсивности метаболизма коллагена и с учетом возраста и пола обследуемых лиц может быть использован для выявления патологических изменений в синтезе и распаде коллагена в организме человека.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Карпенко В. С., Колесников Г. Ф., Петрунь Н. М. и др. // Функциональная диагностика в урологии и нефрологии. — Киев, 1977. — С. 8—10.
- Black D., Duncan A., Robins S. P. // *Analyt. Biochem.* — 1988. — Vol. 169. — P. 197—203.
- Eyre D. R., Koob T. J., Van Ness K. // *Ibid.* — 1984. — Vol. 137. — P. 380—388.
- Eyre D. R., Paz M. A., Gallop P. M. // *Ann. Rev. Biochem.* — 1984. — Vol. 53. — P. 717—748.
- Eyre D. R., Dickson I. R., Van Ness K. // *Biochem. J.* — 1988. — Vol. 252. — P. 495—500.
- Fujimoto D., Suzuki M., Uchiyama A. et al. // *J. Biochem. (Tokyo)*. — 1983. — Vol. 94. — P. 1133—1136.
- Gunja-Smith Z., Boucek R. J. // *Biochem. J.* — 1981. — Vol. 197. — P. 759—762.
- Herbage D., Le Lous M., Cohen-Solal L., Bazin S. // *Front. Matrix Biol.* — 1985. — Vol. 10. — P. 59—91.

9. Moriguchi T., Fujimoto D. // J. Biochem. (Tokyo).— 1984.— Vol. 84.— P. 933—935.  
 10. Reiser K. M., Hennessy S. M., Last J. A. // Biochim. biophys. Acta.— 1987.— Vol. 926.— P. 339—348.  
 11. Robins S. P. // Biochem. J.— 1982.— Vol. 207.— P. 617—620.

Поступила 27.12.89

#### PHYSIOLOGICAL ALTERATIONS OF PYRIDOLINE EXCRETION WITH URINE DEPENDING ON AGE AND SEX

N. N. Prozorovskaya, E. A. Kozlov, T. A. Prokhorova, T. A. Gorokhova, V. N. Prozorovskiy, A. A. Del'vig

Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Natural physiological alterations in excretion of pyridoline (total hydroxypyridoline and lysyl pyridoline) with urine were studied in children and adults depending on age (1-86 years old) and sex. Age-dependent alterations of pyridoline excretion with urine had apparently four phases: an increase, a decrease, stabilization and secondary increase. Distinct dissimilarity between men and women in the rate of pyridoline excretion was found only in the age group of 16-21 years old.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616.71-007.12-055.5/7-07.1616-008.931:577.152.32]-074

И. В. Цветкова, Е. А. Карпова, Я. В. Возный, Т. В. Золотухина, В. Б. Бирюков, А. Н. Семьячкина

#### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ 4-МЕТИЛУМБЕЛЛИФЕРИЛ- $\alpha$ -L-ИДУРОНИДА И 4-ТРИФТОРМЕТИЛУМБЕЛЛИФЕРИЛ- $\alpha$ -L-ИДУРОНИДА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ НЕДОСТАТОЧНОСТИ $\alpha$ -L-ИДУРОНИДАЗЫ В ТКАНЯХ ЧЕЛОВЕКА И ДЛЯ БЫСТРОЙ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ БОЛЕЗНИ ГУРЛЕР

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Институт биохимии АН Армянской ССР (Ереван), Институт медицинской генетики АМН СССР, Институт педиатрии и детской хирургии Минздрава РСФСР

В развитии диагностики наследственных болезней накопления, вызванных недостаточностью гликозидаз, большое значение имело создание флюорогенных субстратов для определения активности этих ферментов, а именно 4-метилумбеллиферил-гликозидов. Методы определения активности гликозидаз, основанные на измерении флюоресценции отщепляющегося от этих субстратов 4-метилумбеллиферона (МУФ), в настоящее время широко используют для диагностики лизосомных болезней, в том числе и пренатальной. Ценность этих методов обусловлена в основном их высокой чувствительностью. Возможности использования флюорогенных субстратов могут быть расширены в результате модификации как сахарной, так и агликоновой части этих субстратов. Так, можно целенаправленно влиять на их специфичность, в частности приблизить ее к специфичности, достигаемой при использовании некоторых природных субстратов гликозидаз и при этом сохранить высокую чувствительность, которой, как правило, методы, основанные на применении природных субстратов, не обладают. Таким образом, был создан, например, специфический субстрат для определения гексозаминидазы А сульфатированием N-ацетилглюкозамина в 4-МУФ- $\beta$ -D-глюкозаминиде [5]. На основе о-ацетиламинопроизвод-

ных 4-МУФ были синтезированы флюорогенные субстраты, имитирующие природные, для  $\beta$ -галактоцереброзидазы и  $\beta$ -глюкоцереброзидазы [1, 2].

Другой целью модификации синтетических субстратов является изменение люминесцентных свойств, растворимости и avidности к подложке или к полимерной мембране агликоновой части субстрата, отщепляющегося при ферментной реакции. Такие субстраты могут оказаться полезными при выявлении фермента *in situ*, например в клеточных структурах или при электрофоретическом разделении ферментов на твердых носителях. Было описано [10] применение в иммуноферментном анализе галактозида 4-трифторметилумбеллиферона (ФМУФ). Отмечено высокое сродство отщепляющегося ФМУФ к полимерной мембране.

В настоящей работе представлены данные по использованию синтезированного [3] 4-трифторметилумбеллиферил- $\alpha$ -L-идурида (ФМУФ-Ид) как субстрата  $\alpha$ -L-идуридазы для выявления активности этого фермента в различных тканях в норме и при наследственной недостаточности  $\alpha$ -L-идуридазы. При расщеплении этого субстрата освобожденный агликон — ФМУФ — дает ярко-желтую флюоресценцию в ультрафиолетовой области, что удобно также использовать и для оценки активности  $\alpha$ -L-идуридазы непосредственно в кусочках тканей, например в плаценте.

Для сравнения одновременно с ФМУФ-Ид активность  $\alpha$ -L-идуридазы определяли с 4-метилумбеллиферил  $\alpha$ -L-идуридом (МУФ-Ид), который обычно используют для этой цели [8].

**Методика.** Исследовали лейкоциты контрольных лиц, больных с болезнью Гурлер и гетерозиготных носителей болезни, культуру клеток амниотической жидкости (ККАЖ) при беременности с риском по указанной болезни, плаценту, а также органы плода с болезнью Гурлер, выявленной в результате пренатального анализа.

В качестве субстратов для определения активности  $\alpha$ -L-идуридазы использовали МУФ-Ид и ФМУФ-Ид [3]. Для определения активности  $\alpha$ -L-идуридазы с МУФ-Ид 10 мкл гомогената ткани (20—40 мкг белка) инкубировали с 10 мкл 2 мМ раствора субстрата и 10 мкл 0,4 М формиатного буфера pH 3,5 в течение 15—30 мин для лейкоцитов и ККАЖ и 1 ч — для плаценты и органов плода. Реакцию останавливали добавлением 4 мл 0,2 М глицинового буфера, pH 10,5 и измеряли флюоресценцию отщепившегося МУФ при длине волны возбуждения 365 нм и длине волны флюоресценции 436 нм в флюориметре БИАН-130. В качестве стандарта использовали раствор МУФ («Koch—Light», Англия).

При определении активности  $\alpha$ -L-идуридазы с ФМУФ-Ид сохраняли те же условия проведения реакции. Флюоресценцию отщепившегося ФМУФ измеряли с помощью флюориметра «Оптон» при длине волны возбуждения 390 нм и длине волны флюоресценции 510 нм, что является в этом случае оптимальным. В качестве стандарта использовали синтезированный ФМУФ [3]. Для остановки реакции применяли глициновый буфер pH 7,0, в котором и измеряли флюоресценцию, так как именно при этой величине pH ФМУФ дает максимальный выход флюоресценции. Интенсивность флюоресценции настолько зависит от величины pH, что даже небольшой сдвиг в кислую область при добавлении глицинового буфера к инкубационной смеси pH 3,5 заметно уменьшает флюоресценцию. Поэтому при измерении флюоресценции стандартного раствора ФМУФ, по которому проводили расчеты при использовании в качестве субстрата ФМУФ-Ид, в глициновый буфер добавляли такое же количество формиатного буфера pH 3,5, как и в инкубационную смесь.

Для выявления активности  $\alpha$ -L-идуридазы непосредственно в тканях использовали прием, описанный ранее [7] для аналогичного выявления  $\beta$ -D-глюкозаминидазы А. На дне маленьких чашек Петри на смоченную формиатным буфером pH 3,5 фильтровальную бумагу помещали полоску ацетатцеллюлозной пленки, пропитанной тем же буфером и 2 мМ раствором ФМУФ-Ид. Кусочки ткани (до 1 мг),

Таблица 1

Активность  $\alpha$ -L-идуронидазы в лейкоцитах (в нмоль на 1 мг белка за 1 ч)

Объект	Субстрат МУФ-Ид 365/450	Субстрат ФМУФ-Ид	
		390/510	365/510
Контроль ( $n=10$ )	$32,0 \pm 6,4$ (23,2—38,9)	$25,3 \pm 6,0$ (15,6—35,0)	$27,4 \pm 2,8$ (15,1—44,0)
Гетерозиготные носители ( $n=7$ )	$16,4 \pm 3,0$ (12,8—19,3)	$10,9 \pm 5,6$ (5,8—18,7)	$9,6 \pm 4,3$ (4,6—17,2)
Больные с болезнью Гурлер ( $n=7$ )	0	0	0

Примечание. В скобках — пределы колебаний.

отмытые в формиатном буфере и смоченные раствором субстрата, помещали на ацетатцеллюлозную пленку и, плотно закрыв, инкубировали при 37 °С в течение 30 мин. После инкубации при исследовании пленки в ультрафиолетовых лучах можно судить о наличии активного фермента по кольцу ярко-желтой флюоресценции вокруг кусочка ткани. Белок определяли по методу [9].

**Результаты и обсуждение.** Для решения вопроса о пригодности ФМУФ-Ид для выявления активности  $\alpha$ -L-идуронидазы и диагностики болезни Гурлер активность фермента в лейкоцитах определяли с двумя субстратами — ФМУФ-Ид и обычно используемым МУФ-Ид. Полученные данные об активности  $\alpha$ -L-идуронидазы в лейкоцитах контрольных лиц, от больных с болезнью Гурлер и гетерозиготных носителей болезни представлены в табл. 1.

Из табл. 1 видно, что ФМУФ-Ид является субстратом для  $\alpha$ -L-идуронидазы. ФМУФ имеет широкую полосу возбуждения, что позволяет проводить измерения флюоресценции при длине волны возбуждения как 390, так и 365 нм (рис. 1) и использовать не только флюориметры марки «Оптон», но и отечественные приборы типа БИАН.

Из приведенных в табл. 1 данных следует, что с ФМУФ-Ид, как и с МУФ-Ид, можно достаточно четко различать контрольных лиц и гетерозигот и выявлять больных, у которых активность фермента практически отсутствует.

Величина константы Михаэлиса для фермента нормальных лейкоцитов была одного порядка и составила с МУФ-Ид и ФМУФ-Ид соответственно 0,2 и 0,3 мМ.

ФМУФ-Ид был использован нами как субстрат  $\alpha$ -L-идуронидазы и для целей пренатальной диагностики. В табл. 2 представлены данные по определению активности этого фермента с ФМУФ-Ид и МУФ-Ид в ряде биологических объектов при выполнении пренатального анализа в семье

Таблица 2

Активность  $\alpha$ -L-идуронидазы (в нмоль на 1 мг белка за 1 ч) в тканях

Объект	МУФ-Ид	ФМУФ-Ид
Ребенок Ю.	0	0
Мать Ю.	12,8	6,5
Отец Ю.	19,3	10,0
<i>ККАЖ</i>		
Контроль ( $n=10$ )	$32 \pm 6,4$	$25 \pm 6,0$
Мать Ю.	0	0
<i>Плацента</i>		
Контроль	133,8	87,8
Мать Ю.	0	0
<i>Органы плода</i>		
Контроль	6,8; 16,6	2,8; 6,2
Печень плода Ю.	0	0
<i>Почки плода Ю.</i>		
Контроль*	8,3	4,1
Почки плода Ю.	0	0
<i>Контроль*</i>		
	27,6	3,8

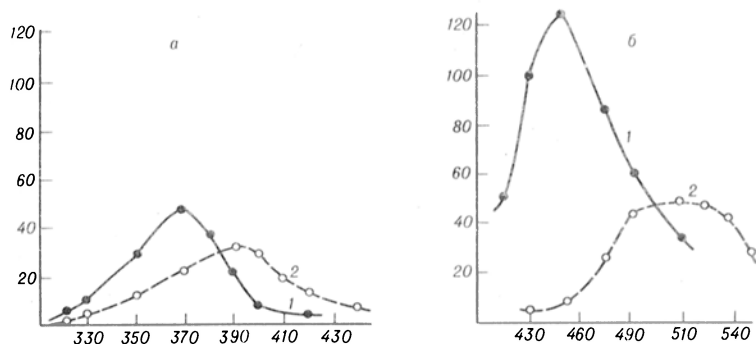
\* В качестве контроля взяты органы крысы.

Ю. с. риском по болезни Гурлер. У первого ребенка в этой семье был поставлен диагноз этого заболевания (мукополисахаридоз I типа) на основании полного отсутствия в лейкоцитах активности  $\alpha$ -L-идуронидазы. Активность фермента у родителей была снижена до величин, соответствующих статусу гетерозиготных носителей болезни.

При последующей беременности у матери Ю. был проведен диагностический амниоцентез и получена ККАЖ. При определении в клетках активности  $\alpha$ -L-идуронидазы последняя не выявлена ни с МУФ-Ид, ни с ФМУФ-Ид, в то время как в контрольной ККАЖ она составила соответственно 133,8 и 87,8 нмоль/мг за 1 ч. Эти данные позволили констатировать наличие болезни Гурлер у плода и прервать беременность. Для подтверждения точности диагноза была определена активность  $\alpha$ -L-идуронидазы в плаценте Ю., а также в печени и в почках плода. Как видно из табл. 2, в органах плода активность фермента отсутствовала, что подтверждало правильность пренатального диагноза. Она отсутствовала также в плаценте Ю., при наличии активности, хотя и небольшой, в 2 контрольных плацентах.

Рис. 1. Спектры возбуждения и флюоресценции МУФ и ФМУФ.

а: 1 — спектр возбуждения МУФ при фиксированной длине волны флюоресценции 450 нм; 2 — спектр возбуждения ФМУФ при фиксированной длине волны флюоресценции 510 нм; б: 1 — спектр флюоресценции МУФ при фиксированной длине волны возбуждения 365 нм; 2 — спектр флюоресценции ФМУФ при фиксированной длине волны возбуждения 390 нм. По осям абсцисс — длина волны, нм; по осям ординат — флюоресценция агликона, в усл. ед.



Отсутствие какой-либо остаточной активности в лейкоцитах больных, а также в ККАЖ и эмбриональных тканях при наличии болезни Гурлер у плода косвенно свидетельствует о том, что использованные нами препараты МУФ-Ид и ФМУФ-Ид не были загрязнены соответствующими  $\alpha$ -L-гликозуридами. Во всех указанных тканях имелась высокая активность  $\alpha$ -L-гликозуридазы и при наличии в субстратах примеси гликозуридов обнаруживалось бы какое-либо количество отщепившегося агликона. Таким образом, метод синтеза [3] дает возможность получать свободные от примеси гликозуридов субстраты  $\alpha$ -L-идуридазы. В связи с этим мы не добавляли к инкубационным пробам ингибитор  $\beta$ -гликозуридазы — D-сахароно-1,4-лактон, что необходимо, если МУФ-Ид содержит примесь гликозурида [5].

В последние годы для пренатальной диагностики лизосомных болезней используют биоптаты хориона [4]. Однако некоторые авторы считают нежелательным применение хориона для пренатальной диагностики болезни Гурлер из-за низкой активности  $\alpha$ -L-идуридазы в плаценте и в хорионе даже при работе с таким чувствительным субстратом, как МУФ-Ид [6]. Как следует из наших данных, ФМУФ-Ид не является лучшим субстратом, чем МУФ-Ид, при определении  $\alpha$ -L-идуридазы в гомогенатах тканей. Однако мы предположили, что этот субстрат может оказаться полезным при оценке активности  $\alpha$ -L-идуридазы *in situ*, например в кусочках тканей, так как ФМУФ дает ярко-желтую флюоресценцию в ультрафиолетовой области, которая в сравнении с голубой флюоресценцией МУФ более контрастна. Это удобно при работе с тканями, имеющими низкую активность фермента.

Поскольку разработка простых и быстрых методов пренатальной диагностики наследственных лизосомных болезней остается до сих пор актуальной, мы попытались использовать ФМУФ-Ид для диагностики болезни Гурлер путем определения активности  $\alpha$ -L-идуридазы в плаценте.

Действительно, методом, описанным в разделе «Методика», можно четко дифференцировать плаценту с нормальной активностью  $\alpha$ -L-идуридазы и с недостаточностью фермента. Как видно из рис. 2, вокруг кусочков контрольной плаценты,

инкубированных на пропитанной ФМУФ-Ид ацетатцеллюлозной пленке, наблюдается яркий ореол желтой флюоресценции ФМУФ, которого нет вокруг плаценты Ю., где, как показано в табл. 2, нет активности  $\alpha$ -L-идуридазы. Не наблюдалось подобной флюоресценции и вокруг кусочков печени и плода с болезнью Гурлер, в то время как вокруг контрольных тканей наблюдалась яркая флюоресценция. Отметим, что флюоресценция выявляется с таким малым количеством ткани (не более 1 мг), которого совершенно недостаточно для приготовления гомогената и определения активности фермента общепринятыми методами.

Таким образом, препарат ФМУФ-Ид можно использовать для определения активности  $\alpha$ -L-идуридазы и ее недостаточности. Он не имеет преимуществ перед МУФ-Ид при определении активности фермента в гомогенатах. Однако благодаря появлению ярко-желтой флюоресценции он позволяет четко выявить дефект фермента непосредственно в тканях, в частности в плаценте. Это перспективно для быстрой пренатальной диагностики болезни Гурлер с помощью выявления  $\alpha$ -L-идуридазы в ворсинах хориона.

Предварительные данные показали, что ФМУФ-Ид, как и другие ФМУФ-гликозиды, являются удобными субстратами для выявления гликозидаз при их электрофоретическом разделении.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Видершайн Г. Я., Козлова И. К., Ильина Г. С. // Биохимия.— 1985.— № 10.— С. 1665—1668.
2. Видершайн Г. Я., Козлова И. К., Ильина Г. С., Михайлова М. А. // Биоорг. химия.— 1988.— Т. 14, № 8.— С. 1014—1026.
3. Возный Я. В., Каличева И. С., Галоян А. А., Гусина П. Б. // Там же.— 1989.— Т. 14.— С. 1040—1046.
4. Цветкова И. В. // Вестн. АМН СССР.— 1984.— № 8.— С. 70—74.
5. Bayleran J., Hechtman P., Saray W. // Clin. Chim. Acta.— 1984.— Vol. 143.— P. 73—77.
6. Gatti R., Lombardo C., Filocamo M. et al. // Prenat. Diagn.— 1985.— Vol. 5.— P. 329—336.
7. Grebner E. E., Wenger D. A. // Ibid.— 1987.— Vol. 7.— P. 419—423.
8. Hopwood J. J., Muller V., Smithson A., Baggett N. // Clin. chim. Acta.— 1979.— Vol. 92.— P. 257—265.
9. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem.— 1951.— Vol. 193, N 1.— P. 265—275.
10. Smith R. E. // J. Histochem. Cytochem.— 1986.— Vol. 34, N 5.— P. 585—591.

Поступила 11.07.89

#### USE OF 4-METHYLUMBELLIFERYL- $\alpha$ -L-IDURONIDE AND 4-TRIFLUOROMETHYLUMBELLIFERYL- $\alpha$ -L-IDURONIDE IN DETECTION OF $\alpha$ -L-IDURONIDASE DEFICIENCY IN HUMAN TISSUES AND IN EXPRESS PRENATAL DIAGNOSIS OF HURLER DISEASE

I. V. Tsvetkova, E. A. Karpova, Ya. V. Vozny, T. V. Zolotukhina, V. B. Biryukov, A. N. Semyachkina

Institute of Biological and Medical Chemistry, Institute of Medical Genetics, Academy of Medical Sciences of the USSR, Institute of Pediatrics and Child Surgery, Ministry of Public Health of the RSFSR, Moscow, Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Armenian SSR, Yerevan

Activity of  $\alpha$ -L-iduридазы was studied in leukocytes of healthy persons, of patients with Hurler disease and of heterozygous carriers of the disease where 4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -L-iduридазы and 4-trifluoromethylumbelliferyl- $\alpha$ -L-iduридазы were used as substrates. 4-Trifluoromethylumbelliferyl- $\alpha$ -L-iduридазы proved to be also a specific substrate of  $\alpha$ -L-iduридазы and enabled to detect the enzyme deficiency in patients with Hurler disease as well as a decrease of the

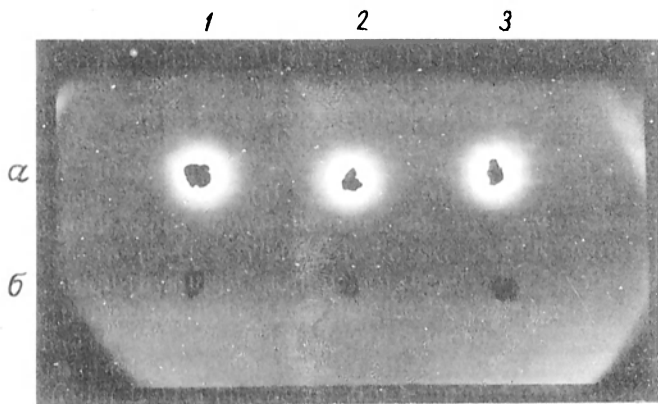


Рис. 2. Образцы тканей, инкубированные на пропитанной ФМУФ-Ид ацетатцеллюлозной пленке.

а — контроль; 1 — печень, 2 — почка, 3 — плацента; б — ткани плода Ю.: 1 — печень, 2 — почка, 3 — плацента. Наличие кольца флюоресценции вокруг контрольных тканей свидетельствует о наличии активности  $\alpha$ -L-идуридазы. Вокруг тканей плода Ю. с болезнью Гурлер и плаценты Ю. флюоресценция отсутствует.

enzymatic activity in heterozygous carriers of the disease. Using these two substrates prenatal diagnosis of Hurler disease was carried out in fetus which exhibited absence of the enzymatic activity in cell culture from amniotic fluid. The diagnosis was corroborated after analysis of  $\alpha$ -L-iduronidase activity in liver and kidney tissues of the fetus. 4-Trifluoromethylumbelliferyl- $\alpha$ -L-iduronide was very effective in express detection of  $\alpha$ -L-iduronidase deficiency immediately in tissue slices as well as in placenta which is of importance in prenatal diagnosis of Hurler disease.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616.5-004.1-031.81-07:616.5-008.946.51-02:615.31:577.123.3

Л. Н. Кашикова, Г. В. Яроцук, А. Ф. Панасюк, М. Д. Гроздова

## ВЛИЯНИЕ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ НА СПЕЦИФИЧЕСКОЕ СВЯЗЫВАНИЕ ЭСТРАДИОЛА ФИБРОБЛАСТАМИ КОЖИ В НОРМЕ И ПРИ СИСТЕМНОЙ СКЛЕРОДЕРМИИ

Институт ревматологии АМН СССР, Москва

Эстрадиол ( $E_2$ ) оказывает разностороннее воздействие на метаболизм клеток не только репродуктивных органов, но и других тканей. В отношении влияния на соединительную ткань особый интерес представляют результаты исследований, свидетельствующие о способности  $E_2$  тормозить продукцию коллагеновых белков [8], поскольку их синтез является одной из основных функций фибробластов.

На возможную связь половых стероидных гормонов с процессами фиброобразования указывает и факт половой предрасположенности женщин к развитию системной склеродермии (ССД) — болезни, представляющей природную модель фиброза. У данных больных отмечается тенденция к снижению в крови содержания  $E_2$ , но не тестостерона или прогестерона [2]. Нами выявлено также снижение влияние  $E_2$  на показатели метаболизма культивируемых фибробластов кожи больных ССД [3] и уменьшение специфического связывания  $E_2$  в культурах этих клеток [2].

При ССД существенно изменен обмен циклических нуклеотидов (ЦН) в склеродермических фибробластах [11]. Механизмы регуляции метаболизма, зависящие от ЦН, являющиеся частью системы внутриклеточного контроля, осуществляемого главным образом через фосфорилирование белков [5].

В связи с тем что способность рецепторов к связыванию стероидных гормонов может зависеть от фосфорилирования рецепторов [7], целью настоящего исследования было изучить влияние ЦН на специфическое связывание  $E_2$  бесклеточными препаратами фибробластов, полученными из кожи здоровых доноров и больных ССД.

**Методика.** Культуры фибробластов выращивали из биоптатов кожи предплечья больных ССД и здоровых доноров. Исследование проведено на культурах клеток 5 больных ССД в возрасте от 16 лет до 41 года. Биоптаты кожи брали при поступлении больных в стационар, до начала лечения стероидными препаратами или D-пеницилламином. Контролем служили культуры фибробластов 6 практически здоровых доноров в возрасте от 26 до 44 лет.

Специфическое связывание  $E_2$  определяли на гомогенатах

клеток [10]. Культуры (2–9-го пассажа) в стационарной фазе роста обрабатывали раствором 0,25 % трипсина («Spofa», Чехословакия), готовили клеточную суспензию, которую центрифугировали в течение 10 мин при 200 г и осадок ресуспендировали в среде 199. Процедуру центрифугирования повторяли трижды для удаления трипсина. К осадку клеток добавляли буфер следующего состава: глицерол — 30 %,  $MgCl_2$  — 1 мМ, трис-НCl (рН 8,0) — 10 мМ («Serva», ФРГ), дитиотреитол — 1 мМ («Serva», ФРГ), теофиллин — 0,2 мМ, разведение фибробластов —  $10^6$  клеток на 1 мл. Затем клетки гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе и аликвоты полностью разрушенных клеток инкубировали в присутствии (2,4,6,7- $^3H$ )- $E_2$  с удельной активностью 100 Ки/ммоль («Amersham», Англия). В параллельные пробы добавляли 200-кратный избыток немеченого гормона («Sigma», США). Инкубацию проводили при 4 °С в течение 90 мин, затем процесс останавливали замораживанием проб в жидком азоте. Для отделения несвязанного  $E_2$  размороженные пробы обрабатывали активированным углем с 0,25 % декстраном («Amersham» Англия). Далее пробы центрифугировали в течение 20 мин при 1500 г и определяли радиоактивность супернатанта. Специфическое связывание вычисляли по разности радиоактивности проб с добавкой и без добавки 200-кратного избытка немеченого гормона. При определении влияния циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) и циклического гуанозинмонофосфата (гГМФ) на связывающую активность рецепторов  $E_2$  в инкубационную среду добавляли указанные нуклеотиды в конечной концентрации  $10^{-6}$  М («Amersham», Англия). Количество белка в пробах определяли по Лоури [13].

**Результаты и обсуждение.** На рис. 1 показано специфическое связывание  $^3H$ - $E_2$  в гомогенатах фибробластов исследованных культур клеток здоровых доноров и больных ССД. В норме оно составляло  $120 \pm 20$  нмоль  $E_2$  на 1 мг белка ( $n=8$ ). У больных ССД ( $n=6$ ) специфическое связывание гормона было достоверно снижено (в среднем в 4,3 раза) и составляло  $28 \pm 12$  нмоль  $E_2$  на 1 мг белка. В культурах фибробластов некоторых больных ССД (штаммы № 3 и 6) специфическое связывание полностью отсутствовало, что указывает, по-видимому, на утрату рецепторов к данному гормону клетками этих штаммов.

Добавление цАМФ к гомогенатам фибробластов здоровых доноров приводило к увеличению специфического связывания  $E_2$ . Эффект нуклеотида имел дозозависимый характер и максимум связывания наблюдали при концентрации цАМФ  $10^{-5}$  М (рис. 2). В дальнейшем мы использовали более физиологическую концентрацию цАМФ —  $10^{-6}$  М. Обнаружилось, что специфическое связывание  $E_2$  гомогенатами клеток в присутствии цАМФ возрастало практически в 2 раза

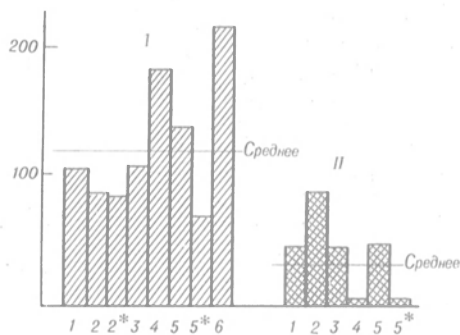


Рис. 1. Специфическое связывание  $^3H$ - $E_2$  в гомогенатах фибробластов кожи здоровых доноров и больных ССД.

Фибробласты культивировали в среде DMEM с 10 % бычьей сыворотки. Исследовали культуры на 4–10-м пассаже в стационарной фазе роста. Звездочкой отмечены штаммы клеток, исследованные по данному показателю повторно. I — норма, II — ССД. По оси ординат (здесь и на рис. 3) — специфическое связывание  $^3H$ - $E_2$ , нмоль на 1 мг белка.

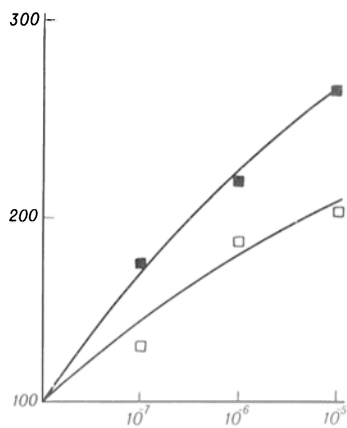


Рис. 2. Влияние различных концентраций цАМФ на специфическое связывание  $17\beta\text{-E}_2$  в двух штаммах фибробластов кожи здоровых доноров.

По оси абсцисс — концентрации цАМФ, М; по оси ординат — специфическое связывание, % от базального уровня.

( $p < 0,01$ ) и составляло в среднем  $226 \pm 31$  нмоль  $\text{E}_2$  на 1 мг белка ( $n=8$ ). цГМФ оказывал слабое действие на специфическое связывание  $\text{E}_2$  фибробластами кожи здоровых доноров (рис. 3). В опытах с совместным добавлением обоих нуклеотидов мы не наблюдали аддитивности эффекта цАМФ и цГМФ: специфическое связывание  $\text{E}_2$  в присутствии только цАМФ практически равнялось таковому в пробах, где в инкубационной смеси присутствовали оба ЦН (табл. 1). Таким образом, стимулирующий эффект на специфическое связывание  $\text{E}_2$  фибробластами здоровых доноров способен оказывать главным образом цАМФ и в значительно меньшей степени — цГМФ, причем, по-видимому, по одному и тому же механизму.

В гомогенатах склеродермических фибробластов эффект ЦН на специфическое связывание  $\text{E}_2$  существенно отличался от нормы. В большинстве случаев цАМФ не влиял на степень связывания гормона рецепторами, тогда как цГМФ достоверно повышал данный показатель в среднем в 3 раза: с  $28 \pm 12$  до  $100 \pm 15$  нмоль  $\text{E}_2$  на 1 мг белка (табл. 2).

Базальный уровень специфического связывания  $\text{E}_2$  и его зависимость от ЦН существенно не изменялись в процессе культивирования. Как видно из табл. 2, данные характеристики были изучены на разных пассажах в 2 штаммах фибробластов кожи здоровых доноров и в 1 — от больного ССД. Во всех случаях сохранялась направленность ответа на соответствующий ЦН.

В норме в исследованном интервале пассажей цАМФ более эффективно увеличивал специфическое связывание  $\text{E}_2$ , чем ГМФ. При ССД более эффективным оказался цГМФ. Следовательно, особенности рецепторного аппарата фибробластов сохраняются в ряду клеточных генераций.

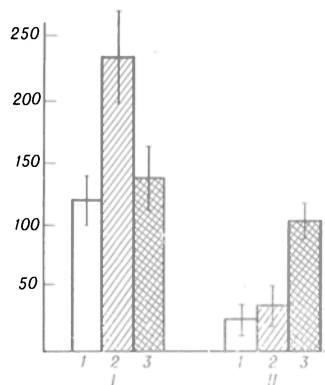


Рис. 3. Влияние цАМФ ( $10^{-6}$  М) и цГМФ ( $10^{-6}$  М) на связывание  $17\beta\text{-E}_2$  рецепторами фибробластов кожи.

Инкубацию гомогенатов клеток с ЦН проводили в течение 1,5 ч при  $4^\circ\text{C}$ . I — базальный уровень; 2 — в присутствии цАМФ; 3 — в присутствии цГМФ. I — здоровые доноры (8); II — больные ССД (6).

Таблица 1

Специфическое связывание  $17\beta\text{-E}_2$  рецепторами фибробластов кожи здоровых доноров в присутствии ЦН ( $10^{-6}$  М)

№ штамма	Пассаж	Специфическое связывание $^3\text{H-E}_2$ , нмоль $\text{E}_2$ на 1 мг белка			
		базальное	с добавлением		
			цАМФ	цГМФ	цАМФ + цГМФ
1	5-й	110	190	120	190
2	11-й	180	390	290	390
3	4-й	80	120	100	130

Таблица 2

Специфическое связывание  $17\beta\text{-E}_2$  в культурах фибробластов разных пассажей и влияние ЦН ( $10^{-6}$  М)

Штамм	Пассаж	Специфическое связывание $^3\text{H-E}_2$ , нмоль $\text{E}_2$ на 1 мг белка		
		базальное	с добавлением	
			цАМФ	цГМФ
H2	4-й	78	119	103
	5-й	78	300	113
H6	7-й	54	137	109
	9-й	140	177	66
С2	3-й	44	0	132
	4-й	0	0	99

Согласно современным представлениям, фосфорилирование рецепторов стероидных гормонов способствует проявлению гормонсвязывающей активности. Так, фосфорилирование рецепторов прогестерона и  $\text{E}_2$  выявлено в тканях репродуктивных органов [9, 7], причем оно может осуществляться при участии цАМФ-зависимой протеинкиназы [14]. В фибробластах рецепторы глюкокортикоидов тоже подвергаются фосфорилированию, которое, по-видимому, влияет на их функциональные характеристики [12].

В настоящем исследовании обнаружено существование определенной зависимости между концентрацией ЦН и специфическим связыванием  $\text{E}_2$  в фибробластах кожи, что указывает на вероятность фосфорилирования рецепторов в клетках, не относящихся к репродуктивной системе.

Отсутствие регуляторного эффекта цАМФ на специфическое связывание  $\text{E}_2$  фибробластами больных ССД и появление стимулирующего действия цГМФ на этот показатель свидетельствует об изменении процессов внутриклеточной регуляции. Ранее нами было показано, что содержание цАМФ в фибробластах при ССД резко снижено, а уровень ГМФ повышен так, что соотношение этих ЦН снижается до 7:1 против 17:1 в норме. Возможно, склеродермические фибробласты в условиях стойкого дефицита цАМФ «переключаются» на путь фосфорилирования рецепторов  $\text{E}_2$  при участии цГМФ-зависимой протеинкиназы. Однако новый, хотя и повышенный уровень цГМФ в фибробластах больных ССД не обеспечивает соответствующей активации рецепторов  $\text{E}_2$ , судя по тому, что базальный уровень специфического связывания существенно снижен как в целых клетках [2], так и в гомогенате. Это может быть обусловлено изменением в патологической клетке связывающей способности рецепторов и (или) уменьшением их абсолютного количества. Тот факт, что величина максималь-

ного связывания при добавлении цГМФ приближалась, но не достигала базального уровня в норме, свидетельствует о снижении количества рецепторов  $E_2$  в склеродермических клетках. Исходя из данных, полученных на репродуктивных органах, о том, что эстрогены могут быть индукторами собственных рецепторов в клетках [6], снижение количества рецепторов в фибробластах можно частично объяснить выявленным ранее некоторым снижением уровня  $E_2$  в крови больных ССД [2]. Снижение специфического связывания  $E_2$  в склеродермических фибробластах проявлялось в одинаковой мере на целых клетках и гомогенате; следовательно, это снижение не сопряжено с нарушением доставки гормона к рецептору.

Выявленные особенности склеродермических клеток оказались устойчивыми характеристиками, существенно не изменявшимися в ходе культивирования. Сохранение этих характеристик, а также некоторых других, которые были обнаружены ранее [1, 3, 4], в ряду последовательных клеточных генераций при длительном культивировании указывает в большей мере на генетические особенности этих клеток, чем на эффект регуляторных воздействий.

Обсуждая полученные результаты, сопоставим их с данными о тормозящем эффекте  $E_2$  на биосинтез коллагена III типа. Этот белок является одним из важнейших структурных компонентов сосудистой стенки; нарушение его синтеза в связи со снижением связывания  $E_2$  может быть существенным фактором в патогенезе ССД, приводящим к повреждению стенок сосудов, характерному для этого заболевания.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о нарушении рецепции  $E_2$  в клетках соединительной ткани при ССД. Оно выражается в уменьшении количества функционально активных рецепторов  $E_2$  в фибробластах и изменении их регуляции, осуществляемой при участии ЦН. Снижение чувствительности клеток к гормональному воздействию может служить одной из причин гиперпродукции коллагеновых белков (коллагена III типа) и, возможно, других компонентов соединительной ткани при ССД. Следствием неконтролируемого синтеза коллагена III типа может быть развитие сосудистых нарушений при данном заболевании и возникновение системного фиброзного процесса.

Нарушение регуляторного влияния  $E_2$  на клетки больных ССД может служить объяснением механизма более частого возникновения данного заболевания у женщин.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Абакумова О. Ю., Панасюк А. Ф., Куценко Н. Г. // Бюл. экспер. биол.— 1985.— № 2.— С. 156—158.
2. Гроздова М. Д., Анашкина Г. А., Кашишкова Л. Н. и др. // Тер. арх.— 1984.— № 5.
3. Гроздова М. Д., Панасюк А. Ф. // Там же.— 1983.— № 7.— С. 12—15.
4. Гроздова М. Д., Панасюк А. Ф., Шарлова И. Л. // Там же.— 1980.— № 4.— С. 452—455.
5. Северин Е. С., Кочеткова М. Н. Роль фосфорилирования в регуляции клеточной активности.— М., 1985.
6. Розен В. Б. Основы эндокринологии.— М., 1980.
7. Auricchio F., Migliaccio A., Carforia G. et al. // J. Steroid. Biochem.— 1984.— Vol. 20.— P. 31—35.
8. Beldekas J. C., Smith B. et al. // Biochemistry.— 1981.— Vol. 20.— P. 2162—2167.
9. Dougherty J. J., Puri R. K., Tott D. O. // J. biol. Chem.— 1982.— Vol. 257.— P. 1426—1430.
10. Fleming H., Blumenthal R., Gurside E. // Endocrinology.— 1983.— Vol. 111.— P. 1671—1677.
11. Grosdova M. D., Khokhlova J. V., Panasyuk A. F. et al. // Arthr. Rheum.— 1984.— Vol. 27.— P. 10.
12. Housley P. R., Pratt W. B. // J. biol. Chem.— 1983.— Vol. 258.— P. 4630—4635.
13. Lowry O., Rosebrough N., Farr A. et al. // Ibid.— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
14. Wigle N. L., Tash J. S., Means A. R. et al. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1981.— Vol. 102.— P. 513—519.

Поступила 01.03.89

#### ROLE OF CYCLIC NUCLEOTIDES IN SPECIFIC BINDING OF ESTRADIOL BY SKIN FIBROBLASTS UNDER CONDITIONS OF NORMAL STATE AND SYSTEMIC SCLERODERMIA

L. N. Kashnikova, G. V. Yaroshtchuk, L. F. Panasyuk, M. D. Grozdova

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

Specific binding of estradiol  $E_2$  was studied in homogenates of cultivated skin fibroblasts from healthy persons and patients with systemic scleroderma as well as effect of cAMP and cGMP on the hormone binding was evaluated. Binding of estradiol  $E_2$  was decreased 4-fold in systemic scleroderma. cAMP and cGMP were of importance in activation of the estradiol specific binding. Under conditions of normal state cAMP  $10^{-6}$  elevated 2-fold the estradiol specific binding, while the stimulation was not observed in systemic scleroderma. However, cGMP  $10^{-6}$  M did not affect distinctly the estradiol  $E_2$  binding by fibroblasts of healthy volunteers but stimulated the hormone binding in systemic scleroderma as a result of which the binding values were increased practically up to the basal level of normal state.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616.233-002.2-07:616.24-018

В. С. Хышиктуев, В. Н. Иванов, М. З. Жиц

#### СОСТОЯНИЕ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В СИСТЕМЕ ЛЕГОЧНОГО СУРФАКТАНТА У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ БРОНХИТОМ

Читинский медицинский институт

Широкое распространение хронического бронхита (ХБ), трудности ранней диагностики и лечения его, тенденция к учащению тяжелых форм заболевания, часто ведущих к временной и стойкой потере трудоспособности, преждевременной смерти больных, требуют глубокого изучения патогенеза данного состояния.

В последние годы значительно возрос интерес к сурфактантной системе легких (ССЛ) и нарушениям ее деятельности как важного звена развития болезней органов дыхания [9, 12, 14]. Вместе с тем остается ряд малоизученных проблем, к которым можно отнести роль свободнорадикальных процессов в ССЛ и их вклад в повреждение легочной ткани при разных патологических состояниях [3].

Интенсификация перекисного окисления липидов (ПОЛ) имеет особое значение для функционирования бронхолегочного аппарата. Лег-

кис представляют собой наиболее крупную биологическую мембрану организма, внешняя поверхность которой, представляющая сурфактантом (Сф), постоянно и непосредственно контактирует с кислородом, а также с такими активными инициаторами перекисного окисления, как озон и двуокись азота — наиболее распространенными оксидантами атмосферы [8]. Кроме того, азрогематический барьер поверхностно-активной выстилки альвеол обеспечивается главным образом структурной организацией фосфолипидов, из них 30—35 % представлены полиенольными, которые являются потенциальными субстратами для свободнорадикальных реакций [4]. Следовательно, при сочетании столь существенных факторов, активирующих ПОЛ, может иметь место различная степень сдвигов перекисного гомеостаза.

В настоящей работе приведены результаты исследования показателей свободнорадикальных процессов в системе легочного Сф у больных ХБ в зависимости от формы, степени функциональных нарушений и длительности болезни.

**Методика.** Обследовано 90 больных ХБ в возрасте от 20 до 74 лет, у 18 из них диагностирован хронический простой бронхит (ХПБ) и у 72 — хронический обструктивный бронхит (ХОБ). По степени функциональных расстройств больные ХОБ распределились следующим образом: дыхательная недостаточность (ДН) 0 степени зарегистрирована у 17 человек, I степени — у 25, II — степени — у 18 и III степени — у 12. Больные ХОБ в зависимости от длительности заболевания были разделены на 4 группы: с длительностью болезни до 5 лет (17 человек), от 5 до 10 лет (19), от 10 до 15 лет (16) и более 15 лет (20).

Контрольную группу составили 30 здоровых лиц в возрасте от 18 до 68 лет.

В настоящее время считают правомочным изучение конденсата выдыхаемого воздуха (КВВ) в качестве материала, позволяющего судить о состоянии ССЛ [1, 2, 9, 10].

Мы проводили оценку показателей перекисного гомеостаза в КВВ. Конденсат собирали с помощью U-образной трубки, помещенной в термос со льдом [10]. Для получения 2,5 мл экспирата (объем, необходимый для анализа) требовалось 20—30 мин. Пробы исследовали в течение 6 ч после их взятия. До начала эксперимента материал хранили при 4 °С. Изучали следующие показатели: общие липиды (ОЛ), ацилгидроперекиси липидов (ГП), ТБК-активные продукты или вещества, реагирующие с ТБК (тиобарбитуровой кислотой), и антирадикальную активность конденсата (АРА).

В основе определения ОЛ лежит их реакция (после предварительного гидролиза в присутствии  $H_2SO_4$ ) с фосфованилиновым реактивом. Из-за малого содержания липидов в КВВ объем материала, необходимого для анализа, увеличивали до 0,5 мл и измерения проводили на спектрофотометре при длине волны 530 нм [1].

Содержание ГП определяли по методу [5], с незначи-

тельной модификацией: в высокие пробирки к 0,5 мл экспирата добавляли 7,5 мл смеси гептан — изопропанол (1:1) и помещали на 10 мин в лабораторный встряхиватель. Затем в пробирку приливали 1,5 мл раствора  $HCi$  pH 2,0 и 3 мл гептана, перемешивали и после отстаивания и расслоения смеси через 20—30 мин отбирали гептановый слой, в котором измеряли  $D_{233}$  на спектрофотометре. В качестве контрольной пробы использовали образец, содержащий вместо конденсата 0,5 мл дистиллированной воды и подвергнутый всем вышеперечисленным этапам обработки. Количество ГП рассчитывали в относительных единицах по формуле:  $\Delta D_{233}$  на 1 мг липидов =  $(D_{233} \cdot V_3) / (V_n \cdot ОЛ) = 13,5 \cdot D_{233} / ОЛ$ , где  $D_{233}$  — измеренное значение оптической плотности,  $V_3 = 6,75$  мл — конечный объем гептанового экстракта,  $V_n = 0,5$  мл — объем взятого материала, ОЛ — содержание общих липидов КВВ (в мг/мл).

Для оценки общей АРА [11] определяли ингибирующее влияние конденсата (40 мкл) на свободнорадикальное окисление липидов мембран эритроцитов, в которых окисление индуцируется УФ-светом.

Концентрацию ТБК-активных продуктов определяли по методу [15].

Полученные результаты обработаны на ЭВМ ДВК-2М методом вариационной статистики, достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента.

**Результаты и обсуждение.** При поражении бронхолегочного аппарата были отмечены нарушения в системе ПОЛ — антиоксиданты в поверхностно-активных слоях легких (см. таблицу), причем с возникновением синдрома бронхиальной обструкции активация свободнорадикальных процессов усиливалась. При ХПБ в стадии обострения повышение количества ГП и ТБК-активных продуктов в КВВ составило соответственно 55,6 и 97,9 % от контрольного уровня, а у больных ХОБ данные показатели повышались соответственно в 2 и 3 раза. В периоде ремиссии при ХПБ или ХОБ параметры ПОЛ достоверно не изменялись. Если содержание ГП имело лишь незначительную тенденцию к снижению, то количество ТБК-положительного материала, напротив, повышалось.

Выявленная нами более выраженная интенсификация ПОЛ у пациентов с неспецифическими заболеваниями органов дыхания при развитии обструкции бронхиального дерева согласуется с данными литературы [6, 13]. Бронхообструктивный синдром способствует чрезмерной активации ПОЛ, а последнее в свою очередь развитию ХОБ. Одним из факторов, способных разорвать этот порочный цикл, является функционирование антиоксидантной системы, универсальной для всех живых тканей, в том числе и для ССЛ. В поверхностно-активной фракции Сф

Показатели ПОЛ и антирадикальной активности КВВ у больных ХБ в зависимости от формы и стадии заболевания ( $\bar{X} \pm m$ )

Показатель	Контроль (n=30)	ХПБ		ХОБ	
		обострение (n=18)	ремиссия (n=17)	обострение (n=72)	ремиссия (n=64)
Общие липиды, мкг/мл	3,02 ± 0,05	3,98 ± 0,41 <0,05	3,55 ± 0,34	4,47 ± 0,15 <0,05	4,17 ± 0,15 <0,05
Ацилгидроперекиси липидов, $\Delta D_{233}$ на 1 мг липидов	27,0 ± 2,0	42,0 ± 4,4 <0,001	37,0 ± 4,6 <0,05	53,0 ± 3,8 <0,001	45,0 ± 3,0 <0,001
ТБК-активные продукты, нмоль на 1 мг липидов	6,81 ± 0,65	13,48 ± 1,87 <0,001	14,59 ± 1,67 <0,001	21,04 ± 1,16	21,74 ± 1,11
Антирадикальная активность, %	5,79 ± 0,26	5,94 ± 0,89	5,24 ± 0,89	<0,001 <0,001 <0,01	<0,001 <0,001 <0,02

Примечание. n — число обследованных,  $p_1$  — по сравнению с контролем,  $p_2$  — между ХПБ и ХОБ.



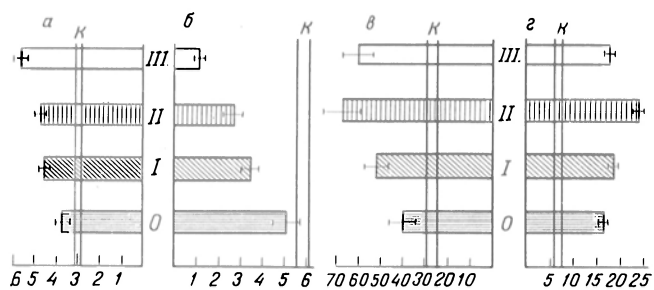


Рис. 1. Показатели ПОЛ в КВВ у больных ХОБ в зависимости от выраженности функциональных нарушений.

По оси абсцисс здесь и на рис. 2: а — содержание ОЛ (в мкг/мл), б — антирадикальная активность (в %), в — количество ГП (в АД<sub>233</sub> на 1 мг липидов), г — ТБК-активные продукты (в нмоль на 1 мкг липидов); по оси ординат — степень ДН. К — контроль.

обнаружены многие антиоксиданты, сравнимые по активности с микросомальной фракцией [3]. Поскольку КВВ не содержит веществ белковой природы, использованный нами метод оценки АРА характеризует, по-видимому, разнообразные по своей природе ингибиторы радикальных процессов.

При ХПБ способность антиоксидантов противостоять перекисному стрессу практически не отличалась от контроля как в стадии обострения, так и в периоде ремиссии. В то же время у больных ХБ с развитием бронхообструктивного синдрома наблюдали дефицит факторов антирадикальной защиты в системе легочного Сф; их уровень снижался на 43,2 % по сравнению с нормой. Возможно, что несостоятельность антиоксидантной системы является одним из главных патогенетических механизмов при дефектах мукоцилиарного клиренса и слизеобразования у больных хроническими неспецифическими заболеваниями легких [12].

Представляет интерес анализ свободнорадикальных процессов у больных ХБ в зависимости от функционального состояния аппарата дыхания и длительности болезни.

Как видно из рис. 1, количество ОЛ в КВВ повышалось с увеличением степени ДН; более четкую обратную зависимость от этого фактора наблюдали при исследовании АРА конденсата. Изменения, подобные сдвигам ОЛ, претерпевал уровень начальных и конечных продуктов ПОЛ. Исключение составляли больные с крайней степенью функциональных нарушений (ДН III степени), у которых содержание ГП снижалось на 10,4 %, а количество ТБК-активных продуктов — на 24,5 % по сравнению с больными ДН II степени. Ослабление ПОЛ при ДН III степени, несмотря на замедленную антиоксидантную активность, вероятно, связано с глубокими метаболическими сдвигами в легочной ткани и вытекающими отсюда последствиями в виде снижения количества субстратов для свободнорадикальных реакций. Кроме того, патоморфологическая перестройка органа, характерная для этой степени функциональных расстройств, значительно сокращает площадь газообмена, что, безусловно, приводит к меньшему выделению продуктов ПОЛ через дыхательные пути.

Анализ динамики параметров системы ПОЛ — антиоксиданты в зависимости от длительности заболевания (рис. 2) показал, что с увеличе-

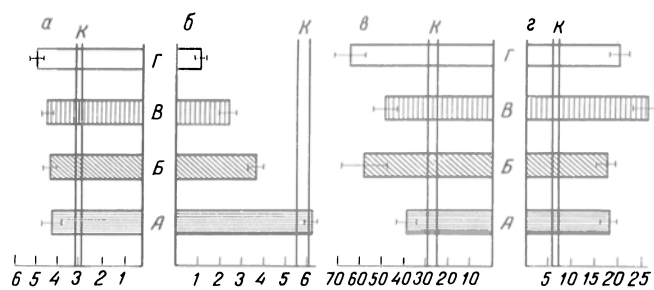


Рис. 2. Показатели ПОЛ в КВВ у больных ХОБ в зависимости от длительности заболевания.

По оси ординат: А — длительность болезни до 5 лет, Б — от 5 до 10 лет, В — 10—15 лет, Г — свыше 15 лет. К — контроль.

нием длительности болезни ослабляется антирадикальная защита в поверхностно-активных веществах легких: если в первые 5 лет имела тенденция к увеличению данного показателя, что свидетельствует о достаточных компенсаторных возможностях органа противостоять нарушениям перекисного гомеостаза, то в последующие годы пролонгированный свободнорадикальный стресс истощает механизмы обезвреживания продуктов перекисления и извращает репарацию фосфолипидного бислоя мембран [7].

Разнонаправленные сдвиги выявлены при изучении спектра показателей перекисидации липидов. У лиц с длительностью болезни до 5 лет преобладает повышение содержания ТБК-положительного материала в КВВ (271 % относительно контроля;  $p < 0,02$ ) по сравнению с уровнем ГП, который увеличился почти на 44 % ( $p < 0,02$ ). При длительности ХОБ до 10 лет количество начальных и конечных продуктов ПОЛ возрастало в 2,2 и 2,5 раза соответственно. Максимальную концентрацию веществ, реагирующих с ТБК в КВВ, наблюдали при дальнейшем развитии болезни (до 15 лет), напротив, содержание ГП снижалось на 38 % по сравнению с предыдущей группой. Высокий уровень свободнорадикальных процессов в ССЛ был характерен для лиц, страдающих ХОБ свыше 15 лет. Одной из причин, объясняющих эти сдвиги, служит низкая обеспеченность системы легочного Сф факторами антирадикальной защиты.

Используемый нами подход к изучению перекисного статуса в ССЛ прост, нетравматичен и может широко использоваться в клинической практике. По нашим данным, у больных ХБ происходит значительная интенсификация ПОЛ в поверхностно-активных слоях легких, причем с возникновением синдрома бронхиальной обструкции данные процессы еще более усиливаются. Дисбаланс в системе ПОЛ — антиоксиданты углубляется с ростом выраженности функциональных нарушений аппарата дыхания. Активность антирадикальной защиты ССЛ находится в обратной пропорциональной зависимости от длительности заболевания и степени ДН.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бестужева С. В. Физико-химическое и биохимическое исследование конденсата паров выдыхаемого воздуха: Метод рекомендации. — Минск, 1983.
2. Бестужева С. В. Биохимическое исследование нереспираторного конденсата паров выдыхаемого воздуха.



Таблица 1

Расщепление [ $^{14}\text{C}$ ]-тиамина при инкубации с гомогенатами печени крыс ( $M \pm m$ )

Длительность инкубации, мин	Метод оценки тиаминазной активности			
	[ $^{14}\text{C}$ ]-тиазол, имп/мин	$p$	[ $^{14}\text{C}$ ]-тиохром, имп/мин	$p$
Контроль на реактивы	197 $\pm$ 4,6		1001 $\pm$ 5,4	
1	188 $\pm$ 9,5	>0,5	1045 $\pm$ 22,8	>0,5
60	193 $\pm$ 11,1	>0,5	986 $\pm$ 37,2	>0,5

Примечание. Пробы содержали 40 мг ткани 175 нмоль субстрата (50 тыс имп/мин), в 0,05 М фосфатном буфере pH 6,4; содержание косубстрата в пробе 2,1 мкмоль цистеина  $\times \text{HCl}$ ; 30 °С.

деления выполнены с диоксидным жидким сцинтиллятором в счетчике "Mark-II" ("Nuclear Chicago", США).

В работе использовали: анилин, серникоксидный (отечественного производства), L-цистеин серникоксидный ("Chemapol", Чехословакия), витамин В<sub>1</sub> ("Ferah", Западный Берлин).

**Результаты и обсуждение.** Эксперименты на белых беспородных крысах и мышях показали, что в тканях (печень, почки) фермент, катализирующий расщепление витамина В<sub>1</sub> по тиаминазному механизму, отсутствует. Это согласуется с данными других исследователей [6, 9, 14]. При определении тиаминазной активности в гомогенатах печени и почек крыс и мышей по продукту ферментативной реакции — [ $^{14}\text{C}$ ]-тиазолу (табл. 1; рис. 2, 3) с использованием высоко-

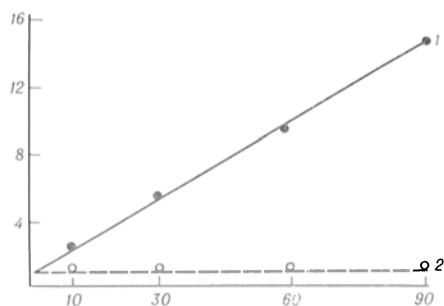


Рис. 2. Динамика образования [ $^{14}\text{C}$ ]-тиазола (в имп/мин  $\cdot 10^{-3}$  на 1 г ткани) гомогенатами печени (1) мышей после подкожного введения им тиаминазы (0,0052 МЕ/г) и контроль на ткани животных без введения фермента (2).

Здесь и на рис. 3: конечный объем проб для реакции 1 мл, содержащий ткань печени 40 мг и меченого тиамин 105 нмоль, 30 тыс. имп/мин, косубстрата цистеина  $\cdot \text{HCl}$  21 000 нмоль; среда для инкубации: фосфатный буфер pH 6,4, 0,05 М, 30 °С. По оси абсцисс — время (в мин).

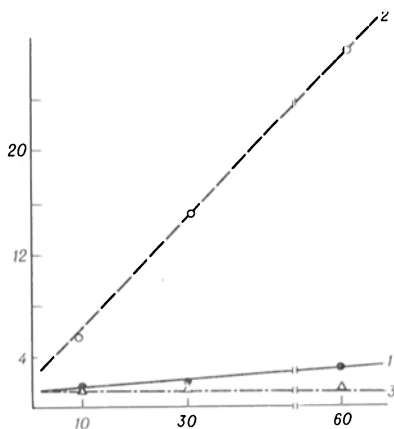


Рис. 3. Динамика образования [ $^{14}\text{C}$ ]-тиамина (в имп/мин  $\cdot 10^{-3}$  на 1 г ткани) гомогенатами печени (1) и почек (2) крысы после подкожного введения им тиаминазы (0,0052 МЕ/г) и контроль на ткани без введения фермента (3).

чувствительного радиометрического метода отмечено отсутствие меченого продукта в инкубационной среде как через 1 мин, так и через 1 ч после инкубации с меченым тиаминном при 30 °С и других оптимальных условиях эксперимента. Полученные для подопытных проб печени крыс величины соответствовали контролям на реактивы (см. табл. 1), что исключает наличие ферментов деградации тиаминна в исследуемых тканях животных.

Другой использованный подход заключался в превращении меченого витамина В<sub>1</sub> после инкубации с гомогенатами тканей крыс в радиоактивный тиохром.

В данном эксперименте в пробах, содержащих одинаковое количество меченого витамина до инкубации с гомогенатами тканей животных (контроль на реактивы) и после инкубации (опыт), окисляли тиамин в [ $^{14}\text{C}$ ]-тиохром феррицианидом в щелочной среде [11]. Затем тиохром избирательно извлекали изобутанолом и производили подсчет радиоактивности полученного соединения. Как видно из табл. 1, значения радиоактивности тиохрома подопытных проб соответствовали контрольным величинам. Таким образом, тиаминазная активность в печени и почках крыс и мышей не была обнаружена.

С целью подтверждения корректности и высокой чувствительности изотопного метода, использованного нами, группе белых мышей была инъецирована подкожно тиаминна I из беззубки обыкновенной (0,0013 МЕ/г) на 6 ч на фоне введенного [ $^{14}\text{C}$ ]-тиамина. В ткани печени животных этой группы удалось зафиксировать уменьшение общей радиоактивности в 7 раз, в почках — в 4,5 раза по сравнению с контролем. Общее количество метки в моче, приведенное к одинаковому объему, в подопытной группе по сравнению с контрольной возросло более чем в 6 раз, причем количество тиазола в печени и моче увеличилось в 3 раза, в почке — в 4 раза (табл. 2, 3).

Более высокое содержание радиоактивного тиазола после инъекции фермента животным в почке по сравнению с печенью при одинаковом количестве взятой для определения ткани можно объяснить тем, что продукты катаболизма витамина поступают в почки позже, чем в печень. Печень

Таблица 2

Общая радиоактивность [ $^{14}\text{C}$ ]-тиамина (в имп/мин на 1 г ткани) в органах и моче мышей при его введении в дозе 5,65 нмоль/г подкожно за 8 ч до умерщвления животных с промежуточным введением интактной или инактивированной тиаминназы (0,0013 МЕ/г) за 6 ч до декапитации ( $M \pm m$ )

Ткань и жидкость	Условия исследования	Общая метка	$p$
Печень	Контроль	101 900 $\pm$ 5 900	
	Инактивированная тиаминназа	99 300 $\pm$ 9 300	>0,5
Почка	Тиаминназа	14 800 $\pm$ 3 800	<0,001
	Контроль	44 300 $\pm$ 4 200	
Моча (1 мл)	Инактивированная тиаминназа	43 900 $\pm$ 5 200	>0,5
	Тиаминназа	9 700 $\pm$ 900	<0,001
Моча (1 мл)	Контроль	16 120 $\pm$ 2 880	
	Инактивированная тиаминназа	12 140 $\pm$ 150	>0,5
	Тиаминназа	103 730 $\pm$ 18 910	<0,001

Таблица 3

Радиоактивность [ $^{14}\text{C}$ ]-тиазола (в имп/мин на 1 г ткани) в органах и моче мышей

Ткань и жидкость	Условия исследования	Метка [ $^{14}\text{C}$ ]-тиазола ( $M \pm m$ )	$p$
Печень	Контроль	800 $\pm$ 300	
	Инактивированная тиаминазы	700 $\pm$ 82	>0,5
Почка	Тиаминазы	2 600 $\pm$ 900	<0,05
	Контроль	1 100 $\pm$ 650	
Моча (1 мл)	Инактивированная тиаминазы	1 600 $\pm$ 300	>0,5
	Тиаминазы	4 700 $\pm$ 400	<0,05
Моча (1 мл)	Контроль	7 300 $\pm$ 1 700	
	Инактивированная тиаминазы	7 200 $\pm$ 1 600	>0,5
	Тиаминазы	27 800 $\pm$ 3 600	<0,001

Примечание. Условия опыта такие же, как в табл. 2.

и почки участвуют в рециркуляции тиамин и его дериватов в организме животных [2]. Согласно данным литературы, при введении тиазолового компонента тиамин — [ $^{14}\text{C}$ ]-геминейрина — основная радиоактивность тканей определялась лишь в первые часы эксперимента (3 ч) [13]. Известно, что при парентеральном введении фермента животным инъекцированные макромолекулы лучше и в первую очередь проникают в печень и почки [1, 7].

В наших дальнейших опытах на крысах и мышах [ $^{14}\text{C}$ ]-тиамин вносили в пробы с гомогенатами тканей (печень, почка) и проводили инкубацию в течение 1, 10, 30 и 60 мин по описанному в литературе методу [6]. Это исключает загрязнение тканей тиазолом как продуктом ферментативного процесса через кровь и лимфу, что дает возможность тестировать активность введенного фермента в исследуемом органе. Кинетика образования тиазола при тиаминазной реакции в гомогенатах тканей мышей и крыс после подкожного введения фермента показывает, что введенный энзим хорошо тестируется (см. рис. 2, 3). В опыте на мышах, при использовании инактивированной тиаминазы (см. табл. 2, 3), общая радиоактивность гомогенатов тканей соответствовала контролю, а [ $^{14}\text{C}$ ]-тиазол в исследуемых органах и моче почти не определялся. Следовательно, явление тиазола в гомогенатах печени, почек и в моче свидетельствует об активности тиаминазы, введенной животным парентерально.

Таким образом, «разрушение» тиамин при его инкубации с гомогенатами тканей крыс и морских свинок, отмеченное исследователями [3, 5], необходимо рассматривать как не связанное с ферментом тиаминазой, а имеющее иную природу.

Известно, что на выход тиаохрома из витамина  $\text{B}_1$  могут оказывать разнонаправленное влияние (гасить или потенцировать флуоресценцию) соединения различной химической природы.

По нашим данным, существенных изменений витамина  $\text{B}_1$  при его инкубации с гомогенатами печени, почек крыс и мышей в течение 1 ч не происходило. При этом мы не исключаем, что в рационе животных в опытах португальских исследователей [5] мог преобладать сырой корм морской фауны (рыба, моллюски и т. д.). Тогда «тиаминазная» активность в органах животных.

обнаруженная указанными исследователями, может иметь алиментарное происхождение.

Полученные нами при применении радиометрического метода данные позволяют заключить, что в печени и почках белых беспородных крыс и мышей тиаминазная активность отсутствует.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Вольф М., Крансбергер К. // Лечение ферментами: Пер. с англ.— М., 1976.— С. 26, 33.
2. Гасман В., Кетц К. // Международный биохим. конгресс, 5-й.— М., 1961.— Т. 1.— С. 487.
3. Кошта М. М., Азеведо М. Д. // Европейское хим. о-во: Конференция, 16-я: Тезисы докладов.— 1984.— Т. 22, № 103.— С. 456.
4. Пузач С. С., Горбач З. В., Островский Ю. М. // Биохимия.— 1984.— Т. 49, вып. 7.— С. 1178—1183.
5. Azevedo M. D., Jacobsohn K., Cardoso M. R. // Bull. Soc. chim. Biol.— 1966.— Vol. 50, N 10.— P. 1791—1796.
6. Edwin E. E., Jackman R. A. // J. Sci. Food and Agric.— 1974.— Vol. 25, N 4.— P. 357—368.
7. Fiddler M. B., Desnick R. J. // Arch. Biochem. Biophys.— 1977.— Vol. 179.— P. 397—408.
8. Fujita A. // J. Vitaminol.— 1972.— Vol. 18, N 1.— P. 67—72.
9. Ikehata H. // J. gen. appl. Microbiol. Chem.— 1960.— Vol. 6, N 1.— P. 30—39.
10. Kumar B., Chandhuri D. K. // Int. Vitamin. Nutr. Res.— 1976.— Vol. 46, N 2.— P. 154—159.
11. Leveille C. A. // Amer. J. clin. Nutr.— 1972.— Vol. 25, N 3.— P. 273—274.
12. Mc Cleary B. V., Chick B. F. // Phytochemistry.— 1977.— Vol. 16, N 4.— P. 357—368.
13. Morey A. V., Juni Elliot // J. biol. Chem.— 1968.— Vol. 234.— P. 3009—3019.
14. Murata K. // Review of Japanese Literature on Beri-Beri and Thiamine.— Tokyo, 1965.— P. 220—254.
15. Schaller K., Höller H. // Int. J. Vitamin. Nutr. Res.— 1976.— Vol. 46, N 2.— P. 143—148.
16. Somogyi J. C., Nageli U. // Int. J. Vitaminforsch.— 1969.— Bd 39, N 4.— S. 401—406.
17. Somogyi J. C. // J. Vitaminol.— 1971.— Vol. 17, N 3.— P. 165—174.

Поступила 20.09.89

## ON THE PRESENCE OF THE ANTITHIAMIN FACTOR — THIAMINASE IN RAT AND MICE TISSUES

S. S. Puzach

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

Thiaminase activity was not found in rat and mice tissues (liver, kidney tissues) using radiometric procedure. Intact exogenous thiaminase I from bivalve freshwater mollusks was effectively detected in homogenates of rat or mice liver and kidney tissues within 6 hrs after the enzyme parenteral administration into these animals; at the same time, considerable amount of [ $^{14}\text{C}$ ]-thiazol developed after thiaminase catalysis was estimated in urine.

И. П. Ашмарин, Л. А. Ляпина, В. Е. Пасторова,  
Б. А. Кудряшов

## ДЕЙСТВИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПЕПТИДОВ С РАЗЛИЧНОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ НА ПРОЦЕСС ПОЛИМЕРИЗАЦИИ ФИБРИНА И НЕФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ФИБРИНОЛИЗ. НЕЙРОГОРМОНЫ ГИПОФИЗА, ГОРМОНЫ ГИПОТАЛАМУСА, ЛИБЕРИНЫ, АКТГ И ЕГО АНАЛОГИ

Кафедра физиологии человека и животных биологического факультета МГУ

Известно, что многие регуляторные пептиды (РП) при системном введении оказывают сильное и быстрое действие на многие физиологические функции организма [1]. В сложных физиологических процессах, регулирующих нормальный уровень факторов системы гемостаза, принимает участие система гипофиз — кора надпочечников. При действии чрезвычайных раздражителей включается цепь реакций, начинающихся с возбуждения симпатико-адреналовой системы, выделения адреналина и активации системы гипоталамус — гипофиз — кора надпочечников. Показано, что АКТГ, образующийся в базофильных клетках передней доли гипофиза и являющийся физиологическим стимулятором коры надпочечника, участвует в осуществлении функции противосвертывающей системы. Блокирование секреции АКТГ приводило к угнетению фибринолитических и антикоагулянтных свойств плазмы крови [6]. Крупный фрагмент АКТГ<sub>1-24</sub> способствует эффективной коррекции нарушений гемодинамики и дыхания после значительных кровопотерь [7]. *In vivo* АКТГ регулирует процесс образования в кровотоке комплексных соединений гепарина с белками крови, как считают, опосредованно через стимуляцию им коры надпочечников и повышение в организме уровня кортикостероидов [10].

Имеются единичные сообщения о влиянии других пептидов гипофиза и гипоталамуса на процессы свертывания крови. Показана, например, эффективность вазопрессина при мышечных гематомах и остановке кровотечений [9]. Его аналог (1-дезамино-8-D-аргинин-вазопрессин) используют для лечения легкой формы недостаточности фактора VIII крови [9]. Выявлена эффективность триолиберина [2], соматостатина [11] при некоторых видах кровотечений. Окситоцин — октапептид задней доли гипофиза, стимулирующий сокращение матки и вызывающий поведенческие эффекты, применяют для профилактики и лечения гипотонических маточных кровотечений [5]. Пептиды, содержащие последовательность аминокислот  $\text{глу—про—арг—}$ , влияют как на ферментативную стадию свертывания крови, так и на стадию полимеризации фибрина [4].

Настоящее сообщение посвящено исследованию влияния ряда РП гипофиза и гипоталамуса, некоторых их аналогов на процесс перехода фибриномера в фибрин-полимер, на нестабилизированный фибрин и антикоагулянтные свойства плазмы крови в условиях *in vitro*.

Методика. В работе использованы вазопрессин и окситоцин отечественного производства, аналог фрагмента АКТГ<sub>4-7</sub> — препарат «Семакс» (АКТГ<sub>4-7</sub> — про—глу—про—) из института молекулярной генетики АН СССР, гипоталамические гормоны, контролирующие освобождение гормонов гипофиза, триолиберин (TRH) и его синтетический аналог PR-546, меланостатинингибирующий фактор (МИФ) из Института органического синтеза АН Латвийской ССР (Рига).

Антикоагулянтную активность РП определяли по времени рекальцификации плазмы крови здоровых крыс общепринятым методом. Препараты исследовали на наличие неферментативной фибринолитической активности на нестабилизированных пластинах фибрина как в отсутствие, так и в присутствии блокаторов ферментативного фибринолиза — ингибитора трипсина из соевых бобов в конечной концентрации 0,1 % [3]. Фибриндеполимеризационную и фибринполимеризационную активности препаратов определяли по модифицированному нами методу [8], для чего использовали препарат очищенного фибриномера (степень чистоты 98—99 %) [8].

Результаты и их обсуждение. Исследованные нами препараты РП в концентрациях от  $10^1$  до  $10^{-10}$  мг/мл ( $10^{-2}$ — $10^{-13}$  М) не обладали прокоагулянтными свойствами, так как время рекальцификации и тромбиное время нормальной плазмы крови крыс в присутствии окситоцина, «Семакса», TRH, PR-546, МИФ не изменялось и соответствовало контрольному уровню.

Установлено, что окситоцин в концентрациях от  $10^{-1}$  до  $10^{-3}$  мг/мл ( $10^{-4}$ — $10^{-6}$  М) способен растворять нестабилизированный фибрин как в отсутствие, так и в присутствии блокаторов ферментативного фибринолиза, т. е. оказывает неферментативное фибринолитическое действие на нестабилизированный фибрин. Все остальные исследованные пептиды не обнаруживали четко выраженного действия на нестабилизированный фибрин, хотя отмечена слабая неферментативная фибринолитическая активность у вазопрессина: зоны лизиса не превышали 4—6 мм<sup>2</sup> при концентрации препарата  $10^{-2}$ — $10^{-3}$  мг/мл ( $10^{-5}$ — $10^{-6}$  М).

При анализе влияния РП на степень полимеризации фибрина (см. таблицу) отмечено, что наибольшей способностью растворять нестабилизированный фибрин обладал окситоцин в концентрациях от  $10^{-1}$  до  $10^{-3}$  мг/мл ( $10^{-4}$ — $10^{-6}$  М); в более низких концентрациях — от  $10^{-3}$  до  $10^{-5}$  мг/мл ( $10^{-6}$ — $10^{-8}$  М) он проявлял лишь слабую деполимеризационную активность, а в концентрациях ниже  $10^{-9}$  мг/мл ( $10^{-12}$  М) был неэффективен. Вазопрессин в концентрациях  $10^{-2}$ — $10^{-5}$  мг/мл ( $10^{-5}$ — $10^{-8}$  М) проявлял слабую фибриндеполимеризационную активность и в отличие от окситоцина не оказывал деполимеризационного влияния на нестабилизированный фибрин при концентрациях  $10^{-6}$ — $10^{-10}$  мг/мл ( $10^{-9}$ — $10^{-13}$  М). TRH и его аналог PR-546, напротив, усиливали полимеризацию нестабилизированного фибрина. В концентрациях  $10^{-1}$  мг/мл ( $10^{-4}$  М) PR-546 усиливал полимеризацию фибрина на 32 %, а в концентрации  $10^{-2}$  мг/мл ( $10^{-5}$  М) — на 41 %. TRH по сравнению с PR-546 давал меньший фибринполимеризационный эффект и усиливал полимеризацию фибрина максимально только на 25 % — при концентрации  $10^{-1}$  мг/мл ( $10^{-4}$  М). TRH при более низких концентрациях —  $10^{-2}$  и  $10^{-3}$  мг/мл ( $10^{-5}$ — $10^{-6}$  М) и PR-546 при концентрации  $10^{-3}$  мг/мл ( $10^{-6}$  М) усиливали полимеризацию фибрина лишь на 18—20 %. Интересно отметить, что оба препарата из гипоталамуса в исследованных нами дозах обнаруживали еще один

Влияние препаратов РП на процесс полимеризации фибрина (в %;  $M \pm m$ )

Концентрация, мг/мл	Окситоцин	Вазопрессин	PR-546	TRH	МИФ	«Семакс»
$10^1$	—	—	—	—	—	94 ± 4,1
$10^{-1}$	51**	87 ± 5,9	132 ± 5,0**	125 ± 3,8*	100 ± 4	109 ± 3,5
$10^{-2}$	—	64 ± 7,1**	141 ± 3,1**	120 ± 7*	91 ± 5	99 ± 3,8
$10^{-8}$	55**	88 ± 4,3	118 ± 3,5*	118 ± 4*	100 ± 3,3	107 ± 5
$10^{-4}$	82	73 ± 5,5**	100 ± 1,3	103 ± 5	77 ± 7,5**	94 ± 5
$10^{-5}$	80*	82 ± 5,1	100 ± 2,2	100 ± 1,3	81 ± 11	117 ± 7
$10^{-6}$	110	95 ± 4,9	118 ± 7*	128 ± 8*	89 ± 9	116 ± 6
$10^{-7}$	82	96 ± 5	120 ± 2*	104 ± 3,5	86 ± 3	103 ± 4,7
$10^{-8}$	96	100 ± 3,4	103 ± 5	100 ± 5,1	80 ± 9	111 ± 2
$10^{-9}$	90	91 ± 6,8	105 ± 4,8	100 ± 3	80 ± 9	106 ± 3,8
$10^{-10}$	89	97 ± 4	103 ± 4	105 ± 4,5	—	112 ± 4,4

Примечание. Исходный уровень белка принят за 100%. Статистические показатели рассчитаны относительно соответствующих проб контроля (без добавления препаратов). Звездочки — достоверность различий: одна —  $p < 0,05$ ; две —  $p < 0,001$ .

пик активности при более низких концентрациях — при  $10^{-6}$  мг/мл ( $10^{-9}$  М) для TRH и PR-546 и при  $10^{-7}$  мг/мл ( $10^{-10}$  М) для PR-546.

МИФ проявил слабый фибриндеполимеризующий эффект лишь при концентрации  $10^{-4}$  мг/мл ( $10^{-7}$  М). При всех других исследованных концентрациях МИФ был неэффективен. Аналог АКТГ<sub>4-10</sub> «Семакс» при всех исследованных концентрациях — от  $10^{-1}$  до  $10^{-10}$  мг/мл ( $10^{-4}$  —  $10^{-13}$  М) практически не обладал способностью влиять на полимеризацию фибрина.

Таким образом, препараты РП из гипофиза — окситоцин и вазопрессин — обладают слабым фибриндеполимеризующим действием в отношении нестабилизированного фибрина. РП из гипоталамуса — TRH и PR-546 — вызывают усиление полимеризации фибрина. Вопрос о том, чем обусловлен тот или иной характер взаимодействия РП с нестабилизированным фибрином, требует дальнейших исследований. Можно предположить, что взаимодействием указанных РП с фибриногеном затрагивает разные участки цепи фибриногена, что и приводит к разнонаправленному действию РП на фибрин и фибриноген.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ашмарин И. П. // Пат. физиол. и Экспер. терап.— 1988.— № 3.— С. 3—8.
2. Булаев В. М. Фармакология аналогов энкефалинов и их антагонистов: Автореф. дис. ... канд мед. наук.— М., 1983.
3. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А., Баскова И. П. // Вестн.

- Моск. ун-та: Сер. биол. почвовед.— 1974.— № 5.— С. 41—45.
4. Левицкая Н. Г., Клейменов А. Н., Петросян М. Т., Розенфельд М. А. и др. // Бюл. Экспер. биол.— 1987.— № 7.— С. 190—192.
5. Машковский М. Д. // Лекарственные средства.— М., 1986.— Т. 1.— С.
6. Шапиро Ф. Б., Ломовская Э. Г. // Биол. науки.— 1972.— № 5.— С. 42—46.
7. Bertolini A., Guarini S., Ferrari W., Rompianesi E. // Life Sci.— 1986.— Vol. 39, N 14.— P. 1271—1280.
8. Buluk K., Januszko T., Olbromski J. // Nature.— 1961.— Vol. 191.— P. 1093—1098.
9. Chirardini A., Chistolini A., Tirindelli M. et al. // Thromb. Res.— 1988.— Vol. 49, N 3.— P. 363.
10. Buluk K., Shapiro F. B., Lomovskaja E. G., Lyapina L. A. // Thrombos. Res.— 1975.— Vol. 7.— P. 285—295.
11. Magnusson J., Ihre T. // Lancet.— 1985.— Vol. 1.— N 8424.— P. 337—338.

Поступила 19.07.89

EFFECT OF REGULATING PEPTIDES WITH VARIOUS BIOLOGICAL ACTIVITY ON FIBRIN POLYMERIZATION AND NONENZYMATIC FIBRIOLYSIS. NEUROHORMONES OF HYPOPHYSIS, HORMONES OF HYPOTHALAMUS, LIBERINES, ACTH AND ITS DERIVATIVES

I. P. Ashmarin, L. A. Lyapina, V. E. Pastorova, B. A. Kudryashov  
Biological Faculty, M. V. Lomonosov State University, Moscow

Preparations of regulating peptides from hypophysis oxytocin ( $10^{-1}$ – $10^{-3}$  mg/ml) and vasopressin ( $10^{-2}$ – $10^{-5}$  mg/ml) demonstrated weak depolymerizing effect on unstabilized fibrin. Regulating peptides from hypothalamus thyroliberine and PR-546 ( $10^{-1}$ – $10^{-3}$  mg/ml) increased polymerization of fibrin monomer.

МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616-008.931:577.152.143/074

И. А. Волчегорский, Н. А. Скобелева, Р. И. Лифшиц

МОДИФИЦИРОВАННЫЙ МЕТОД СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ МОНОАМИНОКСИДАЗЫ С БЕНЗИЛАМИНОМ В КАЧЕСТВЕ СУБСТРАТА

Челябинский медицинский институт

Одним из подходов к регистрации активности моноаминоксидазы [МАО; амин: кислород оксидоредуктазы (дезаминирующей), (содержащей флавин); КФ 1.4.3.4] является определение таких продуктов окислительного дезаминирования моноаминов, как альдегиды, путем превращения их в семикарбазоны с последующей спектрофотометрией [1, 12, 15]. Среди методов, основанных на данном принципе, обращает на себя внимание описанный в работе [12] как весьма чувствительный, простой и позволяющий использовать биогенные моноамины в качестве субстратов. Эти до-

стоинства метода связаны с непрерывной фиксацией альдегидов семикарбазидом, входящим в состав среды инкубации. Вместе с тем установлен факт наличия ингибиторных свойств семикарбазида по отношению к MAO [15], что делает очевидными ошибку занижения и неопределенность результатов, получаемых этим методом [1]. В работе [15] предложен метод, лишенный указанных недостатков, так как семикарбазид вводится в инкубационную среду одновременно с остановкой ферментативной реакции. Однако техника определения активности MAO, описанная в работе [15], громоздка, требует сложной системы оптических контролей и обладает относительно низкой чувствительностью, что делает необходимой инкубацию в течение 60 мин при определении активности MAO в таком богатом ферментом органе, как печень. Кроме того, метод требует строгой стандартизации проб по количеству белка, при завышении которого наблюдается грубое отклонение от линейной зависимости между содержанием ферментного препарата в пробе и накоплением продукта реакции. Эти недостатки делают методику [15] малоприменимой для биохимического анализа. В представленной работе описан оптимизированный метод определения активности MAO, основанный на принципе семикарбазообразования.

**Методика.** В работе использованы семикарбазида гидрохлорид ("Fluka", Швейцария), серотонина креатининсульфат и тирамина гидрохлорид ("Reanal", Венгрия), остальные реактивы отечественного производства. Бензиламина гидрохлорид получен из основания и дважды перекристаллизован из ацетона [8]. Исследование выполнено на белых беспородных мышцах-самцах массой 18—22 г. Животных забивали декапитацией, быстро извлекали головной мозг и печень, отмывали их в охлажденной среде выделения (0,25 М сахараза в 0,067 М Na-фосфатном буфере pH 7,4) и гомогенизировали в этой среде в системе стекло—стекло с последующим центрифугированием при 650 г в течение 10 мин. Супернатанты, используемые в качестве источников MAO, выдерживали в ледяной бане вплоть до определения ферментативной активности. Использовали 3—5 % гомогенаты (вес/объем) ткани печени и 10—15 % гомогенаты головного мозга. Ферментативную реакцию проводили в пробах объемом 3,2 мл следующего состава: 2,5 мл 0,067 М Na-фосфатного буфера pH 7,4, 0,2 мл гомогената, 0,5 мл 30,2 мМ раствора солянокислого бензиламина. Конечная концентрация субстрата в пробе 4,72 мМ. Реакцию начинали внесением субстрата в преинкубированные 20 мин при 37 °С пробы. Длительность инкубации при определении MAO печени составляла 20 мин, при определении ферментативной активности мозга — 60 мин. Пробы фиксировали внесением 1 мл 0,6 н. HClO<sub>4</sub>, содержащей семикарбазида гидрохлорид в концентрации 50 мМ. Слепые пробы инкубировали без субстрата и вносили его после остановки реакции. Накопление бензальдегида в пробе оценивали по разности оптических плотностей депротенинатов опытной и слепой проб при 278 нм, перерасчет в наномоли продукта осуществляли, исходя из тангенса угла наклона калибровочного графика, равного 0,012 [12]. Содержание белка в гомогенатах определяли по методу [6], в среде, содержащей 4 М мочевины, — по [7]. В экспериментах с индукцией перекисного окисления липидов (ПОЛ) гомогенаты готовили на 0,011 М Na-фосфатном буфере pH 7,4, так как высокие концентрации орто-фосфата снижают интенсивность ПОЛ [17]. Индукцию ПОЛ осуществляли в гомогенатах мозга, которые преинкубировали в течение 20 мин при 37 °С в присутствии 0,5 мМ аскорбиновой кислоты и 50 мкМ FeSO<sub>4</sub>. MAO-реакцию в этой серии начинали внесением в пробы 0,2 мл гомогената.

Уравнения зависимостей в двойных обратных координатах Лайнуивера — Берка интерполировали из экспериментальных данных с применением программ корреляционно-регрессионного анализа. Определение активности MAO во всех постановках проводили в 5 повторностях. Достоверность различий оценивали с использованием критериев Стьюдента и Вилкоксона — Манна — Уитни.

**Результаты и обсуждение.** Описанный

метод определения активности MAO воспроизведен по [12] с модификацией, исходя из подхода предложенного в [15]. Суть изменения заключалась в переносе семикарбазида из среды инкубации в 0,6 н. HClO<sub>4</sub>, которой останавливали реакцию. В данных условиях активность MAO гомогенатов мозга и печени мышей составила соответственно  $0,4 \pm 0,04$  и  $1,27 \pm 0,13$  нмоль бензальдегида на 1 мг белка в минуту. Отметим высокие чувствительность и воспроизводимость метода. Так, прирост оптической плотности при 278 нм, обусловленный семикарбазона бензальдегидом, равный 0,15—0,23 ед экстинкции, обеспечивали присутствием в пробе  $0,73 \pm 0,05$  мг белка (20—30 мг сырой ткани) и  $0,57 \pm 0,06$  мг белка (6—10 мг сырой ткани) для мозга и печени соответственно. Коэффициент биологической вариации ферментативной активности колебался от 23 до 25 %. Накопление бензальдегида в среде инкубации линейно зависело от времени вплоть до 120 мин для ткани мозга и до 60 мин для гомогенатов печени.

Прирост содержания продукта также линейно зависел от уровня белка в пробе вплоть до 1,63 мг (80 мг ткани) для мозга и до 1,87 мг (30 мг ткани) для печени. Изменения концентрации бензиламина в пробе от 3,33 до 10 мМ не влияли на получаемые результаты об активности MAO. Накопление бензальдегида в пробах с гомогенатами печени непрерывно нарастало с увеличением концентрации субстрата до 20 мМ. Однако степень этого прироста была низка. Так, при увеличении концентрации бензиламина с 4,72 до 20 мМ выход продукта возрос лишь на 14 %, что можно объяснить ингибиторными свойствами бензиламина в отношении альдегидметаболизирующих систем печени, субстратом которых в данном случае является бензальдегид [15]. Биогенные субстраты MAO — серотонин и тирамин, вероятно, не обладают таким свойством, поскольку при использовании их в описанной системе не удалось получить прироста оптической плотности в рекомендуемой для соответствующих семикарбазонов области спектра (240—255 нм) [12]. Возможность использования биогенных моноаминов в качестве субстратов при наличии семикарбазида в среде инкубации [12] и отсутствие такой возможности при исключении семикарбазида из системы позволяют предположить угнетение метаболизма жирно-ароматических альдегидов в присутствии этого вещества, что согласуется с данными работ [9, 15]. На рис. 1 показано, что семикарбазид вызывал наиболее выраженное подавление активности MAO в концентрации  $10^{-2}$  М. Усиленное (до 112 %) дезаминирование бензиламина MAO гомогената ткани мозга в присутствии  $10^{-3}$  М семикарбазида ( $p < 0,05$ ) может быть связано как с непрерывной фиксацией бензальдегида в виде семикарбазона в процессе инкубации [9], так и с подавлением альдегидокисляющих ферментов гомогената [15]. Для проверки последнего предположения было изучено действие ингибитора альдегиддегидрогеназ — хлоралгидрата [13] на активность MAO тканей мозга и печени (рис. 2). Максимальная из исследованных концентраций хлоралгидрата ( $10^{-2}$  М) увеличивала накопление бензальдегида в среде инкубации на 20—25 % ( $p < 0,02$ ), что, однако, нельзя расценить как следствие активации MAO, поскольку при меньших концентрациях от-

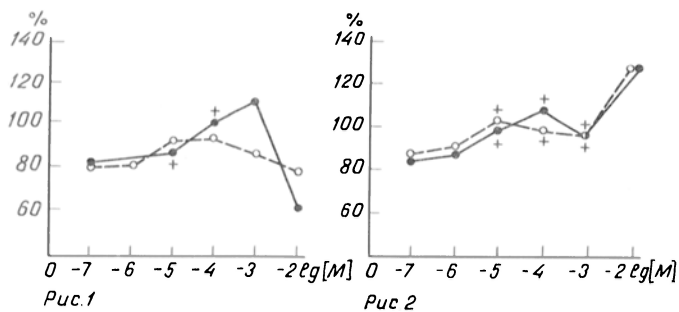


Рис. 1. Влияние семикарбазида на активность МАО.

По оси абсцисс — десятичные логарифмы концентраций семикарбазида во время 20-минутной преинкубации; по оси ординат — активность МАО, % от контроля. Знаком + отмечены значения МАО-активности, достоверно не отличающиеся от контроля ( $p > 0,05$ ). Здесь и на рис. 2 и 3 источником МАО служили объединенные гомогенаты мозга (сплошная линия) 10 мышей и объединенные гомогенаты печени (штриховая линия) 4 мышей.

Рис. 2. Влияние хлоралгидрата на активность МАО.

мечалось подавление дезаминирования бензиламина. Подобный механизм может быть источником ошибки при скрининге вероятных ингибиторов и активаторов МАО, поскольку известно, что даже хорошо изученные ингибиторы фермента (паргилин, флоргиллин, депренил, ниаламид и транилципрамин) могут блокировать метаболизм альдегидов [4], а альдегидокисляющие ферменты присутствуют не только в гомогенатах, но и в митохондриях, которые наиболее часто используются в качестве источников МАО [9]. Очевидно, модификация альдегидметаболизирующей активности биологических образцов может вызвать ложное изменение активности МАО в предлагаемых системах. Последнее может быть справедливо и для наиболее распространенных методов изучения активности МАО — радиометрических, связанных с экстракцией дезаминированных метаболитов органическими растворителями. Так, известно, что индолуксусная кислота экстрагируется лучше, чем ее метаболитический предшественник — индолуксусный альдегид, являющийся продуктом дезаминирования  $^{14}\text{C}$ -триптамина [14]. Установлено также, что при использовании в качестве субстратов аминов, меченных дейтерием по альфа-углеродному атому, окисление альдегидов ведет к потере радиоактивной метки продуктами дезаминирования [16]. Методы определения МАО, базирующиеся на регистрации поглощения  $\text{O}_2$ , также могут давать искаженные результаты за счет дополнительного поглощения кислорода при окислении альдегидов [9]. Описанные источники ошибки предлагалось устранить включением в среду инкубации ингибиторов метаболизма альдегидов [9], однако некоторые из них, в частности семикарбазид [1, 15] и хлоралгидрат, как показано нами (см. рис. 2), могут искажать результаты за счет подавления собственно МАО. Вероятно, подобные противоречия можно отчасти устранить параллельным определением активности МАО как в среде без ингибиторов метаболизма альдегидов, так и с включением данных веществ в состав инкубируемых проб. В описанной нами системе представляется целесообразным параллельное определение активности МАО в присутствии  $10^{-3}\text{M}$  семикарбазида, дающего максимальный выход бензальдегида при этой концентрации (см. рис. 1).

Зависимость интенсивности дезаминирования бензиламина от концентрации хлоралгидрата (см. рис. 2) имеет выраженный двухфазный характер, что позволяет предположить неоднородность ферментных систем, катализирующих дезаминирование субстрата, в гомогенатах мозга и печени мышей. С целью проверки этого предположения была изучена зависимость аминоксидазной активности

от концентрации бензиламина. Как показано на рис. 3, в гомогенатах исследованных тканей присутствуют два фермента, существенно различающихся по степени сродства к бензиламину: высокоаффинный ( $K_m$  для мозга  $0,28\text{ мМ}$ , для печени  $0,27\text{ мМ}$ ) и низкоаффинный ( $K_m$  для мозга  $0,56\text{ мМ}$ , для печени  $0,98\text{ мМ}$ ). Это во многом напоминает ситуацию, описанную в работе [10] для сердца крысы, и позволяет соотнести высокоаффинный фермент с бензиламинооксидазой (хлоргиллинрезистентным, семикарбазидчувствительным ферментом), а низкоаффинный с МАО. Наличие высокоаффинной бензиламинооксидазной активности в гомогенатах мозга и печени мышей делает целесообразным постановку параллельного контроля с семикарбазидом в составе среды инкубации, что позволяет вычленить активность собственно МАО из общей аминоксидазной активности гомогената. Данная возможность связана с высокой чувствительностью солибилизируемых аминоксидаз, к которым относится бензиламинооксидаза [3], к ингибирующему действию карбонильных реагентов — производных гидразина [2], в частности семикарбазида [3, 10].

Предлагаемая модификация спектрофотометрического определения активности МАО применима в основном для изучения МАО-Б, во-первых, потому, что бензиламин дезаминируется преимущественно этой формой фермента [11] и, во-вторых, потому, что нами в опытах с преинкубацией гомогената мозга в условиях, благоприятствующих ПОЛ, была продемонстрирована относительная независимость интенсивности дезаминирования

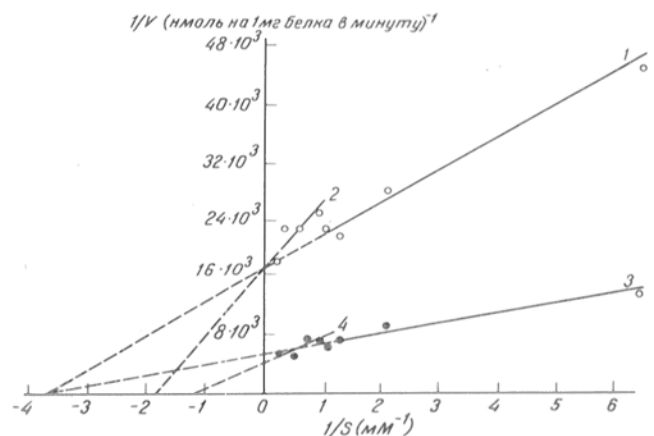


Рис. 3. Зависимость аминоксидазной активности от концентрации бензиламина.

Высокоаффинная аминоксидаза головного мозга (1), печени (3); низкоаффинная аминоксидаза головного мозга (2), печени (4).



Компонент среды	Активность МАО, нмоль бензиальдегида на 1 мг белка в минуту	% от контроля	$p$ (отличия от контроля)
Контроль (0,011 М Na-фосфатный буфер pH 7,4)	0,21 ± 0,01	100	—
Fe <sup>2+</sup> (50 мкМ)	0,21 ± 0,004	100	>0,5
Аскорбиновая кислота (0,5 мМ)	0,21 ± 0,01	100	>0,5
Fe <sup>2+</sup> (50 мкМ) + аскорбиновая кислота (0,5 мМ)	0,18 ± 0,01	85,7	<0,05

Примечание. Источником МАО служил объединенный гомогенат мозга от 10 мышей.

бензиламина от липидного окружения (см. таблицу). Представленные данные свидетельствуют о том, что в среде индукции ПОЛ в отличие от ее отдельных компонентов снижает активность МАО до 86 % от контроля, т. е. до величины, сопоставимой с результатами работы [5], где показано снижение активности МАО-Б всего на 20 % при экстенсивном делиидировании митохондрий, приводящем к угнетению МАО-А на 93 %.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Горкин В. З. Аминоксидазы и их значение в медицине. — М., 1981.
2. Buffoni F., Igenes G. // Biochem. J. — 1975. — Vol. 145. — P. 369—372.
3. Buffoni F. // J. Pharm. Pharmacol. — 1984. — Vol. 36, Suppl. 21.
4. Dembiec D., MacNamee D., Cohen G. // J. Pharmacol. Exp. Ther. — 1976. — Vol. 197. — P. 332—339.
5. Ekstedt B., Orelund L. // Biochem. Pharmacol. — 1976. — Vol. 25. — P. 119—124.
6. Goa J. // Scand. J. Clin. Lab. Invest. — 1953. — Vol. 5. — P. 218—222.
7. Hoffmann J. P., Richterich R. // Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. — 1970. — Bd 8. — S. 595—598.
8. Houslay M. D., Tipton K. F. // Biochem. J. — 1973. — Vol. 135. — P. 735—750.
9. Jain M., Sands F., Von Kroff R. W. // Analyt. Biochem. — 1973. — Vol. 52. — P. 542—554.
10. Lyles G. A., Callingham B. A. // J. Pharm. Pharmacol. — 1975. — Vol. 27. — P. 682—691.
11. Parkinson D., Lyles G. A., Brown B. J., Callingham B. A. // J. Pharm. Pharmacol. — 1980. — Vol. 32. — P. 844—850.
12. Popov N., Rosler V., Thiemann Chr., Matthes H. // Acta Biol. Med. Germ. — 1971. — Bd 26. — S. 239—245.
13. Racker E. // Methods in Enzymology / Eds S. P. Colowick, N. O. Kaplan. — New York, 1955. — Vol. 1. — P. 514.
14. Southgate J., Collins G. G. S. // Biochem. Pharmacol. — 1969. — Vol. 18. — P. 2285—2287.
15. Turski W., Turska E., Gross-Bellard M. // Enzyme. — 1972/1973. — Vol. 14. — P. 211—220.
16. Yu P. H., Bailey B. A., Durden D. A. // Analyt. Biochem. — 1986. — Vol. 152. — P. 160—166.
17. Wills E. D. // Biochim. Biophys. Acta. — 1965. — Vol. 98. — P. 238—251.

Поступила 22.05.89

#### SPECTROPHOTOMETRIC ASSAY OF MAO ACTIVITY USING BENZYLAMINE AS A SUBSTRATE

I. A. Volchegorsky, N. A. Skobeleva, R. I. Lifshilz

Chair of Biochemistry, Medical School, Chelyabinsk

Modified assay of MAO activity with benzylamine as a substrate is described. The method is based on trapping benzaldehyde product of MAO-reaction by semicarbazide, introduced in samples in 0.6 N perchloric acid after the incubation period. Advantages and disadvantages of semicarbazide presence in incubation medium are discussed. Additional control containing  $10^{-3}$  mol/L semicarbazide was required during incubation.

Л. М. Поляков, О. Н. Потеряева, Л. Е. Панин

#### ОПРЕДЕЛЕНИЕ АПОПРОТЕИНА А-1 МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Институт биохимии Сибирского отделения АМН СССР, Новосибирск

Основным белком липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) сыворотки крови является апопротеин А-1 (апоА-1). Функциями апоА-1 являются «обратный» транспорт холестерина в печень [2, 5, 15], обеспечение рецепторного узнавания ЛПВП гепатоцитами [22], фибробластами [7], клетками эндотелия [20] и стероидирулирующих тканей [9]; активация лецитинхолестеринацилтрансферазы [8]. Показано, что апоА-1 является стабилизирующим фактором простациклина [23]. Предполагается, что простациклин играет важную роль в образовании тромбов. Концентрация апоА-1 в сыворотке крови отрицательно коррелирует с кардиоваскулярными нарушениями [3, 6]. Антиатерогенная роль апоА-1 свидетельствует, что своевременное определение его содержания в крови может быть важным для диагностики.

Существует несколько иммунохимических методов определения апоА-1: радиальная иммунодиффузия, ракетный иммуноэлектрофорез, радиоиммунологический и иммуноферментный анализы (РИА и ИФА). Первые два метода недостаточно высокочувствительны, не поддаются автоматизации, требуют много антисыворотки. РИА и ИФА по чувствительности одинаковы, однако ИФА имеет ряд преимуществ: нет контакта исследователя с радиоактивными веществами, стабильность конъюгатов позволяет использовать их в течение длительного времени, колориметрирование проб требует меньше затрат, чем подсчет радиоактивности [1].

Мы применили непрямой твердофазный ИФА для количественного определения апоА-1 в сыворотке крови. С этой целью была проведена оптимизация метода, включающая идентификацию полученных антигена и антител, выбор рабочих режимов использования компонентов и конъюгатов, а также изучено влияние различных способов предварительной обработки сыворотки крови для более полного выявления антигенных детерминант апоА-1.

Методика. Препаративное выделение ЛПВП из сыворотки крови осуществляли в растворах KBr [10] в присутствии 0,005 М ЭДТА-Na<sub>2</sub> на центрифуге "Beckman L-75" с использованием ротора 75 Ti. Полученные ЛПВП (плотность 1,063—1,21 г/мл) диализовали в течение 48 ч при 4 °С против 0,15 М NaCl, содержащего 0,005 М ЭДТА-Na<sub>2</sub>, pH 7,4. Делипидирование проводили охлажденной смесью хлороформ—метанол (2 : 1) с последующей многократной отмывкой эфиром. АпоА-1 получали методом гель-фильтрации на сефарозе 4В («Фармация», Швеция) в 0,01 М трис-HCl-буфере, содержащем 6 М мочевины, pH 8,6. Пик II, соответствующий апоА-1, повторно очищали путем ионообменной хроматографии, используя прочный анионообменник DEAE-Toyorearl 650 M (TSK, Япония), уравновешенный 0,01 М трис-HCl с 6 М мочевиной, pH 8,6. Элюирование проводили исходным буфером с линейным градиентом NaCl от 0 до 0,5 М.

Проверку чистоты апоА-1 осуществляли путем электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) с додецилсульфатом натрия [12]. АпоА-1 мигрировал в геле одной полосой как

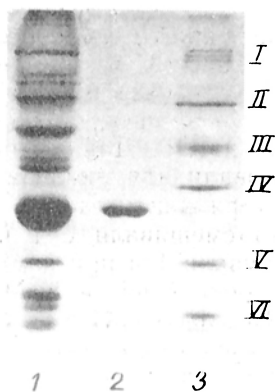


Рис. 1. Электрофоретическое исследование апоА-I в ПААГ (12,5 %) по Лэммли [12].

I — суммарные апо-ЛПВП; 2 — апоА-I после хроматографической очистки, белковые полосы визуализированы 0,1 % Кумаси Г-250 в смеси этанола и 10 % уксусной кислоты (1:1); 3 — низкомолекулярные белки-стандарты («Фармация», Швеция): I — фосфолипаза 94 000, II — альбумин 67 000, III — овальбумин 43 000, IV — карбоангидраза 30 000, V — ингибитор трипси-на 20 100, VI — лактальбумин 14 400.

гомогенный белок с мол. массой 28 000 (рис. 1). Концентрацию белка определяли по Лоури [14], используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта.

Для получения антисыворотки кроликам подкожно вводили раствор апоА-I в разные точки верхней части спины. Первую иммунизацию проводили с полным адьювантом Фрейнда. Каждому кролику вводили смесь 0,5 мл антигена (100 мкг) с 0,5 мл полного адьюванта Фрейнда. Последующие 2 иммунизации проводили через 10 дней тем же количеством антигена с неполным адьювантом Фрейнда. Последняя иммунизация — внутривенное введение раствора апоА-I без адьюванта. Гаммаглобулиновую фракцию получали из сыворотки крови 3-кратным осаждением 50 %  $(NH_4)_2SO_4$  с последующим диализом против 0,01 М фосфатного буфера рН 7,4, содержащего 0,15 М NaCl и 0,1 % азида натрия. Конечный этап очистки антител включал ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-сефарозе («Фармация», Швеция). Полученные антитела хранили в замороженном виде при  $-20^\circ C$ . Для идентификации антител использовали реакцию двойной радиальной иммунодиффузии [17]. В последующих экспериментах специфичность антител определяли с помощью непрямого метода ИФА или иммуноэлектроблоттинга [21].

Количество апоА-I в сыворотке крови определяли методом непрямого ИФА [13]. Полистироловые планшеты («Nunc», Дания) инкубировали в течение ночи при  $4^\circ C$  (или 1 ч при  $37^\circ C$ ) со 100 мкл раствора апоА-I, содержащего 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 нг белка в 0,01 М фосфатно-солевом буфере (ФСБ). После инкубации планшеты трижды отмывали в ФСБ, содержащем 0,05 % твин-20 (ФСБТ). Незанятые места сорбции блокировали 10 % бычьей сывороткой. В подготовленные таким образом планшеты добавляли по 100 мкл специфических антител в разведении 1:3000 в 0,01 М ФСБТ. Связавшиеся с апоА-I первые антитела на следующем этапе насыщались вторыми антителами. Для этого использовали козы антитела к IgG кролика, меченные пероксидазой («Sigma», США), которые добавляли в количестве 100 мкл в каждую ячейку (разведение 1:1000 в ФСБТ). Планшеты инкубировали 1 ч при  $37^\circ C$ . После 5-кратного отмывания ФСБТ проводили ферментативную реакцию. В ячейки вносили по 200 мкл свежеприготовленного субстрата — о-фенилендиамина («Merk», ФРГ) в концентрации 20 мг/100 мл в 0,1 М фосфатно-цитратном буфере рН 5,0, содержащем 0,006  $H_2O_2$ . Через 15 мин ферментативную реакцию останавливали добавлением 50 мкл 10 н.  $H_2SO_4$  и измеряли экстинцию при длине волны 492 нм на многоканальном фотометре Multiscan («Flow», Англия). В качестве отрицательного контроля принимали значение оптической плотности в ячейках, в которые вместо антигена добавляли по 100 мкл ФСБ.

Опыты проводили на крысах-самцах Вистар массой 180—200 г. В качестве модели функционального напряжения организма использовали 3-часовое плавание в аквариуме с грузом, составляющим 4 % от массы тела, при температуре воды  $33^\circ C$ . Анализировали также состояние животных через 6 ч после плавания.

**Результаты и обсуждение.** Полученные кроличьи антитела к апоА-I крыс были охарак-

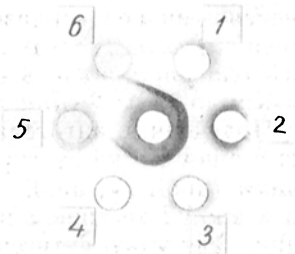


Рис. 2. Двойная радиальная иммунодиффузия.

В центре — антитела к апоА-I крыс, 1 — апоА-I крыс, 2 — ЛПВП крыс, 3 — цельная сыворотка крыс, 4 — сыворотка крыс, не содержащая липопротеиды, 5 — ЛПВП человека, 6 — апоА-I человека.

теризованы с помощью двойной иммунодиффузии по Оухтерлони. На рис. 2 видно, что антитела давали 1 полосу преципитации с апоА-I, изолированными ЛПВП крыс, сывороткой крови крыс и сывороткой крови крыс, не содержащей липопротеиды. Отсутствовала преципитация с ЛПВП человека, а также с апоА-I из сыворотки крови человека, что свидетельствует об иммунохимической гетерогенности апоА-I человека и крысы. Обращает внимание четкая полоса преципитации с сывороткой после ультрацентрифугирования, не содержащей липопротеиды. Это подтверждает наличие «свободного» пула апоА-I, убедительно продемонстрированного методом перекрестного иммуоэлектрофореза [16].

Моноспецифичность полученных нами антител была показана с помощью иммуноблоттинга, по чувствительности значительно превосходящего метод Оухтерлони (рис. 3). Для этого апо-ЛПВП крыс были разделены с помощью электрофореза в 12,5 % ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия. Затем белки электрофоретически переносились на нитроцеллюлозную бумагу (Schleicher, Schuell; диаметр пор 0,45 мкм) «полусухим методом» с использованием плоских угольных электродов. На нижнее графитовое плато, служащее анодом, укладывался сэндвич — фильтровальная бумага, нитроцеллюлозная бумага, гель, фильтровальная бумага. Сверху сэндвич закрывался графитовым плато, являющимся катодом. Перенос белков осуществляли в течение 1 ч при силе тока 0,8 мА на  $1\text{ см}^2$  геля и напряжении 8—14 В. Блокировку проводили 0,01 М ФСБ, содержащим 1 % БСА. После отмывки бумаги ФСБТ ее инкубиро-

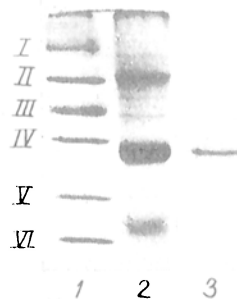


Рис. 3. Выявление специфичности антител с помощью иммуноблоттинга.

I — низкомолекулярные белки-стандарты (см. рис. 1); 2 — суммарные апо-ЛПВП (окраска Кумаси Г-250); 3 — электрофоретический перенос апо-ЛПВП на нитроцеллюлозную бумагу (обработка анти-апоА-I-антителами, окраска 4-хлор-1-нафтолом).

вали с первыми антителами 1 : 3000, а затем со вторыми, меченными пероксидазой. Для выявления последней готовили следующий раствор: 8 мг 4-хлор-1-нафтола растворяли в 0,5 мл метанола, доводили объем до 20 мл ФСБ и добавляли 10 мкл 33 %  $H_2O_2$ . Полученные антитела взаимодействовали только с апоА-1 и не реагировали с другими апопротеинами (апоА-IV, апоЕ, апоС).

Антитела к апоА-1 тестировали с помощью непрямой ИФА. Для этого антиген сорбировали на планшет в избыточной концентрации 1 мкг/мл в ФСБ pH 7,4 в течение ночи при 4 °С. Образцы антител титровали при последовательном 2-кратном разведении буфером, содержащим 0,05 % твин-20 и 0,5 % БСА. Планшеты инкубировали 1 ч при 37 °С. Конечный титр антител был достаточно высок — 1 : 600 000—1 : 800 000. В наших условиях было найдено оптимальное количество антител — 5 мкг/мл или разведение 1 : 2000—1 : 3000 (рис. 4).

Ранее были выявлены различия в количественной оценке апоА-1 при взаимодействии антисыворотки с изолированными ЛПВП, рекомбинантами ЛПВП и плазмой крови. Оказалось, что не все эпитопы апоА-1 присутствуют на поверхности ЛПВП [19]. С помощью моноклональных антител у апоА-1 обнаружили 3 антигенные детерминанты [18]. Две из них располагались соответственно на N- и C-концевом фрагменте молекулы. S-концевая детерминанта равномерно располагалась на поверхности ЛПВП и встречалась в 3 раза чаще, чем N-концевая детерминанта. Третья детерминанта зависела от температуры и была отнесена к конформационной. Использование поликлональных антител дает определенные преимущества — возможность количественно оценивать апоА-1 по совокупности различных антигенных детерминант.

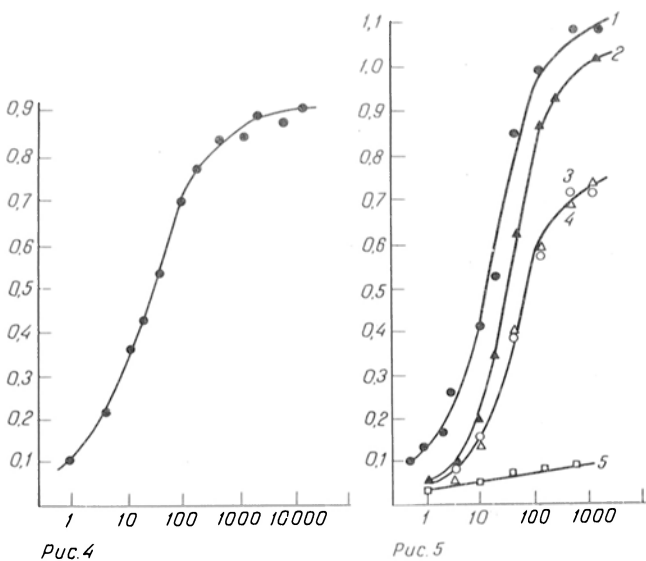


Рис. 4. Кривая титрования антител к апоА-1.

Здесь и на рис. 5: по оси ординат — поглощение при 492 нм; по оси абсцисс — количество белка (в нг) в одной ячейке.

Рис. 5. Кривые титрования стандартного раствора апоА-1 (1); цельной сыворотки крысы, обработанной ТММ (2); сыворотки без обработки (3); сыворотки, нагретой до 52 °С (4). Неспецифическое связывание с БСА (5).

Каждая точка — среднее значение 3 параллельных измерений.

Для выявления апоА-1 сыворотку нагревали до 52 °С в течение 3 ч или обрабатывали 1,1, 3,3-тетраметилмочевинной (ТММ), как описано в работе [11]. Преимущества второго способа представлены на рис. 5. Данный прием в дальнейшем использовали для анализа сыворотки с неизвестным содержанием апоА-1. Для этого 1 часть сыворотки смешивали с 1 частью ТММ. Раствор выдерживали 1 ч при комнатной температуре и добавляли 2 части 8 М мочевины в 0,01 М трис-НСl-буфере pH 8,6. Обработанные таким образом стандарты апоА-1 и сыворотки использовали для приготовления рабочих разведений. На рис. 5 показана стандартная кривая с очищенным апоА-1, выделенным из сыворотки крови крыс. Рабочий режим метода приходился на линейный участок кривой от 5 до 100 нг. Параллельная кривая была получена с цельной сывороткой крыс, обработанной ТММ. Сыворотка крыс без добавления ТММ, а также сыворотка, подвергнутая нагреванию (на рис. 5 представлены одной кривой), давали более низкие значения содержания апоА-1 (70 %). Таким образом, добавление к сыворотке крыс ТММ приводило к увеличению доступности эпитопов апоА-1 при взаимодействии их с антителами. Оптимальное рабочее разведение сыворотки колебалось от 1:1000 до 1:3000.

Содержание апоА-1 в сыворотке крови крыс, определенное этим методом, составляло  $407 \pm 16$  мг/л. Данным методом мы определяли также содержание апоА-1 у крыс после интенсивной физической нагрузки. Обнаружено достоверное увеличение содержания апоА-1 до  $592 \pm 32$  мг/л. В период восстановления количество апоА-1 в сыворотке крови снижалось до  $418 \pm 11$  мг/л. Полученные результаты указывают на высокую скорость обмена апоА-1 и подтверждают полученные нами ранее данные, согласно которым интенсивная физическая нагрузка способствует активной утилизации транспортных форм липидов и сдвигу липопротеидного спектра в сторону ЛПВП [4].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Дзангиев Б. Б. // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева.— 1982.— Т. 27. № 4.— С. 82—89.
2. Климов А. И. // Дислиппротеидемии и ишемическая болезнь сердца / Под ред. Е. И. Чазова, А. Н. Климова.— М., 1980.— С. 10—25.
3. Ноева Е. А., Перова Н. В., Герасимова Е. И. и др. // Кардиология.— 1985.— № 2.— С. 46—51.
4. Панин Л. Е. // Энергетические аспекты адаптации.— М., 1978.— С. 91—104.
5. Репин В. С., Антонов А. С., Преображенский С. И. и др. // Бюл. ВКНЦ АМН СССР.— 1985.— № 1.— С. 19—34.
6. Avogaro P., Cazzolato G., Bottolo B. G. et al. // Lancet.— 1980.— Vol. 28.— P. 901—903.
7. Biesbroeck R., Oram J. F., Albers J. J., Bierman E. I. // J. Clin. Invest.— 1983.— Vol. 71.— P. 525—539.
8. Fielding C. J., Shore V. G., Fielding P. E. // Biochem. Biophys. Res. Commun.— 1972.— Vol. 46.— P. 1493—1498.
9. Glass C., Pittman R. C., Civen M., Steinbrg D. // J. Biol. Chem.— 1985.— Vol. 260.— P. 744—750.
10. Hatch F. T., Lees R. S. // Advanc. Lipid Res.— 1968.— Vol. 6.— P. 2—68.
11. Koritnik D. L., Rudel L. // J. Lipid Res.— 1983.— Vol. 24.— P. 1639—1645.
12. Laemli U. K. // Nature.— 1970.— Vol. 227.— P. 680—685.
13. Lin R. C. // Anal. Biochemistry.— 1986.— Vol. 154.— P. 316—326.

14. Lowri O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randal R. J. // J. Biol. Chem.— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
15. Miller N. E., La Ville A., Crook D. // Nature.— 1985.— Vol. 314.— P. 109—111.
16. Neary R. H., Golland E. // Clin. Chim. Acta.— 1988.— Vol. 171.— P. 239—246.
17. Ouchterlony O. // Progr. Allergy — 1958.— Vol. 5.— P. 1—77.
18. Petit E., Ayrault-Jarrier M., Pastier M., Pastier D. et al. // Biochem. biophys. Acta.— 1987.— Vol. 919.— P. 287—296.
19. Schonfeld G., Chen J. S., Roy R. G. // J. Biol. Chem.— 1977.— Vol. 252.— P. 6655—6659.
20. Tauber J.— P., Goldmiz D., Gospodarowicz D. // Europ. J. Biochem.— 1981.— Vol. 119.— P. 327—339.
21. Tovey E., Baldo A. // Electrophoresis.— 1987.— Vol. 8.— P. 384—387.
22. Van Berkel T. J. C., Kruijt J. K., T. van Gent, A. Van Tol. // Biochem. Biophys. Res. Commun.— 1980.— Vol. 92.— P. 1002—1008.
23. Yui Y. T., Aoyama T., Morishita H. et al. // J. Clin. Invest.— 1988.— Vol. 82.— P. 803—807.

Поступила 29.06.89

#### ESTIMATION OF APOPROTEIN A-I USING IMMUNOENZYMATIC ASSAY

L. M. Polyakov., O. N. Poteryaeva, L. E. Panin

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

Indirect solid-phase immunoenzymatic assay was improved and adapted for quantitative estimation of apo A-I in blood serum. Immunochemical identification of apo A-I was carried out and specific antibodies were obtained. Various procedures of blood serum pretreatment affected dissimilarly the detection of antigenic determinants in apo A-I. Presence of tetramethyl urea in blood serum increased by 30% the latent antigenic determinants accessibility.

© Е. И. КИСЕЛЬГОФ, 1991

УДК 612.461:577.123.3].06:612.66/87

Е. И. Кисельгоф

#### О КОРРЕКТНОСТИ ОЦЕНКИ ЭКСКРЕЦИИ С МОЧОЙ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ У КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА

Институт биофизики Минздрава СССР, Москва

Широкое изучение системы циклических нуклеотидов в норме и при патологических состояниях вызывает необходимость сопоставления получаемых данных. Однако в литературе встречаются различные способы выражения результатов исследования, в частности экскреции цАМФ и цГМФ с мочой: на весь объем суточной мочи, на единицу массы тела и мочи, на единицу креатинина [1, 8, 9]. При этом, как правило, отсутствует обоснование применяемых способов расчета. Настоящее исследование предпринято с целью подбора корректной оценки экскреции с мочой цАМФ и цГМФ у половозрелых разновозрастных крыс.

**Методика.** Крыс-самцов линии Вистар 2—6-месячного возраста обследовали ежемесячно в весенний сезон (I серия), в осенне-зимний (II серия) и в летний сезон (III серия). Животных содержали на стандартном рационе питания, предусмотренном приказом Минздрава СССР № 1179 от 10.03.83 г. Для сбора мочи крыс помещали на 1 сут в индивидуальные обменные клетки без еды, потребление воды не ограничивали. Суточную мочу собирали при комнатной температуре в пробирки, куда предварительно вносили 30—50 мкл смеси хлороформ — вода (1:2), после фильтрования добавляли триэ-ЭДТА-НСI-буфер (50 мМ — 4 мМ — 2 М) pH 7,5 в

количестве 1% от объема мочи. Аликвоты мочи хранили в замороженном состоянии при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Содержание креатинина определяли при помощи наборов фирмы «Lachema» (Чехословакия), циклических нуклеотидов — радиоиммунологическими методами при помощи наборов фирмы «Amersham» (Великобритания). При статистической обработке материала использовали вычисление средних арифметических, ошибок средних, а также корреляционный, регрессионный и двухфакторный анализ.

**Результаты и обсуждение.** Выявлено, что характер изменения содержания в моче циклических нуклеотидов по экскреции за 1 сут по мере роста крыс различался в разных сериях: у крыс I и II серий экскреция цАМФ постепенно увеличивалась, а у животных III серии наблюдалось ее снижение в 2,4 раза через 1 мес от начала эксперимента с последующим возвращением к исходному уровню. Содержание цАМФ в суточной моче в первый срок исследования (2-месячный возраст) резко различалось у крыс разных серий (см. таблицу). Суточная экскреция цГМФ у крыс разного возраста практически не различалась, лишь у животных I серии наблюдалось некоторое увеличение содержания указанного нуклеотида в моче 5- и 6-месячных крыс.

Полученные данные о величине экскреции цАМФ и цГМФ с мочой у интактных крыс и закономерности изменения этих показателей с возрастом согласуются с имеющимися данными литературы [8, 9]. В клинических исследованиях показано, что экскреция цАМФ коррелирует с экскрецией креатинина и поверхностью тела [6], что нашло подтверждение и в наших исследованиях. Отмечена положительная корреляция между массой тела и экскрецией креатинина ( $r=0,71 \pm 0,08$ ;  $p<0,001$ ), экскрецией цАМФ и экскрецией креатинина ( $r=0,82 \pm 0,05$ ;  $p<0,001$ ), экскрецией цАМФ и массой тела ( $r=0,59 \pm 0,08$ ;  $p<0,001$ ) (рис. 1). В связи с этим расчет содержания цАМФ в моче на единицу креатинина или массы сглаживает различия в экскреции этого нуклеотида при увеличивающейся массе тела (см. таблицу). Для цГМФ корреляция с экскрецией креатинина была значительно слабее ( $r=0,41 \pm 0,09$ ;  $p<0,001$ ), а с массой не выявлялась ( $r=0,1 \pm 0,1$ ;  $p>0,05$ ), поэтому выражение экскреции цГМФ на единицу массы или креатинина приводило к постепенному снижению этого показателя с возрастом (см. таблицу).

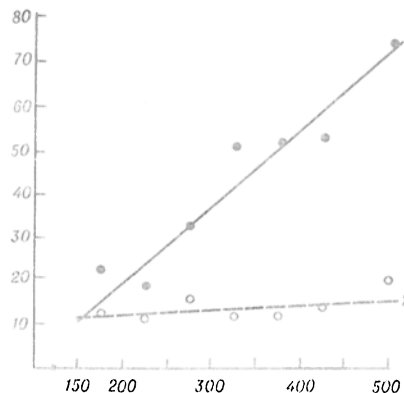


Рис. 1. Зависимость экскреции циклических нуклеотидов от массы тела крыс.

По оси абсцисс — масса, г; по оси ординат — содержание в суточной моче цАМФ (1) и цГМФ (2), нмоль.



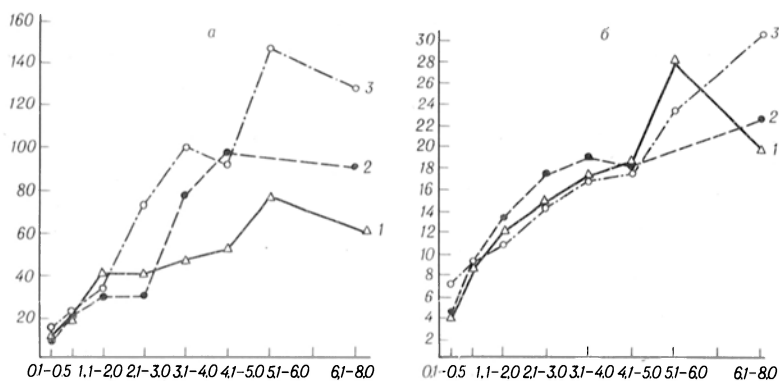


Рис. 3. Влияние величины суточного диуреза и массы тела на экскрецию цАМФ (а) и цГМФ (б) с мочой у крыс.

По осям абсцисс — объем мочи, мл; по осям ординат — содержание циклических нуклеотидов в суточной моче, μмоль. Диапазоны массы: 1 — 100—200 г, 2 — 201—300 г, 3 — 301—500 г.

мочой. Отсутствие существенной значимости массы для экскреции цГМФ, скорее всего, обусловлено тем, что мышцы не являются источником цГМФ.

Связь экскреции циклических нуклеотидов с величиной диуреза изучена недостаточно. Есть указание на отсутствие увеличения выделения циклических нуклеотидов при полиурии, вызванной нагрузкой декстрозой [7], в то же время другими авторами обнаружена позитивная корреляция между экскрецией цГМФ и объемом мочи [9]. Считается, что механизмом почечного клиренса цАМФ и цГМФ, как и креатинина, является простая клубочковая фильтрация [5]. Поэтому в норме любые колебания диуреза сопровождаются реципрокным изменением концентрации этих соединений в моче. Действительно, в нашем эксперименте при малых объемах суточной мочи (0,1—0,5 мл) концентрация цАМФ и цГМФ у крыс с диурезом 1 мл возрастала в 2,2 раза по сравнению с таковой у крыс с диурезом больше 2 мл. Тем не менее общее количество экскретируемых циклических нуклеотидов было снижено в 4 раза.

Вряд ли можно думать, что редукция экскреции циклических нуклеотидов у интактных животных при малом диурезе обусловлена почечной патологией. Мы не исключаем неточности в определении объема мочи из-за ее испарения. Однако следует думать о возможности выделения этих веществ экстракренальным путем, например через потовые железы. Есть сведения, что в составе пота выделяются те же азотистые вещества, которые содержатся в моче: мочевины, мочевая кислота, креатинин, аминокислоты и даже полипептиды [2]. Уровень креатинина в моче крыс также снижался при малых объемах и составлял  $10,9 \pm 1,6$  мкмоль при диурезе 0,1—0,5 мл, в то время как при диурезе 1—2 мл он равнялся  $31,3 \pm 4,3$  мкмоль. Несмотря на то что явление реабсорбции для циклических нуклеотидов не установлено [5], трудно исключить и этот фактор при анализе полученных данных, так как разумеется, потери низкомолекулярных компонентов с потом невелики. Окончательное решение вопроса возможно лишь при параллельном исследовании плазмы крови и мочи.

Приведенные материалы свидетельствуют о том, что в качестве значения «нормы» для суточной экскреции циклических нуклеотидов с мочой у крыс должна приниматься референтная величина, получаемая с учетом влияния различных факторов, в частности массы тела и диуреза. Это особенно важно в случае необходимости решения вопроса об отклонении показателей от нормы в ст-

дельных случаях. Выражение экскреции циклических нуклеотидов в виде концентрации в 1 мл на 100 г массы животного в какой-то мере учитывает влияние обоих факторов. Сравнение показателей, рассчитанных таким образом, в первом приближении свидетельствует о том, что по мере роста крыс уровень цАМФ в организме не изменяется, а содержание цГМФ снижается. Такой вывод согласуется с общепринятым мнением об уменьшении пролиферативной способности клеток с возрастом [5]. Для оценки соотношения цАМФ- и цГМФ-зависимого метаболизма корректным и надежным критерием является соотношение между цАМФ и цГМФ. В условиях патологии значимость этого соотношения возрастает [4].

Таким образом, в настоящем исследовании установлено, что у крыс 2—6-месячного возраста из 2 изученных факторов величина диуреза оказывает на экскрецию циклических нуклеотидов более существенное влияние, чем масса тела животного. Выбор способа выражения экскреции циклических нуклеотидов должен определяться целями исследования, тем не менее очевидно, что все виды расчета дополняют друг друга. Для практического использования предложенных подходов к расчетам экскреции циклических нуклеотидов в эксперименте можно рекомендовать составление уравнений регрессии для каждой совокупности данных, полученных для интактных крыс, принимая во внимание массу тела и величину диуреза.

Выражаю благодарность Б. В. Сидиной за техническую помощь.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Костикова С. П., Малыгина Л. С., Федоров М. О. // Укр. биохим. журн.— 1976.— Т. 48, № 4.— С. 447—449.
2. Косяков К. С. // Клин. биохим.— Л., 1967.— С. 289.
3. Соколова Т. И., Романцев Е. Ф. // Биологические науки.— М., 1988.— № 8.— С. 5—12.
4. Федоров И. А. Биологическое и клиническое значение циклических нуклеотидов.— М., 1979.
5. Broadus A. E., Kaminski N. I., Hardman I. G. et al. // J. clin. Invest.— 1970.— Vol. 49, N 12.— P. 2222—2236.
6. Gennari C., Galli M., Montagnani M. // J. clin. Path.— 1976.— Vol. 29.— P. 69—72.
7. Hardman J. H., Davis I. W., Sutherland E. W. // J. biol. Chem.— 1969.— Vol. 244, N 23.— P. 6354—6362.
8. Murad F., Kimura H., Hopkins H. A. et al. // Science.— 1975.— Vol. 190.— N 1209.— P. 58—60.
9. Steel L. K., Rafferty M. A., Wolfe W. W. et al. // Int. J. Radiat. Biol.— 1986.— Vol. 50, N 4.— P. 695—715.
10. Wehmann R. E., Blonde L., Steiner A. // J. clin. Invest.— 1974.— Vol. 53.— P. 173—179.