

Том 37

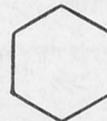
ВЫПУСК 3

МАЙ — ИЮНЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

# ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

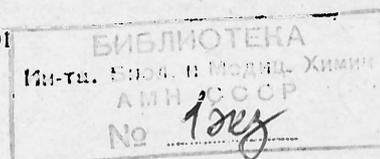
Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. А. ТУТЕЛЬЯН (зам. редактора), А. И. АРЧАКОВ, И. П. АШМАРИН, Т. Т. БЕРЕЗОВ,  
Ю. В. БУКИН, А. В. ВАСИЛЬЕВ, Е. Н. ГЕРАСИМОВА, В. З. ГОРКИН, И. Б. ЗБАРСКИЙ,  
В. Л. 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:

БЛЕВ 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)



© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 612.112.95.015:547.922].06:612.397.81].08

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

### ЭСТЕРИФИКАЦИЯ ОКИСЛЕННЫХ ПРОДУКТОВ ХОЛЕСТЕРИНА И ИХ ВЛИЯНИЕ НА СКОРОСТЬ ЭСТЕРИФИКАЦИИ ХОЛЕСТЕРИНА В МАКРОФАГАХ

Институт терапии Сибирского отделения АМН СССР, Новосибирск

Окисленные производные холестерина (ХС) широко распространены в пищевых продуктах животного происхождения, особенно в тех, которые подвергаются сублимации и термической обработке в процессе приготовления пищи [21]. Наряду с этим известно, что коммерческий ХС, используемый для воспроизведения классической холестериневой модели атеросклероза, окисляется на воздухе и может содержать до 5 % окислов ХС [2, 3]. Введение экспериментальным животным окисленных продуктов ХС вызывает изменения в сосудах, сопровождающиеся массивными повреждениями эндотелия и сильным кальцинозом [8, 13, 17]. Исследования на гладкомышечных и эндотелиальных клетках сосудов позволили выделить среди широкого спектра стероидов 25-гидрокси-ХС, холестан-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -триол и 7-кето-ХС как наиболее токсичные соединения [9, 16, 18].

Многочисленные наблюдения позволяют полагать, что атерогенность окисленных продуктов ХС наряду с цитотоксичностью вызвана их воздействием на ключевые реакции холестеринového обмена в клетках [2, 3, 6, 7, 12, 15]. Так, установлена способность некоторых окисленных форм ХС в низких концентрациях стимулировать активность ацил-КоА-холестерол-о-ацилтрансферазы (АХАТ) [7, 10, 14]. Это может иметь прямое отношение к высокой скорости эстерификации свободного ХС (СХС) и накоплению массивных количеств эфиров ХС (ЭХС) в пенистых клетках, образующихся из макрофагов (МФ) в процессе развития атеросклероза [22]. Вместе с тем известно лишь два сообщения о возможности эстерификации 25-гидрокси-ХС с участием АХАТ в гепатоцитах [7] и микросомах печени [10] крыс.

Целью настоящей работы явилось исследование принципиальной возможности эстерификации некоторых окисленных продуктов ХС, полученных при длительной термической обработке ХС, и изучение их влияние на эстерификацию СХС в культивируемых МФ.

Методика. 4-<sup>14</sup>C-СХС («Amersham», Англия) с удельной радиоактивностью 50 мКи/ммоль и СХС («Sigma», США) помещали в стеклянные чашки Петри и подвергали термической обработке на воздухе при 60 °С в течение 5 нед [19]. Полученные окисленные производные СХС разделяли тонкослойной хроматографией на силикагеле Н в системе растворителей этилацетат — гептан в объемном соотношении 1:1 с использованием соответствующих стандартов [19]. Во фракции холестан-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -триола ( $R_f=0-0,2$ ), смеси 7 $\alpha$ , 7 $\beta$ -гидрокси-ХС ( $R_f=0,2-0,45$ ), 25-гидрокси-ХС ( $R_f=0,45-$

0,65), ХС ( $R_f=0,65-0,85$ ) и неидентифицированных стероидов ( $R_f=0,85-1,0$ ) определяли радиоактивность в сцинтилляторе на основе толуола (4 г ППО и 0,3 г ППОП в 1 л толуола) в жидкостном сцинтилляционном счетчике «Марк-3» (США). Содержание окисленных производных СХС выражали в процентах от общей радиоактивности смеси окисленного 4-<sup>14</sup>C-СХС. Меченые и немеченые окисленные производные ХС получали экстракцией из силикагеля смесью хлороформ — метанол в объемном соотношении 2:1 [19], органический растворитель удаляли под вакуумом и сухой остаток хранили при температуре -20 °С не более 2 нед. Связывание 1-<sup>14</sup>C-олеата («Amersham», Англия) удельной радиоактивностью 56 мКи/ммоль со свободным от жирных кислот бычьим сывороточным альбумином — БСА («Sigma», США) осуществляли, добавляя по каплям 30 мкл раствора олеиновой кислоты в ацетоне к 10 % раствору БСА на 0,05 М фосфатном буфере рН 7,4, 0,15 М ФБС [5]. Удельная радиоактивность связанного 1-<sup>14</sup>C-олеата составляла 4200—8600 имп/мин на 1 нмоль БСА. Растворы стерилизовали фильтрацией через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм.

МФ получали из перитонеальной жидкости 6—8-недельных белых мышей на 5-й день после внутрибрюшинного введения 5 % гликогена в ФБС [23]. 3 мл среды А (среда RPMI-1640 с глутатионом, 20 % эмбриональная сыворотка телят, 100 ЕД гентамицина в 1 мл) вводили в брюшную полость мышей и после забора перитонеальной жидкости клетки собирали центрифугированием (400 g, 10 мин). Осадок ресуспендировали в среде 4 до плотности клеток  $2 \cdot 10^6$  в 1 мл, по 4 мл суспензии вносили в стеклянные чашки Петри диаметром 70 мм и инкубировали в атмосфере CO<sub>2</sub> (5 %) при 37 °С в течение 2 ч. Клеточный монослой отмывали 7 раз по 4 мл средой RPMI-1640 и МФ инкубировали в среде RPMI-1640, содержащей 0,1 % БСА и 100 ЕД/мл гентамицина, в атмосфере CO<sub>2</sub> (5 %) и воздуха (95 %) при 37 °С.

Скорость эстерификации СХС в МФ оценивали по включению (1-<sup>14</sup>C)-олеата в ЭХС в течение 10 ч инкубации [5]. Окисленные продукты СХС и дважды перекристаллизованный в этаноле СХС («Sigma», США) вносили в среду инкубации в 0,1—0,5 % растворе спирта. Прогестерон («Serva», ФРГ) вносили в 0,2 % растворе спирта в объеме 5 мкл в 1 мл среды (10 мкг на 1 мл среды). Экстракцию липидов МФ проводили смесью гексан — изопропанол в объемном соотношении 3:2 [5] и отдельные классы липидов получали методом тонкослойной хроматографии на силикагеле Н [1]. Липидное пятно, соответствующее ЭХС, переносили в сцинтилляционные флаконы и радиоактивность подсчитывали в сцинтилляторе на основе толуола. Результаты выражали в наномолях эстерифицированного олеата на 1 мг клеточного белка.

Исследование эстерификации 4-<sup>14</sup>C-окисленных производных СХС и 4-<sup>14</sup>C-СХС в МФ осуществляли следующим образом. Сухой остаток 4-<sup>14</sup>C-стероидов растворяли в 50 мкл нагретого до 50 °С этанола и добавляли к 500—600 мкл стерильной среды RPMI-1640, содержащей 5 % БСА. Радиоактивность стероидов регистрировали в диоксановом сцинтилляторе. Раствор, содержащий связанные с БСА меченые стероиды, в объеме 200—300 мкл добавляли к 5 мл инкубационной среды и монослой МФ инкубировали в течение 8 ч при 37 °С в атмосфере CO<sub>2</sub> (5 %) и воздуха (95 %). По окончании инкубации клеточный монослой дважды промывали ФБС, содержащим 10 % БСА, и 5 раз — раствором ФБС. Экстракцию липидов из МФ проводили описанным выше способом, органический растворитель удаляли под током азота при 60 °С и разделение стероидов и их эфиров осуществляли методом тонкослойной хроматографии [10] на силикагеле Н в системе растворителей бензол — этилацетат в объемном соотношении 75:25. В соответствии с методикой Лихтенштейна и Брехера [10] силикагель с остатков хроматографической пластинки, соответствующих следующим значениям  $R_f$  стероидов: 0—0,25 — окисленные формы СХС, 0,25—0,3 — СХС, 0,3—0,4 и 0,4—0,5 — моноэфиры 25-гидрокси-ХС, 0,5—0,75 и 0,75—0,8 — диэфиры 25-гидрокси-ХС, 0,8—0,9 и 0,9—0,95 — холестерололеат, 0,95—1,0 — переносили в сцинтилляционные флаконы и радиоактивность подсчитывали в сцинтилляторе на основе толуола. Для рехроматографии стероиды предварительно экстрагировали из силика-

Таблица 1

Количественное соотношение окисленных форм ХС, полученных при его термической обработке

Маркерные стероиды	R <sub>f</sub>	Содержание стероида, % от общей радиоактивности
Холестан-3β,5α,6β-триол	0—0,2	3,05±0,7
Смесь 7α,7β-гидрокси-ХС и 7-кето-ХС	0,2—0,45	3,18±0,8
25-Гидрокси-ХС	0,45—0,65	5,13±2,3
ХС	0,65—0,85	86,89±5,6
Неидентифицируемые стероиды	0,85—1,0	1,75±0,7

Примечание. Представлены средние значения 3 хроматографий.

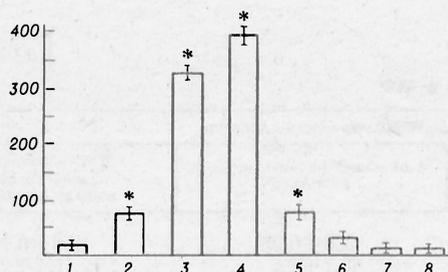
геля [7]. Результаты выражали в имп·мин<sup>-1</sup> на 1 мл клеточного белка в процентах от вводимой в среду инкубации радиоактивности стероидов.

Белок в МФ определяли после экстракции липидов. Для этого в каждую чашку Петри вносили 1,5 мл 0,2 М раствора NaOH и через 2 ч брали аликвоты для определения белка методом Лоури [11].

Данные обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Данные, представленные в табл. 1, свидетельствуют о том, что в процессе термической обработки ХС образуется до 13 % окисленных продуктов ХС. Основным продуктом окисления ХС является 25-гидрокси-ХС, на долю которого приходится 5,13±2,3 % от общей радиоактивности стероидов. Эти данные находятся в соответствии с результатами Пена и соавт. [19] об образовании 5,7±1,9 % 25-гидрокси-ХС из ХС в сходных лабораторных условиях. Вместе с тем результаты, полученные в наших условиях эксперимента, о содержании холестан-3β,5α,6β-триола и смеси 7α-,7β-гидрокси-ХС и 7-кето-ХС в 1,5 и 2 раза соответственно превышают содержание этих соединений в окисленном ХС, указанное в упомянутой выше работе.

Немеченые продукты окисления ХС экстрагировали из силикагеля и исследовали их влияние на скорость включения 1-<sup>14</sup>С-олеата в ЭХС МФ (см. рисунок). Обнаружено, что в присутствии 25 мкг смеси окисленных продуктов ХС и СХС в 1 мл среды скорость эстерификации СХС в МФ повышается в 17 раз, в то время как дважды перекристаллизованный СХС в аналогичных кон-



Влияние окисленных продуктов ХС и дважды перекристаллизованного СХС на включение 1-<sup>14</sup>С-олеата в ЭХС МФ.

По оси ординат — скорость включения 1-<sup>14</sup>С-олеата в ЭХС МФ, нмоль олеата на 1 мг клеточного белка за 10 ч инкубации; по оси абсцисс: 1 — 5 мкл этанола в 1 мл среды RPMI-1640, 2 — СХС 25 мкг/мл среды, 3 — окисленный при 60 °С СХС 25 мкг/мл среды, 4 — 25-гидрокси-ХС 4 мкг/мл среды, 5 — 7α-,7β-гидрокси-ХС и 7-кето-ХС 4 мкг/мл среды, 6 — холестан-3β,5α,6β-триол 4 мкг/мл среды, 7 — СХС 25 мкг/мл среды и прогестерон 10 мкг/мл среды, 8 — 25-гидрокси-ХС 4 мкг/мл среды и прогестерон 10 мкг/мл среды. Стероиды добавляли в 0,1—0,5 % растворе этанола в объеме 5 мкл на 1 мл среды. Звездочка — достоверные различия с контролем (1), p<0,005, n=5.

центрациях стимулирует эстерификацию СХС лишь в 4 раза по сравнению с контролем. При этом включение метки в ЭХС МФ при воздействии смеси окисленных продуктов ХС и СХС в 4—5 раз превышало этот показатель, полученный при воздействии свободного от примесей СХС. Количественное сравнение влияния окисленных производных ХС показывает, что 25-гидрокси-ХС обладает наибольшей способностью стимулировать эстерификацию СХС в МФ. Количественное соотношение включения 1-<sup>14</sup>С-олеата в ЭХС в МФ при воздействии стероидов можно представить, если контрольные значения этого показателя принять за 100 %. При этом скорость эстерификации СХС в МФ в присутствии 25-гидрокси-ХС, смеси стероидов 7α-,7β-гидрокси-ХС, 7-кето-ХС и холестан-3β,5α,6β-триола составит 2028, 428,5 и 127,6 % соответственно. Необходимо отметить, что включение метки в ЭХС при воздействии холестан-3β,5α,6β-триола достоверно не отличается от контрольных величин этого показателя.

Как известно, прогестерон является относительно избирательным ингибитором АХАТ [10] и эстерификации СХС в МФ [5] и при концентрации 10 мкг в 1 мл среды препятствует стимуляции эстерификации СХС в МФ в присутствии 25-гидрокси-ХС и очищенного СХС, снижая включение метки в ЭХС до контрольного уровня (см. рисунок).

Для идентификации образовавшихся эфиров окисленных производных ХС в МФ мы использовали метод тонкослойной хроматографии [10], основанный на том, что более полярные эфиры окисленных форм ХС (R<sub>f</sub> моноэфиры 25-гидрокси-ХС=0,4—0,5, R<sub>f</sub> диэфиров 25-гидрокси-ХС=0,75—0,8) имеют меньшую подвижность на силикагеле, чем неполярные ЭХС (R<sub>f</sub>=0,9—0,95). Как следует из табл. 2, 4-<sup>14</sup>С-СХС эстерифицируется в МФ с образованием холестерололеата (R<sub>f</sub>=0,9—0,95), радиоактивность которого составляет 1,2 % от общей радиоактивности в клетках. При этом радиоактивность в клетках главным образом (88,5 %) представлена СХС (R<sub>f</sub>=0,25—0,3). Иное количественное соотношение стероидов наблюдается при исследовании эстерификации 4-<sup>14</sup>С-25-гидрокси-ХС. 88,24 % радиоактивности ассоциируется в фракцией окисленных производных ХС (R<sub>f</sub>=0—0,25). Во фракциях менее полярных стероидов, имеющих R<sub>f</sub>=0,4—0,5 и 0,75—0,8, обнаружено 7,72 и 1,27 % от общей радиоактивности в клетках соответственно. Для исключения артефакта фракции экстрагировали из силикагеля и подвергали рехроматографии. При этом 96,3 и 86,4 % от экстрагируемой радиоактивности соответственно располагались на хроматограмме аналогичным образом. Полученные результаты свидетельствуют об эстерификации 25-гидрокси-ХС в МФ с образованием моно- и диэфиров стероида. Скорость эстерификации 4-<sup>14</sup>С-25-гидрокси-ХС в 6—7 раз превышала скорость эстерификации 4-<sup>14</sup>С-СХС. Изучение эстерификации смеси 7α-,7β-гидрокси-ХС и 7-кето-ХС показало наличие 0,25 % от общей радиоактивности стероидов в клетках во фракции, имеющей R<sub>f</sub>=0,4—0,5, что указывает на возможность образования эфиров производных ХС, окисленных в положении 7 перигидрофенантенового кольца. Однако для доказательства этой возможности необходимы даль-

Эстерификации (4-<sup>14</sup>C)-окисленных форм ХС и (4-<sup>14</sup>C)-ХС в МФ

Исследуемые 4- <sup>14</sup> C-стероиды	R <sub>f</sub>	Радиоактивность стероидов		
		имп-мин <sup>-1</sup> на 1 мг белка <sup>-1</sup>	% от общей радиоактивности в клетках	% от добавленной радиоактивности в среду инкубации
ХС	0—0,25	96 671±9 076	9,74±0,65	1,17±0,014
	0,25—0,3	791 096±85 957	88,45±10,64	10,6±0,85
	0,4—0,5	1 392±23	0,16±0,007	0,019±0,001
	0,75—0,8	531±29	0,059±0,002	0,007±0,0007
	0,9—0,95	10 978±1 223	1,202±0,03	0,14±0,014
25-Гидрокси-ХС	0—0,25	782 366±46 907	88,24±0,08	22,13±1,5
	0,25—0,3	14 493±298	1,65±0,13	0,41±0,007
	0,4—0,5	67 742±1 374	7,72±0,25	1,74±0,007
	0,75—0,8	11 123±260	1,27±0,1	0,28±0,007
	0,9—0,95	1 341±471	0,15±0,06	0,07±0,007
7α-, 7β-гидрокси-ХС и 7-кето-ХС	0—0,25	938 673±20 911	93,82±0,89	16,35±0,78
	0,25—0,3	33 230±5 335	4,1±0,28	0,62±0,05
	0,4—0,5	5 320±5,7	0,52±0,02	0,09±0
	0,75—0,8	1 366±145	0,13±0,007	0,022±0,003
	0,9—0,95	560±11,3	0,06±0	0,011±0,0007
Холестан-3β, 5α, 6β-триол	0—0,25	690 104±25 906	97,52±0,79	8,5±0,21
	0,25—0,3	8 760±1 834	1,09±0,02	0,10±0,01
	0,4—0,5	227±187	0,027±0,02	0,0026±0,002
	0,75—0,8	20±28,3	0	0
	0,9—0,95	0	0	0

Примечание. Распределение стероидов на хроматограмме: оксистероиды — R<sub>f</sub>=0—0,25, ХС — R<sub>f</sub>=0,25—0,3, моноэфиры 25-гидрокси-ХС — R<sub>f</sub>=0,4—0,5, диэфиры 25-гидрокси-ХС — R<sub>f</sub>=0,75—0,8, холестерололеат — R<sub>f</sub>=0,9—0,95.

нейшие исследования. Согласно результатам, полученным при исследовании 4-<sup>14</sup>C-холестан-3β,5α,6β-триола, 97,5 % от радиоактивности стероида, обнаруженной в МФ, связано с фракцией полярных стероидов (R<sub>f</sub>=0—0,25). Во фракциях менее полярных стероидов (R<sub>f</sub>=0,4—1,0) находятся лишь следовые количества радиоактивности этого стероида, что, вероятно, свидетельствует об отсутствии превращения холестан-3β,5α,6β-триола в его эфиры в МФ.

При дальнейшем исследовании роли АХАТ в эстерификации 25-гидрокси-ХС в МФ было показано, что прогестерон в концентрации 10 мкг/мл среды ингибирует включение 4-<sup>14</sup>C-СХС в ЭХС (R<sub>f</sub>=0,9—0,95) в 15—16 раз (p<0,01) и снижает включение меченного 25-гидрокси-ХС в моноэфиры (R<sub>f</sub>=0,4—0,5) и диэфиры (R<sub>f</sub>=0,75—0,8) стероида в 22 и 33 раза соответственно (p<0,05). При этом включение метки в ЭХС, диэфиры- и моноэфиры 25-гидрокси-ХС составляло 6, 4,4 и 3,3 % соответственно от контрольных величин, принятых за 100 % (см. табл. 2 и 3).

Таким образом, проведенные эксперименты продемонстрировали отчетливо увеличение скорости эстерификации СХС в МФ при воздействии 25-гидрокси-ХС и смеси 7α-,7β-гидрокси-ХС, 7-кето-ХС, а также возможность внутриклеточной эстерификации 4-<sup>14</sup>C-25-гидрокси-ХС со скоростью, превышающей скорость образования ЭХС. Вместе с тем, согласно полученным результатам, холестан-3β,5α,6β-триол не стимулирует эстерификацию ХС и не эстерифицируется в МФ.

Известно, что образование пенных клеток из МФ может сопровождаться 70-кратным увеличением скорости образования ЭХС в сосудистой ткани [4]. В связи с этим одним из механизмов атерогенного воздействия окисленных производных ХС является, вероятно, их участие в накоплении ЭХС в МФ. При этом образование пенных клеток из МФ может не только происходить в результате нерегулируемого захвата модифицированных липопротеидов [22], но являться следствием резкого увеличения скорости эстерификации СХС в клетках. Данное заключение согласует-

Таблица 3

Влияние прогестерона на эстерификацию 4-<sup>14</sup>C-25-гидрокси-ХС и 4-<sup>14</sup>C-ХС в МФ

Исследуемый 4- <sup>14</sup> C-стероид	R <sub>f</sub>	Радиоактивность стероидов		
		имп-мин <sup>-1</sup> на 1 мг белка <sup>-1</sup>	% от общей радиоактивности в клетках	% от добавленной радиоактивности в среду инкубации
ХС	0—0,25	123 976±3 041	11,6±0,25	1,59±0,11
	0,25—0,3	943 480±2 134	88,1±0,4	12,15±1,25
	0,4—0,5	92±92	0,009±0,009	0,001±0,001
	0,75—0,8	0	0	0
	0,9—0,95	658±0,5	0,06±0,0005	0,009±0,0005
25-Гидрокси-ХС	0—0,25	677 072±27 245	97,57±0,75	16,7±0,71
	0,25—0,3	12 413±1 765	1,86±0,36	0,3±0,071
	0,4—0,5	3 050±202	0,43±0,01	0,08±0,006
	0,75—0,8	332±103	0,05±0,01	0,01±0,002
	0,9—0,95	120±12	0,02±0,0007	0,003±0,0001

Примечание. Распределение стероидов на хроматограмме: оксистероиды — R<sub>f</sub>=0—0,25, ХС — R<sub>f</sub>=0,25—0,3, моноэфиры 25-гидрокси-ХС — R<sub>f</sub>=0,4—0,5, диэфиры 25-гидрокси-ХС — R<sub>f</sub>=0,75—0,8, холестерололеат — R<sub>f</sub>=0,9—0,95.

ся с мнением Морина и соавт. [14], согласно которому 25-гидрокси-ХС резко смещает равновесие биосинтеза и гидролиза ЭХС в сторону образования ЭХС в гладкомышечных клетках аорты, а также с исследованиями, в которых было показано накопление ЭХС в фибробластах, инкубированных в присутствии 25-гидрокси-ХС [9].

Результаты настоящего исследования и данные литературы [14] свидетельствуют о том, что в отличие от 25-гидрокси-ХС и других окисленных производных ХС холестеран-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -триол не стимулирует эстерификацию СХС в клетках. В то же время известно, что введение этого стероида вызывает изменения в сосудах, характерные для артериосклероза, но не атеросклероза [13]. Вероятно, сосудистые изменения, вызываемые холестеран-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -триолом, главным образом связаны с повреждением мембранных структур клеток при включении в их состав этого полярного соединения [13, 17]. 25-Гидрокси-ХС и некоторые другие окисленные продукты ХС также являются высокотоксичными мембранотропными соединениями [9, 17]. Вероятным механизмом, приводящим к снижению токсического эффекта 25-гидрокси-ХС в клетках, может быть его эстерификация с участием АХАТ, скорость которой превышает скорость эстерификации СХС.

В последнее время в литературе обсуждается вопрос о возможном участии некоторых окисленных форм ХС в регуляции холестерина обмена. Показано, что 25-гидрокси-ХС репрессирует транскрипцию генов оксиметилглутарил-КоА-редуктазы [12], белковой части рецептора к липопротеидам низкой плотности [6], стимулирует биосинтез апопротеина Е [15] и активность АХАТ [7, 10]. Данные о присутствии 25-гидрокси-ХС в фибробластах [20] косвенно указывают на возможность образования этого стероида в результате метаболизма СХС в клетках. Не исключено, что эстерификация 25-гидрокси-ХС в клетках с участием АХАТ является физиологической реакцией, направленной на снижение метаболического эффекта этого соединения.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Душкин М. И., Долгов А. В. // *Вопр. мед. химии.*— 1986.— № 3.— С. 98—101.
2. Ланкин В. З., Вихерт А. М., Тихадзе А. К. и др. // *Докл. АН СССР.*— 1987.— Т. 296, № 2.— С. 478—480.
3. Подрез Е. А., Козик В. А., Сударииков А. В. и др. // *Там же.*— 1989.— Т. 305, № 3.— С. 743—746.
4. Brecher P., Chan C. T. // *Biochim. biophys. Acta.*— 1980.— Vol. 617, N 2.— P. 458—471.
5. Brown M. S., Ho Y. K., Goldstein J. L. // *J. biol. Chem.*— 1980.— Vol. 255, N 19.— P. 9344—9352.
6. Dawson A., Hofmann S. L., Van der Westhuyzen D. R. et al. // *Ibid.*— 1988.— Vol. 263, N 7.— P. 3372—3379.
7. Drevon Ch. A., Weinstein D. B., Steinberg D. // *Ibid.*— 1980.— Vol. 255, N 19.— P. 9128—9137.
8. Fornas E., Fortea A., Renan J., Camanas A. // *J. exp. Path.*— 1987.— Vol. 31, N 2.— P. 105—112.
9. Higley N. A., Taylor S. L. // *Food Chem. Toxicol.*— 1984.— Vol. 22.— P. 983—992.
10. Lichtenstein A. H., Brecher P. // *Biochim. biophys. Acta.*— 1983.— Vol. 751.— P. 340—348.
11. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // *J. biol. Chem.*— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
12. Luskey K. L., Faust J. R., Chin D. J. et al. // *Ibid.*— 1983.— Vol. 258.— P. 8462—8469.
13. Mathias D., Becker C. H., Godicke W., Schmidt R. // *Atherosclerosis.*— 1987.— Vol. 63, N 2, 3.— P. 115—124.
14. Morin R. J., Peng S. K., Shuk K. // *Lipids.*— 1989.— Vol. 24, N 3.— P. 217—220.

15. Mazzone T., Jump H., Diller Ph., Yetz Y. S. // *J. biol. Chem.*— 1987.— Vol. 262, N 24.— P. 11 657—11 662.
16. Naseem S. M., Heald F. P. // *Biochem. int.*— 1987.— Vol. 14.— P. 71—84.
17. Peng S. K., Hill J. C., Morin R. J., Taylor C. B. // *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*— 1985.— Vol. 180.— P. 126—132.
18. Peng S. K., Taylor C. B., Hill J. C., Morin R. J. // *Atherosclerosis.*— 1985.— Vol. 54, N 1.— P. 121—133.
19. Peng S. K., Phillips G. A., Xia G. Z., Morin R. J. // *Ibid.*— 1987.— Vol. 64, N 1.— P. 1—6.
20. Sancier S. E., Kandutch A. A., Taylor F. R. et al. // *J. biol. Chem.*— 1985.— Vol. 260, N 27.— P. 14 571—14 579.
21. Taylor C. B., Peng S. K., Werthessen N. T. et al. // *Amer. J. clin. Nutr.*— 1979.— Vol. 32.— P. 40—57.
22. Steinberg D. // *Circulation.*— 1987.— Vol. 76, N 3.— P. 508—514.
23. Wiktorowicz J. E., Baur P. S., Srivastava S. K. // *Europ. J. Cell Biol.*— 1977.— Vol. 14.— P. 401—411.

Поступила 06.10.89

#### ESTERIFICATION OF CHOLESTEROL OXIDATION PRODUCTS AND THEIR EFFECTS ON THE RATE OF CHOLESTEROL ESTERIFICATION IN MACROPHAGES

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

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

Effects of cholesterol (CH) autooxidation products on incorporation of  $^{14}\text{C}$ -oleate into cholesteryl esters (CE) and their possible esterification were studied in cultivated mice peritoneal macrophages (MPM). 25 Mg/ml of purified CH and 25 Mg/ml of autooxidized CH stimulated (4- and 17-fold, respectively) the cholesterol esterification in MPM. In presence of 4 Mg/ml 25-hydroxy CH or the mixture of 4 Mg/ml 7 $\alpha$ -, 7 $\beta$ -hydroxy CH and 7-keto CH incorporation of oleate into cellular CE was increased 20- and 4-fold, respectively. 4 Mg/ml concentration of cholestane-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -triol caused no effects. Mono- and diesters of  $^{14}\text{C}$ -hydroxy CH were found after 8 hrs incubation of the steroid with MPM. Incorporation of  $^{14}\text{C}$ -25 hydroxy CH into its esters occurred at the rate, which exceeded 6-7-fold the  $^{14}\text{C}$ -CH incorporation into CE. Esterification of 7 $\alpha$ -, 7 $\beta$ -hydroxy CH and 7-keto CH was studied, 0.52 % label of the total cell sterols radioactivity was detected in the fraction of nonpolar steroids.  $^{14}\text{C}$ -cholestane-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -triol was not esterified in MPM. The stimulating effects of 25-hydroxy CH on oleate incorporation into CE and its esterification in MPM were inhibited in presence of 10 Mg/ml progesterone, an inhibitor of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase activity. Induction of CE formation in MPM by means of choltransferase activity. Induction of CE formation in MPM by means of cholesterol oxidation products may be responsible for development of foam cells, while esterification of polar steroids in cells appears to be of importance in decrease of their toxic and metabolic effects.

© Л. Е. ПАНИН, Д. И. КУЗЬМЕНКО, 1991

УДК 616.393-092.9-07: [616.36-018.1:576.31]:347]-008.939.15

Л. Е. Панин, Д. И. Кузьменко

#### ОСОБЕННОСТИ ОКИСЛЕНИЯ РЕЗЕРВНЫХ ЛИПИДОВ В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ ПРИ ГОЛОДАНИИ: РОЛЬ НЕГЕМООВОГО ЖЕЛЕЗА И СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Институт биохимии СО АМН СССР, Новосибирск

В последние годы существенно возрос интерес к изучению механизмов повреждения дыхательной цепи митохондрий при различных патологических состояниях. Вместе с тем не уделяется должного внимания проблеме регуляции митохондриального аппарата в условиях функционального напряже-

ния организма, хотя теоретические и экспериментальные основы энергетики стресса были заложены еще в 70-е годы [8—11, 17]. Не вызывает сомнений то, что в условиях воздействия на организм субэкстремальных и экстремальных факторов среды включаются дополнительные механизмы, обеспечивающие высокую эффективность сопряжения окисления и фосфорилирования, поскольку энергоемкость адаптивно-восстановительных процессов весьма высока. Природа этих механизмов остается по-прежнему неясна.

Известно, что в процессе синтеза макроэргов митохондриями принимают участие свободнорадикальные процессы [1, 7, 15, 16]. Одним из генераторов свободных радикалов во внутренней мембране митохондрий является негемовое железо [33], входящее в состав I, II и III комплексов дыхательной цепи [28], содержание которого в митохондриях печени крыс превышает количество гемосодержащих белков [37]. Негемовое железо способно катализировать также образование перекисей липидов [2, 32], которое обязательно сопровождает процесс транспорта электронов по дыхательной цепи [21, 36]. Конкретный механизм участия негемового железа в окислительном фосфорилировании не известен. Вместе с тем показано, что его редокс-состояние находится в строгом соответствии с метаболической активностью митохондрий [23, 25]. Это дает основание предполагать, что в структуре адаптивных механизмов, приводящих энергопродукцию клетки в соответствии с ее возросшими потребностями, могут лежать процессы окисления части резервных липидов по свободнорадикальному механизму с участием негемового железа митохондрий. Настоящая работа посвящена попытке получить экспериментальные иллюстрации некоторых положений этой концепции, нашедшей свое отражение в более ранних работах [12, 20].

**Методика.** Эксперименты были проведены на крысах-самцах Вистар массой 130—170 г. В качестве модели функционального напряжения организма использовано 72-часовое голодание без ограничения доступа к питьевой воде. Премущественно такой модели состоят в том, что она полностью исключает влияние специфических агентов и позволяет изучать адаптивные процессы в период их наибольшей мобилизации [17, 20].

Митохондрии из печени крыс выделяли методом [38]. Поглощение кислорода регистрировали электродом Кларка с помощью полярографа LP-7 (Чехо-Словакия). Объем кюветы 1 мл, содержание митохондриального белка 2—3 мг, температура 23—26 °С. Средой инкубации служил раствор, содержащий 125 мМ KCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 мМ трис-HCl pH 7,4. Субстраты окисления: сукцинат 10 мМ, пальмитоилкарнитин 25 мкМ («Sigma», США) в присутствии 1 мМ малата, АДФ — 100 мкМ.

Об интенсивности процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ) судили по количеству малонового диальдегида (МДА), который определяли по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [22]. Использованные в этих экспериментах митохондрии предварительно отмывали и затем ресуспендировали с помощью раствора, содержащего 175 мМ KCl и 20 мМ трис-HCl pH 7,4. Исходное содержание МДА определяли в свежеприготовленной суспензии митохондрий. Для оценки скорости ПОЛ в митохондриях под влиянием различных условий эксперимента фракцию митохондрий в количестве 3—4 мг по белку инкубировали 10 мин при 26 °С в среде: 125 мМ KCl, 0,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 30 мМ трис-HCl pH 7,4, 50 мМ глюкозы, 50 мкг/мл гексокиназы («Calbiochem», США) и 300 мМ АТФ (метаболическое состояние 3, V<sub>3</sub>). Подбирали такое количество гексокиназы, чтобы скорость дыхания была максимальной в данных условиях. Метаболическое состояние 4, V<sub>4</sub> моделировали в отсутствии АДФ-регенерирующей системы. Конечный объем составлял 2 мл. Субстраты окисления были те же, что в полярографических экспе-

риментах. Количество АТФ, синтезированное за период инкубации в V<sub>3</sub> и в присутствии различных ингибиторов, оценивали энзиматическим методом [27].

Ингибиторный анализ включал использование бензгидроксамовой кислоты (БГК) — соединения, способного хелатировать негемовое железо митохондрий [29, 30, 35]. БГК («Реахим», СССР), предварительно перекристаллизованную из 96° этанола, вносили в кювету непосредственно перед митохондриями до конечных концентраций 1 мМ [35] и 5 мМ [14]. Антимидин А использовали в дозе 0,1 мкг/мг белка митохондрий, KCN в концентрации 0,5 мМ. Белок митохондрий определяли по Лоури. Статистическую обработку результатов осуществляли стандартными методами с использованием t-критерия Стьюдента.

**Результаты и обсуждение.** Из рис. 1 следует, что БГК в концентрации 1 мМ практически не оказывала влияния на величины окисления сукцината как в норме, так и при голодании. Ранее на митохондриях интактных растительных тканей было показано, что БГК в аналогичной концентрации также не влияла на окисление субстратов цикла Кребса [35]. При окислении пальмитоилкарнитина БГК в концентрации 1 мМ снижала АДФ:О у интактных ( $p < 0,05$ ), а также АДФ:О и скорость фосфорилирования у голодавших крыс ( $p < 0,05$ ). Под влиянием 5 мМ БГК при окислении сукцината митохондриями интактных крыс снижались все показатели ( $p < 0,05$ ). При окислении пальмитоилкарнитина независимо от состояния животных в присутствии 5 мМ БГК были достоверно снижены дыхательный контроль (ДК) и АДФ:О ( $p < 0,01$ ). В то же время такой показатель, как скорость фосфорилирования, достоверно уменьшался только у голодавших крыс ( $p < 0,01$ ). Результаты этой серии экспериментов указывают на то, что эффекты БГК в наибольшей степени проявляются на митохондриях печени голодавших крыс при использовании в качестве субстрата окисления пальмитоилкарнитина.

Исходное содержание МДА в митохондриях голодавших крыс было значительно выше таковой у интактных животных (рис. 2;  $p < 0,001$ ). Инкубация митохондрий в V<sub>4</sub> независимо от состояния животных и типа окисляемого субстрата (сукцинат или пальмитоилкарнитин) вызывала незначительный прирост МДА по сравнению с исходным содержанием. В метаболическом состоянии 3 накопление МДА было максимальным и не зависело от состояния животных и наиболее значительным в случае митохондрий голодавших крыс при окислении пальмитоилкарнитина ( $p < 0,01$ ). Антимидин А в концентрации, блокирующей транспорт электронов, вызывал полное прекращение накопления МДА при всех условиях эксперимента. Это вполне согласуется с данными о влиянии ингибиторов транспорта электронов на скорость ПОЛ в митохондриях [21]. Чувствительность процессов образования МДА в митохондриях к БГК определялась главным образом состоянием животных: в митохондриях интактных крыс накопление МДА снижалось, не достигая исходного уровня, а в митохондриях голодавших животных прекращалось полностью (см. рис. 2). При одновременном воздействии антимидина А и БГК превалировал эффект ингибитора транспорта электронов.

Результаты, представленные на рис. 1 и 2, могут свидетельствовать о возрастании роли не-

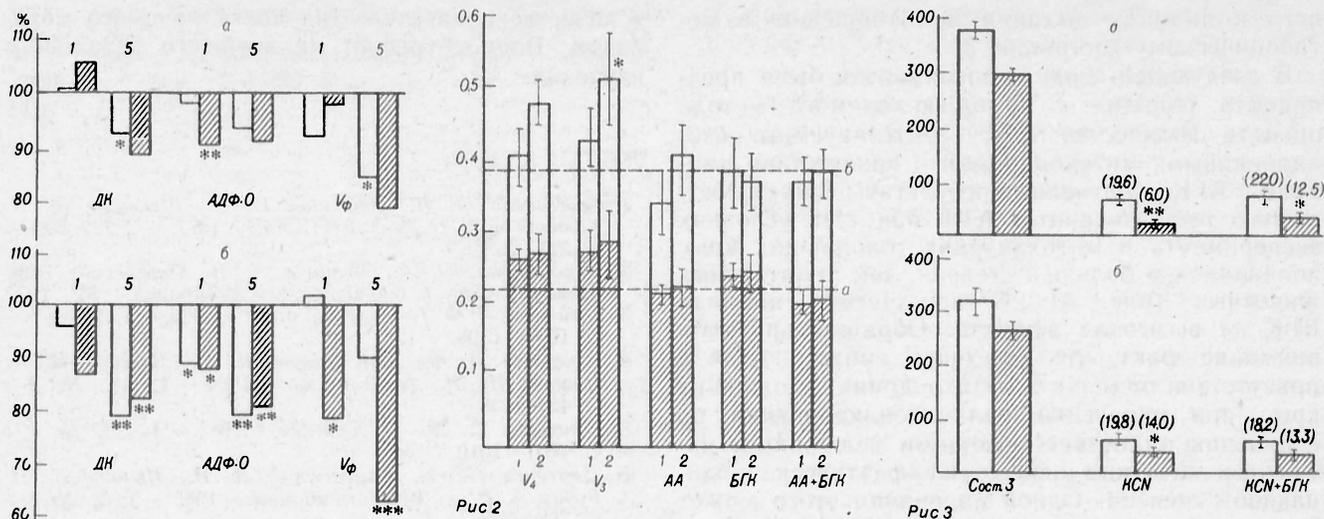


Рис. 1

Рис. 2

Рис. 3

Рис. 4

Рис. 5

Рис. 6

Рис. 7

гемового железа митохондрий в окислении липидов при голодании. Известно, что при голодании продолжительностью до 5 сут в митохондриях печени развивается низкоамплитудное обратимое набухание, отражающее процесс структурно-функциональной перестройки дыхательной цепи, направленной на активацию окисления жирных кислот [17, 19, 24]. Согласно данным [35], внутренняя мембрана митохондрий интактных тканей непроницаема для БГК. Учитывая эти факты, можно предположить, что более выраженный эффект БГК, полученный на митохондриях голодавших крыс, может быть связан не только с концентрацией хелатора (5 мМ), но и повышением доступности железосульфопротеидов дыхательной цепи для БГК (см. рис. 1). Можно также предположить, что наиболее доступным для БГК становятся железосульфопротеины, входящие в состав III комплекса дыхательной цепи: согласно современным представлениям [26] это единственный комплекс, активный центр которого ориентирован в сторону наружной поверхности сопрягающей мембраны митохондрий, в то время как активные центры I и II комплексов обращены в сторону матрикса. Можно думать, что перестройка белок-липидных взаимоотношений во внутренней мембране является одной из причин повышения ПОД вследствие изменения доступности двойных связей жирных кислот для атаки их кислородом.

Из гипотезы о возможной природе адаптивного механизма энергообеспечения клетки вытекает то обстоятельство, что синтез АТФ в данном варианте может изменить чувствительность к такому ингибитору дыхания, как цианид. Ре-

зультаты наших экспериментов, посвященных проверке этого предположения, оказались возможным сравнить с результатами работы [31], в которой была сделана попытка обнаружить цианидрезистентное дыхание в изолированных митохондриях печени крыс. В цитируемой работе показана зависимость величины устойчивого к ингибитору дыхания от количества белка митохондрий. Для адекватного сравнения результатов мы представили дозировку цианида не в виде его конечной концентрации в кювете (ммоль/л), а как микромоляр ингибитора на 1 мг белка митохондрий, тем более, что объем кювет в наших экспериментах и работе [31] был разным. Из таблицы видно, что как доза ингибитора, так и доля цианидрезистентного дыхания митохондрий в условиях инкубации митохондрий в работе [31] соответствовали метаболическому состоянию 4, что не позволило сравнить величину устойчи-

Сравнение величины устойчивого к KCN дыхания митохондрий печени интактных крыс при окислении сукцината

Показатель	Собственные наблюдения	По данным [31]	
		I	II
Белок митохондрий в кювете, мг	2,6	2,5	1,0
KCN, мкмоль на 1 мг белка митохондрий	0,19	0,12	0,15
Величина KCN-устойчивого дыхания, %	11—12* 5—6**	9—10*	8*

Примечание. I и II — величины, представленные на рис. 2, 4 и 4 в работе [31]. Одна звездочка и две — за 100% принята скорость дыхания соответственно в V<sub>4</sub> и V<sub>3</sub>.

вого к цианиду дыхания по отношению к метаболическому состоянию 3.

В следующей серии экспериментов была предпринята попытка с помощью прямого метода оценить количество АТФ, синтезируемого изолированными митохондриями в присутствии цианида и БГК. Полученные результаты свидетельствуют о том, что синтез АТФ при всех условиях эксперимента в митохондриях голодавших крыс подавлялся в большей степени, чем у интактных животных (рис. 3). В присутствии цианида БГК не вызывала эффекта. Обращает на себя внимание факт, что угнетение синтеза АТФ в присутствии цианида в митохондриях голодавших крыс при окислении пальмитоилкарнитина по сравнению с соответствующими величинами интактных животных происходило фактически в одинаковой степени. Одной из причин этого может быть то обстоятельство, что концентрация цианида в данной серии экспериментов (0,5 ммоль/л) соответствовала дозе 0,34—0,36 ммоль на 1 мг белка митохондрий, что почти вдвое больше, чем в предыдущей серии (см. таблицу). Как видно на рис. 3, доля устойчивого к действию данной дозы цианида в случае митохондрий интактных крыс составляла около 20%. В связи с этим вызывает интерес работа [34], где исследовалась зависимость величины электрохимического потенциала на внутренней мембране митохондрий от степени ингибирования транспорта электронов.

Результаты, полученные в настоящей работе, могут быть объяснены в рамках представлений, согласно которым в результате адаптивной структурно-функциональной перестройки дыхательной цепи в условиях голодания часть жирных кислот, поступающих в митохондриальный компартмент в качестве субстрата, может окисляться по свободнорадикальному механизму с участием негемового железа и, возможно, служить дополнительным источником макроэргов. В пользу этого механизма свидетельствуют данные об активации процессов ПОЛ в митохондриях и результаты ингибиторного анализа, согласно которым наибольшую чувствительность к БГК проявил процесс окисления пальмитоилкарнитина в митохондриях голодавших крыс, а также то, что в условиях голодания может меняться чувствительность биоэнергетических процессов к ингибиторам. Анализ данных литературы позволяет предполагать, что негемовое железо участвует в постулируемом механизме на этапах образования перекисей жирных кислот, образования радикалов липидных перекисей и в процессе рекомбинации радикалов. Последний этап может быть сопряжен с актом синтеза молекулы АТФ [13].

Не так давно был опубликован ряд интересных работ [3—6], в которых авторы развивают гипотезу об участии перекисных радикалов липидов в механизме сопряжения окисления и фосфорилирования. В качестве источника радикалов рассматривается липидная фаза сопрягающей мембраны митохондрий. Эти данные, а также работа [15] могут служить веским доводом в пользу наших предположений. Представленные нами результаты не претендуют на всесторонний охват проблемы и их не следует рассматривать

в качестве доказательства постулируемого механизма. Вопрос требует дальнейшего детального изучения.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бржевальская О. П., Неделина О. С., Шекшеев Э. М., Каюшин Л. П. // Докл. АН СССР.— 1977.— Т. 232, № 1.— С. 221—224.
2. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.— М., 1972.
3. Дмитриев Л. Ф. // Молекул. биол.— 1983.— Т. 17, № 6.— С. 1297—1305.
4. Дмитриев Л. Ф., Давлетшина Л. П., Белевич Н. П., Иванов И. И. // Там же.— 1984.— Т. 18, № 2.— С. 427—435.
5. Дмитриев Л. Ф. // Там же.— 1985.— Т. 19, № 4.— С. 1001—1010.
6. Дмитриев Л. Ф., Давлетшина Л. П., Иванов И. И., Рубин А. В. // Биол. мембраны.— 1985.— Т. 2, № 8.— С. 795—799.
7. Каюшин Л. П., Бржевальская О. П., Неделина О. С., Шекшеев Э. М. // Биофизика.— 1979.— Т. 24, № 2.— С. 246—253.
8. Кондрашова М. П. // Там же.— 1970.— Т. 15, № 2.— С. 312—323.
9. Кондрашова М. П. Митохондрии: структура и функции в норме и патологии.— М., 1971.— С. 25—40.
10. Кондрашова М. П. Регуляция энергетического обмена и устойчивость организма.— Пушкино, 1975.— С. 67—82.
11. Кондрашова М. П., Маевский Е. И. Регуляция энергетического обмена и физиологическое состояние организма.— М., 1978.— С. 5—14.
12. Кузьменко Д. И. Влияние липопротеидов крови и цАМФ на окислительное фосфорилирование митохондрий печени в условиях функционального напряжения организма: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— Томск, 1982.
13. Макоялов С. Е., Вовси Б. А., Полосова Р. Г., Сидорова Н. Д. // Биохимия.— 1966.— Т. 31, № 3.— С. 613—618.
14. Меденцев А. Г., Акименко В. К. // Микробиология.— 1977.— Т. 46, № 2.— С. 147—202.
15. Маршанский В. П., Новгородов С. А., Жигачева И. В., Ягушкинский Л. С. // Докл. АН СССР.— 1983.— Т. 269, № 5.— С. 1245—1248.
16. Неделина О. С., Вишневецкий Е. С., Бржевальская О. П., Шекшеев Э. М. // Там же.— 1980.— Т. 252, № 6.— С. 1497—1500.
17. Панин Л. Е. Энергетические аспекты адаптации.— Л., 1978.
18. Панин Л. Е., Кузьменко Д. И., Третьякова Т. А. Механизмы адаптации гомеостатических систем при действии на организм субэкстремальных и экстремальных факторов (энергетический гомеостаз) / Под ред. Л. Е. Панина.— Новосибирск, 1980.— С. 36—51.
19. Панин Л. Е., Кузьменко Д. И., Колпаков А. Р. // Бюл. экпер. биол.— 1982.— № 9.— С. 50—52.
20. Панин Л. Е. Биохимические механизмы стресса.— Новосибирск, 1983.
21. Ситковский М. В., Гуровецкий В. Б., Данилов В. С., Козлов Ю. П. // Изв. АН СССР. Сер. биол.— 1973.— № 1.— С. 65—68.
22. Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г. // Современные методы в биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича.— М., 1977.— С. 66—68.
23. Шалинец Е. Б., Кондрашова М. П. Митохондрии: транспорт электронов и преобразование энергии.— М., 1976.— С. 77—79.
24. Cieciora L., Rudzynski K., Krakowski G. // Acta med. pol.— 1979.— Vol. 20, N 4.— P. 367—368.
25. Eresinska M., Wilson D. A. // Arch. Biochem.— 1976.— Vol. 174, N 1.— P. 143—157.
26. Ernster L. // Biochemical and Clinical Aspects of Coenzyme Q / Eds. K. Folkers, Y. Yamamura.— Amsterdam, 1977.— P. 15—21.
27. Estabrook R. W., Williamson J. R., Frenkel R., Maitra P. K. // Meth. Enzymol.— 1967.— Vol. 10, Sect. V.— P. 474—482.
28. Gazzolli P. // Top. Bioelectrochem. Bioenerg.— 1980.— Vol. 3.— P. 149—190.
29. Henry M.-F., Nyns E. // J. sub-cell. Biochem.— 1975.— Vol. 4, N 1.— P. 1—65.
30. Henry M.-F., Nyns E. // Arch. Microbiol.— 1977.— Vol. 114, N 2.— P. 171—174.

31. Meera - Rau, Ramasarma T. // Indian J. Biochem. Biophys.— 1979.— Vol. 16.— P. 379—383.
32. Misra H. P., Fridovich I. // J. biol. Chem.— 1972.— Vol. 247, N 10.— P. 3170—3175.
33. Ohnishi T. // Biochim. biophys. Acta.— 1975.— Vol. 387, N 3.— P. 475—490.
34. Pietrobbon D., Azzone G. F., Waltz D. // Europ. J. Biochem.— 1981.— Vol. 117, N 2.— P. 389—394.
35. Schonbaum G. R., Bonner M. D., Storey I. B., Bahr J. T. // Plant. Physiol.— 1971.— Vol. 47, N 1.— P. 124—128.
36. Screde S., Christophersen B. O. // Biochem. J.— 1966.— Vol. 101, N 1.— P. 37—41.
37. Tangeras A., Flatmark T., Backstrom D., Ehrenberg A. // Biochim. biophys. Acta.— 1980.— Vol. 589, N 2.— P. 162—175.
38. Weinbach E. C. // Analyt. Biochem.— 1961.— Vol. 162, N 4.— P. 500—505.

Поступила 01.01.90

#### SPECIFICITY OF DEPOSITED LIPIDS OXIDATION IN LIVER MITOCHONDRIA IN STARVATION: ROLE OF NON-HEME FERRUM AND FREE RADICAL OXIDATION OF FATTY ACIDS

L. E. Panin, D. I. Kuzmenko

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

Structure-functional transformation of respiratory chain, developed in response to 72 hrs starvation involved the following alterations: 1. in mitochondria of starved rats distinct increase was observed in sensitivity of palmitocarnitine oxidation, but not of succinate, to benzhydroxamic acid — chelator of non-heme ferrum; 2. as compared with controls accumulation of malonic dialdehyde was completely inhibited in liver mitochondria of the starved rats in presence of benzhydroxamic acid; 3. considerable alteration in sensitivity of respiration and ATP synthesis to the effect of some inhibitors was found in liver mitochondria of starved rats. Results of the experiment are discussed on the basis of the assumption that existence of additional pathways of ATP synthesis, essential for adaptation-restoration processes, is biologically important under conditions of stress.

© В. Т. Долгих, 1991 •

УДК 616-005.1-036.11-085-039.72-036.8-07:616.12-008.939.15

В. Т. Долгих

#### ВЛИЯНИЕ ОСТРОЙ СМЕРТЕЛЬНОЙ КРОВОПОТЕРИ НА ПОСТРЕАНИМАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ФОСФОЛИПИДОВ СЕРДЦА И ИХ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Омский медицинский институт

Мембраны кардиомиоцитов — это регуляторные системы, осуществляющие тесную связь структуры и функции. Фосфолипиды (ФЛ), входящие в билипидный слой клеточных мембран, регулируют конформацию белков, встроенных в мембрану, обуславливают ферментативную активность и проницаемость мембран [16], выступают в качестве сопрягающего фактора при взаимодействии рецептора с ферментом, сохраняют рецептор-энзимный комплекс в состоянии, отзывчивом к гормонам [19]. Не исключено, что выявленная нами в предыдущих исследованиях ферментемия [6], нарушение биоэнергетики сердца и аритмии [7], депрессия сократительной функции миокарда, дистония кардиальных антигенов и появление противосердечных антител [8] являются следст-

ствием повреждения мембран кардиомиоцитов. Если это предположение верно, то с помощью препаратов, стабилизирующих фосфолипидный состав мембран, можно предупредить или значительно уменьшить эти функционально-метаболические нарушения.

Цель настоящей работы — изучить влияние острой смертельной кровопотери на фосфолипидный состав мембран сердца, а затем попытаться с помощью предварительно вводимых антигипоксантов гамма-оксипутирага натрия (ГОМК) и гутимины,  $\beta$ -блокатора индерала, антиоксиданта ионола и блокатора медленных Са-каналов изоптина уменьшить постреанимационные повреждения мембран кардиомиоцитов.

Методика. Эксперименты выполнены на беспородных крысах-самцах массой 185—210 г, наркотизированных внутрибрюшинным введением нембутала из расчета 25 мг/кг. Клиническую смерть продолжительностью 4 мин вызывали острым кровопусканием, а оживление осуществляли центрипетальным нагнетанием выпущенной крови, искусственной вентиляции легких и закрытым массажем сердца без применения средств, стимулирующих сердечно-сосудистую систему. С учетом сроков восстановления жизненно важных функций (время появления сердечных сокращений, дыхания и роговичного рефлекса), степени неврологического дефицита [7] и метаболических нарушений выделили 2 группы животных: с благоприятным (1-я) и неблагоприятным (2-я) течением постреанимационного периода. В течение 30 мин после оживления непрерывно регистрировали ЭКГ для подсчета экстрасистол, так как абсолютное большинство экстрасистол регистрировалось в первые 15 мин после возобновления сердечных сокращений, а позднее — единичные экстрасистолы. Опыты проведены в 2 этапа. На 1-м этапе изучали влияние клинической смерти и последующей реанимации на общее содержание ФЛ [4] и их фракций [12]. Разделение ФЛ на фракции проводили методом тонкослойной хроматографии на пластинках Silufol фирмы «Kavalier» (ЧССР) и идентифицировали их при помощи специфических методов окраски. При этом выделено 6 фракций: фосфатидилхолин (ФХ), лизофосфатидилхолин (ЛФХ), сфингомиелин, фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилэтанолламин (ФЭА) и кардиолипин + фосфатидные кислоты. Общее содержание ФЛ и их фракций выражали в миллимолях неорганического фосфора, содержавшегося в 1 кг влажной массы миокарда. В липидном экстракте определяли содержание гидроперекисей липидов (ГПЛ), свободных жирных кислот (СЖК) и антиоксидательную активность (АОА) липидов ранее применявшимися методами [5]. Кроме того, в сердечной мышце определяли неорганический фосфор (ФН) по методу [9]. По количеству ферментов, выделяемых в коронарный проток изолированными сердцами, перфузируемыми по методу [15], судили о степени повреждения мембран кардиомиоцитов, а по количеству глюкозы, потребляемой изолированным сокращающимся сердцем на единицу выполненной функции, и выделению им пирувата и лактата — о нарушении окислительного фосфорилирования в митохондриях. На 2-м этапе предпринята попытка уменьшить характерные для постреанимационного периода нарушения фосфолипидного состава мембран сердечной мышцы внутрибрюшинным введением ГОМК (по 300 мг/кг за 48, 24 и 1 ч до кровопотери), гутимины (50 мг/кг за 1 ч), индерала (1 мг/кг за 30 мин), ионола (по 100 мг/кг за 48, 24 и 1 ч) и изоптина (0,1 кг/кг за 30 мин до кровопотери). Результаты обработаны статистически с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Представленные в табл. 1 и 2 данные свидетельствуют о том, что острая кровопотеря и клиническая смерть вызывают умеренное снижение содержания ФЛ в сердечной мышце. Реанимация и реоксигенация организма усиливают разрушение ФЛ. Через 15 мин после восстановления сердечных сокращений выявляется значительное снижение в миокарде ФХ, ФЭА и кардиолипина. В меньшей степени катаболизируются ФС и сфингомиелин, но значительно (на 60—85 %) нарастает в течение суток содержание ЛФХ. При неблагоприят-

Влияние острой смертельной кровопотери и предварительного введения препаратов на содержание в ммоль/кг фосфолипидов (ФЛ), гидроперекисей липидов (ГПЛ) неорганического фосфора (ФН) и АОА липидов в сердце крыс в постреанимационном периоде

Условия эксперимента	Группа животных	ФЛ	ФН	ГПЛ	АОА
Контроль	(11)	31,5±2,15	5,5±0,28	1,56±0,06	11,1±0,66
Клиническая смерть	(11)	29,9±1,91	9,7±1,33	3,00±0,26	5,6±0,29
<b>Постреанимационный период</b>					
15 мин	(11)	27,8±1,72	7,3±0,55	2,71±0,28	4,0±0,26
	1-я (11)	26,1±1,68	7,1±0,80	2,57±0,18	2,8±0,24
90 мин	2-я (7)	24,9±1,57	12,3±1,32	3,69±0,24	2,0±0,12
	1-я (9)	26,8±1,33	9,2±1,22	2,77±0,28	4,8±0,33
3 ч	2-я (5)	24,9±1,84	12,1±0,85	4,81±0,43	3,1±0,22
6 ч	1-я (12)	26,6±1,63	7,2±0,57	3,23±0,16	5,1±0,43
	2-я (5)	23,5±1,44	10,2±0,69	5,02±0,39	3,5±0,32
1 сут	1-я (12)	25,4±1,65	4,8±0,48	2,44±0,15	6,4±0,40
	2-я (5)	22,5±1,47	10,4±1,63	3,96±0,59	3,0±0,16
3 сут	1-я (10)	25,9±1,60	5,3±0,43	2,60±0,13	7,5±0,48
	2-я (6)	22,6±1,69	8,2±0,58	4,01±0,29	3,8±0,24
7 сут	1-я (9)	28,1±1,88	4,1±0,35	2,13±0,06	6,4±0,55
	2-я (4)	24,5±2,05	8,5±0,65	3,85±0,31	4,0±0,33
14 сут	1-я (10)	29,4±1,76	6,0±0,37	2,88±0,16	12,2±0,74
	2-я (4)	25,7±1,96	14,2±1,03	4,24±0,27	7,6±0,45
21 сут	1-я (10)	30,2±2,04	4,8±0,30	2,10±0,17	14,6±1,10
	2-я (5)	28,3±1,94	9,6±0,88	3,47±0,45	9,1±0,86
30 сут	(10)	30,9±2,29	3,6±0,22	1,77±0,19	13,3±0,85
ГОМК+6 ч	(8)	30,1±1,72	5,0±0,41	1,80±0,09	9,9±0,65
Гутимин+90 мин	(9)	30,7±1,86	3,8±0,21	2,37±0,09	7,9±0,55
Индерал+90 мин	(10)	29,9±1,71	5,5±0,37	1,44±0,08	9,8±0,66
Ионол+6 ч	(9)	30,5±1,82	8,0±0,41	1,64±0,11	10,6±0,93
Изоптин+90 мин	(10)	30,9±2,06	5,3±0,50	1,63±0,06	7,9±0,52

Примечание. Здесь и в табл. 2: в скобках — число животных.

ном течении постреанимационного периода гидролиз ФЛ особенно выражен, что в совокупности с катаболизмом адениловых нуклеотидов [7] увеличивает содержание неорганического фосфора (см. табл. 2) в сердечной мышце ( $r=-0,84$ ;  $p<0,01$ ).

Причины и механизмы столь значительного уменьшения уровня ФЛ в сердце оживленных крыс могут быть двоякого рода. Клиническая смерть и реанимация вызывают, во-первых, повреждение печени, сопровождающееся нарушением ее функций [10], включая синтез ФЛ, а во-

Таблица 2

Постреанимационная динамика содержания ФЛ (в ммоль Р<sub>n</sub> на 1 кг влажной ткани) в сердце крыс ( $M \pm m$ )

Условия эксперимента	Группа животных	Фракции ФЛ					
		ЛФХ	сфингомиелин	ФХ	ФС	ФЭЛ	кардиолипиды + фосфатидные кислоты
Контроль	(11)	1,26±0,08	1,52±0,09	11,25±1,02	2,16±0,14	9,19±0,54	4,04±0,27
<b>Постреанимационный период</b>							
15 мин	(11)	1,87±0,13*	1,45±0,09	9,87±0,70	1,80±0,10*	7,32±0,44*	3,45±0,24
90 мин.	1-я (11)	2,19±0,14*	1,45±0,10	9,35±0,64	1,81±0,09*	6,64±0,50*	2,60±0,19*
	2-я (7)	2,45±0,16*	1,39±0,11	9,06±0,66	1,67±0,09*	6,22±0,53*	2,16±0,15*
6 ч	1-я (10)	2,03±0,13*	1,45±0,06	9,22±0,66	1,77±0,10*	6,93±0,51*	3,10±0,17*
	2-я (6)	2,26±0,14*	1,39±0,08	8,55±0,59*	1,67±0,09*	5,22±0,45*+	2,35±0,15*+
1 сут	1-я (11)	2,06±0,12*	1,48±0,09	8,70±0,66	1,75±0,11*	6,10±0,49*	3,03±0,20*
	2-я (7)	2,35±0,13*	1,32±0,08	7,77±0,56*	1,61±0,11*	5,16±0,43*	2,31±0,19*+
3 сут	1-я (12)	1,90±0,12*	1,45±0,07	8,96±0,70	1,84±0,10	6,39±0,43*	3,06±0,23*
	2-я (6)	2,13±0,15*	1,36±0,10	7,90±0,66*	1,68±0,12	5,06±0,49*+	2,33±0,16*+
7 сут	1-я (11)	1,80±0,12*	1,48±0,08	9,41±0,72	1,97±0,13*	7,74±0,55*	3,45±0,21
	2-я (5)	2,06±0,15*	1,42±0,10	8,26±0,64	1,77±0,20	6,10±0,52*+	2,58±0,16*+
14 сут	1-я (11)	1,73±0,10*	1,51±0,09	9,77±0,65	2,03±0,14	8,45±0,57	3,74±0,22
	2-я (6)	2,09±0,15*	1,45±0,10	8,76±0,57	1,80±0,12	6,64±0,43*+	2,87±0,18*+
21 сут	1-я (10)	1,70±0,09*	1,55±0,10	10,19±0,88	2,07±0,15	8,80±0,67	4,06±0,30
	2-я (5)	1,93±0,13*	1,48±0,11	9,35±0,72	1,93±0,12	7,71±0,59	3,33±0,27
30 сут	(12)	1,44±0,11	1,55±0,12	10,84±1,05	2,10±0,14	9,03±0,58	3,91±0,28
ГОМК+6 ч	(8)	1,42±0,16*	1,50±0,11	10,41±0,56	2,02±0,10*	8,62±0,53*	3,82±0,22*
Гутимин+90 мин	(9)	1,55±0,10*	1,42±0,07	10,65±0,53	2,04±0,11*	8,75±0,48*	3,87±0,32*
Индерал+90 мин	(10)	1,57±0,11*	1,49±0,12	10,29±0,78	2,03±0,10*	8,77±0,45*	3,74±0,30*
Ионол+6 ч	(9)	1,39±0,07*	1,46±0,10	10,94±0,71	2,03±0,11*	8,72±0,49*	3,77±0,24*
Изоптин+90 мин	(10)	1,40±0,10*	1,48±0,08	10,73±0,78	2,02±0,13*	8,77±0,63*	3,75±0,24*

Примечание. Звездочкой обозначены достоверные различия с контролем и с соответствующими сроками оживленных (90 мин и 6 ч) животных и животных, «защищенных» препаратами, а плюсами — достоверные различия показателей между группами животных с благоприятным (1-я) и неблагоприятным (2-я) течением постреанимационного периода.

вторых, усиливают процессы ПОЛ и активируют фосфолипазы, которые модифицируют липидный бислой мембран кардиомиоцитов.

Из табл. 1 видно, что у подопытных животных содержание ГПЛ повышается почти в 2 раза уже к концу клинической смерти, а после оживления процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) усиливаются в еще большей степени, особенно у животных с неблагоприятным течением восстановительного периода. Корреляционный анализ выявил наличие обратной зависимости между содержанием ГПЛ и ФЛ в сердце ( $r = -0,89$ ;  $p < 0,001$ ). Усиление ПОЛ и избыточное накопление ГПЛ, разрушающих мембраны кардиомиоцитов, могут быть связаны с ингибированием супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы, выявленным нами в ранее проведенных исследованиях [8], значительным (в 2—5 раз) снижением АОА липидов (см. табл. 2), отражающей запасы антиоксидантов в миокарде, которые, взаимодействуя с образовавшимися радикалами, обрывают цепной свободнорадикальный процесс [2]. Активации процессов ПОЛ и увеличению содержания ГПЛ в сердечной мышце способствовало увеличение в ней через 15 мин после оживления на 72 % СЖК (с  $360 \pm 23$  до  $620 \pm 103$  м-экв/кг;  $p < 0,05$ ) за счет ингибирования в условиях гипоксии  $\beta$ -окисления жирных кислот и высвобождения СЖК при разрушении ФЛ мембран.

Другим способом модификации липидного бислоя мембран и уменьшения уровня ФЛ в кардиомиоцитах, кроме чрезмерной активации ПОЛ и образования перекисных соединений, обладающих мембранодеструктивным свойством [2], является активация в условиях гипоксии и последующей реоксигенации фосфолипаз, особенно фосфолипазы  $A_2$ . Длительная постреанимационная гиперкатехоламинемия [3] и возросший в 1,4—1,5 раза уровень адреналина в сердечной мышце в 1-й час после оживления [5] способствуют накоплению  $Ca^{2+}$  в саркоплазме, что, как известно, повышает активность фосфолипаз [11].

Активация фосфолипазы  $A_2$  (о чем свидетельствует увеличение содержания ЛФХ) ионами кальция приводит к гидролизу ФЛ и частичному удалению из мембран кардиомиоцитов ФЭА, ФХ и ФС. Их содержание к 1,5 ч после реанимации уменьшается соответственно на 36, 28, 17 и 16 %. На протяжении 1-й недели в условиях максимальной активации ПОЛ продолжает снижаться общее содержание ФЛ и их отдельных фракций, особенно в сердцах животных с неблагоприятным течением постреанимационного периода. Наибольшей выраженности катаболизм ФЛ достигает к концу 1-х суток: если общее содержание ФЛ уменьшается на 29 %, то уровень отдельных фракций — еще более значительно: кардиолипина на 43 %, ФЭА на 44 %, ФХ на 31 %. И это не случайно, так как в состав ФЭА входят жирные кислоты, чувствительные к ПОЛ и содержащие по 7 двойных связей [18]. Кроме того, ФЭА и ФХ являются главными компонентами мембран клетки и в первую очередь подвергаются гидролитическому расщеплению фосфолипазой  $A_2$ , что приводит к образованию ЛФХ и ЛФЭА, оказывающих выраженное токсическое

действие [1]. Из табл. 2 видно, что содержание ЛФХ уже через 15 мин после оживления возрастает на 48 %, через 1,5 ч — на 74 %, а через 1 сут — на 87 %.

Через неделю катаболизм ФЛ уменьшается, появляется тенденция к постепенной (в течение 3 нед) нормализации общего содержания ФЛ и их фракций на фоне повышения АОА липидов и уменьшения интенсивности ПОЛ, особенно у животных с благоприятным течением в восстановительном периоде.

Уменьшение содержания ФЛ в мембранах существенно сказывается на их проницаемости, активности мембранолокализованных ферментов и электрической нестабильности мембран кардиомиоцитов, что подтверждают данные рис. 1—3. Из рис. 1 видно, что клиническая смерть и реанимация значительно увеличивают выделение кардиомиоцитами ферментов различной ультраструктурной локализации в коронарный перфузат, свидетельствуя о повышении проницаемости мембран. В течение всего периода наблюдения динамика освобождения ферментов примерно одинакова в обеих группах, но абсолютные величины высвобождаемых ферментов при неблагоприятном течении постреанимационного периода оказались в 3—3,5 раза больше, чем при благоприятном. У животных этой же группы отмечалось также максимальное уменьшение уровня ФЛ в сердце. Корреляционный анализ, проведенный между содержанием ФЛ и выходом ферментов в коронарный проток, выявил наличие тесной обрат-

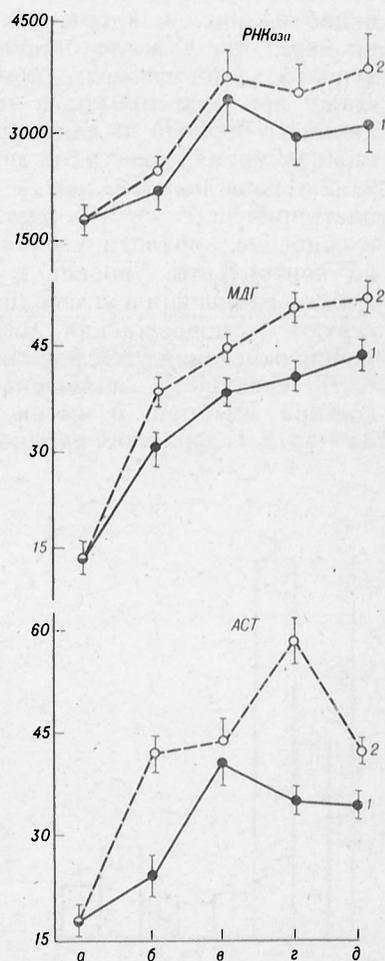


Рис. 1. Влияние острой смертельной кровопотери на выделение ферментов изолированными сердцами крыс в коронарный проток.

По оси ординат — активность выделяемых в коронарный проток ферментов (в расчете на 1 кг его массы): РНКазы (в ед/ч,  $\times 10^3$ ) и АСТ и МДГ (в ммоль/ч). Здесь и на рис. 2: по оси абсцисс — сроки исследования: а — контроль; б, в, г, д — соответственно 90 мин, 1, 7 и 14 сут после оживления. 1 — группа с благоприятным исходом; 2 — с неблагоприятным.

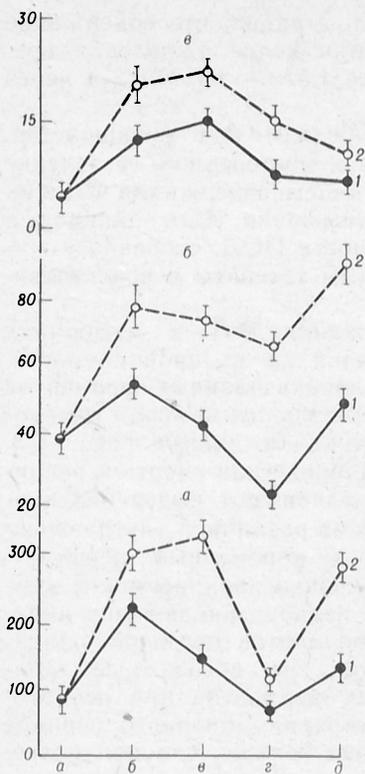


Рис. 2. Влияние острой смертельной кровопотери на потребление глюкозы, выделение лактата и пирувата изолированными сердцами крыс в коронарный проток.

По осям ординат — потребление глюкозы (а) и выделение лактата (б) и пирувата (в) (в ммоль на 1 кг массы миокарда за 1 мин и на 1 мм рт. ст. развиваемого изолированным сердцем давления).

ной зависимости линейного характера ( $r_{\text{ЛСТ}} = -0,89$ ;  $r_{\text{МДГ}} = -0,81$ ;  $r_{\text{ПНКЛД}} = -0,84$ ;  $p < 0,01$ ).

Изменение фосфолипидного состава мембран нарушало энергетическое обеспечение сократительной функции изолированного сердца. Как видно из рис. 2, в течение 1-х суток и особенно через 1,5 ч после оживления эффективность использования глюкозы значительно снижается. Даже при благоприятном течении постреанимационного периода на единицу выполняемой функции изолированные сердца затрачивали глюкозы в 2—2,5 раза больше, чем в контроле, а при неблагоприятном — в 3,5—5 раз. Выделение лактата и особенно пирувата увеличивалось и превышало контрольный уровень в несколько раз. Подобные изменения в углеводном обмене свидетельствуют о повреждении митохондрий и разобщении окисления с фосфорилированием, что может быть связано с нарушением фосфолипидного состава мембран, а именно с уменьшением на 35—43 % содержания кардиолипина (см. табл. 2).

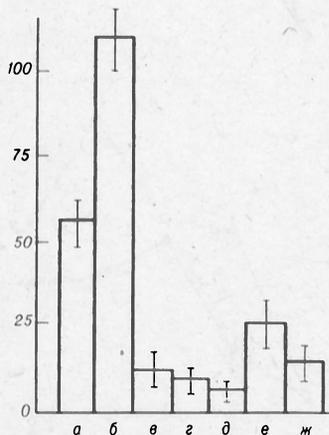


Рис. 3. Влияние острой смертельной кровопотери и препаратов, стабилизирующих мембраны, на постреанимационные нарушения ритма сердца.

По оси ординат — количество extrasystол, регистрируемых в первые 30 мин после оживления. Буквами обозначены серии опытов: а, б — животных с благоприятным и неблагоприятным течением постреанимационного периода соответственно; в — животные, получавшие до кровопотери ГОМК; г — нолюл; д — индерал; е — гутимин; ж — изоптин.

Известно, что при снижении уровня кардиолипина в митохондриях уменьшается содержание цитохрома  $a_1 + a_3$ , сукцинатдегидрогеназы, НАД· $H_2$ -оксидазы [16], разобщается окислительное фосфорилирование и в конечном итоге нарушается энергетический обмен в сердце.

Уменьшение на 17—25 % ФС, определяющего  $Na^+$ -зависимое фосфорилирование и  $K^+$ -зависимое дефосфорилирование [17] и регулирующего АТФазную активность [16], сказывается не только на нарушении биоэнергетики сердца, но и на функционировании мембранных ионных насосов и возникновении постреанимационных нарушений ритма (см. рис. 3). Видно, что даже при благоприятном течении восстановительного периода в первые 30 мин после возобновления сердечных сокращений регистрируется  $59 \pm 8$  экстрасистол, а при неблагоприятном —  $144 \pm 9,6$  экстрасистолы. В 15 % случаев экстрасистолия заканчивалась фибрилляцией желудочков. Выявлена прямая корреляционная зависимость между частотой экстрасистолии и содержанием ЛФХ в сердце ( $r = 0,87$ ;  $p < 0,01$ ). ЛФХ сам по себе обладает аритмогенным свойством, но может и опосредованно через повышение в сердце содержания ЦАМФ вызывать нарушения ритма [14]. Аритмогенный эффект ЛФХ обусловлен его способностью уменьшать максимум потенциала покоя и длительность потенциала действия, замедлять проводимость и увеличивать автоматию [13].

Таким образом, в постреанимационном периоде выявляются значительные количественные и качественные нарушения ФЛ сердца, что закономерно приводит к нарушению ритма, повышению проницаемости мембран, изменению активности мембрано локализованных ферментов и как следствие — к нарушению биоэнергетики сердца.

На 2-м этапе экспериментов с целью уменьшения постреанимационных нарушений фосфолипидного состава мембран мы использовали с профилактической целью препараты, стабилизирующие билипидный слой мембран. Из табл. 1 и 2 следует, что антигипоксанты ГОМК и гутимин, введенные до смертельной кровопотери, предупреждали постреанимационные нарушения в содержании как общих ФЛ, так и их фракций. Увеличивая содержание важнейших ФЛ миокарда почти до контрольного уровня, снижая концентрацию ЛФХ и ограничивая интенсивность ПОЛ, гутимин и ГОМК устраняли лизирующий эффект перекисных соединений и лизофосфолипидов на мембраны сердца, снимая тем самым их ингибирующее влияние на активность фосфолипидзависимых ферментов. В результате этого выделение ферментов изолированным сердцем в коронарный проток снизилось почти до контрольного уровня, а потребление глюкозы и выделение лактата и пирувата лишь на 10—14 % превышали контрольный уровень. Оба антигипоксанта уменьшали нарушения ритма: у животных, защищенных ГОМК, число экстрасистол снизилось до  $13 \pm 5,9$ , а гутимином — до  $8 \pm 2,3$  (см. рис. 3).

Индерал, ограничивая опосредованно через блокаду  $\beta$ -адренорецепторов чрезмерную активацию ПОЛ и накопление ГПЛ, оказывающих мембрано-деструктивное действие, предупреждал характерное для постреанимационного периода снижение уровня ФЛ в сердце. Уменьшалось содержа-

ние ЛФХ, а концентрация ФХ, ФЭА, ФС и кардиолипина в сердечной мышце крыс, защищенных индералом, достоверно превышала уровень этих фракций у животных, не получавших препарат, и не отличалась от контроля (см. табл. 1 и 2). Это сказывалось на работе сердца: заметно уменьшалось количество экстрасистол (см. рис. 3), а у 42 % животных они вообще отсутствовали; выделение АСТ в коронарный проток снизилось до  $18,6 \pm 2,7$  ммоль/(ч·кг), МДГ — до  $16,3 \pm 1,7$  ммоль/(ч·кг), а РНКазы — до  $(1780 \pm 142) \times 10^3$  ед/кг. Потребление глюкозы на единицу выполняемой функции уменьшилось до  $85,8 \pm 5,7$  ммоль/(кг·мин) [в контроле  $78,0 \pm 6,0$  ммоль/(кг·мин)].

Синтетический антиоксидант ионол, обладая выраженной антирадикальной активностью, в 2 раза снижал в сердце содержание ГПЛ и на 63 % увеличивал АОА липидов (см. табл. 1). Очевидно, способностью ионола ограничивать интенсивность процессов ПОЛ и ингибировать фосфолипазы [11] и объясняется относительная сохранность ФЛ и их фракций в сердцах животных, перенесших клиническую смерть. Нормализуя содержание общих ФЛ и в особенности таких фракций, как ФХ и ФЭА, ионол предотвращает характерное для постреанимационного периода ингибирование мембранолокализированных ферментов, в частности ферментов цикла Кребса. Этим фактом можно объяснить повышение эффективности использования глюкозы изолированными сердцами животных, защищенных ионолом. На единицу выполняемой функции они затрачивали глюкозы на 29 % меньше по сравнению с сердцами животных, не получавших ионол, и в 2 раза меньше выделяли в коронарный перфузат пирувата. Нормализуя содержание ФЛ в сердце, ионол предотвращал фибрилляцию желудочков и уменьшал количество экстрасистол до  $6 \pm 2,2$  (см. рис. 3).

Предварительное введение изоптина, ограничивающего приток  $Ca^{2+}$  в кардиомиоциты за счет специфической блокады  $Ca$ -каналов и тем самым предотвращающего активацию фосфолипазы  $A_2$  в кардиомиоцитах оживленных животных, практически полностью устраняло количественные и качественные нарушения ФЛ сердца (см. табл. 1 и 2). В итоге выделение ферментов в коронарный проток изолированными сердцами снижалось в 1,5—2 раза по сравнению с таковым у животных, не получавших изоптин до клинической смерти; расход глюкозы на единицу выполняемой функции снизился до  $91,4 \pm 7,6$  ммоль/(кг·мин); экстрасистолы регистрировались только у 60 % оживляемых крыс (без препарата — у 90 % животных), а их количество снижалось до  $15 \pm 5,9$  (см. рис. 3).

Таким образом, клиническая смерть от острой кровопотери и последующее оживление организма вызывают значительные изменения в фосфолипидном составе сердечной мышцы, обуславливающие возникновение нарушений ритма, повышение проницаемости мембран и нарушение его биоэнергетики. Уменьшить постреанимационный катаболизм ФЛ можно с помощью предварительно вводимых препаратов, обладающих мембранопротекторными свойствами.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Абидов А. А., Алматов К. Т., Марталипов Д. Т. и др. // Всесоюзный биохимический съезд, 5-й: Тезисы докладов.— М., 1985.— Т. 3.— С. 94—95.
2. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.— М., 1972.
3. Волков А. В., Кожура В. Л. // Пат. физиол.— 1968.— № 6.— С. 22—26.
4. Грибанов Г. А., Сергеев С. А., Алексеенко А. С. // Лаб. дело.— 1976.— № 12.— С. 724—727.
5. Долгих В. Т. // Бюл. Сиб. отд. АМН СССР.— 1984.— № 4.— С. 10—17.
6. Долгих В. Т. // Пат. физиол.— 1986.— № 3.— С. 23—27.
7. Долгих В. Т. // Вопр. мед. химии.— 1988.— № 1.— С. 33—38.
8. Долгих В. Т., Редькин Ю. В., Соколова Т. Ф. и др. // Пат. физиол.— 1987.— № 1.— С. 37—41.
9. Конвай В. Д., Леонтьев В. К., Брызгалова В. П. // Хабаровский мед. ин-т: Науч. конф., 4-я: Материалы.— Хабаровск, 1972.— С. 144—145.
10. Конвай В. Д., Лукошкин А. В., Поспелов В. С. // Пат. физиол.— 1987.— № 5.— С. 57—59.
11. Меерсон Ф. З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца.— М., 1984.
12. Овчинников И. В., Ходтаев М. М., АLEANOV A. A. и др. // Мед. журн. Узбекистана.— 1978.— № 11.— С. 38—42.
13. Corr P. B., Cross R. W., Sobel B. E. // Circulat. Res.— 1984.— Vol. 55, N 2.— P. 135—154.
14. Cross R. W., Grafford W. A., Sobel B. E. et al. // Circulation.— 1980.— Vol. 62, N 4.— Pt 2.— P. 280.
15. Fallen E. T., Elliott W. G., Gortin R. // J. appl. Physiol.— 1967.— Vol. 22, N 4.— P. 836—839.
16. Hauser H., Phillips M. C. // Progr. Surf. Membr. Sci.— 1979.— Vol. 13.— P. 297—413.
17. Langer G. A. // J. molec. cell. Cardiol.— 1980.— Vol. 12.— P. 231.
18. Montfoort A., Rutten-van Besyterveld C. C. M., Wortelboer M. R. // Abh. Akad. Wiss. DDR. Abt. Math. Naturwiss. Techn.— 1984.— N 1.— S. 207—212.
19. Witbers K. H., Halst C. W., von Benthem M. et al. // Biochim. biophys. Acta.— 1979. Vol. 554.— P. 400—409.

Поступила 22.08.89

## EFFECT OF ACUTE LETHAL HEMORRHAGE ON POSTRESUSCITATION ALTERATIONS IN HEART PHOSPHOLIPIDS AND THEIR PROPHYLAXIS

V. T. Dolgikh

Medical School, Omsk

Acute lethal hemorrhage and resuscitation led to a decrease in content of phosphatidyl-choline, -ethanolamine, -serine and cardiolipin but increased lysophosphatidyl choline in rat heart muscle. Within the first week catabolism of phospholipids predominated, maximal rate of which was detected at the end of the first day. Within the subsequent three days phospholipid composition of cardiomyocyte membranes was gradually normalized. Qualitative and quantitative alterations in the membranes phospholipid composition correlated with frequency of heart rhythm impairments, with increased consumption of glucose by functioning heart as well as with amount of enzymes, liberated from isolated isometrically contracting heart into coronary circulation. Preadministration of  $\gamma$ -hydroxybutyric acid, guthimine, inderale, ionol and isophtine enabled to decrease or even to normalize the cardiomyocyte membranes phospholipid composition.

С. В. Гульник, Г. Феохарус, Н. В. Варченко,  
Г. И. Лавренова, В. М. Степанов

## ДЕЙСТВИЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* НА НЕКОТОРЫЕ БЕЛКИ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА. РАСЩЕПЛЕНИЕ $\alpha_1$ -АНТИТРИПСИНА И КИСЛОСТОБИВНОГО ИНГИБИТОРА СЕРИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ

МГУ им. М. В. Ломоносова

Вирулентность патогенных бактерий определяется рядом факторов. В последнее время все большее внимание исследователей привлекают протеиназы патогенных организмов как возможные факторы патогенности. При этом механизм патогенного действия протеиназ может быть различным. Показано, например, что эластаза синегнойной палочки способна гидролизовать основные структурные белки и гликопротеины [7, 8, 10], нарушая целостность эпителия и сосудов и приводить к некрозу тканей. Протеолитические ферменты бактерий могут снижать иммунный ответ макроорганизма, расщепляя иммуноглобулины [3, 5, 9, 12]. Показано также, что протеиназы *P. aeruginosa* и *S. marcescens* способны гидролизовать ингибиторы протеиназ, содержащиеся в тканях верхних дыхательных путей [3, 13—15, 17]. Инактивация этих ингибиторов во время инфекции может приводить к нарушению протеиназно-ингибиторного баланса в организме хозяина и усилению воспалительного процесса за счет активации эндогенных протеиназ.

В связи с этим мы исследовали действие основной протеиназы *L. pneumophila* — металлопротеиназы — на некоторые ингибиторы протеиназ сыворотки крови —  $\alpha_1$ -антитрипсин и кислото-стабильный ингибитор (КСИ) сериновых протеиназ.

Методика. В работе использовали: трис HCl-буфер (НПО «Биолар», Олайне), акриламид, ДС—Na, меркаптоэтанол, термозин, глицин, персульфат аммония, куасси ярко-голубой G-250 («Serva», ФРГ); N, N'-метиленисакриламид, N, N', N'-тетраметилэтилендиамин, сахарозу, диэтилбарбитуровую кислоту, куасси ярко-голубой R-250 («Reanal», Венгрия); агарозу типа I («Sigma», США); азоказеин (Вильнюсский опытно-промышленный завод ферментных препаратов); о-фенадроллин, трипсин («Спофа», ЧСФР); этиловый эфир N-бензоиларгинина («Koch-Light», Великобритания). Моноспецифическая антисыворотка кролика к  $\alpha_1$ -антитрипсину была любезно предоставлена Т. С. Котовой (НИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Минздрава СССР), нормальная сыворотка крови человека — В. В. Куликовым (ИИМБ Минздрава СССР), КСИ сериновых протеиназ — О. Г. Оглоблиной (ВКНЦ АМН СССР), за что авторы выражают им глубокую признательность.

Выделение металлопротеиназы и определение активности по синтетическому пептидному субстрату DNP—Gly—Gly—Pe—Arg проводили как описано ранее. Протеолитическую активность по расщеплению азоказеина определяли в 0,1 М аммонийно-ацетатном буфере, pH 6,8 по методу [4]. Для расчета удельной активности величину активности относили к поглощению раствора фермента при 280 нм.

Антитриптическую активность ингибиторов определяли по ингибированию эстеразной активности трипсина, используя в качестве субстрата этиловый эфир N-бензоиларгинина [1]. В 2 кюветы спектрофотометра, содержащие по 1,9 мл 50 мМ трис-HCl-буфера pH 8,0, добавляли по 0,1 мл раствора трипсина (0,1 мг/мл) в 2,5 мМ HCl, содержащей 10 мМ хлорида кальция. В одну из кювет добавляли 5 мкл раствора КСИ

(1 мг/мл) или 10 мкл сыворотки крови. Реакцию начинали добавлением в каждую из кювет 1 мл 1,5 мМ раствора этилового эфира N-бензоиларгинина в 50 мМ трис-HCl буфере pH 8,0. Измеряли прирост оптической плотности в опытных пробах при 253 нм против пробы, содержащей 1,5 мМ раствор этилового эфира N-бензоиларгинина в том же буфере, делая отсчеты через 1 мин в течение 5 мин. Из линейного хода кривой роста оптической плотности находили прирост оптической плотности ( $A_{253}$ ) за 1 мин для обеих проб. Антитриптическую активность находили по формуле.

$$\frac{A_0 - A_1}{P} \cdot 2,73,$$

где  $A_0$  — прирост оптической плотности при 253 нм пробы, не содержащей ингибитор, за 1 мин;  $A_1$  — прирост оптической плотности при 253 нм пробы, содержащей ингибитор, за 1 мин;  $P$  — содержание в пробе КСИ (в мг) или сыворотки крови (в мл); 2,73 — коэффициент пересчета  $A_{253}$  в мкмоль гидролизованного субстрата.

Антитриптическую активность выражали в ингибиторных единицах (ИЕ) в 1 мг ингибитора или 1 мл сыворотки крови. 1 ИЕ соответствует количеству ингибитора, тормозящему гидролиз 1 мкмоль субстрата за 1 мин в условиях определения.

Диск-электрофорез проводили в 15% полиакриламидном геле в присутствии 0,1% ДС—Na в модифицированной системе Лэммли [11]. Перекрестный иммуноэлектрофорез сыворотки крови проводили в геле 1% агарбзы типа I («Sigma», США) на пластинках 4×4,5 см при pH электродного буфера 8,6 (0,02 М трис-веронал) [6]. Во втором направлении использовали моноспецифическую антисыворотку кролика к  $\alpha_1$ -антитрипсину.

Для исследования действия металлопротеиназы на очищенный КСИ к раствору КСИ (1 мг/мл) в 0,05 М трис-HCl буфере pH 7,0 добавляли протеиназу (1 мг/мл) в том же буфере (соотношение фермент/субстрат 1:100 по массе). Реакционные и контрольные образцы, не содержащие протеиназу, инкубировали при 37 °С, отбирая пробы через разные промежутки времени. Реакцию останавливали прибавлением 15 мМ о-фенадроллина в 0,05 М трис-HCl-буфере pH 7,0 до концентрации 3 мМ в пробе. Пробу исследовали с помощью электрофореза и определяли антитриптическую активность.

Для исследования действия металлопротеиназы на  $\alpha_1$ -антитрипсин к нормальной сыворотке крови человека добавляли раствор металлопротеиназы (1 мг/мл) в 0,05 М трис-HCl-буфере pH 7,0 до соотношения фермент/суммарный белок сыворотки 1:300, 1:900, 1:1500. Реакционную смесь инкубировали при 37 °С, отбирая пробы через разные промежутки времени. Реакцию в пробах останавливали о-фенадроллином, как описано выше. Измеряли антитриптическую активность проб. Часть проб анализировали с помощью перекрестного иммуноэлектрофореза. Для этого пробы разбавляли в 3 раза водой, используя для электрофореза по 2 мкл полученной смеси.

Результаты и обсуждение.  $\alpha_1$ -антитрипсин ( $\alpha_1$ -ингибитор протеиназ) является одним из основных ингибиторов протеиназ плазмы крови. Его содержание в плазме составляет 2—4 мг/мл. Физиологическая роль  $\alpha_1$ -антитрипсина заключается главным образом в контроле активности эластазы — сериновой протеиназы, секретируемой лейкоцитами [16]. При воспалительных процессах в очаге воспаления резко возрастает концентрация лейкоцитов. Протеиназы, секретируемые лейкоцитами, способны осуществлять неконтролируемый гидролиз тканевых белков. Три ингибитора плазмы крови —  $\alpha_1$ -антитрипсин,  $\alpha_2$ -макроглобулин и  $\alpha_1$ -антихимотрипсин — осуществляют защиту от воспалительного и деструктивного действия протеиназ лейкоцитов.

Мы инкубировали сыворотку крови человека с металлопротеиназой *L. pneumophila* в соотношениях 300:1, 900:1 и 1500:1 в расчете на общее содержание белка в сыворотке.

За ходом расщепления следили по снижению антитриптической активности сыворотки, которую определяли по торможению расщепления трипсином этилового эфира N-бензоиларгинина [1].

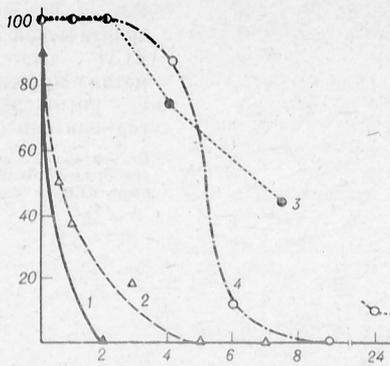


Рис. 1. Изменение антитриптической активности сыворотки крови человека под действием металлопротеиназы *L. pneumophila* и термолизина.

Соотношение фермент / суммарный белок сыворотки 1:300 (1), 1:900 (2), 1:1500 (3). Действие термолизина изучали при соотношении фермент / суммарный белок сыворотки 1:300 (4). По оси абсцисс — время (в ч); по оси ординат — остаточная антитриптическая активность (в %).

В этих условиях антитриптическая активность сыворотки связана практически исключительно с содержанием  $\alpha_1$ -антитрипсина, поскольку другой основной ингибитор сыворотки крови —  $\alpha_2$ -макроглобулин — не подавляет активность трипсина по низкомолекулярному субстрату. Зависимость снижения антитриптической активности от времени инкубации сыворотки крови и металлопротеиназы, взятых в различных соотношениях, представлена на рис. 1, из которого видно, что при соотношении металлопротеиназы к суммарному белку сыворотки 1:300 антитриптическая активность через 1 ч инкубации составляет менее половины исходной, а через 2 ч достигает нуля. При соотношении металлопротеиназа/суммарный белок сыворотки 1:900 антитриптическая активность падает до нуля через 5 ч инкубации. При соотношении 1:1500 антитриптическая активность остается постоянной в течение первых 2 ч, после чего происходит прогрессирующее снижение ее до 10 % к 24 ч инкубации. Последний результат указывает, по-видимому, на ингибирование металлопротеиназы одним из ингибиторов сыворотки крови. Этот факт более подробно будет обсужден далее.

Для того чтобы доказать, что металлопротеиназа расщепляет  $\alpha_1$ -антитрипсин в сыворотке

крови, реакционная смесь была подвергнута перекрестному иммуноэлектрофорезу с использованием во втором направлении моноспецифической антисыворотки кролика к  $\alpha_1$ -антитрипсину (рис. 2). Для иммуноэлектрофореза были взяты 3 пробы реакционной смеси, в которых антитриптическая активность составляла соответственно 100, около 50 и 0 % (см. рис. 1, кривая 2).

Из рис. 2 видно, что происходит постепенное уменьшение пика  $\alpha_1$ -антитрипсина, и после 7 ч инкубации пик полностью исчезает. Это согласуется с результатами изменения антитриптической активности сыворотки, согласно которым за это время происходит полная инактивация  $\alpha_1$ -антитрипсина. Полное исчезновение пика  $\alpha_1$ -антитрипсина свидетельствует о расщеплении большинства антигенных детерминант ингибитора. Этот результат представляется необычным, поскольку другие металлопротеиназы, выделенные из культуральной жидкости *P. aeruginosa* [14] и *S. marcescens* [17], а также некоторые другие протеолитические ферменты [17] расщепляют в  $\alpha_1$ -антитрипсине преимущественно единственную пептидную связь в районе остатка метионина активного центра. Такое расщепление, как показано для металлопротеиназы (эластазы) *P. aeruginosa*, не вызывает изменения антигенных свойств ингибитора [14]. По-видимому, протеолиз  $\alpha_1$ -антитрипсина металлопротеиназой *L. pneumophila* происходит гораздо глубже.

Как указывалось выше, в сыворотке крови человека содержатся, кроме  $\alpha_1$ -антитрипсина, и другие ингибиторы протеиназ, в частности  $\alpha_2$ -макроглобулин, количество которого в сыворотке приблизительно равно количеству  $\alpha_1$ -антитрипсина.  $\alpha_2$ -Макроглобулин ингибирует большинство протеиназ всех 4 классов, причем молекула протеиназы оказывается физически включенной внутрь объемистой молекулы  $\alpha_2$ -макроглобулина. Высокомолекулярные субстраты не могут достичь активного центра протеиназы из-за стерических затруднений. В то же время включенная в комплекс протеиназа способна гидролизовать низкомолекулярные субстраты, что свидетельствует о том, что активный центр фермента при таком ингибировании не заблокирован [16].

Для проверки предположения о возможном ингибировании металлопротеиназы *L. pneumophila*

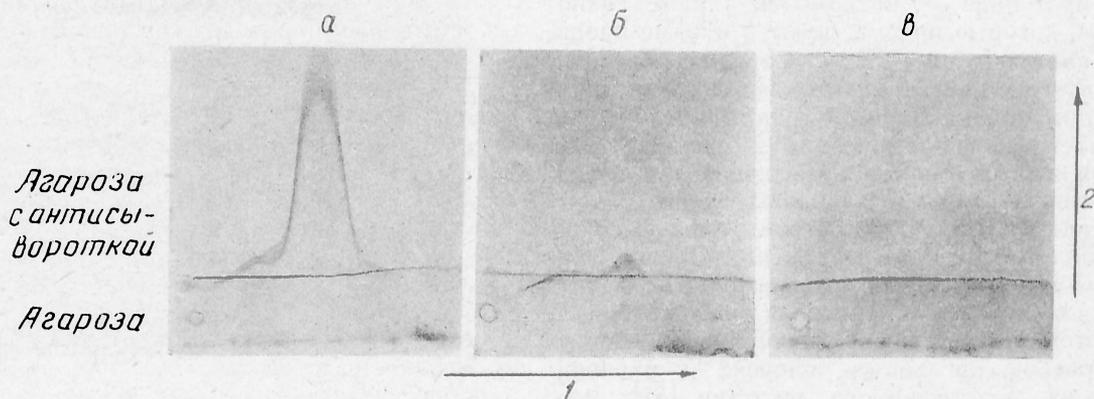


Рис. 2. Перекрестный иммуноэлектрофорез в геле 1% агарозы сыворотки крови человека, инкубированной с металлопротеиназой *L. pneumophila*.

Соотношение фермент / суммарный белок сыворотки 1:900 до инкубации (А) и через 30 мин (Б) и 7 ч (В) инкубации. Гель второго направления содержал моноспецифическую антисыворотку кролика к  $\alpha_1$ -антитрипсину.

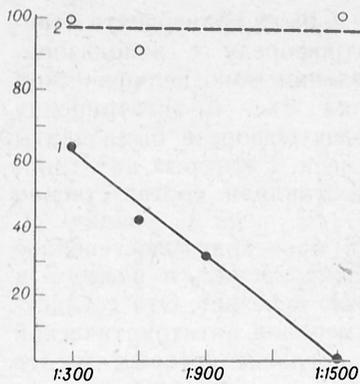


Рис. 3. Влияние сыворотки крови человека на активность металлопротеиназы *L. pneumophila*.

Фермент инкубировали с сывороткой крови 10 мин при 20 °С и определяли активность по азоказеину (1) и DNP—Gly—Gly—Phe—Arg (2). По оси абсцисс — соотношение фермент / суммарный белок сыворотки; по оси ординат — активность фермента (в % от исходной).

сывороткой крови человека (по-видимому,  $\alpha_2$ -макроглобулином) мы измеряли активность фермента по высокомолекулярному и низкомолекулярному субстратам в присутствии различных концентраций сыворотки крови (рис. 3). При этом при различных соотношениях фермент/сыворотка крови не наблюдалось снижения активности металлопротеиназы по низкомолекулярному субстрату DNP—Gly—Gly—Phe—Arg, в то время как активность по высокомолекулярному субстрату — азоказеину — снижалась до нуля при соотношении металлопротеиназа/сумма общего белка сыворотки 1:1500. Это согласуется с представлениями о механизме ингибирования протеолитических ферментов  $\alpha_2$ -макроглобулином.

В связи с этим сохранение антитриптической активности сыворотки крови в течение первых 2 ч инкубации с металлопротеиназой в соотношении 1500:1 можно объяснить, вероятно, ингибированием фермента  $\alpha_2$ -макроглобулином. При меньших концентрациях сыворотки фермент ингибируется не полностью. Металлопротеиназа постепенно освобождается из комплекса с  $\alpha_2$ -макроглобулином, по-видимому, расщепляя его, и начинает инактивировать  $\alpha_1$ -антитрипсин.

Действие термолизина на  $\alpha_1$ -антитрипсин в сыворотке крови изучали при соотношении фермент/суммарный белок 1:300 (см. рис. 1). Термолизин инактивирует  $\alpha_1$ -антитрипсин аналогичным образом. Первоначальная задержка инактивации может, вероятно, объясняться тем, что термолизин связан в комплекс с  $\alpha_2$ -макроглобулином, который расщепляется значительно медленнее, чем для металлопротеиназы *L. pneumophila*.

КСИ протеиназ — низкомолекулярные гликопротеиды, которые присутствуют в плазме крови, а также синтезируются местно в органах и тканях. Устойчивость к нагреванию в кислой среде является общим признаком этой группы ингибиторов и отражает особенности их структуры. Все КСИ являются кислыми белками, имеют небольшие размеры молекул ( $M=5000-30\,000$ ), много (5—6) дисульфидных связей, характеризуются высоким содержанием углеводов. КСИ ингибируют трипсин, химотрипсин, плазмин, протеиназы гранулоцитов, в том числе эластазу, и катепсин G и являются эффективным внесосудистым защитным барьером организма человека и млекопитающих от деструктивного действия этих протеиназ [2].

Мы исследовали действие металлопротеиназы *L. pneumophila* на КСИ человека, относящийся к группе И- $\alpha$ -И, который образуется в организме

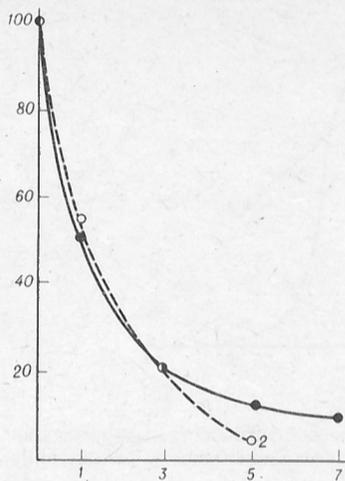


Рис. 4. Изменение антитриптической активности КСИ под действием металлопротеиназы *L. pneumophila* (1) и термолизина (2).

По оси абсцисс время (в ч); по оси ординат: остаточная активность КСИ (в %).

из интер- $\alpha$ -ингибитора трипсина плазмы крови в результате ограниченного протеолиза [2]. Результаты измерения антитриптической активности представлены на рис. 4. Видно, что уже через 1 ч инкубации с ферментом активность КСИ снижается более чем в 2 раза и на 90 % за 5 ч.

Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии ДС—Na показал, что за 1 ч металлопротеиназа расщепляет КСИ на фрагменты с мол. м. 7000, 9000 и 12 000 (рис. 5). Термолизин действует на КСИ аналогично (см. рис. 4).

Таким образом, металлопротеиназа расщепляет некоторые ингибиторы сыворотки крови, при этом они теряют способность ингибировать трипсин.

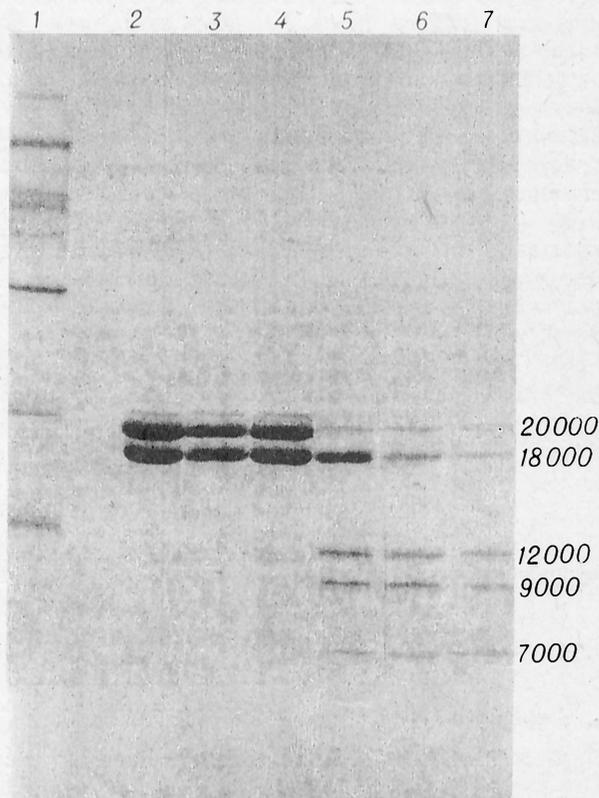


Рис. 5. Электрофорез КСИ, инкубированного с металлопротеиназой *L. pneumophila*.

1 — смесь белков-стандартов; 2, 3 — КСИ (15 мкг), инкубированный 5 ч без фермента; 4—7 — КСИ, инкубированный с металлопротеиназой 0, 1, 3 и 5 ч соответственно. Справа указаны молекулярные массы КСИ и фрагментов его расщепления.

Расщепление ингибиторов *in vivo* может вызывать нарушение протеиназно-ингибиторного баланса в организме хозяина и приводить к усилению воспаления.

Результаты исследований показывают, что металлопротеиназа *L. pneumophila* в каталитических количествах способна расщеплять ряд физиологически важных белковых компонентов сыворотки крови человека, включая сывороточный альбумин, иммуноглобулин G и некоторые ингибиторы сериновых протеиназ. Однако это свойство присуще не только ей, поскольку другая бактериальная протеиназа — термолизин — гидролизует исследованные субстраты аналогичным образом, хотя и с меньшей скоростью.

По-видимому, основной функцией металлопротеиназы *L. pneumophila* *in vivo* является генерирование питательных компонентов, необходимых для жизнедеятельности бактерии из белковых субстратов, хотя не исключено, что она может выводить из строя некоторые защитные механизмы организма хозяина.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Наргикова В. Ф., Пасхина Т. С. // Биохимия. — 1970. — Т. 35, № 1. — С. 187—195.
2. Оглоблина О. Г. // Там же. — 1982. — Т. 47, № 10. — С. 1587—1600.
3. Catanese J., Kress L. F. // Biochim. biophys. Acta. — 1984. — Vol. 789, N 1. — P. 37—43.
4. Dod B., Balassa G., Raulet E., Jeunoda V. // Molec. gen. Genet. — 1978. — Vol. 163, N 1. — P. 45—56.
5. Döring G., Obernesser H.-J., Botzenhart K. // Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. A. — 1981. — Bd 249. — S. 89—98.
6. Grubb A. O. // Scand. J. Immunol. — 1983. — Vol. 17, N 10. — P. 113—124.
7. Heck L. W., Morihara K., McRae W. B., Miller E. J. // Infect. a. Immun. — 1986. — Vol. 51, N 1. — P. 115—118.
8. Heck L. W., Morihara K., Abrahamson D. R. // Ibid. — Vol. 54, N 1. — P. 149—153.
9. Holder I. A., Wheeler R. // Canad. J. Microbiol. — 1984. — Vol. 30, N 9. — P. 1118—1124.
10. Kessler E., Kennah H. E., Brown S. I. // Invest. Ophthalm. — 1977. — Vol. 16, N 5. — P. 484—497.
11. Laemmly U. K. // Nature. — 1970. — Vol. 255, N 5259. — P. 680—685.
12. Molla A., Matsumoto K., Oyamada I. et al. // Infect. a. Immun. — 1986. — Vol. 53, N 3. — P. 522—529.
13. Molla A., Oda T., Maeda H. // J. Biochem. — 1987. — Vol. 101, N 1. — P. 199—205.
14. Morihara K., Tsuzuki H., Harada M., Iwata T. // Ibid. — 1984. — Vol. 95, N 3. — P. 795—804.
15. Tournier J. M., Jacquot J., Puchelle E., Brieth J. G. // Amer. Rev. resp. Dis. — 1985. — Vol. 132, N 3. — P. 524—528.
16. Travis J., Salvesen G. S. // Ann. Rev. Biochem. — 1983. — Vol. 52. — P. 655—709.
17. Virca G. D., Lyerly D. M., Kreger A. S., Travis J. // Biochim. biophys. Acta. — 1982. — Vol. 704, N 1. — P. 267—271.

Поступила 27.06.89

#### EFFECT OF METALLOPROTEINASE FROM LEGIONELLA PNEUMOPHILA ON SOME HUMAN BLOOD SERUM PROTEINS. HYDROLYSIS OF $\alpha_1$ -ANTITRYPSIN AND ACID STABLE INHIBITOR OF SERINE PROTEINASES

S. V. Gulnik, G. Feoharus, N. V. Varchenko, G. I. Lavrenova, V. M. Stepanov

M. V. Lomonosov State University, Moscow

Antitryptic activity of human blood serum was decreased after incubation with metalloproteinase from *Legionella pneumophila*. The enzymatic activity depends on the time of incubation as well as on the ratio between the enzyme content and

blood serum total protein. Cross immunoelectrophoresis, involving monospecific rabbit antiserum towards the  $\alpha_1$ -antitrypsin, demonstrated highly effective hydrolysis of  $\alpha_1$ -antitrypsin by the metalloproteinase. As shown by polyacrylamide gel electrophoresis the metalloproteinase hydrolyzed acid stable inhibitor of serine proteinases into fragments with distinct loss of the inhibitor activity. Thermolysin hydrolyzed similarly the proteins studied but at a lower rate. The metalloproteinase from *L. pneumophila* appears to be mainly responsible for production of utilizable components from protein substrates involved in vital activity of the bacteria. It may not be excluded that the enzyme is able to impair some host protective mechanisms.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ. 1991

УДК 616-001.17-003.923-053.2-074:616.633.747

Е. А. Козлов, Г. И. Багдатлишвили, Н. Н. Прозоровская, А. А. Дельвиц

#### СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСКРЕЦИИ ОКСИПРОЛИНА С МОЧОЙ У ДЕТЕЙ С ПОСЛЕОЖГОВЫМИ ГИПЕРТРОФИЧЕСКИМИ И КЕЛОИДНЫМИ РУБЦАМИ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

На ранних стадиях восстановления кожи после повреждения обычно наблюдается некоторая тенденция к образованию избыточной ткани, но впоследствии благодаря процессу ремоделирования на месте повреждения остаются только участки депигментации или нормальной зрелый рубец [11]. Однако в некоторых случаях вновь образующаяся ткань продолжает разрастаться, захватывая площадь, превышающую первоначальное повреждение, что приводит к образованию патологических келоидных или гипертрофических рубцов.

Отмечено, что гипертрофические рубцы увеличиваются в размерах только в течение нескольких месяцев после повреждения, тогда как келоидные рубцы продолжают расти в течение длительного срока, захватывая примыкающую к ним здоровую ткань [7]. Имеются данные о том, что образование келоидов может определяться наследственными факторами [10].

Однако до сих пор не разработаны надежные лабораторные тесты, которые позволили бы дифференцировать келоидные и гипертрофические рубцы на ранних этапах их формирования.

Гистологическая картина патологических рубцов характеризуется избыточным образованием соединительной ткани, в которой преобладает коллаген [4]. Было показано, что этот процесс может быть связан как с увеличением синтеза коллагена фибробластами [5, 6, 8], так и со снижением скорости деградации коллагена [4, 9, 13].

Увеличение в рубцовой ткани содержания растворимого коллагена и повышение активности пролилгидроксилазы указывают на усиленный синтез коллагена, а нормальная или несколько увеличенная активность нейтральной коллагеназы свидетельствует, что развитие рубца, очевидно, не является следствием подавления катаболизма [7].

Мы провели сравнительное исследование катаболизма коллагена у больных с келоидными и

Таблица 1

Характеристика больных с послеожоговыми рубцами ( $M \pm \sigma$ )

Показатель	Гипертрофический рубец	Келоидный рубец
Число больных	16	9
Возраст больных, годы	$6,6 \pm 4,0$	$4,3 \pm 1,9$
Площадь рубца, % от площади тела	$4,8 \pm 6,3$	$6,2 \pm 4,8$
Давность рубца, годы после ожога	$3,5 \pm 3,3$	$2,4 \pm 1,9$

гипертрофическими рубцами на основании определения продуктов деградации коллагена, экскретируемых с мочой, а именно общего и полипептидосвязанного оксипролина.

**Методика.** Экскреция оксипролина с мочой была исследована у 25 детей с послеожоговыми рубцами, характеристика которых дана в табл. 1. Контрольную группу составили 10 здоровых детей сходного возраста.

Для анализа использовали утреннюю порцию мочи, собранную после соблюдения бесколлагеновой диеты на протяжении предшествующих суток. Мочу центрифугировали 5 мин при 10 800 г, и 1 мл надосадочной жидкости наносили на предварительно откалиброванную колонку ( $15 \times 250$  мм), заполненную сефадексом G-15, и проводили элюцию дистиллированной водой. На выходе с колонки оптическую плотность элюата регистрировали при 280 нм и, исходя из калибровки, собирали 2 фракции. Фракция 1 (Ф1) содержала полипептиды с мол. массой более 1500, фракция 2 (Ф2) — олигопептиды и свободный оксипролин. Фракции лиофилизировали и гидролизывали в 6 н. HCl в течение 22 ч при 105 °C. Гидролизат высушивали, остаток растворяли в воде и в растворе определяли содержание оксипролина по методу [2]. Использовали следующие показатели: отношение общего оксипролина к креатинину (обОп/Кр) и полипептидосвязанного оксипролина в материале первого пика к креатинину (ОпФ1/Кр), содержание которых выражали в ммоль/моль, и процентную долю ОпФ1 в общем оксипролине. Креатинин определяли по методу Поннера и соавт. на основании цветной реакции Яффе [3]. Хемотаксис клеток воспаления исследовали методом кожного окна по Ребуку [1].

**Результаты и обсуждение.** Результаты исследования экскреции оксипролина с мочой у детей с послеожоговыми патологическими рубцами представлены в табл. 2. У больных как с гипертрофическими, так и с келоидными рубцами величина обОп/Кр была выше ( $p < 0,01$  и  $p < 0,001$  соответственно), чем в контроле. Уровень полипептидосвязанного оксипролина у больных с келоидными рубцами в среднем был значимо выше нормы ( $p < 0,05$ ), тогда как относительная его доля не отличалась значимо от нормы. У больных с гипертрофическими рубцами наблюдалась обратная картина: средняя величина ОпФ1/Кр достоверно не отличалась от нормы, а относительная доля полипептидосвязанного оксипролина была значимо ниже нормы ( $p < 0,05$ ). Значимые различия между двумя типами рубцов зарегистриро-

Таблица 2

## Экскреция оксипролина с мочой у детей с послеожоговыми патологическими рубцами (средние значения и 95 % доверительный интервал)

Тип рубца	обОп/Кр	ОпФ1/Кр	ОпФ1, %
Гипертрофический ( $n=16$ )	79 (57,7—100,3)	14,5 (9,6—19,4)	16,9 (13,2—20,6)
Келоидный ( $n=9$ )	119,4 (68,6—170,2)	22,2 (11,4—33,0)	19,4 (12,6—26,2)
Контроль ( $n=10$ )	32,3 (34,1—52,5)	11,4 (8,6—14,2)	25,6 (22,2—29,0)

ваны только по величине ОпФ1/Кр ( $p < 0,05$ ).

У больных обеих групп отмечено широкое варьирование величин исследованных показателей, что могло быть обусловлено возрастом больных на момент обследования и возрастом больных в момент получения ожога; площадью и давностью послеожоговых рубцов, а также активностью клеток воспаления у обследованных.

Возраст больных с келоидными рубцами варьировал от 2 до 8 лет, а с гипертрофическими — от 1,8 до 13,5 лет. Корреляционный анализ выявил наличие слабой зависимости от возраста больных в момент исследования только показателя ОпФ1/Кр ( $r=0,516$ ) у больных с гипертрофическими рубцами, а у больных с келоидными рубцами была обнаружена слабая зависимость показателей обОп/Кр и ОпФ1/Кр от возраста в момент получения ожога ( $r=0,536$  и  $r=0,506$  соответственно).

Исследование зависимости показателей экскреции оксипролина от площади рубца (Sp) показало наличие прямой корреляции между Sp и обОп/Кр ( $r=0,974$ ), и ОпФ1/Кр ( $r=0,955$ ) только у больных с келоидными рубцами. Между тем анализ множественной регрессии позволил выявить довольно высокую обратную зависимость между давностью рубца (Trp) и обОп/Кр ( $r=-0,804$ ) и ОпФ1/Кр ( $r=-0,769$ ) только у больных с гипертрофическими рубцами.

Известно, что макрофаги могут продуцировать факторы, способные контролировать пролиферацию фибробластов и продукцию ими коллагена, а также факторы, участвующие в деградации коллагена за счет регуляции синтеза и активности специфической коллагеназы [12]. С целью выявления возможной связи между реакцией клеток воспаления на повреждение и характером развития рубцового процесса у большого мы исследовали хемотаксис клеток воспаления методом кожного окна (табл. 3). Больные с гипертрофическими рубцами имели 1-й и 2-й типы кожного окна, а больные с келоидными рубцами — только 3-й тип. Первый тип характеризовался снижением хемотаксиса макрофагов: через 24 ч не наблюдали смены клеточных фаз и макрофаги составляли 10—20 % от общего числа клеток при норме 70—80 %. Второй тип характеризовался сниженным хемотаксисом как макрофагов, так и нейтрофилов и отсутствием клеток воспаления через 6 ч; через 24 ч макрофаги составляли не более 10 %; были выражены дистрофические изменения в клетках воспаления (пикноз ядер, вакуолизация цитоплазмы). При 3-м типе кожного окна на фоне умеренно сниженного хемотаксиса макрофагов наблюдали большое количество эозинофилов (до 12 % при норме 1 %).

Таким образом, при гипертрофических рубцах (1-й и 2-й типы кожного окна) через 24 ч число макрофагов составляло  $7,6 \pm 6,1$  и было значимо ниже ( $p < 0,001$ ), а число нейтрофилов ( $92,4 \pm 6,1$ ) было значимо выше ( $p < 0,001$ ), чем при келоидных рубцах. Таким образом, отношение макрофаги/нейтрофилы (M/N) у больных с гипертрофическими рубцами было значимо ниже ( $p < 0,001$ ), чем у больных с келоидными рубцами ( $0,09 \pm 0,08$  и  $0,36 \pm 0,19$  соответственно).

Множественный регрессионный анализ позволил выявить у больных с келоидными рубцами

Картина кожного окна у детей с послеожоговыми гипертрофическими и келоидными рубцами ( $M \pm \sigma$ )

Тип рубца	Тип окна	Через 6 ч			Через 24 ч		
		Н	М	Э	Н	М	Э
Гипертрофический	1-й ( $n=6$ )	100	0	0	$88,0 \pm 7,2$	$12,0 \pm 4,9$	0
Гипертрофический	2-й ( $n=10$ )	Ед.	0	0	$95,1 \pm 3,6$	$4,9 \pm 3,6$	0
Келоидный	3-й ( $n=9$ )	$89,3 \pm 0,6$	$1,4 \pm 0,6$	$8,1 \pm 1,1$	$67,8 \pm 8,3$	$22,8 \pm 8,2$	$9,4 \pm 1,1$

Примечание. В скобках — число больных. Н — нейтрофилы, М — макрофаги, Э — эозинофилы; Ед. — единичные в поле зрения.

довольно высокую, статистически достоверную корреляцию между показателями М/Н и ОпФ1/ОпФ2 ( $r=0,855$ ). У больных с гипертрофическими рубцами такой зависимости не обнаружено. Это дает некоторые основания для предположения, что взаимодействие макрофагов, нейтрофилов и, возможно, эозинофилов может играть определенную роль в регуляции процесса деградации коллагена.

На основании результатов проведенного исследования можно сделать следующие выводы. Образование послеожоговых патологических рубцов приводит к повышению уровня экскреции продуктов деградации коллагена, причем степень этого повышения определяется площадью и давностью рубца. При гипертрофических рубцах уровень экскреции продуктов метаболизма коллагена обратно коррелирует с давностью рубца, что указывает на тенденцию к ослаблению метаболизма коллагена этого типа рубца по мере его старения. У больных с келоидными рубцами экскреция продуктов обмена коллагена с мочой определяется площадью рубца и мало зависит от его давности.

По данным литературы, в своем основном состоянии фибробласты проявляют невысокую синтетическую активность, которая контролируется преимущественно путем взаимодействия клеток с окружающими компонентами клеточного матрикса. Однако при воспалении в результате ожога инициируется цикл изменений метаболических процессов в фибробластах, находящихся в очаге повреждения. Начавшийся в результате воспаления фибротический ответ после образования грануляционной ткани и перестройки внеклеточного матрикса переходит в фазу тканевого рубца, который напоминает нормальную соединительную ткань. В конечном итоге в результате циклически протекающей смены биологической активности фибробластов в очагах воспаления происходит репарация поврежденной ткани и фибробласты возвращаются в исходное метаболическое состояние.

Как косвенно свидетельствуют наши наблюдения, в случае гипертрофических рубцов их рост, по-видимому, со временем затихает, тогда как рост келоидов продолжается. При этом заметную роль в изменениях функций фибробластов, присутствующих в месте формирования рубцовой ткани, играет количественный и качественный состав клеток воспаления (макрофаги, гранулоциты, лимфоциты).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Державин В. М., Казанская И. В., Вишневикий Е. Л., Гусев Б. С. // Диагностика урологических заболеваний у детей. — М., 1984. — С. 79.

2. Замаева Т. В. // Современные методы в биохимии. — М., 1977. — С. 262—264.
3. Карпенко В. С., Колесников Т. Ф., Петрунь Н. М. и др. // Функциональная диагностика в урологии и нефрологии. — Киев, 1977. — С. 8—10.
4. Abergel R. P., Pizzuro D., Mecker C. A. et al. // J. invest. Derm. — 1985. — Vol. 84. — P. 384—390.
5. Cohen I. K., Kei H. F., Sjoerdsma A. // Surg. Forum. — 1971. — Vol. 22. — P. 488—489.
6. Craig R. D. P., Schofield J. D., Jackson D. S. // Europ. J. clin. Invest. — 1975. — Vol. 5. — P. 69—74.
7. Jackson D. S. // Collagen in Health and Disease. — London, 1982. — P. 466—472.
8. Madden J. W., Peacock E. E. // Ann. Surg. — 1971. — Vol. 174. — P. 511—520.
9. Miesson J. P., Craig R. D. P. // Brit. J. Derm. — 1977. — Vol. 89. — P. 635—641.
10. Omo-Dare P. // J. nat. med. Ass. — 1975. — Vol. 67. — P. 428—432.
11. Peacock E. E., van Winkele W. // Surgery and Biology of Wound Repair. — Berlin, 1976. — P. 13—16.
12. Wahl S. N. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1985. — Vol. 460. — P. 231—244.
13. Zeitz M., Ruiz-Torres A., Merke H. // Arch. dermat. Res. — 1978. — Vol. 263. — P. 207—214.

Поступила 17.04.90

#### EXCRETION OF HYDROXYPROLINE WITH URINE IN CHILDREN WITH POSTBURN HYPERTROPHIC AND KELOID SCARS: COMPARATIVE ASPECTS

E. A. Kozlov, G. I. Bagdallishvili, N. N. Prozorovskaya, A. A. Delvig

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

Catabolism of collagen was studied in 25 children with keloid and hypertrophic scars by means of evaluation of total and polypeptide-bound hydroxyproline excreted with urine. Formation of postburns pathological scars led to an increase in excretion of collagen degradation products, the rate of the increase depended on area and age of scar. In hypertrophic cicatrization rate of collagen metabolites excretion correlated with the scar age reversely, demonstrating the tendency to decrease of the scar collagen metabolites with its ageing. Excretion of collagen metabolites with urine in patients with keloid scars depended on area of the scar and only slightly on its age. Besides, in patients with keloids rather high, statistically distinct correlation ( $r=0,855$ ) was found between the ratio macrophages/neutrophils under studies using "skin window" as well as between the ratio of hydroxyproline content in the polypeptide fractions with molecular mass above 1,500 and in the fraction containing oligopeptides and free hydroxyproline. This correlation was not found in patients with hypertrophic scars. Interaction of macrophages, neutrophils and, probably, eosinophiles appears to have a definite importance in regulation of collagen degradation, impairment of which may be substantial for scars formation.

Т. Я. Кондратенко, Н. В. Кузина, Е. С. Северин,  
З. Х. Корнилова, Э. В. Тихомиров, М. И. Перельман

## ХРОНИЧЕСКАЯ ПНЕВМОНИЯ И РАК: ИЗМЕНЕНИЯ $\beta$ -АДРЕНЕРГИЧЕСКИХ РЕЦЕПТОРОВ В ПАРЕНХИМЕ ЛЕГКИХ ЧЕЛОВЕКА

Научный центр молекулярной диагностики Минздрава СССР, Москва; Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова

Мускариновые ацетилхолиновые и  $\beta$ -адренергические рецепторы играют важную роль в развитии легочных заболеваний [3]. По данным ряда авторов [2, 8, 9], адренергические и мускариновые рецепторы значительно меняются при хронических обструктивных заболеваниях дыхательных путей (хронический бронхит, бронхиальная астма). Рецепторы паренхимы легких при злокачественных новообразованиях остаются практически неизученными. Нами ранее были обнаружены изменения  $\beta$ -адренергических и мускариновых ацетилхолиновых рецепторов в паренхиме легких больных легочной аденокарциномой. На основании полученных данных было сделано предположение о важной роли этих рецепторов в патогенезе раковых опухолей легких человека.

Предполагается, что предшествующие заболевания дыхательных путей могут играть определенную роль в развитии рака легких человека [15]. По данным ряда авторов [6, 10, 13, 14], хронические обструктивные заболевания дыхательных путей, туберкулез, аллергические заболевания являются патогенетическими факторами рака легких. Так, А. Wu и соавт. [15] выделили группу основных заболеваний, относящихся к факторам риска рака легких человека.

Целью настоящей работы являлось исследование  $\beta$ -адренергических и мускариновых рецепторов паренхимы легких человека при хронической пневмонии, относящейся к факторам риска рака легких.

**Методика.** Кусочки паренхимы легких были получены при торакотомии у 28 пациентов — мужчин 45—50 лет. Образцы были разделены на 3 группы: контрольные (образцы получали от 10 пациентов с диагнозом туберкулема при сегментарной резекции в пределах здоровых тканей), образцы от 12 больных легочной аденокарциномой), образцы от 6 больных хронической пневмонией. Диагноз во всех случаях был подтвержден при гистологическом исследовании.

Все кусочки легких после взятия немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при температуре  $-70^\circ\text{C}$ .

Выделение мембран легких проводили по методу [7]. Ткань гомогенизировали в буфере, содержащем 50 мМ трис-NCl (pH 7,4), 0,32 М сахарозу, 0,154 М NaCl, в гомогенизаторе «Virtis-45» (США). Гомогенат фильтровали через несколько слоев марли, центрифугировали 10 мин при 1000 г; полученный надосадок центрифугировали 40 мин при 40 000 г. Осадок

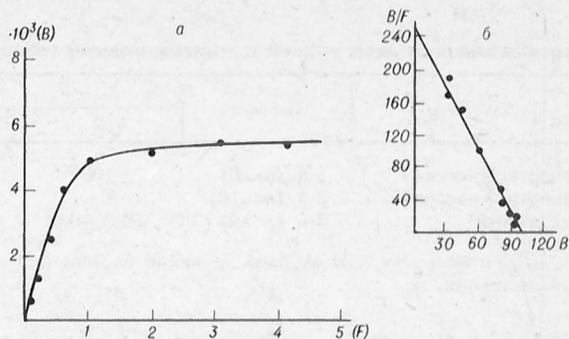


Рис. 1. Специфическое связывание  $^3\text{H}$ -ДГА мембранами паренхимы легких у больных хронической пневмонией.

а — связывание  $^3\text{H}$ -ДГА. По оси абсцисс — концентрация лиганда, нМ (F); по оси ординат — связанный  $^3\text{H}$ -ДГА, имп на 1 мг белка (B); б — график в координатах Скэтчарда. По оси абсцисс — B — связанный  $^3\text{H}$ -ДГА, фмоль на 1 мг белка; по оси ординат — B/F — отношение связанного  $^3\text{H}$ -ДГА к свободному;  $r=0,99$ .

суспандировали в 10 мл буфера, содержащего 50 мМ трис-NCl (pH 7,4), 10 мМ  $\text{MgCl}_2$ , и центрифугировали в тех же условиях. Конечный осадок суспандировали в 5 мл буфера и хранили при  $-70^\circ\text{C}$  до анализа связывания.

Анализ связывания  $^3\text{H}$ -дигидроалprenолола ( $^3\text{H}$ -ДГА).

Мембранные белки (100 мкг) инкубировали в общем объеме 500 мкл с 50 мМ трис-NCl (pH 7,5), 10 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 0,1—5 нМ  $^3\text{H}$ -ДГА (82 Ки/ммоль, «Amersham», Англия) 20 мин при  $30^\circ\text{C}$ . Разделение свободного и связанного с мембранами лиганда проводили фильтрацией проб на фильтрах GE/C («Whatman», Англия). Фильтры высушивали и просчитывали на жидкостном радиоспектрометре «Rackbeta» (LKB, Швеция) с эффективностью счета 40 %.

Специфическое связывание  $^3\text{H}$ -QNB определяли как разницу между связыванием в отсутствие и в присутствии 10 мкМ атропина («Sigma», США). Концентрацию белка определяли по методу [4], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин. Определение параметров рецепторного связывания ( $K_d$  и  $B_{\text{max}}$ ) проводили в координатах Скэтчарда [12].

**Результаты и обсуждение.** Показано, что число мест связывания  $\beta$ -адренергического радиолиганда  $^3\text{H}$ -ДГА значительно снижается в паренхиме легких при злокачественных новообразованиях по сравнению со здоровой тканью (см. таблицу). Связывание  $^3\text{H}$ -ДГА в группе больных хронической пневмонией было насыщаемым и высокоаффинным (рис. 1). Насыщение наступало при концентрации лиганда 1 нМ. Анализ в координатах Скэтчарда выявил следующие параметры связывания  $^3\text{H}$ -ДГА:  $K_d=0,5\pm 0,09$  нМ,  $B_{\text{max}}=113,8\pm 10,3$  фмоль на 1 мг белка (средние значения  $\pm$  SEM;  $n=6$ ). Аффинность связывания  $^3\text{H}$ -ДГА при хронической пневмонии практически не менялась по сравнению со здоровой тканью, в то время как величина  $B_{\text{max}}$  значительно уменьшалась, занимая промежуточное положение между показателями в норме и при раке (см. таблицу).

Связывание мускаринового антагониста  $^3\text{H}$ -QNB в паренхиме легких при хронической пнев-

Характеристика связывания  $^3\text{H}$ -ДГА и  $^3\text{H}$ -QNB мембранами паренхимы легких человека в норме, хронической пневмонии и раке

Объект исследования	$^3\text{H}$ -ДГА		$^3\text{H}$ -QNB	
	$K_d$ , нМ	$B_{\text{max}}$ , фмоль/мг	$K_d$ , нМ	$B_{\text{max}}$ , фмоль/мг
Контроль ( $n=10$ )	$1,0\pm 0,1$	$456,7\pm 73,7$	$0,45\pm 0,07$	$108,9\pm 12,1$
Хроническая пневмония ( $n=6$ )	$0,5\pm 0,09$	$113,8\pm 10,3$	$0,30\pm 0,07$	$97,7\pm 14,7$
Рак ( $n=12$ )	$0,40\pm 0,08$	$84,1\pm 14,5$	$0,55\pm 0,09$	$377,5\pm 65,5$

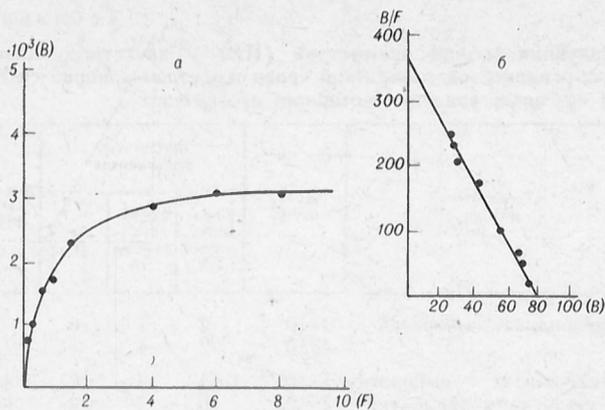


Рис. 2. Специфическое связывание  $^3\text{H}$ -QNB мембранами паренхимы легких у больных хронической пневмонией.

а — связывание  $^3\text{H}$ -QNB. По оси абсцисс — концентрация лиганда, нМ (F); по оси ординат — связанный  $^3\text{H}$ -QNB, имп на 1 мг белка (B); б — график в координатах Скэтчарда. По оси абсцисс — B — связанный  $^3\text{H}$ -QNB, фмоль на 1 мг белка; по оси ординат — B/F — отношение связанного  $^3\text{H}$ -QNB к свободному;  $r = 0,97$ .

мнии также было насыщаемым и высокоаффинным (рис. 2). Параметры связывания  $^3\text{H}$ -QNB, определенные в координатах Скэтчарда, практически не отличались от контроля.

Изучение роли предшествующих заболеваний дыхательных путей в развитии рака легких проводилось в ряде лабораторий [1, 5, 11]. Однако рецепторы паренхимы легких при заболеваниях, относящихся к факторам риска рака легких, изучены мало. Ранее нами были выявлены значительные изменения концентрации  $\beta$ -адренергических (уменьшение) и мускариновых (повышение) рецепторов у больных аденокарциномой.

В настоящей работе показано, что количество  $\beta$ -адренергических рецепторов в паренхиме легких значительно уменьшается при хронической пневмонии по сравнению со здоровой тканью, в то время как количество мускариновых рецепторов практически не меняется.

Полученные данные позволяют предположить важную роль  $\beta$ -адренергических рецепторов в развитии злокачественных новообразований легких у больных хронической пневмонией.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Auerbach O., Garfinkel L., Parks V. R. // Cancer (Phila.).— 1979.— Vol. 43.— P. 636—642.
2. Barnes P. J., Karliner J. S., Dollery C. T. // Clin. Sci.— 1980.— Vol. 58.— P. 457—461.
3. Barnes P. J., Minette P., MacLagan J. // TIPS.— 1988.— Vol. 9.— P. 412—416.
4. Bradford M. M. // Analyt. Biochem.— 1976.— Vol. 72.— P. 248—254.
5. Davis A. L. // J. A. M. A.— 1976.— Vol. 235.— P. 621—622.
6. Hinds M. W., Cohen H. I., Kolonel L. N. // Amer. Rev. resp. Dis.— 1982.— Vol. 125.— P. 776—778.
7. Norman P., Abram T. S., Kluender H. C. et al. // Europ. J. Pharmacol.— 1987.— Vol. 143, N 3.— P. 323—334.
8. Raaijmakers J. A. M., Beneker C., Dol K., De Ruiter-Bootsma A. L. // Cell. molec. Biol.— 1987.— Vol. 33, N 4.— P. 515—518.
9. Raaijmakers J. A. M., Terpstra G. K., Van Rosen A. J. et al. // Clin. Sci.— 1983.— Vol. 66.— P. 585—590.
10. Reynolds P., Kaplan G. A. // Amer. J. Epidem.— 1987.— Vol. 125.— P. 539—540.
11. Rimington J. // Brit. med. J.— 1971.— Vol. 2.— P. 373—375.
12. Scatchard G. // Ann. N. Y. Acad. Sci.— 1949.— Vol. 51.— P. 660—672.

13. Scillrud D. M., Kenneth P. O., Miller R. D. // Ann. intern. Med.— 1986.— Vol. 105.— P. 503—507.
14. Vena J. E., Bona J. R., Byers T. E. // Amer. J. Epidem.— 1985.— Vol. 122.— P. 66—74.
15. Wu A. H., Yu M. C., Thomas D. C., Pike M. C., Henderson B. E. // Cancer Res.— 1988.— Vol. 48.— P. 7279—7284.

Поступила 02.04.90

#### CHRONIC PNEUMONIA AND CANCER: ALTERATIONS OF $\beta$ -ADRENERGIC RECEPTORS IN HUMAN LUNG PARENCHYMA

T. Ya. Kondratenko, N. V. Kuzina, E. S. Severin, Z. Ch. Kornilova, E. V. Tikhomirov, M. I. Perelman

Research Centre of Molecular Diagnostics, Ministry of Public Health of the USSR, Chair of Phthisiopulmonology, I. M. Sechenov I Medical School, Moscow

$\beta$ -Adrenergic and muscarinic cholinergic receptors have been investigated in human lung parenchyma during cancer and chronic pneumonia as compared with normal tissue, obtained after segmental resection of tuberculoma from surrounding normal tissues. Binding of  $\beta$ -adrenergic radioligand  $^3\text{H}$ -dihydroalprenolol ( $^3\text{H}$ -DHA) and muscarinic antagonist  $^3\text{H}$ -quinuclidinyl benzylate ( $^3\text{H}$ -QNB) was saturating with high rate of affinity in lung parenchyma membranes of both controls and patients with cancer and chronic pneumonia. Amount of binding sites of  $^3\text{H}$ -QNB was significantly increased in cancer ( $B_{\text{max}} = 377.5 \pm 65.5$  fmole/mg) and did not change in chronic pneumonia ( $B_{\text{max}} = 97.7 \pm 14.7$  fmole/mg) as compared with normal tissues ( $B_{\text{max}} = 108.9 \pm 12.1$  fmole/mg); a number of binding sites of  $^3\text{H}$ -DHA was significantly decreased both in lung parenchyma under conditions of cancer ( $B_{\text{max}} = 84.1 \pm 14.5$  fmole/mg) and chronic pneumonia ( $B_{\text{max}} = 113.8 \pm 10.3$  fmole/mg) as compared with normal tissue ( $B_{\text{max}} = 456.7 \pm 73.7$  fmole/mg). The affinity of  $^3\text{H}$ -DHA and  $^3\text{H}$ -QNB binding was practically unaltered. The results obtained suggest the important role of  $\beta$ -adrenergic receptors in formation of lung cancer in the patients with pneumonia.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616.831-009.11-031.4-092.9-092.19:612.017.11-07

М. А. Даниловский, И. В. Лосева, И. В. Красильников, Б. Н. Свиридов

#### БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ КОМПЕНСАЦИИ ОДНОСТОРОННИХ ДВИГАТЕЛЬНЫХ РАССТРОЙСТВ ЦЕНТРАЛЬНОГО ГЕНЕЗА И ИХ СВЯЗЬ С ИММУННОЙ СИСТЕМОЙ

Институт экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград, Институт иммунологии Минздрава СССР, Москва

Одностороннее поражение центральных моторных систем сопровождается появлением в ЦНС пептидных факторов, вызывающих стойкое асимметричное функционирование спинальных центров, — так называемых факторов позной асимметрии (ФПА) [1—3]. Начальный этап компенсаторных перестроек после таких повреждений мозга сопровождается симметризацией работы спинальных центров за счет инактивации ФПА появляющимся в ЦНС фактором инактивации [4, 7]. Активность ФПА в остром посттравматическом периоде выявляется также и в сыворотке крови, куда ФПА поступает из-за нарушения гематоэнцефалического барьера, а через 3 нед после травмы активность ФПА в крови исчезает [9]. Механизмы инактивации ФПА в крови до сих пор

остаются невыясненными, что и определило задачи данного исследования.

**Методика.** Работа выполнена на белых беспородных крысах-самцах массой 180–200 г. Животным по ранее описанной методике [2, 5] удаляли корковое представительство правой задней конечности, на 21-е сутки у животных брали кровь, получали сыворотку, которую затем лиофилизировали и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Лиофилизат сыворотки фракционировали методом гель-фильтрации на сефадексе G-25 (сверхтонкий) («Pharmacia», Швеция) на высокомолекулярную — VM ( $M_r$  выше 5 кД) и низкомолекулярную — NM ( $M_r$  менее 5 кД) фракции. Для этого 1 мг лиофилизированной сыворотки растворяли в 0,1 мл 1 M уксусной кислоты и наносили на колонку  $1 \times 12$  см. Элюцию вели 1 M уксусной кислотой, скорость протекания  $3,5 \text{ мл/ч}\cdot\text{см}^2$ . Полученные фракции лиофилизировали. Для биотестирования лиофилизат каждой фракции растворяли в 1 мл рабочего буфера (0,05 M трис-HCl pH 7,4, содержащий 0,15 M NaCl). Также проводили фракционирование лиофилизата сыворотки на сефадексе G-200 («Sigma», США), на колонке  $0,8 \times 16$  см. Элюцию вели рабочим буфером, скорость протекания  $3,5 \text{ мл/ч}\cdot\text{см}^2$ . На колонку наносили 1 мг лиофилизата сыворотки в 50 мкл рабочего буфера. Элюируемый материал собирали фракциями по 0,2 мл. В качестве калибровочных стандартов использовали голубой декстран ( $M_r$  2 000 000 Д), иммуноглобулин G (производство НИИЭМ им. Пастера Минздрава СССР;  $M_r$  150 кД), сывороточный альбумин («Sigma»,  $M_r$  68 кД), цитохром C («Reanal»,  $M_r$  13 кД). Термообработку сыворотки и ее фракций вели в стеклянной запаянной ампуле объемом 1 мл при температуре  $100^{\circ}\text{C}$  в течение 15 мин. Для ферментативной обработки высокомолекулярной фракции сыворотки лиофилизат этой фракции растворяли в 1 мл рабочего буфера с pH 8,3 и вводили в колонку объемом 2 мл, заполненную сефарозой 4B («Serva») с иммобилизованным трипсином («Serva»), количество иммобилизованного трипсина 20 мг. После 20-часовой инкубации гидролизат элюировали и использовали в дальнейших исследованиях. Время инкубации выбрано согласно кинетике ферментативного гидролиза раствора азоальбумина («Calbiochem»). Инкубацию лиофилизата с белком A производства НИИЭМ им. Пастера Минздрава СССР проводили в 1 мл рабочего буфера (1 мг лиофилизата сыворотки и 0,1 мг белка A). Время инкубации 60 мин. После инкубации смесь фракционировали на сефадексе G-200. Активность ФПА в лиофилизате и его фракциях выявляли по их способности индуцировать у крыс-реципиентов флексию правой задней конечности после медленного введения им в затылочную цистерну 50 мкл раствора тестируемого материала и последующей (через 5 мин) перерезки спинного мозга на уровне  $\text{C}_4$ — $\text{C}_5$ . Регистрацию позной асимметрии задних конечностей проводили через 1 ч после спинализации [1, 4]. Данные обрабатывали статистически с использованием критерия знаков [10].

Для изучения влияния иммуномодулятора на скорость восстановления двигательной функции использовали описанную ранее модель одностороннего удаления моторного неокортекса, при этом животным экспериментальной группы вводили препарат «Градек Б», представляющий собой модифицированный гаминцидином S дигидрокси-ддекстран (экспериментальная партия производства НПО «Биолар»). Препарат вводили внутривенно в день операции и на 7-е сутки после операции. Использовали по 0,1 мг препарата, растворенного в 0,2 мл физиологического раствора. Восстановление двигательной активности у животных оценивали, определяя число соскальзываний правой и левой задних конечностей при удержании животного на вращающемся барабане [8]. Статистическую обработку проводили с использованием критерия Вилкоксона—Манна—Уитни [10].

**Результаты и обсуждение.** Как оказалось, сыворотка крови, взятая у животных на 21-е сутки после операции удаления моторного неокортекса слева, не вызывает достоверной позной асимметрии в интервале разведений  $10^{-1}$ — $10^{-5}$  мг/мл. В то же самое время термообработка мобилизует активность ФПА в этом же диапазоне доз (табл. 1). Это позволяет предположить присутствие в сыворотке крови термолабильного фактора, инактивирующего ФПА. Гель-фильтрация лиофилизата сыворотки на сефадексе G-25 позволяет выявить активность ФПА в NM-

Таблица 1

**Индукция позной асимметрии (ПА) у интактных животных-реципиентов сыворотки крови животных-доноров спустя 21 сут после удаления моторного неокортекса**

Тестируемый материал	Доза, мг/мл	Количество реципиентов			Активность ФПА
		с правой стороны ПА	с левой стороны ПА	без ПА	
Лиофилизат сыворотки	$1 \cdot 10^{-1}$	2	1	6	—
	$1 \cdot 10^{-5}$	2	4	4	—
Лиофилизат сыворотки после термообработки	$1 \cdot 10^{-4}$	16	3	0	+
	$1 \cdot 10^{-5}$	10	1	0	+
	$1 \cdot 10^{-6}$	4	2	4	—

Таблица 2

**Активность ФПА во фракциях сыворотки крови животных-доноров на 21-е сутки после операции**

Тестируемый материал	Количество реципиентов			Активность ФПА
	с правой стороны ПА	с левой стороны ПА	без ПА	
Фракция NM	11	1	0	+
Фракция VM	2	2	6	—
Фракция VM+NM	3	2	5	—
Фракция VM после обработки трипсином+фракция NM	10	0	1	+

фракции. Объединение фракции NM с фракцией VM, прошедшей обработку трипсином, не приводит к инактивации ФПА, что говорит о белковой природе фактора инактивации (табл. 2).

При биотестировании фракций сыворотки крови, полученных после гель-фильтрации на сефадексе G-200, активность ФПА не обнаружена, однако термообработка этих фракций позволила выявить активность ФПА во фракции, содержащей биополимеры с молекулярной массой в диапазоне 130—170 кД и соответствующей по объему выхода иммуноглобулину класса G. Принимая во внимание малую молекулярную массу ФПА [1, 3], можно предположить, что молекулярная масса комплекса ФПА — фактор инактивации незначительно отличается от молекулярной массы фактора инактивации. Исходя из значений молекулярной массы и динамики активности фактора инактивации [5], можно предположить, что фактор инактивации является продуктом иммунной системы. Проверить это предположение можно, используя уникальную способность белка A стафилококков образовывать комплексы с молекулами IgG, не нарушая при этом взаимодействия с антигеном [11]. Гель-фильтрация инкубационной смеси, содержащей лиофилизат сыворотки и белок A, с последующей термообработкой и биотестированием полученных фракций позволила выявить активность ФПА во фракциях свободного объема, что свидетельствует об образовании комплекса белка A с фактором инактивации и подтверждает предположение о иммуноглобулиновой природе фактора инактивации (табл. 3).

Принимая во внимание ключевую роль фактора инактивации в механизмах восстановления мотор-

## Молекулярные массы комплексов ФПА — фактор инактивации

Молекулярная масса, кД	Лифолизат сыворотки								Лифолизат сыворотки + белок А			
	до термообработки			актив-ность ФПА	после термообработки			актив-ность ФПА	после термообработки			актив-ность ФПА
	О	П	Л		О	П	Л		О	П	Л	
Свыше 200	10	2	1	—	9	2	0	—	9	9	0	+
200—170	11	3	2	—	11	4	5	—	8	3	1	—
170—130	10	2	3	—	10	9	1	+	8	3	2	—
130—90	11	3	3	—	11	2	5	—	9	3	3	—
90—70	10	1	1	—	12	6	3	—	11	4	2	—
Менее 70	10	1	2	—	10	3	3	—	8	1	1	—

Примечание. О — общее число реципиентов, П — число реципиентов с правосторонней асимметрией, Л — число реципиентов с левосторонней асимметрией.

ного дефицита после органических поражений мозга и его иммуноглобулиновую природу, мы предприняли попытку воздействовать на биогенез фактора инактивации путем введения оперированным животным вещества, стимулирующего иммуногенез. В качестве иммуномодулятора использовали препарат «Градекс Б». Скорость восстановления двигательной функции при действии иммуномодулятора оценивали, используя роллинг-тест [8]. Всего было произведено 2 серии опытов, в каждой серии использовано 2 группы крыс (по 9 животных в группе). 1-я группа — контрольная, без введения препарата, 2-я группа — экспериментальная, состоящая из животных, получивших двукратно инъекцию препарата. Эксперименты проводились на животных с левосторонним (I серия) и правосторонним (II серия) удалением моторного неокортекса.

На рис. 1 представлены результаты I серии опытов. Видно, что через 2 сут после инъекции препарата происходит достоверное снижение уровня моторного дефицита у животных экспериментальной группы по сравнению с контролем. Отличие это сохраняется в течение 4 сут. Вторая инъекция препарата также приводит к достоверному снижению числа «хроманий» правой задней конечности, которое удается наблюдать лишь в течение 1 дня. Нами было выдвинуто предположение о том, что одной из причин такого непродолжительного периода действия повторной инъекции препарата могла являться малая разрешающая способность данной методики. Ранее было показано, что динамика восстановления двигательной функции после правосторонней травмы

моторной коры имеет несколько иной характер: на более поздних сроках уровень компенсации моторного дефицита достоверно ниже, чем у левосторонне травмированных животных [6]. С учетом этого аналогичная серия экспериментов была проведена на крысах с удалением участка правой моторной коры. Результаты этих исследований представлены на рис. 2. Как и в I серии опытов, эффект от введения иммуномодулятора проявляется на 2-е сутки после инъекции и сохраняется в течение нескольких дней. Повторное введение препарата через 7 сут после операции приводит к более стойкому, чем в случае с левосторонней травмой, улучшению двигательной функции конечности: эффект сохраняется в течение 5 дней. Таким образом, введение иммуномодулятора после односторонней травмы моторного неокортекса приводит к достоверному снижению числа «хроманий» центрально-деафферентированной конечности, которое сохраняется в течение нескольких суток после инъекции.

Результаты проведенного исследования позволяют сделать важный вывод о принципиальной возможности эффективной терапии центральных двигательных расстройств с помощью веществ, обладающих иммуномодулирующими свойствами. Несомненно, что использование более чувствительных тестов, позволяющих оценивать двигательную активность конечностей, позволит с большей наглядностью оценить эффективность подобных препаратов в лечении двигательных расстройств центрального генеза.

## ЛИТЕРАТУРА

- Вартамян Г. А., Балабанов Ю. В. // Бюл. exper. биол.— 1978.— № 8.— С. 147.
- Вартамян Г. А., Варлинская Е. И., Балабанов Ю. В. // Там же.— 1981.— № 4.— С. 398.

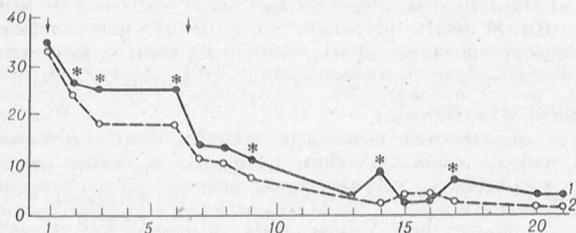


Рис. 1. Динамика соскальзывания правой задней конечности с вращающегося стержня после удаления моторного неокортекса слева.

Здесь и на рис. 2: 1 — контроль; 2 — введение иммуномодулятора. По оси абсцисс — дни после операции; по оси ординат — число соскальзываний задней лапы (в %). За 100% принят данный показатель в 1-е сутки после операции. Стрелками отмечены дни введения иммуномодулятора, звездочками — те дни тестирования, когда регистрируемые показатели в контрольной и экспериментальных группах достоверно различались.

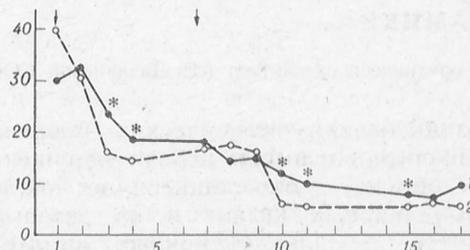


Рис. 2. Динамика соскальзывания левой задней конечности с вращающегося стержня после удаления моторного неокортекса справа.

3. Вартамян Г. А., Клементьев Б. И. // Физиология человека.— 1983.— № 6.— С. 222.
4. Варлинская Е. И., Рогачий М. Г., Вартамян Г. А., Клементьев Б. И. // Бюл. exper. биол.— 1984.— № 9.— С. 281.
5. Даниловский М. А., Дулинец В. В., Вартамян Г. А., Беленков Н. Ю. // Физиол. журн. СССР.— 1987.— № 5.— С. 602.
6. Даниловский М. А., Лосева И. В. // Всесоюзная конф. по нейронаукам, 2-е: Труды.— Киев, 1988.— С. 108—109.
7. Даниловский М. А., Токарев А. В., Клементьев Б. И., Вартамян Г. А. // Бюл. exper. биол.— 1987.— № 6.— С. 132.
8. Лосева И. В., Силаков В. Л. // Физиол. журн. СССР.— 1987.— № 12.— С. 1608.
9. Макаров А. Ю., Помников В. Г., Вартамян Г. А. и др. // Реабилитация больных первично-психическими заболеваниями и алкоголизмом.— Л., 1986.— С. 174.
10. Урбах В. Ю. Биометрические методики.— М., 1964.
11. Erling B., Myhre B. A. Non-Immune Binding of Immunoglobulin G to Grampositive Cocci: Doct. Dis.— Lund, 1981.

Поступила 09.06.89

## BIOCHEMICAL MECHANISMS FOR COMPENSATION OF UNILATERAL LOCOMOTOR DISTURBANCES OF THE CENTRAL GENESIS AND THEIR RELATION WITH IMMUNE SYSTEM

M. A. Danilovskiy, I. V. Loseva, I. V. Krasilnikov, B. N. Sviridov

Institute of Experimental Medicine, Academy of Medical Sciences of the USSR, Leningrad, Institute of Immunology, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

Unilateral impairments of brain led to appearance of posture asymmetry factors (PAF) in central nervous system, which caused asymmetric function of spinal centers and were responsible for asymmetry of limb muscular tension. During compensation symmetrization of muscular tension was followed by inactivation of PAF using developed in central nervous system antifactors which formed complexes with PAF. These factors of inactivation proved to be thermolabile proteins partially involving IgG. Administration of immunomodulator "Gradex B" into postoperation animals stimulated distinctly restoration of arbitrary movements in impaired limbs. The data obtained suggest that immune system is of importance in control of endogenous substances activity, which are produced in central nervous system; a novel procedure was studied for correction of locomotory impairments of central genesis.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616.127-008.94:577.164.183]-02:615.272.4]-092.9-07

Ж. В. Шутенко, И. А. Приедена, И. Я. Калвиньш, Э. Я. Лукевиц

## ВОЗДЕЙСТВИЕ СТРУКТУРНОГО АНАЛОГА $\gamma$ -БУТИРОБЕТАИНА МИЛДРОНАТА [3-(2,2,2-ТРИМЕТИЛГИДРАЗИНИЙ) ПРОПИОНАТА] НА КАРНИТИНЗАВИСИМЫЙ МЕТАБОЛИЗМ В ДИНАМИКЕ

Институт органического синтеза АН Латвийской ССР, Рига

В возникновении ишемических повреждений сердца значительную роль играют нарушения липидного обмена, заключающиеся в накоплении свободных жирных кислот и их детергентных метаболитов — длинноцепочных ацил-КоА и ацилкарнитина [2, 4, 7, 11, 13, 15]. Одним из перспективных способов метаболической коррекции ишемического миокарда является угнетение карнитинзависимого окисления жирных кислот на

стадии их активации. Это достигается путем снижения внутриклеточной концентрации свободного карнитина в результате угнетения его биосинтеза из  $\gamma$ -бутиробетаина [3, 14]. Созданный в Институте органического синтеза структурный аналог  $\gamma$ -бутиробетаина 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионат — милдронат — обладает способностью ингибировать активность  $\gamma$ -бутиробетаин-гидроксилазы и снижать концентрацию свободного карнитина в миокарде крыс при его курсовом применении. При этом содержание свободных жирных кислот в сыворотке крови возрастает [3, 14]. Несмотря на достаточно подробно изученный механизм действия препарата, до сих пор открытым оставался вопрос о динамике изменений концентраций свободного и связанного карнитина в миокарде, свободных жирных кислот в сыворотке крови, а также способности гомогената миокарда окислять длинноцепочные жирные кислоты под влиянием милдроната в условиях торможения им карнитинзависимого метаболизма и после его отмены. Это и послужило целью настоящего исследования.

Методика. Опыты проводили на белых крысах-самцах, полученных из питомника Института органического синтеза АН Латвийской ССР массой 200–250 г. Животных содержали на стандартном рационе вивария. В течение 10 дней крысам перорально вводили милдронат в дозе 200 мг/кг. При помощи гильотины животных декапитировали через 6 ч после однократного введения препарата, а также на 2, 4, 6, 8 и 10-й дни применения через 2 ч после последнего введения. Кроме того, животных забивали на 3, 5, 7, 9, 11, 13, 20 и 30-й дни после прекращения курса милдроната. При изучении влияния милдроната на окисление пальмитиновой кислоты гомогенатом миокарда крыс забивали на 10-й день введения, а также на 5 и 15-й дни после отмены курса препарата. В каждой группе использовано по 6 крыс.

Реактивы. Ацетил-КоА («Boehringer», ФРГ), сывороточный альбумин (V фракция, свободный от жирных кислот), пальмитиновая кислота, карнитинацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.7) (все — «Sigma», США), гидроокись тиамин («Intercept», Франция), дитиобиснитробензойная кислота («Gee Lawson Chem.», Англия), набор для определения свободных жирных кислот в сыворотке крови («Wako», Япония), трис-НСI («Reanal», Венгрия), ЭДТА, сахароза («Реахим», СССР),  $1-^{14}C$ -пальмитиновая кислота (Всесоюзное объединение «Изотоп», СССР, 31 мКи/ммоль), кислоты, щелочи, соли и растворители (ч. д. а.).

После декапитации сердца извлекали, замораживали в жидком азоте, растирали до порошкообразного состояния и гомогенизировали в 0,6 н  $HCIO_4$ . Супернатант нейтрализовали 5 М КОН и доводили при помощи разбавленных растворов КОН до pH 7,9–8,0.  $KClO_4$  удаляли центрифугированием (3000 об/мин, 30 мин). В кислоторастворимом экстракте определяли концентрацию свободного карнитина [9], а в кислотонерастворимом осадке после щелочного гидролиза (0,4 М КОН, pH ~12,0, 70 °С, 2 ч), нейтрализации и центрифугирования (3000 об/мин, 10 мин) — концентрацию длинноцепочного ацилкарнитина [10]. Оптическую плотность регистрировали на двулучевом спектрофотометре («Hitachi-577», Япония).

Для определения свободных жирных кислот использованы наборы фирмы «Wako» (Япония). В основе метода лежат сопряженные энзиматические реакции, катализируемые ацил-КоА-синтетазой и ацил-КоА-оксидазой. Образующаяся  $H_2O_2$  в присутствии пероксидазы осуществляет реакцию конденсации 3-метил-N-этил-N- $\beta$ -гидроксиэтиланилина и 4-аминоантипирина с образованием окрашенного комплекса с максимумом абсорбции при 550 нм [12].

При изучении способности гомогената миокарда метаболизировать длинноцепочные жирные кислоты после декапитации сердца извлекали, промывали в  $K^+$ ,  $Na^+$ -фосфатном буфере (pH 7,4) и готовили 20 % гомогенат на 0,25 М сахарозе и  $4 \times 10^{-4}$  М ЭДТА. Инкубационная среда (pH 7,4) в объеме 4 мл содержала: 100 мг ткани миокарда,  $10^{-3}$  М  $MgCl_2$ ,  $8 \times 10^{-2}$  М  $KCl$ ,  $8 \times 10^{-3}$  М  $Na_2HPO_4$ ,  $10^{-3}$  М АТФ,

Влияние милдроната (200 мг/кг, нерорально, 10 дней) на концентрацию свободного карнитина и длинноцепочного ацилкарнитина в миокарде крыс

Условия эксперимента	Свободный карнитин	Длинноцепочный ацилкарнитин
	мкмоль/г	
Контроль	0,395 (0,180—0,678)	0,031 (0,021—0,042)
Милдронат:		
1-й день введения, через 6 ч	0,316 (0,090—0,499)	—
2-й день введения	0,193 (0,101—0,277)*	—
4-й день »	0,146 (0,106—0,277)*	0,016 (0,005—0,039)*
6-й день »	0,231 (0,098—0,416)*	—
8-й день »	0,169 (0,078—0,294)*	0,004 (<0,001—0,007)*
10-й день »	0,076 (0,047—0,111)*	<0,001*
3-й день после окончания введения	0,131 (0,081—0,183)*	0,024 (<0,001—0,042)*
5-й день « » »	0,181 (0,099—0,253)*	0,032 (<0,001—0,060)
7-й день « » »	0,311 (0,203—0,386)*	—
9-й день « » »	0,241 (0,159—0,389)*	0,054 (0,033—0,094)
11-й день « » »	0,314 (0,156—0,608)*	—
13-й день « » »	0,399 (0,220—0,625)	—
20-й день « » »	0,374 (0,257—0,605)	0,055 (0,018—0,091)
30-й день « » »	0,450 (0,285—0,579)	0,059 (0,017—0,114)

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3 звездочка —  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

0,1 мМ пальмитиновую кислоту ( $1-^{14}\text{C}$ -пальмитиновой кислоты — 0,5 мкКи на пробу). Пальмитиновую кислоту предварительно комплексовали с сывороточным альбумином V фракции (6 мг/мл) [5]. Пробы инкубировали при 37 °С в течение 60 мин. По окончании инкубации во внутреннюю ячейку инкубационного сосуда помещали желатиновую капсулу со стекловатой, смоченной 0,3 мл раствора 1 М гидроксида гуанина в метаноле (1:1 по объему), добавляли 0,5 мл 30 %  $\text{HClO}_4$ , плотно закрывали и инкубировали в том же режиме 30 мин. Стекловоду извлекали и подсчитывали радиоактивность с 10 мл толуолового сцинтиллятора на жидкостно-сцинтилляционном счетчике («Rackbeta-1217», Швеция) [6, 8].

Для статистической обработки результатов применяли непараметрический U-критерий Вилкоксона — Манна — Уитни [1].

Результаты и обсуждение. Механизм действия милдроната при курсовом применении связан с ингибированием активности  $\gamma$ -бутиробетаингидроксилазы и снижением концентрации свободного карнитина и длинноцепочного ацилкарнитина в миокарде крыс [14]. Так, падение уровня свободного карнитина в 2,5 раза обнаружено уже на 2-й день введения препарата. Содержание же длинноцепочного ацилкарнитина на 4-й день введения милдроната уменьшается в 2 раза. В дальнейшем содержание как свободного карнитина, так и длинноцепочного ацилкарнитина продолжает снижаться, причем к 10-му дню введения препарата уровень свободного карнитина снижается в 5,2 раза, а концентрация длинноцепочного ацилкарнитина составляет менее 0,001 мкмоль/г. Уровень длинноцепочного ацилкарнитина восстанавливается уже к 5-му дню после завершения курсового введения милдроната, тогда как в случае свободного карнитина — только к 13-му дню после его отмены (табл. 1).

Снижение концентрации свободного карнитина под влиянием милдроната влечет за собой угнетение карнитинзависимого метаболизма и накопление свободных жирных кислот в сыворотке крови [3]. На 4-й день применения милдроната наблюдается повышение уровня свободных жирных кислот в сыворотке крови крыс в 1,4 раза, а на 10-й — в 1,8 раза. После отмены курса препарата начинается постепенное снижение содержания свободных жирных кислот в сыворот-

ке крови вплоть до восстановления их исходного уровня (табл. 2).

Торможение под воздействием препарата карнитинзависимого  $\beta$ -окисления жирных кислот приводит к снижению способности гомогената миокарда к окислению свободных жирных кислот [3, 14]. К 10-му дню введения милдроната наблюдается угнетение окисления 0,1 мМ пальмитиновой кислоты до  $^{14}\text{CO}_2$  20 % гомогенатом миокарда крыс в 1,9 раза. На 5-й день после окончания введения препарата способность гомогената миокарда окислять пальмитиновую кислоту восстанавливается (табл. 3).

Таблица 2

Влияние милдроната (200 мг/кг, нерорально, 10 дней) на концентрацию свободных жирных кислот в сыворотке крови крыс

Условия эксперимента	Свободные жирные кислоты, мкмоль/мл
Контроль	0,510 (0,279—0,777)
Милдронат:	
1-й день введения, через 6 ч	0,578 (0,432—0,795)
2-й день введения	0,480 (0,288—0,644)
4-й день »	0,693 (0,170—1,611)*
8-й день »	0,740 (0,623—0,957)*
10-й день »	0,911 (0,636—1,43)*
3-й день после окончания введения	0,624 (0,437—0,948)
5-й день »	0,672 (0,485—0,922)
7-й день »	0,722 (0,558—1,043)
9-й день »	0,603 (0,320—0,788)
11-й день »	0,482 (0,398—0,797)
13-й день »	0,432 (0,277—0,713)
20-й день »	0,525 (0,170—0,911)
30-й день »	0,329 (0,208—0,483)

Таблица 3

Влияние милдроната (200 мг/кг, нерорально, 10 дней) на окисление  $1-^{14}\text{C}$ -пальмитиновой кислоты гомогенатом миокарда крыс

Условия эксперимента	$^{14}\text{CO}_2$ , расп/мин на 100 мг ткани
Контроль	13823,0 (10859,4—18878,7)
Милдронат:	
10-й день введения	7322,2 (8213,1—6693,9)*
5-й день после окончания введения	15196,2 (11396,6—18926,8)
15-й день введения	14780,5 (10660,2—19214,9)

. Постепенный характер появления изменений, вызываемых милдронатом, связан, по-видимому, с суммированием его ингибирующего воздействия на биосинтез карнитина при курсовом применении. Концентрация длинноцепочного ацилкарнитина в миокарде, как и способность гомогената миокарда к карнитинзависимому метаболизму, достигает контрольных значений уже к 5-му дню после отмены курса милдроната, несмотря на то, что уровень свободного карнитина в миокарде еще остается пониженным. По-видимому, к этому сроку уже восстанавливается минимальное количество карнитина, необходимое для осуществления полноценного  $\beta$ -окисления длинноцепочных жирных кислот.

Последовательность биохимических эффектов, наблюдаемых при введении милдроната, можно представить следующим образом: ингибирование биосинтеза карнитина и снижение его концентрации в миокарде, падение уровня длинноцепочного ацилкарнитина, как следствие этого ингибирования, торможение карнитинзависимого метаболизма и накопление, в связи с этим, свободных жирных кислот в сыворотке крови. После окончания введения препарата восстановительный процесс, по всей видимости, начинается с нормализации биосинтеза карнитина путем снятия ингибирующего воздействия милдроната на активность  $\gamma$ -бутиробетаингидроксилазы. Следующим этапом является усиление карнитинзависимого метаболизма вплоть до его исходного уровня и снижение концентрации свободных жирных кислот в сыворотке крови крыс.

Следует подчеркнуть, что наличие изменений в содержании изученных показателей в течение значительного срока после окончания курсового введения милдроната указывает на возможность регуляторного воздействия препарата на карнитинзависимый метаболизм и после его отмены.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гублер Е. Р., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях.— Л., 1973.
2. Сакс В. А., Черноусова Г. Б., Воронков Ю. И. и др. // Чазов Е. И., Браунвальд Ю. Метаболизм миокарда.— М., 1975.— С. 289.
3. Шутенко Ж. В. Регуляция метаболизма миокарда структурным аналогом  $\gamma$ -бутиробетайна — милдронатом: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Тарту, 1988.
4. Corr P. B., Gross R. W., Sobel B. E. // *Circulat. Res.*— 1984.— Vol. 55, N 1.— P. 135.
5. Glatz J. F. C., Wagenmakers A. J. M., Veerkamp J. H., Von Moerkerk H. T. B. // *Biochem. Pharmacol.*— 1983.— Vol. 32, N 17.— P. 2489.
6. Higgins A. J., Morville M., Roger A. B., Blackburn K. J. // *Biochem. biophys. Res. Commun.*— 1981.— Vol. 100, N 1.— P. 291.
7. Katz A. M., Messineo F. C. // *Circulat. Res.*— 1981.— Vol. 48, N 1.— P. 1.
8. Kobayashi G. // *Analyt. Biochem.*— 1963.— Vol. 5, N 2.— P. 284.
9. Marquis N. R., Fritz J. B. // *J. Lipid Res.*— 1964.— Vol. 5, N 1.— P. 184.
10. Pearson D. J., Tubbs P. K., Chase F. A. // *Methoden der Enzymatischen Analyse* / Hrsg. H. U. Bergmeyer.— Weinheim, 1974.— Bd 2.— S. 1818.
11. Saks V. A., Lipina N. V., Smirnov V. N., Chazov E. I. // *Arch. Biochem.*— 1976.— Vol. 173, N 1.— P. 34.
12. Shimizu S., Yamada H. // *Methods of Enzymatic Analysis* / Ed. H. U. Bergmeyer— Weinheim, 1985.— Vol. 1.— P. 19.

13. Shug A. L., Shrogo E., Bittar N. et al. // *Amer. J. Physiol.*— 1975.— Vol. 228, N 3.— P. 689.
14. Simkhovich B. Z., Shutenko Z. V., Meirena D. V. et al. // *Biochem. Pharmacol.*— 1987.— Vol. 37, N 2.— P. 195.
15. Vignais P. V. // *Biochim. biophys. Acta.*— 1976.— Vol. 456.— P. 1.

Поступила 16.02.90

#### EFFECT OF MILDRONATE, THE STRUCTURE DERIVATIVE OF $\gamma$ -BUTYROBETAINE, ON DYNAMICS OF CARNITINE-DEPENDENT METABOLISM

Zh. V. Shutenko, I. A. Priedena, I. J. Kalvins, E. Ya. Lukevics

Institute of Organic Synthesis, Academy of Sciences of the Latvian SSR, Riga

Inhibitor of carnitine-dependent metabolism mildronate, 3-(2,2,2-trimethylhydrazinium) propionate, administered into rats at a dose of 200 mg/kg, per os, within 10 days, caused a decrease in concentration of free carnitine and of long-chain acylcarnitine in myocardium as well as contributed to accumulation of free fatty acids in blood serum. Besides, the rate of  $^{14}\text{C}$ -palmitic acid turnover to  $^{14}\text{CO}_2$  was decreased in myocardium homogenate. The drug inhibitory effect on carnitine biosynthesis from  $\gamma$ -butyrobetaine was responsible for the phenomenon observed. Content of the metabolites studied was altered gradually both during treatment of rats with mildronate and after the drug abolition, thus demonstrating an opportunity of gentle influence on carnitine-dependent metabolism by means of the drug treatment and its abolition.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ. 1991

УДК 616.36-008.5-085.246.2-032:611.341-036.8-07:616.36-008.61-092.9

И. В. Гринько, А. А. Кривчик, О. В. Иванкова

#### ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПЕЧЕНИ В ХОДЕ РАЗВИТИЯ ВНЕПЕЧЕНОЧНОГО ХОЛЕСТАЗА И ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ЭНТЕРОСОРБЦИИ

Минский медицинский институт

Трудно назвать какой-либо патологический процесс, в который бы не вовлекались в той или иной степени печень. Достаточно четко прослеживается участие печени при тех заболеваниях, которые сопровождаются выраженными явлениями эндогенной интоксикации: обтурационной желтухе, перитоните, панкреатите, лучевой болезни, опухолевом росте и др. [6, 7]. Общим признаком этих заболеваний является накопление во внутренней среде организма большого количества разнообразных по своей природе промежуточных и конечных метаболитов, среди которых преобладают гидрофобные соединения, плохо элиминирующиеся системой выделения. Такие соединения транспортируются в печень, где в результате процессов биоконверсии, конъюгации превращаются в нетоксичные водорастворимые соединения, доставляются к почкам и выводятся из организма. Если нагрузка на систему детоксикации превышает ее функциональные возможности, возникает необходимость удаления токсичных продуктов, минуя этапы биотрансформации. Одним из способов решения этой задачи являются сорбционные методы детоксикации, в том числе и энтеросорбция. Несмотря на перспективность использования указанных методов, механизмы их действия, степень эффективности

при каждой конкретной форме патологии, возможные отрицательные побочные эффекты изучены недостаточно.

Целью данной работы явилось изучение характера и некоторых механизмов влияния энтеросорбции на функциональное состояние печени при обтурационной желтухе.

**Методика.** Эксперимент поставлен на 58 белых беспородных крысах-самцах, содержащихся на стандартном вареном рационе. Внепеченочный холестаза моделировали путем перевязки с последующей перерезкой желчного протока у крыс под гексеналовым наркозом. Начиная со дня операции и в течение последующих 6 дней интрагастрально с помощью зонда вводили водный раствор волокнистого сорбента АУВМ Днепр МН (разработан в Институте проблем материаловедения АН УССР) в дозе 200 мг/кг 1 раз в сутки. На 8-й день животных декалентировали. Контролем служили здоровые крысы (контроль 1) и животные с 1-недельным холестазом, которым вместо сорбента через зонд вводили одинаковый объем питьевой воды (контроль 2). Для оценки функционального состояния печени использовали бромсульфалеиновую (поглотительно-эскреторная) и антипириновую (биотрансформирующая функция) пробы [9]. Субклеточные структуры печени (митохондрии, микросомы) выделяли методом дифференциального центрифугирования и исследовали полярографически [8]. Определяли скорости дыхания на эндогенных субстратах, свободного окисления сукцината, фосфорилирующего окисления, соотношение АДФ/О, дыхательный контроль (ДК) Чанса, скорость фосфорилирования митохондриями, интенсивность потребления кислорода микросомами в среде, содержащей НАДФН. Об интенсивности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в ткани печени судили по накоплению малонового диальдегида (МДА), определяемого тиобарбитуровым методом [14]. О степени интоксикации организма судили по количеству общего билирубина в плазме крови, определяемого методом [4], желчных кислот [3], содержанию эндотоксина грамотрицательных бактерий [11], средних молекул [2]. Результаты эксперимента обработаны статистически с использованием критерия *t* Стьюдента и Фишера.

**Результаты и обсуждение.** Развитие внепеченочного холестаза в течение 7 сут сопровождалось гибелью значительной части (9 из 24) животных и нарушением функции печени у выживших. Об этом свидетельствовали результаты бромсульфалеиновой и антипириновой проб (рис. 1). Так, содержание бромсульфалеина через 15 мин после его внутривенного введения было на 190 % ( $p < 0,001$ ) выше его контрольных (по сравнению с контролем 1) значений. Задержка антипирина через 15 ч после его интраперитонеального введения превышала таковую в контроле 1 на 80 % ( $p < 0,001$ ). Резко ухудшалось функциональное состояние субклеточных структур органа. Значительно (на 34—50 %;  $p < 0,05$ ) уменьшалась скорость безсубстратного дыхания, свободного и фосфорилирующего окисления сукцината, ДК Чанса (на 44 %;  $p < 0,01$ ), соотношение АДФ/О (на 31,1 %;  $p < 0,01$ ), скорость фосфорилирования митохондриями печени (на 65,5 %;  $p < 0,001$ ) (рис. 2). Происходило

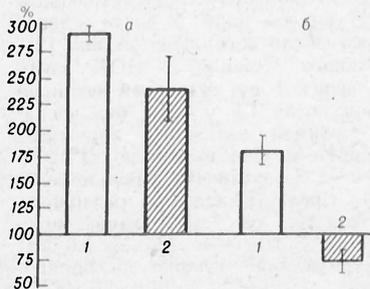


Рис. 1. Величина задержки бромсульфалеина (а) и антипирина (б) в плазме крови животных с холестазом без (1) и на фоне (2) энтеросорбции при выполнении соответствующих проб (в % к контролю 1).

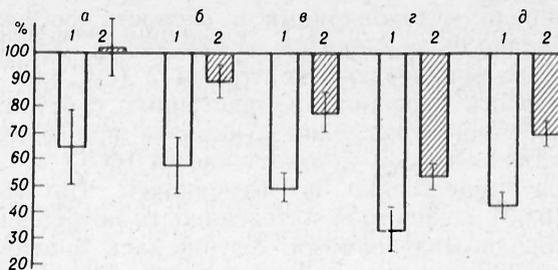


Рис. 2. Показатели функционального состояния митохондрий и микросом.

а — дыхание на эндогенных субстратах; б — свободное окисление сукцината; в — фосфорилирующее окисление сукцината; г — скорость фосфорилирования; д — интенсивность потребления кислорода микросомами печени крыс с внепеченочным холестазом без (1) и на фоне энтеросорбции (2) (в % к контролю 1).

угнетение (до 44 %;  $p < 0,01$ ) интенсивности потребления кислорода микросомами. В основе указанных изменений функционального состояния печени и ее субклеточных структур лежало нарушение оттока желчи, сопровождающееся накоплением ее компонентов во внутренней среде организма и в самом органе. Так, содержание билирубина в плазме крови возрастало по сравнению с контролем 1 в 2,1 раза,  $p < 0,001$ , желчных кислот — в 1,5 раза,  $p < 0,01$ . О развитии эндогенной интоксикации в организме свидетельствовало также увеличение концентрации молекул средней массы (до 131 г;  $p < 0,01$  по сравнению с контролем 1). Существенное значение имело также то обстоятельство, что в результате отсутствия поступления желчи в кишечник создавались условия для развития грамотрицательной микрофлоры и повышенной выработки эндотоксина этой группы бактерий [1, 10]. Количество эндотоксина в наших экспериментах возрастало по сравнению с контролем 1 в кишечнике на 87 % ( $p < 0,01$ ), в плазме крови — на 126 % ( $p < 0,001$ ). Поступление его в печень с портальной кровью во многом определяло нарушение функции этого органа. Известно, что повреждающее действие эндотоксина на гепатоциты реализуется в основном опосредованно, через вещества, вырабатываемые клетками Купфера. Некоторые авторы считают, что в качестве таковых выступают продукты ПОЛ, выработка которых значительно интенсифицируется в этих клетках при попадании эндотоксина [12, 13]. В наших экспериментах содержание в ткани печени одного из продуктов ПОЛ — МДА возрастало на 62 % ( $p < 0,001$ ).

Применение в течение недели сорбента у крыс с развивающейся механической желтухой существенно снижало проявления эндогенной интоксикации, а значит, и нагрузку на печень и заметно улучшало тем самым функциональное ее состояние, увеличивая резервные возможности организма в целом. Сорбент связывал в просвете кишечника значительное количество эндотоксина грамотрицательных бактерий (его концентрация по сравнению с контролем 2 уменьшалась до 69 %;  $p < 0,05$ ) и снижал его поступление с портальной кровью в печень. Результатом этого явилось снижение интенсивности ПОЛ (концентрация МДА в ткани печени по сравнению с контролем 2 снижалась на 34 %;  $p < 0,01$ ) и как следствие большая сохранность субклеточных структур и органа в целом. Потребление

кислорода митохондриями и скорость фосфорилирования были значительно (28—36 %;  $p < 0,05$ ) выше по сравнению с контролем 2 (см. рис. 2), а скорость дыхания на эндогенных субстратах и свободного окисления сукцината практически нормализовались. Соотношение АДФ/О и ДК Чауса существенно не изменялись. На 18 % ( $p < 0,05$ ) возрастала интенсивность потребления кислорода митохондриями. Улучшалась биотрансформационная функция органа в целом. Содержание антипирина в плазме крови через 15 ч после его парентерального введения была на 25 % ( $p < 0,01$ ) ниже уровня здоровых животных (см. рис. 1). Последнее можно, по-видимому, объяснить тем, что наряду с активацией процессов биотрансформации в печени часть антипирина, растворяющегося в водных средах организма, беспрепятственно проникавшего через клеточные мембраны и равномерно распределяющегося во всех органах и тканях [5], в том числе и в желудочно-кишечном тракте, вероятно, связывалась находящимся там сорбентом. Об улучшении при проведении энтеросорбции функционального состояния печени свидетельствуют и данные бромсульфалеиновой пробы. Величина задержки бромсульфалеина по сравнению с контролем 1 снижалась с 290 % (у животных с холестазом без энтеросорбции) до 239 % ( $p < 0,05$ ) при применении сорбента. Уменьшалось содержание токсичных продуктов в плазме крови: билирубина на 46 % ( $p < 0,01$ ) и желчных кислот на 31 % ( $p < 0,05$ ), молекул средней массы — на 22 % ( $p < 0,05$ ). Заметно увеличилась выживаемость животных: из 21 крысы погибли только 3, т. е.  $1/7$  часть экспериментальных животных против более чем  $1/3$  при «чистом» холестазе.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что применение энтеросорбции с первых дней моделирования экстрапеченочного холестаза во многом предупреждает накопление токсичных продуктов во внутренней среде организма и обуславливает более сохранную функцию печени и ее субклеточных структур.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Андреичин И. А.* // Антибиотики.— 1980.— № 12.— С. 936—939.
2. *Габриэлян Н. И., Липатова В. И.* // Лаб. дело.— 1984.— № 3.— С. 138—140.
3. *Карпова Е. Ф.* // Там же.— 1972.— № 9.— С. 533—541.
4. *Меньшиков В. В.* Лабораторные методы исследования в клинике.— М., 1987.
5. *Неделкина С. В., Субботина Р. С.* // Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. биол. наук.— 1977.— № 5, вып. 1.— С. 139—140.
6. *Николайчик В. В.* // Здравоохран. Белоруссии.— 1984.— № 4.— С. 15—20.
7. *Уманский М. А., Пинчук Л. Б., Пинчук В. Г.* Синдром эндогенной интоксикации.— Киев, 1979.
8. *Франк Г. М., Кондрашова М. И., Мохова Е. М., Ротенберг Ю. С.* Руководство по изучению биологического окисления полярнографическим методом.— М., 1973.
9. *Хазанов А. И.* Функциональная диагностика болезней печени.— М., 1988.
10. *Cahill C. J., Pain J. A., Bailey M. H.* // Surg. Gynec. Obstet.— 1987.— Vol. 165, N 6.— P. 519—522.
11. *Cynkin M. A., Gilbert A.* // Nature.— 1960.— Vol. 186, N 4719.— P. 155—156.
12. *Flohe L., Gierth H.* // Rev. infect. Dis.— 1987.— Vol. 9, Suppl. 5.— P. 553—561.
13. *Peavy D. L., Fairchild E. J.* // Infect. a. Immun.— 1986.— Vol. 152, N 2.— P. 613—616.

14. *Placer C. A., Chesman L. L., Johnson B. C.* // Analyt. Biochem.— 1966.— Vol. 16, N 2.— P. 359—364.

Поступила 16.11.89

#### FUNCTIONAL STATE OF LIVER TISSUE DURING DEVELOPMENT OF EXTRAHEPATIC CHOLESTASIS AND IN ENTEROSORPTION

*I. V. Grinko, A. A. Krivchik, O. V. Ivankova*

Medical School, Minsk

Use of enterosorption during the first week of extrahepatic cholestasis in rats led to decrease of disorders in functional state of liver tissue and its subcellular organelles as well as of accumulation of toxic substances in organism. The main effect of enterosorption appears to be binding of Gram-negative bacteria endotoxin in intestine.

© В. Л. СЕМЕНОВ, А. М. ЯРОШ, 1991

УДК 616.24-002-092.9-07:616.36-008.9

*В. Л. Семенов, А. М. Ярош*

#### НАРУШЕНИЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА В ПЕЧЕНИ ПРИ ВОСПАЛЕНИИ ЛЕГКИХ У КРЫС

НИИ физических методов лечения и медицинской климатологии им. И. М. Сеченова Минздрава УССР, Ялта

При воспалительных заболеваниях легких (ВЗЛ) в органах с аэробным характером энергетического метаболизма возникают нарушения тканевого дыхания, в том числе разобщение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи митохондрий [8]. Причинами этих нарушений могут быть тканевая гипоксия [8, 9] и действие медиаторов воспаления [11], а одним из механизмов их реализации — активация перекисного окисления липидов (ПОЛ) в мембранах митохондрий. Гипоксическая гипоксия также сопровождается развитием тканевой гипоксии. Однако в процессе адаптации к гипоксической гипоксии активируются механизмы регуляции цикла Кребса и дыхательной цепи митохондрий, обеспечивающие резистентность организма к острой гипоксии и другим неблагоприятным факторам [3—5, 12].

Цель работы — выяснение возможности предупреждения нарушений тканевого дыхания при ВЗЛ путем предварительной гипоксической тренировки (ГТ) и изучение некоторых биохимических механизмов превентивного действия такой тренировки.

Методика. Работа выполнена на белых крысах Вистар массой 150—200 г. ГТ крыс проводили путем их содержания в барокамере по 7 ч в сутки на протяжении 2 нед при пониженном давлении атмосферы, соответствующем подъему на высоту 4 км над уровнем моря. У части животных под эфирным наркозом вызвали воспаление легких [2]. Исследование митохондриального дыхания и ПОЛ митохондрий печени проводили через 3 сут развития воспаления или в аналогичный срок после ГТ у крыс без воспаления легких. Контролем служили интактные животные. После декапитации митохондрии печени выделяли из 10 % гомогената при температуре 0—2 °С путем дифференциального центрифугирования [7]. Среда выделения содержала 300 мМ сахарозы и 4 мМ трис-НСl pH 7,4. Дыхание митохондрий регистрировали при 26 °С в ячейке (объем 1,6 мл) с помощью закрытого электрода типа Кларка на поляро-

Действие ГТ на дыхание митохондрий печени крыс при воспалении легких ( $M \pm m$ ;  $n=5-8$ )

Вариант опыта	$V_3$ , нг	$V_4$ , $O_2$ /с·мг белка	$V_{днф}$	Дыхательный контроль, отн. ед.	$\Delta ADF/\Delta O$	$\Delta ADF/\Delta I$ , мкМ/с·мг белка
<b>Сукцинат, 2,5 мМ</b>						
Контроль	$1,54 \pm 0,05$	$0,72 \pm 0,03$	$2,89 \pm 0,14$	$2,18 \pm 0,14$	$1,33 \pm 0,06$	$1,92 \pm 0,11$
ГТ	$1,26 \pm 0,10^*$	$0,62 \pm 0,05$	$2,41 \pm 0,17^*$	$2,05 \pm 0,09$	$1,78 \pm 0,09^*$	$2,21 \pm 0,09^*$
ГТ+ВЗЛ	$1,32 \pm 0,09$	$0,65 \pm 0,02^{**}$	$2,58 \pm 0,12^{**}$	$2,02 \pm 0,11^{**}$	$1,41 \pm 0,07$	$1,86 \pm 0,11^{**}$
ВЗЛ	$1,03 \pm 0,11^*$	$0,54 \pm 0,04^*$	$1,90 \pm 0,07^*$	$1,43 \pm 0,13^*$	$1,23 \pm 0,13$	$1,23 \pm 0,12^*$
<b>Сукцинат, 2,5 мМ+глутамат, 1 мМ</b>						
Контроль	$1,54 \pm 0,05$	$0,70 \pm 0,02$		$2,17 \pm 0,11$	$1,39 \pm 0,05$	$2,12 \pm 0,11$
ГТ	$1,31 \pm 0,06^*$	$0,58 \pm 0,05^*$		$2,22 \pm 0,09$	$1,61 \pm 0,06^*$	$2,11 \pm 0,06$
ГТ+ВЗЛ	$1,40 \pm 0,07^{**}$	$0,65 \pm 0,03^{**}$		$2,15 \pm 0,09$	$1,43 \pm 0,05^{**}$	$2,01 \pm 0,09^{**}$
ВЗЛ	$0,99 \pm 0,11^*$	$0,52 \pm 0,03^*$		$2,06 \pm 0,08$	$1,22 \pm 0,07^*$	$1,38 \pm 0,07^*$

графическом анализаторе РА-2 (ЧСФР). Среда инкубации содержала 190 мМ сахарозы, по 5 мМ KCl, MgCl<sub>2</sub>, KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 мМ трис-HCl pH 7,4. В среду инкубации вносили митохондрии до концентрации белка 1,5—2 мг/мл, измеренной по Лоури [13]. Субстраты окисления: сукцинат (2,5 мМ), сукцинат (2,5 мМ)+глутамат (1,0 мМ), глутамат (1,0 мМ)+малат (1,0 мМ) или липемическая сыворотка (12,5 мкл/мл), содержащая липиды в концентрации 25 мг/мл. Акцептором фосфата служил аденозиндифосфат (АДФ) (100 мкМ), разобщителем фосфорилирования и дыхания — 2,4-динитрофенол (ДНФ) (300 мкМ). Оценивали следующие показатели:  $V_4$  — скорость дыхания в присутствии субстрата окисления;  $V_3$  — скорость дыхания после добавки АДФ;  $V_{днф}$  — скорость разобщенного дыхания;  $\Delta ADF/\Delta O$  — коэффициент фосфорилирующего дыхания как характеристика эффективности дыхания;  $\Delta ADF/\Delta I$ ·мг белка — скорость фосфорилирования АДФ.

Для оценки ПОЛ выделенные митохондрии промывали 175 мМ KCl, содержащим 2,5 мМ трис-HCl pH 7,4. В них определяли уровень диеновых конъюгатов ( $\Delta E_{232}$ ), диенкетон ( $\Delta E_{273}$ ), малонового диальдегида, общих липидов, каталазную активность, в постмитохондриальной фракции измеряли антиокислительную активность [10].

Результаты измерений обработаны статистически с использованием критериев Томпсона и Стьюдента [6].

**Результаты и обсуждение.** Через 3 сут после индукции ВЗЛ у крыс, не подвергавшихся ГТ, развивалась бронхопневмония (от сливной дольковой до полисегментарной). В легких при этом возникли изменения, обуславливающие как выброс в кровь медиаторов воспаления (результат воспалительной реакции), так и развитие гипоксии (скопление в просветах бронхов слизистого и слизисто-гнойного содержимого, появление в просветах альвеол клеточного экссудата, отек и клеточная инфильтрация межальвеолярных перегородок, в ряде случаев — очаговая гнойная деструкция и склерозирование легочной ткани).

Изменения окислительного фосфорилирования митохондрий печени крыс этой группы в зависимости от использованных субстратов окисления состояли в следующем (табл. 1). Скорость дыхания митохондрий  $V_3$  была снижена вне зависимости от субстрата окисления, а снижение  $V_4$  и  $V_{днф}$  отсутствовало, если субстратом окисления была липемическая сыворотка. Скорость фосфорилирования АДФ также снижалась при окислении всех субстратов, за исключением липемической сыворотки. Кроме того, при использовании в качестве субстрата липемической сыворотки термодинамический коэффициент окислительного фосфорилирования  $\Delta ADF/\Delta O$  у крыс с ВЗЛ повышался, а на других субстратах он был в пределах нормы. Дыхательный контроль у крыс этой группы был снижен лишь при окислении сукцината.

После ГТ у здоровых крыс установлены следующие изменения митохондриального окисления. При окислении субстратов цикла Кребса отмечалось снижение  $V_3$ ,  $V_4$  и  $V_{днф}$ , как и у больных животных. В то же время эффективность фосфорилирования повышалась на всех использованных субстратах цикла Кребса. Иные, чем при воспалении легких, изменения наблюдали при использовании в качестве субстрата липемической сыворотки: повышались  $V_3$ , дыхательный контроль, эффективность и скорость фосфорилирования АДФ.

При индукции воспаления легких после ГТ воспалительный процесс в легких оказался менее тяжелым и распространенным, чем без ГТ. Преобладали очаговый катаральный бронхит, дольковая или сливная дольковая бронхопневмония без выраженной деструкции легочной ткани. Изменения митохондриального дыхания у этих крыс в сравнении с интактными животными были незначительны и ближе к тем, которые наблюдали после ГТ у здоровых крыс, чем у нетренированных больных крыс. Они проявляются только при использовании в качестве субстрата смеси глутамата с малатом или липемической сыворотки. В первом случае они состояли в уменьшении  $V_{днф}$ , что наблюдали также у нетренированных больных крыс и после тренировки здоровых, а также в снижении дыхательного контроля, что имело место только в данной группе. Во втором случае, как и после ГТ у здоровых крыс, повысились  $V_3$ , дыхательный контроль, эффективность и скорость фосфорилирования АДФ.

Таким образом, предварительные ГТ оказывают выраженное протекторное действие на нарушения энергетических реакций митохондрий печени при развитии воспаления легких. Изложенное позволяет заключить, что это действие реализуется 2 путями — ослаблением воспалительного процесса в легких и изменением метаболических реакций митохондрий, особенно повышением эффективности фосфорилирования на липидных субстратах. Последнее может быть связано с торможением ПОЛ митохондрий — одного из важных механизмов повреждения клеточных мембран [1, 10]. Для проверки данного предположения изучали изменения этого процесса в митохондриях печени при воспалении легких и ГТ.

Результаты исследования показали (табл. 2), что развитие воспаления в легких сопровожда-

Действие ГТ на ПОЛ митохондрий печени крыс при воспалении легких ( $M \pm m$ ;  $n=5-11$ )

Вариант опыта	Диспосые конъюгаты, АЕ на 1 мг липидов	Диенкетоны, АЕ на 1 мг липидов	Малоновый диальдегид, нмоль на 1 мг липидов	Липиды/белок	АОА, $K \cdot 10^{-4}$ л/мин на 1 мг печени	Каталаза, ммоль $H_2O_2$ /мин на 1 мг белка
Контроль	$0,154 \pm 0,013$	$0,096 \pm 0,011$	$5,86 \pm 0,30$	$0,59 \pm 0,01$	$3,16 \pm 0,30$	$4,51 \pm 0,18$
ГТ	$0,130 \pm 0,018$	$0,088 \pm 0,014$	$5,12 \pm 0,88$	$0,95 \pm 0,06^*$	$2,93 \pm 0,30$	$3,67 \pm 0,29^*$
ГТ+ВЗЛ	$0,145 \pm 0,011^{**}$	$0,121 \pm 0,014$	$6,35 \pm 0,60^{**}$	$0,66 \pm 0,02^{***}$	$3,90 \pm 0,06^{***}$	$2,31 \pm 0,12^*$
ВЗЛ	$0,385 \pm 0,106^*$	$0,170 \pm 0,030^*$	$3,87 \pm 0,14^*$	$0,33 \pm 0,02^*$	$1,77 \pm 0,06^*$	$2,18 \pm 0,22^*$
<b>Глутамат, 1 мМ + малат, 1 мМ</b>						
Контроль	$1,03 \pm 0,05$	$0,41 \pm 0,02$	$1,65 \pm 0,05$	$2,68 \pm 0,12$	$1,89 \pm 0,09$	$2,04 \pm 0,14$
ГТ	$1,01 \pm 0,07$	$0,44 \pm 0,04$	$1,20 \pm 0,09^*$	$2,39 \pm 0,21$	$2,29 \pm 0,15$	$2,43 \pm 0,18$
ГТ+ВЗЛ	$0,96 \pm 0,06$	$0,43 \pm 0,02^{**}$	$1,28 \pm 0,08^*$	$2,23 \pm 0,09^{***}$	$2,12 \pm 0,09$	$2,08 \pm 0,16^{**}$
ВЗЛ	$0,79 \pm 0,04$	$0,31 \pm 0,02^*$	$1,22 \pm 0,09^*$	$2,51 \pm 0,09$	$1,88 \pm 0,11$	$1,32 \pm 0,07^*$
<b>Сыворотка, 12,5 мкл/мл</b>						
Контроль	$0,50 \pm 0,03$	$0,33 \pm 0,05$		$1,52 \pm 0,09$	$1,30 \pm 0,09$	$0,63 \pm 0,06$
ГТ	$0,91 \pm 0,08^*$	$0,38 \pm 0,04$		$2,40 \pm 0,12^*$	$2,09 \pm 0,08^*$	$1,78 \pm 0,10^*$
ГТ+ВЗЛ	$0,81 \pm 0,05^{***}$	$0,39 \pm 0,02^{**}$		$3,09 \pm 0,08^{***}$	$2,05 \pm 0,13^{***}$	$1,81 \pm 0,17^{***}$
ВЗЛ	$0,34 \pm 0,02^*$	$0,25 \pm 0,05$		$1,39 \pm 0,10$	$1,55 \pm 0,01^*$	$0,53 \pm 0,02$

Примечание. Здесь и в табл. 2 одна звездочка — достоверные различия по сравнению с контролем, две — по сравнению с группой ВЗЛ ( $p \leq 0,05$ ).

ется активацией ПОЛ в митохондриях печени. Об этом свидетельствуют повышение в них содержания диеновых конъюгатов и диенкетонных структур, снижение каталазной и неферментативной антиокислительной активности. В то же время имеет место снижение уровня конечного продукта ПОЛ — малонового диальдегида, что может быть следствием утилизации промежуточных продуктов ПОЛ в качестве субстратов энергетических реакций митохондрий. Это подтверждает также факт снижения в митохондриях отношения липиды/белок.

После ГТ у здоровых крыс содержание продуктов ПОЛ в митохондриях печени не изменяется; повышается лишь отношение липиды/белок и незначительно снижается каталазная активность. Индукция воспаления легких после ГТ не вызывает у крыс столь выраженного изменения ПОЛ митохондрий печени, как у нетренированных крыс. Содержание продуктов ПОЛ у этих крыс такое же, как у здоровых. Отношение липиды/белок повышено, как и у здоровых крыс после ГТ. Значительно повышена неферментативная антиокислительная активность постмитохондриальной фракции печени. Единственное сходство этих крыс и животных с ВЗЛ без предварительных ГТ состоит в существенном снижении каталазной активности.

Таким образом, ГТ предупреждают нарушения митохондриального дыхания печени, вызываемые воспалением легких. Выявлено 2 возможных метаболических механизма протекторного действия ГТ: первый — повышение эффективности окислительного фосфорилирования, второй — торможение ПОЛ митохондрий и повышение вклада липидов в энергетическое обеспечение организма.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Дудник Л. Б., Биленко М. В., Алесенко А. В. и др. // *Вопр. мед. химии.* — 1981. — № 3. — С. 380—383.
2. Захарьевская М. А., Анчиков Н. Н. // *Бюл. эксп. биол.* — 1952. — № 6. — С. 62—67.
3. Коваленко Е. А. // *Нарушение механизмов регуляции и их коррекция.* — М., 1989. — С. 482.
4. Лукьянова Л. Д. // *Клеточное дыхание в норме и в условиях гипоксии.* — Горький, 1973. — С. 36—37.
5. Лукьянова Л. Д. // *Там же.* — С. 615.
6. Мюллер П., Нойман П., Шторм Р. *Таблицы по математической статистике:* Пер. с нем. — М., 1982.

7. Руководство по изучению биологического окисления полиграфическим методом / Под ред. Г. М. Франка и др. — М., 1973.
8. Семенов В. Л. // *Укр. биохим. журн.* — 1988. — Т. 60, № 3. — С. 94—97.
9. Семенов В. Л., Ярош А. М. Компенсаторно-приспособительные изменения кардиореспираторной системы и дыхание тканей с аэробным метаболизмом при воспалении легких // *Рукопись деп. в ВИНТИ 01.12.88.* № 8477-В.
10. Семенов В. Л. // *Пат. физиол.* — 1989. — № 2. — С. 17—20.
11. Семенов В. Л. // *Климатические и преформированные физические факторы в профилактике и реабилитации больных бронхолегочными и сердечно-сосудистыми заболеваниями* / Под ред. В. М. Боголюбова, А. Ф. Гавриленко. — М., 1989. — С. 224—225.
12. Симановский Л. Н. // *Клеточное дыхание в норме и в условиях гипоксии.* — Горький, 1973. — С. 147—148.
13. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. // *J. biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.

Поступила 26.04.90

#### IMPAIRMENT OF ENERGY METABOLISM IN LIVER TISSUE OF RATS WITH PNEUMONIA

V. L. Semenov, A. M. Yarosh

Institute of Physical Methods of Treatment and Medical Climatology, Yalta

Low energetic shift was found in liver mitochondria of rats with pneumonia, which was expressed as a decrease in rates of phosphorylating respiration and ADP phosphorylation independently on substrate of oxidation. Training of rats under hypoxic conditions led to a decrease in severity and distribution of inflammation in the animals with induced pneumonia. Patterns of mitochondrial oxidation, if Krebs cycle substrates were used, were normalized in most of the animals, while rates of ADP-stimulated respiration, phosphorylation as well as energy regulation were distinctly increased. Alterations in mitochondrial energy reactions depended on the state of lipid peroxidation, initial steps of which may produce substrates of mitochondrial respiration. Training under hypoxic conditions, which protected against energy deficiency developed in pneumonia, contributed to increase in oxidative phosphorylation efficiency especially when lipid substrates were used.

С. А. Козлов, О. Ю. Урюпов, А. Б. Томчин,  
Е. Н. Киселев

## ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ РЯДА ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ ИШЕМИИ ПЕЧЕНИ

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

Временная ишемия и обусловленная ею циркуляторная гипоксия печени являясь неизбежным следствием лигирования печеночно-двенадцатиперстной связки. Эта процедура необходима при операциях по поводу тяжелых травм печени или при больших резекциях опухолей этого органа. Циркуляторная гипоксия и ишемия наблюдаются также на всех этапах трансплантации печени, при различных видах шока и т. д. Проблема противоишемической защиты печени разработана недостаточно, что связано со сложной структурно-функциональной организацией органа и высокой чувствительностью его к ишемии [8]. Мы провели сравнительное исследование противоишемической эффективности ряда фармакологических препаратов, хорошо зарекомендовавших себя при изучении на изолированном органе [2], а также новых антигипоксантов — производных триазиноиндола Т-468 и Т-407 на модели временной ишемии печени *in situ*.

Методика. Опыты выполнены на 61 кролике породы шиншилла массой 2,0—2,7 кг. Под фторотановым наркозом производили срединную лапаротомию и выделяли гепатодуоденальную связку, бедренные магистральные сосуды (артерию и вену), магистральную вену брыжейки толстой кишки. Бедренную артерию использовали для измерения артериального давления (АД), бедренную вену и магистральную вену брыжейки толстой кишки — для наложения анастомоза между бассейнами портальной и нижней полой вен для предупреждения застоя крови в бассейне портальной вены. Всем животным накладывали лигатуру на гепатодуоденальную связку на 90 мин. Животные были разделены на 5 групп. 1-я группа ( $n=23$ ) служила контролем — противоишемическую защиту печени не проводили. Кроликам остальных групп профилактически вводили различные препараты: 2-я группа ( $n=8$ ) — преднизолон в дозе 2—30 мг/кг, 3-я ( $n=11$ ) —  $\alpha$ -токоферол в дозе 100—200 мг/кг, 4-я ( $n=8$ ) — Т-407 в дозе 8,7—18,9 мг/кг и 5-я группа ( $n=11$ ) — Т-468 в дозе 6,1—9,4 мг/кг. Все препараты, кроме  $\alpha$ -токоферола, вводили внутривенно в водных растворах за 1—2 ч до опыта;  $\alpha$ -токоферол вводили внутривенно за 1 сут до ишемии печени. После снятия зажима кроликам внутрипортально вводили 10 мл 6% раствора двууглекислого натрия и внутривенно 20 мл полиглюкина, далее на протяжении 3—4 ч внутривенно переливали 100—150 мл гемодеза. Регистрировали выживаемость кроликов в динамике, а также ряд физиологических и биохимических показателей: АД и портальное давление (ПД) крови, частоту сокращений сердца (ЧСС) и частоту дыхания (ЧД), ректальную температуру ( $T_{\text{рект}}$ ), активность АСТ и АЛТ (в  $\mu\text{кат/л}$ ), рН крови, концентрацию в крови мочевины (в мМ) и аммиака (в мкМ). Активность трансаминаз определяли по методу [6, 7], аммиак в крови — по методу [9], для определения уровня мочевины в крови пользовались стандартными тест-наборами фирмы «Лаксма» (ЧСФР). Статистическую обработку полученных данных проводили по методу непрямых разностей с использованием критерия Стьюдента [3], для сравнения выживаемости животных пользовались точным методом Фишера [5]. Все показатели регистрировали трижды: перед опытом (исходные данные), через 30 мин от начала ишемии и спустя 3 мин после ее окончания. Длительность наблюдения за выживаемостью составила 7 сут.

Результаты и обсуждение. Предварительный анализ показал, что наиболее характер-

Изменения функциональных и биохимических показателей у кроликов после ишемии печени под влиянием фармакологических средств

Препарат	Период исследования	АД, мм рт. ст.	ПД, мм рт. ст.	ЧСС	ЧД	$T_{\text{рект}}$ , °С	рН крови	АСТ, $\mu\text{кат/л}$	АЛТ, $\mu\text{кат/л}$	Мочевина, мМ	Аммиак, мкМ	Выживаемость через 1 сут
Контроль	Исходные данные	97±2	20±1	274±10	86±5	37,3±0,2	7,41±0,01	458±36	323±37	4,5±0,4	13,6±1,7	—
	Через 30 мин после ишемии:											
Преднизолон	абс.	66±3*	20±1	176±5*	86±5	30,8±0,3*	7,00±0,02*	1037±73*	580±63*	5,2±0,8	20,5±2,2*	—
	% к исходным	68,0	100,0	64,2	100,0	82,6	94,5	226,4	179,6	115,6	150,7	0,0
$\alpha$ -Токоферол	Исходные данные	95±2	17±1	259±12	84±7	38,1±0,2	7,48±0,02	407±48	323±31	4,4±0,4	15,8±3,5	—
	Через 30 мин после ишемии:											
$\alpha$ -Токоферол	абс.	71±5*	18±1	196±9*	100±10	30,1±0,4*	7,10±0,03*	781±65*	385±50	7,0±0,9*	14,3±2,0	—
	% к исходным	74,7	105,9	76,7	119,0	79,0	94,9	191,9	119,9	159,1	90,5	50,0
Т-407	Исходные данные	92±3	19±2	276±9	89±4	38,0±0,1	7,50±0,02	414±36	300±43	4,4±0,4	13,4±2,4	—
	Через 30 мин после ишемии:											
Т-407	абс.	71±2*	14±2	183±13*	87±8	30,0±0,3*	7,05±0,02*	840±73*	386±35	5,9±0,7	14,3±1,0	—
	% к исходным	77,2	73,7	66,3	97,7	78,9	94,0	202,9	128,7	134,1	106,7	27,3
Т-468	Исходные данные	101±3	20±2	254±4	71±7	37,2±0,3	7,45±0,02	400±47	301±33	5,0±0,8	14,4±0,9	—
	Через 30 мин после ишемии:											
Т-468	абс.	76±5*	17±1	180±6*	84±9	29,7±0,4*	7,12±0,02*	978±100*	511±53*	7,7±0,7*	16,7±0,7	—
	% к исходным	75,2	85,0	70,9	118,3	79,8	95,6	244,5	169,8	154,0	116,0	37,5
Т-468	Исходные данные	101±3	19±1	250±10	83±6	37,5±0,2	7,41±0,01	474±81	320±32	5,4±0,9	13,1±1,7	—
	Через 30 мин после ишемии:											
Т-468	абс.	77±4*	19±1	162±7*	76±10	29,6±0,4*	7,08±0,03*	815±64*	370±52	6,4±0,9	14,3±0,4	—
	% к исходным	76,2	100,0	64,8	91,6	78,9	95,5	171,9	115,6	118,5	109,2	45,5

\* Достоверные отличия ( $p < 0,05$ ) от исходных данных.

ными являются изменения, наступившие после окончания ишемии, а данные, полученные через 30 мин после начала ишемии, в большинстве случаев — промежуточные между исходными и окончательными, кроме ПД, ЧД и концентрацией мочевины. Исходные и окончательные данные сведены нами в таблицу, в которой представлены средние величины параметров, а также их изменения (в %) по сравнению с исходными значениями.

Сравнение показателей указывает на то, что во всех случаях, включая контроль, изменения ПД и ЧД были незначительными и недостоверными, т. е. эти показатели не являются информативными. Анализ, проведенный путем сравнения сумм отклонений средних данных после ишемии по препаратам от контрольных, показал, что наибольшие суммы отклонений дают следующие показатели: выживаемость через 1 сут после опыта > аммиак > АСТ > АЛТ > мочевины, т. е. преимущественно биохимические параметры. Изменения физиологических показателей и рН крови, даже если они по сравнению с исходными данными были значительны (рН,  $T_{рект}$ , АД, ЧСС), мало отличались от контрольных и между собой при использовании разных препаратов. Следовательно, и эти параметры не дают существенной информации для анализа действия веществ на состояние печени после ишемии.

Наибольшую активность АСТ в крови в реперфузионном периоде наблюдали у контрольных животных. Значительное снижение активности АСТ отмечали при использовании преднизолона,  $\alpha$ -токоферола и Т-468. Поскольку выход внутриклеточного фермента возможен лишь через поврежденную мембрану гепатоцита, то полученные результаты подтверждают общеизвестные данные о наличии у преднизолона и  $\alpha$ -токоферола мембраностабилизирующих свойств [4] и свидетельствуют о возможном их присутствии у Т-468. Сходные данные были получены и в отношении другой трансаминазы — АЛТ. Это также подтверждает наличие у исследуемых препаратов мембраностабилизирующих свойств.

При использовании всех исследуемых препаратов в постишемическом периоде наблюдали существенное снижение содержания аммиака в крови по сравнению с контролем. В сопоставлении с тем, что все препараты, кроме Т-468, значительно повышают уровень мочевины в крови, это свидетельствует о лучшей по сравнению с контролем сохранности мочевиносинтетической функции печени в условиях лекарственной защиты от ишемии.

Наблюдения за выживаемостью животных показали, что ни один из контрольных кроликов не прожил более 1 сут, при использовании в качестве средств противоишемической защиты преднизолона более 1 сут прожили 4 кролика из 8 (2 — менее 2 сут, 1 — менее 4 сут), при применении  $\alpha$ -токоферола — 3 кролика из 11 (1 — менее 2 сут, 1 — менее 3 сут и 1 — менее 4 сут), при применении Т-407 — 3 кролика из 8 (1 — менее 2 сут, 1 — менее 3 сут и 1 — более 7 сут). Наилучший исход ишемии при длительном наблюдении отмечали при использовании Т-468: из 11 кроликов более 1 сут прожили 5 животных (2 — более 7 сут, 1 — более 6 сут, 1 — более 5 сут и 1 — менее 2 сут).

Анализ корреляции между выживаемостью и информативными показателями (АСТ, АЛТ, моче-

вина, аммиак) показал тесную и достоверную отрицательную связь между выживаемостью и степенью изменения концентрации аммиака ( $r = -0,92$ ). Менее тесные связи существуют между степенью изменения концентрации аммиака и активностью АЛТ ( $r = 0,83$ ) и между степенью изменения активности АСТ и АЛТ ( $r = 0,90$ ). Коэффициент множественной корреляции между выживаемостью и изменениями аммиака и АЛТ был таким же, как и коэффициент для аммиака, т. е. 0,91. Все это указывает на то, что ведущим в механизме гибели животных от ишемии печени является нарушение детоксицирующей функции этого органа по отношению к аммиаку. Понятны и связи изменений уровня аммиака и активности трансаминаз, поскольку во время ишемии катализируемые ими процессы, по-видимому, и являются основными поставщиками этого метаболита. Таким образом, изученные препараты защищали животных от гибели в основном благодаря способности уменьшать вызванное гипоксическим повреждением печени накопление аммиака в крови.

Что касается механизмов действия веществ, то по представленным данным судить о нем можно лишь в общих чертах. Ясно только то, что все они защищают мембраны гепатоцитов от повреждения, но характер их мембраностабилизирующего действия, вероятно, различен, поскольку нет корреляции между их влиянием на выживаемость и отдельные биохимические показатели. Однако можно сказать, что прямое действие преднизолона на мембраны, антиоксидантный эффект  $\alpha$ -токоферола и антигипоксическое действие производных триазиноиндола имеют одним из главных проявлений стабилизацию мембран гепатоцитов при ишемии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Козлов С. А. Способ оценки длительности тепловой ишемии печени: А. с. 989483 СССР // Открытия.— 1983.— № 2.— С. 210.
2. Козлов С. А., Зиновьев Ю. В. // Анест. и реаниматол.— 1987.— № 6.— С. 48—50.
3. Монцевичуге-Эрингене Е. В. // Пат. физиол.— 1964.— № 4.— С. 71—79.
4. Розенталь Р., Соболев В., Сондоре А. Донорство в трансплантации органов.— Рига, 1987.
5. Урбах В. Ю. Математическая статистика для биологов и медиков.— М., 1963.
6. Bergmeyer H. U., Bernt E. // Methoden der enzymatischen Analyse / Hrsg. H. U. Bergmeyer.— Berlin, 1970.— S. 691—695.
7. Bergmeyer H. U., Bernt E. // Ibid.— S. 723—727.
8. Hasselgren P. O. // Surg. Obstet.— 1987.— Vol. 164, N 2.— P. 187—196.
9. Keller H., Müller-Beissenhirtz K., Neumann E. // Klin. Wschr.— 1967.— Bd 45.— S. 314—319.

Поступила 13.02.90

#### EFFICIENCY OF SOME PHARMACOLOGICAL DRUGS IN LIVER TISSUE ISCHEMIA

S. A. Kozlov, O. Yu. Uryupov, A. B. Tomchin, E. N. Kiselev

Military Medical Academy, Leningrad

Antiischemic activity of  $\alpha$ -tocopherol, prednisolone, T-407 and T-408 on functions of liver tissue was studied after 90 min contraction of hepatoduodenal ligament in 61 animals. All the preparations studied exhibited the antiischemic protection of liver tissue; the most effective drugs proved to be T-408 and prednisolone.

В. Б. Шнейвайс, К. С. Амилов

**РОЛЬ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ ВИСЦЕРАЛЬНО-ИШЕМИЧЕСКОГО ШОКА**

НИИ гематологии и переливания крови Минздрава Узбекской ССР, Ташкент

Основными факторами патогенеза шока как типового патологического процесса являются снижение перфузии тканей кровью в результате распада метаболитов гемоциркуляции, гипоксия и нарушение метаболизма, которые по мере прогрессирования приводят к смерти («необратимая» фаза шока) даже в условиях интенсивной терапии [14]. Гипоксия, носящая вначале циркуляторный характер, на поздних стадиях шока осложняется гистотоксией, во многом обусловленной действием токсических метаболитов, в том числе продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ). По данным [9], в основе гистотоксии, приводящей к «необратимым» изменениям клеток, лежит блокада переноса электронов по дыхательной цепи митохондрий, в связи с чем затрудняется утилизация имеющегося в тканях кислорода. Такое повреждение дыхательной цепи способствует генерации супероксидного анион-радикала сразу в нескольких дыхательных комплексах [15], что приводит к резкому усилению ПОЛ мембран митохондрий и образованию ацилгидроперекисей микросомальных мембран [2]. Увеличение полярности окисляемых соединений препятствует накоплению продуктов ПОЛ в гидрофобной фазе мембран и способствует выходу их в кровь [1]. Существенную роль в повышении уровня продуктов ПОЛ в крови может также играть генерация супероксидных радикалов нейтрофилами и лимфоцитами. Индукторами этого процесса способны выступать накапливающиеся в организме токсины в виде антигенов микроорганизмов, олигопептидов и др. [5].

Несмотря на резкую активацию ПОЛ, при некоторых экстремальных состояниях (шок, травма, инфаркт миокарда) отмечается подавление хемилюминесценции (ХЛ) сыворотки крови, причина которого нуждается в изучении [13].

В настоящей работе представлены результаты исследования содержания продуктов ПОЛ в сыворотке крови крыс в динамике висцерально-ишемического шока (ВИШ), сопровождающегося выраженным эндотоксикозом, изменением показателей ХЛ сыворотки и антирадикальной активности сывороточных липидов.

Методика. Работа выполнена на 42 белых крысах-самцах массой 250—300 г. Под местной анестезией 0,5 % раствором новокаина обнажали и канюлировали бедренную артерию для измерения артериального давления (АД). Наркоз достигался введением этаминал-натрия (4 мг на 100 г массы). Свертывание крови предотвращали гепарином (0,2 мг на 100 г массы). На основной ствол передней брыжеечной артерии накладывали сосудистый зажим и оставляли его на 2 ч. В состоянии острой ишемии оказывались вся тонкая и правые отделы толстой кишки. После снятия зажима и восстановления кровообращения продолжительность жизни животных составляла 80—120 мин. Пробы крови брали для исследования перед реваскуляризацией и через 60 мин после нее. В течение опыта исследовали АД, pH артериальной крови и другие физиологические показатели. Периодически наблюдали за макроскопическими изменениями кишечника.

Определяли содержание общих липидов сыворотки крови [6], гидроперекисей липидов [20], флюоресцирующих шиффовых оснований [16]. ХЛ регистрировали с помощью ФЭУ-39А по схеме усиления тока. Инициация ХЛ проводилась серно-кислым железом. Антирадикальную активность липидов, выделенных по методу [17], определяли по ингибированию электрохемилюминесценции (ЭХЛ) системы хлороформ — ацетон — малениновая кислота и выражали в виде коэффициента ингибирования в процентах [10].

Результаты и обсуждение. Характер изменения уровня АД и pH артериальной крови свидетельствует о наличии свойственных шоку расстройств гемодинамики и метаболического ацидоза уже на стадии ишемии кишечника, которые достигают значительной степени в терминальной фазе патологического процесса. В свою очередь 2-часовая окклюзия верхней брыжеечной артерии с последующей реваскуляризацией привела к повышению содержания общих липидов в сыворотке с 3,2 до 4,6 мг/мл, по-видимому, за счет выхода свободных липидов в кровь и миграции окисленных жирных кислот из повреждаемых мембран клеток. Уже в стадии ишемии кишечника отмечено увеличение содержания первичных продуктов ПОЛ; в терминальной фазе процесса уровень гидроперекисей превосходил вдвое (при пересчете на 1 мг липидов) и второе (на 1 мл сыворотки) нормальную величину. Концентрация конечных продуктов ПОЛ (шиффовые основания) к концу опыта также возрастала (табл. 1).

Отсутствие прироста шиффовых оснований после первого этапа (ишемия) можно объяснить активацией антиоксидантных систем, что подтвердилось при исследовании ХЛ сыворотки крови и ЭХЛ липидов, выделенных из сыворотки на этапах ВИШ. Так, ХЛ, индуцированная ионами двухвалентного железа, при ВИШ резко подавлялась; уменьшались и амплитуда быстрой вспышки ХЛ, и светосумма излучения за 10 мин наблюдения. В качестве причины этого можно допустить появление в крови при ВИШ соединений, гасящих люминесценцию, или значительное усиление антирадикальных свойств компонентов сыворотки. Последнее было подтверждено при исследовании

Таблица 1

Артериальное давление, pH артериальной крови и показатели ПОЛ при ВИШ у крыс ( $M \pm m$ )

Период исследования	АД, мм рт. ст.	pH	Общие липиды, мг на 1 мл сыворотки	Гидроперекиси		Шиффовы основания	
				АЕ на 1 мл сыворотки	АЕ на 1 мг липидов	усл. ед. на 1 мл сыворотки	усл. ед. на 1 мг липидов
Контроль	100±6	7,37±0,02	3,2±0,2	1,63±0,4	0,51±0,12	1,6±0,4	0,5±0,1
2-Часовая ишемия кишечника	50±4*	7,22±0,02*	3,3±0,3	2,38±0,3*	0,72±0,11*	2,5±0,7*	0,6±0,2
60 мин после реваскуляризации	29±4*	7,02±0,03*	4,6±0,3*	4,56±1,2*	1,1±0,3*	2,5±0,7*	1,2±0,2*

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

Таблица 2

Интенсивность ХЛ и антирадикальная активность липидов сыворотки крови при ВИШ у крыс ( $M \pm m$ )

Период исследования	Интенсивность ХЛ, усл. ед.	Светосумма медленной вспышки, усл. ед.	Светосумма за 10 мин, усл. ед.	Коэффициент ингибирования, %
Контроль	10,5±2,6	76±4	438±11	24,2±3,1
2-Часовая ишемия кишечника 60 мин после ревазуляризации	9,6±3,1	22,4±4,3*	236±12*	42,4±4,6*
	3,5±2,4*	9,6±1,1*	122±14*	67,3±8,6*

антирадикальных свойств липидов по ингибированию ими ЭХЛ, возникающей при рекомбинации ион-радикалов малеиновой кислоты. Выявлено, что после 2-часовой ишемии антирадикальная активность возросла с 24 до 42 %, в терминальной стадии процесса — до 67 % (табл. 2).

Анализируя многообразие факторов и механизмов патогенеза шока, можно предположить, что многие из них в той или иной степени связаны с активацией свободнорадикального окисления. Известна роль процессов ПОЛ в повышении общего периферического сопротивления сосудов и нарушении микроциркуляции [18], а также в нарушении сократительной функции миокарда и уменьшении сердечного выброса [19]. Известно, что накопление алифатических липоперекисей в крови приводит к подавлению синтеза простаглицина и благоприятствует тромбообразованию, чем способствует развитию ДВС-синдрома, свойственного шоку [12]. Выраженное влияние на адгезивно-агрегационные свойства форменных элементов крови и гемодинамику оказывают такие гидроперекиси липидов, как тромбоксаны [11]. Показано повреждающее влияние продуктов ПОЛ на мембраны эритроцитов, приводящее к снижению их механической стойкости к гемолизу. Существенна роль ПОЛ в активации и повреждении мононуклеарных фагоцитов [22].

С учетом существенной роли нарушений клеточного метаболизма в патогенезе «необратимой» фазы шока особую важность приобретают данные о значении активации ПОЛ в формировании «шоковой» клетки. Поскольку имеются сведения [21] о том, что активация ПОЛ является одной из причин альтерации митохондрий, а нарушение функции митохондриального окисления лежит в основе необратимости шока, можно полагать, что индукция свободнорадикальных реакций способствует прогрессированию процесса.

Продукты ПОЛ и системы регуляции такого окисления, видимо, формируют при шоке и систему адаптации. Известно, что свободнорадикальные продукты могут инактивировать катехоламины и обезвреживать токсины, выступая в качестве молекулярных «фагов» [4]. Супероксидные радикалы, окисляя НАДН [1] и разрушая липопро-теидные комплексы, способствуют выходу липофильных антиоксидантов — жирорастворимых витаминов, хинолов, возможно, липофильных компонентов растворимых витаминов, хинолов, возможно, липофильных компонентов «среднемолекулярного токсина» и др. [7]. Это соответствует при-

веденным выше данным о подавлении ХЛ при ВИШ. Аналогичные результаты получены и другими авторами при некоторых состояниях, требующих резкой активации антиоксидантных систем [3]. Появление в сыворотке веществ, гасящих ХЛ, и усиление антиоксидантных свойств липидов, очевидно, представляют собой молекулярную форму адаптации к чрезмерному усилению ПОЛ. Можно предположить, что недостаточность этой системы, не способной на определенном этапе процесса устранить нарастание в крови и тканях уровня продуктов ПОЛ, является показателем несостоятельности приспособительной реакции и служит одной из причин необратимости шока.

Таким образом, в патогенезе ВИШ наряду с механизмами, достаточно широко освещаемыми в литературе [9, 14], существенную роль играют токсические эффекты кислорода. Активные формы кислорода способны инициировать ПОЛ при взаимодействии с липидными компонентами биомембран либо опосредованно, например при повреждении дыхательных цепей или систем транспорта некоторых ионов. Накопление в крови продуктов ПОЛ происходит уже на стадии ишемии кишечника и резко усиливается после восстановления в нем кровотока. Прогрессирующее снижение уровня ХЛ сыворотки крови при шоке указывает на появление в ней ингибирующих ХЛ соединений, жирорастворимые компоненты которых оказались веществами с высокой антирадикальной активностью.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Афанасьев И. Б. // Успехи химии. — 1979. — Т. 48, № 6. — С. 977—1014.
2. Афанасьев И. Б. // Кислородные радикалы в химии и биологии. Материалы совещания. — Минск, 1984. — С. 13—29.
3. Каценович Э. Р. Исследование взаимосвязи различных форм ишемической болезни сердца с показателями перекисного окисления, антирадикальной активности и жирнокислотным составом липидов сыворотки крови. Автореф. дис. ... канд. наук. — М., 1981.
4. Коган А. Х., Лосев Н. И., Погромов А. П. и др. // Теоретические и экспериментальные вопросы биохимической неценности. — Ташкент, 1986. — С. 103—104.
5. Коган А. Х., Кудрин А. И., Лосев Н. И. и др. // Там же. — С. 104—107.
6. Колб В. Г., Камышников В. С. Клиническая биохимия. — Минск, 1978. — С. 311.
7. Ланкин В. З., Поляков В. М., Гуревич С. М. // Липиды: структура, биосинтез, превращения и функции. — М., 1977. — С. 93—103.
8. Ланкин В. З. // Кардиология. — 1989. — № 8. — С. 42—48.
9. Левин Г. С. // Гематол. и трансфузиол. — 1986. — № 12. — С. 13—18.
10. Лукин Ю. Л. // Биофизика. — 1976. — Т. 21, № 6. — С. 997—1002.
11. Маттиас Ф. Р., Ланс Х. Г. // Кардиология. — 1982. — № 11. — С. 39—44.
12. Самаль А. Б., Черенкевич С. И., Хмара Н. Ф. // Вопр. мед. химии. — 1984. — № 6. — С. 12—15.
13. Фархутдинов Р. Р. // Клини. мед. — 1984. — № 12. — С. 18—23.
14. Хашиев Р., Шейх Д. // Очерки по патологической биохимии. — М., 1981. — С. 253.
15. Cadenas E., Boveris A., Ragan C. J., Stoppani A. O. M. // Arch. Biochem. — 1977. — Vol. 180. — P. 248—257.
16. Csallany A., Ayaz K. L. // Lipids. — 1976. — Vol. 11, N 5. — P. 412—417.
17. Folch I., Lees M., Sloane-Stanley G. H. // J. biol. Chem. — 1957. — Vol. 226, N 1. — P. 497—509.
18. Chaugry J. H. // Amer. J. Physiol. — 1983. — Vol. 245. — P. 117—134.
19. Free radicals in microcirculation // Acta physiol. scand. — 1986. — Suppl. 548. — P. 1—127.

20. *Kako K. J.* // *J. molec. cell. Cardiol.* 1987.— Vol. 19, N 2.— P. 209—211.
21. *Recknagel R. O., Ghoshal A. K.* // *Exp. molec. Path.*— 1966.— Vol. 5, N 5.— P. 413—426.
22. *Werns S. W., Lucchesi B. R.* // *Free Radic. Biol. Med.*— 1988.— Vol. 4, N 1.— P. 31—37.

Поступила 09.01.89

## ROLE OF LIPID PEROXIDATION IN PATHOGENESIS OF VISCERAL-ISCHEMIC SHOCK

*V. B. Shneivais, K. S. Amilov*

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

Patterns of lipid peroxidation, chemoluminescence and anti-radical activity of rat blood serum were studied after simulation of visceral-ischemic shock developed as a result of two-hour-long ischemia of the small intestines and of right-side part of large intestine. Toxic effects of oxygen, accompanied by considerable activation of lipid peroxidation, were of importance in pathogenesis of this shock. Accumulation of lipid peroxidation products in blood occurred at the step of the intestine ischemia and was distinctly increased after restoration of circulation in the tissue. Increased inhibition of blood serum chemoluminescence as well as elevation of lipid antiradical activity were observed depending on steps of the shock development.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ; 1991

УДК 615.31: [547.96:577.112.853]: 033.07

*Н. И. Казачкина, Е. Р. Немцова, Р. И. Якубовская, Т. А. Кармакова, Л. М. Иванова, А. В. Соколов*

## ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИКИ ЛАКТОФЕРРИНА ЖЕНСКОГО МОЛОКА У ИНТАКТНЫХ МЫШЕЙ И ЖИВОТНЫХ-ОПУХОЛЕНОСИТЕЛЕЙ

Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П. А. Герцена, Всесоюзный онкологический научный центр АМН СССР, Москва

Лактоферрин (ЛФ) — железосодержащий гликопротеид, выявлен в ткани и секретах большинства желез экзокринового типа [1, 11], а также в специфических гранулах нейтрофилов [12].

ЛФ выполняет ряд важных функций в организме человека: является антибактериальным агентом [4], регулятором гранулоцитопоза [7], адсорбентом ионов железа [6].

При изучении молекулярных механизмов действия гемосорбции на организм онкологических больных нами было выявлено резкое увеличение количества ЛФ в сыворотке крови после процедуры при неизменившихся значениях концентраций других гуморальных компонентов гомеостаза [2].

Эти данные наряду со сведениями о физиологических функциях ЛФ и клиническими наблюдениями, свидетельствующими о противовоспалительном, детоксикационном эффекте гемосорбции, а также о стимулирующем действии ее на гемопоэз, позволили нам предположить, что ЛФ играет существенную роль в нормализации и длительной стабилизации показателей гомеостаза онкологических больных, подвергавшихся гемосорбции [2].

В связи с этим большой интерес представляло подробное изучение распределения в орга-

нах и тканях ЛФ, поступившего в кровоток. Имеющиеся данные литературы по этому вопросу весьма ограничены и относятся в основном к изучению распределения йодированного ЛФ у интактных животных [9, 14, 15].

Целью настоящего исследования являлось детальное изучение распределения нативного и йодированного ЛФ женского молока (н-ЛФ и  $^{125}\text{I}$ -ЛФ соответственно) в организме интактных животных и животных-опухоленосителей.

Методика. Работа выполнена на 60 интактных мышцах-самках линии ВА1.В/с (27 мышей были использованы в опытах по изучению фармакокинетики н-ЛФ, 33 — в опытах по изучению фармакокинетики  $^{125}\text{I}$ -ЛФ), и 33 мышцах-самках той же линии с асцитной карциномой Эрлиха. Исследования на опухоленосителях проводили на 5-й день после перевивки опухоли.

ЛФ женского молока и антитела к нему получали по описанной ранее методике [3].

Животным внутривенно вводили препарат в дозе 50 мг на 1 кг массы. Сразу после введения, а также через 5, 10, 15, 30 мин, 1, 4 и 24 ч животных деканитировали. Для исследования брали печень, почки, тонкую кишку, быстро добавляли к ним равное количество 0,01 М NaCl и 5000 ед/мл контрикала. Органы гомогенизировали, растирая в ступке со стеклом, и центрифугировали 15 мин при 6000 об/мин. Осадки отбрасывали, а надосадочную жидкость исследовали модифицированным методом радиальной иммунодиффузии по Манчини [10].

Изучение фармакокинетики йодированного ЛФ на интактных животных и мышцах-опухоленосителях проводили следующим образом. ЛФ метили  $^{125}\text{I}$ -хлораминовым методом: 3,1 мг ЛФ растворяли в 200 мкл 0,1 М натрий-фосфатного буфера pH 7,4, добавляли 3 мг  $\text{Na}^{125}\text{I}$  и проводили реакцию окисления хлорамином T в концентрации 4 мг/мл. Через 60 с реакцию останавливали добавлением метабисульфита натрия в концентрации 8 мг/мл и 50 мкл 10% KI. Полученный раствор наносили на колонку с сепадексом G-50, уравновешенным 0,1 М натрий-фосфатным буфером pH 7,4, и собирали фракции по 1 мл. Для дальнейшей работы отбирали белковые фракции, не содержавшие свободного изотопа.

$^{125}\text{I}$ -ЛФ вводили внутривенно в дозе 3,5 мг на 1 кг массы (2000 000 имп за 10 с на мышшь) в 0,2 мл физиологического раствора. Сразу после введения, через 5, 10, 15, 30 мин, 1, 2, 3, 5 и 24 ч после инъекции препарата животных деканитировали. Для исследования брали печень, почки, селезенку, сердце, легкие, желчный пузырь, тонкую кишку, сыворотку крови и асцитическую жидкость (у мышей-опухоленосителей). Измерение радиоактивности в образцах проводили на гамма-счетчике («Тесла», ЧССР).

Иммуногистохимическое изучение распределения н-ЛФ в печени интактных животных проводили по методике, описанной ранее [1].

Результаты и обсуждение. Результаты по распределению  $^{125}\text{I}$ -ЛФ у интактных животных представлены в таблице. Как видно, около 90% введенной в кровоток матки персистируют в организме животных в течение 20—25 мин, перераспределяясь по органам; через 2 ч из организма с мочой выводится 50% радионуклида, в дальнейшем интенсивность выведения замедляется.

На рис. 1 представлена динамика выведения  $^{125}\text{I}$ -ЛФ из органов интактных мышей. Как видно, у интактных животных йодированный антиген быстро выводится из крови, сердца и легких. Динамика выведения препарата из этих органов характеризуется двумя составляющими — быстрой и медленной: в крови  $T_{0,1/2} = 15$  мин,  $T_{m, \infty} = 2$  ч в последующие сроки наблюдения; в сердце и легких  $T_{0,1/2} = 15$  мин,  $T_{m, 1/2} = 2,5$  ч в последующие сроки наблюдения.

В печени, желчи, почках, селезенке и кишечнике происходит накопление метки в определенные сроки и затем ее выведение. В печени максимум

**Динамика включения  $^{125}\text{I}$ -ЛФ в органы и ткани intactных мышей (в % от введенной метки)**

Объект исследования	Время										
	сразу после инъекции	5 мин	10 мин	15 мин	20 мин	30 мин	1 ч	2 ч	3 ч	5 ч	24 ч
Сыворотка крови	57,0	29,3	25,6	21,0	21,0	19,6	15,0	16,3	8,3	5,2	2,1
Печень	29,5	58,9	47,7	47,5	51,3	38,0	31,4	26,6	19,0	10,5	1,8
Почки	3,0	3,9	3,6	3,5	3,4	3,4	2,9	2,7	2,1	1,9	0,3
Селезенка	0,5	1,8	1,5	2,5	2,5	2,5	2,4	2,2	1,8	0,8	0,2
Легкие	4,4	2,3	2,5	2,5	3,0	2,2	2,0	1,8	1,0	1,2	0,2
Сердце	2,2	1,3	0,8	0,8	0,8	0,7	0,6	0,7	0,4	0,4	0,1
Желчь	0,5	2,7	2,5	2,9	1,6	1,3	1,3	1,4	0,6	0,5	0,1
Верхний отдел тонкой кишки	0,3	0,5	0,6	0,9	1,1	1,2	1,5	1,6	1,5	0,9	0,6
Всего...	97,4	100,6	84,6	90,2	84,7	70,3	57,1	53,3	34,7	21,5	11,2

накопления  $^{125}\text{I}$ -ЛФ выявлен через 5 мин, в желчи — через 15 мин после инъекции препарата. Максимальное содержание метки в почках отмечено также через 15 мин, а в селезенке — через 30 мин. Выведение препарата из этих органов происходит с различной скоростью: из печени и желчи — с  $T_{1/2}=2$  ч, из почек — с  $T_{1/2}=3$  ч, из селезенки — с  $T_{1/2}=2,5$  ч.

Особый характер динамики распределения радионуклида отмечен в верхнем отделе кишечника. Максимальная удельная радиоактивность в этом органе наблюдается лишь через 2 ч после введения  $^{125}\text{I}$ -ЛФ. Период полувыведения здесь также более длительный, чем в других органах, и равен 4 ч.

У животных-опухоленосителей характер распределения метки во всех органах аналогичен та-

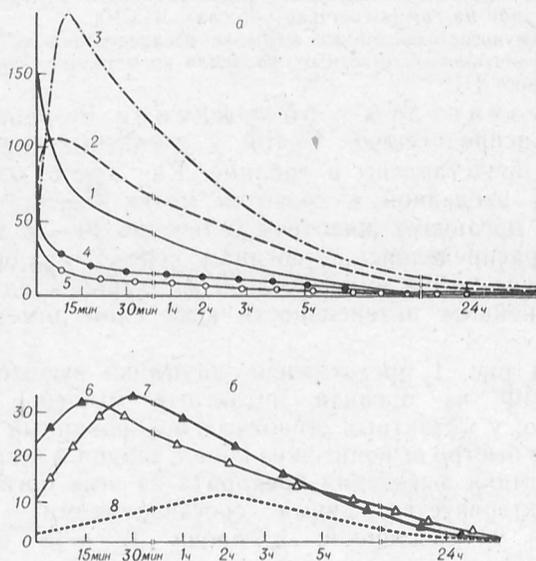


Рис. 1. Фармакодинамика  $^{125}\text{I}$ -ЛФ в органах и тканях мышей. а: 1 — сыворотка крови; 2 — печень; 3 — желчь; 4 — легкие; 5 — сердце; б: 6 — почка; 7 — селезенка; 8 — верхний отдел тонкой кишки. По оси ординат — удельная радиоактивность (в  $10^3$  на 100 мг ткани за 20 с); по оси абсцисс — время после введения.

ковому у intactных мышей.  $^{125}\text{I}$ -ЛФ не накапливается в асцитической жидкости, и значения удельной радиоактивности в ней остаются ниже, чем в других органах и крови животных, во все сроки наблюдения.

Характер распределения н-ЛФ сходен с таковым для  $^{125}\text{I}$ -ЛФ (рис. 2). Динамика выведения антигена из сыворотки крови также характеризуется быстрой и медленной составляющими. В печени происходит увеличение содержания н-ЛФ к 5-й минуте с последующим выведением с  $T_{6,1/2}$ , равным 1 ч,  $T_{3,1/2}$ , равным 4,5 ч в последующие сроки наблюдения. В тонкой кишке и почках отмечено накопление антигена к 4 ч и 1 ч соответственно и дальнейшее уменьшение его содержания.

Имеющиеся различия в скорости выведения  $^{125}\text{I}$ -ЛФ и н-ЛФ обусловлены, по-видимому, использованием различных доз препаратов (3,5 и 50 мг/кг соответственно), что согласуется с данными Е. Regoesji и соавт., отметивших зависимость периода полувыведения  $^{125}\text{I}$ -ЛФ из крови крыс от дозы препарата [15].

Сопоставление полученных результатов по распределению н-ЛФ и  $^{125}\text{I}$ -ЛФ в организме intactных мышей и мышей-опухоленосителей свидетельствует о том, что в основном экзогенный гетерологичный ЛФ практически сразу после введения в кровоток животных поступает в печень, что совпадает с данными других авторов, обнаруживших высокое сродство ЛФ к мембранам гепатоцитов [9, 14, 15]. Отчетливое специфическое свечение по мембранам гепатоцитов было также зафиксировано нами при помощи иммунофлуоресцентного метода. При введении  $^{125}\text{I}$ -ЛФ его обнаружили также и во фракции мелких везикул гепатоцитов [15].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что из печени ЛФ в составе желчи поступает в тонкую кишку в нативном состоянии, что согласуется с данными литературы о слабой подверженности ЛФ действию ферментов печени [15].

Рядом исследователей на энтероцитах обнаружены рецепторы к ЛФ [8], связываясь с которыми, он остается некоторое время в нативном состоянии и выполняет ряд важных функций в кишечнике. Так, предполагают, что ЛФ иг-

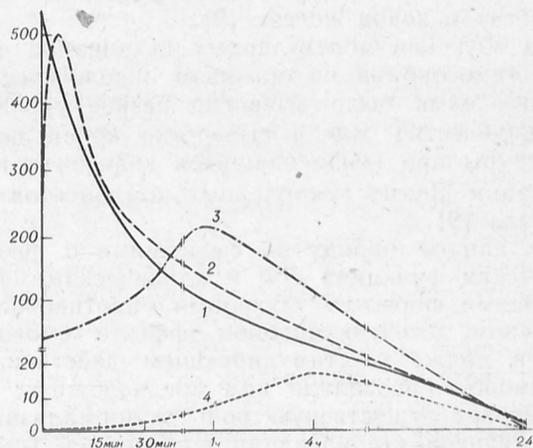


Рис. 2. Содержание н-ЛФ в органах и тканях мышей. 1 — сыворотка крови; 2 — печень; 3 — почки; 4 — тонкая кишка. По оси ординат — концентрация н-ЛФ (в  $10^3$  ед. на мл); по оси абсцисс — время после введения.

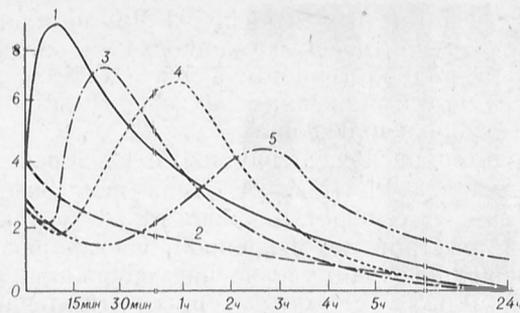


Рис. 3. Фармакодинамика  $^{125}\text{I}$ -ЛФ в кишечнике мышей.

1, 2, 3, 4 — равные части (отделы) тонкой кишки начиная с двенадцатиперстной; 5 — толстая и прямая кишки. По осям ординат и абсцисс то же, что на рис. 1.

рает существенную детоксикационную роль в кишечнике новорожденных, адсорбируя ионы железа, экскретируемые с желчью [6].

А. Prentice и соавт. выявили, что ЛФ, введенный в организм грудного ребенка с молоком матери, не полностью переваривается по мере прохождения по желудочно-кишечному тракту, а частично (1—6% от введенного количества) остается в нативном состоянии и играет важную роль в ингибировании роста патогенной кишечной флоры, способствуя тем самым нормализации деятельности кишечника [13].

В связи с этими данными, а также со сведениями о положительном эффекте гемосорбции у больных с различными поражениями кишечника (диареей, парезом и др.) большой интерес представляло более подробное изучение фармакодинамики ЛФ в этом органе.

На рис. 3 представлено распределение  $^{125}\text{I}$ -ЛФ в различных отделах кишечника.

Как видно, метка поступательно движется по кишечнику от верхнего отдела к нижним, причем характер распределения йодированного гликопротеида во 2-м отделе кишечника резко отличается от такового в остальных частях этого органа. Для объяснения этого явления необходимы специальные исследования. Возможно, что в этом отделе происходит всасывание деградировавшего под действием протеолитических ферментов тонкой кишки ЛФ, а непротеолизированный ЛФ поступает в нижние отделы кишечника.

Таким образом, результаты изучения фармакокинетики гетерологичного ЛФ (нативного и йодированного) в организме интактных мышей и животных-опухоленосителей показали, что основными органами, где происходит накопление ЛФ, являются печень и кишечник, в которых ЛФ, по-видимому, и осуществляет свои физиологические функции.

Полученные нами результаты, а также данные о том, что гомологичный ЛФ, введенный людям внутривенно, попадает в основном в печень [5], позволяют предположить, что ЛФ, освободившись из нейтрофилов в результате гемосорбции, выводится из кровотока гепатобилиарным путем и может являться агентом, способствующим нормализации деятельности кишечника за счет антибактериального и детоксицирующего действия.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Казачкина Н. И., Коханова И. Д., Егорова Е. С. и др. // Арх. анат.— 1988.— № 5.— С. 19—23.

2. Мамонтов А. С., Борисов В. И., Якубовская Р. И. и др. // Сов. мед.— 1988.— № 10.— С. 34—37.
3. Якубовская Р. И., Немцова Е. Р., Коханова И. Д. и др. // Вопр. мед. химии.— 1986.— № 6.— С. 75—86.
4. Arnold R. R., Russel J. E., Breuer W. J., Gauthies J. J. // Infect. Immun.— 1982.— Vol. 35.— P. 792—799.
5. Bennett R. M., Konocinski T. // Clin. Sci.— 1979.— Vol. 57.— P. 453—460.
6. Brock J. H. // Arch. Dis. Child.— 1980.— Vol. 55.— P. 417—420.
7. Broxmeyer H. E., Bicknell D. C., Gillis S. et al. // Blood Cells.— 1986.— Vol. 11.— P. 429—446.
8. Davidson L. A., Lönnerdal B. O. // Amer. J. Physiol.— 1988.— Vol. 54, N 4.— P. G580—G585.
9. Debanne H. T., Regoeci E., Sweeney G. D. F., Krestynski F. // Ibid.— 1985.— Pt 1.— P. G463—G469.
10. Mancini G., Carbonara A., Heremans J. // Immunochemistry.— 1965.— Vol. 2.— P. 235—254.
11. Mason P. Y., Taylor C. R. // J. clin. Path.— 1978.— Vol. 31.— P. 316—317.
12. Parmley R. T., Takagin M., Barton J. C. et al. // Amer. J. Path.— 1982.— Vol. 109.— P. 343—358.
13. Prentice A., Ewing G., Roberts S. E. et al. // Acta paediat. scand.— 1987.— Vol. 76.— P. 592—598.
14. Preels J. P., Pizzo S. V., Glasgow L. R. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1978.— Vol. 75.— P. 2215—2219.
15. Regoeci E., Chindemi P. A., Debanne M. T., Preels J. P. // Amer. J. Physiol.— 1985.— Vol. 248, N 1.— P. G8—G14.

Поступила 11.08.89

#### PHARMACOKINETICS OF HUMAN MILK LACTOFERRIN IN INTACT MICE AND TUMOR-BEARING ANIMALS

N. I. Kazachkina, E. R. Nemtsova, R. I. Yakubovskaya, T. A. Karmakova, L. M. Ivanova, A. V. Sokolov

Oncological Institute, Ministry of Public Health of the RSFSR, All-Union Oncological Research Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Pharmacokinetics of iodine containing and native lactoferrin from human milk was studied in intact mice and the animals with Ehrlich ascites carcinoma. Both these antigens, native and I-lactoferrin, were similarly distributed in intact mice body. The same pharmacokinetics was found in tumor-bearing animals. Exogenous lactoferrin penetrated mainly into liver tissue, then simultaneously with bile — into small intestine and further into large intestine. Distinct accumulation of the glycoprotein was not found in tumor tissue.

© Д. Г. Мальдов, И. Б. Збарский, 1991

УДК 616.36-018-1:576.315]-008.939.6-074-092.9

Д. Г. Мальдов, И. Б. Збарский

#### ПРОТЕИНКИНАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ БЕЛКОВ, ЭКСТРАГИРУЕМЫХ ТРИТОНОМ X-100 ИЗ ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЯДЕР ПЕЧЕНИ КРЫСЫ И ГЕПАТОМЫ ЗАЙДЕЛА

Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова АН СССР, Москва

Выделение ядерного матрикса из клеточных ядер включает их обработку неионным детергентом. С помощью такого воздействия удаляются липиды и значительная часть белков наружной ядерной мембраны, а также большая часть липидов и ряд белков внутренней мембраны ядер [3]. 1% тритоном X-100 из них экстрагируются как зависимые от сАМР, так и сАМР-независимые протеинкиназы, наиболее активно используемым субстратом для которых являются гистоны [5]. Протеинкиназ с иной субстратной специфичностью не описано. С другой стороны, в

ядерной оболочке, не подвергавшейся экстракции детергентом, составной частью которой являются также и белки мембран, экстрагируемые неионными детергентами, содержится протеинкиназа, не фосфорилирующая гистоны [16]. В зависимости от условий фосфорилирования этот фермент фосфорилирует в ядерной оболочке либо только один белок с мол. м. 68 кД [10, 15], либо несколько разных белков [9]. Данная протеинкиназа активируется ионами  $Co^{2+}$ , и ее активность составляет около 40 % от протеинкиназной активности фракции поровых комплексов [15].

В настоящей работе изучали белковый состав и фосфорилирование белков фракции, экстрагируемой 1 % раствором тритона X-100 (БЭТ) из ядер печени крысы и гепатомы Зайдела, а также протеинкиназы той же фракции, разделенные методом изоэлектрофокусирования, и их способность фосфорилировать экзогенные субстраты и белки ядерного матрикса печени крысы.

**Методика.** В работе использовали самок беспородных крыс массой 100–150 г. Асцитную гепатому Зайдела брали на 5-й день после перевивки. Ядра выделяли по методу, принятому в лаборатории [1]. Для извлечения БЭТ изолированные ядра инкубировали в среде, содержащей 1 % тритон X-100, 200 мМ сахарозы, 3 мМ  $CaCl_2$ , 2 мМ  $MgCl_2$ , 30 мМ трис-НСI pH 7,4, 20 мин при 0 °С из расчета 5 мл среды на 100–150 мг белка ядер. После этого препарат центрифугировали при 1000 г 10 мин. Полученный супернатант диализовали (5 мл супернатанта против 1 л  $H_2O$ ) на магнитной мешалке при 0 °С 2 ч.

Фосфорилирование исследуемых субстратов проводили в среде, содержащей 0,1 % детергента NP-40, 5 мМ  $MgCl_2$ , 30 мМ NaCl, 20 мМ трис-НСI pH 7,4 и 5 мМ дитиотрейтола, который в некоторых опытах не добавляли.  $[^{32}P]$  АТФ (Ташкентский завод радиоизотопов) вводили в среду из расчета 8 кБк на 1 мг белка. Измерение радиоактивности, электрофорез и радиоавтографию проводили, как описано ранее [2].

Изоэлектрофокусирование (ИЭФ) БЭТ проводили в блоке полиакриламидного геля: 4,5 % акриламида, 0,5 % метилакриламида, 10 % глицирина, 2 % тритона X-100, 2 % смеси амфолинов (ЛКВ, Швеция) с областями разделения pH 3,0–10,0 5,0–8,0 4,0–6,0 в соотношении 1:2:2. Навеску сефадекса G-50 диализовали против 10-кратного объема воды с «Дауэксом 50» в  $H^+$  форме 1 ч и «Дауэксом 1» в  $OH^-$  форме 1 ч, промывали бидистиллятом на стеклянном фильтре, затем этанолом и эфиром, после чего сушили в эксикаторе до исчезновения запаха. Сефадекс со средой для ИЭФ набухал 1 ч при 0 °С, деаэрировался, после чего его наносили на стеклянную пластинку и выравнивали стеклянной палочкой на участке, ограниченном лентой из синтетического материала. ИЭФ проводили в режиме 10 Вт/см<sup>2</sup> для полиакриламидного геля и 2,5 Вт/см<sup>2</sup> для сефадекса 12 ч при предельном напряжении 1000 В при 0–1 °С, используя систему «Мультифор» (ЛКВ, Швеция).

После ИЭФ измеряли pH либо контактным электродом на pH-метре «Радиометр» (Дания) непосредственно после снятия геля с «Мультифора», или же пленку сефадекса разрезали на полоски шириной 0,5 см, каждую из которых помещали в пробирку и заливали 0,5 мл дистиллята и pH измеряли в пробирках с помощью pH-метра ОР-211/1 (Венгрия). Так же измеряли pH полос акриламида.

Препарат термостабильных белков мышц (ТБМ) кролика получали 15-минутным кипячением 10 г мышц кролика в 50 мл трис-НСI буфера pH 7,2, затем помещали в ледяную баню и центрифугировали по 2000 г 15 мин. Из супернатанта белок осаждали ТХУ (конечная концентрация 10 %), промывали дистиллятом и растворяли, подщелачивая 0,1 М NaOH, доводя средой инкубации до 2 мг/мл и замораживали. 500 мг коммерческого препарата казеина растворяли в 10 мл 0,1 М NaOH, дефосфорилировали нагреванием при 60 °С 40 мин, подкисляли 0,1 М HCl до pH 2,0–3,0, осаждали на центрифуге при 2000 г 15 мин. Осадок растворяли, слегка подщелачивая, и помещали в среду фосфорилирования, доводя pH до 7,4. Препарат разводили до концентрации 20 мг/мл и замораживали аликвотами по 2 мл. Препарат суммарного гистона мыши был любезно предоставлен доктором биол. наук А. А. Каравановым. Ядерный матрикс выделяли по методу, принятому в лаборатории

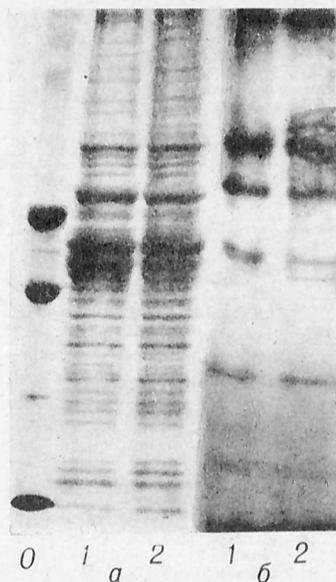


Рис. 1. Белковый состав и фосфорилирование белков экстракта препаратов ядер печени крысы и гепатомы Зайдела.

а — электрофореграмма, окраска кумасси; б — радиоавтография. 0 — свидетели, сверху вниз: бычий сывороточный альбумин (68 кД), овальбумин (43 кД), цитохром С (12 кД). 1 — препарат из печени крысы; 2 — препарат из гепатомы Зайдела.

[1], и инактивировали нагреванием в среде инкубации 3 мин при 60 °С.

Блок сефадекса разрезали и разводили 1:4 по объему средней инкубации, содержащей субстрат и  $[^{32}P]$ -АТФ. Реакцию фосфорилирования проводили при 37 °С 30 мин.

Активность протеинкиназ выявляли также в полиакриламидном геле, обкладывая гелем, предварительно уравновешенным в среде инкубации (20 мин в 5-кратном объеме) фильтрами «Сыпнор» (ЧСФР), уравновешенными в той же среде со 100 кБк  $[^{32}P]$  АТФ. В качестве субстратов среда для уравновешивания фильтров содержала 1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина или ТБМ. Поверх фильтров гелем обкладывали листами ватмана 3 ММ, также уравновешенного в среде фосфорилирования, с меченым АТФ, но без субстратов.

Фильтры «Сыпнор» и гели фиксировали терминирующим раствором, промывали 5 % ТХУ в течение ночи, высушивали и радиоавтографировали.

**Результаты и обсуждение.** Как видно из рис. 1, белковый состав БЭТ нормальной печени крысы и гепатомы Зайдела на электрофореграмме практически одинаков. В обоих препаратах преобладают белки с мол. м. 52 и 98 кД. В составе фосфорилированных белков различия также не обнаруживаются. Наиболее сильно фосфорилированы белки с мол. м. 35, 52, 75 и 98 кД. Полоса на радиоавтограмме в области низких молекулярных масс принадлежит, по-видимому, не белкам, а фосфолипидам, как это было показано Смитом и Уэллсом [13, 14].

Для разделения протеинкиназ методом ИЭФ в качестве носителя был использован сефадекс G-50. В качестве субстратов для выявления протеинкиназной активности использовали смесь ТБМ, казеиногена и суммарного гистона мыши. Выявлено, что БЭТ из ядер печени крысы содержит 4 области протеинкиназной активности с изоэлектрическими точками 5,4–5,8, 6,1–6,3, 6,8–7,2 и 8–10. БЭТ из ядер гепатомы Зайдела разделялись также на 4 дискретные области протеинкиназной активности, хотя рI последних несколько отличались от полученных для БЭТ печени крысы. Они имели значения 4,0–4,4, 5,8–6,1, 6,7–7,0 и более 8,7. Таким образом, 3 изоэлектрические точки, полученные для БЭТ из печени крысы, перекрываются с полученными для БЭТ из гепатомы Зайдела. Протеинкиназная активность с рI 6,1–6,3 обнаруживается только в нормальной печени крысы, а протеинки-

## Фосфорилирование белков ядерного матрикса протеинкиназой БЭТ из ядер печени крысы и гепатомы Зайдела

pI протеинкиназной активности	Включение $^{32}\text{P}$ на 100 мкг ядерного матрикса, имп/мин	Отношение включения $^{32}\text{P}$ в белки ядерного матрикса к включению в гистоны
Печень крысы:		
5,4—5,8	4500	4,5
6,1—6,3	4800	4,0
6,8—7,2	2000	3,0
8,5—10	6500	—
Гепатомы Зайдела:		
4,0—4,4	7200	4,3
5,7—6,1	6300	4,5
6,7—7,0	1400	2,6
8,7	6800	—

Примечание. Аликвоты 20 мкл из каждого пика протеинкиназной активности смешивали с 50 мкл среды инкубации, содержащей либо 100 мкг белка ядерного матрикса, либо такое же количество гистонов, инкубировали 30 мин при 0 °С, затем инактивировали препарат и определяли радиоактивность в ТХУ нерастворимой фракции.

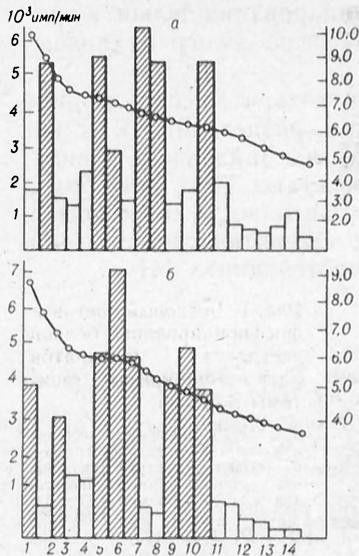


Рис. 2. Разделение протеинкиназ, экстрагированных тритоном X-100 из ядер печени крысы в гепатомы Зайдела методом ИЭФ в сефадексе G-50.

а — печень крысы; б — гепатома Зайдела. По оси абсцисс — длина геля, см; по оси ординат: слева — включение  $^{32}\text{P}$  в смесь субстратов, имп/мин, справа — шкала pH; кривая линия — pH; заштрихованы участки геля, содержащие протеинкиназную активность.

назная активность с pI 4,0—4,4 — только в гепатоме Зайдела (рис. 2).

Если в качестве субстрата использовали гистоны, то, как видно из табл. 1, 3 из 4 протеинкиназы из БЭТ печени крысы и 3 из 4 протеинкиназы из гепатомы Зайдела фосфорилируют гистоны, что хорошо согласуется с данными авторов, изучавших ранее эту фракцию из печени крысы и обнаруживших, что все содержащиеся в ней протеинкиназы используют гистоны в качестве субстратов [5]. Однако протеинкиназы с pI в области pH около 9,0 как из печени крысы, так и из гепатомы Зайдела не фосфорилируют белки с мол. м. 12—31 кД, в которой находятся гистоны, а фосфорилируют эндогенный белок в области 50—70 кД, возможно, аутофосфорилирующаяся субъединица какой-то протеинкиназы.

Когда в качестве субстратов служили белки ядерного матрикса печени крысы, то активность протеинкиназ с изоэлектрическими точками в щелочной области была наиболее высокой в случае как БЭТ из печени крысы, так и из гепатомы

Таблица 1

## Гистонкиназная активность протеинкиназ БЭТ из ядер печени крысы и гепатомы Зайдела

pI протеинкиназной активности во фракции БЭТ	Включение $^{32}\text{P}$ при дополнительном субстрате (200 мкг гистонов), имп/мин	Мол. м. субстратов фосфорилирования, кД
Печень крысы:		
5,4—5,8	2000	11—31 (75)
6,1—6,3	2400	11—31 (90)
6,5—7,2	1300	11—31 (70)
8,5—10	600	50—70 (90)
Гепатома Зайдела:		
4,0—4,4	3000	11—31 (90)
5,7—6,1	2800	11—31 (75)
6,7—7,0	1100	11—31 (70)
8,7	500	50—70 (95)

Примечание. Аликвоты 20 мкл из каждого кусочка сефадекса (G-50, где обнаруживалась протеинкиназная активность (см. рис. 2), инкубировали с 200 мкг гистонов в 50 мкл среды инкубации с 800 Мбк  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  при 0 °С, затем материал наносили на электрофорез, дорожки на геле разрезали по маркерам на кусочки до 11, 11—31, 31—50, 50—70, 70—120 и 120 кД и в них определяли радиоактивность. В скобках — процент.

Зайдела (табл. 2). Таким образом, сходные по изоэлектрической точке и субстратной специфичности протеинкиназы с pI более 8,5 из печени крысы и гепатомы Зайдела, по-видимому, представляют собой один и тот же фермент и фосфорилируют преимущественно кислые ядерные белки. Способность фосфорилировать белок с мол. м. 50—70 кД и отсутствие гистонкиназной активности указывают на очень большое сходство этого фермента с кобальтзависимой киназой из ядерной оболочки печени крысы [15].

Протеинкиназы из печени крысы с pI 6,8—7,2 и протеинкиназы с pI 6,7—7,0 из гепатомы Зайдела, напротив, фосфорилируют белки инактивированного препарата ядерного матрикса печени крысы наименее интенсивно (см. табл. 2). Учитывая близость изоэлектрической точки и сходную активность этих фракций как при фосфорилировании гистонов, так и белков ядерного матрикса, можно предположить, что как в печени крысы, так и в гепатоме Зайдела эта активность также принадлежит одной и той же протеинкиназе.

Аналогичное сходство по изоэлектрическим точкам и субстратной специфичности наблюдается в наиболее активных протеинкиназах БЭТ из обоих источников: с pI 5,4—5,8 из печени крысы и 5,7—6,1 из гепатомы Зайдела. Этот фермент активно фосфорилирует как гистоны, так и белки ядерного матрикса (см. табл. 2).

Протеинкиназа с изоэлектрической точкой в области низких значений pH (4,0—4,4) была обнаружена только в гепатоме Зайдела. Возможно, это одна из тех фосфорилирующих гистоны протеинкиназ, которые участвуют в регуляции клеточного цикла и обнаруживаются только в пролиферирующих клетках [11].

Найденная только в печени крысы протеинкиназа с pI 6,1—6,3 фосфорилирует белки ядерного матрикса (см. табл. 2) и несколько хуже гистоны (см. табл. 1).

При контакте полиакриламидного геля, в котором фокусировались БЭТ из ядер печени крысы и гепатомы Зайдела, с фильтрами, содержащими альбумин, ТБМ и  $[\text{}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ , было обнаружено

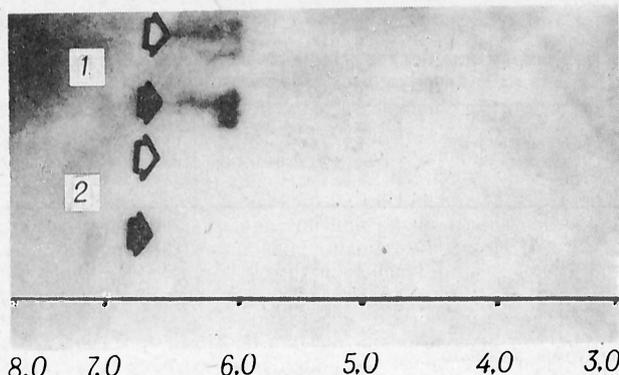


Рис. 3. Выявление протеинкиназной активности, активируемой ТБМ кролика, после ИЭФ БЭТ из ядер клеток печени крысы и гепатомы Зайдела.

Светлая стрелка — аппликация бычьим сывороточным альбумином, темная — аппликация ТБМ кролика. 1 — БЭТ из клеточных ядер печени крысы; 2 — БЭТ из клеточных ядер гепатомы Зайдела. Внизу — рН.

включение  $^{32}\text{P}$  в ТХУ-нерастворимую фракцию субстрата в области значений рН 6,0—6,2 (рис. 3) только при фокусировании БЭТ из ядер печени крысы. В БЭТ из гепатомы Зайдела радиоактивность после отмывки геля не обнаруживалась.

Белок, который фосфорилируется в геле после разделения БЭТ печени крысы, может быть как добавленным субстратом, так и белком БЭТ. Однако фосфорилирование его только в препарате из печени крысы, но не гепатомы Зайделя происходит благодаря наличию среди БЭТ печени протеинкиназы, которой нет в этой фракции из гепатомы, а не субстрату, присущему только печени, так как в использованных нами условиях в препаратах БЭТ из ядер печени крысы и гепатомы Зайделя фосфорилируются одни и те же белки (см. рис. 1).

В присутствии ТБМ в качестве субстрата включение  $^{32}\text{P}$  в белки было значительно выше, чем в присутствии бычьего сывороточного альбумина. Можно сделать вывод, что ТБМ — либо значительно лучший субстрат, чем альбумин, либо ТБМ стимулирует реакцию фосфорилирования белков-субстратов протеинкиназой, специфической для БЭТ из ядер печени крысы. Также было показано, что фосфорилирование белков ядерного матрикса усиливается в присутствии ТБМ в препарате из печени крысы на 74 %, в то время как фосфорилирование белков ядерного матрикса гепатомы Зайдела не изменяется в присутствии ТБМ.

Из вышеизложенного можно сделать вывод, что в ядрах печени крысы содержится протеинкиназная активность, стимулируемая ТБМ, которой не удалось обнаружить в препаратах из ядер гепатомы Зайдела. В литературе описана сходная протеинкиназа из ядер печени крысы, которая по данным ее элюции с ионообменника имеет также сходную изоэлектрическую точку [12]. По мнению Генри и Ходжа, она должна быть представлена в ядерном матриксе [6].

Хотя и в клеточном ядре имеются протеинфосфатазы, которые ингибируются ТБМ [7, 8], маловероятно, чтобы усиление фосфорилирования субстрата в геле после ИЭФ произошло по причине их ингибирования, так как маловероятно, чтобы протеинкиназа и протеинфосфатаза имели практически идентичные изоэлектрические точки.

Однако усиление фосфорилирования белков в препарате ядерного матрикса по этому механизму вполне возможно.

В заключение надо отметить, что все протеинкиназы, обнаруженные при разделении БЭТ как печени крысы, так и гепатомы Зайдела, не зависят от с-АМР, так как в составе ТБМ есть ингибитор, который подавляет активность как холоферментов, так и отдельных каталитических субъединиц с-АМР-зависимых протеинкиназ [4].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Кузьмина С. П., Бульдьева Т. В., Збарский И. Б. // Биохимия. — 1980. — Т. 45. — С. 1417—1425.
2. Мальдов Д. Г., Фам Ань Кюонг, Лучник А. П. и др. // Бюл. exper. биол. — 1984. — Т. 97. — С. 177—179.
3. Berezney R. // Cell Nucleus. — 1979. — Vol. 7, Pt D. — P. 413.
4. Demaile J. G., Ferraz C., Fisher E. H. // Biochim. biophys. Acta. — 1979. — Vol. 580. — P. 374—377.
5. Goueli S., Ahmed K. // Int. J. Biochem. — 1983. — Vol. 15. — P. 1083—1098.
6. Henry S. M., Hodge L. D. // Europ. J. Biochem. — 1983. — Vol. 133. — P. 23—29.
7. Holmes C. F. B., Campbell D. G., Candwell F. B. et al. // Ibid. — 1986. — Vol. 155. — P. 172—182.
8. Jakes S., Mellgren R. L., Schlender K. K. // Biochim. biophys. Acta. — 1986. — Vol. 888. — P. 135—142.
9. Kletzien R. F. // Biochem. J. — 1981. — Vol. 196. — P. 853—859.
10. Lam K. S., Kasper C. B. // Biochemistry (Wash.). — 1979. — Vol. 18. — P. 307—311.
11. Matthews H. R., Huebner U. D. // Molec. Cell. Biochem. — 1984. — Vol. 59. — P. 81—99.
12. Sikorska M., Whitefield J. // Biochim. biophys. Acta. — 1982. — Vol. 703. — P. 171—179.
13. Smith C. D., Wells W. W. // J. biol. Chem. — 1983. — Vol. 258. — P. 9360—9367.
14. Smith C. D., Wells W. W. // Ibid. — P. 9368—9373.
15. Steer R. C., Wilson M. J., Ahmed K. // Exp. Cell. Res. — 1979. — Vol. 119. — P. 403—406.
16. Steer R. C., Goueli S., Wilson M. J. et al. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1980. — Vol. 92. — P. 919—925.

Поступила 22.12.89

#### PROTEINKINASE ACTIVITY OF PROTEINS EXTRACTED WITH TRITON X-100 FROM RAT LIVER TISSUE AND ZAJDELA HEPATOMA NUCLEI

D. G. Maldov, I. B. Zharsky

Institute of Developmental Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Proteins extracted with Triton X-100 from rat liver tissue and Zajdela hepatoma nuclei exhibited similar electrophoretic properties of both proteins and phosphoproteins if they were separated by means of electrofocusing. Four protein kinase activity peaks were detected in each of these preparations. Three protein kinases from rat liver tissue and Zajdela hepatoma were similar in their electrofocusing point and substrate specificity. However, the fourth protein kinase, which had pI 6.1-6.3 and was activated by rabbit muscle thermostable proteins, was detected only in the preparation of rat liver tissue, while the enzyme with isoelectric point at pH 4.0 was found only in Zajdela hepatoma preparation. All the protein kinases studied phosphorylated nuclear matrix proteins at higher rate as compared with histones.

В. А. Королев, Г. Г. Головская, К. Ф. Селиванова,  
К. И. Молдован, С. Н. Борисенко

## СОДЕРЖАНИЕ ГЕМОГЛОБИНА A<sub>1c</sub> И МОДИФИЦИРОВАННОГО АЛЬБУМИНА СЫВОРОТКИ КРОВИ У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

Крымский медицинский институт, Симферополь

У больных сахарным диабетом рекомендуется использовать совместное определение гемоглобина (Hb) A<sub>1c</sub> и гликозилированных белков сыворотки крови [20]: гликозилированного альбумина [14, 16] или общего гликозилированного белка сыворотки крови (фруктозамина) [19, 21]. Указанные белки дают информацию о состоянии углеводного обмена в различные временные сроки: HbA<sub>1c</sub> — в более длинный период (в среднем за 2—3 мес) [17], а гликозилированные белки сыворотки крови — в более короткий (в среднем за 1—2 нед) [9, 18].

Было отмечено, что гликозилирование белков является одной из распространенных форм их модификаций [12]. Определение гликозилированных белков в клинических лабораториях затрудняет необходимость использования трудоемких, дорогостоящих методов либо методов с низкой точностью [7, 25]. Тем не менее исследовательская группа ВОЗ по сахарному диабету рекомендует при большом количестве исследуемого материала для определения HbA<sub>1c</sub> использовать одну из электрофоретических методик [10]. Среди электрофоретических методов определения HbA<sub>1c</sub> за рубежом нередко применяется метод изоэлектрического фокусирования (ИЭФ) в амфолинах [23, 24]. Однако дороговизна амфолинов-носителей затрудняет применение этого метода в отечественных лабораториях.

Целью настоящей работы явилось изучение уровня HbA<sub>1c</sub> с доступным методом ИЭФ в борат-полиольной системе и уровня модифицированного альбумина (МА) сыворотки крови методом электрофореза последней на ацетат-целлюлозных пленках с последующей ТХУ-этаноловой обработкой у больных сахарным диабетом в динамике лечения.

Методика. Обследован 81 больной сахарным диабетом I и II типа с различным состоянием компенсации. Диагноз заболевания устанавливался согласно классификации, предложенной исследовательской группой ВОЗ по сахарному диабету [10]. Наблюдение за больными проводилось в течение 21 дня. Все больные получали сахаропонижающую терапию — диету, таблетированные сахаропонижающие препараты, инсулинотерапию. Контрольную группу составили 30 практически здоровых людей. Для определения

уровня HbA<sub>1c</sub> использовали метод ИЭФ в борат-полиольной системе [5, 11]. Градиент pH от 6,5 до 8,0 готовили из трис-боратного буфера (pH 8,2) и глицерина в концентрации от 0 до 50%. В градиентные растворы добавляли акриламид и метиленбисакриламид в количестве 68 и 2,03 мг на 1 мл раствора соответственно. Для приготовления градиентных растворов использовали также рибофлавин в количестве 4 мг на 100 мл трис-боратного буфера и ТЕМЕД в количестве 0,24 мл на 600 мл исходного буфера. Градиентные растворы наслаивали при помощи микронасоса в трубки аппарата ПЭФА-1. Фотополимеризацию осуществляли в течение 1 ч под лучами кварцевой лампы. Гемолизаты, приготовленные общепринятым способом [8], наслаивали в количестве 120 мкл на столбики полиакриламидного геля. В качестве электродного использовали исходный трис-боратный буфер pH 8,2. ИЭФ проводили при напряжении из расчета 20 В/см<sup>2</sup> при температуре 4 °С в аппарате ПЭФА-1 в течение 16—24 ч. Гели окрашивали бензидином [8]. Количественную оценку изоэлектрофоретических полос осуществляли при помощи денситометра ДМ-1. Для определения уровня МА использовали электрофорез сыворотки крови на ацетат-целлюлозных пленках с последующей ТХУ-этаноловой обработкой [14]. Применяли ацетат-целлюлозные пленки размером 25×180 мм, выпускаемые Казанским конструкторско-производственным объединением «Тасма». Целесообразно для каждой партии пленок выводить коэффициент сорбции после электрофореза сыворотки здоровых людей, который может колебаться от 0 до 6%, и учитывать его при исследовании сыворотки больных лиц. Перед проведением опыта на пленках отмечали стартовую линию, на которую наносили предварительно подготовленную сыворотку (4 мкл сыворотки с концентрацией общего белка 3,22%). Электрофорез проводили в аппарате ПЭФА-2 в течение 1 ч при напряжении 120 В и силе тока 0,5 мА/см. После опыта пленки с опытными образцами погружали в 10% ТХУ на 5 мин, затем на 60 мин в 70% этанол. Далее окрашивали красителем амидо черным 10В. Для получения прозрачного фона пленки выдерживали 5 мин в 96% этаноле, а затем погружали в смесь для просветления (этанол — уксусная кислота — глицерин, 82 : 15 : 30) на 10 мин. Электрофоретические количества оценивали при помощи денситометра «Beckman» (США). Глюкозу в крови и моче определяли унифицированным глюкозооксидазным методом по окислению ортолуидином [6].

Результаты и обсуждение. Процентное содержание HbA<sub>1c</sub> у обследуемых больных сахарным диабетом в среднем оказалось значительно выше, чем у здоровых (табл. 1). У больных обнаружена корреляционная зависимость уровня HbA<sub>1c</sub> от уровня «тощаковой» гликемии ( $r=0,51$ ). Отмечена также корреляция между содержанием HbA<sub>1c</sub> в крови и уровнем суточной глюкозурии ( $r=0,22$ ).

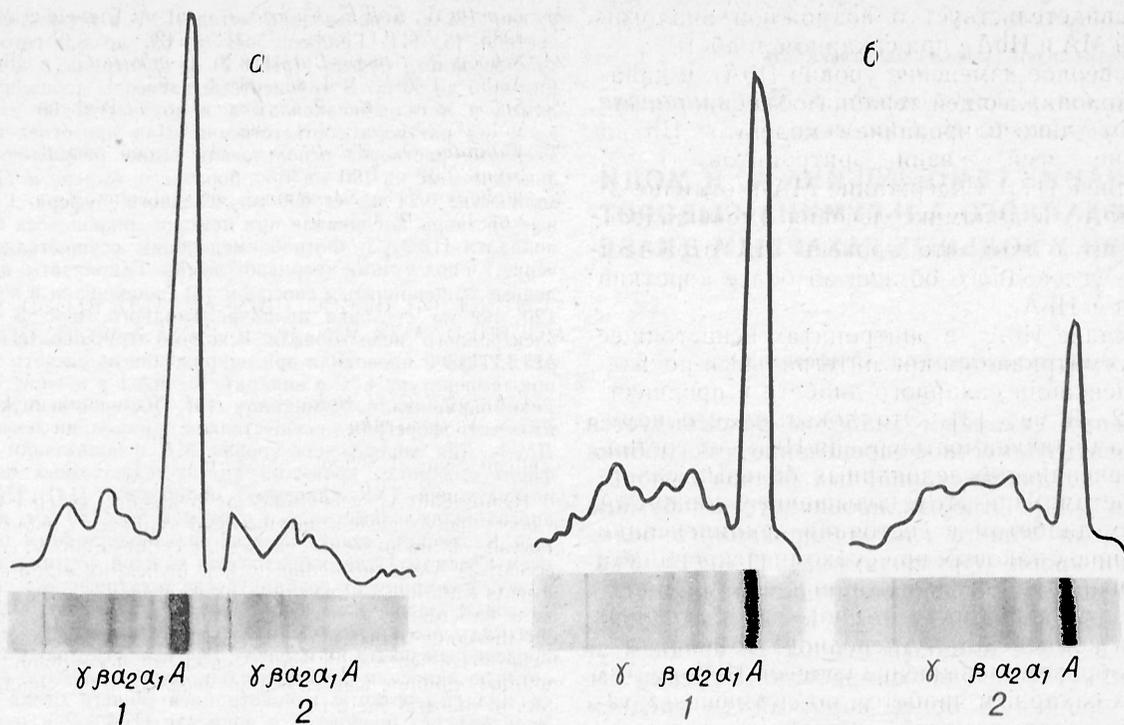
Если у обследуемых здоровых большинство альбумина после ТХУ-этаноловой обработки смывалось и уровень МА составил  $6,05 \pm 1,58\%$ , то у больных после указанной обработки на ацетат-целлюлозных пленках оставалось значительное количество МА (см. рисунок, а, б). При этом уровень МА у больных сахарным диабетом оказался значительно выше, чем в контрольной группе (см. табл. 1). Обнаружена прямая средняя корреляция между уровнями МА и «тощаковой» гликемии ( $r=0,70$ ), слабая корреляция — между уровнями МА и суточной глюкозурии ( $r=0,36$ ).

В динамике лечения у больных сахарным диабетом мы обнаружили снижение уровней «тощаковой» гликемии и суточной глюкозурии. При этом уровень HbA<sub>1c</sub> изменялся недостоверно. В то же

Таблица 1

Уровни HbA<sub>1c</sub>, МА, «тощаковой» гликемии и суточной глюкозурии у здоровых и больных сахарным диабетом ( $M \pm m$ )

Обследованные	HbA <sub>1c</sub> , %	МА, %	«Тощаковая» гликемия, ммоль/л	Суточная глюкозурия, г
Здоровые (n=30)	$7,13 \pm 0,17$	$6,05 \pm 1,58$	$4,72 \pm 0,12$	—
Больные (n=81)	$15,41 \pm 0,33$	$51,21 \pm 4,01$	$12,46 \pm 0,28$	$75,23 \pm 11,58$
p	<0,01	<0,01	<0,01	—



Электрофореграммы сыворотки крови здорового (а) и больного (б) человека.  
1 — до ТХУ-этаноловой обработки; 2 — после ТХУ-этаноловой обработки.

Таблица 2

Уровни HbA<sub>1c</sub>, МА, «тощаковой» гликемии и суточной глюкозурии у больных сахарным диабетом до и после лечения (M±m)

Обследованные	HbA <sub>1c</sub> , %	МА, %	«Тошачковая» гликемия, ммоль/л	Суточная глюкозурия, г
Больные до лечения	15,41±0,33	51,21±4,01	12,46±0,28	75,23±11,58
Больные после лечения	14,21±0,96	30,16±3,48	7,63±0,54	23,48±8,63
<i>p</i>	>0,2	<0,01	<0,01	<0,01

время уровень МА в динамике лечения уменьшался (табл. 2).

Нами отмечено, что значения уровней HbA<sub>1c</sub> и МА зависят от состояния компенсации углеводного обмена у больных сахарным диабетом. Наибольшие уровни HbA<sub>1c</sub> и МА обнаружены при декомпенсированном заболевании, при субкомпенсации они были ниже и наименьшими они были у больных с сахарным диабетом в стадии компенсации (табл. 3).

Наши данные об уровне HbA<sub>1c</sub> у здоровых и больных сахарным диабетом, полученные методом ИЭФ в борат-полиольной системе, согласуются с данными исследователей, использовавших метод ИЭФ в амфолинах [26], а также другие биохимические методы [2, 4]. Повышение уровня HbA<sub>1c</sub> у лиц с сахарным диабетом по сравнению с таковым у здоровых людей объясняется большим гликозилированием молекулы Hb при этом заболевании и соответствует данным литературы [15].

Повышение уровня МА у больных также свидетельствует о патологическом изменении альбумина в условиях хронической гипергликемии. Однако модификацию альбумина в данном случае не следует связывать только с гликозилированием альбумина, так как она может быть следствием и других процессов [1]. Известно, что повышенный уровень гликозилированного альбумина у больных са-

харным диабетом зависит от состояния углеводного обмена при этом заболевании [22]. Обнаруженная в наших исследованиях зависимость МА от уровня «тошачковой» гликемии и суточной глю-

Таблица 3

Уровни HbA<sub>1c</sub> и МА у больных сахарным диабетом с различным состоянием компенсации (M±m)

Обследованные	HbA <sub>1c</sub> , %	МА, %
Здоровые (n=30)	7,13±0,17	6,05±1,58
Больные:		
состояние декомпенсации (n=34)	18,71±0,88	68,89±7,04
<i>p</i>	<0,01	<0,01
состояние субкомпенсации (n=26)	14,36±0,69	46,61±3,59
<i>p</i>	<0,01	<0,01
<i>p</i> <sub>1</sub>	<0,01	<0,01
состояние компенсации (n=21)	10,82±0,67	28,08±2,83
<i>p</i>	<0,01	<0,01
<i>p</i> <sub>2</sub>	<0,01	<0,01
<i>p</i> <sub>3</sub>	<0,01	<0,01

Примечание. *p* — достоверность различий показателей у больных с разными стадиями компенсации заболеваний и у здоровых людей; *p*<sub>1</sub> — достоверность различий показателей у больных в стадии субкомпенсации и декомпенсации; *p*<sub>2</sub> — достоверность различий показателей у больных в стадии компенсации и декомпенсации; *p*<sub>3</sub> — достоверность различий показателей у больных в стадии компенсации и субкомпенсации.

козурии свидетельствует о возможной аналогии изменений МА и HbA<sub>1c</sub> при сахарном диабете.

Недостовверное изменение уровня HbA<sub>1c</sub> в динамике сахарпонижающей терапии объясняется необратимым гликозилированием молекулы Hb на протяжении всей жизни эритроцитов, т. е. 90—120 дней [17]. Содержание МА в отличие от уровня HbA<sub>1c</sub> в динамике лечения уменьшалось. Это говорит о том, что уровень МА отражает состояние углеводного обмена за более короткий период, чем HbA<sub>1c</sub>.

Содержание HbA<sub>1c</sub> в эритроцитах в настоящее время рассматривается как интегральный показатель компенсации сахарного диабета в предшествующие 2—3 мес [3]. Это доказывает обнаруженная нами зависимость уровня HbA<sub>1c</sub> от состояния компенсации обследованных больных сахарным диабетом. При этом повышение уровня МА у больных диабетом в состоянии декомпенсации по сравнению с таковым при субкомпенсированном и компенсированном заболевании также свидетельствует о зависимости данного показателя от состояния компенсации углеводного обмена.

Таким образом, повышение уровней HbA<sub>1c</sub> и МА у больных сахарным диабетом по сравнению с таковыми у здоровых людей, их зависимость от состояния углеводного обмена, а также различное изменение в динамике сахарпонижающей терапии свидетельствует о целесообразности их совместно определения и комплексной оценки результатов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Багдасарьян С. И., Троицкий Г. В., Алахов Ю. Б. // Докл. АН УССР.— 1980.— Т. 225, № 1.— С. 222—224.
2. Гриншпун М. И., Галенок В. А., Мазовецкий А. Г., Диккер В. Е. // Лаб. дело.— 1988.— № 2.— С. 51—54.
3. Гриншпун М. И., Мазовецкий А. Г., Галенок В. А. и др. // Пробл. эндокринолог.— 1983.— № 6.— С. 80—85.
4. Давиденко Н. В. Гемоглобин A<sub>1c</sub> у больных сахарным диабетом до и после лечения: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— М., 1981.
5. Королев В. А., Борисенко С. И., Селиванова К. Ф., Школадкин В. Ф. // Лаб. дело.— 1989.— № 1.— С. 61—62.
6. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Меньшиков В. В., Делекторская Л. Н., Золотницкая Р. П. и др.— М., 1987.
7. Лукичева Т. И. // Мед. реф. журн. XXII.— 1988.— № 11.— С. 16—19.
8. Маурер Г. Диск-электрофорез: Теория и практика электрофореза в полиакриламидном геле: Пер. с нем.— М., 1971.
9. Меньшиков В. В., Дедов И. И., Большакова Т. Д. и др. // Лаб. дело.— 1988.— № 8.— С. 8—12.
10. Сахарный диабет: Доклад исследовательской группы ВОЗ.— М., 1987.
11. Селиванова К. Ф., Королев В. А., Головская Г. Г. и др. // Всесоюзный съезд эндокринологов, 3-й.— Ташкент, 1989.— С. 327—328.
12. Троицкий Г. В. // Укр. биохим. журн.— 1985.— Т. 57.— С. 81—98.
13. Троицкий Г. В., Борисенко С. И., Касымова Г. А. // Лаб. дело.— 1986.— № 4.— С. 229—231.
14. Bunn H. F. // Amer. J. Med.— 1981.— Vol. 70, N 2.— P. 325—330.
15. Bunn H. F., Gabbay K. H., Gallop P. M. // Science.— 1978.— Vol. 200.— P. 21—27.
16. Dolhofer R., Wieland O. H. // FEBS Lett.— 1979.— Vol. 103, N 2.— P. 282—286.
17. Gonen G., Rubenstein A. N., Rahman H. et al. // Lancet.— 1977.— Vol. 2.— P. 734—737.
18. Jermendy G., Kummerer L., Lichy M. et al. // Diabetol. Croat.— 1983.— Vol. 12, N 2.— P. 137—148.
19. Johnson R. N., Metcal P. A., Baker J. R. // Clin. chim. Acta.— 1982.— Vol. 127.— P. 87—95.
20. Kennedy L., Baynes J. W. // Diabetologia.— 1984.— Vol. 26, N 2.— P. 93—98.
21. Kurakachi H., Moridera K. // J. Jap. Diabet. Soc.— 1987.— Vol. 30, N 11.— P. 987—994.

22. Lupolla A., Roli E., Vuleria A. et al. // Diabete et Metab.— 1985.— Vol. 11, N 4.— P. 238—242.
23. Schoog R., Schoog-Burbette S., Lumbotte C. // Clin. chim. Acta.— 1978.— Vol. 86.— P. 61—65.
24. Spicer K. M., Allen R. C., Buse M. G. // Diabetes.— 1978.— Vol. 27, N 4.— P. 384—388.
25. Walinder O., Wibell L. // Acta med. scand.— 1980.— Suppl. 639.— P. 17—22.
26. Welinder B. S., Svendsen P. A. // Diabetologia.— 1980.— Vol. 19.— P. 465—467.

Поступила 23.03.90

#### CONTENT OF HEMOGLOBIN A<sub>1c</sub> AND BLOOD SERUM MODIFIED ALBUMIN IN PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS

V. A. Korolev, G. G. Golovskaya, K. F. Selivanova, K. I. Moldovan, S. N. Borisenko

Crimean Medical School, Simferopol

Hemoglobin A<sub>1c</sub> was studied by means of isoelectric focusing in borate-polyol system and modified albumin — using electrophoresis of blood serum on acetate-cellulose films with subsequent TCA-ethanol sedimentation in healthy volunteers and patients with diabetes mellitus. These parameters were increased in the patients, whereas content of the albumin was decreased and the content of hemoglobin A<sub>1c</sub> was altered only slightly during treatment of diabetes. Content of hemoglobin A<sub>1c</sub> and modified albumin was shown to depend on the compensation state of diabetes mellitus.

© С. А. ГУЛИЕВА, С. И. САМЕДОВ, 1991

УДК 615.326:553.982|015.4:616.153.295|076.9

С. А. Гулиева, С. И. Самедов

#### СОСТАВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ПЛАЗМЫ КРОВИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НА ОРГАНИЗМ КРОЛИКОВ ЛЕЧЕБНОЙ НАФТАЛАНОВОЙ НЕФТИ

НИИ медицинской реабилитации и природных лечебных факторов, Баку

При воздействии на организм нафталановой нефти (НН) в клинике и эксперименте отмечается увеличение содержания фосфолипидов, эфиров холестерина и снижение свободного холестерина, неэстерифицированных жирных кислот и триглицеридов, подтверждающие благоприятное влияние лечебных нафталановых процедур на метаболизм липидов [4, 5]. В нашей лаборатории выявлена [6] нормализация нарушенных показателей липидного обмена у больных с облитерирующим атеросклерозом сосудов нижних конечностей в результате лечения этих больных сидячими и 4-камерными нафталановыми ваннами: в сыворотке крови больных после лечения содержание общих липидов, общего и свободного холестерина, триглицеридов, свободных жирных кислот снижается, а содержание эфиров холестерина и фосфолипидов повышается. Аналогичные сдвиги в показателях липидного обмена выявлены и у больных детей с ограниченным и диффузным нейродермитом, леченных нафталановыми ваннами [7, 8].

Исходя из полученных результатов, целью настоящей работы явилось выявление количественных изменений отдельных жирных кислот под воздействием НН в эксперименте.

Методика. Применяли кожные аппликации с нативной НН (ННН) на одну (80 кроликов, 1—6-я группа) и на обе

Влияние ННН на содержание жирных кислот (в %) в плазме крови кроликов

Жирная кислота		Группа животных								
		контроль (n=100)	1-я (0,5 мл, 5×5 см <sup>2</sup> ), (n=10)	2-я (0,6 мл, 6×6 см <sup>2</sup> ), (n=20)	3-я (0,7 мл, 7×7 см <sup>2</sup> ), (n=10)	4-я (0,8 мл, 8×8 см <sup>2</sup> ), (n=10)	5-я (0,9 мл, 9×9 см <sup>2</sup> ), (n=20)	6-я (1 мл, 10×10 см <sup>2</sup> ), (n=10)	7-я (0,5 мл, 5×5 см <sup>2</sup> ), (n=10)	8-я (1 мл, 10×10 см <sup>2</sup> ), (n=10)
Лауриновая	12:0	0,27	0,12	0,12	0,12	0,21	0,18	0,15	0,13	0,15*
Миристиновая	14:0	1,19	0,90	0,87	0,83	0,92	0,85	0,78	0,80	1,00
Миристолевая	14:1	0,30	0,23	0,20	0,17	0,18*	0,20	0,13	0,18	0,27
Пентадекановая	15:0	0,71	0,47	0,44	0,40	0,52	0,47	0,42	0,35	0,58
Пальмитиновая	16:0	37,09	33,80	33,10	32,29	34,03	33,32	32,61	33,67	34,77
Пальмитолеиновая	16:1	2,42	1,87	1,76	1,64	2,21	2,08	1,94	1,19	1,52
Маргариновая	17:0	0,81	0,53	0,46	0,38	0,53	0,48	0,44	0,43	0,54*
Гептадеценная	17:1	0,65	0,60	0,55	0,48	0,45	0,41	0,37	0,29	0,34
Стеариновая	18:0	12,01	10,51	10,21	9,90	11,07	11,05	11,03	10,08	10,82
Олеиновая	18:1	26,98	31,08*	31,69	32,30	30,13	30,43	30,73	30,00	29,29
Линолевая	18:2	12,99	16,53	17,07	18,20	15,26	15,91	16,47	16,77	15,38
Линоленовая	18:3	1,23	1,47	1,54	1,64	1,80	2,01	2,22	1,82	1,48
Эйкозодиеновая	20:2	0,65	0,50	0,56	0,42	0,52	0,47	0,42	0,38	0,44
Эйкозатриеновая	20:3	0,48	0,41	0,39	0,38	—	0,47	—	0,25	0,31
Арахидоновая	20:4	0,24	0,29	0,32	0,34	0,37	0,40	0,43	0,37	0,38

Примечание. Здесь и в табл. 2 звездочка — различия недостоверны.

(20 кроликов, 7-я и 8-я группы) боковые поверхности тела. Смазываемая площадь кожного покрова в отдельных группах изменялась в зависимости от ее размеров (5×5, 6×6, 7×7, 8×8, 9×9, 10×10 см<sup>2</sup>); в этих группах применяемая доза ННН также была разной: 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, и 1 мл на 1 кг массы тела соответственно. У 30 кроликов применены кожные аппликации с обесмоленной ННН (ОНН) (9—11-я группа), 50 кроликов получали ОНН per os в дозах 0,3, 0,5, 0,9 и 1 мл на 1 кг массы тела (10—15-я группа) и 15-кратно (16-я группа) — 1 мл на 1 кг массы тела).

Кровь для исследования брали до и через 1 день после окончания нафталиновых процедур.

Для анализа использованы липиды, выделенные из 3 мл плазмы крови, которые экстрагировали по методу Folch и соавт. (1957), после чего проводили метилирование ЖК по методическим указаниям В. К. Пустового (1978).

Содержание ЖК определяли на хроматографе «Хром-2». Количественную оценку хроматограмм проводили путем измерения площадей пиков (время удержания пика, умноженное на высоту пика) отдельных компонентов и определения доли каждого из них в процентах от общей суммы площадей пиков, метилированных производных жирных кислот.

Результаты и обсуждение. Выявленное снижение содержания жирных кислот в плазме крови кроликов, подвергнутых воздействию ННН и ОНН, по-видимому, связано с изменением процессов синтеза липидов и энергетических затрат организма [2, 10, 11, 12].

Как следует из табл. 1, после 10-кратного применения ННН по сравнению с контролем происхо-

дит достоверное снижение во всех исследуемых группах содержания большинства как насыщенных, так и ненасыщенных жирных кислот. Вместе с тем следует отметить, что снижение содержания отдельных жирных кислот в плазме крови кроликов в зависимости от дозы, кратности применения и площади аппликации колебалось в значительных пределах.

Как известно, при нафталинолтерапии происходит расширение капилляров, уменьшается сосудистое сопротивление и улучшается кровообращение [5]. В связи с этим усиливаются оксигенация тканей организма и потребление кислорода, что в свою очередь сказывается на мобилизации окисления и циркуляции жирных кислот в плазме крови и тканях организма [2] и может приводить к снижению их уровня в системной циркуляции.

Вместе с тем уровень олеиновой кислоты практически во всех случаях возрастал, что представляет определенный интерес, так как олеиновая кислота играет важную роль в обмене холестерина [3].

Поскольку высокое содержание линолевой кислоты в плазме крови можно рассматривать как необходимое условие для выведения избытка холестерина в форме его эфиров из циркуляции в печень с последующим окислением [1, 9], заслужи-

Таблица 2

Влияние ОНН на содержание жирных кислот (в %) в плазме крови кроликов

Жирная кислота		Группа животных									
		контроль (аппликация) (n=30)	9-я (0,9 мл, 8×8 см <sup>2</sup> ) (n=10)	10-я (1 мл, 10×10 см <sup>2</sup> ) (n=10)	11-я (1 мл, 10×10 см <sup>2</sup> ) (n=10)	контроль (per os) (n=50)	12-я (0,3 мл) (n=10)	13-я (0,5 мл) (n=10)	14-я (0,9 мл) (n=10)	15-я (1 мл) (n=10)	16-я (1 мл) (n=10)
Лауриновая	12:0	0,29	0,22	0,15	0,12	0,23	0,08	0,05	0,15	0,09	0,10
Миристиновая	14:0	1,18	1,05	0,89	0,90	1,22	0,65	0,55	1,14*	0,66	0,83
Миристолевая	14:1	0,30	0,23	0,17	0,25	0,31	0,17	0,13	0,18	0,21	0,18
Пентадекановая	15:0	0,75	0,66	0,58	0,55	0,72	0,37	0,31	0,41	0,44	0,57
Пальмитиновая	16:0	36,87	35,22	34,70	32,53	37,50	30,73	28,90	32,52	33,17	32,43
Пальмитолеиновая	16:1	2,42	2,27	1,95	1,28	2,20	1,48	1,24	1,40	1,14	1,73*
Маргариновая	17:0	0,77	0,60	0,42	0,48	0,82	0,38	0,27	0,50	0,35	0,49
Гептадеценная	17:1	0,64	0,59	0,50	0,32	0,62	0,45	0,35	0,36	0,32	0,38
Стеариновая	18:0	12,30	11,38	11,14	10,96	12,03	9,02	8,12	10,89	10,63	10,37
Олеиновая	18:1	26,96	28,60	29,89	30,04	26,84	35,70	37,60	28,77	31,04	29,61
Линолевая	18:2	12,89	14,48	15,05	16,69	12,86	17,57	18,96	18,04	16,64	15,31
Линоленовая	18:3	1,30	1,78	2,03	1,57	1,13	2,00	2,20	1,59	2,06	2,04
Эйкозодиеновая	20:2	0,67	0,57	0,50	0,44	0,61	0,33	0,27	0,55	0,31	0,41
Эйкозатриеновая	20:3	0,37	—	—	0,30	0,48	0,34	0,24	0,44	0,22	0,26
Арахидоновая	20:4	0,26	0,40	0,43	0,42	0,26	0,37	0,40	0,38	0,46	0,38
Линоленовая	18:3	1,30	1,78	2,03	1,57	1,13	2,00	2,20	1,59	2,06	2,04

вает внимания тот факт, что после 10 процедур ННН у животных 1—3-й группы в плазме крови увеличивался уровень линолевой, линоленовой и арахидоновой кислот.

При применении ОНН на боковую поверхность тела кролика и *per os* в зависимости от дозы, площади смазывания и кратности также отмечено изменение уровня жирных кислот, наиболее выраженное при пероральном введении ОНН (табл. 2). В частности, несколько увеличивались уровень линолевой кислоты в 13-й группе и содержание арахидоновой кислоты, что выражено весьма отчетливо в 6, 10 и 15-й группах. Известно, что увеличение уровня арахидоновой кислоты имеет большое значение, так как дефицит этой кислоты, обладающей высокой биологической активностью, затрудняет обмен холестерина и выведение его из организма путем перевода в лабильные и легко-растворимые соединения, приводит к снижению эластичности сосудов [10].

Необходимо отметить, что при применении НН в организме кролика во всех группах опытов по сравнению с исходными данными отмечена потеря в массе тела, обусловленная, по-видимому, уменьшением массы жировой ткани, что согласуется с результатами других исследователей [2].

Суммируя полученные результаты, можно заключить, что реакция организма на воздействие НН связана с дозой, площадью аппликации, кратностью и методом ее применения. Выявленное при определенных условиях увеличение содержания линолевой, линоленовой и арахидоновой кислот в плазме крови кроликов после нафталиновой процедуры свидетельствует о целесообразности нафталинолечения при лечении ряда заболеваний, связанных с нарушением липидного обмена.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Алимов Е. К., Аствацатурян А. Г., Жаров Л. В. // Липиды и жирные кислоты в норме и при патологических состояниях. — М., 1975. — С. 62—65.
2. Аникеева С. П., Штеринберг Ю. М. // Вопр. мед. химии. — 1981. — № 4. — С. 435—441.
3. Бадейнова Е. П., Левачев М. М., Богдарин Ю. А. // Там же. — 1989. — № 1. — С. 99—104.
4. Гулиева С. А., Самедов С. И., Гусейнов Т. Г. и др. // Современные проблемы патологической физиологии. — Ереван, 1985. — С. 77—78.
5. Гулиева С. А., Гусейнов Т. Г. // Вопр. курортол. — 1988. — № 3. — С. 17—23.
6. Гулиева С. А., Асланова В. Г. // Липидный обмен и лечебная нафталинолечение. — Баку, 1989. — С. 3—12.
7. Гусейнов Т. Г. // Там же. — С. 42—52.
8. Гусейнова Т. А. // Там же. — С. 53—59.
9. Корф И. И., Мещеряков В. А., Самсонов М. А. и др. // Вопр. мед. химии. — 1987. — № 3. — С. 73—77.
10. Паладина О. К., Аношкина А. А., Степанова Н. О. // Пищевая ценность жиров. — Л., 1958. — С. 240—247.
11. Юфит П. М., Алимova Е. К., Аствацатурян А. Т. // Вопр. мед. химии. — 1983. — № 5. — С. 2—5.
12. Paul P. // Metabolic Adaptation to Prolonged Physical Exercise / Eds H. Howald, J. Poortmans. — Basel, 1975. — P. 156—158.

Поступила 25.04.89

#### COMPOSITION OF FATTY ACIDS IN BLOOD PLASMA OF RABBITS TREATED WITH NAPHTHALAN OIL

S. A. Gulieva, S. I. Samedov

Institute of Medical Rehabilitation and of Natural Medical Factors, Baku

Native naphthalan oil was used for skin applications in 100 rabbits, resin-free naphthalan oil was used for skin ap-

plications in 30 rabbits and 50 animals were administered with resin-free naphthalan *per os*. Quantitative and qualitative alterations of individual fatty acids were estimated in rabbit blood plasma before and after these naphthalan treatments. Distinct decrease in content of lauric, myristic, pentadecanic, palmitic, margaric and stearic acids as well as increase of oleic, linoleic and arachidonic acids were observed after the treatment course consisting of 10 naphthalan procedures. The ratio of unsaturated/saturated fatty acids was increased after all the naphthalan treatments. The data obtained suggest that naphthalan therapy may be used in health resort treatment of some disorders related to impairment of lipid metabolism.

© А. К. ЗАХАРЯН, В. Г. АМАТУНИ, 1991

УДК 616.248-07: [616.154:577.175.522/523+577.175.853] + 616-018.1:576.314]-008.939.15-39

А. К. Захарян, В. Г. Амамуни

#### О ВЗАИМОСВЯЗЯХ ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ПРОСТАГЛАНДИНОВ, КАТЕХОЛАМИНОВ И ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ МЕМБРАННЫХ ЛИПИДОВ У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Ереванский медицинский институт

Простагландины (ПГ) являются продуктами циклооксигеназного пути метаболизма арахидоновой кислоты, которая высвобождается из фосфолипидов мембран под воздействием фермента фосфолипазы А<sub>2</sub>. В свою очередь процессы расщепления мембранных фосфолипидов и активность фермента находятся под контролем свободнорадикальных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [14, 15]. Клинические исследования показали, что тяжесть течения бронхиальной астмы (БА) находится, с одной стороны, в прямой зависимости от содержания в крови бронхоконстрикторного ПГФ<sub>2α</sub> и степени увеличения соотношения ПГФ<sub>2α</sub>/ПГЕ [7—9, 16], а с другой — от интенсивности ПОЛ [1]. ПГ является также модулирующей системой, ограничивающей и предупреждающей стрессорные и ишемические повреждения от высоких концентраций катехоламинов (КА), вызывающих активацию ПОЛ [5, 6, 11, 13]. Суть ее заключается в том, что увеличение уровня КА вызывает активацию образования ПГЕ, который в свою очередь ограничивает действие КА [3, 12, 18].

Цель работы — изучение динамики изменения содержания ПГФ<sub>2α</sub> и ПГЕ в плазме крови в сопоставлении с перекисным окислением мембранных липидов и содержанием КА (адреналина и норадреналина) в крови больных атоической БА и инфекционно-зависимой БА (ИЗБА), а также хроническим астматическим бронхитом (ХАБ) с учетом тяжести течения и фазы заболевания.

Методика. Обследовано 24 больных ХАБ и 109 больных БА в возрасте от 23 до 58 лет. На основании клинко-лабораторного, аллергологического и функционального обследования у 19 больных установлена атоическая форма легкого течения БА (АБА<sub>1</sub>), у 21 — (ИЗБА легкого течения (ИЗБА<sub>1</sub>), у 24 — ИЗБА среднетяжелого течения (ИЗБА<sub>2</sub>), у 21 — ИЗБА тяжелого течения (ИЗБА<sub>3</sub>). 13 больных находились в состоянии астматического приступа, 11 — в астматическом состоянии. Контрольную группу составили 20 практически здоровых людей.

Содержание ПГФ<sub>2a</sub> и ПГЕ определяли в плазме крови радиоиммунологическим методом с помощью наборов фирмы "Clinical Assays" и выражали в пикограммах на 1 мл плазмы (пг/мл). Интенсивность ПОЛ в мембранах эритроцитов определяли спектрофотометрически по количеству образовавшегося МДА в реакции с тиобарбитуровой кислотой при 535 нм и выражали в наномолях на 1 мг белка (нмМ/мг) [2]. Количество адреналина (А) и норадrenalина (НА) в крови определяли путем окисления феррицианидом калия при разных рН с последующим определением интенсивности флуоресценции на спектрофлуориметре фирмы "Hitachi" (Япония) при длине волны флуоресценции 540 и 520 нм соответственно. Количество А и НА выражали в микрограммах на 1 л крови (мкг/мл) [10]. Результаты обрабатывали методом вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Как видно из таблицы, содержание ПГФ<sub>2a</sub> в плазме крови у больных ХАБ в фазе обострения колеблется в пределах нормы, а у больных БА находится в прямой зависимости от тяжести заболевания, достоверно отличаясь от контроля на 160 % при ИЗБА<sub>3</sub> и превышая более чем в 2 раза норму при астматическом приступе. Вместе с тем у последних резко (на 57 %) снижено содержание ПГФ<sub>2a</sub> по сравнению с контролем.

Уровень ПГЕ у больных ХАБ и БА независимо от формы и тяжести заболевания значительно ниже контроля примерно в равной степени (на 82—87 %), а у больных с астматическим приступом он увеличен в сравнении с межприступным периодом на 120 %, оставаясь тем не менее ниже, чем в контроле, на 69 %.

Соотношение ПГФ<sub>2a</sub>/ПГЕ в фазе обострения у обследованных всех групп в 8—10 раз достоверно выше, чем в контроле, и достигает максимума (в 30 раз выше нормы) при ИЗБА<sub>3</sub> и при астматическом приступе. У больных в астматическом состоянии соотношение ПГФ<sub>2a</sub>/ПГЕ значительно ниже, чем у больных остальных групп, хотя и остается в 5 раз выше, чем в контроле. В фазе ремиссии уровень ПГФ<sub>2a</sub> снижается до нормы и даже ниже, а уровень ПГЕ повышается до контрольного уровня или превышает его. Коэффициент ПГФ<sub>2a</sub>/ПГЕ при этом ниже нормы на 22—53 %. Аналогичные данные были получены другими исследователями [4, 8].

Поскольку ПГ являются продуктами метаболизма ненасыщенных жирных кислот фосфолипидов клеточных мембран, а при БА имеет место усиленное перекисное окисление мембранных липидов [1], мы рассчитали коэффициенты корреляции между ПГФ<sub>2a</sub> и ПГЕ, с одной стороны, и ПОЛ — с другой. Установлена высокая прямая корреляционная связь между содержанием А, ПГ и интенсивностью ПОЛ ( $r=0,77-0,93$ ) у больных ХАБ и БА; лишь при астматическом состоянии корреляция полностью отсутствует. Приведенные данные свидетельствуют о наличии тесной положительной связи между повышением содержания в крови ПГФ<sub>2a</sub>, уровнем А и интенсивностью ПОЛ у больных ХАБ и БА. При астматическом состоянии крайне напряженное ПОЛ сочетается с резким снижением содержания ПГФ<sub>2a</sub>. Изменения ПГЕ, напротив, не коррелируют с интенсивностью ПОЛ ( $r=0,01-0,40$ ), что делает более вероятным значение интенсивности перекисного окисления мембранных липидов в механизмах биосинтеза только ПГФ<sub>2a</sub>. С другой стороны, крайне высокое напряжение ПОЛ, приводящее к цитотоксическим эффектам и развитию астматического состояния у

Содержание в плазме крови ПГФ<sub>2a</sub> и ПГЕ у больных БА и ХАБ (M±m)

Форма заболевания	Фаза обострения										Фаза ремиссии		
	ПГФ <sub>2a</sub> , пг/мл	ПГЕ, пг/мл	ПГФ <sub>2a</sub> /ПГЕ	НА · 1000/ПГЕ	г <sub>НА-ПГФ</sub>	г <sub>А-ПГФ<sub>2a</sub></sub>	г <sub>ПГФ<sub>2a</sub>-ПОЛ</sub>	г <sub>ПГЕ-ПОЛ</sub>	ПГФ <sub>2a</sub>	ПГЕ	ПГФ <sub>2a</sub> /ПГЕ		
ХАБ	213,8±24,5	57,7±7,9***	4,9±0,7***	20,3±4,7*	0,25	0,79*	0,90*	0,04	140,8±27,5	564,3±154,0	0,39±0,06		
БА <sub>1</sub>	249,4±36,3	57,5±11,8***	6,7±2,05***	20,5±5,5*	0,12	0,90*	0,90*	0,10	250,0±49,9	550,2±101,2	0,47±0,01		
ИЗБА <sub>1</sub>	231,1±27,7**	61,8±11,2***	7,05±1,6***	25,1±6,3*	-0,24	0,65*	0,92*	0,10	124,7±21,4*	457,2±97,6	0,40±0,07		
ИЗБА <sub>2</sub>	302,5±34,4**	79,8±14,7***	6,7±1,04***	27,6±7,6*	-0,31	0,90*	0,90*	0,16	190,9±28,5	516,3±80,7	0,40±0,09		
ИЗБА <sub>3</sub>	550,6±78,6***	62,7±14,3***	20,3±5,04***	30,9±6,7*	0,30	0,97*	0,93*	0,01	161,8±31,9	1021,9±173,3*	0,26±0,08*		
Астматический приступ	660,1±89,7*	137,5±35,5*	19,2±8,7*	39,2±14,5*	-0,32	0,23	0,77*	0,40					
Астматическое состояние	90,6±23,2*	55,2±16,1*	2,8±0,7*	13,3±3,6*	-0,53*	-0,22	0,10	0,0002					

Примечание. Одна звездочка — различия достоверны относительно контроля, две — относительно фазы ремиссии.

больных БА, может стать причиной угнетения синтеза ПГФ<sub>2a</sub>.

Значительное снижение содержания ПГЕ в крови, наблюдаемое при БА и ХАБ в фазе обострения независимо от тяжести заболевания, усиливающее бронхоспастический эффект увеличения ПГФ<sub>2a</sub>, лежит в самой основе заболевания и не обусловлено действием общих патогенетических механизмов, характеризующих стресс-реакции вообще (увеличения содержания КА, усиления ПОЛ). При этом существенное увеличение содержания ПГЕ только в состоянии приступа может рассматриваться как адаптивная реакция, уравновешивающая в известной степени чрезмерное увеличение содержания ПГФ<sub>2a</sub>. Известно, что синтез ПГЕ находится в зависимости от содержания в крови НА; в свою очередь увеличение содержания ПГЕ в порядке обратной связи ингибирует эффекты НА. Как следует из полученных данных, увеличение содержания в крови НА по мере утяжеления БА не отражается на синтезе ПГЕ. Между ними нет также корреляционной связи ( $r = -0,30-0,25$ ). Как показал анализ, соотношение НА/ПГЕ было значительно выше у больных всех групп по сравнению с контролем, причем его отклонение от нормы было тем больше, чем тяжелее протекало заболевание. В частности, наибольшим оно было при астматическом приступе. Следовательно, при ХАБ и БА, включая легкие его формы, нарушается соотношение НА/ПГЕ, что является одним из ранних проявлений заболевания еще в стадии преадаптации. В астматическом состоянии это соотношение самое низкое, хотя и превышает норму на 10%. Нет также внутренней связи между содержанием ПГЕ и А ( $r = -0,20-0,23$ ). Напротив, между содержанием А, НА и уровнем ПОЛ имеется прямая корреляционная связь ( $r = 0,40-0,92$ ), что хорошо согласуется с известными данными литературы о стимулирующем влиянии А на ПОЛ [11, 13].

Отсутствие зависимости снижения синтеза ПГЕ от интенсивности ПОЛ и содержания в крови НА и А, а также значительное отклонение от нормы соотношения НА/ПГЕ и ПГФ<sub>2a</sub>/ПГЕ в состоянии преадаптации свидетельствуют о значимости в патогенезе БА не только усиления синтеза ПГФ<sub>2a</sub>, но и значительного и более раннего (ХАБ, АБА<sub>1</sub>, ИЗБА<sub>1</sub>) снижения синтеза ПГЕ и особенно нарушения в крови соотношения НА/ПГЕ, что имеет непосредственное отношение к функциональному состоянию β-адренорецепции и системы аденилатциклаза — цАМФ, играющих важнейшую роль в патогенезе заболевания. Известно также участие ПГЕ в регуляции иммунного ответа через Т-супрессорное звено и в патохимической стадии развития БА [19].

Значительное снижение в астматическом состоянии содержания ПГФ<sub>2a</sub> и ПГЕ при крайне тяжелом клиническом состоянии больных и продолжающейся инициации все новых цепей свободнорадикального окисления ненасыщенных жирных кислот фосфолипидов клеточных мембран происходит, вероятно, по причине того, что в связи с подавлением циклооксигеназного пути метаболизма арахидоновой кислоты активируется липоксигеназный путь с образованием лейкотриенов — наиболее мощных медиаторов аллергического воспаления, увеличивающих в свою очередь высвобождение

медиаторов клеток-мишеней I порядка, что приводит к все большему высвобождению медиаторов, включая лейкотриены. Другой возможной причиной резкого снижения содержания в крови ПГФ<sub>2a</sub> может быть введение больным в астматическом состоянии больших доз кортикостероидных гормонов, блокирующих выход свободных жирных кислот из фосфолипидов клеточных мембран [17].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Амануни В. Г., Карагезян К. Г., Сафарян М. Д. // Тер. арх.— 1980.— № 3.— С. 96—100.
2. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.— М., 1972.
3. Габриелян Э. С., Амроян Э. А. // Бюл. exper. биол.— 1976.— № 6.— С. 643—645.
4. Кац П. Д., Аметова А. С., Ларина И. М. и др. // Педиатрия.— 1983.— № 12.— С. 12—15.
5. Меерсон Ф. З. Адаптация, стресс и профилактика.— М., 1981.
6. Меерсон Ф. З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца.— М., 1984.
7. Платков Е. И., Бриль Э. Н. // Тер. арх.— 1983.— № 3.— С. 17—19.
8. Чучалин А. Г., Апульцина И. Д. // Сов. мед.— 1983.— № 5.— С. 6—10.
9. Чучалин А. Г. Бронхиальная астма.— М., 1985.
10. Шаталов А. А. // Вопр. мед. химии.— 1969.— № 3.— С. 323—327.
11. Bors W., Michel C., Seran M., Lengfelder E. // Biochim. biophys. Acta.— 1978.— Vol. 540.— P. 162—172.
12. Dahlstrom A. // Brain Res.— 1973.— Vol. 62.— P. 441—446.
13. Dilberto E. J., Allen P. L. // J. biol. Chem.— 1981.— Vol. 256, N 7.— P. 3385—3387.
14. Hemler M. E., Graff A., Lands E. M. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1978.— Vol. 85, N 4.— P. 1325—1331.
15. Hemler M. E., Cook H. W., Lands E. M. // Arch. Biochem.— 1979.— Vol. 193, N 2.— P. 340—345.
16. Nemoto M. J. et al. // J. Allergy.— 1976.— Vol. 57, N 2.— P. 89—94.
17. Samuelson B. // Rass. Clin. Soc. Inst. Biochim. ital.— 1983.— Vol. 59, N 7—8.— P. 134—137.
18. Starke K., Montel H. // Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmakol.— 1973.— Bd 278.— S. 111—116.
19. Webb D. R., Nowowiejski J. // Cell. Immunol.— 1981.— Vol. 63, N 2.— P. 321—328.

Поступила 16.02.90

## INTERRELATIONSHIP BETWEEN ALTERATIONS IN CONTENT OF PROSTAGLANDINS, CATECHOLAMINES AND MEMBRANE LIPID PEROXIDATION IN PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA

A. K. Zakharyan, V. G. Amatuni

Medical School, Yerevan

Dynamics of alterations in content of prostaglandins (PG) F<sub>2a</sub> and E and in the ratio PGF<sub>2a</sub>/PGE was studied in blood plasma of 24 patients with chronic asthmatic bronchitis and 109 patients with bronchial asthma. Alterations in content of PGF<sub>2a</sub> correlated with severity of the disease, while PGE content was similarly below the control values in all the groups examined. The ratio PGF<sub>2a</sub>/PGE corresponded with the alterations in content of PGF<sub>2a</sub>. Direct correlation was observed between content of adrenaline, PGF<sub>2a</sub> and the rate of lipid peroxidation, whereas PGE was not related to these patterns. The correlation was completely absent under conditions of asthmatic attack.

Н. А. Зорин, С. Г. Жабин, Т. И. Белогорлова,  
С. В. Архипова

## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ $\alpha_2$ -МАКРОГЛОБУЛИНА И АССОЦИИРОВАННЫХ С БЕРЕМЕННОСТЬЮ $\alpha_2$ -ГЛИКОПРОТЕИНА И ПРОТЕИНА А КАК ВОЗМОЖНЫХ АНАЛОГОВ

ЦНИЛ Новокузнецкого института усовершенствования врачей

В последнее время было установлено, что  $\alpha_2$ -макроглобулин (МГ), ассоциированный с беременностью  $\alpha_2$ -гликопротеин (АБГ) и ассоциированный с беременностью протеин А (РАРР-А) являются неспецифическими ингибиторами протеиназ и обладают определенным структурным сходством [1—3, 7, 12, 14]. Однако именно это сходство затрудняет получение каждого из них в свободном от примесей виде и порождает расхождение результатов изучения данных белков. Настоящая работа представляет собой попытку получения высокоочищенных препаратов названных белков и изучения их свойств в единой аналитической системе.

**Методика.** В качестве источника изучаемых белков использовали сыворотку крови доноров-мужчин и ретроплацентарную сыворотку крови. На первом этапе ее разбавляли равным объемом 0,05 М трис-НСl-буфера pH 7,8, содержащего 0,45 М NaCl и 0,1 % тритона X-100 [14]. Смесь наносили на колонку (2,6×20 см) гепарин-агарозы («Кемотекс», Таллинн), уравновешенную тем же буфером. Белок, элюированный стартовым буфером, осаждали сульфатом аммония (40—55 % насыщения) и диализовали против воды, а затем против 0,02 М натрий-фосфатного буфера pH 8,0, содержащего 1 М NaCl [12]. РАРР-А, адсорбированный гепарин-агарозой, элюировали 0,05 М трис-НСl-буфером pH 7,8, содержащим 1 М NaCl. Для удаления примесей полученный материал подвергали негативной аффинной хроматографии на колонке бромцианактивированной агарозы («Кемотекс», Таллинн) с присоединенными антителами козы против белков сыворотки крови человека. Эти антитела выделяли из соответствующей антисыворотки (Горьковский НИИЭМ) при помощи анионообменной хроматографии на 4 % ДЭАЭ-агарозе («Эстар», Тарту) [4]. Материал, не присоединившийся к гепарин-агарозе, наносили на колонку (2,6×40 см) иминодиуксуноисликой агарозы («Кемотекс», Таллинн). Предварительно ее промывали 5 объемами 0,05 М ЭДТА-буфера pH 6,0 и 1 М NaCl воды, 0,05 М ацетата цинка pH 6,0, воды и 0,02 М натрий-фосфатного буфера pH 8,0 и 1 М NaCl [12]. После внесения белка колонку промывали двумя объемами 0,02 М натрий-фосфатного буфера pH 7,0 и 1 М NaCl. Для последовательного элюирования АБГ и МГ использовали градиент 0,02 М натрий-фосфатных буферов pH 7,0 и 5,0, содержащих 1 М NaCl. АБГ освобождали от примесей при помощи 2—3 последовательных сеансов негативной аффинной хроматографии, а МГ — при помощи гель-хроматографии на колонке (5×100 см) 4 % поперечно-сшитой агарозы («Кемотекс», Таллинн) или сефарозы 4В. Очищенные от примесей белки диализовали против 0,1 М натрий-фосфатного буфера pH 8,0, концентрировали диализом против декстрана с мол. м. 70 000 до концентрации 3—5 мг/мл, фильтровали через капроновые фильтры («Химифил», Таллинн) и хранили в замороженном состоянии при -20 °С.

Для определения молекулярной массы белка использовали гель-хроматографию на колонке (1,6×90 см) сефарозы КВ. В качестве высокомолекулярного маркера применяли иммуноглобулин М, полученные из сыворотки крови при помощи позитивной аффинной хроматографии на колонке цианбромированной агарозы с присоединенными бараньими антителами против этого белка (Горьковский НИИЭМ). Для получения «полумолекул» белка в состав элюирующего буфера вводили хлорид кадмия [11]. Электрофорез в градиенте (4—16 %) ПААГ проводили с немодифицированным белком, а также после обработки его додецилсульфатом натрия и меркаптоэтанолом [5]. Ограниченный протеолиз белков осу-

ществляли путем обработки их трипсином в течение 0,5—16 ч с последующим определением молекулярной массы лизатов электрофорезом в ПААГ с додецилсульфатом натрия [5]. Влияние первичных аминов оценивали методом электрофореза в 5 % ПААГ после 3-часовой инкубации белков с 0,1 М метиламина [12]. Количество внутренних тиоэфиров определяли путем титрования 5,5-дитио-бис-(2-нитробензойной кислотой) растворов белка, обработанных трипсином или метиламином [9, 12]. Для определения pI использовали изoeлектрическое фокусирование в 1 % агарозе («Эстар», Тарту) в присутствии амфолитов («Химифил», Таллинн) с диапазоном pH 4—9 и 4—6 [6]. Изучение pH-стабильности белков проводили методом электрофореза в ПААГ после 0,5—24-часовой инкубации при соответствующем значении pH [7, 12, 14]. Моноспецифические антисыворотки против каждого из белков получали путем внутрикожной иммунизации кроликов смесью белка и адьюванта Фрейнда («Реа-Комплекс», Чита) [4]. Диапазоны осаждения белков сульфатом аммония и полиэтиленгликолем 6000 оценивали при помощи ракетного иммуноэлектрофореза [4]. Для иммобилизации протеолитических ферментов использовали активированный кремнеземный сорбент — диасорб А («Диагностикум», Львов). Иммобилизованные ферменты включали в состав промежуточных гелей в методе перекрестного иммуноэлектрофореза [4]. Связывающую активность (аффинитет) иммобилизованных ферментов оценивали по изменению площади преципитатов изучаемых белков, а ингибирующую активность изучаемых белков — по торможению казеинолитической активности трипсина [12]. Относительную электрофоретическую подвижность оценивали при помощи классического [13] и перекрестного иммуноэлектрофореза [4]. Аминокислотный состав белков изучали при помощи аминокислотного анализатора LC-5001 («Biotronic», ФРГ). Содержание белково-связанных гексоз оценивали при помощи итронового [16], а сиаловых кислот — резорцинового [15] методов. Определяли также концентрации аминокислот [10] и фукозы [8].

**Результаты и обсуждение.** С использованием описанного выше комплекса методов нам удалось получить свободные от примесей препараты изучаемых белков (рис. 1, 2). При иммунизации ими в течение 2 лет кролики продуцировали моноспецифические антисыворотки. Следовательно, чистота препаратов белков по ре-

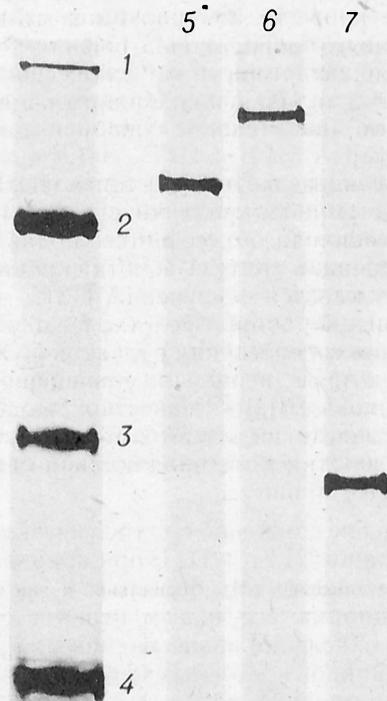


Рис. 1. Электрофорез в градиенте ПААГ.

1 — IgM (мол. м. 900 000), 2 — тиреоглобулин (мол. м. 669 000), 3 — ферритин (мол. м. 440 000), 4 — каталаза (мол. м. 232 000), 5 — МГ, 6 — РАРР-А, 7 — АБГ.

## Физико-химические свойства МГ, АБГ и РАРР-А

Свойства	МГ	АБГ	РАРР-А
Молекулярная масса:			
гель-хроматография на сефарозе 4В	720 000	360 000	820 000
то же в присутствии ионов Cd <sup>2+</sup>	360 000	360 000	400 000
электрофорез в градиенте ПЛАГ	720 000	360 000	820 000
то же в присутствии додецилсульфата натрия без меркаптоэтанола	360 000	360 000	400 000
то же с меркаптоэтанолом	180 000	180 000	205 000
то же после трипсинизации	85 000	85 000	85 000
pI	4,75	4,80	4,60
Влияние метиламина на электрофоретическую подвижность	+	-	+
Количество внутренних тиоэфиров на молекулу	3,8	1,9	3,8
pH-стабильность	3-11	4-10	4-10
Диапазон осаждения сульфатом аммония, %	30-55	30-55	30-55
То же с полиэтиленгликолем 6000, %	4-16	4-16	4-16
Связывание:			
диасорб-трипсином	+++	+++	+++
диасорб-папаином	+++	+++	+++
диасорб-тромбином	+	+++	+++
диасорб-пепсином	++	+	+
диасорб-плазмином	+	+++	+++
диасорб-коллагеназой	++	++	++
диасорб-гиалуронидазой	-	-	-
диасорб-РНКазой	-	-	-

Рис. 2. Электрофорез в градиенте ПЛАГ с додецилсульфатом натрия в восстанавливающих условиях.

1 — ферритин (мол. м. 440 000), 2 — бычий МГ (мол. м. 180 000), 3 — фосфорилаза В (мол. м. 94 000), 4 — бычий сывороточный альбумин (мол. м. 67 000), 5 — РАРР-А, 6 — МГ, 7 — АБГ.

зультатам химического и иммунохимического анализа превышает 95 %. Из 300 мл сыворотки крови беременных женщин этим способом можно выделить около 20 мг РАРР-А (выход 40 %), 35 мг АБГ (выход 20 %) и 350 мг МГ (выход 45 %). Следует отметить, что в исходном методе [12], где отсутствует аффинная хроматография на гепарин-агарозе, РАРР-А загрязняет очищенные препараты АБГ и МГ и не поддается полному удалению. С другой стороны, этот метод отличается многостадийностью и технической сложностью. Нужно также указать, что препараты МГ, выделенные из сыворотки крови беременных женщин, содержат до 5 % АБГ, который не удается удалить. Лишь МГ, выделенный по нашей схеме из сыворотки крови мужчин, полностью свободен от примесей.

По нашим данным, МГ и РАРР-А являются тетрамерами, а АБГ — димером идентичных субъединиц (см. рис. 1, 2; табл. 1). Поскольку без меркаптоэтанола образуются «полумолекулы» МГ и РАРР-А, можно полагать, что они имеют связь нековалентной природы. Аналогичное влияние ионов кадмия позволяет предполагать наличие таких связей через ионы металлов [11]. Ранее это было доказано лишь в отношении МГ [11]. Следовательно, субъединицы всех трех изучаемых белков образуют димеры путем формирования ковалентных связей, а МГ и РАРР-А — димеры димеров на основе нековалентных связей. Впрочем, частично денатурированный АБГ способен также образовывать димеры димеров и агрегаты [12].

Обработка метиламином увеличивает анодную подвижность МГ и РАРР-А, но не АБГ. По аналогии с МГ [1, 12] это свидетельствует о конформационной перестройке молекул под влиянием первичных аминов и протеиназ. Обычно при этом высвобождаются внутренние тиоэфиры [1]. Нами показано, что каждый из белков содержит около одного внутреннего тиоэфира на

субъединицу (см. табл. 1). Очевидно, функционально активные тиоэфиры есть только у тетрамеров — МГ и РАРР-А, тогда как у димера — АБГ они не связаны с конформационными преобразованиями, что соответствует данным [12]. Наличие у всех трех белков сходных пептидов после трипсинизации позволяет рассматривать их как фрагменты «ловушки», участвующей в иммобилизации протейназ [1, 12]. Весьма сходно и связывание белков с иммобилизованными ферментами. При этом родство АБГ и РАРР-А практически идентично, тогда как МГ сильнее связывается с пепсином и значительно слабее — с тромбином и плазмином. С ферментами, лишенными протеолитической активности, все три белка не реагируют. Сходна и кинетика ингибирования казеинполитической активности трипсина (рис. 3). Интересно, что при эквимолярных количествах фермента и белка реакция практически стабилизируется. Если учесть, что каждая субъединица МГ содержит по одной «ловушке», можно полагать наличие аналогичных структур у АБГ и РАРР-А. Кинетика же

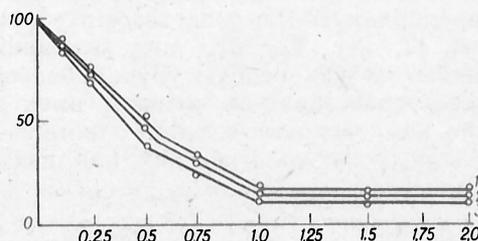


Рис. 3. Ингибирующее действие РАРР-А (1), МГ (2) и АБГ (3) на казеинполитическую активность трипсина.

По оси абсцисс — соотношение белок/трипсин; по оси ординат — остаточная активность (в %).

Таблица 2

## Аминокислотный и углеводный состав МГ, АБГ и РАРР-А

Аминокислоты, углеводы	МГ	АБГ	РАРР-А
Cys	1,60	1,60	2,46
Asx	10,05	9,81	10,33
Thr	4,86	6,66	5,18
Ser	5,60	9,14	7,31
Glx	10,93	10,69	11,24
Pro	4,33	6,06	9,67
Gly	10,85	7,28	7,30
Ala	10,50	6,30	5,84
Val	7,24	8,08	6,16
Met	2,24	1,19	1,24
Ile	5,28	3,96	5,38
Leu	6,83	7,88	7,27
Tyr	2,48	3,79	3,22
Phe	5,47	3,76	3,86
His	2,58	4,06	5,48
Lys	5,31	6,38	4,27
Arg	3,28	2,83	3,79
Trp	0,60	0,59	0
Гексозы	6,2	6,8	10,04
Гексозамины	1,9	1,7	0,8
Сигаловые кислоты	2,0	2,1	3,4
Фукоза	0,3	0,3	0,4
Белок	89,6	89,1	85,0
Углеводы	10,4	10,9	15,0

Примечание. Содержание аминокислот выражено в молях на 100 моль аминокислотных остатков, углеводов и белка в процентах.

ингибирования казеинолитической активности трипсина свидетельствует о том, что часть «ловушек» не связывает фермент.

Определенное сходство можно проследить и при сопоставлении аминокислотного и углеводного состава белков (табл. 2). Все они богаты глицином и аспарагином, но бедны серосодержащими аминокислотами и триптофаном. Впрочем, есть и определенные различия. Так, РАРР-А гликозилирован в большей степени, чем МГ и АБГ, углеводный состав которых весьма близок.

Вероятно, столь высокое сходство по составу и структуре может объяснить близость и иных свойств: диапазона рН-стабильности и осаждения сульфатом аммония, а также полиэтиленгликолем. По электрофоретической подвижности в агарозном геле все 3 белка относятся к гликопротеннам с подвижностью  $\alpha_2$ -глобулинов. Некоторое различие их  $rI$  можно объяснить различиями в аминокислотном и углеводном составе.

Таким образом, на основе изучения свойств высокоочищенных препаратов МГ, АБГ и РАРР-А нами продемонстрирована высокая степень сходства их состава, структуры и функциональных свойств. Ранее была продемонстрирована аналогия между МГ и АБГ [12], а также высказаны предположения о сходстве структуры МГ и РАРР-А [7, 14]. Все это дает основания рассматривать их как особую группу белков плазмы крови, представители которой, имея сходные функции, компенсируют дефицит одного из них при определенных физиологических или патологических процессах.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Веремеско К. Н., Голобородько О. П., Кизим А. И. Протеолиз в норме и при патологии.— Киев, 1988.
2. Жабин С. Г., Зорин Н. А. // Акуш. и гин.— 1988.— № 10.— С. 7—9.

3. Зорин Н. А., Зорина Р. М., Горин В. С. // Там же.— 1986.— № 6.— С. 6—9.
4. Руководство по количественному иммуноэлектрофорезу / Под ред. Н. Аксельсена, Й. Крелля, Б. Вееке.— М., 1977.
5. Такач Б. // Методы исследований в иммунологии.— М., 1981.— С. 93—119.
6. Andrea A. L., Leedham V. // Electrophoresis.— 1986.— Vol. 7.— P. 454—456.
7. Bischof P. // Arch. Gynäk.— 1979.— Bd 227.— S. 315—326.
8. Dische L., Schettles L. // J. biol. Chem.— 1948.— Vol. 172.— P. 595—603.
9. Ellman G. L. // Arch. Biochem.— 1959.— Vol. 82.— P. 70—77.
10. Gatt R., Berman E. R. // Analyt. Biochem.— 1966.— Vol. 15.— P. 167—172.
11. Pochon F., Barray M., Delain E. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1987.— Vol. 149.— P. 488—492.
12. Sand O., Folkersen J., Westergaard J. G. et al. // J. biol. Chem.— 1985.— Vol. 260.— P. 15723—15735.
13. Scheidegger J. J. // Int. Arch. Allergy.— 1955.— Vol. 7.— P. 103—110.
14. Sinosich M. J., Davey M., Ghosh P. et al. // Biochem. int.— 1982.— Vol. 5.— P. 777—786.
15. Svennerholm L. // Biochim. biophys. Acta.— 1958.— Vol. 24.— P. 30—41.
16. Trewellian W. R., Harrison E. R. // Biochem. J.— 1952.— Vol. 50.— P. 298—311.

Поступила 12.05.89

POSSIBLE SIMILARITY BETWEEN  $\alpha_2$ -MACROGLOBULIN AND PREGNANCY-DEPENDENT  $\alpha_2$ -GLYCOPROTEIN AND PROTEIN A: A COMPARATIVE STUDY

N. A. Zorin, S. G. Zhabin, T. I. Belogorova, S. V. Arkhipova  
Institute for Postgraduate Training of Physicians, Novokuznetsk

Pregnancy-dependent protein A,  $\alpha_2$ -glycoprotein as well as  $\alpha_2$ -macroglobulin were isolated from retroplacental blood serum by means of affinity chromatography. These proteins proved to be similar in their structure, amino acid and carbohydrate compositions as well as in their properties to bind proteinases and to inhibit the enzymatic activity. The hypothesis on possible integration of these proteins into a group of high molecular inhibitors of proteinases is discussed.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616.831-005-07:616.153.295.96-074

А. Г. Паносян, О. Н. Аракелян, Е. Г. Саакян,  
С. Э. Акопов, А. В. Назарян, Э. С. Габриэлян

ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МОНОГИДРОКСИЭЙКОЗАТЕТРАЕНОВЫХ КИСЛОТ В КРОВИ БОЛЬНЫХ С НАРУШЕНИЯМИ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ

Институт медицинской радиологии Минздрава Армянской ССР, Ереванский медицинский институт

Изменения метаболизма арахидоновой кислоты привлекают внимание исследователей как фактор, непосредственно участвующий в нарушениях регионарного кровообращения. Исследования метаболизма арахидоновой кислоты при этом касались в основном циклооксигеназного пути [6, 7, 21]. Показано, что при атеросклерозе и вызываемых им осложнениях, проявляющихся в виде нарушений коронарного и мозгового кровообращения, увеличивается образование циклооксигеназных метаболитов арахидоновой кислоты (АК), способных провоцировать вазомоторные и тромботические расстройства [6, 7, 16]. При этом

нарушается баланс в биосинтезе простаглицина и тромбосана [16]. Исследования последних лет показали, что липоксигеназные метаболиты АК также влияют на эти процессы. Прежде всего это касается моногидроксиэйкозатетраеновых кислот (МГЭТК) — (5S)-5-гидрокси-(E,Z,Z,Z)-6,8,11,14-эйкозатетраеновой (5-НЕТЕ), (12S)-12-гидрокси-(Z,Z,E,Z)-5,8,10,14-эйкозатетраеновой (12-НЕТЕ) и (15S)-15-гидрокси-(Z,Z,Z,E)-5,8,11,13-эйкозатетраеновой (15-НЕТЕ) кислот, являющихся основными метаболитами АК в тканях млекопитающих [5]. Известно, что макрофаги и тромбоциты, накапливающиеся в субэндотелиальном слое пораженных участков сосудов со значительно большей активностью, окисляют АК моногидроксиэйкозатетраеновые кислоты [19]. 5-, 12- и 15-НЕТЕ образуются также и в гладкомышечных клетках сосудов [8] и, по-видимому, играют важную роль в зарождении и развитии атеросклероза [4, 10, 14]. 12-НЕТЕ вызывает мобилизацию внутриклеточного кальция лейкоцитов [12] и их хемотаксис [2, 3], стимулирует миграцию гладкомышечных клеток в субэндотелиальном пространстве [18], влияет на пролиферацию гладкомышечных клеток в интиме [22], подавляет биосинтез простаглицина в эндотелии [15]. Сегменты пораженного инфарктом миокарда собак, подвергнутых окклюзии и реперфузии, интенсивно метаболизируют АК в 12-НЕТЕ что, по всей вероятности, связано с зональной инфильтрацией нейтрофилов в миокард [17]. Показано также, что 5- и 12-НЕТЕ способны быстро включаться в липиды мембран эндотелиальных и гладкомышечных клеток [20], меняя вязкость клеточных мембран и их проницаемость к катионам, что весьма существенно в регуляции сосудистых функций [12, 20].

5-НЕТЕ стимулирует хемотаксис лейкоцитов [2], а 15-НЕТЕ является сильным вазоконстриктором [1, 10, 23], что также имеет большое значение для атерогенеза и развития регионарных дисциркуляций.

Все это свидетельствует о том, что образование МГЭТК связано с развитием атеросклероза и вазоспазма. В настоящей работе мы исследовали уровень этих кислот в плазме крови больных с нарушениями мозгового кровообращения (НМК).

**Методика.** Было обследовано 30 больных с церебральным атеросклерозом, на фоне которого развилась дисциркуляторная энцефалопатия I—II стадий, и 20 больных, у которых на фоне атеросклероза развился инфаркт мозга. Кровь у больных инфарктом мозга брали в остром периоде заболевания. Средний возраст больных составлял 56,4 года. Контролем служила группа из 12 практически здоровых доноров в возрасте 30—40 лет.

Образцы плазмы крови, содержащие цитрат натрия, дополнительно центрифугировали 15 мин при 4500 об/мин, добавляли внутренний стандарт — простаглицин В2 (100 нг на 1 мл плазмы), подкисляли 1 н НСl до pH 3 и наносили на колонку с 10 мл Амберлита ХАД-2 («Serva», ФРГ) предварительно промытого 1 н НСl, 1 н NaOH, метанолом и водой. Вещества с колонки элюировали водой (50 мл, до pH 6,5) и метанолом (30 мл). Метанольный элюат упаривали досуха, остаток растворяли в 60 мкл метанола и анализировали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии («LKB-Bromma», Швеция) на колонках с Lichrosorb-RP-18 (5 мкм) и Nucleosil-C-18 (5 мкм), используя систему растворителей метанол — вода — уксусная кислота, 70:30:0,01, pH 5,5 (с помощью водного раствора аммиака), скорость потока — 1 мл/мин, детекция при 280 нм (1—15 мин) и 234 нм (16—70 мин) с помощью детектора с переменной длиной волны («LKB-Bromma») или диодного детектора «Polychrom-9000» («Varian») с одновременной регистрацией УФ-спектров. Вещества идентифицировали путем сравнения с истинными стандартами.

**Результаты и обсуждение.** Результаты исследования уровня МГЭТК в плазме крови больных с НМК представлены в табл. 1. По сравнению с контрольным уровнем у больных с церебральным атеросклерозом имеет место резкое увеличение уровня всех исследуемых кислот, причем интересно отметить, что у них в заметных количествах появляются 8-, 11-НЕТЕ, лейкотриен В4 и 5S, 12S-дигидрокси-(E,Z,E,Z)-6,8,10,14-эйкозатетраеновая кислота, а также 2 неидентифицированных соединения с максимумами поглощения в УФ-спектрах при 234 и 243 нм (возможно, 5-15-DHETE [11]).

Сравнение уровня липоксигеназных метаболитов АК у больных, у которых на фоне церебрального атеросклероза развился инфаркт мозга, показало, что и у них уровень МГЭТК резко повышен по сравнению с контролем, однако он ниже (недостаточно), чем у больных с церебральным атеросклерозом.

Учитывая, что в остром периоде инфаркта имеет место ишемизация обширного региона сосудистой сети, можно предположить, что это как-то связано с изменениями липоксигеназного метаболизма АК в сосудистой стенке. Для проверки этого предположения мы исследовали уровень МГЭТК в плазме крови больных после турникетной ишемии верхней конечности. Этот прием широко используется при исследовании динамики высвобождения циклооксигеназных метаболитов АК у больных атеросклерозом [9]. Исследование показало (табл. 2), что можно выделить 2 типа больных: у 44 % обследованных на фоне ишемии возрастает уровень МГЭТК, лейкотриена В4 и 5-, 12-DHETE, тогда как у 38 % больных содержание этих метаболитов АК в крови резко падает. Пока неясно, с чем может быть связана такая реакция, касающаяся всех исследо-

Таблица 1

Содержание эйкозаноидов в плазме крови больных с дисциркуляторной энцефалопатией (ДЭ), с инфарктом мозга (ИНФ) и здоровых доноров (ЗД), нг/мл

Группы больных	15-НЕТЕ	12-НЕТЕ	5-НЕТЕ	8-НЕТЕ	11-НЕТЕ	ЛТВ+DHETE	А-234	В-243
ДЭ (n=30)	836±169	597±123	692±129	297±81	81±27	28±10	284±74	75±16
p<	0,0005	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
ИНФ (n=20)	382±47	363±25	324±19	181±15	154±15	22±3	164±17	35±2
p<	0,1	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
ЗД (n=12)	251±55	98±15	61±8	p<0,1	p<0,1	p<0,1	p<0,1	p<0,1

Примечание. А-234 и В-243 — неидентифицированные метаболиты с максимумами в УФ-спектрах при 234 и 243 нм.

Изменения уровня МГЭТК (в пг/мл) в плазме крови больных с дисциркуляторной энцефалопатией после туниркетной ишемии

МГЭТК	I подгруппа		II подгруппа	
	до ишемии	после ишемии	до ишемии	после ишемии
15-НЕТЕ	1005 (659--1352)	1855* (1449--2260)	1373 (818--1929)	982* (612--1352)
12-НЕТЕ	608 (465--750)	1022* (754--1290)	1150 (685--1615)	851 (553--1149)
5-НЕТЕ	727 (550--905)	1417* (1173--1661)	1390 (1124--1656)	965* (792--1137)
8-НЕТЕ	423 (314--533)	692 (380--1005)	620 (338--901)	429 (244--614)

Примечание. Звездочка —  $p < 0,05$ .

ванных оксикислот. Возможно, что при ишемии усиливается их катаболизм или включение в липиды форменных элементов крови и ткани. Во всяком случае, можно допустить, что при инфаркте мозга именно с такой реакцией у части больных и связано снижение уровня липоксигеназных метаболитов АК в крови.

Подводя итог, можно заключить, что при атеросклерозе базальный уровень МГЭТК и диокси-кислот в плазме крови значительно выше, чем в норме; если же учесть данные об активности МГЭТК, то можно считать, что они играют важную роль в развитии атеросклероза и НМК.

Одним из источников МГЭТК в плазме, по-видимому, являются нейтрофилы, другим, возможно, — сосудистая стенка. Известно, что 5- и 12-НЕТЕ могут быстро включаться в липиды мембран эндотелиальных и гладкомышечных клеток [20], при этом изменяются вязкость мембран клеток и их проницаемость к катионам, что приводит к нарушению сосудистых функций [12]. Последующее усиление пролиферации элементов интимы, также связанное с воздействием МГЭТК [22], может ускорить процессы атерогенеза и явиться одной из причин развития церебральных дисциркуляций. О важности этого механизма свидетельствует и тот факт, что ингибиторы липоксигеназы могут быть использованы для лечения сердечно-сосудистых заболеваний [13].

Вместе с тем, согласно полученным данным, возможны пока недостаточно понятные изменения уровня МГЭТК в крови при ишемии. Впервые обнаруженные два противоположных типа реакции на ишемию позволяют допустить, что уровень липоксигеназных метаболитов АК определяется равновесием процессов их образования и элиминирования из крови, природу которых еще предстоит изучить. Можно предположить, что в зависимости от степени поражения сосудистой стенки атеросклерозом характер изменений уровня липоксигеназных метаболитов АК в крови при ишемии может изменяться. С учетом того, что эти метаболиты обладают и вазомоторной активностью [1, 7] допустимо, что в зависимости от колебаний их уровня может изменяться и опасность развития ангиоспастических расстройств в очаге ишемии, что требует, разумеется, новых исследований.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Asano T., Sasaki S., Koide T. et al. // *Advanc. Prostagl. Thrombox. Leukotr. Res.*— 1985.— Vol. 15.— P. 503—505.

- Goetzl E. J., Brash A. R., Tauber A. I. et al. // *Immunology.*— 1980.— Vol. 39.— P. 491—501.
- Goetzl E. J., Hill H. R., Gorman R. R. // *Prostaglandins.*— 1980.— Vol. 19.— P. 71—85.
- Hadjagapiou C., Spector A. A. // *Ibid.*— 1986.— Vol. 31.— P. 1135—1144.
- Hansson G., Malmsten C., Radmark O. // *New Compr. Biochem.*— 1983.— Vol. 5.— P. 203—223.
- Hayaishi O., Yamamoto S. (Eds). // *Advanc. Prostagl. Thrombox. Leukotr. Res.*— 1985.— Vol. 5.— P. 240—246.
- Kanemaru Y., Noguchi T., Kazama Y. I. et al. // *Prostaglandins.*— 1988.— Vol. 36.— P. 881—890.
- Larrue J., Kazaka G., Daret D. et al. // *Advanc. Prostagl. Thrombox. Leukotr. Res.*— 1985.— Vol. 13.— P. 55—58.
- Long S., Ito T., Ogawa K., Satake T. // *Jap. Circulat. J.*— 1982.— Vol. 46.— P. 651—656.
- Lovelady G. K., Mirro R., Armstead W. M. et al. // *Prostaglandins.*— 1988.— Vol. 36.— P. 507—513.
- Maas R. L., Turk J., Oates J. A., Brash A. R. // *J. biol. Chem.*— 1982.— Vol. 237.— P. 7056—7067.
- Maccache P. H., Shaafi R. T., Borgeat P., Goetzl E. T. // *J. clin. Invest.*— 1981.— Vol. 67.— P. 1581—1587.
- Massocot J. G., Soberman R. J., Ackerman N. R. et al. // *Prostaglandins.*— 1986.— Vol. 32.— P. 481—494.
- Mathur S. N., Field F. J., Spector A. A., Armstrong M. L. // *Biochim. biophys. Acta.*— 1985.— Vol. 837.— P. 13—19.
- Moncada S. // *Atherosclerosis.*— 1982.— Vol. 2.— P. 193—207.
- Moncada S. // *Advanc. Prostagl. Thrombox. Leukotr. Res.*— 1985.— Vol. 15.— P. 507—512.
- Mullane K. M., Salmon J. A., Kraemer R. // *Fed. Proc.*— 1987.— Vol. 46.— P. 2422—2433.
- Nakao J., Ito H., Koshihara Y. et al. // *Advanc. Prostagl. Thrombox. Leukotr. Res.*— 1985.— Vol. 15.— P. 681—683.
- Rabinovich H., Durand J., Rigand M. et al. // *Lipids.*— 1981.— Vol. 16.— P. 518—524.
- Schafar A. I., Takayama H., Farrell S., Gimbrone M. A. Jr. // *Blood.*— 1986.— Vol. 67.— P. 373—378.
- Serneri G. G. N., McGiff J. C., Paoletty R., Born G. V. R. (Eds). // *Advanc. Prostagl. Thrombox. Leukotr. Res.*— 1985.— Vol. 13.— P. 28—32.
- Smith D. L., Willis A. L., Mahmudl. // *Prostagl. Leukotr. Med.*— 1984.— Vol. 16.— P. 1—10.
- Van Diest J., Verbueren T. J., Herman A. G. // *Prostaglandins.*— 1986.— Vol. 32.— P. 97—100.

Поступила 28.04.90

#### CONTENT OF MONOHYDROXYEICOSATETRAENIC ACIDS IN BLOOD OF PATIENTS WITH IMPAIRMENTS OF BRAIN CIRCULATION

A. G. Panosyan, O. N. Arakelyan, E. G. Saakyan, S. E. Akopov, A. V. Nazaryan, E. S. Gabrielyan

Institute of Medical Radiology, Ministry of Public Health of the Armenian SSR, Medical School, Yerevan

Content of 5-, 8-, 11-, 12- and 15-monohydroxyeicosatetraenic acids was markedly increased in blood of patients with cerebral atherosclerosis accompanied by discirculatory encephalopathy and brain infarction. These values were lower in the patients with infarction as compared with healthy people. After tourniquet ischemia of limbs concentration of the eicosatetraenic acids was altered in blood of patients:

in one group the concentration of all the lipoxigenase metabolites of arachidonic acid was increased, in the other group of patients it was decreased. Development of atherosclerosis appears to be related to activation of lipoxigenases and production of monohydroxyeicosatetraenic acids.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 618.3-06-07: [616.151.5+616.153.96

Э. М. Султанова, Ш. Г. Мухамедиева, Н. Ж. Сагдиев, О. А. Ключев, А. А. Хаджиметов, С. Н. Султанов, В. Е. Аваков, Ш. И. Салихов

## ПЕПТИДНЫЕ ЭНДОТОКСИНЫ И НАРУШЕНИЕ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА ПРИ ОСЛОЖНЕННОМ ТЕЧЕНИИ БЕРЕМЕННОСТИ

Институт биоорганической химии им. А. С. Садыкова АН Узбекской ССР, НИИ акушерства и гинекологии Минздрава Узбекской ССР, Ташкент

В последнее время в патогенезе многих заболеваний, сопровождающихся эндогенной интоксикацией, большое значение придается нарушениям системы гемостаза. Как правило, эти нарушения приводят к расстройствам в системе микроциркуляции, что отягощает течение патологического процесса. Работы, посвященные изучению факторов, влияющих на систему гемостаза, в частности эндогенных токсинов пептидной природы, немногочисленны и проводились с использованием суммарных фракций пептидов [3]. Цель настоящего исследования — выделение и идентификация пептидных фракций, влияющих на систему гемостаза, из плазмы больных с осложненным течением беременности — нефропатией, острой почечной недостаточностью (ОПН), гнойно-септическим состоянием.

**Методика.** Исследованы плазма крови беременных с нефропатией, преэклампсией, эклампсией, ОПН, гнойно-септическим состоянием, находившихся на лечении в отделении патологии беременности и отделении реаниматологии и анестезиологии НИИ акушерства и гинекологии Минздрава Узбекской ССР, и плазма крови больных, лечившихся в отделении реаниматологии и анестезиологии 1-й клиники Ташкентского медицинского института. Для выделения пептидов из плазмы крови на первоначальном этапе применен метод гелевой хроматографии на колонке с сефадексом G-25 [1]. Биологическую активность фракций определяли методом измерения агрегации тромбоцитов и методом тромбоэластографии [2]. Активные фракции разделяли на колонке с гелем Toyo Pearl HW-40 («Toyo soda», Япония). Фракции элюировали водой, доведенной аммиаком до pH 8,0, со скоростью 16,0 мл/мин. Фракцию Б-1 подвергали гидрофобной хроматографии на колонке с полихромом-1 («Олайн», СССР). Для элюирования пептидов увеличивали ступенчато концентрацию изопропанола в воде. N-концевые остатки определяли по методу Грея [4]. Аминокислотный анализ пептида проводили в стандартных условиях на аминокислотном анализаторе Biotronic LC 7000. Определение массы пептида осуществляли на жидкостном хроматографе высокого давления «Kratos 4S».

**Результаты и обсуждение.** Анализ элюционных диаграмм разделения плазмы крови больных с нарушением функции почек и септическим состоянием и плазмы здоровых доноров обнаружил значительные различия. В плазме больных в значительных количествах присутствовали пептиды с мол. м. от 500 до 5000 Да (рис. 1).

При анализе элюционных диаграмм не установ-

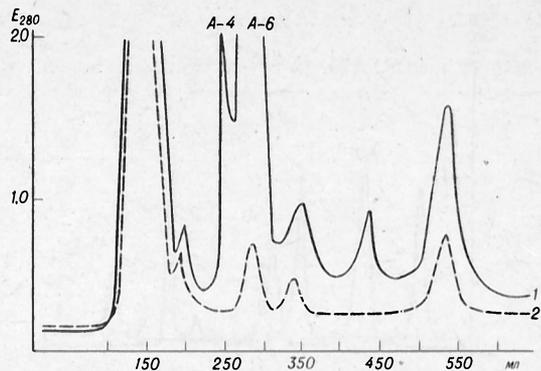


Рис. 1. Гель-хроматография плазмы крови больных с ОПН (1) и плазмы крови доноров (2).

Сефадекс G-25 в 0,01 М натрий-ацетатном буфере pH 6,7, колонка 2,5×100 см, скорость элюции 25 мл/ч. А-4, А-6 — физиологически активные фракции.

лено значительных различий при гель-фильтрации плазмы больных с нарушением функции почек и гнойно-септическим состоянием с акушерской патологией и больных контрольной группы.

Для идентификации фракций, влияющих на свертывающую систему, было исследовано действие всех фракций, выделенных из плазмы больных и здоровых доноров, на параметры тромбоэластограммы (ТЭГ) и агрегацию тромбоцитов. На состояние системы гемостаза, если его оценивать по интегральным показателям ТЭГ, влияли 2 фракции пептидных эндотоксинов, выделенных из плазмы больных всех групп. Фракции пептидов из плазмы здоровых доноров заметно действия не оказывали. Фракция А-4, особенно выраженная в плазме больных с кровотечениями и нарушениями функции почек, вызывала изменение параметров ТЭГ в сторону гипокоагуляции (см. таблицу). При исследовании влияния фракции А-4 на АДФ-стимулирующую агрегацию тромбоцитов было показано, что пептиды из нее вызывают угнетение агрегационной активности тромбоцитов, что проявляется в уменьшении максимальной агрегации тромбоцитов под воздействием индуктора агрегации АДФ.

Противоположный эффект вызывали пептиды из фракции А-6, которая присутствовала в плазме крови больных всех групп и отсутствовала в плазме крови доноров. Фракция А-6 вызывала снижение показателя  $\gamma + K$  ТЭГ (что свидетельствует об уменьшении времени свертывания крови), т. е. состояние хронометрической гиперкоагуляции. Наблюдалось также увеличение показателя  $mA$  ТЭГ, что свидетельствует об увеличении структурных свойств сгустка, т. е. отражает увеличение агрегационной активности тромбоцитов.

С целью получения в гомогенном состоянии

### Состояние системы свертывания крови по показателям тромбоэластограммы

Фракции пептидов	г, мин	К, мл	mA, мм	ИТН, усл. ед.
Норма	11,8±0,8 =2,04	8,7±0,7 =1,9	43,2±1,9 =4,6	9,35±1,3 =3,6
А-4	13,8±0,6 =1,3	12,2±0,4 =0,8	38,4±0,9 =2,1	5,2±2,1 =3,2
А-6	8,2±0,8 =1,8	5,7±0,5 =1,2	50,7±0,8 =2,1	18,4±2,2 =3,2

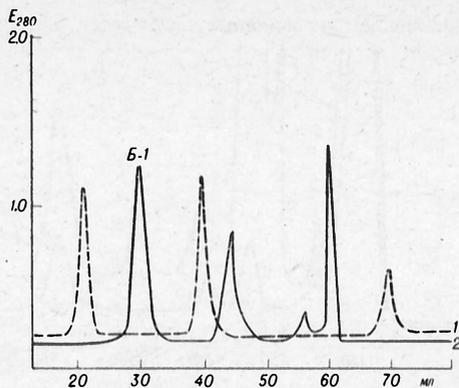


Рис. 2. Хроматография фракций А-4 (1) и А-6 (2) на геле Тоуо Pearl HW-40 в воде при pH 8,0, колонка 1×60 см, скорость элюции 18 мл/ч.

пептидов, ответственных за обнаруженные эффекты, фракции А-4 и А-6 были разделены на колонке с гелем Тоуо Pearl HW-40 (рис. 2). После разделения фракции А-4 функциональная активность не сохранилась, а при разделении фракции А-6 она была обнаружена во фракции Б-1. Фракцию Б-1 подвергали гидрофобной хроматографии на колонке с полихромом 1 (рис. 3). При элюировании 50% изопропанолом был получен гомогенный пептид, сохраняющий гиперкоагуляционные свойства. При определении N-концевого аминокислотного остатка пептида обнаружены только дансильные производные ε-лизина и о-тирозина. Пептид имеет мол. м. 2112 Да. Аминокислотный состав пептида представлен следующими аминокислотами: Asp — 2,01, Thr — 1,00, Ser — 1,15, Glu — 2,20, Pro — 0,93, Gly — 1,08, Ala — 1,13, Val — 0,97, Met — 0,85, Ile — 0,75, Leu — 1,20, Tyr — 0,87, Phe — 0,85, His — 0,45, Lys — 1,25, Arg — 0,69.

Таким образом, из плазмы крови больных с нарушениями функции почек и гнойно-септическим состоянием выделен гомогенный пептид, функциональная активность которого проявляется в индукции АДФ-зависимой агрегации тромбоцитов, что выражается в гиперкоагуляционных нарушениях системы гемостаза.

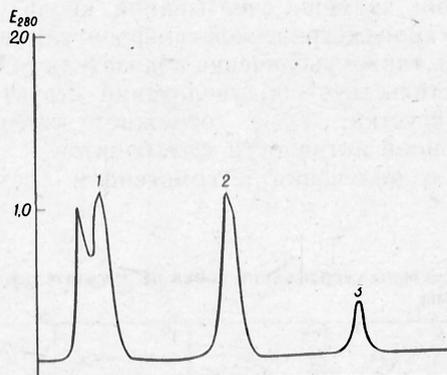


Рис. 3. Гидрофобная хроматография фракции Б-1 на колонке с полихромом-1 в ступенчатом градиенте изопропанола. Колонка 1×10 см, скорость элюции 40 мл/ч. Изопропанол: 1 — 5%; 2 — 50%; 3 — 70%.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Садыков А. С., Салихов Ш. И., Мухамедиева Ш. Г. и др. // Бюл. exper. биол.— 1984.— № 8.— С. 248.
2. Born G. V. R. // Nature.— 1962.— Vol. 194.— P. 927.
3. Gallice P., Fournier N., Crevat A. et al. // Biomed. exp.— 1980.— Vol. 33, N 6.— P. 185—188.
4. Gray W. R. // Meth. Enzymol.— 1967.— Vol. 1.— P. 463—475.

Поступила 16.02.90

## PEPTIDE ENDOTOXINS AND IMPAIRMENT OF THE HEMOSTASIS SYSTEM IN ABNORMAL DEVELOPMENT OF PREGNANCY

E. M. Sullanova, Sh. G. Mukhamedieva, N. Zh. Sagdiev, O. A. Klyuev, A. A. Khadzhimetov, S. N. Sultanov, V. E. Avakov, Sh. I. Salikhov

Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the Uzbek SSR, Institute of Obstetrics and Gynecology, Ministry of Public Health of the Uzbek SSR, Tashkent

Peptide fractions, affecting the state of the hemostasis system, were isolated from blood plasma of patients with abnormal development of pregnancy. The functional activity of homogenous peptide preparation was expressed as induction of ADP-dependent thrombocytes aggregation.

© Г. А. БОЯРИНОВ, Н. Н. АНДРЕЕВА, 1991

УДК 616.127-005.4-092.9-02:615.832.9]-07-616.127-008.939.15-074

Г. А. Бояринов, Н. Н. Андреева

## ИЗМЕНЕНИЯ ЖИРНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ФОСФОЛИПИДОВ МИОКАРДА ПОСЛЕ ГИПОТЕРМИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ

ЦНИЛ медицинского института им. С. М. Кирова, Нижний Новгород

Послеоперационная острая сердечная недостаточность как следствие интраоперационного ишемического повреждения миокарда продолжает оставаться одной из основных причин летальности больных при кардиохирургических операциях [5].

Ишемия в этих условиях закономерно влечет за собой значительное уменьшение одного из основных компонентов мембран — фосфолипидов [11, 16, 17], что влияет на функционирование каналов ионной проницаемости, липидзависимых ферментов, встроенных в мембраны сердечной клетки [3]. По-видимому, снижению общего количества фосфолипидов в условиях дефицита кислорода предшествует изменение их жирнокислотного состава, т. е. степени насыщенности [4, 20], так как структурные модификации мембранных фосфолипидов рассматриваются сейчас как первичные ответы клетки на стресс [13].

В то же время известно, что гипотермическая защита миокарда является одним из эффективных способов повышения его устойчивости к ишемии при операциях на открытом сердце.

Однако сведения в литературе об изменении жирнокислотного состава различных фосфолипидов миокарда при ишемии и особенно в пост-ишемическом периоде после гипотермической защиты малочисленны, а патогенетические механизмы этих процессов до конца не выяснены.

В связи с вышеизложенным целью настоящей работы было исследование изменений жирнокислотного состава различных фосфолипидов миокарда в постишемическом периоде при охлаждении сердечной мышцы до 8—12 °С, ибо этот температурный режим, согласно ряду исследований [7], в значительной степени предупреждает структурные и метаболические повреждения кардиомиоцитов при выключении сердца из кровообращения.

**Методика.** Опыты проводили на беспородных крысах-самцах массой 180—200 г. Извлекали сердца под внутрибрюшинным нембуталовым наркозом (26 мг/кг). Сердца интактных крыс ( $n=17$ ) промывали 0,9 % раствором NaCl и брали на анализ. Сердца подопытных животных ( $n=11$ ) перфузировали оксигенированным раствором Krebsa — Хензелейта в течение 15 мин при 37 °С. Затем, моделируя тотальную ишемию миокарда, аорту пережимали зажимом на 90 мин. В период ишемии внутримышечную температуру поддерживали на уровне 8—12 °С. После этого осуществляли реперфузию при 37 °С в течение 90 мин и брали сердце на анализ. Миокардиальные липиды экстрагировали по методу [12]. Экстракт липидов в виде полоски наносили на тонкий слой силикагеля марки ЛС 5/40 МК, в состав которого входило 13 % гипса (фирма «Chemapol», ЧСФР). Разделение липидов на фракции проводили в системе хлороформ — метанол — вода (65:28:4), пятна различных фосфолипидов выявляли парами йода. Получение метиловых эфиров жирных кислот лизофосфатидилхолина (ЛФХ), сфингомиелина (СМ), фосфатидилсерина (ФС), фосфатидилхолина (ФХ), фосфатидилэтаноламина (ФЭ) проводили, как описано [2]. Метиловые эфиры жирных кислот разделяли на газовом хроматографе «Цвет-162» с ионизационно-пламенным детектором в стеклянной 2-метровой колонке, заполненной хроматином N-AW-DMCS (0,125—0,160 мм) + 4,5 % полидиэтиленгликольсукцината [1]. Разделение проводили в изотермическом режиме при температуре колонки 170 °С, испарителя — 220 °С. Скорость потоков газов: азот — 30 мл/мин, водород — 30 мл/мин. Идентифицировали метиловые эфиры жирных кислот пробы с помощью стандартов (фирма «Serva», ФРГ). Количественную оценку хроматограмм осуществляли методом нормализации путем измерения площадей пиков компонентов [9]. Статистическую достоверность различий оценивали методом Стьюдента.

**Результаты и обсуждение.** В результате проведенных исследований установлено, что в миокарде после гипотермической (8—12 °С) ишемии по сравнению с интактными сердцами индекс насыщенности (отношение суммы насыщенных кислот в процентах к сумме ненасыщенных кислот в процентах) увеличивается во всех фракциях фосфолипидов (см. таблицу).

Изменение процентного содержания отдельных жирных кислот различных фосфолипидов в опытной серии было неоднозначно (см. рисунок).

#### Индекс насыщенности различных фосфолипидов миокарда крыс

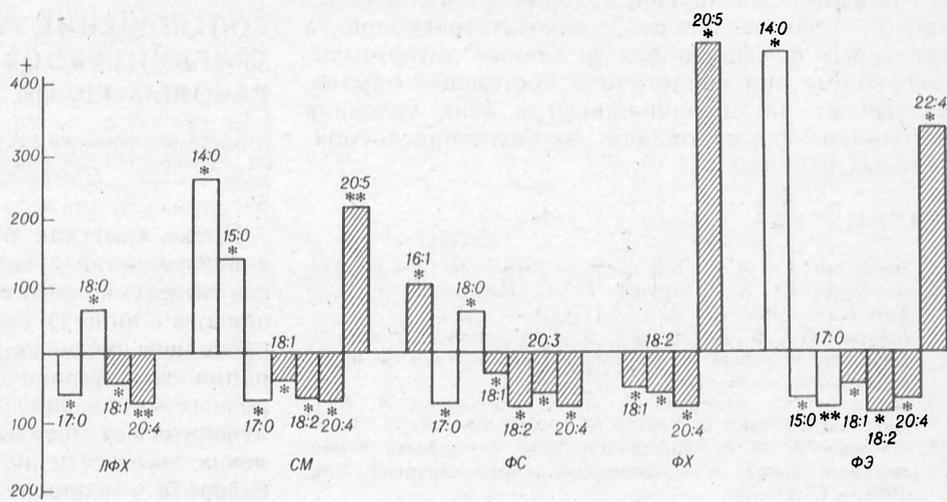
Фракция фосфолипидов	Контроль	Опыт
ЛФХ	0,91	1,5
СМ	1,6	2,1
ФХ	1,3	2,6
ФС	1,1	2,3
ФЭ	1,7	2,4

В ЛФХ достоверно уменьшилось по сравнению с интактными сердцами относительное количество гептадекановой (17:0), олеиновой (18:1), арахидоновой (20:4) кислот, увеличилось содержание стеариновой кислоты (18:0). В СМ уменьшилось процентное содержание ненасыщенных олеиновой, линолевой (18:2), арахидоновой кислот и насыщенной гептадекановой; увеличилось количество миристиновой (14:0), пентадекановой (15:0) и эйкозопентаеновой (20:5) кислот. В ФС в опытной серии наблюдалось снижение процентного содержания гептадекановой, олеиновой, линолевой, эйкозатриеновой (20:3) и арахидоновой кислот и увеличение количества пальмитоолеиновой (16:1), стеариновой кислот. В ФХ процент ненасыщенных кислот — линолевой, олеиновой, арахидоновой — снизился, а количество эйкозопентаеновой кислоты возросло. В жирнокислотном составе ФЭ миокарда после гипотермической ишемии выявлены следующие изменения: уменьшилось содержание пентадекановой, гептадекановой, олеиновой, линолевой, арахидоновой кислот и возросло процентное содержание миристиновой и докозатетраеновой (22:4) кислот.

Увеличение доли в ЛФХ и ФС стеариновой кислоты, а также миристиновой в СМ и ФЭ, пентадекановой в СМ при одновременном снижении процентного содержания олеиновой, линолевой, арахидоновой кислот практически во всех фракциях фосфолипидов миокарда в реперфузионном периоде, вероятно, свидетельствует о еще достаточно высокой активности фосфолипаз, так как, согласно исследованиям [4], увеличение в ЛФХ митохондрий сердца содержания пальмитиновой и стеариновой кислот и снижение количества арахидоновой и линолевой кислот после 1 ч тотальной ишемии вызвано расщеплением митохондриальных фосфолипидов миокарда фосфолипазой  $A_2$ . Вполне допустимо, что дальнейшая

Жирнокислотный состав фосфолипидов миокарда после гипотермической ишемии.

По оси ординат — содержание жирных кислот (в % от контроля). Светлые столбики — насыщенные жирные кислоты, заштрихованные — ненасыщенные жирные кислоты. Звездочка —  $p \leq 0,05$ .



биохимическая трансформация линолевой и арахидоновой кислот, освобожденных в результате гидролиза фосфолипидов фосфолипазой A<sub>2</sub>, в миокарде после гипотермической ишемии совершается по пути синтеза простагландинов [6, 14], которые, как показано [10, 18, 19], оказывают защитное действие при ишемических и стрессорных повреждениях сердца, влияя на многие важнейшие звенья метаболизма кардиомиоцитов.

Подтверждением предположения о возможной активации синтеза простагландинов в миокарде в период реперфузии как о адаптационной реакции могут служить данные о полном и быстром восстановлении сократительной функции сердечной мышцы в период реперфузии после охлаждения миокарда до 8—12 °С в аналогичных условиях [8].

Повышение относительного количества эйкозапентаеновой, докозатетраеновой и пальмитоолеиновой кислот в отдельных фракциях фосфолипидов при отсутствии этих кислот в перфузате, по-видимому, обеспечивается за счет эндогенных источников. Полученные данные позволяют предположить, что в миокарде после гипотермической ишемии наряду с процессами деградации фосфолипидов с помощью ацилтрансфераз осуществляется и их ресинтез из лизоформы и свободных жирных кислот.

Возможно, предполагаемое реацилирование фосфолипидов в постишемическом миокарде после гипотермической ишемии является тем механизмом, который обеспечивает в кардиомиоцитах оптимальное содержание лизофосфолипидов и свободных жирных кислот, и, следовательно, способствует поддержанию необходимой активности мембранных энзимов для нормального функционирования сердечных клеток. Подтверждением данного тезиса являются сведения [8] о повышении в сердечной мышце в реперфузионном периоде после гипотермической ишемии активности Ca<sup>2+</sup> и K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>=АТФаз.

Таким образом, через 90 мин реперфузии после гипотермической (8—12 °С) ишемии в ткани миокарда возрастает индекс насыщенности фосфолипидов. При этом во всех фракциях фосфолипидов уменьшается содержание олеиновой, линолевой и арахидоновой кислот, что может свидетельствовать о фосфолипазном механизме повреждения мембран кардиомиоцитов. Однако возможный синтез из этих жирных кислот простагландинов, увеличение содержания полиеновых кислот — эйкозапентаеновой, докозатетраеновой в некоторых фосфолипидах и данные литературы, полученные при аналогичной постановке опытов, указывают на сохранившиеся в этих условиях источники формирования защитно-приспособительных реакций.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Богдарин Ю. А. // Лаб. дело.— 1979.— № 2.— С. 121.
2. Богдарин Ю. А., Бояринов Г. А., Горбунова Л. Б. // Там же.— 1982.— № 9.— С. 17—19.
3. Бурлакова Е. Б., Архипова Г. В., Голощапов А. И. и др. // Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии.— М., 1982.— С. 74—83.
4. Дагис А. С., Толейкис А. И., Прашкявичюс А. К. // Бюл. экпер. биол.— 1985.— № 1.— С. 43—45.
5. Дворцин Г. Ф. // Защита миокарда от ишемии в экспериментальной и клинической кардиохирургии.— М., 1984.— С. 1—73.

6. Демурув Е. А., Игнатова В. А. // Метаболические и нейрогуморальные механизмы ишемических повреждений миокарда.— М., 1985.— С. 104—116.
7. Мальцев Ю. И. // Труды кафедры хирургических болезней № 1 и межобластного кардиохирургического центра.— Челябинск, 1986.— С. 5—16.
8. Мухина И. В., Контрощикова К. Н. и др. // Российская респ. науч.-практ. конф.— Новосибирск, 1987.— С. 81.
9. Столяров Б. В., Савинов И. М., Витенберг А. Г. Руководство к практическим занятиям по газовой хроматографии.— 2-е изд.— Л., 1978.
10. Araki H., Lefer A. M. // Fed. Proc.— 1980.— Vol. 39.— P. 1003.
11. Chien K. R., Han A., Sen A. et al. // Circulat. Res.— 1984.— Vol. 54.— P. 313—322.
12. Folch J., Lees M., Stanley G. S. // J. biol. Chem.— 1957.— Vol. 226.— P. 497.
13. Guy A. T. // Biochem. Cell Biol.— 1986.— Vol. 64.— P. 66—69.
14. Hohl C. M., Rosen P. // Biochim. biophys. Acta: Lipids and Lipid Metab.— 1987.— Vol. 2.— P. 356—363.
15. Injanle J. P. // Molec. Cell. Biochem.— 1987.— Vol. 2.— P. 111—116.
16. Katz A. M. // Ibid.— 1982.— Vol. 14.— P. 627—632.
17. Lochner A., Victor T., la Cock C. // J. molec. cell. Cardiol.— 1983.— Vol. 15, Suppl. 3.— P. 10.
18. Mest H.-J. // Z. klin. Med.— 1987.— Bd 2.— S. 103—104.
19. Nayler W. G., Purchase M., Dusting G. J. // Basic Res. Cardiol.— 1984.— Vol. 79.— P. 125—134.
20. Shaikh N. A., Downar E. // Circulat. Res.— 1981.— Vol. 49.— P. 316.

Поступила 20.07.88

#### ALTERATIONS IN MYOCARDIAL PHOSPHOLIPIDS FATTY ACID COMPOSITION AFTER HYPOTHERMIC ISCHEMIA

G. A. Boyarinov, N. N. Andreeva

Central Research Laboratory, Medical School, Gorki.

Index of phospholipids saturation was increased in myocardium within 90 min reperfusion after hypothermic (8-12°) ischemia. Content of oleic, linoleic and arachidonic acids was decreased in all the phospholipid fractions studied thus suggesting that phospholipase mechanism was involved in cardiomyocyte membranes impairment. However, mechanisms of adaptation-protective reactions were maintained as synthesis of prostaglandins from these fatty acids was possible and amount of polyenic acids (eicosapentaenic, dokosatetraenic acids) was increased in some phospholipids. Data of literature corroborated this suggestion.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 612.123:547.922]:1612.123:547.426.23].08:572.9(729.1)

П. И. Кальсинес, О. Л. Г. Гонсалес, О. Калельё, Ф. А. Армас, М. Родригес, И. П. Смирнова, Т. Т. Березов

#### СООТНОШЕНИЕ УРОВНЕЙ ХОЛЕСТЕРИНА И ТРИГЛИЦЕРИДОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ У РАСОВЫХ ГРУПП НА КУБЕ

Высший медицинский институт, Санта-Клара, Республика Куба, Университет Дружбы народов им. Патриса Лумумбы, Москва

После того как были получены убедительные доказательства существования прямой зависимости между количеством абсорбированного (введенного с пищей) холестерина и его синтезом [6], проведены более широкие исследования концентрации холестерина в биологических жидкостях разных этнических групп людей в надежде, что полученные результаты будут способствовать выявлению сущности и механизма развития атеросклероза у человека.

Относительная концентрация триглицеридов и холестерина в плазме крови доноров различных групп

Группа доноров	Расовые группы			
	белая		негроидная	
	число обследованных	% к общему числу доноров	число обследованных	% к общему числу доноров
Нормохолестеринемия с нормотриглицеридемией (контроль)	130	43	54	55
Нормальные показатели холестерина + гипертриглицеридемия	49	16	9	9
Гипохолестеринемия + нормальные показатели триглицеридов	64	21	22	22
Гипохолестеринемия + гипертриглицеридемия	9	3	8	8
Гиперхолестеринемия + нормотриглицеридемия	25	8	2	2
Гиперхолестеринемия + гипертриглицеридемия	22	7	3	3

На содержание липидов и холестерина в плазме крови оказывает влияние множество факторов, в том числе ряд генетических факторов [9, 10], определяя тем самым риск развития сердечно-сосудистой патологии у различных групп населения.

Отмеченные в данной работе различия в липидном обмене в обеих расовых группах, вероятно всего, связаны со структурными изменениями белковой части липопротеидов, хотя прямых экспериментальных доказательств этого положения нет. Однако следует отметить, что на Кубе фактор питания не имеет существенных различий для всего населения, поэтому он, по-видимому, не оказывает заметного влияния на различия в липидном обмене между обеими группами.

При генетических биометрических исследованиях было установлено, что имеются существенные различия в переменной количественных фенотипов между отдельными индивидуумами и это обусловлено тем обстоятельством, что существуют полигенные различия у индивидуумов [3].

Результаты, суммированные в табл. 2, свидетельствуют, что большое количество полигенов оказывает небольшое независимое и аддитивное влияние на фенотип индивидуумов каждой расовой группы. Это не исключает возможности существования других генетических факторов и дифференциальных модификаторов у каждой расовой группы.

Можно полагать, что существующие различия между представителями негроидной и белой расовых групп связаны с определенными структурными изменениями белковой части липопротеидов и, возможно, определяют особенности появления заболеваний сердца у лиц различных расовых групп.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Allan C. A. et al.* // Clin. Chem.— 1974.— Vol. 20.— P. 470.
2. *Bergmeyer H. V., Wahlged A. W.* // Methods of Enzymatic Analysis.— New York, 1974.— P. 1831—1835.
3. *Boerwinkle E., Sing F.* // Ann. hum. Genet.— 1987.— Vol. 51.— P. 211.

Учитывая эти обстоятельства, а также официальное предписание о необходимости и целесообразности определения сыровоточного холестерина у всех людей на Кубе [8], в данной работе была поставлена задача провести сравнительное исследование не только концентрации холестерина, но и уровня триглицеридов в сыровотке крови доноров с целью получения данных о связи между концентрацией холестерина и триглицеридов, с одной стороны, и поражениями сердечно-сосудистой системы, с другой, у разных расовых групп, существующих на Кубе.

**Методика.** Исследовали плазму крови 397 доноров, из которых 299 принадлежали к группе белой расы и 98 — к негроидной группе (мулаты и негры). В плазме крови определяли общий холестерин [1] и общие триглицериды по методу [2] с использованием прибора «Sigma» (Республика Куба). В качестве антикоагулянта применяли гепарин, плазму отделяли центрифугированием. По результатам исследования содержание в плазме крови общих триглицеридов (норма 0,35—1,7 ммоль/л) и общего холестерина (норма 3,8—5,7 ммоль/л) исследуемые доноры были разделены на 3 группы: группа доноров с нормальными показателями указанных величин (нормотриглицеридемия и нормохолестеринемия); группа доноров с уровнем показателей ниже нормы (гипохолестеринемия и гипотриглицеридемия) и группа доноров с уровнем холестерина и общих триглицеридов выше нормы (гиперхолестеринемия и гипертриглицеридемия). Для статистического анализа результатов использовали критерий Стьюдента [4].

**Результаты и обсуждение.** Как видно из результатов определения общих триглицеридов в плазме крови, существенных различий между расовыми группами не выявлено. Следует, однако, отметить, что 20—27 % здорового населения имело повышенный уровень содержания триглицеридов в плазме крови (табл. 1). Также не было выявлено значительных различий между группами с нормохолестеринемией и гипохолестеринемией в обеих расовых группах. В тоже время обнаружено больше людей с гиперхолестеринемией в группе белой расы ( $p < 0,005$ ) по сравнению с негроидной группой.

Рядом авторов на Кубе [5] отмечалась существенность генетических факторов и факторов внешней среды (или обоих одновременно) на обмен липидов. В этом аспекте несомненный интерес могут представить данные о связи между факторами риска заболеваний сердца и генетическими различиями. Для Кубы этот вопрос имеет большое теоретическое и практическое значение, поскольку существует большая генетическая гетерогенность рас [7].

Таблица 1

Относительная концентрация триглицеридов и холестерина в плазме крови доноров различных расовых групп

Группа доноров	Расовые группы				
	белая		негроидная		
	число обследованных	% к общему числу доноров	число обследованных	% к общему числу доноров	
Нормотриглицеридемия	219	73	78	80	1,25
Гипертриглицеридемия	80	27,6	20	20	1,25
Нормохолестеринемия	179	60	63	64	0,774
Гипохолестеринемия	73	24	30	31	1,21
Гиперхолестеринемия	47	16	5	5	2,704

4. Fisher R. A. // Statistical Methods for Research Workers. — 14-th Ed. — Edinburgh, 1970.
5. Friedlander Y., Kark J. D., Stein Y. // Hum. Hered. — 1986. — Vol. 36. — P. 143.
6. Grundy S. M., Ahrens E. H. Jr., Davignon J. // J. Lipid Res. — 1969. — Vol. 10. — P. 304.
7. Hidalgo P. C., González O. L., Rodríguez M. et al. // Medicentro. — 1987. — Vol. 3, N 2. — P. 149.
8. Medicamentos y terapéuticos. — 1987. — P. 46—47.
9. Sing Ch., Davignon F. // Amer. J. hum. Genet. — 1985. — Vol. 37. — P. 268.
10. Talmud P. J., Barni N., Kesshing A. M. et al. // Atherosclerosis. — 1987. — Vol. 67. — P. 81.

Поступила 06.10.89

#### RELATION BETWEEN CHOLESTEROL AND TRIGLYCERIDES CONTENT IN BLOOD PLASMA OF VARIOUS RACE GROUPS IN CUBA

P. I. Kalsines, O. L. G. Gonsales, O. Kale'lo, F. A. Armas, M. Rodrigues, I. P. Smirnova, T. T. Berezov

High Medical School, Saint-Clara, Republic Cuba, P. Lumumba People's Friendship University, Moscow

Content of cholesterol and total triglycerides was studied in blood plasma of 397 healthy volunteers, 299 of which belonged to white race and 99 persons — to negroid race (mulatto and negroes). Distinct variations were not found in content of total triglycerides in these both groups. However, statistically significant dissimilarity was detected in distribution of hypercholesterolemia as compared with normocholesterolemia and normotriglyceridemia, hypocholesterolemia — with hypertiglyceridemia and hypercholesterolemia — with normotriglyceridemia in race groups. The same analysis should be performed in "mixed race group" which constitutes the main population of Cuba.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616.33-002.44-07:[616.33-018.73-018.1:576.311.344]-008.931:577.152.3

И. Р. Бияшева, Г. Ю. Мальцев, В. В. Пустовойтов, Т. И. Лоранская

#### ИССЛЕДОВАНИЕ СИСТЕМЫ АНТИОКСИЛИТЕЛЬНОЙ ЗАЩИТЫ И АКТИВНОСТИ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ГИДРОЛАЗ В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ЖЕЛУДКА ПРИ ЯЗВЕННОЙ БОЛЕЗНИ

Институт питания АМН СССР, Москва

Развитие язвенной болезни сопровождается, как известно, интенсификацией процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [9, 12, 15]. Это приводит, в частности, к повреждению структурных компонентов клетки, где наиболее чувствительны к воздействию продуктов ПОЛ лизосомы, отличительной характеристикой которых является однослойная фосфолипидная мембрана [14]. В свою очередь процесс язвообразования в слизистой оболочке желудка (СОЖ) непосредственно связан со структурно-функциональным состоянием лизосомального аппарата [8, 13]. Поскольку интенсивность процессов ПОЛ в значительной степени определяется состоянием антиокислительной защиты организма и его обеспеченностью антиоксидантами [11], в настоящей работе была поставлена задача исследовать взаимосвязь уровня ПОЛ, активности и содержания отдельных компонентов антиокислительной защиты в сыворотке крови и активности лизосомальных гидролаз в СОЖ у больных язвенной болезнью.

Методика. Обследовано 96 пациентов в периоде обострения заболевания в возрасте от 14 до 74 лет. 19 больных страдали хроническим эрозивным, 18 — атрофическим гастритом, 21 — язвенной болезнью желудка, 38 — язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки. Продолжительность заболевания была от 1 года до 30 лет. Диагноз устанавливали на основании данных анамнеза и результатов общепринятых клинических, лабораторных, рентгенологических, эндоскопических исследований. Контрольная группа состояла из 15 практически здоровых мужчин-добровольцев.

Активность глутатионпероксидазы (КФ 1.11.1.9) в гемолизатах эритроцитов определяли по скорости окисления НАДФ-Н в глутатионредуктазной реакции, сопряженной с восстановлением гидроперекиси, и выражали в наномолях НАДФ на 1 мг эритроцитарного белка в 1 мин [23].

Диеновую конъюгацию в эритроцитах определяли спектрофотометрическим методом [7]. Взвес клеточного материала растирали в гомогенизаторе, используя смесь изопропанол — гептан в соотношении 1:1 (объем — объем). Гомогенат центрифугировали, аликвоту верхнего гептанового слоя высушивали в вакуумном эксикаторе, после чего разводили в метаноле и измеряли при длине волны 233 нм. Содержание диеновых конъюгатов выражали в условных единицах оптической плотности на 1 мл эритроцитарной смеси.

Содержание витаминов А и Е определяли флюориметрически при длине волны возбуждения 340 и 480 нм и длине волны флюоресценции 295 и 340 нм соответственно [28]. Расчет проводили по отношению к флюоресценции стандартов и выражали в микрограммах на 1 дл сыворотки. Полученные результаты представлены в виде частот отклонения от верхней и нижней границ нормы [4].

В биоптатах, полученных из антрального отдела желудка определяли активность 3 лизосомальных гидролаз — катепсина D (КФ 3.4.23.5), катепсина С (КФ 3.4.14.1) и катепсина L (КФ 3.4.22.15) с помощью спектрофотометрических и спектрофлюориметрических методов [5, 6, 20], используя в качестве субстратов гемоглобин, глифен-L-β-нафтиламид и N-КБЗ-фен-арг-7-амидо-4-метилкумарин (\*Sigma, США) соответственно. Содержание белка определяли по методу Лоури.

Результаты и обсуждение. В таблице представлены результаты, характеризующие состояние антиоксидантной защиты организма при гастритах, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки. Прежде всего следует отметить резкое увеличение активности глутатионпероксидазы эритроцитов во всех обследованных нозологических группах. Данный эффект может расцениваться как компенсаторный, поскольку увеличение радикалообразования из-за локальных ишемических изменений является одним из закономерных факторов патогенеза язвообразования [9, 26]. В этой связи заслуживает внимания выявленный факт недостаточности антиоксидантов, в частности α-токоферола. Как видно, у 64—90 % больных отмечалось снижение уровня α-токоферо-

#### Активность глутатионпероксидазы и содержание диеновых конъюгатов, витаминов А и Е в сыворотке крови гастроэнтерологических больных

Диагноз	Глутатионпероксидаза, нмоль НАДФ за 1 мин на 1 мг белка эритроцитов	Диеновые конъюгаты, усл. ед. на 1 мл эритроцитов	α-Токоферол	Ретинол
			частота значений ниже нормы	
Гастрит	96,7±38,6	1,2±0,3	0,87*	0,67*
Язвенная болезнь: желудка	84,5±19,7	1,3±0,7	0,64*	0,64*
	двенадцатиперстной кишки	110,5±16,3*	1,2±0,34	0,90*
Контроль	51,5±7,9	0,95±0,2	—	—

Примечание. Звездочка — различия достоверны по t-критерию и по критерию для 2-биномиальных распределений с уровнем значимости, равным 5 %.

ла в сыворотке. Установлены аналогичные, но менее выраженные изменения содержания в сыворотке крови ретинола. Случаев увеличения уровня  $\alpha$ -токоферола и ретинола относительно нормы при этом практически не отмечалось. Вместе с тем остается открытым вопрос, является ли недостаточность антиоксидантов результатом их интенсивного расхода или нарушения их всасывания.

Достоверных изменений в содержании продуктов ПОЛ — диеновых конъюгатов — не отмечено, однако наличие значительной дисперсии данных по уровню диеновых конъюгатов у больных язвенной болезнью желудка коррелирует у них с менее выраженной компенсаторной реакцией со стороны глутатионпероксидазной системы и уровнем  $\alpha$ -токоферола и ретинола. Возможно, что данной ситуации отвечает хронизация язвенного процесса, сопровождающаяся, как правило, более глубокими деструктивными изменениями СОЖ.

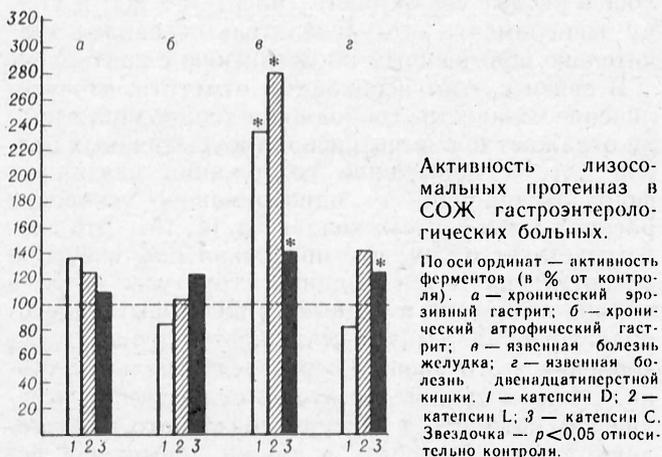
В этом аспекте привлекают внимание результаты исследования активности комплекса лизосомальных протеолитических ферментов в СОЖ при исследованных заболеваниях (см. рисунок). Если при гастритах отмечается лишь тенденция к увеличению активности катепсинов D, L и C на 19—36% ( $p < 0,05$ ), то у больных язвенной болезнью желудка активность катепсинов D и L значительно превышала нормальные значения (в 2,4 и в 2,8 раза соответственно), а при язвенной болезни двенадцатиперстной кишки изменения были менее существенны. Создается впечатление, что в процессе хронизации язвенной болезни происходит активация комплекса лизосомальных эндопептидаз, очевидно, связанная с развитием деструктивных процессов в СОЖ. Примечательно, что как при эрозивном, так и при атрофическом гастрите не выявлено существенных изменений активности катепсинов C и L, а активность катепсина D, одной из наиболее мощных лизосомальных эндопептидаз, содержащейся в СОЖ в высоких концентрациях [16, 21, 24], была даже несколько ниже нормы. Таким образом, можно с достаточной определенностью заключить, что существенными биохимическими компонентами патогенеза язвенной болезни является усиление процессов радикалообразования, сопровождающихся компенсаторной мобилизацией системы антиокислительной защиты крови и расходом антиоксидантов. В случае хронизации заболевания имеет место снижение компенсаторных возможностей антиоксидантной системы, как это отмечалось при

язвенной болезни желудка, и одновременное усиление процессов деструкции СОЖ, подтверждением чего является увеличение активности комплекса лизосомальных эндопептидаз лизосом. Полученные результаты согласуются с имеющимися экспериментальными данными о медиаторной роли продуктов ПОЛ в развитии повреждений СОЖ и структурно-функциональных изменений лизосомального аппарата энтероцитов при ulcerогенных воздействиях [10, 13]. Вместе с тем остается открытым вопрос о последовательности проявления указанных биохимических нарушений в СОЖ при язвенной болезни. Ряд авторов отводят триггерную функцию в деструктивных процессах продуктам перекисного окисления, снижению синтеза простагландинов E [17, 19] и дисбалансу в содержании цАМФ и цГМФ [18, 27], поскольку эти факторы приводят к глубоким структурным изменениям клеточных мембран [22].

В свою очередь имеются сведения, что изменения активности лизосомальных протеиназ после ulcerогенного воздействия характеризуются определенной динамикой и предшествуют во времени развитию видимых повреждений слизистой оболочки [1—3]. В совокупности изложенные результаты свидетельствуют о существовании причинной связи между факторами, дестабилизирующими клеточные и лизосомальные мембраны, и активностью гидролитических ферментов лизосом в развитии язвенных поражений СОЖ.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Амиров Н. Ш., Белостоцкий Н. И. // Бюл. exper. биол. — 1987. — № 10. — С. 445—448.
2. Амиров Н. Ш., Белостоцкий Н. И. // Там же. — 1982. — № 11. — С. 17—19.
3. Амиров Н. Ш., Трубицына И. Е. // Там же. — № 9. — С. 55—57.
4. Афифи А., Эйзен С. Статистический анализ: подход с использованием ЭВМ. — М., 1982.
5. Баррет А. Дж., Хит М. // Лизосомы: методы исследования / Под ред. Дж. Дингла: Пер. с англ. — М., 1980. — С. 25—156.
6. Васильев А. В., Капелевич Т. А., Тутельян В. А. // Вопр. мед. химии. — 1983. — № 3. — С. 127—130.
7. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М., 1972.
8. Дзодзуашили В. У. // Вопр. мед. химии. — 1988. — № 2. — С. 46—49.
9. Звершхановский Ф. А., Вайнштейн С. Г. // Врач. дело. — 1987. — № 9. — С. 42.
10. Иванов Г. Г., Шелкогонов М. А. // Тер. арх. — 1983. — № 2. — С. 86—87.
11. Литинская Э. В. // Врач. дело. — 1989. — № 8. — С. 70.
12. Мараховский Ю. X. // Современные аспекты практической гастроэнтерологии. — Рига, 1986. — С. 28—38.
13. Пасечников В. Д. // Вопр. мед. химии. — 1989. — № 3. — С. 51—54.
14. Покровский А. А., Тутельян В. А. Лизосомы. — М., 1976.
15. Теоретические и клинические аспекты науки о питании: Методы оценки обеспеченности населения витаминами. — М., 1987.
16. Bando I., Kominami E., Katunuma N. // J. Biochem. — 1986. — Vol. 100. — P. 35—42.
17. Fergusson W., Starling I. R., Edmonds A. W. // Ann. Surg. Forum. — 1972. — Vol. 23. — P. 380—382.
18. Hatt J. F., Hanson P. I. // Biochem. J. — 1988. — Vol. 255, N 3. — P. 789—794.
19. Iasunari K. et al. // J. Hypertens. — 1988. — Vol. 6, N 12. — P. 1023—1028.
20. Kizchke H. // Proteinases in Mammalian Tissues and Cells. — Halle, 1982. — P. 125—128.
21. Kominami E., Tsukahara T., Bando I. et al. // J. Biochem. — 1985. — Vol. 98. — P. 87—93.
22. Massey T. H. // Clin. Chem. — 1985. — Vol. 31, N 1. — P. 70—75.



23. Mills G. // J. biol. Chem.— 1959.— Vol. 234.— P. 502—506.
24. Muto N., Yamamoto K., Tani S. et al. // J. Biochem.— 1988.— Vol. 103.— P. 629—632.
25. Perry M. A., Wadhwa S., Parks D. A. et al. // Gastroenterology.— 1986.— Vol. 90, N 2.— P. 362—367.
26. Smith S. M., Kvietyls P. R. // Crit. Care Med.— 1988.— Vol. 16, N 9.— P. 892—898.
27. Varis K., Raij K., Hartonen M. et al. // Scand. J. Gastroent.— 1988.— Vol. 23, N 9.— P. 1025—1034.
28. Zelan G., Norvick W. I. // Amer. J. clin. Path.— 1969.— Vol. 4.— P. 51.

Поступила 11.10.90

## THE ANTIOXIDANT SYSTEM AND LYSOSOMAL HYDROLASES ACTIVITY IN GASTRIC MUCOSAL MEMBRANE IN ULCER

I. R. Bigasheva, G. Yu. Maltsev, V. V. Pustovoitov, T. I. Loranskaya

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

A state of blood antioxidant system and patterns of destructive processes in gastric mucosal membrane were studied under conditions of various gastroenterological diseases. Compensatory activation of glutathione peroxidase in erythrocytes and increased consumption of  $\alpha$ -tocopherol and retinol were observed in these pathological forms. These alterations became less distinct during chronic development of gastric ulcerous disease simultaneously with elevation of destructive processes in gastric mucosal membrane as lysosomal endopeptidases were stimulated.

© Е. Г. БУТОЛИН, П. Н. ШАРАЕВ, 1991

УДК 616.132-018.2-008.9-02: [615.357:577.175.652]-092.9

Е. Г. Бутолин, П. Н. Шараев

## ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОБМЕНА БИОПОЛИМЕРОВ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ ПРИ ЦЕНТРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ АНГИОТЕНЗИНА II

Ижевский медицинский институт

Анализ возможных физиологических и биохимических эффектов пептидов позволяет констатировать, что они играют существенную роль в реализации различных функций организма. Показано, что наиболее физиологически активными веществами являются олигопептиды [3, 13, 16]. В этом отношении интерес представляет ангиотензин II — один из самых мощных прессорных агентов, обуславливающих возникновение эссенциальной гипертензии [6]. Введение ангиотензина II в структуры мозга повышает также секрецию в кровь АКТГ, кортикостерона и катехоламинов [8, 14]. Артериальная гипертензия и повышение концентрации гормонов в крови, вызванное этим пептидом, могут привести к биохимическим и структурным сдвигам в стенке сосудов, а также во внутренних органах, в том числе и изменениям обмена биополимеров соединительной ткани. Сказанное выше позволяет предположить, что ангиотензин II принимает участие в регуляции обмена соединительной ткани.

Целью данной работы было изучение влияния ангиотензина II на обмен биополимеров соединительной ткани в аорте и содержание кортикостероидных гормонов в периферической крови у

кроликов при длительном введении указанного пептида в различные структуры мозга.

Методика. Хронические опыты проведены на 40 половозрелых кроликах породы шиншилла массой 2,5—3,5 кг. Опытным и контрольным животным по координатам атласа мозга [1] с помощью стереотаксического прибора вживляли канюли в левой боковой желудок мозга (AP=—1; S=2,7; V=1,5) (9 кроликов) и вентромедиальное ядро гипоталамуса (AP=—1; D=0,7; V=5,0) (8 кроликов). Локальное введение ангиотензина II в дозе 150 нг производили через день в течение 30 дней с помощью микроинъектора в 10 мкл физиологического раствора. В качестве контроля (по 8 кроликов в каждой серии) использовали животных, которым в вышеуказанные структуры мозга в течение 30 дней вводили 10 мкл физиологического раствора, а также 7 интактных кроликов. В конце эксперимента их забивали воздушной эмболией на фоне кратковременного эфирного наркоза. Точность попадания канюль в боковой желудочек мозга и вентромедиальное ядро гипоталамуса определяли гистологически. В крови, которую брали в динамике опыта через 30 мин после микроинъекций ангиотензина II, определяли содержание сиаловых кислот [10], гликозаминогликанов по уровню гексуроновых кислот [7], а также количество 11-оксикортикостероидов (11-ОКС) флуориметрическим методом [9]. Показатели обмена коллагена — уровни свободного и связанного с пептидами оксипролина в плазме крови анализировали с использованием паради-метиламинобензальдегида [2, 11]. В стенке аорты исследовали содержание гликозаминогликанов по уровню гексуроновых кислот [7], свободного и суммарного коллагена по количеству оксипролина [12], коллагенолитическую активность [17].

Результаты и обсуждение. Согласно полученным данным (см. таблицу), микроинъекции физиологического раствора в боковой желудочек мозга и вентромедиальное ядро гипоталамуса не вызывали достоверных изменений в исследуемых показателях в течение всего периода эксперимента. Локальное введение ангиотензина II в указанные структуры мозга вызывает увеличение уровня 11-ОКС в крови, особенно выраженное при микроинъекциях олигопептида в вентромедиальное ядро гипоталамуса. Максимальное повышение (на 63 %) концентрации 11-ОКС при внутривенном введении ангиотензина II наблюдалось на 10-й день опыта, а при введении в гипоталамус — на 20-й день (на 82 %).

Уровень свободного оксипролина в этих условиях значительно возрастал на 10-й день микроинъекций, причем введение ангиотензина II в вентромедиальное ядро гипоталамуса вызывало более существенные сдвиги в обмене коллагена. К 30-му дню опыта исследуемый показатель существенно не отличался от данных контроля. В изменении содержания пептидно-связанного оксипролина выраженной закономерности не наблюдалось, хотя его содержание в крови увеличивалось в разные сроки опыта (на 19—59 %). К концу эксперимента этот показатель оставался значительно повышенным по сравнению с контролем.

В связи с этим необходимо отметить, что увеличение количества свободного оксипролина в крови отражает процессы распада коллагеновых белков [4], а повышение содержания связанных форм оксипролина — одновременное ускорение распада и биосинтеза коллагена [4, 15]. Это свидетельствует о том, что при локальном введении ангиотензина II в указанные структуры мозга в обмене коллагена в первые 10 дней опыта преобладает распад, а затем усиливаются процессы накопления этого биополимера соединительной ткани. Об этом свидетельствует и существенное увеличение количества пептидносвязанного оксипролина в плазме крови, а также повышение со-

Содержание биополимеров соединительной ткани и 11-ОКС в крови кроликов при микроинъекциях ангиотензина II в желудочек мозга (в числителе) и вентромедиальное ядро гипоталамуса (в знаменателе)

Условия эксперимента	Оксипролин, мкмоль/л		Кислоты, мг/л		11-ОКС, мкг/л
	свободный	пептидо-связанный	сиаловые	гексуроновые	
Интактные животные	9,56±0,64	6,68±0,51	520±32	3,9±0,3	88,6±10,2
Микроинъекции физиологического раствора:					
10 дней	10,20±0,42 9,84±0,86	6,84±0,48 7,14±0,72	516±29 491±27	3,8±0,3 3,6±0,4	92,4±10,7 82,8±6,9
20 дней	10,80±0,77 10,40±0,64	7,05±0,71 7,34±0,58	540±36 512±36	4,2±0,4 4,1±0,4	90,7±9,8 82,4±7,7
30 дней	10,60±0,90 10,10±0,70	7,30±0,54 6,90±0,60	532±31 510±30	4,0±0,3 4,3±0,3	84,0±6,4 91,6±10,2
Микроинъекции ангиотензина II:					
10 дней	13,20±0,72* 14,00±0,82*	8,16±0,66 7,32±0,64	720±42* 705±44*	7,6±0,8* 7,4±0,6*	151±14,8* 139±10,6*
20 дней	10,70±0,60 13,2±0,78*	11,2±0,90* 10,8±0,80*	460±28 480±32	4,8±0,6 5,0±0,6	137±11,9* 150±11,0*
30 дней	10,20±0,76 10,40±0,88	9,94±0,54* 10,7±0,74*	388±24* 374±22*	3,2±0,4 3,1±0,4	106±14,4 104±16,2

Примечание. Звездочкой отмечены показатели, достоверно ( $p < 0,05$ ) отличающиеся от контрольных.

держания суммарного коллагена в стенке аорты к концу опыта и одновременное снижение коллагенолитической активности в исследуемой ткани. Так, при микроинъекциях ангиотензина II в боковой желудочек мозга содержание суммарного коллагена в аорте увеличилось с  $21,6 \pm 1,06$  до  $29,4 \pm 1,52$  г на 1 кг сухой обезжиренной ткани ( $p < 0,05$ ), а при локальном введении в вентромедиальное ядро гипоталамуса — с  $23,1 \pm 1,42$  до  $30,2 \pm 1,77$  г на 1 кг сухой обезжиренной ткани ( $p < 0,05$ ). Активность ферментов, расщепляющих коллаген, уменьшилась соответственно с  $4,72 \pm 0,30$  до  $2,36 \pm 0,18$  и с  $4,12 \pm 0,26$  до  $2,44 \pm 0,21$  мкмоль оксипролина на 1 г белка за 1 ч ( $p < 0,05$ ). Содержание свободного оксипролина в стенке аорты к концу эксперимента практически не отличалось от контроля.

Известно, что коллаген тесно связан с другими биополимерами соединительной ткани: гликозаминогликанами, гликопротеинами, сиаловыми кислотами [7]. Поэтому данные об усилении процессов накопления коллагена при длительном локальном введении ангиотензина II могут служить признаком общего анаболического процесса в соединительной ткани. Это согласуется с результатами других исследований (см. таблицу): постепенным снижением уровня гликозаминогликанов и сиаловых кислот в крови на 20—30-й день опыта и ростом количества гликозаминогликанов в аорте через 30 дней после микроинъекций ангиотензина II. Введение пептида в боковой желудочек мозга вызывает увеличение количества гликозаминогликанов в стенке аорты с  $4,9 \pm 0,3$  до  $7,2 \pm 0,4$  г на 1 кг сухой обезжиренной ткани ( $p < 0,01$ ), а в вентромедиальное ядро гипоталамуса — с  $4,6 \pm 0,4$  до  $7,6 \pm 0,5$  г на 1 кг сухой обезжиренной ткани ( $p < 0,01$ ).

При анализе полученных данных отмечен определенный параллелизм между направленностью изменений показателей обмена биополимеров соединительной ткани и уровнем 11-ОКС в периферической крови в первые 10 дней опыта. Увеличение концентрации исследуемых гормонов в

условиях наших опытов совпадает с усилением процессов распада биополимеров соединительной ткани. В то же время к 30-му дню хронических опытов происходит накопление соединительной ткани и в первую очередь коллагена, что, по-видимому, связано с возникновением искусственной гипертонии при многократных микроинъекциях ангиотензина II в структуры мозга. Этим механизмом можно объяснить преобладание процессов синтеза биополимеров соединительной ткани в стенке аорты над их распадом, когда в периферической крови наблюдалось увеличение уровня глюкокортикоидов, обладающих в высоких концентрациях катаболическим свойством [5].

Таким образом, обнаруженные изменения в обмене биополимеров соединительной ткани при длительном центральном введении ангиотензина II обусловлены, по-видимому, как модулирующим влиянием олигопептида на гипофизарно-кортикальную систему с последующим эффекторным воздействием глюкокортикоидных гормонов на соединительную ткань, так и непосредственным гипертензивным эффектом пептида.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Буреш Я., Петрань М., Захар И. Электрофизиологические методы исследования.— М., 1963.
2. Замаева Т. В. // Современные методы в биохимии.— М., 1977.— С. 262—264.
3. Клуша В. Е. Пептиды — регуляторы функций мозга.— Рига, 1984.
4. Мазуров В. И. Биохимия коллагеновых белков.— М., 1974.
5. Никитин В. Н., Перский Е. Э., Утевская Л. А. Возрастная и эволюционная биохимия коллагеновых структур.— Киев, 1977.
6. Реттинг Р., Ланг Р. Е., Рашер У. // Успехи физиол. наук.— 1983.— Т. 14, № 3.— С. 98—112.
7. Слуцкий Л. И. Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани.— Л., 1969.
8. Стабровский Е. М. // Криобиология.— 1987.— № 3.— С. 41—44.
9. Усватова И. Я., Панков Ю. А. // Современные методы определения стероидных гормонов в биологических жидкостях.— М., 1968.— С. 38—48.

10. Цветкова И. В., Козина А. Б. // Современные методы в биохимии.— М., 1968.— С. 177—182.
11. Шараев П. Н. // Лаб. дело.— 1981.— № 5.— С. 283—285.
12. Шараев П. Н., Боданов Н. Г., Ямолдинов Р. Н. // Бюл. exper. биол.— 1976.— № 6.— С. 665—666.
13. Эндорфины / Под ред. Э. Коста, М. Трабукки.— М., 1981.
14. Finn T. M., Stehle C., Ricci P., Hoffman K. // Arch. Biochem.— 1988.— Vol. 264, N 1.— P. 160—167.
15. Nagelschmidt M., Struck L. // Med. Welt.— 1977.— Bd 28, N 7.— S. 334—335.
16. Russell J. D., Russell S. B., Trupin K. M. // J. cell. Physiol.— 1978.— Vol. 97, N 2.— P. 221—229.
17. Schalinatus E., Behuke U., Ruttloff H. // Nahrung.— 1978.— Bd 22.— S. 401—408.

Поступила 29.11.89

#### ALTERATIONS IN METABOLISM OF CONNECTIVE TISSUE BIOPOLYMERS AFTER ADMINISTRATION OF ANGIOTENSIN II INTO CENTRAL NERVOUS TISSUE

E. G. Butolin, P. N. Sharaev

Medical School, Izhevsk

Some patterns of connective tissue metabolism were studied in rabbit blood and aorta after local administration of angiotensin II into lateral ventricle of brain and ventromedian nucleus of hypothalamus. Within the first 10 days of the chronic experiments catabolism of connective tissue predominated, while anabolic processes, accompanied by accumulation of collagen in aorta, were elevated within 30 days. The alterations observed were most distinct after microinjection of angiotensin II into hypothalamus. Both modulating effect of angiotensin II on the adrenohypophysial system and the peptide immediate action were apparently responsible for alterations in metabolism of connective tissue-related biopolymers.

© Ш. Н. ГАЛИМОВ, Ф. Х. КАМИЛОВ, 1991

УДК 617-001.17-053.5-092.9-07: [616.36-008.931:577.152.111]-075

Ш. Н. Галимов, Ф. Х. Камилов

#### О СОСТОЯНИИ СИСТЕМЫ НИКОТИНАМИДНЫХ КОФЕРМЕНТОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОЖОГОВОЙ БОЛЕЗНИ В ДОПУБЕРТАТНОМ ВОЗРАСТЕ

Башкирский медицинский институт, Уфа

Лечение термических поражений и их последствий у детей обрело патогенетическую направленность лишь в последнее десятилетие [1]. Между тем некоторые узловые вопросы молекулярных основ ожоговой болезни в детском возрасте еще далеки от полного разрешения. В частности, это касается тех аспектов, которые связаны с системой никотинамидных коферментов (НК), находящихся на перекрестке метаболических путей и являющихся одним из важных факторов их контролирования [13, 14].

Целью настоящей работы явилось исследование изменений концентрации НК (НАД<sup>+</sup> и НАД·Н) и состояния процессов их биосинтеза и распада в печени неполовозрелых крыс при ожоговой болезни. Проведена также оценка эффективности никотинамида (НА) как средства нормализации обмена НК и активности глицеральдегидфосфат-дегидрогеназы (ГАФДГ) при термической травме.

**Методика.** Опыты проведены на белых беспородных крысятах 4—6-недельного возраста массой 40—60 г. Ожог кожи IIIa—IIIb степени площадью 20—25 % воспроизводили погружением эпилированной спинки и боковых поверхностей туловища животного в кипящую воду на 6 с. Ожог наносили под эфирным наркозом. Исследования осуществлены в динамике через 6 ч, на 1, 3, 5, 7 и 14-е сутки после нанесения ожога, что соответствует периодам ожогового шока, острой ожоговой токсемии и ранней репарации [2].

Содержание НК определяли по [16] с отдельной экстракцией окисленных и восстановленных форм, последующим окислением восстановленных форм и использованием алкогольдегидрогеназной реакции для определения количества НАД<sup>+</sup>.

Интенсивность биосинтеза НАД<sup>+</sup> оценивали по скорости включения радиоактивной метки из 2[<sup>14</sup>C]-глицина, 6[<sup>14</sup>C]-глюкозы, 7[<sup>14</sup>C]-никотиновой кислоты и [<sup>32</sup>P]-ортофосфата натрия. 2[<sup>14</sup>C]-глицин, 6[<sup>14</sup>C]-глюкозу и 7[<sup>14</sup>C]-никотиновую кислоту вводили внутривентриально за 2 ч до декапитации из расчета 1,48 МБк, а [<sup>32</sup>P]-ортофосфат — 0,74 МБк на 100 г массы животного. НАД<sup>+</sup> выделяли хроматографически на анионообменнике «Дауэкс» 1×8, 200×400 меш в формиатной форме [4]. Кислотные экстракты печени наносили на колонки размером 10×0,6 см. НАД<sup>+</sup> элюировали 0,05 н. раствором муравьиной кислоты. Радиоактивность проб измеряли на счетчике «Изокап-300» (США) в диоксановом сцинтиляторе.

Об интенсивности распада НАД<sup>+</sup> судили по его убыли в среде инкубации, включающей 1,5 мл тканевого гомогената, 1,3 мл 0,1 М фосфатного буфера pH 7,8 и 0,2 мл НАД<sup>+</sup> (10 мг/мл) [7]. Для учета возможного неферментативного распада коферментов параллельно с опытными пробами инкубировали пробы, в которые вместо экстракта добавляли равный объем бидистиллированной воды. Инкубации проводили в течение 30 мин при 26 °C.

Для определения активности ГАФДГ ткань печени гомогенизировали в растворе 0,145 М KCl, 3,3 мМ KHCO<sub>3</sub>, pH 7,4, гомогенат центрифугировали при 1400 г в течение 10 мин. Активность фермента определяли по [5] с отдельными модификациями. Инкубационная смесь состояла из 0,25 мл 0,02 М фруктозофосфата натрия, 0,05 мл альдолазы (8 мг/мл), 0,07 мл 0,01 М НАД<sup>+</sup>, 0,08 мл 0,15 М арсената натрия, 0,5 мл 0,2 М трис-HCl, pH 7,5, 0,1 мл 0,1 М цистенна, 1,9 мл бидистиллированной воды и 0,05 мл надосадка.

НА вводили внутривентриально в дозе 50 мг/кг массы животного. Первую инъекцию витамина делали сразу после нанесения ожога, в последующие дни препарата вводили однократно в утренние часы. Белок определяли по Лоури. Данные обрабатывали статистически, используя критерий Стьюдента.

**Результаты и обсуждение.** Во все периоды экспериментальной ожоговой болезни содержание окисленных и восстановленных форм НАД в печени снижалось, минимальный уровень коферментов отмечался в периоде острой ожоговой токсемии (табл. 1). Изменение суммарного количества НК обусловлено снижением концентрации окисленного НАД. Содержание восстановленного

Таблица 1

Влияние термического ожога на содержание (в нмоль на 1 г сырой ткани) и соотношение НАД<sup>+</sup>/НАД·Н в печени крысят (M±m)

Нуклеотиды	Контроль	Время после ожога					
		6 ч	1 сут	3 сут	5 сут	7 сут	14 сут
НАД <sup>+</sup> +НАД·Н	902±34,2	727±35,1**	706±50,7**	651±93,2*	692±33,5***	721±28,1**	782±17,2*
НАД <sup>+</sup>	758±29,4	563±34,7**	564±51,1**	444±64,5**	479±25,8***	501±19,8***	606±12,7***
НАД·Н	154±10,5	164±4,1	172±5,1	215±30,4*	213±10,8**	220±1,36**	185±5,9*
НАД <sup>+</sup> /НАД·Н	4,89±0,25	3,4±0,13***	3,27±0,26***	1,91±0,21***	2,22±0,03***	2,3±0,09***	3,3±,06***

Примечание. Здесь и в табл. 2 представлены средние данные из 6—7 опытов; одна звездочка —  $p < 0,05$ , две —  $p < 0,01$ , три —  $p < 0,001$ .

Интенсивность включения (в имп/мин на 1 нмоль НАД<sup>+</sup>) низкомолекулярных предшественников в НАД<sup>+</sup> печени неполовозрелых крыс при ожогах ( $M \pm m$ )

Предшественник	Контроль	Время после ожога					
		6 ч	1 сут	3 сут	5 сут	7 сут	14 сут
7 [ <sup>14</sup> C]-никотиновая кислота	81 ± 13	35 ± 4,4**	32 ± 3,1**	30 ± 5,2**	64 ± 6,3	72 ± 8,4	80 ± 10
6 [ <sup>14</sup> C]-глюкоза	72 ± 8,5	21 ± 1,9***	35 ± 4,7**	40 ± 3,1**	29 ± 5,7**	19 ± 3,4***	37 ± 4,3**
2 [ <sup>14</sup> C]-глицин	173 ± 24,1	95 ± 6,2**	190 ± 30	197 ± 26	189 ± 29	177 ± 20	95 ± 14*
[ <sup>32</sup> P]-ортофосфат натрия	113 ± 4,4	56 ± 2,9***	48 ± 3,8***	77 ± 9,8**	75 ± 8,7**	74 ± 14*	36 ± 5,6***

кофермента, напротив, возрастало. Важным следствием этого становится резкое снижение величины коэффициента НАД<sup>+</sup>/НАД·Н.

Уровень НК в клетке является одним из критериев РР-витаминовой обеспеченности организма [8]. Поскольку содержание пиридиннуклеотидов в печени при ожоговой болезни снижается, то, принимая во внимание значение этого органа в системном метаболизме НК [12], правомерно заключение о снижении депонирующей роли печени и развитии дефицита витамина РР.

Существенно изменились процессы новообразования НК. Уже через 6 ч после ожога интенсивность использования низкомолекулярных предшественников на синтез НАД<sup>+</sup> снижалась и составляла от 29 до 55 % нормальных величин (табл. 2). В последующие сроки наблюдения динамика включения радиометки начинает различаться. Скорость утилизации 7 [<sup>14</sup>C]-никотината минимальна в периодах ожогового шока и ранней токсемии, повышается к 5-м суткам и полностью нормализуется в периоде ранней репарации. Максимальное снижение количества радиоактивного углерода в НАД<sup>+</sup> на 3-и сутки ожоговой болезни совпадает по времени с минимальным уровнем НАД<sup>+</sup> в печени. Это соответствует представлениям о том, что биосинтез НК лимитируется доступностью витамина в клетке [6].

Синхронное уменьшение удельной радиоактивности НАД<sup>+</sup> при введении [<sup>32</sup>P]-ортофосфата и 6 [<sup>14</sup>C]-глюкозы объясняется, по-видимому, их сочетанным включением в НАД<sup>+</sup> в виде рибозо-5-фосфата. Одновременное снижение включения никотината и рибозо-5-фосфата в остром периоде ожоговой болезни является свидетельством блока биосинтеза НК уже на ранней его стадии, этапе формирования никотинатмононуклеотида.

Скорость включения 2 [<sup>14</sup>C]-глицина достоверно уменьшалась лишь через 6 ч и на 14-е сутки после ожога. Снижение скорости включения глицина на 14-е сутки ожоговой болезни согласуется с низким уровнем в этот период радиоактивности НК при введении меченых глюкозы и ортофосфата. Это может быть обусловлено усилением функционирования альтернативных путей, направляющих общие метаболиты на синтез гликогена, белка, нуклеиновых кислот и др. Вероятно, синтез НК в печени в этих условиях становится неконкурентоспособным, субстраты для него метаболизируются по иным направлениям, что связано прежде всего с интенсификацией в этом периоде ожоговой болезни репаративных процессов.

Результаты исследования ферментативной деградации НАД<sup>+</sup> свидетельствуют о том, что уменьшение при ожогах концентрации пиридиннуклеотидов в печени нельзя связать исключительно с нарушением их биосинтеза. В периоде ожогового

шока скорость распада НАД<sup>+</sup> достоверно снижалась на 46—49 %, а на 3-и сутки не отличалась от уровня контроля. Однако к 5-му дню ожоговой болезни она достоверно возрастала на 30 % по сравнению с интактными животными.

Из сопоставления динамики изменения скорости синтеза и распада НАД<sup>+</sup> со сдвигами его содержания в печени следует, что в начальной стадии ожоговой болезни снижение концентрации НК не связано с активацией их расщепления, а обусловлено, вероятно, торможением их новообразования. Однако интенсификация распада НАД<sup>+</sup> на 5-е сутки после ожога может выступать в качестве главной причины снижения содержания НК, поскольку именно в этот период намечается тенденция к нормализации их синтеза.

Накапливающийся в цитозоле НАД·Н является эффективным ингибитором ГАФДГ [17]. Проведенные нами ранее исследования показали, что активность фермента понижается во все периоды ожоговой болезни [3]. Это может ограничивать интенсивность гликолиза в целом, что наряду с прочими факторами делает невозможной утилизацию глюкозы в необходимых масштабах.

Для выяснения возможности коррекции обнаруженных изменений в системе НК — пиридинзависимые дегидрогеназы нами было изучено влияние введения НА на содержание НАД<sup>+</sup> и НАД·Н, а также на активность ГАФДГ в печени неполовозрелых крыс с тяжелыми термическими ожогами.

Содержание НК и активность ГАФДГ определяли на 7-е сутки после ожога и начала введения НА. Выбор указанного срока объясняется тем, что в этот период ожоговой болезни активность ГАФДГ была минимальна [3], содержание НК также было значительно снижено.

Как видно из табл. 3, введение НА интактным животным приводит к умеренному повышению суммарного содержания НАД<sup>+</sup> и НАД·Н, окисленного НАД и соотношения НАД<sup>+</sup>/НАД·Н при неизменном уровне восстановленного нуклеотида. Применение НА у обожженных крыс вызвало более чем двукратное увеличение концентрации НАД<sup>+</sup>, достоверное понижение концентрации НАД·Н и как следствие резкий прирост величины коэффициента НАД<sup>+</sup>/НАД·Н.

Активность ГАФДГ у контрольных животных на фоне введения НА практически не изменялась. У крыс, подвергнутых термическому воздействию, инъекции НА повышали активность ГАФДГ на 78 % по сравнению с нелечеными животными.

По данным литературы [18, 19], применение НА приводило к увеличению включения меченых по углероду формиата и глицина в аденин, а аденина и [<sup>14</sup>C]-рибозы в НАД<sup>+</sup>; ускоряется превращение [<sup>14</sup>C]-глюкозы в рибозу и утилизация азота

Влияние НА на содержание НАД<sup>+</sup> и НАД·Н (в нмоль на 1 г сырой ткани) и активность ГАФДГ (нКат на 1 мг белка) в печени неполовозрелых крыс в норме и ожоговой болезни ( $M \pm m$ ;  $n=7$ )

Группа животных	НАД <sup>+</sup> +НАД·Н	НАД <sup>+</sup>	НАД·Н	НАД <sup>+</sup> /НАД·Н	ГАФДГ
1-я — контроль (нитактные)	895 ± 23,1	741,1 ± 30,4	153,9 ± 13,3	4,94 ± 0,31	1,27 ± 0,09
2-я — контроль + НА	1134,9 ± 53,4	983,6 ± 74,4	151,3 ± 25,0	7,09 ± 0,64	1,37 ± 0,10
$p_{1-2}$	<0,01	<0,05	>0,5	<0,05	>0,1
3-я — ожог	701,1 ± 16,1	484,7 ± 23,4	216,4 ± 10,4	2,23 ± 0,06	0,54 ± 0,06
$p_{1-3}$	<0,001	<0,001	<0,01	<0,001	<0,001
4-я — ожог + НА	1157,4 ± 65,9	982,7 ± 81,8	174,7 ± 16,0	5,67 ± 0,12	0,96 ± 0,08
$p_{1-4}$	<0,01	<0,05	>0,1	<0,05	<0,05
$p_{3-4}$	<0,001	<0,001	<0,05	<0,001	<0,01

[<sup>15</sup>N]H<sub>4</sub>Cl в амидный азот глутамина. Одновременно повышается концентрация аденина, рибозы, АДФ-рибозы и адениловых нуклеотидов [6, 11]. Следовательно, вызываемый витамином биосинтез НК происходит не столько за счет внутренних фондов аденина и рибозы печени, сколько вследствие их образования de novo и, возможно, мобилизации из других тканей.

Показано также индуцирующее влияние НА и повышенного содержания НАД<sup>+</sup> на активность некоторых гликолитических ферментов и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [8, 15]. Кроме того, НА ингибирует основные ферменты деградации НК: НАД-гликогидролазу и поли-АДФ-рибозилсингтазу [9, 10]. Все это позволяет рассматривать НА как эффективное средство нормализации обмена НК и активности пиридинзависимых дегидрогеназ.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Воздвиженский С. И., Окатьев В. С., Будкевич Л. И., Каменников А. Д. // Научно-практическая конф. по проблеме термических повреждений, 5-я: Тезисы докладов. — Горький, 1986. — С. 57—58.
2. Гублер Е. В., Хребтович В. И., Суббота А. Г. // Моделирование заболеваний. — Л., 1973. — С. 59—76.
3. Камиллов Ф. Х., Давлетов Э. Г., Галимов Ш. Н. // Всесоюзный симпозиум по медицинской энзимологии. — Махачкала, 1986. — С. 190—191.
4. Киреев М. М., Конвай В. Д. // Вопр. мед. химии. — 1979. — № 3. — С. 352—354.
5. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. — М., 1980.
6. Северин С. Е., Цейтлин А. А. // Вопр. мед. химии. — 1967. — № 5. — С. 498—502.
7. Телепнева В. И., Исаева И. В. // Там же. — 1965. — № 2. — С. 36—41.
8. Требухина Р. В., Лашак Л. К., Михальцевич Г. Н. // Метаболические эффекты недостаточности функционально связанных В-витаминов. — Минск, 1987. — С. 227—237.
9. Филиппович И. В., Романцев Е. Ф. // Радиобиология. — 1982. — № 6. — С. 745—752.
10. Цейтлин Л. А. // Успехи биол. химии. — 1967. — Т. 8. — С. 249—277.
11. Чаговец Р. В., Халмурадов А. Г., Шушевич С. И. // Укр. биохим. журн. — 1970. — № 2. — С. 191—200.
12. Dietrich L., Martinez L., Franklin L. // Naturwissenschaften. — 1968. — Bd 55. — S. 231—232.
13. Kaplan N. // Curr. Top. Cell. Regul. — 1985. — Vol. 26. — P. 371—381.
14. Kohen L., Hirschberg J., Wouters A. // Cell. Biochem. Funct. — 1983. — Vol. 1. — P. 3—16.
15. Lagunas R., McLean P., Greenbaum L. // Europ. J. Biochem. — 1970. — Vol. 15. — P. 179—190.
16. Slater T., Sawjer B., Strauli U. // Arch. int. Physiol. Biochem. — 1964. — Vol. 72. — P. 427—447.
17. Smith C., Velick S. // J. biol. Chem. — 1972. — Vol. 247. — P. 273—284.
18. Shuster R., Goldin A. // Ibid. — 1958. — Vol. 230. — P. 873—888.
19. Stollar V., Kaplan N. // Ibid. — 1961. — Vol. 236. — P. 1863—1866.

Поступила 23.11.88

#### THE NICOTINAMIDE COENZYMES SYSTEM IN EXPERIMENTAL BURNS DURING PREPUBERTAL AGE

Sh. N. Galimov, F. Kh. Kamilov

Bashkirian Medical School, Ufa

Distinct impairments were observed in metabolism of nicotinamide coenzymes in liver tissue of preadolescent rats with severe thermic burns: a decrease in total content of the coenzymes, a decrease in content of oxidized forms and elevation of reduced derivatives, inhibition of biosynthesis and stimulation of the nicotinamide coenzymes catabolism, especially high during acute period of burns. Nicotinamide, administered at a dose of 50 mg/kg into animals, was shown to correct the coenzymes content and activity of glyceraldehydephosphate dehydrogenase in liver tissue of rats with burns.

## МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616.153.96-074:543.545

М. В. Голубева, И. Н. Лунга, С. С. Шишкин

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДВУХМЕРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ПО О'ФАРРЕЛЛУ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПОЛИМОРФИЗМА БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ

Всесоюзный научный медико-генетический центр АМН СССР, Москва

Вариабельность электрофоретических характеристик белков сыворотки крови, обусловленная разными причинами, включая генетические, интенсивно изучается многими исследователями. Для этих целей обычно выбирают методики, позволяющие достаточно хорошо тестировать изучаемую полиморфную белковую систему и отличать ее компоненты от других сывороточных белков, а также обеспечивающие возможность массового проведения анализов [1, 3, 10]. Выполнения указанных условий при высокой разрешающей спо-

способности фракционирования позволяют добиться различные модификации изоэлектрофокусирования (ИЭФ), в частности тонкослойное ИЭФ в фиксированном градиенте pH [3, 12]. Однако обычно такой анализ предполагает подбор специальных условий разделения и методов детекции для каждой изучаемой полиморфной системы. Альтернативой может стать проведение параллельного анализа множества полиморфных систем на основе систематического подхода к изучению белков сыворотки крови, который достигается применением двухмерного электрофоретического фракционирования по О'Фарреллу [7]. Изучение белков сыворотки крови человека методом О'Фаррелла было начато в 1977 г. [4], и важным этапом в этом стало построение компьютерной двухмер-

ной карты белков сыворотки крови человека, содержащей около 300 белковых фракций, из которых около 100 идентифицированы с известными белками [5]. В данном сообщении представлены результаты фракционирования белков сыворотки крови человека методом двухмерного электрофореза и подходы к выявлению электрофоретических вариантов белков.

Методика. В работе анализировали образцы крови от 50 здоровых доноров. Гепаринизированную свежеполученную кровь центрифугировали при 1500 об/мин в течение 10 мин, образцы плазмы отбирали и хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$  не более 2 мес до проведения электрофореза. Перед фракционированием пробы размораживали и добавляли к 1 объему плазмы 3 объема лизирующего раствора, содержащего 9,67 М мочевины, 3 % тритон X-100, 0,2 % 3-[(3-холамидопропил) диметиламмоний]-1 пропан сульфат (CHAPS), 5 % 2-меркапто-

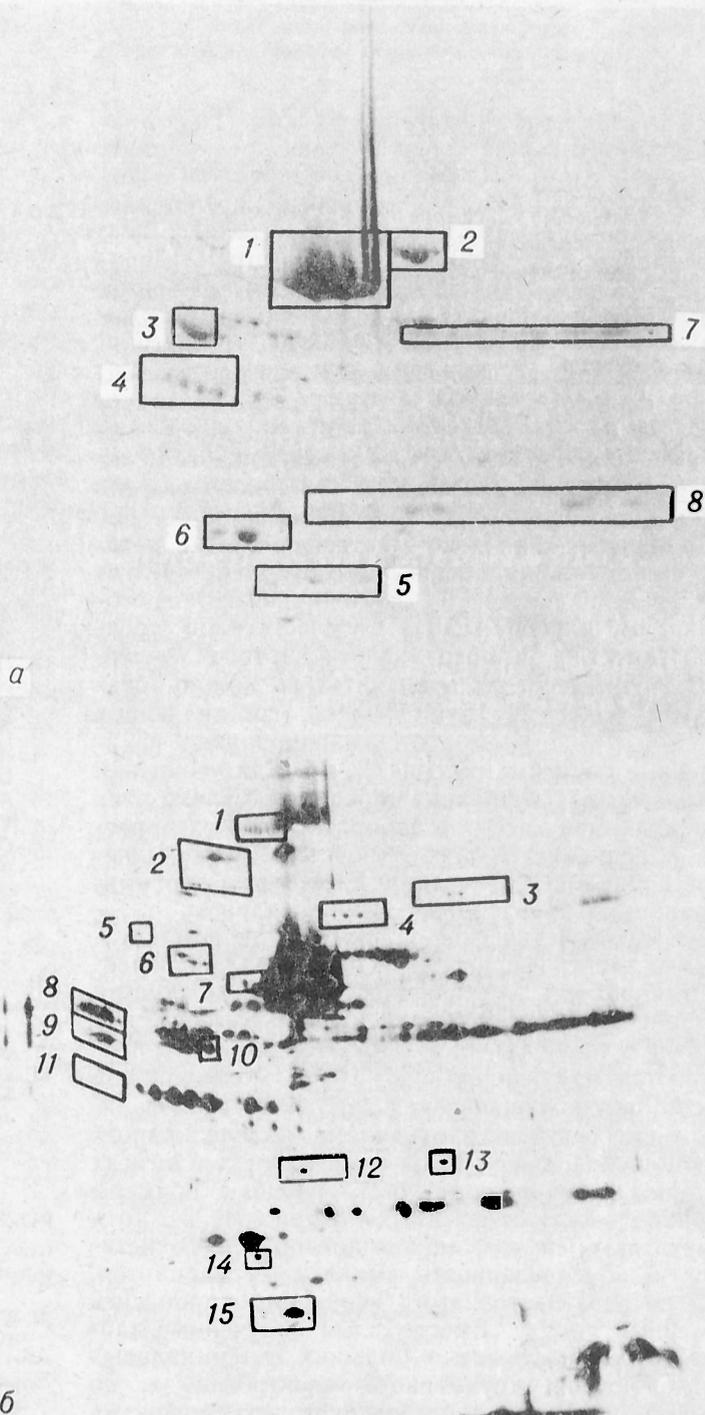


Рис. 1. Двухмерная электрофореграмма белков сыворотки крови человека при окрашивании кумасси R-250 (а) и серебрением (б).

а: 1 — альбумин, 2 — трансферрин, 3 —  $\alpha_1$ -антитринсин, 4 — гаптоглобин  $\beta$ , 5 — гаптоглобин  $\alpha_2$ , 6 — аполинопротеин А1, 7 — иммуноглобулин  $\gamma$ , 8 — иммуноглобулины  $\kappa$  и  $\lambda$ ; б: 1 —  $\alpha_2$ -макроглобулин; 2 — церулоплазмин, 3 — плазминоген, 4 — С3-протоактиватор, 5 — С1s, 6 —  $\alpha_1$ В-гликопротеин, 7 — гемоксигин, 8 —  $\alpha_1$ -антихимо-тридсин; 9 —  $\alpha_2$  HS-гликопротеин, 10 — Gc-белок, 11 — PLS:27 (по номенклатуре Н. Андерсона и Н. Андерсона), 12 — аполинопротеин Е, 13 —  $\gamma$  цепь С4, 14 — ретинол-связывающий белок, 15 — преальбумин. В прямоугольники выделены идентифицированные белковые фракции, справа — шкала распределения по молекулярной массе.

этанол, 0,1 мМ феилметилсульфонилфлуорид (PMSF) и 5 % амфолинов рН 3,5—10,0.

Двухмерный электрофорез белков плазмы проводили по методу О'Фаррелла [7] с небольшими модификациями. Гели для ИЭФ содержали 2 % амфолинов рН 5,0—8,0 и 3,6 % тритона X-100, а содержание остальных компонентов соответствовало исходной методике О'Фаррелла. Образец при проведении ИЭФ наносили со стороны катода. При электрофорезе во втором направлении использовали градиент концентрации акриламида от 7 до 25 %. Полученные электрофореграммы окрашивали сначала кумасси R-250, а затем методом серебрения, как описано ранее [2]. В качестве маркеров молекулярной массы использовали препараты белков мембран эритроцитов, сердечной мышцы и стандарты из набора MSII фирмы «Serva», а в качестве маркеров подвижности при ИЭФ (ОЭП-1) — карбамиллированные производные карбоангидразы фирмы «Pharmacia». Содержание белка в пробах определялось по методу Флорес [8].

В работе использовали амфолины рН 5,0—8,0 и рН 3,5—10,0 и мочевины фирмы LKB, 2-меркаптоэтанол, тритон X-100, CHAPS, PMSF, кумасси голубой R-250 фирмы «Serva»; остальные реактивы отечественного производства марок о. с. ч., х. ч. и реактивы фирмы «Reanal» из наборов для электрофореза в ПААГ.

**Результаты и обсуждение.** При анализе белков плазмы крови человека двухмерным электрофорезом по О'Фарреллу получается очень характерная высоковоспроизводимая картина распределения фракций на электрофореграмме. Ярко доминируют альбуминовые фракции, трансферриновые,  $\alpha_1$ -антитрипсиновые, гаптоглобиновые, апо AI липопротеиновые, а также фракции тяжелых и легких цепей IgG (рис. 1, а). Благодаря этому они хорошо идентифицируются при сравнении с двухмерной картой Н. Андерсона и Н. Андерсона [4, 5]. Важным условием для достижения оптимального разрешения является предотвращение перегрузки гелей белком. В наших условиях содержание белка в пробе не превышало 30 мкг. При окраске типичных электрофореграмм методом серебрения удалось выявить около 200 белковых фракций (рис. 1, б). Среди них, исходя из особенностей расположения, количественной представленности и путем сравнения с картой Н. Андерсона и Н. Андерсона дополнительно можно обнаружить более 20 групп белков, составляющих известные генетически детерминированные полиморфные системы (см. рис. 1, б). Для уточнения принадлежности фракций определяли величину их молекулярной массы по наборам белковых маркеров и величину относительной электрофоретической подвижности при ИЭФ по наборам карбамиллированных производных карбоангидразы.

Электрофоретические варианты белков на двухмерных электрофореграммах при визуальной оценке выявляются по сравнению с рядом лежащими невариантными фракциями, используемыми как реперные точки [4—6, 9]. При этом варианты проявляются изменением ОЭП-1 или молекулярной массы, или возникновением дополнительной фракции, или резкими изменениями количественных соотношений. В изученной нами выборке в разных группах пятен-фракций были найдены примеры вариативности отмеченных 4 видов (рис. 2). Хотя в некоторых случаях можно предполагать генетическую обусловленность выявленных вариантов, для доказательства этого необходимо проводить семейный анализ. Вместе с тем полученные данные свидетельствуют о больших потенциальных возможностях двухмерного электрофореза по О'Фарреллу в изучении белкового полиморфизма человека.

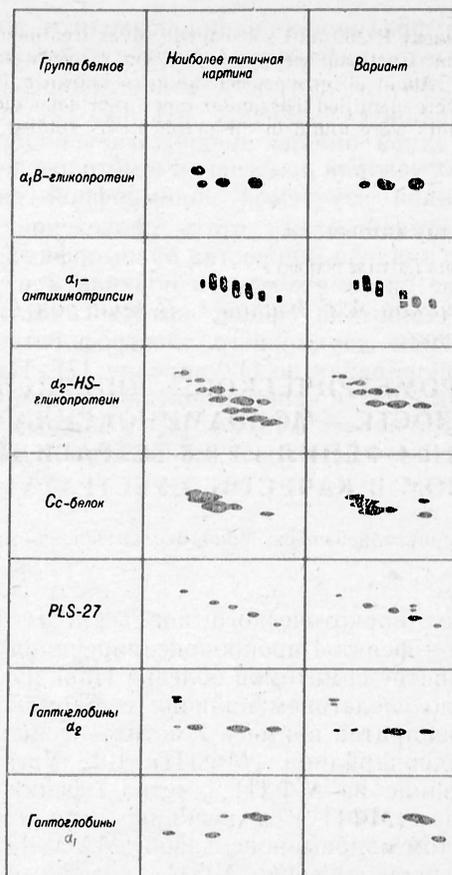


Рис. 2. Схема взаиморасположения выявленных электрофоретических вариантов белков сыворотки крови человека. Изображенные варианты гаптоглобина  $\alpha_1$  более подробно описаны также в [11].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Акуленко Л. В., Лунга И. П., Чудина А. П. // Генетика.— 1989.— Т. 25, № 6.— С. 1125—1127.
2. Громов И. С., Захаров С. Ф., Шлишкин С. С., Ильинский Р. В. // Биохимия.— 1988.— Т. 53, № 8.— С. 1316—1326.
3. Pigetti P. Изозлектрическое фокусирование.— М., 1986.
4. Anderson N. G., Anderson N. L. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1977.— Vol. 74.— P. 5421—5425.
5. Anderson N. L., Anderson N. G. / Clin. Chem.— 1984.— Vol. 30, N 12.— P. 1895—1905.
6. Choulaf A., Stenmetz J., Galteau M. M. et al. // Electrophoresis.— 1989.— Vol. 10, N 11.— P. 781—784.
7. O'Farrell P. M. // J. biol. Chem.— 1975.— с. Vol. 250.— P. 4007—4021.
8. Flores R. // Analyt. Biochem.— 1978.— Vol. 88.— P. 605—611.
9. Hanash S. M., Boehnke M., Chu E. H. Y. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1988.— Vol. 85.— P. 165—169.
10. Harris H. The Principles of Human Biochemical Genetics.— Amsterdam, 1980.
11. John H. A., Purdom I. F. // Genet. Res.— 1987.— Vol. 50.— P. 17—21.
12. Pflug W., Eberspächer B., Bässler G. // Electrophoresis.— 1988.— Vol. 8, N 9.— P. 239—240.

Поступила 29.03.90

#### POLYMORPHISM OF BLOOD SERUM PROTEINS EVALUATED BY MEANS OF TWO-DIMENSIONAL ELECTROPHORESIS BY O'FARRELL

M. V. Golubeva, I. N. Lunga, S. S. Shishkin

All-Union Research Medico-Genetic Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Blood plasma of 50 healthy volunteers was analyzed using two-dimensional electrophoresis by O'Farrell. After staining

with Coomassie R-250 and subsequent silver treatment of gels 200 protein fractions were detected on typical electrophoregrams. About 20 groups, belonging to known polymorphic systems, were identified. Dissimilar types of proteins electrophoretic variants were found in the preparations studied.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 612.82.015.1:577.152.143].085.2

Н. В. Ермаков, А. Г. Ишков, С. В. Микеров, Е. В. Мирошниченко

## ФЛЮОРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ МОНОАМИНОКСИДАЗЫ С 1-МЕТИЛ-4-ФЕНИЛ-1,2,3,6-ТЕТРАГИДРОПИРИДИНОМ В КАЧЕСТВЕ СУБСТРАТА

Институт прикладной молекулярной биологии Минздравства СССР, Москва

Аналог наркотического анальгетика петидина 1-метил-4-фенил-4-пропионоксипиридин вызывал развитие симптомов болезни Паркинсона [5], что было следствием наличия в фармакологических препаратах примеси 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) [9]. Установлено образование из МФТП 1-метил-4-фенил-пиридин-ий-иона (МФП<sup>+</sup>) в реакции, катализируемой ферментом моноаминоксидазой (МАО) [3, 4]. Отмечено проникновение МФП<sup>+</sup> в дофаминергические нейроны мозга [6, 7], особенно в клетки мозга, содержащие нейромеланин [2]. Ингибирующее действие МФП<sup>+</sup> на метаболизм нейронов [8], приводящее к снижению концентрации дофамина в дофаминергических отделах мозга [1, 15], сопровождается гибелью клеток мозга и развитием синдрома, сходного с болезнью Паркинсона.

Нами разработан простой метод определения активности МАО с МФТП. Изучен вклад каждой из двух форм МАО (МАО-А и МАО-В) в скорость утилизации МФТП для отделов мозга обезьяны и проанализирована возможная связь нейротоксического эффекта МФТП с кинетическими характеристиками МАО.

**Методика.** Выделение синаптосомальной фракции P<sub>2</sub> из отделов мозга обезьян *Macaque rhesus* осуществляли по методике [12]. Ткань гомогенизировали (1:10) с холодным 0,32 М раствором сахарозы в 0,1 М натрий-фосфатном буфере (рН 7,4) в стеклянном гомогенизаторе Поттера. Обломки клеток и ядра осаждали центрифугированием (200 g, 20 мин). Надосадочный раствор, содержащий МАО, повторно центрифугировали (16 000 g, 20 мин). Осадок синаптосомальной фракции P<sub>2</sub> промывали дважды 100-кратным объемом 0,1 М натрий-фосфатного буфера и суспендировали в нем. Все операции производили с использованием охлажденных растворов. Отмытую фракцию P<sub>2</sub>, полученную из 100 мг ткани, суспендировали в 7 мл 0,1 М натрий-фосфатного буфера перед проведением инкубации.

В стеклянные пробирки вносили по 350 мкл суспензии синаптосомальной фракции P<sub>2</sub> и проводили преинкубацию в течение 5 мин при 37 °С. Реакцию начинали введением в пробирки 50 мкл раствора МФТП (конечная концентрация 0—1000 мкМ). Пробу инкубировали в течение 1 ч при постоянном перемешивании и температуре 37 °С. Реакцию останавливали введением в пробу 0,1 мл свежеприготовленного раствора, состоящего из равных объемов 1,5 М HCl и 10 % додецилсульфата натрия [13].

В контрольные (фоновые) пробы не вводили МФТП. В стандартные пробы за 10 мин до окончания инкубации вводили МФП<sup>+</sup> в количестве от 0 до 0,50 нмоль. Такие стандартные растворы МФП<sup>+</sup> использовали для построения калибровочной прямой и последующего расчета количества МФП<sup>+</sup> в пробах.

При оценке вклада каждой из двух форм МАО в скорость утилизации МФТП пробы предварительно инкубировали в течение 5 мин при 37 °С, затем вводили 50 мкл раствора избирательных ингибиторов МАО типов А или Б хлоргидина или депренила (конечные концентрации 1·10<sup>-6</sup> М). Образцы инкубировали в течение 30 мин, а затем запускали реакцию добавлением раствора МФТП (конечная концентрация 1 мМ). Через 1 ч после введения МФТП реакцию останавливали.

В основу определения количества продукта реакции (МФП<sup>+</sup>) в пробах нами положена информация [14] о том, что количество МФП<sup>+</sup> можно измерять флюорометрически. Измерения проводили на спектрофлюориметре PF 510 (Shimadzu, Япония) при длине волны возбуждения 290 нм и длине волны эмиссии 375 нм. Показания флюориметра использовали для расчета количества МФП<sup>+</sup> в пробах по калибровочной прямой стандартных расчетов.

Белок в исходном растворе синаптосомальной фракции P<sub>2</sub> определяли по Лоури [11]. В качестве стандартов использовали растворы бычьего сывороточного альбумина. Значения максимальной скорости ферментативной реакции (V<sub>макс</sub>) и константы Михаэлиса (K<sub>м</sub>) определяли методом регрессионного анализа в системе координат Лайнувера — Берка 1/S <math>1/V</math> [10]. В качестве субстрата (S) использовали МФТП различной конечной концентрации — 0, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100, 200, 300, 400, 600, 800, 1000 мкМ, в качестве значения V — количество МФП<sup>+</sup>, образовавшееся в пробах за 1 ч инкубации.

Расчет K<sub>м</sub> и V<sub>макс</sub> для МАО разных отделов мозга выполнен на компьютере типа IBM с указанием доверительных интервалов исходных величин для уровня значимости p=0,05.

Результаты и их обсуждение. С помощью предлагаемой методики можно с высокой степенью чувствительности и специфичности измерить активность МАО по отношению к дофаминергическому нейротоксиину МФТП по нарастающей концентрации продукта реакции МФП<sup>+</sup>. Чувствительность флюориметрического измерения количества МФП<sup>+</sup> в растворах составляла 5—10 пмоль на 0,5 мл.

Методика имеет ряд преимуществ; в частности, концентрацию МФП<sup>+</sup> в пробах можно измерять без применения операций осаждения, экстракции и (или) хроматографии.

В табл. 1 представлены результаты исследования кинетических характеристик МАО синаптосомальных препаратов разных отделов мозга и МАО тромбоцитов крови обезьяны. Можно полагать, что чем меньше величина K<sub>м</sub>, тем в большей степени отдел мозга будет подвержен воздействию МФТП. Поэтому отделы мозга *g. Pallidus*, *s. Nigra*, *p. Caudatus* можно рассматривать как наиболее подверженные воздействию МФТП.

При концентрации МФТП в мозге на порядок меньше, чем K<sub>м</sub> (МФТП <math><1/10 K\_m</math>), определяющей характеристикой нейротоксичности является отношение V<sub>макс</sub>/K<sub>м</sub>. Можно полагать, что при концентрации МФТП в мозге 1 мкМ (1·10<sup>-6</sup> М)

Таблица 1

Кинетические характеристики МАО синаптосомальной фракции P<sub>2</sub> различных отделов мозга и тромбоцитов крови обезьяны *Macaque rhesus*

Объект	K <sub>м</sub> , мкМ МФТП	V <sub>макс</sub> , МФП <sup>+</sup> /мг·ч	V <sub>макс</sub> /K <sub>м</sub>
Отделы мозга:			
п. Accumbens	92,6±58,6	19,5±9,0	0,21
п. Caudatus	20,6±3,5	11,9±1,8	0,58
Putamen	40,0±9,3	12,8±2,5	0,32
g. Pallidus	15,7±1,8	6,9±0,7	0,44
s. Nigra	16,6±2,4	9,2±1,2	0,55
l. Coeruleus	69,8±10,7	50,8±6,9	0,73
Тромбоциты	37,5±1,4	5±0,2	

Примечание. Представлены средние величины и ошибки средней величины для уровня значимости p=0,05

Таблица 2

Значения  $V_{\text{макс}}$  для реакции ферментативного окисления концентрации МФТП 1 мМ и отношения активности форм MAO, полученные при ингибиторном анализе

Объект	V при 1 мМ [МФТП]	Отношение MAO-A/MAO-B	
		абс.	относительное
Отделы мозга:			
n. Accumbens	26,3	6,25:16,25	1/2,60
n. Caudata	17,5	8,48:11,66	1/1,38
Putamen	24,4	8,54:15,84	1/1,86
g. Pallidus	6,8	1,89:4,53	1/2,4
s. Nigra	12,8	0,98:7,85	1/8,00
l. Coeruleus	42,7	33,12:12,24	1/0,37
Тромбоциты	5,75	2,18:3,83	1/1,76

в п. Caudatus, s. Nigra, l. Coeruleus в единицу времени образуется большее количество МФТП<sup>+</sup>, чем в п. Accumbens.

При высоких концентрациях МФТП, на порядок превышающих  $K_m$  (МФТП > 10  $K_m$ ), скорость накопления МФТП<sup>+</sup> определяется величиной  $V_{\text{макс}}$ . Однако такие высокие концентрации нейротоксина, по-видимому, не могут быть созданы в мозге. Поэтому при наличии ограниченного количества биоматериала мы создавали в инкубационных пробах, содержащих синапсомы, концентрацию МФТП 1 мМ. В табл. 2 представлены данные о том, что для всех отделов мозга, за исключением l. Coeruleus, отмечается преимущественный вклад MAO-B в общую активность фермента, в 1,5—3 раза превышающий вклад MAO-A. Возможно, что такое распределение форм фермента в мозге также определяет повышенную чувствительность дофаминергических отделов к нейротоксину.

Приведенные в табл. 1 и 2 характеристики MAO тромбоцитов крови обезьян *Macaque rhesus* позволяют сравнить их с характеристиками MAO отделов мозга.  $K_m$  к МФТП для MAO тромбоцитов лежит в области распределения  $K_m$  MAO дофаминергических отделов мозга.

Для получения надежных результатов достаточно было использовать 100 мг ткани (отделы мозга) и 30 мл крови (тромбоциты).

Авторы статьи выражают благодарность Б. В. Крехнову, Ю. Ф. Назарову, А. П. Морозову (сотрудники Института прикладной молекулярной биологии НИИМД Минздрава СССР) за техническую помощь в математической обработке результатов и искренне признательны сотрудникам лаборатории биогенных аминов (зав. — проф. В. З. Горкин) Института биологической и медицинской химии АМН СССР за консультации в начальный период работы.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Ишков А. Г., Сотниченко А. И., Семенов С. Ю. // Конференция «Нейромедиаторы и поведение»: Материалы. — Новосибирск, 1988. — С. 128.
- D'Amato P. J., Lipman Z. P., Snyder S. N. // Science. — 1986. — Vol. 231. — P. 987—989.
- Chiba K., Trevor A., Castagnoly N. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1984. — Vol. 120. — P. 574—580.
- Chiba K., Petersen L. A., Castagnoly K. P. et al. // Drug. Metab. Dispos. — 1985. — Vol. 13. — P. 342—347.
- Davis G. C., Williams A. C., Markey S. P. et al. // Psychiat. Res. — 1979. — Vol. 1. — P. 249—254.

- Irwin I., Langston J. W. // Life Sci. — 1985. — Vol. 36. — P. 207—212.
- Javitch J. A., D'Amato R. J., Strittmatter S. M., Syder S. H. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1985. — Vol. 82. — P. 2173—2178.
- Kinemuchi H., Fowler C. J., Tipton K. C. // Neurochem. Int. — 1987. — Vol. 11. — P. 359—373.
- Langston J. W., Ballard P., Tetrud J. W., Irwin I. // Science. — 1983. — Vol. 219. — P. 979—980.
- Lineweaver H., Burk D. // J. Amer. Chem. Soc. — 1934. — Vol. 56. — P. 658—666.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
- Patric R. L., Snyder T. E., Barches J. D. // Molec. Pharmacol. — 1984. — Vol. 11. — P. 621—631.
- Szulowicz A., Kobes B. D., Orsulak P. J. // Analyt. Biochem. — 1984. — Vol. 138. — P. 86—94.
- Takahashi T., Naoi M., Nagatsu T. // Neurochem. int. — 1987. — Vol. 11. — P. 89—93.
- Youngster S. K., Sousalla P. K., Heikkela R. E. // J. Neurochem. — 1987. — Vol. 48. — P. 929—934.

Поступила 16.01.90

#### FLUORIMETRIC ESTIMATION OF MONOAMINE OXIDASE ACTIVITY USING 1-METHYL-4-PHENYL-1,2,3,6-TETRAHYDROPIRIDINE AS A SUBSTRATE.

N. V. Ermakov, A. G. Ishkov, S. V. Mikerov, E. V. Miroshni-chenko

Institute of Applied Molecular Biology, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow.

Using the fluorescent properties of 1-methyl-4-phenyl pyridinium ion in water solution a simple procedure was developed for estimation of monoamine oxidase activity using 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine as a substrate.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 547.466.46:543.42.062

Е. В. Лукашева\*, В. С. Веса\*\*, Т. К. Корпела\*\*\*, Т. Т. Березов\*

#### СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ L-ЛИЗИНА С ПОМОЩЬЮ L-ЛИЗИН- $\alpha$ -ОКСИДАЗЫ ИЗ TRICHODERMA SP. И 3,3', 5,5'-ТЕТРАМЕТИЛ-БЕНЗИДИНДИГИДРОХЛОРИДА

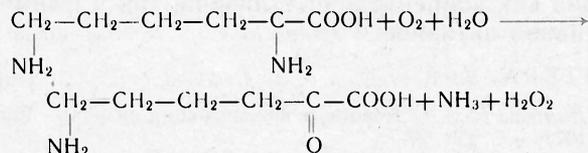
\*Университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы, Москва, \*\*ВНИИПЭ, Вильнюс, \*\*\*Университет г. Турку, Финляндия

L-Лизин является промышленно важной аминокислотой, производимой в количестве нескольких тысяч тонн в год и в основном используемой в качестве кормовых добавок в пищу животных [1, 3, 7, 16]. В основе крупнотоннажного производства L-лизина в большинстве случаев лежит культивирование различных штаммов или мутантов *Brevibacterium*. В последнее время предложен ряд других методов для промышленного получения L-лизина [16, 17]. Кроме того, лизин является незаменимой для человека и животных аминокислотой, обладает рядом уникальных функций, реализуемых на уровне энзиматического катализа и синтеза гистонов.

Для анализа количества лизина в процессе его получения в промышленности, а также его определения в искусственных наборах, предназначенных для парентерального питания в клинике или в кормовых добавках, необходимо иметь простые и чув-

ствительные методы. Для определения концентрации L-лизина часто используются хроматографические методы [2], автоматический аминокислотный анализ [11], реже — специфические ферменты, в частности L-лизиндекарбоксилаза [6, 19], L-лизин- $\alpha$ -кетоглутарат- $\epsilon$ -аминотрансфераза [18], сахарофиндегидрогеназа [14] или L-лизин- $\alpha$ -оксидаза (ЛО), а также ферментные электроды, содержащие иммобилизованные лизиноксидазу и лизиндекарбоксилазу [5, 9, 13].

ЛО катализирует окислительное дезаминирование L-лизина с образованием  $\alpha$ -кето- $\epsilon$ -аминокапроновой кислоты,  $\text{NH}_3$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



Исходная концентрация L-лизина при этом может быть определена как по количеству кислорода, который пошел на окисление, так и по количеству одного из образовавшихся продуктов реакции, например,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , поскольку хорошо известно, что в присутствии пероксидазы  $\text{H}_2\text{O}_2$  окисляет ряд органических веществ с образованием интенсивно окрашенных соединений. В одной из предыдущих наших работ [4] при применении в качестве субстрата пероксидазы *o*-дианизидина был разработан высокочувствительный и доступный метод определения концентрации L-лизина. Единственный недостаток этого метода заключается в том, что *o*-дианизидин оказывает канцерогенное действие. Представлялось целесообразным заменить *o*-дианизидин неканцерогенным, но стабильным веществом. Как известно, канцерогенное действие оказывают преимущественно *o*-гидроксилированные производные ароматических аминов. Если синтезировать аналог *o*-дианизидина, не подвергающийся *o*-гидроксилированию, тогда, по-видимому, будет исключен канцерогенный эффект. Так, был синтезирован модифицированный 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, для которого было экспериментально установлено отсутствие канцерогенного действия [12]. В данной работе была предпринята попытка использования 3,3',5,5'-тетраметилбензидина и ферментов пероксидазы и ЛО с целью разработки ускоренного и чувствительного и в то же время безопасного метода определения концентрации L-лизина.

**Методика.** В работе была применена ЛО, полученная по описанному ранее методу [6], 3,3',5,5'-тетраметилбензидиндигидрохлорид (ТМБ),  $\text{H}_2\text{O}_2$ , L-лизин производства фирмы «Sigma» (США), пероксидаза из хрена фирмы «Reanal» (Венгрия), соли для приготовления буферов марки «ч. д. а».

Концентрацию  $\text{H}_2\text{O}_2$  определяли при 25 °С в спектрофотометрической кювете (1 см). К 1 мл раствора ТМБ (1,6 мМ) добавляли 0,01 мл раствора пероксидазы (0,005 мМ) и 0,01 мл раствора  $\text{H}_2\text{O}_2$  (различные концентрации в интервале 0,5—20 мМ). Раствор тщательно перемешивали. Через 0,5 ч измеряли оптическую плотность при длине волны 650 нм.

Концентрацию L-лизина определяли в тех же условиях добавлением к 1 мл раствора ТМБ (1,6 мМ) 0,01 мл раствора пероксидазы, 0,01 мл раствора ЛО (0,05 МЕ/мл), 0,01 мл раствора L-лизина (различные концентрации в интервале 0,3—30 мМ). Смесь тщательно перемешивали. Через 1 ч измеряли оптическую плотность при длине волны 650 нм.

Концентрацию ЛО определяли в тех же условиях добавлением к 1 мл раствора ТМБ (1,6 мМ) раствора пероксидазы (0,005 мМ), 0,01 мл раствора L-лизина (0,1 М) и 0,01 мл исследуемого раствора ЛО. За реакцией следили по нарастанию оптической плотности.

pH-зависимость скорости ферментативного окисления L-лизина в присутствии ЛО изучали на полярографе LP7e (ЧСФР), оценивая убыль кислорода в реакционной среде с помощью электрода типа Кларка. Измерения выполняли в термостатированной ячейке объемом 1 мл при 25 °С. Концентрация L-лизина в реакционной среде 2 мМ. Реакцию инициировали введением 0,025 мл раствора ЛО (1 МЕ/мл). Для поддержания необходимого значения pH в ячейке использовали 0,1 М натрий-фосфатный, 0,1 М натрий-боратный и 0,1 М натрий-питратный буферные растворы.

**Результаты и обсуждение.** Аналогично *o*-дианизидину 3,3',5,5'-тетраметилбензидин плохо растворим. Поэтому при работе с ним необходимо использовать смешанные с водой апротонные растворители, такие как диоксан, диметилформамид или диметилсульфоксид [10]. ТМБ хорошо растворяется в воде [15], поэтому в настоящей работе именно это производное было использовано для замены *o*-дианизидина. Однако оказалось, что ТМБ очень плохо растворяется в различных буферных растворах (были использованы четыре 0,05 М и 0,025 М натрий-фосфатных буфера с pH 7,0 и 8,0; 0,1 М натрий-цитратный буфер pH 5,0; 0,1 и 0,02 М трис-HCl буферы pH 7,0). В связи с низкой растворимостью ТМБ в буферных растворах работу с этим реагентом проводили в водном растворе.

В результате реакции между ТМБ и  $\text{H}_2\text{O}_2$  в присутствии пероксидазы образуется интенсивно окрашенное в синий цвет соединение с максимумами поглощения при 370 и 650 нм (рис. 1). Поскольку при 650 нм ТМБ обладает незначительным оптическим поглощением, именно эта длина волны была выбрана для дальнейшей работы. В указанных условиях практически не наблюдается пик оптического поглощения при 450 нм; эта длина волны была использована в работе [9], в которой оптическую плотность измеряли после добавления концентрированных кислот в реакционную среду.

Интенсивность оптического поглощения при 650 нм пропорциональна количеству добавленной  $\text{H}_2\text{O}_2$  (рис. 2). Зависимость конечной оптической плотности от исходной концентрации L-лизина также линейна, что позволяет использовать эти результаты для построения калибровочной кривой при определении исходной концентрации L-лизина

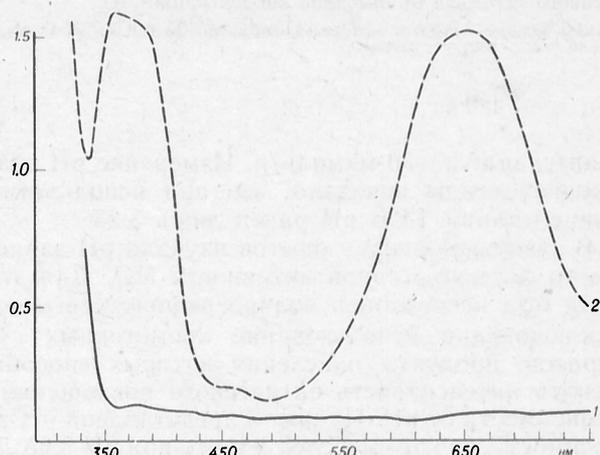


Рис. 1. Спектр оптического поглощения 1,6 мМ раствора ТМБ в воде (1) и продукта его окисления в присутствии пероксидазы и 0,75 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  (2).

По оси ординат — оптическая плотность, по оси абсцисс — длина волны, нм.

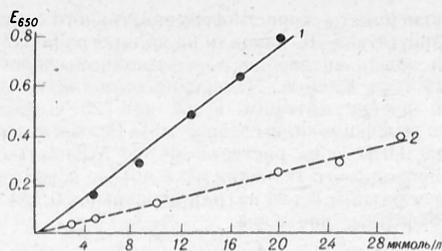


Рис. 2. Зависимость конечной оптической плотности при 650 нм от исходной концентрации  $H_2O_2$  (1) и от исходной концентрации L-лизина (2).

По оси ординат — оптическая плотность, по оси абсцисс — исходная концентрация  $H_2O_2$  или L-лизина.

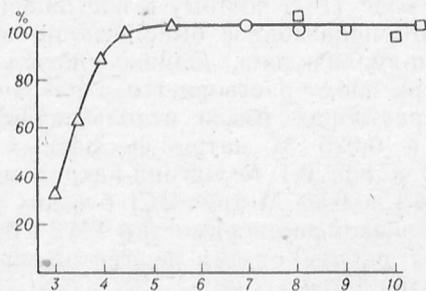


Рис. 3. Зависимость активности ЛО от pH.

Активность определяли полярографически при 25 °С. Концентрация L-лизина 2 мМ; концентрация ЛО 0,025 МЕ/мл. Треугольник — 0,1 М натрий-цитратный буфер; кружок — 0,1 М натрий-фосфатный буфер; квадрат — 0,1 М натрий-боратный буфер. По оси ординат — относительная активность ЛО, по оси абсцисс — pH.

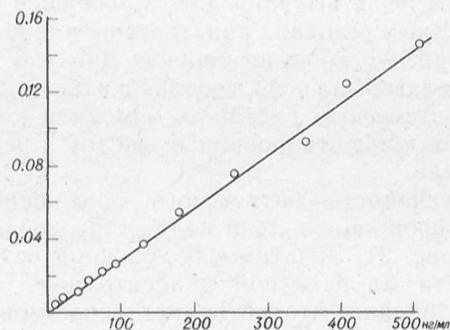


Рис. 4. Зависимость скорости реакции образования окрашенного продукта от исходной концентрации ЛО.

По оси ординат — прирост оптической плотности при 650 нм за 1 мин, по оси абсцисс — концентрация ЛО.

в интервале 2—50 мкмоль/л. Измерение pH реакционной среды показало, что при используемой концентрации ТМБ pH равен лишь 3,35.

В следующей серии опытов изучали pH-зависимость ферментативной активности ЛО. Для этой цели был использован полярографический метод, исключающий использование хромогенных субстратов, продукты окисления которых способны менять интенсивность оптического поглощения в зависимости от pH. На рис. 3 представлена pH-зависимость, из которой следует, что при pH 3,35 ЛО проявляет около 50 % своей каталитической активности. Снижение скорости ферментативной реакции ЛО в условиях эксперимента, возможно, является причиной неполного развития окрашивания.

ТМБ может использоваться, кроме того, для определения концентрации самого фермента — ЛО (рис. 4) в интервале 10—500 нг/мл. Однако следует отметить, что при применении канцерогенного субстрата пероксидазы — *o*-дианизидина — чувствительность метода определения ферментативной активности ЛО выше, поскольку оно осуществляется при pH 7,4, т. е. в области, где ЛО проявляет максимальную активность.

Таким образом, в работе показана возможность использования одного и того же химического препарата, в частности ТМБ, в качестве весьма чувствительного и безопасного реагента для определения как концентрации L-лизина, так и ферментативной активности ЛО.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Дамберг Б. Э. // Кормовые концентрации лизина. — Рига, 1977. — С. 22—27.
2. Зайцева Н. И. // Кормление сельскохозяйственных животных. Вып. 7. — Л., 1966. — С. 306—318.
3. Лой А. Г. // Новейшие достижения в исследовании питания животных. — М., 1983. — Вып. 2. — С. 135—150.
4. Симонян А. Л., Бадалян И. Э., Смирнова И. П. и др. // Труды Ереван. физ. ин-та. — 1989. — Вып. 89. — С. 3—11.
5. Хадуев С. Х., Лукашева Е. В. // Энзимология опухолей. — М., 1985. — С. 78—86.
6. Хачатрян Г. Э., Симонян А. Л. // Биохимия. — 1988. — Т. 53, № 8. — С. 1256—1264.
7. Хиччик И. // Биотехнология. — М., 1988. — С. 8—34.
8. Янкевич Н. Б., Лаугалене Н. Ф., Веса В. С. и др. // Вопр. мед. химии. — 1989. — № 2. — С. 84—86.
9. Berezov T. T., Lukashova E. V. // Biochem. int. — 1988. — Vol. 17, N 3. — P. 529—534.
10. Boss E. S., van der Doelen A. A., van Rooy N., Schuur A. H. W. M. // J. Immunoassay. — 1981. — Vol. 2, N 3—4. — P. 187—204.
11. Fukumura T. // Agricult. Biol. Chem. — 1976. — Vol. 40. — P. 1695—1698.
12. Holland V. R., Saunders B. C., Rose F. L., Walpole A. L. // Tetrahedron. — 1974. — Vol. 30. — P. 3299—3302.
13. Kusakabe H., Kodama K., Kuninaka A. et al. // J. biol. Chem. — 1980. — Vol. 255, N 3. — P. 976—981.
14. Laber B., Amrhein N. // Analyt. Biochem. — 1989. — Vol. 181. — P. 297—301.
15. Liem H. H., Cardenas F., Tavassoli M. et al. // Ibid. — 1979. — Vol. 98. — P. 388—393.
16. Nakayama K. // Comprehensive Biotechnology / Ed. M. Moo-Young. — Oxford, 1985. — Vol. 3. — P. 617—619.
17. Schmidt-Kastner G., Egerer P. // Biotechnology / Eds H. J. Rehm, G. Reed. — Weinheim, 1984. — Vol. 6a. — P. 394—396.
18. Soda K., Hirasawa T., Fukumura T. // Analyt. Biochem. — 1978. — Vol. 87. — P. 283—286.
19. Takeda H., Hagiuchi O. // J. biol. Chem. — 1966. — Vol. 241. — P. 2733—2736.

Поступила 26.02.90

#### SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF L-LYSINE CONCENTRATION USING L-LYSINE $\alpha$ -OXIDASE FROM TRICHODERMA SP. AND 3,3',5,5'-TETRAMETHYLBENZIDINE DIHYDROCHLORIDE

E. V. Lukashova, V. S. Vesa, T. K. Korpela, T. T. Berezov

Chair of Biochemistry, P. Lumumba People's Friendship University, Moscow, Institute of Applied Enzymology, Vilnius, Turku University, Finland

A simple and relatively sensitive procedure was developed for determination of L-lysine at 3-30 mmole/L concentration. The procedure does not involve the carcinogenic compound *o*-dianisidine. L-lysine  $\alpha$ -oxidase catalyzed oxidative deamination of L-lysine with  $O_2$  consumption and formation of  $H_2O_2$ ,  $NH_3$  and  $\alpha$ -keto- $\epsilon$ -aminocaproic acid. Horseradish peroxidase and a non-carcinogenic compound 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride as an electron donor were used in determination of  $H_2O_2$  formed. The procedure developed enabled also to measure the L-lysine  $\alpha$ -oxidase activity at the enzyme concentrations of 10-500 ng/ml. The only limitation of the procedure is relatively low pH-values of the reaction medium.

И. Н. Сергеев, Т. А. Терехина, Л. М. Якушина,  
В. Б. Спиричев

## ПРОСТОЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ 1,25 (ОН)<sub>2</sub>D (КАЛЬЦИТРИОЛА) В КРОВИ

Институт питания АМН СССР, Москва

Гормональная форма витамина D — 1,25-дигидроксивитамин D — 1,25 (ОН)<sub>2</sub>D, или кальцитриол — участвует в поддержании гомеостаза кальция, регуляции пролиферации и дифференцировки клеток, иммунного ответа, продукции и секреции гормонов [4, 14]. К настоящему времени для определения концентрации 1,25(ОН)<sub>2</sub>D в крови предложены радиорецепторный (РРА), радиоиммунологический (РИА), циторепторный, биологический и изотопного разведения масс-фрагментографический методы [1, 5, 11, 13]. Несколько фирм («Amersham», «Buhlman Lab.», «Immunonuclear Corp.» и др.) производят наборы для РРА и РИА кальцитриола в крови. Необходимым условием при определении концентрации 1,25(ОН)<sub>2</sub>D этими двумя методами является выделение фракции гормона, поскольку содержащийся в крови в очень высоких концентрациях по сравнению с кальцитриолом 25-гидроксивитамин D, а также некоторые липидные соединения мешают определению [1; 5]. Обычно для этой цели используют различные модификации ВЭЖХ [1, 2, 3, 8, 9, 13]. В последнее время предложен эффективный и более простой метод выделения 1,25(ОН)<sub>2</sub> с использованием твердофазной экстракции, выполняемой последовательно на мини-колонках с обращенно-фазовым и силикагелевым сорбентами [12].

Мы модифицировали этот метод с целью дальнейшего его упрощения, используя растворители с убывающей полярностью на одной и той же мини-колонке «Silica-Cart C18». Нам удалось получить фракцию 1,25(ОН)<sub>2</sub>D, пригодную для его определения методами РРА и РИА.

**Методика. Оборудование и реактивы.** Использовали кристаллический 1,25-дигидроксивитамин D<sub>3</sub> и 25-гидроксивитамин D<sub>3</sub> («Hoffman LaRoche»); меченые 1,25-дигидроксид [26,27-метил-<sup>3</sup>H] витамин D<sub>3</sub> и 25-гидроксид [26,27-метил-<sup>3</sup>H] витамин D<sub>3</sub> («Amersham»); растворители (n-гексан, изопропанол, метанол, ацетонитрил) квалификации «для спектроскопии» или «ВЭЖХ»; мини-колонки «Sep-Pak C18» («Alltech Ass.») с сорбентом «Adsorbisil» 270/425 меш и «Silica-Cart C18» («Tessek Ltd.», Прага), содержащие 500 мг сорбента «Separon™ SGX C18». Для работы с колонками использовали вакуумный коллектор («Alltech Ass.»).

**Оборудование для ВЭЖХ.** Использовали насос фирмы «Beckman», спектрофотометр фирмы «Kratos», колонка «Ultra-sphere ODS 5 мкм». Для счета радиоактивности использовали жидкостной сцинтилляционный счетчик «Rackbeta 1215» (LKB).

Образцы сыворотки крови получали от крыс или морских свинок, находившихся на обеспеченном и лишенном витамина D рационе, а также от пациентов с заболеваниями почек в стадии хронической почечной недостаточности (ХПН) и больных пролиферативными заболеваниями (миелофиброз, эритремия).

**Твердофазная экстракция 1,25(ОН)<sub>2</sub>D.** К 1 мл сыворотки или плазмы крови в пробирках из боросиликатного стекла («Рух», 12×75 мм) добавляют 50 мкл <sup>3</sup>H-1,25(ОН)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> в этаноле (около 1000 расп/мин). Перемешивают на вихревом смесителе и оставляют на 15 мин. Добавляют 1 мл ацетонитрила, перемешивают 30 с и центрифугируют (2000 г,

10 мин, 20 °С). К надосадку добавляют 1 мл 0,4 М К<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (рН 10,5), перемешивают и наносят надосадок на колонку «Silica-Cart C18». Колонку предварительно промывают 3 мл гексана, 3 мл изопропанола, 3 мл метанола и 3 мл воды. После элюирования образца колонку последовательно промывают 5 мл воды, 3 мл смеси метанол — вода (7:3), 5 мл смеси гексан — хлороформ (9:1), 5 мл смеси гексан — изопропанол (99:1) и смывают фракцию 1,25 (ОН)<sub>2</sub>D 5 мл смеси гексан — изопропанол (85:15). Колонку регенерируют, промывая 5 мл изопропанола, 5 мл метанола и 5 мл воды. Растворители пропускают через колонку при пониженном давлении (15 кПа). Фракцию, содержащую 1,25(ОН)<sub>2</sub>D, упаривают под азотом (40 °С) и растворяют, перемешивая на вихревом смесителе в 100 мкл этанола. Образцы хранят при —20 °С.

Аналогичную процедуру выполняли также с использованием мини-колонок «Sep-Pak C18».

**Экстракция и выделение 1,25(ОН)<sub>2</sub>D с использованием ВЭЖХ.** Экстракцию проводили, как описано выше. Ацетонитрильный экстракт наносили на мини-колонки «Sep-Pak C18» или «Silica-Cart C18», через которые последовательно элюировали 5 мл воды, 3 мл смеси метанол—вода (7:3) и 3 мл ацетонитрила. Последнюю фракцию, содержащую метаболиты витамина D, упаривали под азотом и растворяли в этаноле.

При выделении 1,25(ОН)<sub>2</sub>D с использованием ВЭЖХ фракцию метаболитов витамина D растворяли в 100 мкл смеси метанол—вода (90:10) и вводили в хроматограф. Фракцию, содержащую 1,25(ОН)<sub>2</sub>D, упаривали под азотом и растворяли в этаноле.

**Радиорецепторное и радиоиммунологическое определение 1,25(ОН)<sub>2</sub>D.** Фракцию 1,25(ОН)<sub>2</sub>D, выделенную методом твердофазной экстракции или ВЭЖХ, использовали для определения концентрации 1,25(ОН)<sub>2</sub>D коммерчески доступными наборами «1,25-Dihydroxyvitamin D [<sup>3</sup>H] assay reagent system» (Amersham) или «Calcitriol» (Bulmann Lab.) в соответствии с инструкциями фирм. В первом случае в качестве связывающего реагента (рецепторный белок 1,25(ОН)<sub>2</sub>D) используется цитозольная фракция слизистой оболочки тонкой кишки витамин D-дефицитных цыплят, во втором — овечья антисыворотка к 1,25(ОН)<sub>2</sub>D.

**Результаты и обсуждение.** Для экстракции метаболитов витамина D из сыворотки крови мы использовали ацетонитрил. Этот метод позволяет экстрагировать около 85 % метаболитов витамина D [12]. Существенно, что ацетонитрильный экстракт пригоден для непосредственного нанесения на колонку с обращенной фазой, а добавление щелочного буфера облегчает удаление липидов при отмывке мини-колонки водой и метанолом.

Новым моментом в предложенной нами методике выделения 1,25(ОН)<sub>2</sub>D является применение только одного типа колонки с фазой C18 вместо последовательного использования колонок с прямой и обращенной фазой. На рис. 1 представлено

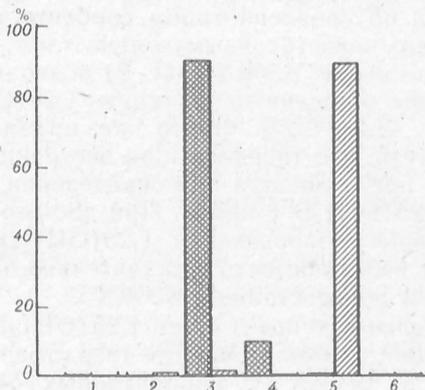


Рис. 1. Элюирование <sup>3</sup>H-метаболитов D<sub>3</sub> с мини-колонок «Silica-Cart C18».

<sup>3</sup>H-метаболиты D<sub>3</sub> добавляли по отдельности в количестве 5000 расп/мин к 1 мл физиологического раствора. Номера фракций соответствуют порядку их упоминания в тексте. Каждый столбик представляет количество радиоактивности, вышедшей с данной фракцией, в процентах к внесенному количеству метки. Столбики с линейной штриховкой — <sup>3</sup>H-1,25(ОН)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, с сетчатой — <sup>3</sup>H-25-ОНD<sub>3</sub>.

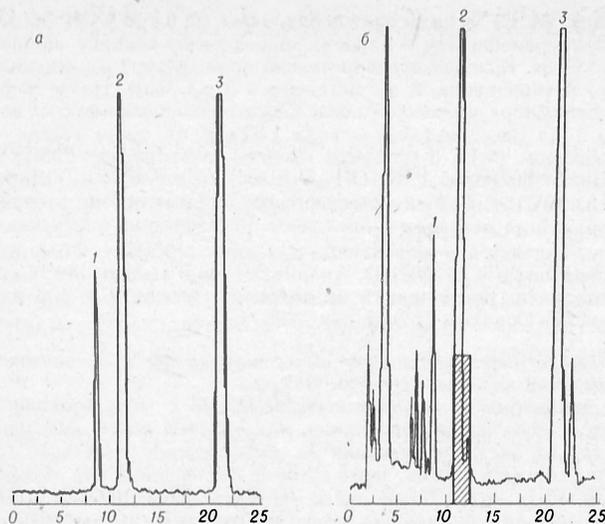


Рис. 2. ВЭЖХ  $^3\text{H}$ -метаболизмов витамина  $\text{D}_3$ .

а — хроматограмма смеси стандартов: 1 —  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (50 нг); 2 —  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (250 нг); 3 —  $25\text{-OH}\text{D}_3$  (250 нг); б — хроматограмма твердофазного экстракта сыворотки крови («Сер-Пак С18») и радиоактивности фракции  $^3\text{H}$ - $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ; перед экстракцией в пробу носили смесь нерадиоактивных стандартов, а также 1000 расп/мин  $^3\text{H}$ - $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Условия хроматографии: колонка «Ultrasphere ODS 5 мкм», элюент — метанол — вода (90:10), скорость потока 1 мл/мин, чувствительность 0,2 АУФС, длина волны 264 нм, объем пробы 100 мкл. По оси абсцисс — время, мин.

разделение  $^3\text{H}$ -метаболизмов  $\text{D}_3$  на одной колонке «Silica-Cart C18». Смена растворителей для образцово-фазного элюирования позволяет полностью отделить  $25\text{-OH}\text{D}_3$ , мешающий определению кальцитриола. Основное количество  $25\text{-OH}\text{D}_3$  элюируется смесью гексан—хлороформ (9:1) и незначительные остаточные количества — смесью гексан—изопропанол (99:1). В то же время  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  почти полностью элюируется при промывке колонки смесью гексан—изопропанол (85:15). Липофильные соединения, более полярные, чем  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , остаются на колонке, но могут быть удалены при ее отмывке (одну колонку без потери селективности можно использовать 5–6 раз). Выход  $^3\text{H}$ - $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  после твердофазной экстракции из сыворотки крови составил  $57,1 \pm 1,6\%$ .

Первоначально мы безуспешно пытались использовать аналогичную схему для мини-колонок «Сер-Пак С18». Неэффективность этих колонок, очевидно, обусловлена типом сорбента или, возможно, его недостаточным количеством.

Использование ВЭЖХ (рис. 2) позволяет получить более очищенную фракцию  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  с выходом  $44,0 \pm 1,4\%$ . В то же время следует подчеркнуть, что твердофазная экстракция имеет большие преимущества при определении концентрации  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  в крови. При достаточной для последующего определения  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  очистке отпадет необходимость в значительно более трудоемкой и дорогостоящей ВЭЖХ.

Определение концентрации  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  в сыворотке крови с использованием твердофазной экстракции и ВЭЖХ у лабораторных животных, обеспеченных витамином D и лишенных его, а также у пациентов в стадии хронической почечной недостаточности (у которых способность к синтезу  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  в почках снижена) и гематологических больных показало его адекватность по сравнению с ВЭЖХ (см. таблицу). Концен-

#### Концентрация $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ в сыворотке крови

Группа	Метод определения	Концентрация $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ , нг/мл
Крысы, +D (7)	ВЭЖХ, РРА	$123 \pm 22$
Крысы, -D (5)	ВЭЖХ, РРА	$17,2 \pm 3,2^*$
Морские свинки, +D (4)	ТФЭ, РИА	$72 \pm 11$
Морские свинки, -D (4)	ТФЭ, РИА	$6,8 \pm 2,4^*$
Пациенты с ХПН (3)	ТФЭ, РИА	$22,0 \pm 5,9^*$
Пациенты с пролиферативными заболеваниями (8)	ТФЭ, РИА	$48,1 \pm 4,8$

Примечание. +D и -D — соответственно животные, обеспеченные и лишенные витамина D. ТФЭ — твердофазная экстракция. Звездочка —  $p < 0,05$  относительно животных, обеспеченных витамином D, или больных с пролиферативными заболеваниями. В скобках — число участвующих в эксперименте.

трация  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  в сыворотке крови резко снижена у витамина-D-дефицитных крыс и морских свинок, а также существенно уменьшена у пациентов с заболеваниями почек.

Таким образом, предлагаемый метод твердофазной экстракции и выделения  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  является простым, быстрым и эффективным и может быть широко использован в экспериментальных и клинических исследованиях.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Арханчев Ю. П., Сергеев И. И., Спиричев В. Б., Блажевич И. В. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 4. — С. 122–124.
- Сергеев И. И., Арханчев Ю. П., Линберг Л. Ф. и др. // Биохимия. — 1984. — Т. 49, № 4. — С. 590–597.
- Сергеев И. И., Арханчев Ю. П., Ким Р. Х. и др. // Там же. — 1987. — Т. 52, № 11. — С. 1867–1874.
- Сергеев И. И. // Вопр. мед. химии. — 1989. — № 1. — С. 2–11.
- Furukawa T., Fukunaga M., Otsuka N. et al. // *Kawasaki med. J.* — 1986. — Vol. 12. — P. 153–161.
- Grey R. W. // *Assay Calcium-Regul. Horm.* — New York, 1983. — P. 85–98.
- Halloran B. P. // *Ibid.* — P. 125–137.
- Horst R. L. // *Ibid.* — P. 21–47.
- Lambert P. W., Fu I. Y., Kaetzel D. M., Hollis B. W. // *Ibid.* — P. 99–124.
- Manolagas S. C. // *Ibid.* — P. 139–150.
- Manolagas S. C., Culler F. L., Howard G. E. et al. // *J. clin. Endocr. Metab.* — 1983. — Vol. 56. — P. 751–760.
- Reinhardt T. A., Horst R. L., Orf G. W., Hollis B. W. // *Ibid.* — 1984. — Vol. 58. — P. 91–98.
- Seamark D. A., Trafford D., Makin H. // *J. Steroid Biochem.* — 1981. — Vol. 14. — P. 111–123.
- Spirichev V. B., Sergeev I. N. // *Wld Rev. Nutr. Diet.* — 1988. — Vol. 56. — P. 173–216.

Поступила 21.12.89

#### SIMPLE PROCEDURE FOR ESTIMATION OF CALCITRIOL, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ IN BLOOD

I. N. Sergeev, T. A. Terekhina, L. M. Yakushina, V. B. Spirichev

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

Simple and effective procedure was developed for solid-phase extraction of  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  (calcitriol) from blood serum or blood plasma using mini-columns "Silica-Cart C18" which enabled to purify the hormone preparation to the state suitable for its subsequent evaluation by means of RRA and RIA. Separation of  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  from  $25\text{-OH}\text{D}$  and purification from lipophilic impurities were carried out on the single mini-column where solvents with gradually decreased polarity were used: water, methanol-water (7:3), hexane-chloroform (9:1), hexane-isopropanol (99:1), hexane-isopropanol (85:15). Concentration of  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  was adequately estimated in blood serum of patients with chronic kidney insufficiency as well as in blood serum of vitamin D deficient animals.

# ФИРМА «ЭББОТТ ЛЭБОРАТОРИЗ» СООБЩАЕТ:

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 615.471.03:616-008.9-074

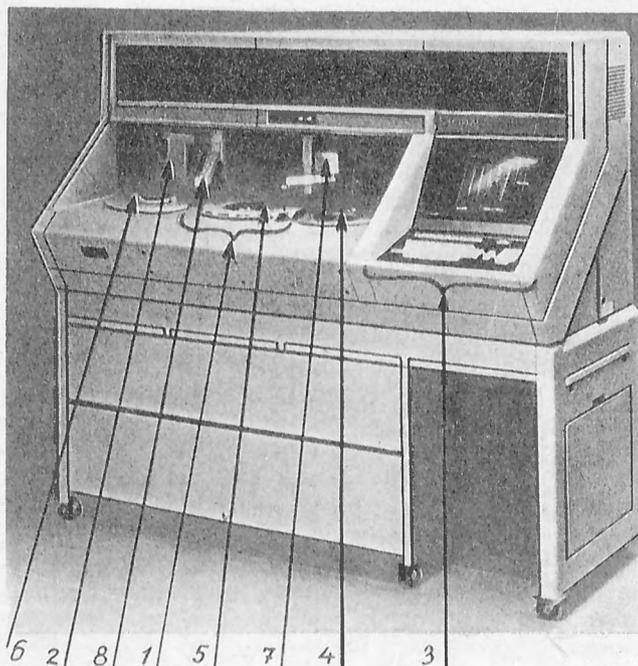
А. А. Карелин, В. И. Андреев, Р. Н. Короткина

## ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АВТОМАТИЧЕСКОГО БИОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗАТОРА «SPECTRUM» ФИРМЫ «ЭББОТТ ЛЭБОРАТОРИЗ» В КЛИНИКО-БИОХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ ИНСТИТУТА ХИРУРГИИ ИМ. А. В. ВИШНЕВСКОГО АМН СССР

Институт хирургии им. А. В. Вишневского АМН СССР, Москва

Одной из особенностей современной медицины является значительное увеличение роли лабораторных диагностических служб в обеспечении лечебного процесса. Развитие клинико-биохимического обеспечения происходит по 2 основным направлениям: 1) разработка и внедрение в практику новых высокоспецифических диагностических тестов и 2) автоматизация выполнения самой работы, т. е. автоматизация проведения так называемых рутинных клинико-биохимических методов исследования.

С марта по июнь 1989 г. в клинико-биохимической лаборатории Института хирургии им. А. В. Вишневского АМН СССР проводились клинико-лабораторные испытания автоматического биохимического анализатора «Spectrum» фирмы «Эбботт» (США). Поскольку отечественных аналогов подобного анализатора не имеется, представляется целесообразным дать краткое техническое описание этого прибора. Внешний вид при-



Общий вид автоматического биохимического анализатора «Spectrum» фирмы «Эбботт Лэбораториз» (США).

1 — спектрофотометрический анализатор, 2 — анализатор электролитов, 3 — компьютер, 4 — карусель реагентов, 5 — карусель спектрофотометрических кювет, 6 — карусель исследуемых проб, 7 — манипулятор отбора реагентов, 8 — манипулятор отбора проб.

бора представлен на рисунке. Функционально прибор состоит из 3 частей: спектрофотометрического анализатора, анализатора электролитов и управляющего компьютера.

Спектрофотометрический анализатор размещен в центральной части основной панели прибора и состоит из механических элементов, обеспечивающих проведение химических реакций, и регистрирующего спектрофотометра. В состав механической части входят 3 отсека-карусели: карусель реагентов, карусель с реакционными кюветами и карусель образцов. В карусели реагентов в специальных емкостях помещаются химические реагенты. Предусмотрено одновременное размещение 24 емкостей, при этом для 18 реагентов предусмотрено охлаждение, что обеспечивает сохранность реагентов в течение всего рабочего дня независимо от температуры лабораторного помещения.

Карусель для спектрофотометрических кювет представляет собой термостатируемую емкость, заполненную водой с 3 режимами термостатирования — 25, 30 и 37 °С. В ней по кругу размещается 8 одноразовых спектрофотометрических кювет, каждая из которых содержит 12 секций. Таким образом, одновременно в приборе находится 96 спектрофотометрических ячеек, что позволяет проводить 96 определений без смены кювет. Композиционно карусель с кюветами совмещена с регистрирующим спектрофотометром таким образом, что свет от лампы накаливания, находящейся в центре карусели, проходит через ячейку кюветы и попадает на регистрирующее устройство. Регистрация изменения светового потока осуществляется с помощью нескольких фотодиодов, позволяющих работать в диапазоне длин волн от 340 до 660 нм.

В карусели для образцов предусмотрено 48 гнезд для пробирок с образцами, 8 гнезд для экстренного определения и места для калибровочных растворов и контрольных образцов.

Отбор, дозирование и перенос реактивов и анализируемых проб в спектрофотометрические кюветы осуществляется 2 механическими манипуляторами. Следует отметить, что забор жидкостей осуществляется одноразово — дискретными порциями и при переходе к внесению нового образца или реагента наконечники манипуляторов обязательно проходят автоматические циклы промывания в дистиллированной воде.

Полное механическое перемешивание реагента и анализируемого образца в ячейке спектрофотометрической кюветы обеспечивается работой третьего манипулятора — миксера, который начинает работать сразу же после добавления анализируемого образца, т. е. запуска реакции.

Важно отметить, что в анализаторе «Spectrum» возможно проведение реакций только с участием одного реагента, и запуск реакции осуществляется добавлением анализируемого образца.

Анализатор электролитов состоит из подвижного пробоотборника, электролитного блока ион-селективных электродов для определения ионов  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  и комплекта необходимых реагентов,

при этом указанные анализаторы работают независимо друг от друга.

Координация и работа всех механических составляющих частей прибора регулируется встроенным в анализатор компьютером. Программное обеспечение анализатора организовано таким образом, что оператор регулирует его работу только через компьютер. Чрезвычайно удачное программное обеспечение прибора не позволяет оператору вмешиваться в тонкую регулировку работы механических составляющих и допускать ошибки, которые могут вывести прибор из строя. В то же время прибор предоставляет очень широкие возможности для программирования выполнения новых тестов, помимо уже предусмотренных.

Информация о работе прибора и результаты анализов передаются одновременно на экран дисплея и на печатающее устройство.

Спектрофотометрические методы исследования выполнялись на наборах реактивов фирмы «Эбботт Лэбораториз». С помощью этого прибора выполнялось около 90 % проводимых в лаборатории биохимических анализов, при этом использовались следующие методы: определение метаболитов — сахара крови (УФ-метод, модификация метода Richterich a. Daudwalder), общего белка (биуретовый метод), альбуминов (колориметрический метод Rodkey в модификации Doumas), билирубина (модифицированный метод Malloy a. Evelyn), мочевины (УФ-ферментативный метод, модификация метода Talke a. Schubert), креатинина (колориметрический метод Яффе), холестерина (колориметрический ферментативный метод, модификация метода Allain и соавт.), триглицеридов (УФ-ферментативный метод, модификация метода Sampson a. Demers), липопротеидов высокой плотности (колориметрический ферментативный метод) мочевой кислоты (УФ-ферментативный метод); электролитов —  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  — с помощью ионоселективных электродов, Са (колориметрический метод, модификация метода Connerty a. Briggs), железа (колориметрический метод), магния (колориметрический метод Tietz), фосфора (колориметрический метод, модификация метода Daly a. Erttingshausen) и бикарбонатов (УФ-метод); ферментов — АсТ, АлТ (УФ-тест, модификация метода Bergmeyer),  $\gamma$ -ГТ (колориметрический тест, модификация метода Ogrowski a. Meister), ЛДГ, ЛДГ<sub>1</sub> (УФ-метод, в основе которого реакция, описанная Wacker и соавт.),  $\alpha$ -ГБДГ (модифицированный УФ-метод Ellis a. Goldberg), КФК, КФК МБ изофермент (УФ- и иммунологический метод Wurzburg и соавт.), щелочная фосфатаза (колориметрический метод Bessey и соавт.),  $\alpha$ -амилаза (колориметрический ферментативный метод). Кроме того, анализатор производит расчет содержания глобулинов и осмоларности крови.

Прибор обслуживается одним оператором, что позволяет в значительной степени повысить производительность труда. Анализатор «Spectrum» достаточно прост в обслуживании, и работа на нем не требует специальных знаний, что позволяет достаточно быстро и эффективно готовить операторов из числа сотрудников, окончивших фельдшерско-лаборантское отделение медицинских училищ.

Высокая точность и воспроизводимость ре-

зультатов определений достигается наличием калибровочных программ, а также постоянным слежением за получаемыми результатами, обеспечиваемым как сопутствующей математической программой, так и открытым для оператора доступом к результатам калибровок и определений. Наличие нескольких режимов работы и запрограммированная оптимизация выполнения анализов по минимальному времени обследования больных делают прибор не только высококачественным, но и высокоскоростным, что позволяет за 1 ч работы обследовать до 15 пациентов по 21 параметру. При некруглосуточной работе прибора на техническое обслуживание и подготовку прибора к работе уходит до 1,5 ч. В оставшееся время можно провести полное биохимическое обследование 60—70 больных. Таким образом, данный прибор вполне удовлетворяет требованиям клиники на 500—600 коек.

Безусловным достоинством прибора является наличие специальной программы «Stat», позволяющей, не останавливая работы прибора, производить определение требуемых параметров по cito. Это дает возможность использовать прибор не только для выполнения плановых биохимических обследований, но и для частичного биохимического мониторинга за состоянием больного при проведении сложных операций, например операций с применением искусственного кровообращения. Получаемая при этом информация может быть полезна как при проведении самой операции, так и для прогнозирования послеоперационных осложнений и их предотвращения.

Испытания прибора «Spectrum» показали, что его высокая точность и производительность позволяют осуществить современный подход к биохимической диагностике, при котором врач в основном делает не назначения на выполнение тех или иных анализов, а указывает диагноз с дополнительными замечаниями. В дальнейшем при поступлении материала для исследования оператор проводит определение тех параметров, которые при данной патологии наиболее информативны, и при наличии каких-либо отклонений самостоятельно проводит дополнительные исследования. Подобная тактика способствует улучшению биохимической диагностики и позволяет избежать малоинформативных исследований.

Анализатор имеет выход и рассчитан на работу в комплексе с ЭВМ, что не только упрощает процедуру хранения и записи получаемой информации, но и позволяет перейти к компьютеризированной диагностике с подготовкой биохимического заключения по результатам обследования и указанием вероятности того или иного патологического процесса.

Конструктивные решения, заложенные в анализатор «Spectrum», позволяют избежать длительного контакта многих частей прибора с химическими реактивами. Фактически с химическими реактивами взаимодействуют только пробоборник реагентов, смеситель и кюветы. Такой принцип функционирования прибора значительно повышает безопасность и надежность его работы и позволяет использовать любые высококачественные химические реактивы. Благодаря этому и

очень гибкому программному обеспечению анализатора при работе можно использовать химические реактивы, удовлетворяющие обычным требованиям по чистоте и качеству, что позволяет создавать и выполнять на анализаторе новые, не разработанные фирмой программы и методики для определения любых веществ, тестируемых с использованием спектрофотометрии, с учетом требований однокомпонентных реакций.

Анализатор зарекомендовал себя с положительной стороны в период проведения обследования больных, пострадавших в результате катастрофы на участке железной дороги Уфа — Челябинск. При оказании помощи таким больным врачи получали полную информацию по 17—20 биохимическим параметрам в течение 20 мин.

Положительным моментом является также то, что для выполнения анализов используется минимальное количество реактивов и сыворотки крови больных. Это позволяет проводить биохимические исследования в более экономичном режиме и одновременно дает возможность уменьшить до 1—2 мл необходимое количество крови больного для обследования, делая тем самым процедуру биохимического обследования более гуманной, что особенно важно в педиатрической практике.

За истекшее время обследовано более 3500 пациентов и выполнено более 35 000 анализов, из них более 7000 определений ферментов и более 28 000 определений метаболитов.

Стоимость прибора с расходными реагентами и запасными частями на год составляет 90 тыс. инв. руб.

Эксплуатация прибора «Spectrum» в Институте хирургии им. А. В. Вишневского АМН СССР позволила кардинальным образом перестроить работу клиничко-биохимической лаборатории. Вместе с тем необходимо отметить, что фирма «Эбботт» на базе автоматического анализатора «Spectrum» в конце 1989 г. начала выпускать новую модификацию прибора «Spectrum-Ерх». Этот прибор обладает более широкими функциональными возможностями по сравнению с предыдущей моделью, заключающимися в следующем. 1. Допустимо выполнение фактически всех спектрофотометрических методик, так как в программном обеспечении заложено использование неограниченного числа химических реагентов, необходимых для проведения реакции. Невозможно выполнение только методов, при проведении которых требуется: а) центрифугирование реакционной смеси, б) кипячение или высокотемпературная обработка реакционной смеси и в) длительная (свыше 30 мин) инкубация реакционной смеси. Последнее ограничение достаточно условно, так как при длительной инкубации просто снижается производительность прибора.

2. В анализаторе «Spectrum-Ерх» осуществлена возможность создания и краткой записи истории болезни и формирования архива данных, что значительно упрощает ведение документации и отражает изменения биохимических показателей в динамике лечения больного. Кроме того, создание архива данных, а главное работа с ним в оперативном режиме позволяют получать статистическую информацию по корреляционной зависимости различных показателей. Это способст-

вует более полному и разностороннему применению получаемой информации, что в конечном итоге позволит использовать результаты рутинных биохимических анализов не только для лечения конкретного больного, но и для выполнения научно-исследовательской работы.

3. Кроме традиционных спектрофотометрических методов и методов определения электролитов ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ) с помощью блока ионселективных электродов, в приборе предусмотрена возможность проведения исследований методами нелинейной оптики, т. е. использование турбидиметрических методов. Это позволяет определять некоторые параметры состояния иммунологической системы — С-реактивный белок, компоненты комплемента С3, С4, иммуноглобулины А, G, М и системы свертывания крови — фибриноген, микроальбумин и др. Кроме этого, можно турбидиметрическим методом определять содержание аполипротеинов и липопротеинов в плазме крови. В силу этого становится возможным обследование большого контингента больных с целью выявления групп риска в отношении тех или иных заболеваний.

В связи с эксплуатацией прибора в Советском Союзе необходимо отметить еще 2 положительных момента в его конструктивном исполнении: 1) наличие в приборе устройства для мойки спектрофотометрических кювет сводит к минимуму их расход, а именно — 8 штук за рабочий день. В то же время это устройство значительно повышает автономность прибора, поскольку производственный цикл не прерывается для смены кювет оператором; 2) наличие в приборе специального стабилизатора напряжения делает его работу независимой от резких изменений напряжения в питающей электрической сети. Даже в случае внезапного отключения электропитания стабилизатор напряжения дает оператору возможность спокойно в течение 5 мин выключить прибор. При этом не происходит потери информации как о выполненных исследованиях, так и потери или сбоя самой программы исследований. Это позволяет нормально продолжать работу после включения электропитания и избежать поломок прибора в момент резких скачков напряжения как это случалось с анализаторами других моделей.

Благодаря широкому функциональным возможностям анализатор «Spectrum-Ерх» является не только прибором параклинического обеспечения современной медицины, но и позволяет проводить научно-исследовательскую работу по различным направлениям современной биохимии.

Стоимость прибора с расходными материалами и реактивами на год работы составляет около 130—140 тыс. инв. руб.

Таким образом, биохимические автоматические анализаторы фирмы «Эбботт Лэбораториз» (США) являются приборами, соответствующими современному состоянию медицины и обеспечивающими проведение лабораторных клиничко-биохимических исследований на уровне, отвечающем самым высоким требованиям.

Поступила 16.05.90.

Т. В. Голосова, А. В. Сомова, А. Н. Марголина,  
А. А. Гуляева

### СЕРОДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИЙ, ПЕРЕДАВАЕМЫХ ГЕМОТРАНСМИССИВНЫМ ПУТЕМ (Н1У-1/Н1У-2, НВУ, СМУ, НСУ, НТИ У-1), С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕСТ-НАБОРОВ ФИРМЫ «АВБОТТ LABORATORIES»

Всесоюзный гематологический научный центр Минздрава СССР, Москва

Проблема предупреждения посттрансфузионных вирусных инфекций, в первую очередь вирусных гепатитов и СПИД, — одна из основных задач службы крови, решение которой прежде всего связано с внедрением в практику здравоохранения высокочувствительных и специфичных методов серодиагностики.

Фирма "Abbott", основанная более 100 лет назад, занимает ведущую позицию на мировом рынке вирусных иммунодиагностикомов. В ее арсенале не только иммунодиагностические системы на все маркеры вирусных гепатитов, вируса цитомегалии, но и разработанные в последние годы тесты на СПИД и вирус Т-клеточной лейкемии взрослых. Сегодня в компании занято около 40 тыс. человек, которые разрабатывают, производят и распространяют продукцию в 130 странах. Наше многолетнее сотрудничество с фирмой позволяет говорить о том, что основой основ ее научного коллектива продолжают оставаться стремление к совершенству, упор на новые идеи, внимательное отношение к запросам потребителей и взгляд, устремленный в будущее. На базе ведущих институтов нашей страны (Институт переливания крови Минздрава СССР, Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского АМН СССР) фирма "Abbott" неоднократно проводила научные симпозиумы с привлечением ведущих специалистов. Нельзя не отметить и оперативность, с которой фирма предоставляет своим партнерам каталоги и проспекты научных публикаций, в которых наглядно и доходчиво обобщены новые материалы.

Фирма явилась одним из первых создателей высокочувствительного радиоиммунного метода (РИМ) для определения HBsAg — основного вирусспецифического маркера HB-вирусной инфекции, а в дальнейшем и других маркеров HB-вируса (НВУ).

В рамках кооперативных исследований СССР — США по проблеме «Переливание крови, ее компонентов и предупреждение гепатита В в сердечно-сосудистой хирургии» еще в 1978 г. была изучена частота встречаемости маркеров НВУ в донорской популяции обеих стран. HBsAg был выявлен в 3,8 % безвозмездных доноров в Советском Союзе и у 0,5 % доноров в США. В нашей стране подавляющее большинство доноров с HB-антигемией (89,4 %) имели антитела к ядерному антигену (антиНВс). В то же время НВеAg — маркер инфекционности крови — был обнаружен только в 2,63 %, тогда как анти-НВе — в 81,7 % случаев. Установлено, что доноры, имеющие анти-НВс, очень редко передают гепатит [3], так

как в их организме не происходит репликации НВУ, хотя и они нуждаются в регулярном наблюдении и исследовании функционального состояния печени. В 7,6 % случаев у доноров регистрировались только анти-НВс, наличие которых может являться единственным доказательством текущей или перенесенной НВУ-инфекции. Число иммунных доноров, т. е. лиц с анти-НВс или в сочетании с анти-НВс, составило 33,6 %. По нашим материалам, у 45 % доноров резерва встречался хотя бы один маркер HB-вируса, что свидетельствует о высокой степени подверженности здорового населения этой инфекции. У доноров США суммарная частота маркеров HB-вирусной инфекции составила только 8 %.

Располагая радиоиммунными наборами фирмы, мы провели также изучение заболеваемости посттрансфузионным гепатитом (ПТГ) кардиохирургических больных, госпитализированных во Всесоюзный центр хирургии АМН СССР.

Результаты первичного обследования РИМ 170 больных с сердечно-сосудистой патологией показали высокую частоту инфицирования маркерами HB-вируса уже при поступлении их в стационар. Носительство HBsAg регистрировалось в 11,2 % случаев, число же иммунных больных, у которых тестировались только анти-НВс или анти-НВс в комбинации с анти-НВс и которые переносили гепатит, по-видимому, ранее в инаппарантной, безжелтушной, форме составило 41,7 %. Из 28 больных, оперированных в условиях искусственного кровообращения и подвергшихся динамическому обследованию в течение 1 года, ПТГ развился в 14,3 % случаев. У 1 больного диагностирован гепатит В и у 3 — гепатит ни А ни В. Клинический диагноз у последних был подтвержден серологически отсутствием в динамике болезни как HBsAg, так и нарастания уровня специфических антител (анти-НВс, анти-НВс и анти-НА), если они определялись в предоперационный период. Дополнительным доказательством отсутствия гепатитов В и А явилась принадлежность выявленных у них антител к классу IgG, что свидетельствовало об их «анамнестическом» характере. Заболевание во всех случаях протекало в желтушной форме. Ретроспективный анализ 330 образцов донорской крови, отрицательной по HBsAg при изучении ее методом ВИЭФ и использованной для этих больных во время операции, показал, что в 3,95 % случаев образцы были положительными в РИМ, анти-НВс обнаруживались в 23,1 % образцов.

Для дифференциальной диагностики поражений печени, нередко возникающих у гематологических больных, обследовано РИМ ("Abbott") 240 человек с острыми и хроническими лейкозами. Полученные результаты также свидетельствовали о высокой степени инфицированности маркерами НВУ этого контингента больных. Так, при поступлении в клинику HBsAg был обнаружен у 35 % обследованных, анти-НВс — у 32,9 % и анти-НВс — у 65,8 %. Присутствие в сыворотке крови 84 больных лейкозами HBsAg изолированно или в сочетании с другими маркерами позволяет предположить наличие микстгепатита на фоне лейкозного процесса. У 16,7 % больных лейкозом в сыворотке крови определялись три типа антител, что указывает на перенесенную в про-

Частота обнаружения анти-НСУ у доноров крови различных регионов страны и гематологических больных

Группа обследованных	Количество образцов	Из них позитивных	
		абс.	%
Безвозмездные доноры:			
Москва	150	3	2
Каунас	100	1	1
Рига	100	3	3
Фрунзе	100	7	7
Больные гемофилией	64	48	75

шлом инфекцию и развитие иммунитета. Статистически достоверных отличий в выявлении HBsAg, а также анти-HBs у пациентов в зависимости от формы лейкозов не отмечалось. Анти-HBs значительно чаще ( $p < 0,05-0,01$ ) тестировали при хроническом миелолейкозе. Снижение иммунологической реактивности у больных лейкозами, по-видимому, обусловлено как основным заболеванием, так и проведением им цитостатической терапии.

Принимая во внимание высокую инфицированность маркерами НВУ кардиохирургических и гематологических больных, в эпидемиологическом плане представлялось важным изучить частоту распространения их среди медицинского персонала этих отделений. Результаты исследования с помощью РИМ сывороток крови 72 медицинских работников кардиохирургической и 57 сотрудников гематологической клиник выявили носительство HBsAg в 18,1 и 19,3 % случаев соответственно, анти-HBs — в 44,4 и 54,4 %, анти-HBs — в 61,1 и 68,4 %.

Полученные на этом этапе данные убедительно свидетельствовали о необходимости внедрения чувствительных методов индикации HBsAg в службе крови страны для предупреждения НВУ-инфекции, а также об обеспечении действенных мер для борьбы с внутрибольничным инфицированием путем создания централизованной стерилизации всего медицинского инструментария, а также применения шприцев, систем для взятия и переливания крови одноразового пользования.

В последние годы фирма "Abbott" перешла на выпуск тест-систем для определения маркеров различных вирусных агентов на основе иммуноферментного анализа (ИФА), сравнимого по чувствительности с РИМ и имеющего перед последним ряд преимуществ (безопасность работы вследствие отсутствия радиоактивности, стабильность реагентов).

Вирусный гепатит ни А ни В с парентеральным механизмом передачи инфекции в СССР диагностируется пока путем исключения других сходных заболеваний печени, прежде всего гепатитов А и В, из-за отсутствия серологических тест-систем. В большинстве стран мира на ПТГ ни А ни В приходится значительная доля (70—90 %) среди других гепатитов, вызванных переливанием крови и ее компонентов [5, 12].

Используя коммерческие наборы для обнаружения антител к вирусу гепатита С (анти-НСУ) фирмы "Abbott", мы выборочно изучали частоту инфицированности НС-вирусом безвозмездных доноров крови, проживающих в различных регионах страны, а также больных гемофилией, многократно получавших гемостатическую терапию. Результаты этого исследования представлены в табл. 1.

Как видно из данных табл. 1, частота выявления антител к вирусу гепатита С среди безвозмездных доноров в различных регионах страны колеблется от 1—3 % (Москва, Прибалтика) до 7 % (Средняя Азия). Обращает на себя внимание высокий процент (75 %) регистрации анти-НСУ у больных гемофилией, что еще раз подтверждает необходимость введения тестирования

донорской крови не только на гепатит В, но и гепатит С (ни А ни В).

По сообщениям зарубежных исследований, анти-НСУ у доноров-волонтеров определяются в 0,4—0,7 % случаев в Европе [6, 9] и в 2—7 % в Юго-Восточной Азии [8]. Еще более высокая частота анти-НСУ отмечена у доноров с повышенными уровнями аминотрансфераз (10 %) и у платных доноров (до 20 %) [8, 11]. На высокий процент (от 6 до 82) обнаружения анти-НСУ у больных гемофилией указывает ряд зарубежных авторов [7, 10].

Мы с успехом применяли наборы фирмы "Abbott" на анти-НСУ для распознавания этиологической природы групповых заболеваний гепатитами у доноров крови и плазмы, возникших в разных регионах страны. Эпидемиологическо-серологическое обследование одного из очагов (северный регион) выявило смешанную структуру: удельный вес гепатита С составил 60 %, гепатита В — 36,4 %, остальные случаи были расценены как реактивный гепатит. При анализе другой вспышки (южный регион) на долю НСУ-инфекции пришлось до 90 % заболеваний и только 2 случая были связаны с токсическим гепатитом. Полученные результаты настоятельно требуют в ближайшие годы акцентировать внимание на всестороннем изучении вирусного гепатита С, в том числе на разработке отечественных тест-систем для его серодиагностики.

В числе причин, вызывающих посттрансфузионные осложнения, протекающие с поражением печени и желтухой, кроме вирусных гепатитов, определенное место занимает цитомегаловирусная инфекция (СМУ-инфекция). Доля ПТГ, вызванного СМУ, составляет 2—10 % во всей заболеваемости [2]. Доказана роль СМУ в инфицировании реципиентов костного мозга от доноров — латентных вирусоносителей [1]. Установлен высокий риск заражения вирусом цитомегалии для новорожденных [2].

С использованием наборов фирмы проведен анализ частоты выявления антител к цитомегаловирусу при исследовании 400 образцов сывороток безвозмездных доноров. Суммарные анти-СМУ обнаружены у подавляющего большинства доноров (94,2 %), в то время как анти-СМУ класса IgM, маркер острой или субклинической инфекции, идентифицированы лишь в 4 % случаев. По-видимому, именно лица, в сыворотке крови которых определяются ранние антитела, представляют наибольшую опасность как возможные источники заражения вирусом.

Сравнительная оценка выявления двух видов антител к ВИЧ в комбинированных тест-системах

Характеристика образцов	Число образцов	Тест-системы							
		«Abbott»		«Pharmacia»		«Boehringer mannheim»		«Hoffman-La-Roche»	
		+	-	+	-	+	-	+	-
Положительные по анти-ВИЧ-1 (блот)	25	25	0	25	0	25	0	25	0
Положительные по анти-ВИЧ-2 (блот)	2	2	0	2	0	2	0	2	0
Сомнительные	93	0	93	2	91	1	92	22	71
Отрицательные	58	0	58	0	58	0	58	0	58

С помощью ИФА-наборов «Abbott» мы изучили и возможную частоту распространения на территории СССР вируса HTIV-1, вызывающего Т-клеточную лейкемию взрослых [4]. Были исследованы образцы сывороток от 1000 доноров резерва, проживающих в различных регионах страны (Москва, Прибалтика, Средняя Азия, Дальний Восток) и 115 сывороток от больных с лимфопролиферативными заболеваниями (острые и хронические лейкозы, злокачественные лимфомы, лимфогрануломатоз, миеломная болезнь). Анти-HTIV-1 ни в одном из испытуемых образцов не выявлены.

Заболеемость СПИД после трансфузий крови и ее препаратов диктует необходимость четкой организации исследований для своевременного обнаружения инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) как среди донорской популяции, так и среди реципиентов крови (гематологических больных).

К настоящему времени известно 2 типа вирусов, способных вызывать СПИД — ВИЧ-1 и ВИЧ-2. Оба вируса, имея сложные общие эпитопы ядерных антигенов, различаются по структуре поверхностных гликопротеидов. Отсутствие перекрестной реактивности объясняет неспособность тест-систем на ВИЧ-1 выявлять ВИЧ-2-положительные образцы. В этой связи весьма актуальным является создание комбинированных тест-систем для индикации антител обоих видов вирусов. Фирма «Abbott» выпускает коммерческий иммуноферментный диагностикум на основе использования комбинации рекомбинантных антигенов.

На панели ВИЧ-1- и ВИЧ-2-положительных и отрицательных образцов мы проанализировали чувствительность и специфичность иммунодиагностикума «Abbott» по сравнению с аналогичными комбинированными тест-системами других фирм. В параллельных опытах применяли тест-наборы «Pharmacia», «Hoffmann-La-Roche», «Boehringer mannheim». Результаты исследований представлены в табл. 2.

Полученные данные свидетельствуют о высокой чувствительности испытанных диагностикумов. Все 27 серопозитивных образцов были оценены как «четко положительные». Однако следует подчеркнуть, что наибольшей специфичностью обладал диагностикум фирмы «Abbott», так как из 93 сомнительных образцов по анти-ВИЧ-1 (в некоторых тест-системах) ложно-положительные реакции не зарегистрированы ни в одном случае. В тест-системах «Boehringer mannheim» и «Pharmacia» положительные образцы обнаружены в 1 и 2 случаях соответственно, тогда как в тесте «Hoffmann-La-Roche» 22 сыворотки дали ложно-положительный результат.

При дополнительном тестировании панели сывороток в отечественных иммунодиагностических

системах «Антиген» и «Welcome» (Англия), основанных на ВИЧ-1 рекомбинантных антигенах, выявлены все 25 анти-ВИЧ-1-положительных образца, однако 2 образца, содержавшие анти-ВИЧ-2, были отрицательными. Эти данные еще раз подтверждают отсутствие перекрестной реактивности двух видов антител. Важно отметить, что комбинированные тест-системы не могут дифференцировать ВИЧ-1 и ВИЧ-2 инфекцию. Наличие одной или одновременно двух инфекций можно определить только в подтверждающих тестах, которыми являются реакции иммуноблоттинга или иммунопреципитации.

В заключение следует подчеркнуть, что применение иммунодиагностических тест-систем производства «Abbott» позволяет более углубленно проводить комплексную диагностику маркеров различных вирусных инфекций. Существенным преимуществом иммунодиагностикумов этой фирмы является как возможность тестирования единичных образцов сывороток, так и проведение массового скрининга. Полная комплектация уже готовых к применению реагентов в наборах, хороший дизайн, высококачественное оборудование значительно снижают затраты времени на проведение анализа и обеспечивают безопасность работы. Высокая чувствительность и специфичность тест-систем «Abbott» позволяет использовать их в качестве арбитражного теста для первично-положительных или сомнительных образцов, полученных другими методами.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Мартынова В. А., Лазарева Е. Б., Любимова Л. С. и др. // Гематол. и трансфузиол.— 1986.— № 11.— С. 13—15.
2. Храмова Л. П., Бондаренко М. П., Бондаренко И. А. // Посттрансфузионные гепатиты.— М., 1989.— С. 20.
3. Barker L. F., Iwarson S., Gola T. et al. // Vox Sang.— 1978.— Vol. 34.— P. 310—319.
4. Blattner W. A., Nomura A., Clark J. W. et al. // Proc. Nat. Acad. Sci.— 1986.— Vol. 83.— P. 4895—4898.
5. Bove J. K. // New Engl. J. Med.— 1987.— Vol. 317.— P. 242—244.
6. Laufs R., Polywka S. et al. // International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease.— Houston, Texas, 1990.— P. 162.
7. Lelie P. N., Mauser-Bunschoten E. P., Barker E. // Ibid.— Houston, Texas, 1990.— P. 152.
8. Lin-Chu M., Isai S. J. L., Watanabe J. et al. // Ibid.— Houston, Texas.— P. 163.
9. Maisonneuve P., Aymard J. P., Janot C. // Lancet.— 1989. N 2.— P. 796—797.
10. Maisonneuve P., Laurian Y. et al. // International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease.— Houston, Texas, 1990.— P. 152.
11. Schmidt W., Hutten P. et al. // Ibid.— P. 163.
12. Wick M. R., Moore S., Taswell H. F. // Transfusion.— 1985.— Vol. 25.— P. 93—101.

О. М. Дронова, М. И. Жабина, Е. В. Дюжикова,  
Н. С. Багирова, Е. Н. Соколова

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АВТОМАТИЗИРОВАННОЙ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ «АВАНТАЖ» ФИРМЫ «АВВОТТ LABORATORIES» ПРИ ИЗУЧЕНИИ ЭТНОЛОГИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ВНУТРИБОЛЬНИЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ В ОНКОЛОГИЧЕСКОЙ КЛИНИКЕ

НИИ клинической онкологии ВОНЦ АМН СССР, Москва

Проблема борьбы с внутрибольничными инфекциями (ВБИ), являющимися в настоящее время одной из основных причин заболеваемости и смертности госпитализированных больных, особенно остро стоит в онкологическом стационаре. Тяжесть основного заболевания, агрессивная противоопухолевая терапия, обширные, длительные оперативные вмешательства предрасполагают онкологических больных к развитию инфекционных осложнений [2, 6—8].

В системе мер по профилактике и лечению ВБИ одно из ведущих мест принадлежит бактериологической диагностике гнойно-воспалительных осложнений, изучению характера их возбудителей.

Известно, что в зависимости от профиля стационара в нем формируется своя экосистема с преобладанием отдельных видов микроорганизмов [1, 3, 5]. Изучение особенностей таксономической структуры возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний в различных клиниках и слежение за изменением их биологических свойств, и в первую очередь антибиотикорезистентности, позволяют вырабатывать подходы к проведению адекватной антибиотикопрофилактики и антибиотикотерапии инфекционных осложнений, а также служат основой для проведения эпидемиологических наблюдений с целью пресечения путей распространения возбудителей ВБИ в стационаре.

Однако точная идентификация микроорганизмов может быть осуществлена только при наличии возможности подробного изучения культуральных и биохимических свойств микроорганизмов с использованием широкого набора биохимических тестов и компьютерной обработки полученных данных. В связи с этим работа на автоматическом микробиологическом анализаторе «Авантаж» фирмы «Abbott» (США) представляется весьма перспективной.

**Методика.** Изучены культуральные и биохимические свойства 1638 штаммов микроорганизмов, выделенных из патологических материалов от онкологических больных, имевших гнойно-воспалительные осложнения. Бактериологические исследования осуществлялись в соответствии с методиками, принятыми в лаборатории [4].

Идентификацию грамотрицательных микроорганизмов проводили на микробиологическом анализаторе «Авантаж» («Abbott», США). В отдельных сомнительных случаях параллельно изучали биохимические свойства грамотрицательных микроорганизмов с использованием питательных сред, изготовленных в лаборатории, с последующей идентификацией по кодовой системе фирмы «Hoffmann-La-Roche» (Австрия).

Проведено бактериологическое исследование 432 образцов мочи для выявления бактериурии. Скрининг мочи на автоматическом анализаторе во всех случаях дополнялся посевом на 5 % кровяной агар неразведённой мочи каплями. Посевы инкубировали в эксикаторе при 37 °С в течение 48 ч. При положительном результате скрининга проводили посев хранящегося до этого в холодильнике образца мочи методом серийных разведений. При отрицательном результате скрининга,

но наличии сливного роста микроорганизмов на кровяном агаре проводили дальнейшее исследование и запрашивали мочу для повторного анализа

**Результаты и обсуждение.** Данные изучения таксономической структуры возбудителей гнойно-воспалительных осложнений у онкологических больных свидетельствуют о значительной роли грамотрицательных микроорганизмов в этиологии инфекционных процессов — 32,5 % приходится на энтеробактерии и 17 % на неферментирующие грамотрицательные палочки (табл. 1). Использование автоматического микробиологического анализатора позволило существенно расширить сведения о характере возбудителей, уточнить их принадлежность к определенным таксономическим единицам. Всего в настоящее время удалось идентифицировать 15 родов и 39 видов грамотрицательных палочек, выделенных из патологических материалов при гнойно-воспалительных процессах, что значительно превосходит данные, получаемые при постановке классического «пестрого ряда».

Из достоинств анализатора можно отметить существенное сокращение времени, необходимого для биохимической идентификации, и достаточно высокую надежность и воспроизводимость результатов. Наиболее уязвимыми и вариабельными, по нашим наблюдениям, являются тесты усвоения цитрата и чувствительности к полимиксину В; в ряде случаев не совпадали при перепроверке тесты ферментации отдельных углеводов и аминокислот. В целом результаты идентификации микроорганизмов вполне удовлетворительные и позво-

Таблица 1  
Таксономическая структура возбудителей гнойно-воспалительных осложнений в онкологической клинике

Микроорганизм	Число дифференцируемых видов	Частота выделения	
		абс.	%
<i>Грамотрицательные палочки</i>			
<i>Escherichia coli</i>	1	146	8,9
<i>Citrobacter</i> spp.	3	37	2,3
<i>Edwardsiella tarda</i>	1	3	0,2
<i>Klebsiella</i> spp.	4	128	7,8
<i>Enterobacter</i> spp.	5	110	6,7
<i>Serratia</i> spp.	3	14	0,9
<i>Hafnia alvei</i>	1	3	0,2
<i>Salmonella</i> spp.	6	4	0,25
<i>Proteus</i> spp.	2	56	3,4
<i>Morganella morganii</i>	1	24	1,5
<i>Providencia</i> spp.	3	6	0,4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	167	10,1
<i>Pseudomonas</i> spp.	4	34	2,1
<i>Acinetobacter</i> spp.	3	69	4,2
<i>Aeromonas</i>	1	10	0,6
Всего...	39	811	49,5
<i>Грамположительные кокки</i>			
<i>Staphylococcus</i> spp.	3	438	26,7
<i>Streptococcus</i> spp.	4	212	12,9
<i>Enterococcus</i>	2	129	7,9
Всего...	9	779	47,5
Прочие...	—	49	3,0
Всего...	—	1639	100,0

Таблица 2

Сравнение результатов выявления бактериурии на 5 % кровяном агаре и микробиологическом анализаторе «Авантаж»

Микроорганизм	Кровяной агар	Анализатор	Частота несоответствия результатов, %
	рост	Negative	
<i>P. aeruginosa</i>	31	6	19,3
<i>Acinetobacter</i>	4	1	25,0
<i>E. coli</i>	12	—	—
<i>Proteus</i>	26	—	—
<i>Providencia</i>	8	1	12,5
<i>Klebsiella</i>	23	3	13,0
<i>Serratia</i>	12	—	—
<i>Enterobacter</i>	7	—	—
<i>Citrobacter</i>	3	8	—
<i>Edwardsiella</i>	1	1	—
<i>Staphylococcus</i>	10	1	10,0
<i>Streptococcus</i>	9	5	55,6
<i>Enterococcus</i>	24	3	12,5
<i>Candida</i>	2	1	50,0
Всего...	172	22	12,8
Бактериурии нет	Роста нет	Positive нет	
Всего...	260	10	3,8
Всего исследований...	432	32	7,4

ляют подробно расшифровывать спектр микроорганизмов, циркулирующих в стационаре и вызывающих ВБИ.

Автоматизированное выявление клинически значимой бактериурии в условиях стационара на 1000 коек имеет серьезные положительные стороны — это и уменьшение трудоемкости, и сокращение времени проведения анализа, и снижение материальных затрат, требующихся для проведения исследования общепринятыми методами. В связи с этим возможность выявления бактериурии на автоматическом микробиологическом анализаторе представлялась перспективной. Однако для подтверждения достоверности получаемых результатов мы осуществляли параллельный посев исследуемых образцов мочи на 5 % кровяной агар с последующей инкубацией в микроаэрофильных условиях. Результаты исследования представлены в табл. 2. Данные свидетельствуют о целесообразности осуществления контрольных высевов на плотную питательную среду, поскольку в 12,8 % случаев были получены ложноотрицательные результаты, которые могли ввести в заблуждение как микробиологов, так и клиницистов. Особенно часто отрицательные результаты получены при мочевых инфекциях, вызванных медленно растущими микроорганизмами — стрептококками, дрожжеподобными грибами, неферментирующими грамотрицательными палочками. Кроме того, нельзя не учитывать того фактора, что нередко для бактериологического исследования поступает моча после антибактериальной химиотерапии, и тогда мы не вправе пренебрегать и бактериурией ниже 100 000 КОЕ/мл, особенно при повторном выделении возбудителя.

Тем не менее тест на выявление бактериурии, несомненно, весьма полезен и позволяет существ-

венно экономить и время персонала, и питательные среды, поскольку при стандартной методике для первичного посева мочи методом серийных разведений требуются 3 чашки кровяного агара и 1 пробирка сахарного бульона, в то время как при использовании автоматического анализатора дополнительный посев осуществляется на 1 чашку без предварительных разведений. Считаем, что во избежание пропуска случаев не выявляемой автоматическим методом бактериурии такой параллельный посев на полноценную питательную среду с последующей инкубацией в условиях пониженного содержания кислорода необходим.

Таким образом, использование автоматизированной микробиологической системы «Авантаж» способствует оптимизации процесса бактериологических исследований, значительно сокращает сроки выполнения анализов, позволяет экономить рабочее время персонала лаборатории, уменьшает расход питательных сред и посуды.

Осуществляемая на анализаторе подробная идентификация микроорганизмов до вида с указанием биохимического кода позволяет не только расшифровать этиологическую структуру гнойно-воспалительных процессов, но и представляется весьма ценной и важной в эпидемиологическом отношении, поскольку подобные сведения позволяют проследивать пути распространения возбудителей госпитальной инфекции и соответственно разрабатывать меры по их пресечению.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Внутрибольничные инфекции: Руководство по лабораторным методам исследования / Под ред. М. Т. Паркера. — Копенгаген, 1979.
2. Дронова О. М. // Антибиотики. — 1990. — Т. 35, № 9. — С. 42—45.
3. Островский А. Д., Родионова М. А., Шабанова С. В. и др. // Актуальные вопросы клинической микробиологии в инфекционной клинике. — М., 1988. — Ч. 2. — С. 3—4.
4. Смолянская А. З., Гриненко Г. И., Дронова О. М. и др. Бактериологическая диагностика инфекционных осложнений у онкологических больных: Метод. рекомендации. — М., 1988.
5. Eortic International Antimicrobial Therapy Cooperativ Grop // *New Engl. J. Med.* — 1987. — Vol. 317, N 27. — P. 1692—1698.
6. *Klastersky J.* // *Rev. Infec. Dis.* — 1983. — N 5. — Suppl. — P. 21—31.
7. *Marcus R. E., Goldman J. M.* // *Brit. Med. J.* — 1986. — N 293. — P. 406—408.
8. *Mortimer J. E., Blinder M., Black D. et al.* // *Curr. Ther. Res.* — 1987. — Vol. 42, N 1. — P. 25—33.

Поступила 03.12.90

© Б. П. БОГОВСКИЙ, Е. Ю. БАРМАНОВА, 1991

УДК 615.2/3.015.4.07

Б. П. Боговский, Е. Ю. Барманова

#### СРАВНЕНИЕ ДВУХ МЕТОДОВ ДЛЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО МОНИТОРИНГА: ФПИА (ТДх) И ЭМИТ

Лаборатория клинической фармакологии I Московского медицинского института им. И. М. Сеченова

Одной из основных задач современной медицины является повышение качества фармакотерапии у каждого конкретного больного. Для постоянно текущей оценки хода лечения и возможности скорой его коррекции необходим терапевтический

лекарственный мониторинг, заключающийся в контроле за концентрацией лекарственных средств в организме с целью оптимизации и индивидуализации лечения.

Следует подчеркнуть, что контроль за концентрацией целесообразен лишь для тех препаратов, клинический эффект которых коррелирует с их концентрацией в организме больного. Основными показаниями для терапевтического лекарственного мониторинга являются: узкий терапевтический диапазон с опасностью тяжелых для больного последствий из-за передозировки лекарства или недостаточного активного лечения; большая межиндивидуальная вариабельность концентраций лекарства в крови после приема его стандартной дозы; наличие у больного патологических изменений, могущих непредсказуемо повлиять на фармакокинетику лекарственных средств [2].

Важнейшей составной частью терапевтического лекарственного мониторинга является выбор методики анализа. Методика должна позволять быстро получать ответ и удовлетворять высоким требованиям к качеству [4, 7]. Наиболее распространенными в настоящее время методикам экспресс-определения концентрации лекарственных средств являются 2 метода гомогенного иммуноанализа: флюоресцентно-поляризационный иммуноанализ — ФПИА (FPIA — Fluorescence Polarization Immunoassay), осуществленный в автоматическом анализаторе TDx [6], и иммуноферментный метод ЭМИТ (EMIT — Enzyme Multiplied Immunotechnique) [3].

Мы предприняли сравнительное исследование параметров контроля качества 2 упомянутых методов: ФПИА (TDx) — реактивы и анализатор фирмы «Эбботт Лэбораториз» и ЭМИТ — реактивы фирмы «Syva» и анализатор «Centrifichem 600» фирмы «Baker Instruments». В настоящей статье приводятся результаты оценки качества определения концентрации теофиллина и хинидина.

Методика. Коммерческие наборы реактивов для определения концентрации теофиллина и хинидина методом ФПИА (TDx) предоставлены фирмой «Эбботт Лэбораториз». Наборы в соответствии с инструкцией изготовителя могут применяться только с оригинальной аппаратурой той же фирмы. Коммерческие наборы реактивов для определения концентрации теофиллина и хинидина методом ЭМИТ предоставлены фирмой «Syva». Эти реактивы в соответствии с инструкцией изготовителя могут быть использованы как с оригинальной аппаратурой, так и с аппаратами ряда других фирм, в том числе анализаторами «Centrifichem» фирмы «Baker Instruments».

Для проведения ФПИА-анализов использован автоматический анализатор TDx фирмы «Эбботт Лэбораториз». Анализ ЭМИТ проводили на автоматическом биохимическом анализаторе «Centrifichem 600» фирмы «Baker Instruments», снабженном программами для проведения анализов ЭМИТ. Работу выполняли в соответствии с инструкцией использования реактивов ЭМИТ в системе «Centrifichem».

Работу проводили с коммерческими наборами контрольных сывороток фирмы «Эбботт Лэбораториз» с известными значениями концентрации низкого, среднего и высокого уровня. Для теофиллина эти значения составляли 7,0, 12,0 и 26,0 мкг/мл, а для хинидина — 1,5, 3,0 и 6,0 мкг/мл. Кроме того, для параллельного определения 2 методами использовали сыворотки больных, принимающих по соответствующим показаниям препараты теофиллина или хинидина и имеющих в крови различные уровни этих лекарственных средств.

После проведения калибровки обоих анализаторов по обоим препаратам с помощью соответствующих калибровочных проб и оценки качества калибровочных кривых приступали в тот же день к сравнительному определению концентрации теофиллина и хинидина. С целью оценки сходимости результатов (в одной

постановке — intraassay) в карусели анализаторов помещали несколько (8—11) образцов каждой из контрольных сывороток для проведения одновременного определения в них концентрации теофиллина или хинидина. Воспроизводимость результатов (в разных постановках — interassay) оценивали при анализе нескольких (4—8) повторных исследований тех же контрольных сывороток в разные дни. Для исследования корреляции между результатами 2 исследуемых методов и решения уравнения линейной регрессии использовали также результаты параллельного анализа сывороток больных.

Статистическую обработку данных, вычисление средних величин ( $\bar{X}$ ), стандартного отклонения (SD), коэффициента вариации (КВ) при исследовании сходимости и воспроизводимости результатов [1], а также вычисление коэффициента корреляции  $r$  и решение уравнений линейной регрессии типа  $Y = a + b \cdot X$  проводили с помощью программируемого микрокалькулятора Hewlett-Packard 41CV.

Результаты и обсуждение. В табл. 1 приведены результаты определения концентрации контрольных сывороток теофиллина в одной постановке. С помощью TDx получены значительно более сходимые результаты по всем 3 значениям контрольных сывороток (КВ 2,8; 3,5; 1,4 %), чем с помощью ЭМИТ (КВ 9,1; 3,0; 12,5 %). Точность измерений, т. е. близость полученных результатов истинному значению контрольных сывороток («выход»), у метода TDx составляла более 95 %, тогда как метод ЭМИТ был значительно менее точным, систематически завышая концентрацию теофиллина приблизительно в 1,5 раза по всему диапазону концентраций.

В табл. 2 приведены результаты определения концентрации контрольных сывороток теофиллина в разных постановках, имеющие такой же характер, как и в табл. 1. Воспроизводимость измерений обоими методами несколько ниже, точность измерений практически такая же, как при анализе в одной постановке.

Аналогичным образом составлены табл. 3 и 4 значений концентрации контрольных сывороток хинидина.

При оценке сходимости (см. табл. 3) измерений концентрации хинидина методом TDx КВ не пре-

Таблица 1  
Определение теофиллина в одной постановке (intraassay)

Концентрация теофиллина в контрольных сыворотках, мкг/мл	Метод	$\bar{X}$ , мкг/мл	SD, мкг/мл	КВ, %	n	«Выход», %
7,0	TDx	6,76	0,19	2,8	11	96,6
12,0	TDx	11,54	0,40	3,5	11	96,1
26,0	TDx	24,93	0,34	1,4	11	95,9
7,0	ЭМИТ	10,31	0,94	9,1	10	147,3
12,0	ЭМИТ	18,68	0,57	3,0	10	155,7
26,0	ЭМИТ	39,41	4,91	12,5	8	151,6

Таблица 2  
Определение теофиллина в разных постановках (interassay)

Концентрация теофиллина в контрольных сыворотках, мкг/мл	Метод	$\bar{X}$ , мкг/мл	SD, мкг/мл	КВ, %	n	«Выход», %
7,0	TDx	6,72	0,57	8,5	8	95,9
12,0	TDx	11,45	0,43	3,8	8	95,4
26,0	TDx	25,11	0,49	2,0	8	96,6
7,0	ЭМИТ	9,91	0,73	7,2	4	141,5
12,0	ЭМИТ	15,87	1,95	12,3	4	132,2
26,0	ЭМИТ	34,59	4,22	12,2	4	133,0

Таблица 3

## Определение хинидина в одной постановке (intraassay)

Концентрация хинидина в контрольных сыворотках, мкг/мл	Метод	X, мкг/мл	SD, мкг/мл	КВ, %	n	«Выход», %
1,5	TDx	1,57	0,03	1,8	10	104,7
3,0	TDx	3,17	0,06	1,9	10	105,7
6,0	TDx	6,31	0,16	2,5	10	105,2
1,5	ЭМИТ	1,14	0,08	6,7	10	76,0
3,0	ЭМИТ	2,11	0,11	5,1	10	70,3
6,0	ЭМИТ	3,93	0,25	6,2	10	65,5

Таблица 4

## Определение хинидина в разных постановках (interassay)

Концентрация хинидина в контрольных сыворотках, мкг/мл	Метод	X, мкг/мл	SD, мкг/мл	КВ, %	n	«Выход», %
1,5	TDx	1,63	0,06	3,4	5	108,7
3,0	TDx	3,17	0,07	2,1	5	105,7
6,0	TDx	6,29	0,20	3,1	5	104,8
1,5	ЭМИТ	1,23	0,18	14,4	5	82,0
3,0	ЭМИТ	2,36	0,22	9,4	5	78,7
6,0	ЭМИТ	4,32	0,54	12,6	5	72,0

вышел 2,5 %, тогда как у метода ЭМИТ КВ не опускался ниже 5 %. Точность TDx при определении хинидина также была существенно выше — «выход» не превышал 106 %, а ЭМИТ систематически занижал результаты на 25—35 %.

Анализ результатов разных постановок (см. табл. 4) определения концентрации хинидина выявил аналогичные соотношения — воспроизводимость метода TDx выше (КВ до 3,5 %), точность у TDx также выше («выход» 104,8—108,7 %), чем у ЭМИТ (72,0—82,0 %).

При оценке параметров качества метода о хорошей сходимости результатов свидетельствует КВ ниже 5 %, воспроизводимости — КВ ниже 10 %. Точность, оцениваемая по «выходу», составляет у хорошего метода определения 90—110 %. Таким образом, по всем этим параметрам TDx обладает высоким качеством, что согласуется с данными других исследователей [4—8], тогда как сочетание ЭМИТ+«Centrifichem 600» значительно уступает в качестве и большинству из предъявляемых критериев не удовлетворяет. Следует отметить, что в предыдущих исследованиях параметры контроля качества метода ЭМИТ были значительно лучше, хотя, как правило, уступали TDx [5, 6, 8]. Вопрос о причинах неточности метода (реактивы, аппарат или их сочетание) остается открытым.

Таблица 5

## Сравнение методов TDx (X) и ЭМИТ+«Centrifichem 600» (Y) определения теофиллина и хинидина

Вещество	r	n	a	b
Теофиллин	0,9478	92	1,53	1,30
	0,9468	45	2,64	1,15
Хинидин	0,9664	78	0,23	0,64
	0,9622	24	0,24	0,65

Примечание. r — коэффициент корреляции, n — количество исследований, a, b — параметры уравнения.

В табл. 5 приведены значения параметров уравнения линейной регрессии типа  $Y=a+b \cdot X$  и коэффициенты корреляции результатов определения концентрации теофиллина и хинидина 2 сравниваемыми методами. Корреляция между методами выявлена достаточно высокая. Параметры уравнения существенно отличаются от идеальных для данного случая значений  $a=0$ ,  $b=1$ . Они могут служить для коррекции менее точных значений (ЭМИТ+«Centrifichem 600») при необходимости получения истинных значений концентрации препаратов или сравнения их с результатами метода TDx.

## Выводы

1. Проведена сравнительная оценка контроля качества при определении концентрации теофиллина и хинидина методом ФПИА (TDx) с использованием оригинальных реактивов и анализатора фирмы «Эбботт Лэбораториз» (США) и методом ЭМИТ с использованием сочетания оригинальных реактивов (фирма «Syva») и анализатора «Centrifichem 600» (фирма «Baker Instruments»).

2. Метод TDx превосходит по результатам метод ЭМИТ в использованном сочетании.

3. Метод TDx соответствует самым строгим требованиям к сходимости, воспроизводимости и точности измерений концентрации теофиллина и хинидина.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Власов В. В. Эффективность диагностических исследований. — М., 1988.
2. Румянцев Д. О., Пиотровский В. К. // Всесоюзная конф. по фармакокинетике «Фармакокинетические исследования при создании и применении лекарственных средств»: Материалы. — Каунас, 1987. — С. 36—38.
3. Basriani R. J. // Antibiot. Chemother. — 1979. — Vol. 26. — P. 89—97.
4. Griffiths A., Hebdige S., Perucca E. et al. // Ther. Drug Monit. — 1980. — Vol. 2. — P. 51—59.
5. Jolley M. E. // J. analyt. Toxicol. — 1981. — Vol. 5, N 4. — P. 236—240.
6. Jolley M. E., Stroupe S. D., Schwenzer R. S. et al. // Clin. Chem. — 1981. — Vol. 27, N 9. — P. 1575—1579.
7. Plant D., Silberman J. // Amer. J. med. Technol. — 1983. — Vol. 49. — P. 213—218.
8. Witebski F. G., Sliva C. A., Selepak S. T. // J. clin. Microbiol. — 1983. — Vol. 18, N 4. — P. 890—894.

Поступила 23.07.90

## EFFICIENCY OF FLUORESCENCE-POLARIZATION IMMUNOASSAY AND ENZYME IMMUNOASSAY IN THERAPEUTIC DRUG MONITORING

B. P. Bogovsky, E. Yu. Barmanova

Laboratory of Clinical Pharmacology, I. M. Sechenov Medical Academy, Moscow

Two procedures of immunoassay used for therapeutic drug monitoring were studied: fluorescence-polarization immunoassay using specific reagents and analyzer TDx ("Abbott") and enzyme immunoassay using specific reagents from "Syva" and analyzer Centrifichem 600 ("Baker Instr"). Control blood sera containing known concentrations of theophylline and quinidine as well as blood sera from patients treated with these drugs were analyzed within low, middle and high ranges. The data of both these procedures correlated at the high rate ( $r=0.93-0.96$ ). Identity, reproducibility and accuracy of the theophylline and quinidine concentrations measurement using fluorescence-polarization immunoassay constituted 1.4-3.5 %, 2.0-8.5 % and 95-109 %, respectively, thus satisfying the high requirements and were superior as compared with corresponding parameters of the enzyme immunoassay.

В. Н. Синюхин, Н. П. Николаева, И. С. Ярмолинский, А. Ф. Даренков

## ИНФОРМАТИВНОСТЬ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИКЛОСПОРИНА А И ЕГО МЕТАБОЛИТОВ ПРИ ЕГО МОНИТОРИНГЕ В КРОВИ БОЛЬНЫХ С ТРАНСПЛАНТИРОВАННОЙ ПОЧКОЙ

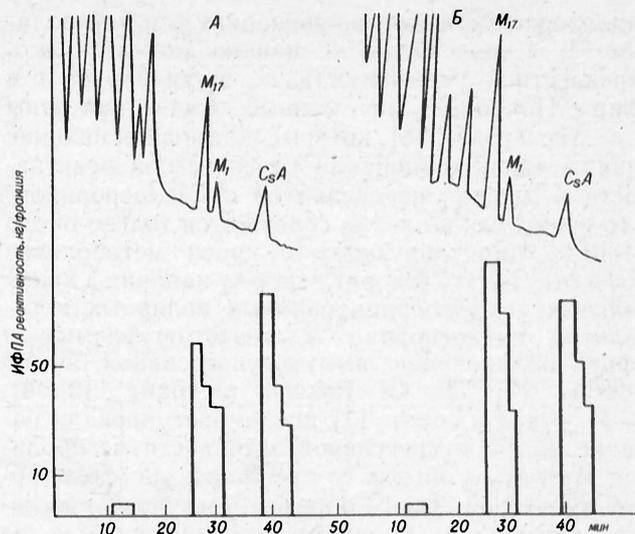
НИИ урологии Минздрава РСФСР, Москва

Циклоспорин является эффективным иммуносупрессивным препаратом, нашедшим широкое применение в современной трансплантологии [1, 4]. К сожалению, при лечении этим лекарственным соединением описаны случаи возникновения гипертензии, проявления нефротоксического и гепатотоксического действия, отсутствия корреляции между терапевтическим эффектом и назначенной дозой. В связи с этим его назначение возможно только при постоянном мониторинге концентрации в крови больных, трактовка результатов которого представляет довольно сложную задачу [2]. Это в первую очередь связано с наличием терапевтической активности у некоторых продуктов метаболизма циклоспорина, индивидуальным метаболическим профилем препарата у каждого больного, отсутствием хорошего метода детектирования, позволяющего провести количественное определение как основного соединения, так и всех продуктов его метаболизма, до сих пор не изученных до конца.

Мы поставили перед собой задачу сравнить информативность методов определения циклоспорина (ВЭЖХ и иммунофлюоресцентного поляризационного анализа) при мониторинге концентрации этого соединения в крови больных с пересаженной почкой.

**Методика.** Исследование проведено на 108 больных в возрасте 13—55 лет с пересаженной почкой. Циклоспорин применяли в суточной дозе 2—7 мг/кг внутрь. Суточная доза метилпреднизолона составляла 1 мг/кг и затем постепенно снижалась до 0,1 мг/кг. Кровь собирали в пробирки за 5 мин до очередного приема препарата. Анализ концентрации препарата в цельной крови проводили методом иммунофлюоресцентного поляризационного анализа (ИФПА) на приборе TDx («Эбботт Лэбораториз», США) по стандартной методике этой фирмы. Определение концентрации циклоспорина методом ВЭЖХ проводили по уже описанной методике [7]. Эфирные экстракты гемолизированной крови высушивали в токе азота, ресуспендировали в 100 мкл подвижной фазы и хроматографировали на жидкостном хроматографе SP-8000B («Spectrophysics») на колонке Polygosil 60 D10 CN фирмы «Chrompack» (Голландия) (250×4,6 мм) при температуре 65 °С. В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрил—вода в соотношении 40:60 (по объему). Использовался УФ-детектор той же фирмы, длина волны 215 нм. Для определения перекрестной реактивности метаболитов циклоспорина в течение всего процесса хроматографирования собирали фракции элюата с колонки, каждая объемом 0,5 см<sup>3</sup>, которые затем высушивали, ресуспендировали в 0,5 мл «Dilution Buffer» для прибора TDx и детектировали на этом же приборе. Гемолизированную кровь после экстракции эфиром повторно анализировали методом ИФПА на наличие перекрестно реагирующей реактивности.

**Результаты и обсуждение.** При исследовании фракций, полученных при пропускании экстрактов проб через колонку жидкостного хроматографа, было показано, что основная часть



ИФПА реактивности фракций, собранных при ВЭЖХ экстрактов крови больных, получавших циклоспорин А (CsA).

А — больной из 1-й группы, б — больной из 2-й группы (объяснение в тексте).

перекрестной активности при использовании ИФПА приходится на фракции, предшествующие выходу циклоспорина А, что соответствует выходу метаболитов М<sub>17</sub> и М<sub>1</sub>. Во фракциях, собранных после выхода циклоспорина А, перекрестной активности не было обнаружено (см. рисунок). При ИФПА цельной крови после проведения эфирной экстракции циклоспорина и его основных метаболитов [6] обнаружилось, что перекрестная активность остатка составляет 14—32 % от исходной реактивности крови.

Всех исследованных больных можно условно разделить на 2 группы. В 1-й группе реактивность распределялась следующим образом: реактивность циклоспорина А превышала перекрестную реактивность фракций метаболитов М<sub>1</sub> и М<sub>17</sub> в элюатах после жидкостной хроматографии, перекрестная реактивность фракции метаболитов, неэкстрагируемых в эфир из крови, не превышала 14—24 % от общей реактивности. Во 2-й группе реактивность распределялась следующим образом: реактивность циклоспорина А была в 1,5—2 раза меньше перекрестной реактивности фракций метаболитов М<sub>1</sub> и М<sub>17</sub> в элюатах после жидкостной хроматографии; перекрестная реактивность фракции метаболитов, неэкстрагируемых в эфир из крови, не превышала 22—32 % от общей реактивности. Оказалось, что больные 2-й группы имели самое благополучное клиническое течение посттрансплантационного периода, который протекал без реакций отторжения.

Как видно из полученных данных, определение содержания циклоспорина А методом ИФПА на приборе TDx складывается как из концентрации собственно циклоспорина А, так и из перекрестной реактивности его метаболитов. До сих пор не идентифицирована структура всех метаболитов, ответственных за перекрестную реактивность. Так, Т. G. Rosano и соавт. [7] продемонстрировали, что из числа метаболитов, экстрагируемых в эфир, наибольшей перекрестной реактивностью обладает метаболит М<sub>17</sub>. Те же авторы установили, что 95 % реактивности эфирного экстракта крови при-

надлежит собственно циклоспоринолу А и метаболитам  $M_1$  и  $M_{17}$ . Согласно нашим данным, часть перекрестной реактивности не экстрагируется в эфир. Подобные же данные были получены Г. С. Yee и соавт. [8], которые установили наличие значительного количества перекрестной реактивности в плазме, не связанной с циклоспорином, в то время как в плазме содержится только около 5—10 % циркулирующих в крови метаболитов  $M_{17}$  и  $M_1$ . Все это говорит в пользу наличия в крови больных неидентифицированных полярных метаболитов циклоспоринолу А, неэкстрагируемых в эфир, обладающих иммуносупрессивной активностью [7]. Т. G. Rosano и соавт. [5, 6], В. M. Freed и соавт. [3] продемонстрировали наличие иммуносупрессивной активности метаболитов  $M_1$  и  $M_{17}$  в опытах со смешанной лимфоцитарной культурой. Таким образом, иммуносупрессивная активность, по-видимому, складывается не только из действия собственно циклоспоринолу А, но и его метаболитов. Наши клинические исследования подтверждают это предположение: у больных с высокой перекрестной активностью, приходящейся на фракции метаболитов циклоспоринолу, не было случаев отторжения.

Наличие иммуносупрессивной активности у метаболитов циклоспоринолу значительно осложняет трактовку результатов мониторинга этого соединения. С одной стороны, если учитывать концентрацию только исходной молекулы невозможно учесть иммуносупрессивный и токсический эффект метаболитов, с другой — до сих пор неизвестна структура многих продуктов биотрансформации циклоспоринолу А и не изучена их фармакологическая активность; наконец, метаболический профиль и чувствительность к препарату индивидуальны у каждого больного. Наложение друг на друга перечисленных факторов заставляет рассматривать общепринятые нормы концентрации циклоспоринолу в крови только как ориентировочные. Выход из этого положения только один: на основании данных мониторинга концентрации и клинической картины больного разрабатывать строго индивидуальные критерии трактовки результатов. В своей работе мы придерживались этих принципов в выборе метода определения концентрации циклоспоринолу и трактовке полученных данных. В случае стандартного клинического течения на фоне постоянного набора лекарственных препаратов мы ориентировались на ИФПА определения циклоспоринолу А и эмпирическим путем устанавливали для этого больного индивидуальную норму содержания циклоспоринолу в крови. На этом фоне мы определяли содержание циклоспоринолу методом ВЭЖХ, оценивали вклад его метаболитов в перекрестную реактивность ИФПА, определяли перекрестную реактивность в плазме после ее эфирной экстракции. При изменении сочетанной терапии или клинической ситуации мы повторяли все эти исследования. В тех случаях, когда ИФПА давал высокие концентрации и вклад метаболитов был также высоким (при условии удовлетворительного состояния трансплантата), мы исходили из позиций классической токсикологии, согласно которым продукты метаболизма обладают меньшей токсичностью, чем исходный продукт, не опасались нефротоксического эффекта и продолжали терапию. При боль-

шом повышении концентрации исходного соединения и нарушении соотношения метаболиты — циклоспоринолу в пользу циклоспоринолу мы всегда старались разобраться в причинах этого явления.

При трактовке результатов в отношении иммуносупрессивного эффекта препарата мы исходили из того, что почти все метаболиты циклоспоринолу влияют на иммунитет, стремились придерживаться индивидуальной нормы для больного при мониторинге циклоспоринолу методом ИФПА, всегда учитывая соотношение метаболитов к неметаболизированному препарату и стараясь поддерживать его на постоянном уровне.

Таким образом, предпосылкой успешного мониторинга концентрации циклоспоринолу в крови больных с пересаженной почкой является детектирование не только исходного соединения, но и его метаболитов, определение соотношения циклоспоринолу и его метаболитов. Эти показатели следует, по-видимому, устанавливать для каждого конкретного больного путем сопоставления динамики индивидуальных клинических показателей и соответствующих данных мониторинга циклоспоринолу. Ориентировка на популяционные нормативы снижает прогностическую ценность мониторинга. Для определения концентрации циклоспоринолу и его метаболитов следует использовать различные методические подходы, исходя из конкретной клинической задачи. Для рутинного мониторинга больше всего подходит определение концентрации циклоспоринолу и его метаболитов с использованием неспецифических китов типа «Циклоспоринолу и его метаболиты» для прибора ТДх фирмы «Эбботт Лэбораториз» (США), дающих интегральную информацию о циклоспоринолу и его метаболитах. Однако в процессе мониторинга концентрации циклоспоринолу этой информации бывает зачастую недостаточно. В этих случаях следует применить ВЭЖХ с целью разделения циклоспоринолу и его метаболитов и вычисления соотношения метаболиты — циклоспоринолу путем определения перекрестной реактивности в собранных элюатах и крови после экстракции. Обнадешивают сообщения о специфическом методе радиоиммунологического определения только циклоспоринолу с помощью «sand-immun-kit specific radioimmuno assay», наличие которого может в значительной степени ускорить время количественного определения исходного соединения. Так или иначе, но только исчерпывающая информация как о содержании самого циклоспоринолу, так и его метаболитов отражает истинную ситуацию в организме больного и весьма важна для оценки проводимой терапии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Beverige T. // Progr. Allergy.— 1986.— Vol. 38.— P. 269—292.
2. Burekart G. T. // A Textbook for the Clinical Application of Therapeutic Drug Monitoring / Ed. W. T. Teylir, M. H. Diers.— Caviness, 1986.— P. 339—351.
3. Freed B. M., Rosano T. G., Quick C., Lempert N. // Transplant. Proc.— 1987.— Vol. 19.— P. 1223—1226.
4. Land W., Castro L. A., White D. T. G. et al. // Progr. Allergy.— 1986.— Vol. 38.— P. 293—328.
5. Rosano T. G., Freed B. M., Cerilli T. et al. // Transplantation.— 1986.— Vol. 42.— P. 262—265.
6. Rosano T. G., Freed B. M., Pell M. A. et al. // Transplant. Proc.— 1987.— Vol. 19.— P. 1699—1703.
7. Rosano T. G., Freed B. M., Pell M. A. et al. // Ibid.— 1986.— Vol. 35, Suppl. 5.— P. 35—38.

А. Б. Дзгоев, С. А. Еремин, Н. П. Данилова, А. М. Егоров, Р. Г. Василев

## КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕНОБАРБИТАЛА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ПОЛЯРИЗАЦИОННОГО ФЛЮОРОИММУНОАНАЛИЗА

МГУ им. М. В. Ломоносова, ВНИИ биотехнологии, Москва

В настоящее время барбитураты широко применяются в медицинской практике для лечения ряда нервно-психических заболеваний. При этом важное значение имеет подбор терапевтического диапазона концентрации препарата индивидуально для каждого пациента. Именно этим и вызвана необходимость разработки специфичных экспресс-методик для количественного определения барбитуратов в сыворотке крови человека. Данная статья посвящена разработке метода определения фенобарбитала — одного из производных барбитуровой кислоты, применяемого в лечебных целях в качестве спазмолитического и противосудорожного средства. В силу специфики лекарственных соединений, требующих простой и точной экспресс-диагностики, для их определения наиболее часто используются гомогенные методы иммуноанализа.

Поляризационный флюороиммуноанализ (ПФИА), подробно описанный в обзоре [1], основан на конкуренции определяемого антигена и антигена, меченного флюоросцентной меткой (трассер) за ограниченное количество центров связывания антител. Концентрация антигена в пробе определяется по изменению поляризации флюоресценции, которая зависит от степени связывания трассера с антителами. Данный метод позволяет определить в течение нескольких минут концентрацию лекарственного соединения в объеме пробы от 1 до 10 мкл с пределом детекции 10—100 нг/мл. К преимуществам ПФИА можно отнести также отсутствие стадии подготовки пробы, быстроту и простоту выполнения анализа, точность и хорошую воспроизводимость результатов. Существенным недостатком метода является отсутствие широкой инструментальной базы и отечественных аналогов прибора.

Целью нашей работы была разработка метода определения фенобарбитала в сыворотке крови человека на приборе ТДх фирмы «Аввотт» (США). Метод анализа разработан с использованием моноклональных антител.

Методика. Моноклональные антитела к фенобарбиталу были получены путем слияния спленоцитов мышей линии BALB/c с клетками миеломной линии X63—Ag865.3. В лаборатории гибридом ВНИИ биотехнологии поликлональные антитела к фенобарбиталу получали иммунизацией кроликов конъюгатом антиген-BSA на кафедре химической энзимологии МГУ, меченный флюоресцином гаптен, был синтезирован нами по ранее описанному [2] методу. В качестве деблокирующего реагента, снижающего влияние сывороточных белков, использовали мертиолат натрия («Fluka» AG, Chem.).

Буфер для анализа готовили следующим образом: 24,6 г НВОЗ растворяли в дистиллированной воде, доводили NaOH до pH 7,9—8,0 и добавляли в раствор 0,1 г  $\text{NaN}_3$ ; довели объем до 1 л.

Стандартные растворы готовили путем разбавления матричного раствора фенобарбитала в этаноле (1 г/л) [3] в нормальной лошадиной сыворотке до конечных концентраций 5, 10, 20, 50 и 100 мкг/мл.

Для измерения поляризации флюоресценции мы использовали анализатор ТДх фирмы «Аввотт» (США). Исследования проводили в полуавтоматическом режиме по программе «Photo Check».

В стеклянную кювету к 10 мкл анализируемой сыворотки или стандарта прибавляли 500 мкл меченного флюоресцином фенобарбитала в концентрации 10 нмоль/л и 500 мкл асцитной жидкости, разбавленной в соотношении 1:10 (начальная) буфером для анализа, содержащим 0,025 % (конечная) раствор мертиолата натрия. После 5—10-минутной инкубации при комнатной температуре измеряли поляризацию флюоресценции.

Результаты и обсуждение. Для разработки чувствительного и специфического иммунологического метода анализа существенную роль играет качество антител. В настоящее время титр, константы связывания и процент перекрестных реакций антител для гаптенных определяют в основном методами радиоиммуноанализа, имеющими свои недостатки.

Для оценки качества антител к фенобарбиталу мы проводили сравнительное тестирование асцитных жидкостей и кроличьих поликлональных антисывороток. Метод тестирования заключается в добавлении аликвоты меченного флюоресцином гаптена к антисыворотке в разном разведении, инкубации в течение нескольких минут и измерений поляризации флюоресценции. Метод гомогенный и позволяет в течение 0,5 ч определить титр и рассчитать концентрацию специфических антител к гаптену в антисыворотке.

Из полученных результатов видно, что наиболее высокие титры антител давали асциты в разведении от 1:600 до 1:5 000, а поликлональные антисыворотки — от 1:150 до 1:600 (рис. 1). В результате экспериментов была установлена оптимальная величина разбавления асцитных жидкостей — 1:800.

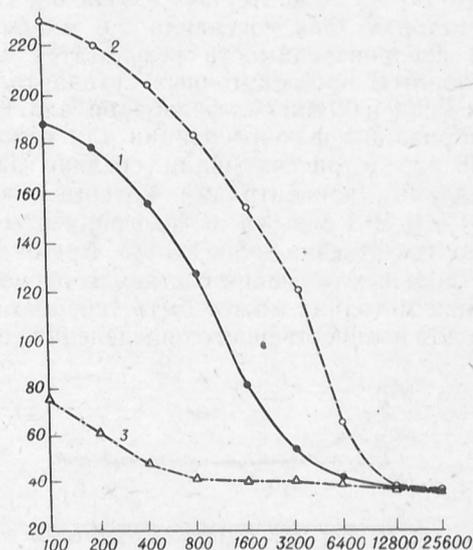


Рис. 1. Кривые разбавления поликлональной антисыворотки (1), асцитной жидкости (2), нормальной кроличьей сыворотки (3).

По оси абсцисс — разведение антисыворотки; по оси ординат (здесь и на рис. 2, 3) — поляризация флюоресценции (mP).

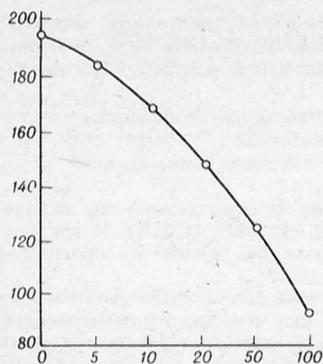


Рис. 2. Калибровочная кривая для поляризационного флюороиммуноанализа фенобарбитала в сыворотке крови.

По оси абсцисс — концентрация фенобарбитала (в мкг/мл).

При построении калибровочной кривой (рис. 2) мы использовали диапазон концентрации от 0 до 100 мкг/мл, учитывая тот факт, что в медицинской практике важное значение имеет диапазон концентрации от 15 до 55 мкг/мл.

С целью снижения значительного неспецифического связывания меченого антигена с белками асцитной жидкости мы добавляли различные концентрации — от 0,1 до 0,0005 % (конечная) — мертиолата натрия в раствор нормальной человеческой сыворотки или буфера с антителами (С-const) и меченым антигеном, измеряли поляризацию флюоресценции. Полученные результаты (рис. 3) показали, что максимальное ингибирование неспецифического связывания имеет место при добавлении 0,025 % (конечная) раствора мертиолата натрия. При концентрациях 0,012 % и менее влияние деблокирующего реагента практически не проявлялось, а при концентрациях натрия мертиолата выше 0,025 % показатели поляризации флюоресценции повышались за счет неспецифического связывания на 5—25 мР. Таким образом, в данном методе анализа использование 0,025 % (конечная) раствора мертиолата натрия в процессе предподготовки анализируемого образца положительно сказывается на точности конечных результатов.

Чувствительность анализа определяли по методу Rodbard [4] из 20 повторных измерений «нулевого» стандарта. Она составила 2,6 мкг/мл. Для оценки воспроизводимости результатов анализа приготовили 3 промежуточных стандарта, содержащих 15, 30 и 60 мкг/мл фенобарбитала. Измеряли поляризацию флюоресценции для каждого из них 10 раз и рассчитывали средние значения определяемых концентраций, которые составили 14,1, 31,5 и 59,1 мкг/мл, и коэффициенты вариации, (соответственно 6, 5 и 1,5 %). Время анализа 10 контрольных образцов составило около 7 мин.

Данная методика может быть успешно использована для количественного определения содержа-

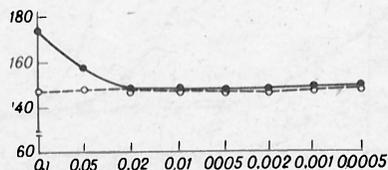


Рис. 3. Влияние мертиолата натрия на неспецифическое связывание белков сыворотки крови: в буфере (1) и в нормальной сыворотке крови человека (2).

По оси абсцисс — концентрация мертиолата натрия (в %).

ния фенобарбитала в сыворотке крови пациентов, которым препарат применяют в терапевтических целях.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бекбергенев Б. М., Житников В. Г. // Антибиотики. — 1988. — № 2. — С. 13—16; 72—76.
2. Sidki A. M., Rowell F. J., Smith D. S. // Ther. Drug Monit. — 1982. — Vol. 4. — P. 397—403.
3. Eremin S. A., Gallacher G., Lotey H. et al. // Clin. Chem. — 1987. — Vol. 33. — P. 1903—1906.
4. Rodbard D. // Analyt. Biochem. — 1978. — Vol. 90. — P. 1—12.

Поступила 30.10.90

© Коллектив авторов, 1991

УДК 615.214.32.03:616.36-089.843

Н. И. Габриэлян, О. А. Савостьянова, О. И. Белоцерковская

### МОНИТОРИНГ ЦИКЛОСПОРИНА В СХЕМЕ ВЕДЕНИЯ БОЛЬНЫХ В ПОСТТРАНСПЛАНТАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ

НИИ трансплантологии и искусственных органов Минздрава СССР, Москва

Циклоспорин — наиболее широко используемый иммунодепрессант при трансплантации печени, сердца, почек, костного мозга, поджелудочной железы. К настоящему времени по эффективности применения циклоспорин как иммуносупрессор не имеет равных. Одновременно возросло применение его при ряде аутоиммунных заболеваний. Известно положительное влияние использования циклоспорина в лечении таких заболеваний, как буллезный пемфигоид, язвенный колит, псориаз, эритродермия.

Известно, что циклоспорин оказывает избирательное подавляющее действие в отношении клеток лимфоцитарной системы. В основе иммуносупрессивного эффекта лежит блокирование рецепторов иммунокомпетентных Т-лимфоцитов. Торможение иммунного ответа достигается в результате блокировки передачи сигнала о накоплении антигена. Активации лимфоцитов не происходит, нарушаются процессы иммуорегуляции, что способствует в конечном итоге удлинению срока жизни трансплантата. Использование современных схем иммуносупрессии с применением циклоспорина изменило течение посттрансплантационного периода, значительно улучшило результаты операций. В частности, повысились показатели выживаемости трансплантатов, почти втрое уменьшились показатели ранней послеоперационной летальности, уменьшилась тяжесть кризов отторжения, отмечены лучшая их купируемость, уменьшение осложнений, вызываемых кортикостероидами.

К важным факторам, учитываемым при назначении циклоспорина, относятся данные о метаболизме, всасываемости и выведении препарата, а также данные о возможном синергизме, куммуляции или иных проявлениях совместного действия циклоспорина с другими лекарственными препаратами. Циклоспорин, являющийся циклическим пептидом, в результате метаболических превращений

образует более 30 метаболитов, часть из которых обладает токсической активностью, большей, чем исходный пептид.

Известно, что около 50 % циклоспорина всасывается в желудочно-кишечном тракте. Далее в процессе метаболизма происходит печеночно-кишечный кругооборот циклоспорина и его метаболитов. При этом состояние желудочно-кишечного тракта, в частности проницаемость, кровоснабжение, моторика слизистой существенно влияет на метаболизм препарата. Незаработанной остается проблема влияния изменений в экобиоценозе кишечной флоры на всасываемость и метаболизм циклоспорина. Клинические наблюдения показывают, что резкие проявления дисбактериоза приводят к непредсказуемым колебаниям концентрации препарата в крови.

Максимальная концентрация циклоспорина в крови определяется через 2—4 ч после введения. К концу 18—20 ч препарат полностью выводится из крови. Считается, что выведение почками составляет не более 5—10 % от введенной дозы, остальная часть выводится с желчью. При этом концентрация неизмененного циклоспорина, выводимого с желчью, составляет не более 1—2 %. Такое сродство циклоспорина к желчи приводит к тому, что концентрация препарата в желчи может на 1—2 порядка превосходить концентрацию в крови.

Токсичность циклоспорина представляет собой серьезную проблему. Токсические эффекты, как правило, наблюдаются при повышении концентрации его в крови. Важно, что при снижении дозы или отмене препарата токсические эффекты достаточно быстро устраняются. Существование зависимости токсичности от высоты концентрации препарата не вызывает сомнения. Однако остается нерешенным вопрос о токсичности самого циклоспорина и его метаболитов. Нефротоксическое и гепатотоксическое действие является основным в побочных эффектах препарата. Нефротоксичность от циклоспорина может привести даже к необратимым изменениям. Четкой зависимости между дозой циклоспорина, клубочковой фильтрацией и концентрацией его в крови не выявлено. В качестве побочного токсического действия отмечаются и нейропатические эффекты: повышенная утомляемость, парестезии, тремор, эпилептиформные приступы. Возможны отсутствие аппетита, гиперплазия десен, тошнота и рвота, диарея. Отмечено, что нефротоксический эффект заметно усиливается при приеме антибиотиков, особенно аминогликозидов. К побочному действию циклоспорина относится и угнетение противовирусной защиты. Считается, что это действие менее опасно при приеме циклоспорина, чем подавляющее действие на противои инфекционный иммунитет, отчетливо выраженный у неспецифических иммуносупрессоров. По сравнению с традиционной иммуносупрессивной терапией в небольшом проценте случаев отмечено развитие лимфом. Лимфопротиперация при традиционной иммуносупрессии выявлена в 8 %, а при использовании циклоспорина — в 0,4 % наблюдений. Токсической считается концентрация от 500 нг/мл и выше. Как правило, вызываемые осложнения носят временный характер и зависят от дозы. В то же время имеются данные, согласно которым нефротоксичность развивается при концентрации циклоспорина ниже

500 нг/мл. То, что нефротоксичность развивается и при низких концентрациях циклоспорина, может быть объяснено повышением порога чувствительности к сандиммуну. Это зависит как от особенностей метаболического гомеостаза, так и от длительности приема препарата. Важно, что снижение дозы циклоспорина для снятия нефротоксичности приводит к заметному повышению риска отторжения трансплантата.

Схемы и дозы циклоспорина для предупреждения кризов отторжения после трансплантации жизненно важных органов окончательно не установлены. К настоящему времени выбор правильного курса доз циклоспорина для ведения больного зависит от искусства врача, способного балансировать между токсической дозой и достаточностью иммуносупрессии. Выработка оптимальной схемы, сводящей к минимуму токсические осложнения при максимальной защите от реакций отторжения, должна быть основана на учете индивидуальной чувствительности реципиента. В основе этой чувствительности лежат механизмы эндогенной детоксикации. Считается, что малые дозы циклоспорина, стероидов и азатиоприна — это наиболее надежный способ добиться стабильной иммуносупрессии и получить наименьшее число осложнений. Рекомендуемые разовые концентрации циклоспорина в плазме: 1-й месяц — 100—500 нг/мл; 2-й — менее 250 нг/мл; 3-й — менее 200 нг/мл; далее — менее 150 нг/мл.

Определение циклоспорина осуществляется, как правило, перед приемом последующей дозы, таким образом определяются минимальные концентрации препарата в крови. В большинстве трансплантационных центров поддерживают низкие концентрации циклоспорина в цельной крови 300—800 нг/мл, в сыворотке крови 100—200 нг/мл, которая достигается при использовании доз препарата от 3 до 8 мг/кг в сутки. Если концентрация меньше 100 нг/мл, возрастает число отторжений. При концентрации 1000 нг/мл проявляются побочные действия препарата. Следует отметить, что токсикологический эффект циклоспорина, как и особенности его метаболизма, а также влияние на биохимический статус больного изучены недостаточно.

Достаточно трудным остается момент правильной тактики при назначении даже минимальных доз препарата. Обзор доступных нам данных литературы показывает, что максимальный иммуносупрессивный эффект, создаваемый сочетанием преднизолона, азатиоприна и циклоспорина, требует постоянной и тщательной коррекции дозировки последнего. Опыт различных трансплантационных центров показал, что в настоящее время используются 4 различные протоколы введения циклоспорина: I схема — дозы 11—17 мг/кг в сутки; II схема (средние дозы) — 7—11 мг/кг в сутки; III схема (низкие дозы) — 7 мг/кг в сутки; IV схема (ультранизкие дозы) — менее 2 мг/кг в сутки.

Трудности выбора оптимальных схем и доз лечения обусловлены различной выраженностью иммунных реакций у каждого реципиента, уровнем абсорбции в кишечнике, особенностями метаболизма. Особенно важен выбор дозы в ранний посттрансплантационный период, когда наиболее выражены иммунные реакции и ишемические повреждения трансплантата. В таблице представ-

**Концентрация циклоспорина в крови и доза сандиммуна у больных в различные сроки трансплантации печени, сердца или почки**

Срок после трансплантации	Трансплантируемый орган	Число наблюдений	Доза сандиммуна, мг/кг в сутки	Концентрация циклоспорина, нг/мл
До 1 мес	Печень	42	1,6—13,0	525±65
	Сердце	64	2,0—5,0	400±25
	Почка	195	1,6—7,0	247±22
1—3 мес	Печень	35	1,3—10,0	535±50
	Сердце	17	2,0—5,3	338±37
	Почка	114	1,6—7,6	305±34
3—12 мес	Печень	12	5,7—7,6	710±91
	Сердце	21	2,0—4,3	436±34
	Почка	73	1,6—5,0	328±39

лены собственные данные об уровнях циклоспорина в цельной крови, сохраняющиеся в различные сроки после трансплантации печени, почек и сердца. Циклоспорин в цельной крови определяли флуоресцентно-поляризационным методом иммунологического анализа. Из вышеизложенного очевидно, что определение концентрации циклоспорина в крови исключительно важно для выбора правильной тактики лечения. Несмотря на достаточное количество тщательных выполненных исследований, проведенных на различных категориях больных, связи между дозой циклоспорина и абсорбцией, аккумуляцией, метаболизмом и концентрацией его в крови с эпизодами отторжения или нефротоксичностью не выявлено. Расчет на уровень концентрации циклоспорина в крови до настоящего времени не всегда позволяет прогнозировать вероятность развития нефротоксичности. В определенной степени это зависит от методических особенностей определения циклоспорина. Имеется достаточное количество работ, свидетельствующих в пользу того, что показатели фармакокинетики циклоспорина зависят от такого фактора, как связь с белками, форменными элементами крови.

Известно, что большая часть циклоспорина (80 %) связана с форменными элементами крови, главным образом с эритроцитами. При оценке получаемых результатов важно учитывать, что степень связи циклоспорина с форменными элементами крови зависит от температуры. Поэтому более стабильные и приемлемые для обсуждения результаты, получаемые при определении циклоспорина в цельной крови. В этих условиях термозависимость распределения циклоспорина между плазмой и эритроцитами не отражается на результатах. Важно отметить также, что ряд метаболитов обнаруживается только в эритроцитах, но не обнаруживается в плазме. Все это свидетельствует о сложности и неоднозначности трактовки однотипных результатов анализов, даже одинаковых, полученных различными лабораторными методами.

Известны три метода определения циклоспорина, наиболее широко используемые в трансплантологии: радиоиммунологический анализ, высокоэффективная жидкостная хроматография и флуоресцентно-поляризационный метод. Последний использован в системе TDx, которая представляет собой автоматизированную систему для измерения концентраций терапевтических лекарств и гормонов в крови и сыворотке крови, разработанную

фирмой «Abbott Laboratories» (США). При этом используется 2 активных компонента-антитела и трассер (флуоресцентный краситель). При флуоресцентно-поляризационном иммунологическом анализе комплекс метка — антитело определяли прямо в растворе, используя особые свойства флуоресцентного красителя — флуоресцеина. Изменение в поляризации флуоресцентного испускаемого света красителем, так как метка становится связанной, измеряется с помощью сложной оптической системы детекции. Важно, что на показания прибора не оказывают влияния желтушность сыворотки, гемолиз, содержание липидов. Основным преимуществом данного метода является быстрота выдачи результатов. Серия, состоящая из 20 проб, исследуется в течение 20 мин. Опыт нашей работы позволяет сделать вывод, что система TDx фирмы «Abbott Laboratories» полностью отвечает требованиям мониторинга циклоспорина у больных в посттрансплантационный период.

Преимущества циклоспорина как мощного иммунодепрессанта могут быть реализованы только при наличии адекватной схемы его использования. Адекватность предполагает постоянную коррекцию вводимых доз в зависимости от показателей биохимического и иммунного статуса больного на протяжении всего посттрансплантационного периода. Практически правильный выбор дозы — это надежная иммуносупрессия и отсутствие нефротоксичности или иных токсических проявлений циклоспорина и его метаболитов. В связи со сложностью метаболизма циклоспорина, зависимостью его от многочисленных факторов создание индивидуальной схемы лечения должно опираться на максимальное привлечение количественных параметров фармакокинетики препарата. При этом учет именно конкретных условий метаболического статуса больного является гарантией правильной оценки возможностей кумуляции препарата, появления эффектов совместного действия с другими лечебными препаратами, возможностей элиминации препарата и его метаболитов.

Для создания надежных вариантов лечебных схем, рассчитанных на разные варианты клинко-лабораторного статуса больных, необходимо продолжение исследований, оценивающих фармакокинетику препарата в связи с особенностями биохимических и иммунологических показателей, а также клинического состояния больного. При этом количественной оценке должны подлежать показатели, оценивающие состояние печени и желчной системы, всасываемость в желудочно-кишечном тракте, активность клеточного звена иммунитета и др.

Проведение последующего статистического многофакторного анализа соответствующего банка данных позволит индивидуализировать супрессию больного и использовать все преимущества циклоспорина как надежного иммунодепрессанта.

Поступила 29.11.90

© Т. В. ДЕНИСЕНКО, 1991

УДК 616-008.9-07-092:001.5

## К 100-ЛЕТИЮ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В ИНСТИТУТЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ АМН СССР

20 декабря 1990 г. исполнилось 100 лет Институту экспериментальной медицины АМН СССР. Отмечая 100-летний юбилей, мы не можем не вспомнить тех, кто создавал это первое в России медицинское учреждение научно-исследовательского профиля и своим трудом и талантом определил те направления движения исследовательской мысли, которые позволили достичь весомых результатов, составивших гордость отечественной науки.

Биохимические исследования в Императорском институте экспериментальной медицины были начаты непосредственно со времени его основания принцем Александром Петровичем Ольденбургским в химической лаборатории. По рекомендации И. П. Павлова заведовать отделом в 1891 г. был приглашен проф. физиологической химии Бернского университета (Швейцария) Маркел Вильгельмович Ненцкий (1847—1901), поляк по национальности. Это был блестящий ученый-экспериментатор с мировой известностью.

М. В. Ненцкий прибыл в Санкт-Петербург после 18 лет плодотворной работы в Берне вместе со своими ассистентами Н. О. Зибер-Шумовой и С. К. Держжовским и сразу включился в работу по организации химического отдела института. По инициативе Маркела Вильгельмовича для химической лаборатории было решено построить уникальное здание, отвечавшее всем требованиям, предъявляемым к сооружениям такого типа. Для этого был приглашен известный петербургский архитектор Ф. Л. Миллер; к строительству привлекаются лучшие подрядчики города. М. В. Ненцкий лично участвовал в проектировании и оборудовании лаборатории, используя свой огромный практический опыт работы, приобретенный в лучших лабораториях Европы. В декабре 1892 г. корпус был сдан в эксплуатацию; общая стоимость постройки и оборудования составила 110,5 тыс. р.

Штат отдела тогда состоял из заведующего, двух его помощников, 2—3 лабораторных служащих и нескольких практикантов, которые не только не получали жалованья, но и сами должны были оплачивать рабочее место в лаборатории. Практикантский стаж определялся в 2—3 года и предусматривал подготовку к самостоятельной научной работе. Такой порядок имел неоспоримое преимущество, так как в лабораторию привлекались люди, действительно интересующиеся наукой и преданные ей. За первые 25 лет существования отдела в качестве практикантов в нем успело поработать около 200 человек, среди них С. Н. Виноградский, С. С. Салазкин, Ф. Я. Чистович, Е. О. Шумова-Симановская, Б. Ф. Вериге, Р. Р. Вреден, В. С. Садиков и др.

Из биохимических проблем М. В. Ненцкий уделял особое внимание разработке вопросов метаболизма аммиака в организме, образования мочевины (он впервые показал, что в образовании мочевины принимают участие аммиак и углекислота) и роли печени в этом процессе, изучению структуры и свойств пепсина, исследованию окислительных процессов в организме, выяснению структуры гема и ее родства с желчными и растительными пигментами. Во многих своих наблюдениях он проявил большую научную прозорливость и был весьма близок к нынешним нашим взглядам на эти проблемы. Достаточно напомнить, что структурная формула гема, предложенная ученым в 1901 г., явилась прообразом современной окончательной формулы гема, установленной Г. Фишером 30 лет спустя.

После смерти М. В. Ненцкого в течение 15 лет отдел возглавляла Н. О. Зибер-Шумова — достойная его ученица, помощница и друг. Она продолжала развивать биохимическую проблематику, начатую М. В. Ненцким. Н. О. Зибер-Шумова первая женщина — профессор биохимии в России. Химический отдел при Надежде Олигимевне становится по сути своей первой и единственной в то время специализированной исследовательской биохимической лабораторией в России.

Свой гражданский и человеческий долг Н. О. Зибер-Шумова видела в увековечении памяти своего учителя. С этой целью в 1905 г. ей удалось опубликовать прекрасно изданное двухтомное собрание работ М. В. Ненцкого и его учеников под заглавием «*Marceli Nencki. Opera Omnia*», куда вошло более 340 статей. В 1907 г. Зибер-Шумовой была учреждена премия им. М. В. Ненцкого, присуждавшаяся в годовщину его смерти молодым исследователям института, достигшим значительных успехов в области биологических наук. Премия составляла проценты с капитала в 5000 р., пожертвованного Надеждой Олигимевной Институту экспериментальной медицины. В 1909 г. она пожертвовала польскому Комитету биологических исследований 50 000 р. из личных средств для организации в Польше научно-исследовательского учреждения медико-биологического профиля им. М. В. Ненцкого и завещала этому будущему институту часть своей личной научной библиотеки на иностранных языках, а также право на издание трудов проф. М. В. Ненцкого. Такое учреждение было создано в 1918 г. — это Институт экспериментальной биологии им. М. В. Ненцкого в Варшаве, который успешно продолжает работать и в наши дни.

После Великой Октябрьской социалистической революции в разные годы отделом руководили крупные ученые-биохимики — профессора Б. И. Словоц, С. С. Салазкин, академик В. С. Гулевич.

При С. С. Словоце в отделе разрабатываются проблемы биохимии мозга, взаимосвязи метаболизма с питанием, открывается клиника обмена веществ. С. С. Салазкин уделяет большое внимание изучению азотистого обмена и мочевинообразования, исследованию взаимодействия белков с катионами и анионами в норме и при патологии. Академик В. С. Гулевич, выдающийся специалист по биохимии мышц, открывший азотистые основания — карнозин, карнитин и ансерин, к сожалению, проработал в институте лишь один год.

В последующие годы отделом руководили проф. Ю. М. Гейфтер (1933—1936), П. А. Аншмарин (1936—1937), А. П. Конников (1937—1941).

После войны с 1945 по 1951 г. отдел возглавлял выдающийся советский биохимик академик В. А. Энгельгардт. Основные усилия отдела были направлены на изучение взаимосвязи энергетического обмена с процессами дыхания.

В 1951—1976 гг. во главе отдела стоял академик АМН СССР В. С. Ильин. Крупный специалист по энзимологии, он уделял большое внимание расшифровке механизмов гормональной регуляции ферментных систем тканевого обмена, изучению биохимических основ нервной трофики. В 1963 г. из отдела биохимии «отпочковалась» лаборатория энзимологии, возглавляемая членом-корр. АМН СССР С. А. Нейфахом, которая начала разработку проблем биохимической генетики. В 1985 г. эта лаборатория, получившая название лаборатории молекулярной биологии и генетики наследственных болезней, вошла в структуру вновь организованного отдела молекулярной биологии (руководитель — член-корр. АМН СССР А. А. Тотолян). В настоящее время эта лаборатория, возглавляемая доктором мед. наук В. С. Гайцкоки, занимается изучением молекулярных основ некоторых болезней, в частности болезни Вильсона—Коновалова.

В 1962 г. по инициативе академик П. Н. Анничкова в отделе биохимии для изучения роли липидов в атерогенезе А. П. Климовым была организована лаборатория липидного обмена — в то время первая лаборатория такого профиля в нашей стране. В 1974 г. она была преобразована в отдел биохимии липидов и атеросклероза (руководитель — академик АМН СССР А. Н. Климов). После смерти В. С. Ильина его отдел воссоединился с отделом биохимии липидов и атеросклероза и с 1978 г. стал вновь называться отделом биохимии.

Под руководством А. П. Климова в отделе проводится широкомасштабное изучение биохимических аспектов патогенеза атеросклероза. Фундаментальное значение в развитии представлений о патогенезе атеросклероза приобрел установленный впервые факт проникновения плазменных липопротеидов в сосудистую стенку целой частицей. Это открытие, имеющее ключевое значение в развитии атеросклеротических поражений сосудов, является в настоящее время общепризнанным. Показано наличие в печени животных и человека автономного пути образования холестерина, не регулируемого конечным продуктом. Начальные этапы этого пути аналогичны первым стадиям синтеза жирных кислот и включают в себя реакцию карбоксилирования ацетил-КоА.

А. П. Климовым и соавт. сформулирована аутоиммунная теория патогенеза атеросклероза, получившая всеобщее признание. Впервые удалось выделить из крови животных с экспериментальным атеросклерозом и больных ишемической бо-

лезно сердца аутоиммунный комплекс липопротеид — антители, обладающий высокой атерогенностью.

В последние годы большое внимание уделяется природным модификациям липопротеидов, способствующим появлению у них аутоантигенности, начато изучение генетических аспектов атерогенеза с применением модели трансгенных животных.

Биохимические исследования проводятся и в других отделах Института экспериментальной медицины. Так, в физиологическом отделе им. И. П. Павлова (руководитель — член-корр. АМН СССР Г. А. Вартамян) изучают пептидные и белковые факторы, играющие ключевую роль в патогенезе центральных двигательных расстройств. В отделе нейрофизиологии, возглавляемом акад. Н. П. Бехтеревой, лаборатория молекулярной нейробиологии (руководитель — доктор биол. наук С. А. Дамбинова) проводит исследование глутаматного рецептора головного мозга животных и человека, а также эндогенных нейропептидов в норме и при патологии.

Таким образом, сотрудники института достойно встретили его 100-летний юбилей, активно развивая биохимические исследования.

Т. В. Денисенко (Ленинград)

© А. Я. НИКОЛАЕВ, 1991

УДК 577.1:378.661:008

А. Я. Николаев

## О ПЕРЕСТРОЙКЕ ПРЕПОДАВАНИЯ БИОХИМИИ В МЕДИЦИНСКИХ ИНСТИТУТАХ

Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова

Мотив углубления фундаментальной подготовки, с одной стороны, и прицельности, направленности на конкретную профессиональную деятельность, с другой, постоянно звучит при обсуждении вопросов перестройки высшей школы. Современный врач должен не только знать тонкости своего дела, но и уметь ориентироваться в быстро меняющейся информационной обстановке, видеть перспективу, проявлять высокую профессиональную мобильность. Такая подготовка в качестве обязательного условия требует усиления связей между преподаванием клинических и фундаментальных дисциплин медико-биологического профиля.

Преподавание любой дисциплины в медицинском институте должно быть ориентировано на конечную цель — подготовку врача общей практики, широкого профиля. Как используется знание медико-биологических дисциплин в практической деятельности врача? Установление диагноза болезни и назначение адекватного лечения включают ряд логических операций, начиная с отбора симптомов из многих тысяч диагностических признаков, известных современной медицине. Отобранные симптомы складываются в клиническую картину, на основе которой делается заключение о сущности болезни и, наконец, устанавливается диагноз страдания конкретного больного, служащий базой для определения схемы лечения. При этом мысль врача постоянно возвращается от последующего этапа к предыдущему и корректируется путем сопоставления промежуточных заключений. Центральную роль в этом процессе играют образ сущности болезни, имеющийся в памяти врача: он служит главным ориентиром и в движении к диагнозу, и в движении от диагноза к способам лечения и к прогнозу [7]. А сущность болезни, равно как мишени и механизмы действия лечебных мероприятий, описываются в терминах и понятиях морфологии, физиологии, биохимии. Именно этим определяется значение медико-биологических дисциплин в подготовке врача, и именно здесь узел интеграции клинических и фундаментальных дисциплин.

Отсюда следуют два существенных вывода.

1. Традиционно представители каждой медико-биологической дисциплины пытаются обосновать ее роль для врача изолированно, вне связи с другими медико-биологическими дисциплинами. Как следует из изложенного, в таких попытках не слишком много смысла, поскольку для клиницистов важно именно интегральное знание этих дисциплин, только оно обеспечивает описание и понимание сущности болезни, нормальных состояний организма и действия лечебных мероприятий.

2. При обсуждении путей сближения клинических и фундаментальных дисциплин клиницисты, как правило, предлагают давать преимущественно описание диагностических

признаков или симптомов, а также методов их выявления. Такой подход в предельном случае привел бы к превращению фундаментальных дисциплин в прикладные (по типу курсов по лабораторному делу). Слов нет, биохимия и другие медико-биологические дисциплины поставляют множество диагностических признаков и методов, но было бы ошибкой в этом видеть существенную, а тем более основную роль медико-биологических дисциплин в медицинском образовании. Они в самой своей фундаментальности должны служить решению главных и каждодневных практических задач лечащего врача. Если этого нет (увы, этого часто нет!), то возрастает вероятность диагностических ошибок и неправильного лечения, в лучшем случае увеличиваются стоимость и время установления диагноза и лечения.

Изложенное определяет подходы к отбору содержания обучения биохимии в медицинском вузе. Другая сторона проблемы — методы обучения, адекватные целям и содержанию. Основные направления перестройки высшей школы предусматривают решительный поворот от массового, валового обучения к усилению индивидуального подхода, от преимущественно информационного метода к активным формам обучения, к повышению самостоятельности работы студентов и на этой основе к развитию творческих способностей будущих специалистов. В результате такого обучения студент должен не просто приобрести знания, а выработать умение применять их в дальнейшем при обучении в вузе, а затем во врачебной деятельности. Кроме того, студенту прививается умение и стремление пополнять и углублять знания на протяжении всей его трудовой деятельности. Эти цели выражает известная педагогическая максима: учащийся — не кувшин, который нужно наполнить, а факел, который нужно зажечь.

«Знание только тогда знание, когда оно приобретено усилиями собственной мысли, а не памятью», говорил Л. Н. Толстой. Усилия собственной мысли — вот основное ядро самостоятельности и активности студента при обучении.

Психологи отмечают, что студенту легче запомнить, чем понять, соответственно он и стремится больше запоминать, чем понимать. Наибольшие трудности понимания связаны с выделением в учебном материале ключевых моментов, установлением логических связей между ними, с обоснованием правил и закономерностей, установлением междисциплинарных связей и связей с предстоящей профессиональной деятельностью. Немногие студенты в пределах времени, отводимого учебным планом, могут приобрести подобные знания без помощи преподавателя и применения специальных форм и методов обучения. Следовательно, повышение самостоятельности работы означает не предоставление студента самому себе, а усиление роли преподавателя в обучении. Это проявляется не только в процессе занятия, но и в разработке специальных учебных пособий и материалов.

Какие же формы и средства обучения могут стимулировать включение усилий собственной мысли студента? Их суть в том, что содержание обучения преобразуют в обучающие задачи (проблемы) и ориентировочную основу действий по их решению. Многолетняя работа кафедры биохимии Московской медицинской академии им. И. М. Сеченова по оптимизации обучения нашла отражение в комплексе учебных материалов: учебнике «Биохимия» [3], руководстве к практическим занятиям [1], методических пособиях для самостоятельной аудиторной [4] и внеаудиторной [5] работы, банке контрольных тестов и заданий. Пособия для самостоятельной работы по существу представляют собой сценарий деятельности студента при изучении биохимии (поскольку они излагают материал в логике действий, а не описания). Такие пособия, предоставляемые каждому студенту, являются средством автоматизации управления учебным процессом. Они служат для индивидуализации потока учебной информации, обеспечивают использование учебного времени с максимальной полнотой и пользой даже в больших учебных группах, типичных для нашей высшей школы, и в целом позволяют вести преподавание в эффективной дидактической системе.

Приступая к работе, студент находит в пособии формулировку задачи (проблемы), осознает ее и с помощью ориентировочной основы действий ищет решение. При этом следует такая цепочка операций: план решения; актуализация нужной информации, имеющейся в памяти; поиск недостающей информации (если необходимо); решение; самоконтроль по эталону ответа (или преподавательский контроль). В случае неудачи — новый план решения и т. д. При правильном решении студент приступает к следующей задаче, т. е. к усвоению очередной порции новой информации. На аудиторных занятиях темп работы регулируется преподавателем. При самоподготовке студент работает в индивидуальном темпе, что существенно для качества усвоения материала.

Поясним сказанное конкретным примером. Студент при-

ступил к изучению проявлений недостаточности инсулина. Ему известно, что инсулин увеличивает проницаемость для глюкозы мембран некоторых клеток. При традиционном информационном методе обучения сведения о метаболических следствиях студент получает в готовом виде от преподавателя или из учебника. При активном методе студенту представляется проблемная ситуация: у пациента снижена концентрация инсулина в крови. На основе этой ситуации формулируется учебная проблема (или серия проблем): как это может влиять на концентрацию глюкозы в крови (в моче)? как изменится метаболизм глюкозы (жиров, аминокислот)? Приступая к изучению регуляции метаболизма инсулином, студент уже знает о метаболизме углеводов, жиров, аминокислот и может самостоятельно решить задачу.

В пособиях исправляющего типа содержание обучения делится на части, доступные быстрому усвоению, и структурируется в соответствии с логикой связи частей. Учебная проблема может быть и небольшой. Например, студент получил информацию о липидном бислое мембран и наличии в них белков. Ему предьявляется схема строения мембраны и ставится задача: какие предположения он может сделать об аминокислотном составе погруженной и выступающей частей полупогруженного белка? Используя имеющиеся у него знания о строении белков, студент в состоянии сам решить эту задачу (с помощью ориентировочной основы действий) и в дополнение к этому еще и понять, что белок фиксирован в мембране в определенном положении (не может перевернуться или гидрофильной частью в гидрофобный слой мембраны). Функции преподавателя в этих условиях заключаются в консультировании студентов в случае существенных отклонений или задержек, однако при этом преподаватель старается не нарушить творческий характер работы студента, в коррекции деятельности студента (если в этом возникает необходимость) и контроле усвоения материала.

Такой метод обучения является активным в том смысле, что представляет собой совместную деятельность преподавателя и студента по решению задач (проблем). Решение задачи — всегда проблема мышления, усилий мысли, а не памяти. Студент не получает готовый результат, а учится его добывать, преодолевая при этом некоторые затруднения. Знания, приобретенные таким путем, также являются активными, поскольку студент учится использовать их для получения новых знаний, а также для принятия решений в практических ситуациях.

Самостоятельная работа студентов — главный инструмент приобретения активных знаний. Однако следует помнить, что активность знаний определяется также их содержанием. Знания в области биохимии могут быть востребованы и использованы только в том случае, если они множеством связей включены в систему знаний, получаемых студентом при изучении других медико-биологических дисциплин, и если перекинуты достаточно ясные и прочные мостики к последующим дисциплинам, прежде всего клиническим. Последнее имеет важное значение и для мотивации к изучению биохимии, для формирования профессионального интереса.

Как видно из изложенного, активное обучение означает добывание новых знаний на основе актуализации ранее полученных знаний и, следовательно, дальнейшее обучение возможно лишь при правильном усвоении предыдущего материала. Поэтому необходим постоянный контроль, позволяющий студенту и преподавателю узнать, как усвоен материал. В больших учебных группах эта работа возможна только при широком использовании автоматизированных методов контроля. Среди последних следует назвать подбор тестовых вопросов и задач, а также эталонных ответов на них, которые студент получает заранее (для промежуточного самоконтроля) или после выполнения задания.

На кафедре имеется большой набор тестовых вопросов разных типов, который постоянно обновляется и пополняется. В частности, используются типы тестовых вопросов, рекомендованных ВОЗ для внедрения в систему медицинского образования [8].

I. Вопрос на выбор наиболее правильного ответа из числа предложенных.

Пример. Предшественниками глюкозы в организме могут быть: а) пируват; б) лактат; в) глицерин; г) аминокислоты; д) все вышеназванное верно. Ответ: д.

II. Вопрос на выбор правильной комбинации ответов.

Пример. Выбрать реакции, сопряженные с синтезом АТФ:

1)  $\text{НАДН} + \text{H}^+ + \text{Q} \rightarrow \text{НАД}^+ + \text{QH}_2$ ; 2)  $\text{сукцинат} + \text{Q} \rightarrow \text{фумарат} + \text{QH}_2$ ; 3)  $\text{QH}_2 + 2 \text{ цитохром с (Fe}^{3+}) \rightarrow \text{Q} + 2 \text{ цитохром с (Fe}^{2+}) + 2\text{H}^+$ ; 4)  $\text{малат} + \text{НАД}^+ \rightarrow \text{оксалоацетат} +$

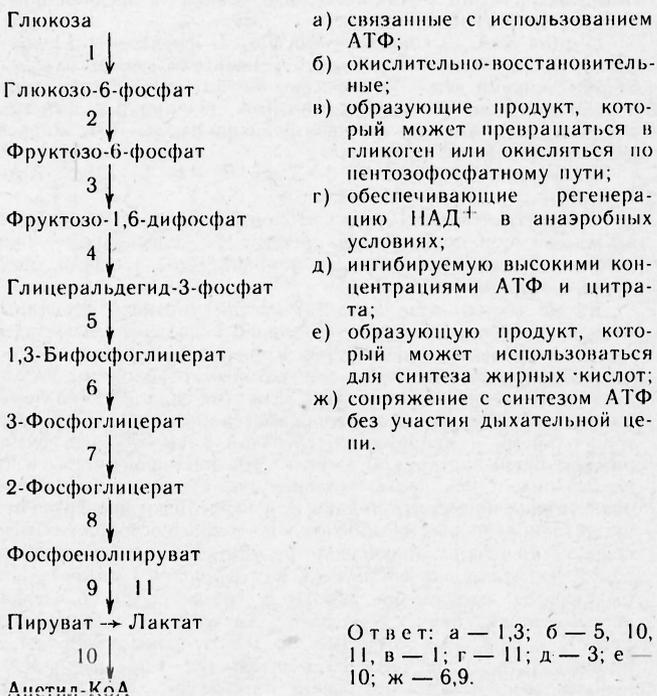
$\text{НАДН} + \text{H}^+$ . Ответ дается по таблице, в которой набор выбранных цифр зашифрован в виде буквы.

III. Вопрос на выбор правильного ответа из возможных комбинаций причинно-следственных связей.

Пример. Аспирин оказывает выраженное противовоспалительное действие, потому что ингибирует простагландинсинтетазу. Форма ответа: обе части сложно-подчиненного предложения и связь между ними («потому что») оцениваются как «верно» или «неверно».

IV. Вопрос-сопоставление: к ряду вопросов подобрать правильный ответ из предложенных.

Пример. Рассмотрите схему катаболизма глюкозы и, используя предложенную нумерацию, выберите реакции:



На кафедре разработаны и применяются другие типы тестовых вопросов.

Воспроизведение последовательности метаболического пути из предложенных пронумерованных метаболитов.

Пример. Опишите превращения жиров, поступивших с пищей, для чего расположите указанные ниже этапы ассимиляции жиров в организме в нужной последовательности: 1) образование хиломикронов; 2) ресинтез триацилглицеринов; 3) транспорт кровью; 4) всасывание; 5) эмульгирование; 6) гидролиз с образованием преимущественно 2-моноацилглицеринов и жирных кислот; 7) гидролиз с образованием преимущественно глицерина и жирных кислот; 8) утилизация жирных кислот разными тканями. Ответ: 5—6—4—2—1—3—7—8.

К этому можно добавить еще один вопрос: для каких этапов необходимы следующие факторы: а) липопротеинлипаза; б) панкреатическая липаза; в) желчные кислоты? Ответ: а — 7, б — 6, в — 4,5.

Перечисленные типы тестовых вопросов дают возможность в короткое время проверить большое число студентов. Это достигается тем, что ответы даются в кратком формализованном виде и проверяются с помощью эталонов. Следует заметить, что при традиционном оформлении задач и ответов значительно более половины текста приходится именно на ответы (например, [2], [6]). Проверка ответов на такие задачи отнимает много времени, и при работе с группой из 15 студентов такой контроль не может обеспечить в каждом случае постоянной обратной связи.

Недостаток тестовых вопросов — возможность проверить в основном знание фактического материала, т. е. ориентацию прежде всего на память. Активное же усвоение материала предполагает умение применять его для получения новых знаний и принятия решений.

Для проверки такого рода усвоения материала нами разработаны задания, которые представляют собой обучающие ситуационные проблемы (задачи), преобразованные в форму тестовых вопросов (ситуационные тесты). Особенностью ситуационного теста является то, что с предлагаемой в нем ситуацией студент в процессе обучения не встречался, в его

памяти нет прямого ответа на проблему, но есть информация, необходимая для ее решения.

Пример. 1. Спортсмен пробежал первые 2 км 10-километровой дистанции. 2. Заблудившийся грибник целый день бродил по лесу, не имея еды. Вечером он встретил местного жителя, который сказал, что в 2 км находится железнодорожная станция, но нужно потопотиться, потому что последний поезд будет через полчаса. Грибник успел на поезд.

А. Какое из перечисленных ниже веществ является основным источником энергии на 2-километровом пути спортсмена и грибника: 1) жирные кислоты; 2) лактат; 3) ацетоацетат; 4) гидроксипурилат; 5) глюкоза?

Б. Составьте метаболический путь, обеспечивающий энергией работу мышц в этих условиях, выбрав из предложенных ниже элементов необходимые:

1) ацил-КоА; 2) глюкозо-6-фосфат; 3) фруктозо-1,6-дифосфат; 4) триацилглицерин; 5) глицеральдегидфосфат; 6) дыхательная цепь; 7) 3-фосфоглицерат; 8) 2-фосфоглицерат; 9) глюкоза; 10) ацетоацетил-КоА; 11) пируват; 12) ацетил-КоА; 13) лактат; 14) фосфоенолпируват; 15) жирные кислоты; 16) цитратный цикл.

Ответ: 1. А: 5; Б: 9—2—3—5—7—14—1—13; 2. А: 1. Б: 4—15—1—10—12—16—6.

Ситуационные тесты могут быть и более простыми, и более сложными, чем приведенный пример. Их целесообразно применять для контроля усвоения крупной темы, раздела, всего курса (экзамен).

Кроме тестов, предназначенных для автоматизированных методов контроля, на кафедре широко используются экспериментально-теоретические задачи. Кроме теоретических, они содержат вопрос, для ответа на который необходимо выполнить экспериментальную работу. Для этих заданий характерно то, что теоретическая часть выполняется студентом во внеаудиторное время и является подготовкой к выполнению экспериментальной аудиторной работы. Эти задачи могут быть использованы и как часть коллоквиума, что позволяет проверить умение применять знания для подготовки эксперимента, анализа полученных результатов и оценки состояния обмена веществ на основе полученных результатов. Содержание задач и формулировка вопросов к ним позволяют выбрать разные формы выполнения работы в соответствии со способностями и желанием студента: от выполнения лабораторной работы с краткими ответами на поставленные вопросы до развернутого теоретического обоснования типа реферата с использованием дополнительной литературы. Это дает возможность дифференцированной оценки знаний и умений студента.

Пример. У 2 пациентов исследовали сок поджелудочной железы. В колбах А и Б находится 3 мл свежего молока. В одну из колб добавили сок двенадцатиперстной кишки здорового человека, в другую — сок двенадцатиперстной кишки больного с выраженным повреждением поджелудочной железы после перенесенного панкреатита. Пробы инкубировали в течение 60 мин при 38 °С.

Задача:

1) каким известным Вам химическим методом можно проверить, в какую колбу добавили панкреатический сок здорового человека, в какую — больного? Выберите описание соответствующего метода в практикуме, установите, с какого пункта Вам следует начать работу; свой выбор проверьте у преподавателя;

2) исследуйте выбранным методом оба образца, составьте протокол исследования и сделайте заключение;

3) укажите, какие пищеварительные ферменты секретируются поджелудочной железой;

4) как отразится нарушение функций поджелудочной железы на переваривании пищи?

5) опишите реакции при переваривании липидов и углеводов.

Задачи такого типа позволяют студентам серьезно готовиться к выполнению лабораторной работы и являются хорошей тренировкой умения анализировать результаты биохимических исследований.

В заключение можно сказать, что проводимая на кафедре методическая работа — составление методических рекомендаций для самостоятельной аудиторной и внеаудиторной работы, банка тестов и задач — обеспечивает возможность непосредственного перехода к составлению обучающе-контролирующих программ и компьютеризации учебного процесса. Проверка одной из таких программ в экспериментальных группах показала значительное уменьшение необходимого на обучение времени и одновременно улучшение качества усвоения материала.

Полный переход на новые методы обучения станет возможным лишь при условии значительного улучшения материально-технического оснащения учебного процесса, уменьшения педагогической нагрузки на преподавателя, уменьшения количества студентов в учебной группе, существенного расширения научно-исследовательской работы на кафедрах. Однако и при имеющихся условиях есть достаточно широкие возможности для совершенствования процесса обучения.

Учитывая, что подготовленная сотрудниками кафедры учебная литература представляет единый комплекс, мы направили всем кафедрам биохимии медицинских вузов учебно-методические разработки с предложением тиражировать их на месте. Ряд кафедр применяют эти разработки в учебном процессе. Более интенсивный и разнообразный обмен опытом будет способствовать повышению качества преподавания биохимии в медицинских вузах страны. Коллектив нашей кафедры будет признателен за отзыв о представленных методических разработках и предложения по их совершенствованию.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Алейникова Т. Л., Рубцова Г. В. Руководство к практическим занятиям по биологической химии / Под ред. А. Я. Николаева. — М., 1989.
2. Ленинджер А. // Основы биохимии. — М., 1985.
3. Николаев А. Я. // Биохимия. — М., 1989.
4. Самостоятельная аудиторная работа студентов по биологической химии / Под ред. А. Я. Николаева. — М., 1987.
5. Самостоятельная внеаудиторная работа студентов по биологической химии / Под ред. А. Я. Николаева. — М., 1987.
6. Страйер Л. // Биохимия. — М., 1984.
7. Чазов Е. И., Царегородцев Г. И., Кротков Е. А. // Вопросы философии. — 1986. — № 9. — С. 66.
8. Iborra I. L. et al. // Biochem. Educ. — 1984. — Vol. 12. — P. 108—111.

Поступила 03.04.90

## РЕЦЕНЗИИ

© Л. А. ЛОКШИНА, 1991

УДК 612.822.1.015.1:577.152.34 [049.32]

А. В. Азарян. Пептидгидролазы нервной системы и их биологические функции. — Ереван: Айтап, 1989. — 206 с.

Монография А. В. Азарян посвящена свойствам, структуре и биологическим функциям протеолитических ферментов нервной системы. Протеолитические ферменты находятся в центре внимания многих исследователей в связи с первостепенной ролью, которую они играют в регуляции обмена в организме, и в частности в обмене нейропептидов. В настоящее время очевидно, что понимание механизмов сложнейших нейробиологических явлений — памяти, боли, эмоций, поведенческих реакций и т. д. — невозможно без расшифровки меха-

низмов функционирования пептидергических систем и образующих ими медиаторов — нейропептидов. Установлено, что практически все регуляторные пептиды синтезируются в виде полифункциональных предшественников и образуются из них в результате избирательного гидролиза определенных пептидных связей под действием специфических пептидгидролаз. Ферменты этой же группы включены в процессы деградации и инактивации биологически активных пептидов. С нарушением функций протеиназ и их регуляции связано развитие многих патологических состояний, для коррекции активности которых ингибиторы протеиназ в последнее время находят широкое применение в медицинской практике.

Монография А. В. Азарян представляет собой сводку современных данных о протеолитических ферментах нервной ткани: их свойствах, специфичности, распространении, биологических функциях и регуляции активности. Придерживаясь современной классификации ферментов, автор рассматривает

последовательно различные классы пептидгидролаз и описывает свойства около 40 ферментов, обнаруженных в нервной ткани. В четкой и сжатой форме изложены основные свойства ферментов, методы их выделения, наиболее важные субстраты и ингибиторы, региональное распределение в различных отделах нервной системы, подробно рассмотрены специфичность и биологические функции. В отдельной главе, посвященной регуляции активности пептидгидролаз, перечислены основные пути регуляции активности этих ферментов и приведен большой материал об эндогенных ингибиторах разных классов пептидгидролаз. Особый интерес представляет глава о биологических функциях пептидгидролаз нервной системы и их решающей роли в образовании и инактивации нейропептидов и регуляции различных нейробиологических явлений. В монографии приведено много данных, полученных в самые последние годы как самим автором, так и другими исследователями. В списке литературы значится более 530 наименований, в том числе и публикации 1989 г. Все это делает книгу А. В. Азарян одним из самых полных современных справочников по пептидгидролазам нервной ткани не только в СССР, но и за рубежом.

Недостатками книги являются некоторая перегруженность ее фактическими данными и изложение основного материала, касающегося разных аспектов исследования пептидгидролаз, по ходу описания отдельных ферментов. Это, а также некоторая недостаточность обобщений не дают возможности читателю сразу составить себе ясное представление по ряду общих вопросов, касающихся пептидгидролаз нервной системы (например, региональному распределению различных ферментов, нарушению их функционирования при патологических состояниях). Несмотря на это, книга является ценным справочником по пептидгидролазам нервной ткани, в которой систематизирован и обобщен новейший материал по этим ферментам. Она может быть полезна специалистам-энзимологам, биохимикам, биологам разного профиля, изучающим регуляторные пептиды, нейрофизиологам, фармакологам. Книга может также представлять интерес для невропатологов и психиатров, исследующих молекулярные основы патологических состояний нервной системы.

Л. А. Локшина (Москва)

## СОДЕРЖАНИЕ

### Оригинальные статьи

- Душкин М. И., Мандрикова Е. В., Долгов А. В. Эстерификация окисленных продуктов холестерина и их влияние на скорость эстерификации холестерина в макрофагах 2
- Панин Л. Е., Кузьменко Д. И. Особенности окисления резервных липидов в митохондриях печени при голодании: роль иегемового железа и свободнорадикального окисления жирных кислот 5
- Долгих В. Т. Влияние острой смертельной кровопотери на пострестимуляционные изменения фосфолипидов сердца и их предупреждение 9
- Гульник С. В., Феохарус Г., Варченко П. В., Лавренова Г. И., Степанов В. М. Действие металлопротеиназы *Legionella pneumophila* на некоторые белки сыворотки крови человека. Расщепление  $\alpha_1$ -антитрипсина и кислотостабильного ингибитора сериновых протеиназ 14
- Козлов Е. А., Багдадлишвили Г. И., Прозоровская Н. Н., Дельвиц А. А. Сравнительная характеристика экскреции оксипролина с мочой у детей с послеожоговыми гипертрофическими и келоидными рубцами 17
- Кондратенко Т. Я., Кузина Н. В., Северин Е. С., Корнилова Э. Х., Тихомиров Э. В., Перельман М. И. Хроническая пневмония и рак: изменения  $\beta$ -адренергических рецепторов в паренхиме легких человека 20
- Даниловский М. А., Лосева И. В., Красильников И. В., Свиридов Б. Н. Биохимические механизмы компенсации односторонних двигательных расстройств центрального генеза и их связь с иммунной системой 21
- Шутенко Ж. В., Приедена И. А., Калвинш И. Я., Лукевиц Э. Я. Воздействие структурного аналога  $\gamma$ -бутиробетайна милдроната [3-(2,2,2-триметилгидразиний)пропионата] на карнитинзависимый метаболизм в динамике 24
- Гринько И. В., Кривчик А. А., Иванкова О. В. Функциональное состояние печени в ходе развития внепеченочного холестаза и при применении энтеросорбции 26
- Семенов В. Л., Ярош А. М. Нарушения энергетического обмена в печени при воспалении легких у крыс 28
- Козлов С. А., Урюпов О. Ю., Томчин А. Б., Киселев Е. Н. Исследование эффективности ряда фармакологических препаратов при ишемии печени 31
- Шнейвайс В. Б., Амилов К. С. Роль перекисного окисления липидов в патогенезе висцерально-ишемического шока 33
- Казачкина Н. И., Немцова Е. Р., Якубовская Р. И., Кармакова Т. А., Иванова Л. М., Соколов А. В. Изучение фармакокинетики лактоферрина женского молока у интактных мышей и животных-опухоленосителей 35

## CONTENTS

### Original Papers

- Dushkin, M. I., Mandrikova, E. V., Dolgov A. V. Esterification of cholesterol oxidation products and their effects on the rate of cholesterol esterification in macrophages 2
- Panin, L. E., Kuzmenko, D. I. Specificity of deposited lipids oxidation in liver mitochondria in starvation: role of non-heme ferrum and free radical oxidation of fatty acids 5
- Dolgikh, V. T. Effect of acute lethal hemorrhage on postresuscitation alterations in heart phospholipids and their prophylaxis 9
- Gulnik, S. V., Feoharus, G., Varchenko, N. V., Lavrenova, G. I., Stepanov, V. M. Effect of metalloproteinase from *Legionella pneumophila* on some human blood serum proteins. Hydrolysis of  $\alpha_1$ -antitrypsin and acid-stable inhibitor of serine proteinases 14
- Kozlov, E. A., Bagdallishvili, G. I., Prozorovskaya, N. N., Delvig, A. A. Excretion of hydroxyproline with urine in children with postburn hypertrophic and keloid scars: comparative aspects 17
- Kondratenko, T. Ya., Kuzina, N. V., Severin, E. S., Kornilova, Z. Ch., Tikhomirov, E. V., Perelman, M. I. Chronic pneumonia and cancer: alteration of  $\beta$ -adrenergic receptors in human lung parenchyma 20
- Danilovskiy, M. A., Loseva, I. V., Krasilnikov, I. V., Sviridov, B. N. Biochemical mechanisms for compensation of unilateral locomotor disturbances of the central genesis and their relation with immune system 21
- Shutenko, Zh. V., Priedena, I. A., Kalvins, I. J., Lukevics, E. Ya. Effect of mildronate, the structure derivative of  $\gamma$ -butyrobetaine, on dynamics of carnitine-dependent metabolism 24
- Grinko, I. V., Krivchik, A. A., Ivankova, O. V. Functional state of liver tissue during development of extrahepatic cholestasis and in enterosorption 26
- Semenov, V. L., Yarosh, A. M. Impairment of energy metabolism in liver tissue of rats with pneumonia 28
- Kozlov, S. A., Uryupov, O. Yu., Tomchin, A. B., Kiselev, E. N. Efficiency of some pharmacological drugs in liver tissue ischemia 31
- Shneivais, V. B., Amilov, K. S. Role of lipid peroxidation in pathogenesis of visceral-ischemic shock 33
- Kazachkina, N. I., Nemtsova, E. R., Yakubovskaya, R. I., Karmakova, T. A., Ivanova, L. M., Sokolov, A. V. Pharmacokinetics of human milk lactoferrin in intact mice and tumor-bearing animals 35

- Мальдов Д. Г., Збарский И. Б. Протеинкиназная активность белков, экстрагируемых тритоном X-100 из изолированных клеточных ядер печени крысы и гепатомы Зайдела 37
- Королев В. А., Головская Г. Г., Селиванова К. Ф., Молдован К. И., Борисенко С. Н. Содержание гемоглобина  $A_{1c}$  и модифицированного альбумина сыворотки крови у больных сахарным диабетом 41
- Гулиева С. А., Самедов С. И. Состав жирных кислот плазмы крови при воздействии на организм кроликов лечебной нафталановой нефти 43
- Захарян А. К., Аматауни В. Г. О взаимосвязях изменения содержания простагландинов, катехоламинов и перекисного окисления мембранных липидов у больных бронхиальной астмой 45
- Зорин Н. А., Жабин С. Г., Белогорлова Т. И., Архипова С. В. Сравнительное изучение  $\alpha_2$ -макроглобулина и ассоциированных с беременностью  $\alpha_2$ -гликопротеина и протеина А как возможных аналогов 48
- Паносян А. Г., Аракелян О. Н., Саакян Е. Г., Акопов С. Э., Назарян А. В., Габриэлян Э. С. Исследование содержания моногидроксиэйкозатетраеновых кислот в крови больных с нарушениями мозгового кровообращения 50
- Султанова Э. М., Мухамедиева Ш. Г., Сагдиев Н. Ж., Ключев О. А., Хаджиметов А. А., Султанов С. Н., Аваков В. Е., Салихов Ш. И. Пептидные эндотоксины и нарушение системы гемостаза при осложненном течении беременности 53
- Бояринов Г. А., Андреева Н. Н. Изменения жирнокислотного состава фосфолипидов миокарда после гипотермической ишемии 54
- Кальсинес П. И., Гонсалес О. Л. Г., Калелье О., Армас Ф. А., Родригес М., Смрнова И. П., Березов Т. Т. Соотношение уровней холестерина и триглицеридов в плазме крови у расовых групп на Кубе 56
- Бияшева И. Р., Мальцев Г. Ю., Пустовойтов В. В., Лоранская Т. И. Исследование системы антиоксидантной защиты и активности лизосомальных гидролаз в слизистой оболочке желудка при язвенной болезни 58
- Бутолин Е. Г., Шараев П. Н. Изменение показателей обмена биополимеров соединительной ткани при центральном введении ангиотензина II 60
- Галимов Ш. Н., Камиллов Ф. Х. О состоянии системы никотинамидных коферментов при экспериментальной ожоговой болезни в допубертатном возрасте 62

#### Методы биохимических исследований

- Голубева М. В., Лунга И. Н., Шишкин С. С. Использование двумерного электрофореза по О'Фарреллу для изучения полиморфизма белков сыворотки крови 64
- Ермаков Н. В., Ишков А. Г., Микеров С. В., Мирошниченко Е. В. Флуорометрическое определение активности моноаминоксидазы с 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином в качестве субстрата 67
- Лукашева Е. В., Веса В. С., Корпела Т. К., Березов Т. Т. Спектрофотометрический метод определения концентрации L-лизина с помощью L-лизин- $\alpha$ -оксидазы из *Trichoderma* sp. и 3,3',5,5'-тетрамethylбензидиндигидрохлорида 68
- Сергеев И. Н., Терехина Т. А., Якушина Л. М., Спиричев В. Б. Простой метод определения 1,25(OH) $_2$ D (кальцитриола) в крови 71

#### Фирма «Эбботт Лэбораториз» сообщает:

- Карелин А. А., Андреев В. И., Короткина Р. Н. Опыт использования автоматического биохимического анализатора «Spectrum» фирмы «Эбботт Лэбораториз» в клинико-биохимической лаборатории Института хирургии им. А. В. Вишневского АМН СССР 73
- Голосова Т. В., Сомова А. В., Марголина А. Н., Гульева А. А. Серодиагностика инфекций, передаваемых гемотрансиссивным путем (НИУ-1/НИУ-2, НВУ, СМУ, НСУ, НТИ Y-1), с использованием тест-наборов фирмы «Abbott Laboratories» 76
- Дронова О. М., Жабина М. И., Дюзжикова Е. В., Багирова Н. С., Соколова Е. Н. Использование автоматизированной микробиологической системы «Авантаж» фирмы «Abbott Laboratories» при изучении этиологической структуры внутрибольничных инфекций в онкологической клинике 79

Maldov, D. G., Zbarsky, I. B. Protein kinase activity of proteins extracted with Triton X-100 from rat liver tissue and Zajdela hepatoma nuclei

- Korolev, V. A., Golovskaya, G. G., Selivanova, K. F., Moldovan, K. I., Borisenko, S. N. Content of hemoglobin  $A_{1c}$  and blood serum modified albumin in patients with diabetes mellitus
- Gulieva, S. A., Samedov, S. I. Composition of fatty acids in blood plasma of rabbits treated with naphthalan oil
- Zakharyan, A. K., Amaluni, V. G. Interrelationship between alterations in content of prostaglandins, catecholamines and membrane lipid peroxidation in patients with bronchial asthma
- Zorin, N. A., Zhabin, S. G., Belogorlova, T. I., Arkhipova, S. V. Possible similarity between  $\alpha_2$ -macroglobulin and pregnancy-dependent  $\alpha_2$ -glycoprotein and protein A: a comparative study
- Panosyan, A. G., Arakelyan, O. N., Saakyan, E. G., Akopov, S. E., Nazaryan, A. V., Gabrielyan, E. S. Content of monohydroxyeicosatetraenoic acids in blood of patients with impairments of brain circulation
- Sultanova, E. M., Mukhamedieva, Sh. G., Sagdiev, N. Zh., Klyuev, O. A., Khadzhimetov, A. A., Sultanov, S. N., Avakov, V. E., Salikhov, Sh. I. Peptide endotoxins and impairment of the hemostasis system in abnormal development of pregnancy
- Boyarinov, G. A., Andreeva, N. N. Alterations in myocardial phospholipids fatty acid composition after hypothermic ischemia
- Kalsines, P. I., Gonsales, O. L., Kalleljo, O., Armas, F. A., Rodrigues, M., Smirnova, I. P., Berezov, T. T. Relation between cholesterol and triglycerides content in blood plasma of various race groups in Cuba
- Biysheva, I. R., Maltsev, G. Yu., Pustovoitov, V. V., Loranskaya, T. I. The antioxidant system and lysosomal hydrolases activity in gastric mucosal membrane in ulcer

- Butolin, E. G., Sharaev, P. N. Alterations in metabolism of connective tissue biopolymers after administration of angiotensin II into central nervous tissue
- Galimov, Sh. N., Kamilov, F. Kh. The nicotinamide coenzymes system in experimental burns during prepubertal age

#### Methods of Biochemical Investigations

- Golubeva, M. V., Lunga, I. N., Shishkin, S. S. Polymorphism of blood serum proteins evaluated by means of two-dimensional electrophoresis by O'Farrell
- Ermakov, N. V., Ishkov, A. G., Mikerov, S. V., Miroshnichenko, E. V. Fluorimetric estimation of monoamine oxidase activity using 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine as a substrate
- Lukasheva, E. V., Vesa, V. S., Korpela, T. K., Berezov, T. T. Spectrophotometric determination of L-lysine concentration using L-lysine- $\alpha$ -oxidase from *Trichoderma* sp and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride
- Sergeev, I. N., Terekhina, T. A., Yakushina, L. M., Spirichev, V. B. Simple procedure for estimation of calcitriol (1,25(OH) $_2$ D) in blood

#### «Ebbott Laboratories» informs:

- Karelin, A. A., Andreev, V. I., Korotkina, R. N. Experience with a «Spectrum» automatic biochemical analyzer (Ebbott Laboratories) in the Clinicobiochemical Laboratory of the A. V. Vishnevsky Institute of Surgery, USSR Academy of Medical Sciences
- Golosova, T. V., Somova, A. V., Margolina, A. N., Gulyaeva, A. A. Serodiagnosis of infections transferred by means of hemotransmission (HIY-1/HIY-2, HBY, CMY, HCY, HTI Y-1) using test kits from «Abbott Laboratories»
- Dronova, O. M., Zhabina, M. I., Dyuzhikova, E. V., Bagirova, N. S., Sokolova, E. N. Use of automatic microbiological system «Avantage» («Abbott Laboratories») in evaluation of etiological structure of intrahospital infection in oncological clinic

- Боговский Б. П., Барманова Е. Ю. Сравнение двух методов для терапевтического лекарственного мониторинга: ФПИА (ТДх) и ЭМИТ 80
- Синюхин В. Н., Николаева Н. П., Яромлинский И. С., Даренков А. Ф. Информативность методов определения циклоспорина А и его метаболитов при его мониторинге в крови больных с трансплантированной почкой 83
- Дзгоев А. В., Еремин С. А., Данилова Н. П., Егоров А. М., Васильев Р. Г. Количественное определение фенобарбитала в сыворотке крови человека методом поляризационного флюороиммуоанализа 85
- Габриелян Н. И., Савостьянова О. А., Белоцерковская О. И. Мониторинг циклоспорина в схеме ведения больных в посттрансплантационном периоде 86

#### Хроника

- Денисенко Т. В. К 100-летию биохимических исследований в Институте экспериментальной медицины АМН СССР 89
- Николаев А. Я. О перестройке преподавания биохимии в медицинских институтах 90

#### Рецензии

- Локшина Л. А.— А. В. Азарян. Пептидгидролазы нервной системы и их биологические функции.— Ереван: Айастан, 1989 92

- Bogovsky, B. P., Barmanova, E. Yu. Efficiency of fluorescence-polarization immunoassay and enzyme immunoassay in therapeutic drug monitoring 80
- Sinyukhin, V. N., Nikolaeva, N. P., Yarmolinsky, I. S., Darenkov, A. F. Informative value of procedures for estimation of cyclosporine A and its metabolites during monitoring in blood of patients with transplanted kidney 83
- Dzgoev, A. V., Eremin, S. A., Danilova, N. P., Egorov, A. M., Vasilov, R. G. Estimation of phenobarbital content in human blood serum by means of polarization fluoroimmunoassay 85
- Gabrielyan, N. I., Savostyanova, O. A., Belotserkovskaya, O. I. Monitoring of Cyclosporine in the treatment course of patients during the posttransplantation period. 86

#### Current Events

- Denisenko, T. V. A century of biochemical investigations at the Institute of Experimental Medicine of the Academy of Medical Sciences of the USSR 89
- Nikolaev, A. Ya. Reorganization of teaching biochemistry at Medical Institutes 90

#### Book Reviews

- Lokshina, L. A. A. V. Azaryan. Peptide hydrolases of the nervous system and their biological functions. Erevan. Aiastan, 1989 92

Адрес редакции журнала:

Москва, 109801, Солянка, 14  
АМН СССР  
Тел. 297-16-44

Зав. редакцией Э. А. Половинко

## РЕФЕРАТЫ СТАТЕЙ, ДЕПОНИРОВАННЫХ В ВИНТИ

УДК 577.164.11:612.766.2

**Влияние лечебных доз витамина В<sub>1</sub> на показатели обмена тиамин при гипокинезии.** Климович В. В.

Метаболические реакции, обеспечивающие процессы приспособления к гипокинезии, свидетельствуют о важной роли витаминов в осуществлении этих реакций. В связи с усиленной метаболизацией витамина В<sub>1</sub>, повышением потребности в нем при гипокинезии поступление физиологических доз тиамин при сбалансированном питании может не обеспечивать в полной мере тиаминзависимые ферментативные реакции. После кратковременных космических полетов отмечены снижение экскреции тиамин, угнетение активности транскетаказы в крови и высокий тиаминдифосфатный (ТДФ) эффект. В экспериментах на животных обнаружено угнетение активности транскетаказы в печени и мышце, снижена концентрация фосфорных эфиров в миокарде.

Представилось обоснованным изучить целесообразность применения избыточных количеств тиамин при гипокинезии с целью коррекции метаболизма, контролируемого витамином В<sub>1</sub>.

Опыты поставлены на беспородных крысах-самцах зрелого возраста массой 150—170 г. Животных подвергали 15-суточной гипокинезии в индивидуальных клетках-пеналах малой площади и объема. Раствор тиамин в дозе 2,5 мг на 1 кг массы животные получали с питьевой водой или в виде одной подкожной инъекции в сутки в течение всего срока эксперимента. В гемолизатах цельной крови, го-

могенатах ткани печени и миокарда определяли содержание тиамин, ТДФ и активность ТДФ-зависимых ферментов — транскетаказы, пируват- и 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплексов.

В крови животных, подвергнутых гипокинезии, активность транскетаказы оказалась сниженной. Содержание ТДФ оставалось таким же, как и у интактных животных. В печени подопытных крыс было повышено содержание свободного тиамин и снижен уровень ТДФ. Уменьшение активности процессов, поставляющих АТФ при гипокинезии, приводит к ослаблению эстерификации тиамин В<sub>1</sub>, в связи с чем, по-видимому, наблюдается угнетение активности транскетаказы и пируватдегидрогеназы в этом органе при ограничении движения. В миокарде обнаружено повышенное содержание тиамин и ТДФ у крыс с гипокинезией. Однако активность пируват- и 2-оксоглутаратдегидрогеназы в группе животных, не получавших лечебные дозы тиамин, снижается.

Избыточные количества тиамин независимо от путей введения приводят к повышению содержания ТДФ в крови, восстановлению его в печени и способствуют нормализации ферментативной активности контролируемых тиамин реакций в исследуемых тканях.

Есть основание полагать, что для проявления регуляторного потенциала в отношении активности контролируемых тиамин ферментов при гипокинезии необходимо насыщение организма экзогенным витамином.

Таблиц 3. Библиография: 19 названий.  
(Рукопись деп. в ВИНТИ 07.09.90, № 4935-В).

**Биохимические маркеры опухолевой трансформации при лимфопролиферативных заболеваниях.** Папъков В. Н., Ворончихина Л. Д., Демьянова В. Т., Рябова Т. И.

Исследовано содержание внеклеточной ДНК и свободно циркулирующих полиаминов в крови и костном мозге 49 больных хроническими лимфолейкозами и лимфосаркомами. Биохимические исследования проводили при поступлении больных в клинику и по окончании лечения. Содержание внеклеточной ДНК определяли флуориметрически с бисбензимидами, а уровень свободных полиаминов в крови и костном мозге — электрофоретически по разработанным нами методам.

Установлено, что содержание плазменной ДНК и полиаминов, включая спермин и спермидин, у обследованных больных существенно выше, чем у здоровых людей. При этом отмечено, что у больных с доброкачественной формой хронического лимфолейкоза эти показатели снижались в ходе лечения до нормальных величин, тогда как при прогрессирующей форме заболевания и лимфосаркомах в стадии лейкемизации содержание этих метаболитов оставалось повышенным до окончания лечения. Установлено, что уровень внеклеточной ДНК изменяется параллельно содержанию полиаминов и коррелирует с клинико-гематологическим состоянием больных, что позволяет рекомендовать эти биохимические параметры в качестве диагностических тестов при лимфопролиферативных заболеваниях.

Таблиц 3. Библиография: 16 названий.  
(Рукопись деп. в НИО «Союзмединформ» 16.07.90. № Д-20087).

УДК 591.131

**К вопросу об определении нитритов в слюне человека.** Храмов В. А.

Представлена методика определения нитритов в слюне человека, основанная на цветной реакции Грисса. Для анализа требуется приблизительно 0,5 мл слюны, а аналитическая процедура занимает не более 15 мин. Реактивы стабильны и достаточно доступны. С помощью предлагаемого метода можно исследовать динамику накопления и разрушения нитритов в ротовой полости. В условиях нагрузки пищевыми нитратами уровень нитритов слюны заметно повышается, затем постепенно снижается в течение последующих 5—7 ч. У 18 здоровых людей в период между завтраком и обедом средний уровень нитритов составил  $102 \pm \pm 53$  нмоль на 1 мл цельной слюны. При стоянии образцов слюны при комнатной температуре уровень нитритов в них, как правило, снижается, но отмечались и случаи небольшого его повышения. Добавление нитратов в слюне в пробирках приводило к заметному повышению содержания нитритов.

Можно предположить, что в жидкости полости рта человека действуют ферментные системы восстановления нитратов и нитритов, т. е. нитрат- и нитритредуктазы.

Библиография: 6 названий.  
(Рукопись деп. в ВИНТИ 07.09.90, № 4936-В).

**Оценка влияния различных доз кадмия на функциональную систему мать — плод (крысы) по активности некоторых ферментов энергетического и углеводного обмена.** Литвинов Н. Н., Астахова Л. Ф., Казачков В. И.

Исследовали активность  $H^+$ -АТФазы митохондрий, НАД-глутаматдегидрогеназы, НАД- и НАДФ-изоцитратдегидрогеназы, фосфофруктокиназы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в печени, почках, сыворотке крови беременных крыс и печени их плодов при ежедневном воздействии кадмия с 1-го по 20-й день беременности в дозах 2,5; 5; 7,5; 10; 15; 20 мг/кг. Наибольшие изменения изучаемых биохимических показателей выявлены в печени беременных крыс при воздействии кадмия в дозе 20 мг/кг, в почках — 7,5 мг/кг, в печени плодов — 5 мг/кг. По токсичности действия перечисленные выше ферментные системы печени беременных крыс дозы кадмия располагаются в следующем порядке (в мг/кг):  $20 > 7,5 > 10 > 5 > 15 > 2,5$ ; почек беременных крыс:  $7,5 > 2,5 > 20 > 15 > 10 > 5$ ; печени плодов:  $5 > 10 > 7,5 > 15 > 20 > 2,5$ . Чем сильнее поражались изучаемые ферментные системы в органах беременных крыс (особенно в печени) при интоксикации кадмием, тем меньшая степень неблагоприятных изменений в данных ферментных системах наблюдалась в печени плодов.

Таблиц 4. Библиография: 22 названия.  
(Рукопись деп. в ВИНТИ 07.09.90, № 4937-В).

УДК 616.127-005.8-036.11-07:616-153.962-074

**Кинетика миоглобина и креатинкиназы крови отражают разные периоды некротических изменений миокарда зоны инфаркта.** Яблчанский Н. И., Бровкович В. М., Власенко М. А., Сокрут В. Н., Дыкун Я. В., Копица Н. И.

В эксперименте на 27 собаках с моделью гипо-, нормо- и гиперреактивного инфаркта миокарда изучены закономерности кинетики креатинкиназы крови и гранулоцитов зоны инфаркта. В клинике у 83 больных изучена кинетика миоглобина и креатинфосфокиназы при гипо-, нормо- и гиперреактивном инфаркте миокарда. Исследования показали, что кинетика миоглобина отражает разные фазы некротизации (преднекроза и некроза) миокарда в зоне инфаркта, кинетика креатинкиназы — период деструкции некротизированных тканей. Комплексное определение креатинкиназы и миоглобина при инфаркте миокарда позволяет более точно выявить динамику некротических процессов, что важно при диагностике и лечении заболевания.

Иллюстраций 2. Библиография: 18 названий.  
(Рукопись деп. в ВИНТИ 14.09.90, № 5056-В).

Редактор К. И. Кочкарёва  
Технический редактор Л. Н. Гаарилова

Художественный редактор Р. Р. Катеева  
Корректор А. М. Шувалова

Сдано в набор 26.02.91. Подписано в печать 06.04.91. Формат 60×88 1/8. Печать офсетная. Усл. печ. л. 11,76.  
Усл. кр.-отт. 12,25. Уч.-изд. л. 14,06. Тираж 1000. Заказ 5385. Цена 3 р.

Орден Трудового Красного Знамени  
Издательство «Медицина» Москва 101000. Петроверигский пер. 6/8.

Набрано на орден Трудового Красного Знамени  
Чеховском полиграфическом комбинате  
Государственного комитета СССР по печати  
142300, г. Чехов Московской обл.

Отпечатано в Подольском филиале ПО «Периодика»  
Государственного комитета СССР по печати  
142110, г. Подольск ул. Кирова, 25