

ТОМ 37

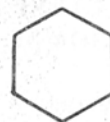
ВЫПУСК 4

ИЮЛЬ — АВГУСТ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

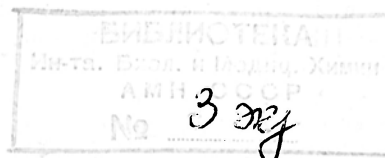
Главный редактор С. С. ДЕБОВ

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

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

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



© Г. А. ГРИБАНОВ, 1991

УДК 616-008.939.53(048.8)

Г. А. Грибанов (г. Калинин)

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ЛИЗОФОСФОЛИПИДОВ

В обзоре рассмотрены особенности строения, распространение в органах, тканях, субклеточных структурах, пути образования и метаболические превращения лизофосфолипидов (ЛФЛ). Обсуждается роль ЛФЛ в функционировании липосом и мембранной системы клеток, в регуляции активности некоторых ферментов, в процессах гемолиза, лизиса и адгезии клеток, в развитии ряда патологических процессов и аутолиза.

В последние годы в связи с активным изучением молекулярных механизмов развития патологических состояний на уровне мембранных образований клеток значительно усилился интерес к особенностям биологического функционирования ЛФЛ. Выяснено, что ЛФЛ встречаются в большинстве клеток и их ультраструктурах, принимают непосредственное участие в ряде физиологических реакций.

Согласно современным представлениям, ЛФЛ называют фосфолипиды, содержащие не два, а лишь один остаток жирной кислоты, т. е. это моноацильные (в случае глицерофосфолипидов и инозитфосфолипидов) производные соответствующих фосфатидов.

Первые ЛФЛ были описаны, вероятно, в 1903 г. [95]. Вещество, образующееся при взаимодействии очищенного яичного лецитина с ядом змей (кобры), было названо кобралецигидом; это вещество обладает гемолитическим свойством. Еще в 1877 г. было отмечено, что панкреатический сок видоизменяет лецитин [35]. Продуктами гидролиза лецитина ядами змей являются ненасыщенные жирные кислоты (чаще олеиновая кислота) и компонент, которому было дано название деолеолецитин [105]. Высказано предположение, что эта реакция носит ферментативный характер, но некоторые исследователи [30] отрицали такую возможность. В 1914 г. для обозначения таких веществ был предложен термин «лизоцитины» [68]. Химический анализ препаратов лецитинов, обработанных ядами змей, показал, что остающееся после действия яда вещество (лизолецитин) содержит насыщенную жирную кислоту, а от лецитина отщепляется ненасыщенная кислота [100]. Ферменты, отщепляющие жирные кислоты от лецитинов и от других фосфолипидов, называемые лецитазами, лецитиназами, фосфолипазами, фосфолипидацилгидролазами, найдены во многих тканях и органах [2, 24, 25, 62]. Во многих тканях выявлено наличие лизофосфатидилхолинов (лизолецитинов) — ЛФХ, лизофосфати-

дилэтаноламинов (лизокефалинов) — ЛФЭ, лизофосфатидилсеринов (ЛФС), лизофосфатидных кислот (ЛФК), лизосфингомиелинов, лизофосфоинозитидов (ЛФИ) и даже лизоплазмалогенов [6, 24, 25, 73, 131, 157].

Особенности структуры и жирнокислотный состав лизофосфатидов

Среди природных ЛФЛ возможно существование как α -, так и β -ацильных форм [104, 120, 133], но чаще встречаются α (1-моноацильные)-формы ЛФЛ [151]. Наличие в структуре ЛФЛ первичной спиртовой группы приводит к появлению новых физико-химических характеристик. Они приобретают при этом способность растворяться не только в спиртах, хлороформе, но и в воде (но не в ацетоне или эфире) [55].

Было обнаружено [105], что в продуктах гидролиза лецитинов ядами змей появлялись ненасыщенные жирные кислоты. В природных фосфолипидах положение 2 глицерина занимает, как правило, ненасыщенная жирная кислота [41, 149]. Но в отдельных классах фосфатидов это правило не всегда соблюдается [9, 10, 54]. Именно этим, а также тканевыми особенностями структурной организации диацильных форм фосфатидов, очевидно, объясняется тот факт, что жирнокислотный состав ЛФЛ из различных тканей и органов существенно различается. При сравнительном анализе жирных кислот лизолецитинов [150], полученных из яичного желтка, сыворотки крови человека и других тканей животных, а также дрожжевых клеток обнаружили, что в ЛФХ яичного желтка, сыворотки крови человека, легкого быка на 48—57 % представлено $C_{16:0}$ и на 13—25 % — $C_{18:0}$. Соотношение насыщенные кислоты:ненасыщенные составляет 73—76:24—27. В дрожжевых клетках оно не превышает 56:44. Для лецитинов яичного желтка это соотношение равно 42:58, тогда как для сыворотки крови — 63:38.

В составе ЛФИ, полученных обработкой инозитфосфатидов поджелудочной железы ядом змей (*Cr. adamanteus*) и пчел, α -формы содержат значительные количества насыщенных кислот ($C_{16:0}$ и $C_{18:0}$ в сумме свыше 30 %), тогда как в составе β -форм ЛФИ обнаруживается свыше 36 % $C_{20:4}$ и 15—16 % $C_{18:2}$, а $C_{18:0}$ составляет до 40 % [87].

Среди жирных кислот ЛФХ эритроцитов человека около 20 % жирных кислот представлены ненасыщенными кислотами, а в ЛФЭ количество их достигает 47,5 % [143]. В составе семи-лизо-бис-фосфатидной кислоты из легких кролика около 20 % найдено $C_{16:0}$, тогда как ненасыщенные кислоты ($C_{18:1}$, $C_{18:2}$) составляют в сумме до 60 % [43].

Все это свидетельствует о том, что жирно-

кислотный состав и позиционное распределение их в лизофосфатидах имеют выраженную видовую и тканевую специфичность. Характер образующихся при этом ЛФЛ определяется набором ферментов, катализирующих гидролиз соответствующих фосфолипидов или их синтез.

Содержание лизофосфатидов в органах, тканях и субклеточных структурах

Лизофосфатиды, особенно лизолецитины, найдены во многих, если не во всех, органах, тканях, биологических жидкостях, субклеточных структурах [24, 25].

ЛФЛ являются обычными компонентами большинства субклеточных структур и мембранных образований [25]. Содержание ЛФЛ в субклеточных и мембранных образованиях клеток весьма разнообразно [24, 25], что отражает тканевые и видовые особенности. Не исключено, что они появляются в процессе выделения, последующей очистки и анализа [150].

Количество ЛФХ в плазматических мембранах клеток существенно варьирует (0,5—7,1 %) [25, 159]. В них выявлена высокая фосфолипазная активность [111, 152]. В ядрах клеток разных органов содержание ЛФХ колеблется в таких же пределах [14, 25]. Ядерные мембраны содержат немного ЛФХ [91] и ненасыщенных жирных кислот [90]. Концентрация ЛФХ в целых митохондриях печени не превышает 4 % [80, 102]. Наружные мембраны митохондрий печени крыс содержат больше ЛФХ, чем внутренние [102].

Значительную долю ЛФЛ лизосом печени [40] составляют ЛФК и другие ЛФЛ. В лизосомной фракции семян и надпочечных желез крыс обнаруживается до 15—18 % ЛФЛ [7]. В хромоаффинных гранулах мозгового слоя надпочечников крупного рогатого скота присутствует до 17 % ЛФЛ [39, 156].

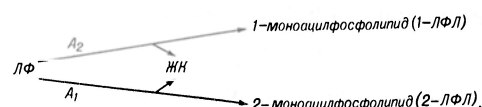
Отмечено [39] участие ЛФХ в процессе секреции катехоламинов. Содержание ЛФХ в мозговой части надпочечников меньше, чем определяли раньше (до 6—7 % суммы фосфолипидов), а в корковом слое надпочечников крупного рогатого скота ЛФХ вообще не обнаруживается. В мозговом слое замороженных в жидком азоте надпочечных желез кроликов ЛФХ также не обнаруживается. Очевидно, в интактных хромоаффинных гранулах ЛФХ отсутствует, накапливаясь в них во время анализа. Основное место локализации ЛФХ в надпочечниках — мембраны хромоаффинных гранул, причем в наружных монослоях гранул располагается до 10 % ЛФХ [115].

Мембранная система комплекса Гольджи печени и других несэндокринных органов содержит до 6 % ЛФЛ [25]. Мембраны эндоплазматической сети (микросомная фракция) также весьма богаты ЛФХ (до 13 % от суммы фосфатидов) [25]. В микросомах надпочечных желез крыс содержится 4,5 % ЛФЛ [68]. Основная масса ЛФЛ в микросомах печени крыс представлена ЛФХ (их в 5 раз больше, чем ЛФЭ). Среди ЛФЭ обнаруживаются как 1-ацил-, так и 2-ацил-лизофосфатидилхолины, тогда как ЛФЭ представлены главным образом 1-моноацильными производными [71]. В мембранной системе саркоплазматического ретикулаума находят до 2—6 % ЛФХ [29].

Таким образом, лизофосфатиды для большинства тканей, клеток, их ультраструктур являются нормальными компонентами. Различия в содержании, очевидно, отражают как биохимическую специфику тканей и ультраструктур, так и методические подходы к выделению, очистке и анализу фосфатидов, приводящие к активации эндогенных фосфолипаз и увеличению количества лизофосфатидов.

Пути образования и метаболические превращения лизофосфатидов

Основной путь образования большинства лизофосфатидов — гидролиз соответствующих диацильных фосфолипидов фосфолипазами типа A_2 и A_1 [2].

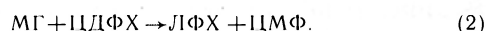


где ФЛ — фосфолипид; A_1 и A_2 — фосфолипаццилгидролазы A_1 и A_2 ; ЖН — остатки жирных кислот.

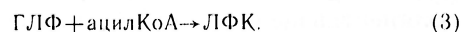
Ферменты, гидролизующие сложноеэфирные связи фосфолипидов, найдены практически во всех клетках, тканях, органах, пищеварительных соках, ядах насекомых, змей, бактерий и др. Но позиционная специфичность действия фосфолипаз была установлена лишь в 60-е годы [2, 54]. Фосфолипазы различных биологических структур часто обладают неодинаковыми свойствами. Так, фосфолипаза A_2 мембран эндоплазматического ретикулаума, как правило, не требует для проявления активности ионов Ca^{2+} [2]. Фосфолипаза A_2 лизосом отличается от митохондриальной и микросомальной тем, что наиболее активна при кислых значениях pH. При нейтральных значениях pH более высокая активность фосфолипазы A_2 обнаруживается в митохондриях, а фосфолипаза A_1 — в микросомах, эндоплазматической сети [2]. Превращение лецитинов в лизолецитины не является односторонним процессом: $ФХ \rightarrow ЛФХ$. Возможна и обратная реакция: $ЛФХ \rightarrow ФХ$. В клетках может существовать так называемый лецитин-лизолецитиновый цикл [134, 153]:



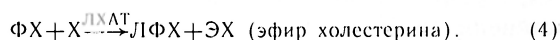
Гидролитический путь образования лизофосфатидов из диацильных форм не единственный. С помощью меченых предшественников был изучен механизм непосредственного синтеза ЛФХ в микросомах легких крыс [17]. Эта ферментная система осуществляет синтез ЛФХ из моноглицерида (МГ) и меченого по CH_3 группе цитидиндифосфохолина (ЦДФХ):



Для ЛФК возможен путь ацилирования глицерофосфата (ГЛФ) [16]:



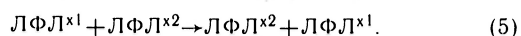
Для некоторых тканей и особенно крови характерна еще одна реакция, катализируемая лецитинхолестеринацилтрансферазой (ЛХАТ):



В этой реакции из положения 2 молекулы лецитина переносятся, как правило, ненасыщенная жирная кислота на молекулу холестерина. Данная ферментная система наряду с функцией поддержания и регулирования физиологических концентраций холестерина и его эфиров в крови и мембранах клеток [13] играет важную роль в метаболических взаимоотношениях липидов [6а].

В ряде тканей и органов имеется ацилтрансфераза, катализирующая обратную реакцию, — АТФ-независимый перенос ацильной группы с холестерилолеата на лизолецитин с образованием свободного холестерина и лецитина [119].

Определенное значение в образовании некоторых молекулярных видов ЛФЛ может иметь лизофосфолипаза, которая наряду с расщеплением ЛФЛ участвует в переносе ацильного остатка с одной молекулы ЛФЛ на другую [18]:

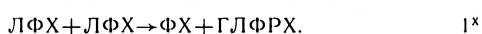


Из растворимой фракции легких крыс был выделен фермент лизофосфолипаза-трансацилаза, осуществляющая как гидролиз ЛФЛ, так и перенос остатка жирной кислоты на другую молекулу ЛФЛ с образованием диацильной формы фосфолипида и глицерилфосфорилхолина (ГЛФРХ) [44]:

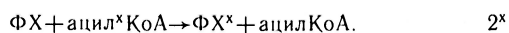


Наиболее быстро превращение ЛФХ в лецитин и глицерофосфорилхолин происходит в печени и кишечнике, медленнее — в легких, почках, сердце, селезенке. Этот путь является главным в образовании полиеновых молекулярных видов лецитинов [21].

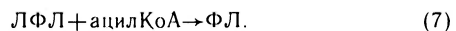
Метаболические превращения лизофосфатидов также разнообразны. Основной путь — это переход ЛФЛ в соответствующие диацильные производные. Переход ЛФХ в лецитины может осуществляться следующим образом [63]:



Впоследствии ФХ вступает в реакцию эфирной перегруппировки:



В ряде клеток и тканей осуществляется и реакция прямого ацилирования ЛФХ и других лизофосфатидов определенными ацилКоА [59—61, 65, 66, 144]:

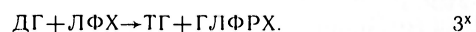


Ацилтрансферазы для ЛФХ, ЛФИ локализованы главным образом в микросомах (слизистая тонкого кишечника, мозг) и имеют оптимум рН 7,0. Ионы Ca^{2+} , Mg^{2+} ингибируют превращение ЛФХ в ФХ. Лучшим ацилирующим агентом (для печени, слизистой кишечника) является олеил-КоА [107], линолеил-КоА (для мозга крыс) [122]. В ЛФС мозга наиболее активно включаются в положение 2 линолеил-КоА, арахидонил-КоА при рН 9,0. Насыщенные ацилпроизводные включаются медленнее [85]. Полагают, что некоторые полиненасыщенные молекулярные виды инозитфосфатидов в печени крыс *in vivo* образуются путем ацилирования ЛФИ [77]. ЛФХ (0,1 мМ) резко (в 6 раз) усиливает включение ^{14}C -пальмитиновой кислоты в лецитины и в еще большей степени (в 16 раз) — в нейтральные глицериды

[160]. Особое значение в реакциях ацилирования имеет ацилглицериновая часть лизофосфатидов, а не их полярная часть [158]. Реакции трансэтерификации между 2 молекулами ЛФЛ, являющиеся, как правило, энергонезависимыми в отличие от реакций прямого ацилирования ЛФЛ, ферменты которых, как считают [146], связаны с липопротеидами плазмы крови. Ацилирование ЛФХ и ЛФЭ в печени осуществляется главным образом ферментами плазматических мембран эндоплазматического ретикула и (менее активно) наружной мембраны митохондрий [113]. Ряд фосфолипидов в мембранах митохондрий не гидролизуются фосфолипазами (например, фосфатидная кислота), но ЛФК в них обнаруживается. Полагают [113], что появление ЛФК есть результат не гидролазных, а синтетазных реакций, за счет внутренних мембран митохондрий. Ацилирование ЛФЛ в митохондриальных мембранах может осуществляться путем кооперирования мембран эндоплазматического ретикула с внешней мембраной митохондрий [6а], чему способствует действие эндогенных фосфолипаз типа А, вызывающих локальные мицеллярные преобразования внутримембранных липидов, что благоприятствует слиянию внутриклеточных мембран и обмену липидным материалом между мембранными структурами [113].

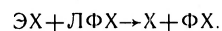
Лизофосфолипадацилтрансферазные реакции играют важную роль в регуляции жирнокислотного состава мембранных фосфолипидов [20]. Реацилирование ЛФЛ — основной путь синтеза насыщенных лецитинов в легких [148]. Эти реакции весьма важны и в процессах развития мозга [125].

Кроме перехода лизофосфатидов в соответствующие диацильные фосфатиды, они участвуют (в концентрациях до 0,2 мМ) в реакциях ацилирования диглицеридов (ДГ) в соответствующие триглицериды (ТГ):



Максимальное ацилирование диглицеридов с участием ЛФХ наблюдается при концентрации последних 75 мкМ. Высокие концентрации ЛФХ ингибируют активность ацил-КоА-1,2-диацилглицерол-трансферазы [117, 118].

Описано участие ЛФХ и в реакциях обратного переноса жирных кислот с холестерололеата. В водных экстрактах ацетон-бутанольного порошка аорты свиней обнаружен АТФ-независимый перенос олеата на ЛФХ с образованием свободного холестерина и лецитина [119]:



В отсутствие ЛФХ образование холестерина и жирной кислоты происходит за счет гидролиза эфира холестерина соответствующей гидролазой.

Главный путь деградации лизофосфатидов — гидролитическое отщепление жирных кислот при участии лизофосфолипаз (старое название — фосфолипаза В). Накопление ЛФЛ в клетках может приводить к разрушению биологических мембран. Не случайно в клетках активность лизофосфолипаз, как правило, выше активности фосфолипаз A_2 и A_1 [2]. Существенной особенностью лизофосфолипаз является то, что они ингибируются дезоксихолатом и изопропилфторфосфатом. Эти ферменты находят в клетках различных микро-

организмов, растений, животных. В тканях млекопитающих активность лизофосфолипазы не обнаруживается в плазматических мембранах и митохондриях, тогда как в мембранах эндоплазматической сети (микросомы), лизосомах, цитозоле находят высокую активность лизофосфолипаз [2]. Лизофосфолипазы не обладают высокой специфичностью действия, гидролизуют лишь молекулярные растворы ЛФЛ и не действуя на мицеллярные формы ЛФЛ [98, 99]. Ингибирующий эффект снимается альбумином. Алкильные производные ЛФХ (2-дезоксид- и 2-метоксид-) деградируют существенно медленнее, чем природные лизолецитины, причем дезоксид-аналоги распадаются быстрее, чем метоксид-производные. При введении в организм они быстро накапливаются в печени, почках, кишечнике [26].

ЛФЛ в функционировании искусственных и природных мембран

Лизофосфатиды и липосомы

Большое значение в выяснении биологической роли ЛФЛ и других липидов в функционировании мембранных структур клеток имели модельные эксперименты с липосомами, получаемыми как из природных, так и из синтетических липидов. Было выявлено, что добавление лизолецитина к липосомам, приготовленным из липидов митохондрий сердца, приводит к исчезновению температурного излома на графике Аррениуса (в области 20 °С). Аналогичную картину наблюдали в липосомах из фосфатидов сердца животных, находящихся в состоянии зимней спячки. Очевидно, в составе фосфолипидов сердца животных, находящихся в состоянии зимней спячки, присутствуют значительные количества лизофосфатидов [88].

Изменения фазовых переходов смесей диацильных и моноацильных форм фосфатидов зависят от природы азотистых остатков фосфатидов и от длины углеводородных цепей [42]. В смеси с дипальмитоилфосфатидилхолином ЛФХ не изменяет ширину пика фазового перехода в отличие от других фосфолипидов, содержащих более длинную углеводородную цепочку. Липосомы из яичного лецитина, холестерина и ЛФХ обладают высокой проницаемостью для глюкозы и отличаются неустойчивостью в гипотонических растворах. Отмечено, что увеличение доли холестерина в липосомах позволяет вводить в них большее количество ЛФХ без нарушения барьерных функций липосомальных мембран. При содержании 50 мол. % холестерина лизолецитин способен образовывать устойчивые липосомы, непроницаемые для глюкозы [89]. Исследование ЯМР-спектров бислойных липосом, содержащих холестерин и ЛФХ в эквимолярных соотношениях, показало, что между гидрофильными и карбонильными группами ЛФХ и гидроксилами холестерина образуются водородные связи [130]. Проницаемость липосом из диолеиллецитинов для флюоресцеина увеличивается с ростом концентрации ЛФХ в них [128]. Везикулы, содержащие ЛФХ, обладают чрезвычайно высокой проницаемостью для некоторых ионов (Eu^{3+}) при температурах ниже температуры фазового перехода, что объясняют образованием кластеров ЛФХ, служащих своеобразными

каналами для быстрого прохождения ионов. При температурах выше фазового перехода проницаемость снижается, но ее можно увеличить нагреванием или увеличением концентрации ЛФХ [97].

Лизофосфатиды оказывают существенное влияние и на размеры липосом. С помощью электронной микроскопии и метода негативного контрастирования удалось выявить существенные различия в размерах и структуре липидных мицелл, содержащих ЛФХ [82]. Дипальмитоиллецитин и сфингомиелин с ЛФХ образуют дисковидные структуры размером 10—50 нм. Добавление холестерина увеличивает диаметр дисков. Эквимолярные смеси ЛФХ с димиритоиллецитином имеют характер цилиндрических мицелл, а с яичным лецитином — концентрические и палочковидные мицеллы радиусом 6 нм. Лизолецитины (как, впрочем, и некоторые другие факторы плазмы или сыворотки крови) способны осуществлять дискоцит-эритроцитную трансформацию эритроцитов [64]. Обнаружен эффект увеличения объема лизосом из печени крыс и водных дисперсий лизосомных фосфолипидов при введении в них ЛФХ. Общее число частиц в дисперсиях лизосомных фосфатидов уменьшается, что могло быть следствием индукции ЛФХ слияния мембран [127].

Лизофосфатиды (5 мол. % ЛФХ), включенные в липосомальные мембраны из яичного лецитина, при введении в организм быстро гидролизуются лизофосфолипазами печени [32]. Полагают, что 80—90 % ЛФХ локализованы во внешнем монослое липосом. Небольшая часть их располагается в межслойном пространстве и поэтому довольно медленно разрушается. Введение в такие липосомы холестерина уменьшает скорость гидролиза ЛФХ, которая составляет лишь 60 % от исходной величины. Очевидно, ЛФХ в них распределяется более равномерно во внешнем и внутреннем слоях.

В последние годы большой интерес проявляется к новому способу введения в состав липосом и биологических мембран липидов с помощью липидпереносящих (липидобменивающих) белков. Внедрение таким способом в липиды митохондрий и микросом ЛФХ существенно ингибирует активность ряда ферментов биологического окисления, но активирует глюкозо-6-фосфатазу [11, 12]. Использование липидпереносящих белков с целью химической модификации мембран открывает широкие возможности для изучения влияния характера липидного окружения на активность многих мембранно-связанных ферментов, изоферментов, их комплексов [1].

Цитолитический и гемолитический эффект лизофосфатидов

Участие лизофосфатидов в других физиологических процессах

Доказано токсическое действие ЛФЛ на эритроциты и другие клетки и ткани [6, 66, 72, 131]. Подкожное введение ЛФХ сопровождается тромбозом, геморрагиями, локальными отеками с последующим некрозом клеток [121]. Цитолитический эффект ЛФЛ как поверхностно-активных веществ сопровождается увеличением проницаемости мембран для органических молекул ионов. Наибольший цитолитический эффект ЛФЛ достигается, когда нет ограничений для подвижности

их в фосфолипидном слое мембран. Такими веществами могут быть молекулы холестерина [81], жирных кислот [84]. Устойчивость биомембран, содержащих ЛФЛ, определяется присутствием в них эквивалентных количеств жирных кислот. Некоторые ЛФЛ (в частности, ЛФК) могут выполнять роль Са-ионофоров [96].

Не все клетки, ультраструктуры или мембранно-связанные ферменты одинаково реагируют на появление в их составе ЛФЛ. При введении фосфолипазы А в трахею мышей быстрее всего лизируются эпителиальные клетки I типа, тогда как эпителиальные клетки II типа являются более устойчивыми к действию эндогенного ЛФХ [27]. В субмитохондриальных частицах, полученных из митохондрий сердца быка, ЛФХ полностью солюбилизирует трансгидрогеназу, сукцинатдегидрогеназу, НАД·Н₂-дегидрогеназу, тогда как олигомицинчувствительная АТФаза солюбилизируется на 63 %, а цитохромоксидаза полностью остается связанной с мембранами. При электрофоретическом анализе солюбилизованных ЛФХ белков было обнаружено, что из субмитохондриальных частиц выходят в раствор белки с мол. м. 70 000, 54 000, 58 000, 34 000 и 122 000 [135].

Цитолитическая активность ЛФХ увеличивается с возрастанием длины углеводородной цепи жирной кислоты, причем в зависимости от длины жирнокислотного остатка находится и характер солюбилизуемых из мембран фосфатидов и других компонентов. Лауриллизолецитин преимущественно солюбилизирует из мембран тромбоцитов фосфатидилсерин; пальмитоиллизолецитин действует менее избирательно. Подобный эффект лизолецитинов на белки мембран имеет много общего с действием на них тритона X-100 [46]. Некоторые авторы изучали механизм лизирующего действия лизофосфатидов на искусственные и природные мембраны [155].

Гемолитические свойства лизофосфатидов известны давно. Выяснены особенности гемолитического действия различных лизофосфатидов [6, 72, 131, 132]. На скорость гемолиза влияет величина адсорбции лизофосфатидов на поверхности эритроцита; 2-бензилпроизводные лизофосфатидов замедляют процессы гемолиза по сравнению со стеароиллизолецитином [155].

Эритроциты, обработанные лизолецитином или имеющие его в составе мембран, обладают пониженной осмотической устойчивостью. Структурной основой понижения осмотической устойчивости эритроцитов, содержащих ЛФЛ, является превращение их в сферические клетки [136]. Изменение поверхности эритроцитов при действии ЛФХ сопровождается увеличением скорости их агглютинации, что некоторые авторы связывают со структурными перестройками белков поверхности мембраны эритроцитов и изменением их заряда [108]. При воздействии ЛФХ на эритроциты человека в концентрации выше их критической концентрации мицеллообразования в среде инкубации обнаруживаются белки с мол. м. от 15 000 до 90 000, среди которых были и ферменты (ацетилхолинэстераза и др.) [37]. Можно полагать, что цитолитический эффект ЛФЛ обусловлен сочетанием действия их как поверхностно-активных веществ, ионофоров, вызывающих структурные перестройки липидного компонента и белков в мембранах.

ЛФЛ оказывают выраженное влияние на рост клеток *in vitro* [114], индуцируют слияние гемолизированных эритроцитов, способствуя образованию синцития и даже слиянию различных типов клеток [123]. На характер адгезии клеток определенное влияние оказывает природа жирной кислоты ЛФХ; чем длиннее цепь жирной кислоты и чем выше степень ее насыщенности, тем выше адгезивные свойства ЛФХ [50, 52]. Однако в больших концентрациях (до 100 мкМ и более) ЛФХ вызывает временное угнетение агрегации тромбоцитов [83], а также клеток сетчатки куриного эмбриона [51]. В условиях, способствующих реацилированию ЛФЛ, антиадгезивный эффект их быстро (через 60—90 мин) снижается, что связывают как с изменением формы клеток, так и с включением ЛФХ в метаболические превращения [83].

Не все лизофосфатиды одинаково влияют на агрегацию клеток. Изучена зависимость адгезивных свойств ЛФК от характера жирнокислотных остатков [69]. Деканоиллизолецитидная кислота в концентрации до 320 мкМ (*in vitro*) не изменяет свойств тромбоцитов; пальмитоилфосфатидная и олеиллизолецитидная кислоты уже в низких концентрациях (до 12 мкМ) вызывают изменение формы тромбоцитов и их агрегацию. В более высоких концентрациях (до 80 мкМ) они вызывают обратимую, а при 200—300 мкМ — необратимую агрегацию тромбоцитов. В этом процессе важная роль принадлежит освобождающимся из тромбоцитов при участии ЛФК внутриклеточных ионов кальция.

Кроме этих явлений, ЛФЛ принимают активное участие в механизмах всасывания липидов, глюкозы, воды, солей в кишечнике. При наличии в пище меченого ЛФХ он уже через 6 ч на 40 % оказывается в составе хиломикронной плазмы [137]. Предполагается, что лецитины в кишечнике частично гидролизуются и всасываются в форме ЛФХ, который в дальнейшем подвергается реацилированию. Лизофосфатиды усиливают всасывание меченой ¹⁴С-олеиновой кислоты и стимулируют включение ее в триглицериды слизистой оболочки, но не влияют на этерификацию холестерина и его всасывание [129]. Особая роль в образовании фосфоглицеридов в слизистой кишечника отводится ЛФК, являющейся предшественником практически всех фосфатидов [116]. С увеличением концентрации (до 5—10 мМ) в просвете тощей кишки *in vivo* у крыс наблюдается снижение (вплоть до полного прекращения) абсорбции воды, глюкозы, электролитов. Наличие в просвете кишечника ФХ (5 мМ), холестерина (2 мМ) уменьшает ингибирующий эффект ЛФХ в отношении поглощения воды, глюкозы, солей. Но добавление таурохолатов совместно с ЛФХ увеличивает поглощение этих компонентов, хотя сам таурохолат не обладает такими свойствами [22].

Новые аспекты в изучении механизма действия ЛФЛ на клетки открываются в связи с установлением асимметричного распределения экзогенных ЛФХ и ЛФС в их мембранах [33]. Обнаружено, что ЛФХ проявляют некоторую предпочтительность по отношению к наружному монослою мембраны эритроцитов, тогда как ЛФС концентрируются во внутреннем монослое мембраны.

Скорость трансмембранной миграции ЛФЛ зависит от липидного окружения и структуры ЛФЛ. Она увеличивается при удалении холестерина из мембраны, увеличении соотношения ФХ/СФМ, повышении степени ненасыщенности мембранных липидов. Скорость миграции возрастает в ряду: пальмитоил — ЛФХ < олеоил — ЛФХ < олеоил — ЛФС.

Лизофосфатиды как регуляторы активности мембранно-связанных ферментов

Изменение физико-химического состояния мембран под влиянием ЛФЛ сказывается на активности мембранно-связанных ферментов. ЛФЛ можно использовать в качестве веществ, способствующих выделению некоторых ферментов в активном состоянии из тканей и органов, внутриклеточных структур. ЛФХ как природные поверхностно-активные вещества использовали для получения ряда ферментов (щелочная фосфатаза, холинэстеразы) из ткани мозга [109]. Активность кислой фосфатазы, моноаминоксидазы при таком способе получения была низкой. Для освобождения ферментов из клеток (фибробласты легких эмбриона человека) необходимо наличие определенных концентраций ЛФХ: для лактатдегидрогеназы 5—10 мкг/мл, аспаратаминотрансферазы 10—25 мкг/мл, глутаматдегидрогеназы 50 мкг/мл. Клетки после 15-минутной экспозиции с ЛФХ сжимаются и теряют часть цитоплазмы [92]. Лизофосфатиды применяли и для очистки АТФазы из мышц омара [53].

Наряду с тем что ЛФЛ использовали как солибилизирующие вещества, способствующие выделению ферментов из клеток и тканей, для ряда ферментов они являются активаторами. ЛФЭ резко (в 15—20 раз) стимулирует активность пируватоксидазы *E. coli* [49]. Активность некоторых гидролаз, трансфераз также контролируется ЛФЛ. Для фенилаланингидроксилазы из печени крыс наибольшей активирующей способностью обладает ЛФХ, тогда как ЛФЭ не влияет на скорость реакции, а лецитин ингибирует этот фермент [67]. ЛФХ оказывает сильное активирующее действие на УДФ-галактозо-гликопротеин-галактозидтрансферазу из микросом и мембран комплекса Гольджи печени крысы. В механизме активирующего действия ЛФХ важным моментом является солибилизирующий эффект, поскольку при инкубации микросом с ЛФХ фермент переходит в растворимую форму, что способствует взаимодействию фермента с субстратом [112]. Аналогичное действие оказывает ЛФХ и на сиалилтрансферазу микросом печени крыс [142]. Основой активирующего действия фосфолипидов на мембранно-связанные ферменты является их аллостерический эффект [4]. ЛФХ осуществляет свое влияние на уровне как вторичной и третичной структуры отдельных субъединиц, так и четвертичной структуры всей молекулы фермента. Коэффициент Хилла, характеризующий число эффекторов, связывающихся с белком-ферментом, для ЛФХ при активации им большинства оксидоредуктаз и фосфатаз составляет 2—3, тогда как для лецитина — 1.

Активизирующим действием на некоторые ферменты обладает и ЛФЭ. Активность нейтраль-

ной гормонально-зависимой триацилглицероллипазы из сердца крыс значительно возрастает при добавлении к очищенному от липидов препарату фермента ЛФЭ и фосфатидилэтаноламина, но не лецитина или кислых фосфолипидов [139].

Не все ферменты активируются ЛФЛ. Большое число ферментов существенно ингибируется моноацильными производными фосфатидов. Обнаружено угнетающее действие ЛФХ на окислительно-восстановительные процессы [6]. В концентрации более 1 мкг/10⁶ клеток в опытах *in vitro* ЛФХ существенно ингибирует дыхание клеток, особенно опухолевых [45]. Отмечен также ингибирующий эффект ЛФЛ на ацил-КоА гидролазу микросом печени [147]. В реконструированных микросомах печени крыс ЛФХ инактивирует цитохром P-450 [11]. Лизолецитины, содержащие C_{14:0} и C_{16:0}, обратимо ингибируют (по смешанному типу) деаминацию аминов моноаминоксидазой митохондрий печени крыс [78].

В препаратах плазматических мембран печени крыс ЛФХ угнетает активность глюкагонстимулируемой аденилатциклазы. В небольших концентрациях ЛФХ стимулирует активность фермента [79]. Основным в механизме ингибирующего действия ЛФХ на фермент является нарушение сопряжения между рецептором гормона и активным центром фермента, поскольку ЛФХ изменяет микровязкость и структуру мембраны.

Лизолецитины могут выступать как мощные внутриклеточные регуляторы активности аденилат- и гуанилатциклазных систем. В клетках нейробластомы ЛФХ, но не ЛФЭ или лецитин и кефалин значительно (в 11 раз) активируют гуанилатциклазу гомогената и несколько меньше (в 4—7 раз) растворимую и мембранно-связанную гуанилатциклазу [161]. Активность аденилатциклазы в противоположность гуанилатциклазе угнеталась в 4 раза. Эндогенные лизофосфатиды (и прежде всего ЛФХ) могут играть важную роль в формировании ответной реакции клеток на стимулирующие или угнетающие факторы и регулировать клеточный метаболизм. В микросомах семенных пузырьков быка обнаружено ингибирующее влияние экзогенного ЛФХ на синтез другого важного внутриклеточного регулятора метаболизма — простагландина E₂ из арахидоновой кислоты [141]. Известно, что эндоперекиси простагландинов, как и ЛФХ, активируют гуанилатциклазу, но в значительно меньших концентрациях (1 мкМ против 80 мкМ для ЛФХ). При соотношении ЛФХ/белок ≥ 0,03 отмечено заметное угнетение активности циклооксигеназы жирных кислот с последующим нарушением синтеза простагландина E₂. При этом структурные аналоги ЛФХ с C_{18:0} обладают более низкой ингибирующей активностью, чем C_{12:0} ЛФХ.

Очевидно, ЛФЛ оказывают многообразное действие на мембраны клеток, изменяя их подвижность, адгезивные свойства, активность их ферментных систем, участвуя тем самым в регуляции метаболизма и формировании ответной реакции клеток на мембранном уровне.

Участие лизофосфатидов в развитии патологических процессов и аутолиза

В последние годы были получены новые дан-

ные о роли ЛФЛ в возникновении и формировании ряда патологических состояний, таких, как гипоксия, заболевания сердечно-сосудистой системы (ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда, атеросклероз), болезни желудочно-кишечного тракта, процессы старения и гибели клеток.

Гипоксия (ишемия) является ведущим фактором в нарушении метаболизма тканей, органов и организма в целом. При инкубации срезов мозга в анаэробных условиях количество ЛФХ в них увеличивается в 3 раза по сравнению с исходными величинами и в 1,5 раза по сравнению с инкубацией в аэробных условиях [154]. Ишемия печени крыс сопровождается заметным снижением в митохондриях количества фосфолипидов с параллельным нарастанием содержания ЛФЛ и необратимым ингибированием дыхания митохондрий [34]. Кратковременная гипоксическая гипоксия у крыс не вызывает значительного накопления ЛФЛ в сыворотке крови и миокарде [8, 15].

Ишемия миокарда у кошек сопровождается значительным увеличением количества ЛФХ и параллельным резким снижением некоторых электрофизиологических показателей (диастолический потенциал действия) [47]. При перфузии сердца овцы оксигенированной средой ЛФХ не изменял потенциала действия [140]. Полагают, что нарушения сердечного ритма в присутствии ЛФХ (0,05—0,1 мМ) у некоторых животных определяется его детергентными свойствами и зависит от длины жирнокислотных цепей в ЛФХ [106].

Склеротические поражения сосудов приводят к значительным нарушениям функции сердца, мозга, печени, почек и других органов. При этом содержание ЛФЛ в жидкой части крови оказывается сниженным [94], особенно значительно при острой ишемии миокарда и инфаркте миокарда [70]. В стенках аорты людей, страдающих атеросклерозом, количество ЛФХ возрастает в 3 раза [74]. Эти исследования послужили поводом для дальнейшего выяснения роли ЛФЛ в механизмах транспорта холестерина с участием ЛФЛ. Введение крысам фосфолипазы А сопровождается увеличением в крови количества ЛФЛ и снижением количества фосфолипидов, холестерина и перемещением последних из липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) в липопротеиды высокой плотности (ЛВП) [56]. Высокие концентрации ЛФХ способствуют снижению количества эфиров холестерина в плазме крови и повышению содержания их в печени и других органах [57, 58]. Лизолецитин обладает выраженным сродством к ЛПНП и плазматическим мембранам [125, 126], функционирует как связующее звено между ними. Природа связей липопротеид-лизолецитиновых комплексов изучена недостаточно; основой их может быть сродство ЛФХ к свободному холестерину [124]. Внутривенное введение ЛФХ увеличивает скорость удаления ЛВП из плазмы крови и накопление их в среднем слое артерий. Лизолецитин является фактором, способствующим развитию гемолитической анемии при синдроме Зива [94].

Демиелинизирующие заболевания центральной нервной системы также сопровождаются накоплением в тканях ЛФХ [3], как и узловые

формы зоба, где особенно много обнаружено ЛФЭ [101]. При тяжелых цирротических поражениях печени количество ЛФХ и ЛФЭ в крови резко снижается [93].

Лизолецитин является важным компонентом, вызывающим язвенные поражения слизистой желудка. В желудочном соке больных язвенной болезнью количество ЛФХ в 10 раз и более превышает соответствующий показатель у здоровых людей [86]. Лизолецитины и лизоцефалины способствуют возникновению катаракты у человека и животных [48, 145]. Повышение количества ЛФЛ в крови находят при уремии [138], у больных рассеянным склерозом [23] и при ряде других заболеваний [6]. Отмечена противоопухолевая активность алкиллизофосфолипидов (по крайней мере для метилхолантрениндуцируемой фибросаркомы) [75].

Большой интерес представляет изучение ЛФЛ как факторов дезинтеграции клеток, их мембранных структур при смерти и аутолизе, поскольку молекулярные механизмы тапатогенеза исследованы еще крайне недостаточно. Первые подробные сведения об изменениях липидного компонента органов и тканей при аутолизе появились в конце 60-х годов текущего столетия в связи с разработкой современных хроматографических методов анализа липидов. Количество ЛФЛ в миокарде крыс на протяжении 1—6 дней после смерти аутолиза снижалось, тогда как в поджелудочной железе возрастало [103]. Наблюдали увеличение доли ЛФЛ в аутолизующей прямой мышце человека [76].

Аутолитические изменения липидов в сыворотке крови крыс в обычных условиях сопровождаются нарастанием количества ЛФЛ уже через 4 ч. Предварительная кратковременная гипоксическая гипоксия животных (1 ч, 190—200 мм рт. ст.) не изменяла уровня ЛФЛ в аутолизующейся сыворотке крови, что может свидетельствовать о различиях в механизмах катаболической деградации липидов крови (органов) в обычных условиях и при гипоксии [15].

Активно изучаются изменения липидного компонента различных ультраструктур клеток, органов, тканей при аутолизе [5, 6б, 7, 8, 15а]. В изолированных ультраструктурах пути биохимических превращений липидов в ходе аутолиза существенно различаются. В микросомах надпочечных желез крыс количество ЛФЛ увеличивается уже к 4 ч аутолиза и остается высоким до конца суток [6б]. В лизосомах семенных желез крыс уровень ЛФЛ снижался после предварительного воздействия на организм острой гипоксии [7]. Отмеченные изменения могут быть связаны с тем, что в различных ультраструктурных образованиях клеток имеется неодинаковый набор активных ферментов метаболизма ЛФЛ, в связи с чем пути аутолитической деградации в ультраструктурах клеток разных органов могут быть неодинаковыми.

Новые сведения об особенностях строения и биологической роли лизофосфатидов значительно расширили наши представления о них. Оказалось, что это не только вещества, вызывающие серьезные нарушения структуры и функции клеток, их ультраструктур, но и обязательные компоненты всех мембранных образований. Они принимают ак-

тивное участие в синтезе некоторых молекулярных форм лецитинов и других фосфатидов, определяют подвижность мембран, их проницаемость, явления секретиции, экзоцитоза, адгезии клеток, участвуют в регуляции активности большинства связанных с мембранами ферментов, развитии физиологических реакций и патологических процессов, старении и гибели клеток. Вместе с тем многие аспекты биологического действия моноацильных форм фосфатидов еще не решены и требуют дальнейшего изучения и уточнения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бергельсон Л. Д., Дятловская Э. В. // Биохимия липидов и их роль в обмене веществ.— М., 1981.— С. 16.
2. Брокерхоф Х., Дженсен Р. Липолитические ферменты.— М., 1978.
3. Вартанян К. Э. // Журн. невропатол. и психиатр.— 1971.— № 2.— С. 193.
4. Влияние липидов мембран на активность ферментов / Булакова Е. Б., Джалябова М. И., Гвахария В. О. и др.— Черноголовка, 1978.
5. Голубев В. П., Грибанов Г. А., Володина Т. В., Козельцев В. Л. // Всесоюзный симпозиум «Структура и функция лизосом», 2-й: Тезисы докладов.— Новосибирск, 1980.— С. 52.
6. Грибанов Г. А. // Успехи соврем. биол.— 1975.— Т. 80, № 6.— С. 382; а. 1979.— Т. 87, № 1.— С. 16; 6. Всесоюзный симпозиум «Липиды биологических мембран»: Тезисы докладов.— Ташкент, 1980.— С. 47.
7. Грибанов Г. А., Капитанов А. Б. // Международный симпозиум «Структура и функции лизосом»: Тезисы докладов.— Новосибирск, 1976.— С. 55.
8. Грибанов Г. А., Сергеев С. А., Алексенко А. С. // Косм. биол.— 1978.— Т. 6.— С. 67.
9. Дятловская Э. В., Волкова В. И., Бергельсон Л. Д. // Биохимия.— 1967.— Т. 32, № 6.— С. 1227 д.
10. Дятловская Э. В., Торховская Т. И., Бергельсон Л. Д. // Там же.— 1971.— Т. 36, № 1.— С. 181.
11. Дятловская Э. В., Леменовская А. Ф., Арчаков А. И. и др. // Там же.— 1977.— Т. 42, № 1.— С. 139.
12. Дятловская Э. В., Леменовская А. Ф., Валдищев А. Т. и др. // Там же.— 1980.— Т. 45, № 11.— С. 2036.
13. Никифорова А. А. // Биохимия липидов и их роль в обмене веществ.— М., 1981.— С. 95.
14. Санина О. А., Эпштейн С. Ф. // Укр. биохим. журн.— 1972.— Т. 44, № 6.— С. 740.
15. Сергеев С. А., Грибанов Г. А. // Вопр. мед. химии.— 1980.— № 2.— С. 260; Косм. биол.— 1981.— № 6.— С. 71.
16. Стрикленд К. Биогенез природных соединений.— М., 1965.— С. 102.
17. Aarsman A., van den Bosch H. // Biochim. biophys. Acta.— 1980.— Vol. 620, N 3.— P. 410.
18. Abe M., Akino T., Oho K. // Ibid.— 1972.— Vol. 280, N 2.— P. 275.
19. Abramson D., Blecher M. // Ibid.— 1965.— Vol. 98, N 1.— P. 117.
20. Akesson B., Arner A., Sundler R. // Ibid.— 1976.— Vol. 441, N 3.— P. 453.
21. Akino T., Yamazaki I., Abe M. // J. exp. Med.— 1972.— Vol. 108, N 2.— P. 133.
22. Ammon H., Loettler R., Luedtke L. // Lipids.— 1983.— Vol. 18, N 6.— P. 428.
23. Andreoli V., Mattei F., Tonon G., Zibetti A. // J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.— 1973.— Vol. 36, N 4.— P. 661.
24. Ansell G., Hawthorne J. Phospholipids, Chemistry, Metabolism and Function.— Amsterdam, 1964.
25. Ansell G., Hawthorne J., Dawson R. Form and Function of Phospholipids.— Amsterdam, 1973.
26. Arnöld B., Reuter R., Weltzien H. // Biochim. biophys. Acta.— 1978.— Vol. 530, N 1.— P. 47.
27. Aronson J., Johs L. // Exp. molec. Path.— 1977.— Vol. 27, N 1.— P. 35.
28. Arthur G., Sheltoway A. // Biochem. J.— 1980.— N 2.— P. 523.
29. Balzer H., Khun A. // Arch. Pharmacol.— 1975.— Vol. 291, N 4.— P. 319.
30. Bang H. Цит. Ercoli A., 1940.
31. Belfanti S., Contardi A., Ercoli A. // Ergebn. Enzymforsch.— 1936.— Bd 5.— S. 213.
32. Besselaar A., Bosch H. van den, Deenen L. van // Biochim. biophys. Acta.— 1977.— Vol. 465, N 3.— P. 454.
33. Bergmann W., Dressler V. et al. // Ibid.— 1984.— Vol. 772, N 3.— P. 328.
34. Boime J., Smith E., Hunter F. // Arch. Biochem.— 1970.— Vol. 139, N 2.— P. 425.
35. Bokay. 1877. Цит. Belfanti S. et al., 1936.
36. Bottiger L. // Acta med. scand.— 1973.— Vol. 193, N 1—2.— P. 49.
37. Bierbaum T., Bouina S., Huestis W. // Biochim. biophys. Acta.— 1979.— Vol. 555, N 1.— P. 102.
38. Biezenski J. // J. Lipid Res.— 1967.— Vol. 8, N 4.— P. 409.
39. Blaschko H., Firemark H., Smith A., Winkler H. // Biochem. J.— 1967.— Vol. 104, N 2.— P. 545.
40. Bleistein J., Heidrich H., Debuch H. // Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.— 1980.— Bd 361, N 4.— S. 595.
41. Bloor W. Biochemistry of the Fatty Acids.— New York, 1943.
42. Blume A., Arnold B., Weltzien H. // FEBS Lett.— 1976.— Vol. 61, N 2.— P. 199.
43. Body D., Gray G. // Chem. Phys. Lipids.— 1967.— Vol. 1, N 5.— P. 424.
44. Brumley G., Bosch H. van den // J. Lipid Res.— 1977.— Vol. 18, N 4.— P. 523.
45. Butterdorth A., Caler D. // Brit. J. Cancer.— 1967.— Vol. 21, N 2.— P. 373.
46. Condrea E. // Experientia (Basel).— 1980.— Vol. 36, N 65.— P. 531.
47. Corr P., Snyder D. et al. // Amer. J. Physiol.— 1982.— Vol. 249, N 2.— P. 187.
48. Collier E., Baskin M., Kresca L. // Invest. Ophthalm.— 1975.— Vol. 14, N 9.— P. 697.
49. Cunningham C., Hager L. // J. biol. Chem.— 1971.— Vol. 246, N 6.— P. 1575.
50. Curtis A., Campbell J., Shaw T. // J. Cell Sci.— 1975.— Vol. 18, N 3.— P. 347.
51. Curtis A., Chandler C., Picton N. // Ibid.— P. 375.
52. Curtis A., Hill O. // J. Cell Sci.— 1979.— Vol. 38.— P. 283.
53. Deamer D. // J. biol. Chem.— 1973.— Vol. 248, N 15.— P. 5477.
54. Deenen L. L. M. van // Ann. Rev. Biochem.— 1966.— Vol. 30, P. 157; Biochem. J.— 1966.— Vol. 98, N 2.— P. 18.
55. Dervichian D. // Progr. Biophys. molec. Biol.— 1964.— Vol. 14.— P. 263.
56. Dobiasova M., Faltova E. Cell Impairment Aging and Develop.— New York, 1975.— P. 459.
57. Dobiasova M., Faltova E., Marek J. et al. // Atherosclerosis.— 1975.— Vol. 21, N 3.— P. 337.
58. Dobiasova M., Kymla J., Faltova E. // Ibid.— 1976.— Vol. 24, N 3.— P. 421.
59. Elsbach P. // J. clin. Invest.— 1967.— Vol. 46, N 6.— P. 1052; J. Lipid Res.— 1967.— Vol. 8, N 4.— P. 359; J. clin. Invest.— 1968.— Vol. 17, N 10.— P. 2217.
60. Elsbach P., Patricia P., Pettis P. et al. // J. clin. Invest.— 1972.— Vol. 51, N 7.— P. 1910.
61. Elsbach P., Pettis P., Marcus A. // Blood.— 1971.— Vol. 37, N 6.— P. 675.
62. Ercoli A. // Handbuch der Enzymologie.— 1940.— Bd 1.— S. 480.
63. Erbland J., Marinetti G. // Fed. Proc.— 1962.— Vol. 21, N 2.— P. 295.
64. Feo C. // Red Cell Physiol. Pathol. Ultrastr.— New York, 1973.— P. 37.
65. Ferber E., Hundler P., Kohlschutter A., Fischer H. // Folia haemat.— 1968.— Bd 92, N 3.— S. 224; Europ. J. Biochem.— 1968.— Vol. 5, N 3.— P. 395.
66. Ferber E., Resch K. // Biochim. biophys. Acta.— 1973.— Vol. 296, N 2.— P. 335.
67. Fischer D., Kaufman S. // J. biol. Chem.— 1972.— Vol. 247, N 7.— P. 2250.
68. Fourneau, Delezenne. 1914. Цит. Ercoli A., 1940.
69. Gerard J., Kindom S. et al. // Amer. J. Path.— 1979.— Vol. 96, N 2.— P. 423.
70. Gillett M., Besterman E. // Atherosclerosis.— 1975.— Vol. 22, N 1.— P. 111.
71. Gossellini L., Descamps R. // Arch. int. Physiol. Biochem.— 1974.— Vol. 82, N 4.— P. 801.
72. Gottfried E., Rapport M. // Fed. Proc.— 1962.— Vol. 7, N 2.— P. 293.
73. Hanahan D. Lipide Chemistry.— New York, 1960.
74. Herrman W., Wagner J., Emmrich R. // Atherosclerosis.— 1974.— Vol. 2, N 1.— P. 117.
75. Herrmann D., Neumann H. // J. biol. Chem.— 1986.— Vol. 261, N 17.— P. 7742.
76. Hof H., Simon G. // Lipids.— 1970.— Vol. 5, N 5.— P. 485.

77. Holub B., Kuksis A. // J. Lipid Res.— 1971.— Vol. 12, N 6.— P. 699.
78. Housley M. // Biochem. Pharmacol.— 1978.— Vol. 27, N 8.— P. 1287.
79. Housley M., Palmer R. // Biochem. J.— 1979.— Vol. 178, N 1.— P. 217.
80. Huet G., Levy M., Pascaud M. // Biochim. biophys. Acta.— 1968.— Vol. 150, N 3.— P. 521.
81. Inoue K., Kitagawa T. // Ibid.— 1974.— Vol. 363, N 3.— P. 361.
82. Inoue K., Suzuki K., Nojima S. // J. Biochem. (Tokyo).— 1977.— Vol. 81, N 4.— P. 1097.
83. Iost I., Dolezel G., Cucuianu M. et al. // Blood.— 1977.— Vol. 49, N 1.— P. 101.
84. Jain M., Echelt C. van, Ramirez F. et al. // Nature.— 1980.— Vol. 284.— P. 486.
85. James O., Mac Donald G., Thompson W. // J. Neurochem.— 1979.— Vol. 33, N 5.— P. 1061.
86. Johnson A., Mc Dermott S. // Gut.— 1974.— Vol. 15, N 9.— P. 710.
87. Keenan R., Hokin L. // Biochim. biophys. Acta.— 1964.— Vol. 84, N 4.— P. 458.
88. Keith A., Aloia R., Lyons J. et al. // Ibid.— 1975.— Vol. 394, N 2.— P. 224.
89. Kitagawa T., Inoue K., Nojima S. // J. Biochem. (Tokyo).— 1976.— Vol. 79, N 6.— P. 1123.
90. Khadwala A., Kassper C. // J. biol. Chem.— 1971.— Vol. 246, N 20.— P. 6242.
91. Kleinig H. // J. Cell Biol.— 1970.— Vol. 46, N 2.— P. 396.
92. Kristensen S., Horder M. // Enzyme.— 1982.— Vol. 27, N 10.— P. 40.
93. Kunz F., Kosin D. // Clin. chim. Acta.— 1970.— Vol. 27, N 1.— P. 185.
94. Kunz F., Stummvoll W. // Blut.— 1970.— Bd 21, N 4.— S. 210; Atherosclerosis.— 1971.— Vol. 13.— P. 413.
95. Kyes P. // Berl. Klin. Wschr.— 1903.— Bd 42, N 956.— S. 982.
96. Lapelina E., Billan M., Cuatrecasas P. // J. biol. Chem.— 1981.— Vol. 256, N 23.— P. 1984.
97. Lee Y., Chan S. // Biochemistry (Wash.).— 1977.— Vol. 16, N 7.— P. 1303.
98. Leibovitz Z., Kobiler I., Gatt S. // J. Biochem.— 1972.— Vol. 247, N 21.— P. 6840.
99. Leibovitz Z., Gatt S. // J. biol. Chem.— 1974.— Vol. 249, N 5.— P. 1525.
100. Levene. 1923. Цит. Ercoli A., 1940.
101. Levis G., Karli J. // Clin. chim. Acta.— 1972.— Vol. 41.— P. 335.
102. Levy M., Sauner M. // C. R. Soc. Biol.— 1967.— Vol. 161, N 2.— P. 277.
103. Lindlar F. // Z. klin. Chem. klin. Biochem.— 1967.— Bd 5, N 5.— S. 251.
104. Long C., Odavic R., Sargent E. // Biochem. J.— 1963.— Vol. 87.— P. 13.
105. Ludecke. 1905. Цит. Belfanti S., 1936.
106. Man R., Wong T., Choy P. // Life Sci.— 1983.— Vol. 32, N 12.— P. 1325.
107. Mansbach C. // Lipids.— 1972.— Vol. 7, N 9.— P. 593.
108. Marikovsky V., Brown C. et al. // Exp. Cell. Res.— 1976.— Vol. 98, N 2.— P. 313.
109. Marples E., Thompson R., Webster G. // J. Neurochem.— 1959.— Vol. 4, N 1.— P. 62.
110. Matsumoto M. // J. Biochem.— 1961.— Vol. 49, N 1.— P. 11.
111. Meldolesi J., Jamieson J., Palade G. // J. Cell Biol.— 1971.— Vol. 49.— P. 130.
112. Mookerjee S., Yung J. // Canad. J. Biochem.— 1974.— Vol. 52, N 11.— P. 1053.
113. Nachbaur J., Colbeau A., Vignais P. // Biochim. biophys. Acta.— 1972.— Vol. 274.— P. 426.
114. Nilausen K. // Nature.— 1968.— Vol. 217.— P. 268.
115. De Oliveira F. // Biochim. biophys. Acta.— 1979.— Vol. 558, N 1.— P. 73.
116. Paris R., Clement C. // Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.).— 1969.— Vol. 131, N 2.— P. 363.
117. Parthasarathy S., Baumann W. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1979.— Vol. 91.— P. 63.
118. Parthasarathy S., Murari R., Crilly K., Baumann W. // Biochim. biophys. Acta.— 1981.— Vol. 664, N 2.— P. 249.
119. Patelski J., Piorunska-Stoltzmann M. // Enzyme.— 1979.— Vol. 24, N 5.— P. 342.
120. Petter A., Schlemmer W., Zipf K. // J. Pharm. Pharmacol.— 1961.— Vol. 13, N 10.— P. 636.
121. Phillips G., Bachner P., McKay D. // Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.).— 1965.— Vol. 119, N 3.— P. 846.
122. Pik J., Thompson W. // Canad. J. Biochem.— 1978.— Vol. 56, N 8.— P. 765.
123. Poole A., Howell J., Lucy J. // Nature.— 1970.— Vol. 227, N 5260.— P. 810.
124. Portman O., Alexander M. // Biochim. biophys. Acta.— 1976.— Vol. 450, N 3.— P. 322.
125. Portman O., Illingworth D. // Ibid.— 1973.— Vol. 326, N 1.— P. 34; 1974.— Vol. 348, N 1.— P. 136.
126. Portman O., Illingworth D., Alexander M. // J. Neurochem.— 1973.— Vol. 20, N 6.— P. 1659.
127. Poznansky M., Weglicki W. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1974.— Vol. 58, N 4.— P. 1016.
128. Ralston E., Blumenthal R., Weinstein J. // Biochim. biophys. Acta.— 1980.— Vol. 597, N 3.— P. 543.
129. Rampone A., Long L. // Ibid.— 1977.— Vol. 486, N 3.— P. 500.
130. Ramsammy S. et al. // Chem. Phys. Lipids.— 1983.— Vol. 32, N 2.— P. 83.
131. Rapport M., Franzl R. // J. biol. Chem.— 1957.— Vol. 225.— P. 859.
132. Rimon A. // Bull. Res. Counc. Israel.— 1958.— Vol. 7-A.— P. 106.
133. Robinson N. // J. Pharm. Pharmacol.— 1961.— Vol. 13, N 6.— P. 321.
134. Rosenbloom A., Elsbach P. // Biochim. biophys. Acta.— 1968.— Vol. 164, N 1.— P. 72.
135. Rydstrom Y. // Ibid.— 1976.— Vol. 455, N 1.— P. 24.
136. Sato T. // Chem. pharm. Bull.— 1973.— Vol. 21, N 1.— P. 176.
137. Scow R., Stein Y., Stein O. // J. biol. Chem.— 1967.— Vol. 242, N 21.— P. 4919.
138. Schardt W., Wardle E. // Clin. chim. Acta.— 1975.— Vol. 63, N 2.— P. 223.
139. Severson D., Hurley B. // Lipids.— 1986.— Vol. 21, N 1.— P. 1.
140. Shaikh N. et al. // Proc. int. Soc. Heart Res.— 1984.— Vol. 2, P. 63.
141. Shier W. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1977.— Vol. 78, N 4.— P. 1168.
142. Shier W., Trotter J. // FEBS Lett.— 1976.— Vol. 62, N 2.— P. 165.
143. Soula G., Valdiqie P., Douste-Blazy L. // Bull. Soc. Chim. Biol.— 1968.— Vol. 50.— P. 7.
144. Stein Y., Widnell C., Stein O. // J. Cell Biol.— 1968.— Vol. 39, N 1.— P. 185.
145. Sternberg P., Collier E., Obara Y. // Exp. Eye Res.— 1978.— Vol. 26.— P. 729.
146. Subbaiah P., Bagdade J. // Life Sci.— 1978.— Vol. 22, N 22.— P. 1971.
147. Sun G., Smith R., Chun K. et al. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1980.— Vol. 94, N 4.— P. 1278.
148. Tansey F., Froloson M. // Ibid.— 1975.— Vol. 67, N 4.— P. 1560.
149. Tatlire N. // J. Lipid Res.— 1959.— Vol. 1, N 1.— P. 60.
150. Tatlire N., Cyr R. // Biochim. biophys. Acta.— 1963.— Vol. 70, N 1.— P. 693.
151. Thiele O. // Europ. J. Biochem.— 1968.— Vol. 5, N 4.— P. 540.
152. Victoria E., Golde L. van et al. // Biochim. biophys. Acta.— 1971.— Vol. 239, N 3.— P. 443.
153. Webster G., Alpern R. // Biochem. J.— 1964.— Vol. 90.— P. 35.
154. Webster G., Thompson R. // Nature.— 1965.— Vol. 4881, N 8.— P. 74.
155. Weltzien H. // Biochim. biophys. Acta.— 1973.— Vol. 311, N 1.— P. 6; 1979.— Vol. 559, N 2.— P. 259.
156. Winkler H., Strieder N. et al. // Arch. Pharmacol. exp. Path.— 1967.— Bd 256, N 4.— S. 407.
157. Wittcoff H. The Phosphatides.— New York, 1951.
158. Wittels B., Hurlbert S. // Biochim. biophys. Acta.— 1977.— Vol. 489, N 1.— P. 72.
159. Wood R. // Arch. Biochem.— 1970.— Vol. 141, N 1.— P. 174.
160. Wright I., Green C. // Biochem. J.— 1971.— Vol. 123, N 5.— P. 837.
161. Zwiller J., Ciesielsky-Treska Y. et al. // FEBS Lett.— 1976.— Vol. 69.— P. 286.

Поступила 03.05.90

© В. А. ДЕНИСЕНКО, З. В. ГОРБАЧ, 1991

УДК 612.46.015.1:577.152.111

В. А. Денисенко, З. В. Горбач

СОРБИТОЛДЕГИДРОГЕНАЗА ПОЧКИ: КИНЕТИЧЕСКИЙ МЕХАНИЗМ

Институт биохимии АН БССР, Гродно

Сорбитоловый путь метаболизма углеводов представлен в различных тканях животных и человека. Лимитирующим звеном пути является сорбитолдегидрогеназа — СДГ (1-идитол: НАД⁺-5-оксидоредуктаза; КФ 1.1.1.14) [2]. Исключение составляет печень, где активность альдозоредуктазы превышает таковую СДГ [4]. К настоящему времени выявлены некоторые специфические функции сорбитолового пути в отдельных органах, показана его патогенетическая роль применительно к хрусталику глаза, сосудам, почкам, нервной ткани в условиях гипергликемии [4, 5]. Однако имеющиеся в литературе данные не позволяют сформировать целостное представление о роли полиолового шунта и отдельных его интермедиатов в метаболизме. Важность изучения данного звена обмена веществ обусловлена также необходимостью поисков способов коррекции патологических состояний, связанных с накоплением сорбита в тканях. В данной работе представлены результаты исследования кинетического механизма СДГ, выполненного на ферменте, выделенном из почек крыс.

Методика. В эксперименте использовали беспородных белых крыс-самцов массой 140—170 г, содержавшихся на стандартном рационе вивария. Крыс декапитировали, почки извлекали и использовали для выделения СДГ. Частичная очистка СДГ включала фракционирование сульфатом аммония и хроматографию на КМ-сефадексе. Гомогенат (брали по 30 г ткани) готовили на 10 мМ триэтаноламиновом буфере pH 7,6, центрифугировали при 105 000 g в течение 1 ч на центрифуге ВАК-601. Надосадочную жидкость использовали для фракционирования сульфатом аммония. Осаждаемую сульфатом аммония фракцию (40—60 % насыщения) растворяли в дистиллированной воде и диализовали против 20 мМ калий-фосфатного буфера pH 6,2, после чего раствор наносили на колонку с КМ-сефадексом (2,5 × 15 см), уравновешенную тем же буферным раствором. После отмывки таким же раствором фермент элюировали линейным градиентом 0,02—0,2 М калий-фосфатного буфера pH 6,2. Фракции, содержащие максимальную активность СДГ, объединяли. Белок концентрировали с помощью ультрафильтрации и хранили в присутствии 20 % глицерина при —10 °С.

Активность СДГ определяли спектрофотометрически по поглощению при 340 нм, причем использовали как прямую (превращение сорбита во фруктозу), так и обратную реакцию. В первом случае инкубационная смесь содержала 0,1 М глициновый буфер pH 9,5, 60 мМ сорбитол и 0,5 мМ НАД⁺, во втором — 0,15 М триэтаноламиновый буфер pH 7,4, 0,2 М фруктозу, 0,16 мМ НАД·Н. Количество белка, вносимого в кювету, составляло 20 мкг.

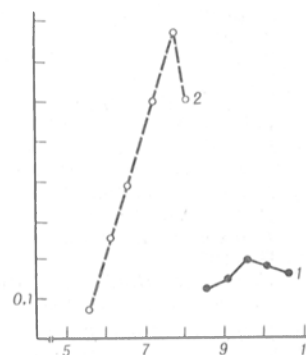
Кинетические характеристики СДГ определяли при 30 °С. Белок измеряли методом Лоури [6] и спектрофотометрически по поглощению при 280 нм.

Результаты и обсуждение. Описанная в разделе «Методика» процедура позволяет достичь 140-кратной очистки СДГ с выходом 40 %.

Удельная активность получаемого препарата

Рис. 1. Оптимум pH СДГ почки крыс.

По оси абсцисс — pH; по оси ординат — активность СДГ (в мкмоль/мин на 1 мг белка). 1 — прямая реакция (превращение сорбита во фруктозу); использовали глициновый буфер (45,2 мМ); 2 — обратная реакция (использовали 45,2 мМ фосфат-по-цитратный буфер).



фермента составляет 0,2—0,3 мкмоль НАД⁺/мин на 1 мг белка.

Исследования зависимости скорости сорбитолдегидрогеназной реакции от pH (рис. 1) показали, что оптимум pH для прямой реакции (превращение сорбита во фруктозу) достаточно широк с пиком в точке, соответствующей pH 9,5. Оптимум pH обратной реакции составил 7,5. Полученные данные близки к значениям оптимумов pH для СДГ из других тканей [3, 8, 9, 11].

Поскольку максимальная скорость обратной реакции значительно превышает скорость прямой, при определении кинетического механизма СДГ использовали реакцию превращения фруктозы в сорбит. Варьирование концентрацией как НАД·Н, так и фруктозы (рис. 2) при ряде фиксированных концентраций другого субстрата дает семейство пересекающихся прямых в координатах Лайнуивера — Бэрка, что свидетельствует о последовательном механизме. K_m по отношению к фруктозе (50 мМ) и НАД·Н ($23,8 \cdot 10^{-3}$ мМ) для СДГ почек крыс являются величинами одного порядка с K_m для СДГ из мозга крысы [9]. В общем же эти показатели вариабельны в широком диапазоне для СДГ из разных источников [7, 8, 10—12].

Чтобы определить тип последовательного механизма, исследовали ингибирование продуктами реакции, причем фиксированный субстрат использовали в ненасыщающей концентрации. Вид графиков зависимости скорости реакции от присутствия различных концентраций ингибитора в обратных координатах свидетельствует о том, что НАД⁺ находится в конкурентных взаимоотношениях с НАД·Н, тогда как по отношению к фрук-

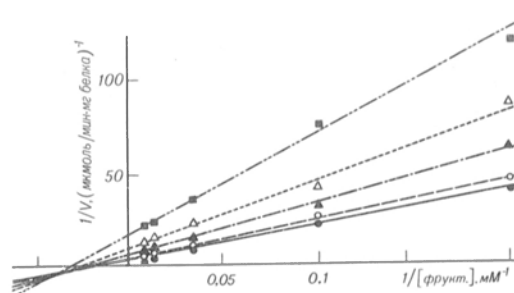


Рис. 2. Зависимость скорости сорбитолдегидрогеназной реакции от концентрации фруктозы в обратных координатах.

1 — 51 мкМ; 2 — 34 мкМ; 3 — 20,4 мкМ; 4 — 10,2 мкМ; 5 — 5,1 мкМ НАД·Н.

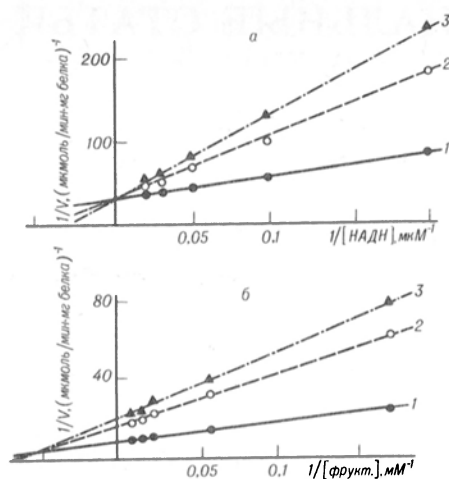


Рис. 3. Ингибирование СДГ почки посредством НАД⁺. а — варьируемый субстрат — НАД·Н; б — варьируемый субстрат — фруктоза; 1, 2, 3 — 0, 46, и 115 мкМ НАД⁺.

Ингибирование СДГ почки продуктами реакции

Субстрат с варьируемой концентрацией	Субстрат с фиксированной концентрацией	Ингибитор	Константа ингибирования, мМ	
			K _i	K _i '
НАД·Н	Фруктоза	Сорбит	78,5	34,5
НАД·Н	Фруктоза	НАД ⁺	2,5·10 ⁻¹	—
Фруктоза	НАД·Н	Сорбит	40,0	—
Фруктоза	НАД·Н	НАД ⁺	3,3·10 ⁻¹	9,7·10 ⁻²

тозе имеет место смешанное ингибирование (рис. 3). Что касается сорбита, то здесь наблюдалась противоположная картина, т. е. ингибирование было конкурентным по отношению к фруктозе, а применительно к НАД·Н имело место ингибирование по смешанному типу. Соответствующие константы приведены в таблице.

Результаты исследования ингибирования СДГ продуктами реакции согласуются с кинетическими механизмами двух типов. Это механизм Теорелла — Чанса и неупорядоченный механизм с образованием двух непродуктивных комплексов [1, 8]. Чтобы отдать предпочтение одному из альтернативных способов катализа, изучали термоинактивацию СДГ в присутствии субстратов (рис. 4). Исследование проводили при 53 °С. В этих условиях как НАД·Н, так и фруктоза обладали защитным действием по отношению к ферменту. Полученные данные свидетельствуют в пользу неупорядоченного присоединения субстратов. Можно заключить, что СДГ почки крыс функционирует по последовательному неупорядоченному механизму.

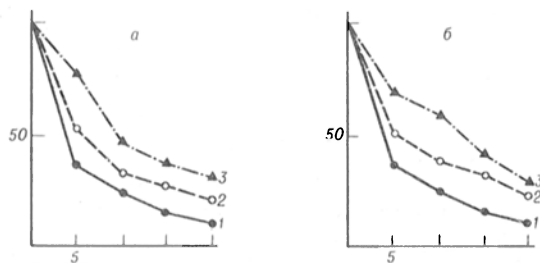


Рис. 4. Термоинактивация СДГ почки крыс при 53 °С.

По оси абсцисс — время инкубации (в мин); по оси ординат — активность СДГ (в %). а — в присутствии 0 (1), 0,5 (2) и 1 М (3) фруктозы; б — в присутствии 0 (1), 46 (2) и 115 мкМ (3) НАД·Н.

ЛИТЕРАТУРА

1. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. — М., 1982.
2. Кендыш М. Н. Регуляция углеводного обмена. — М. 1985.
3. Jedziniak J. A., Chilak L. T., Cheng H.-M. M. et al. // Invest. Ophthalm. Visual Sci. — 1981. — Vol. 20, N 3. — P. 314—326.
4. Jeffery J., Jörnvall H. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1983. — Vol. 80, N 4. — P. 901—905.
5. Kenneth H., Gabbay M. D. // Ann. Rev. Med. — 1975. — Vol. 26. — P. 521—536.
6. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 153, N 1. — P. 265—275.
7. Marel W., Auld D. S. // Biochemistry (Wash.). — 1988. — Vol. 27, N 5. — P. 1622—1628.
8. O'Brien M., Schofield P., Edwards M. // Biochem. J. — 1983. — Vol. 211, N 1. — P. 81—90.
9. Regh J. E., Torack R. M. // J. Neurochem. — 1977. — Vol. 28, N 3. — P. 314—326.
10. Rose C. I., Henderson A. R. // Clin. Chem. — 1975. — Vol. 21, N 11. — P. 1619—1626.
11. Smith M. G. // Biochem. J. — 1962. — Vol. 83, N 1. — P. 135—144.
12. Wiesinger H., Hamprecht B. // J. Neurochem. — 1989. — Vol. 52, N 2. — P. 342—348.

Поступила 14.12.89

KIDNEY TISSUE SORBITOL DEHYDROGENASE. KINETIC MECHANISM

V. A. Denisenko, Z. V. Gorbach

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

Properties of sorbitol dehydrogenase isolated from rat kidney were studied. Sorbitol dehydrogenase reactions followed the consecutive irregular order as shown in studies of kinetic patterns, inhibition by end products and thermoinactivation of the enzyme in the presence of substrates.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616.13-004.6-07:616.153.96-073.916

Х. Барлебен, К. Вагенкнехт, К. Юнг, Л. Юнкер, Х. Хайне

ИССЛЕДОВАНИЯ ОБМЕНА БЕЛКОВ У БОЛЬНЫХ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ С ПОМОЩЬЮ ИЗОТОПА ¹⁵N

Центральный институт исследования сердца и кровообращения АН ГДР, Берлин — Бух, Центральный институт исследования изотопов и радиации АН ГДР, Лейпциг

Изучение азотистого и белкового обмена организма человека проводится путем введения стабильного, нерадиоактивного изотопа ¹⁵N в форме ¹⁵N-хлорида аммония in vivo и последующего анализа включения изотопа в различные N-содержащие соединения [10]. До сих пор оценка белкового обмена была основана в основном на определении концентрации белков плазмы крови и активности ферментов. По степени включения изотопа ¹⁵N в различные плазменные белки и форменные элементы крови можно судить о скорости обмена белков и клеток в организме человека.

Исследование азотистого и белкового обмена с помощью изотопа ¹⁵N уже широко применяется в гастроэнтерологии, исследовании питания, травматологии и педиатрии [5, 8]. Цель настоящей работы — найти возможности применения этого метода для определения скорости обмена плазменных белков и белков форменных элементов кро-

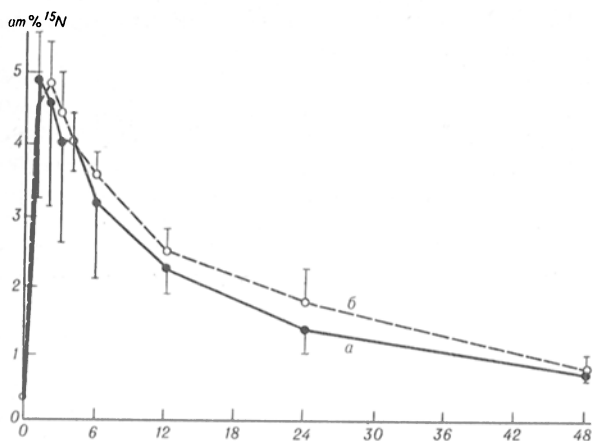


Рис. 1. Средние частоты изотопа ^{15}N ($\bar{x} \pm \text{SD}$) в остаточном азоте в зависимости от времени после приема метки у здоровых (а) и у больных атеросклерозом (б).

По оси абсцисс — время (в ч).

ви у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

В данной работе представлены первые результаты наших исследований у больных ишемической болезнью сердца и периферическим атеросклерозом по сравнению с контрольными испытуемыми.

Методика. Было обследовано 11 больных атеросклерозом мужского пола (9 больных ишемической болезнью сердца и 2 — периферическим атеросклерозом). Диагноз был поставлен на основе анамнеза, данных клинического исследования, коронарографии или ангиографии. Средний возраст больных составил 55 ± 4 года. Для исключения заболеваний желудочно-кишечного тракта и печени, сахарного диабета, нарушений функций почек и инфекционных заболеваний проводили обширное клиническое и лабораторное обследование. В качестве контроля обследовали группу, состоящую из 7 клинически здоровых людей мужского пола без анамнестических и клинических указаний на атеросклеротический процесс. Средний возраст обследованных контрольной группы составил 48 ± 4 года.

В течение 12 ч до начала исследования больные не принимали пищу и соблюдали постельный режим. Затем больные однократно перорально принимали раствор $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (95 ат% ^{15}N) из расчета 3 г на 70 кг массы тела. Через 1, 2, 3, 4, 6, 12, 24, 48 ч после приема метки брали по 10 мл крови, которую переносили в раствор цитрата для исследований остаточного азота, общего белка и фибрина. Для отделения остаточного азота проводили осаждение белка плазмы при помощи 10 % трихлоруксусной кислоты. Фибрин изолировали путем рекальцификации плазмы. Через 3, 6, 12, 24, 48 ч после начала опыта брали по 10 мл крови, которую переносили в раствор цитрата для исследования тромбоцитов, лимфоцитов и гранулоцитов. Разделение форменных элементов крови проводили с помощью дифференциального центрифугирования в градиенте плотности [1 с модификациями]. Затем разделяли остаточный азот и белок клеток при помощи 20 % трихлоруксусной кислоты. После озоления по методу Kjeldahl во всех полученных фракциях определяли частоту изотопа ^{15}N при помощи эмиссионной спектроскопии на ^{15}N -анализаторе NOI-6e [6].

Результаты и их обсуждение. Рис. 1 показывает включение изотопа ^{15}N в остаточный азот плазмы у больных атеросклерозом и в контрольной группе. Видно, что уже за 1—2 ч достигался максимум мечения, а потом частота изотопа ^{15}N постепенно уменьшался. При этом группа больных атеросклерозом существенно не отличалась от контрольной группы.

Включение метки в плазменные белки происходило несколько позже, чем в остаточный азот. При этом группы больных отличались от конт-

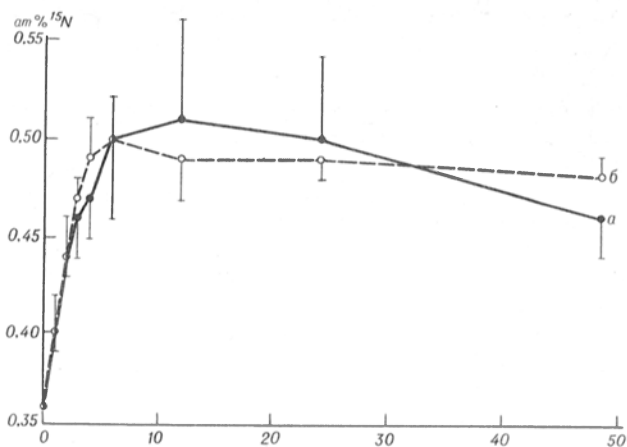


Рис. 2. Средние частоты изотопа ^{15}N ($\bar{x} \pm \text{SD}$) в фибрине в зависимости от времени после приема метки у 73 здоровых (а) и 11 больных атеросклерозом (б).

По оси абсцисс — время (в ч).

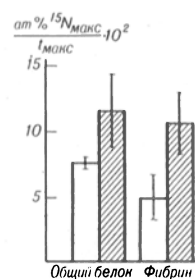


Рис. 3. Средние отношения между максимальными частотами изотопа ^{15}N во фракциях общего белка и фибрина и временем до достижения максимума ($\bar{x} \pm \text{SD}$) у 7 здоровых (светлые столбики) и 11 больных атеросклерозом (заштрихованные столбики).

рольных групп в основном по времени достижения максимальной частоты ^{15}N . На рис. 2 представлено включение изотопа ^{15}N в фибрин у больных атеросклерозом и в контрольной группе. Для оценки скорости включения ^{15}N в белок плазмы и фибрина мы рассчитали соотношение между максимальной частотой ^{15}N (ат% $^{15}\text{N}_{\text{макс}}$) и временем, необходимым для достижения максимума ($t_{\text{макс}}$ в часах). Сравнение обследованных контрольной группы и больных атеросклерозом показало, что у больных скорость включения ^{15}N в общий белок плазмы и фибрин была повышена (рис. 3). На рис. 4 показано включение изотопа ^{15}N в белок тромбоцитов у больных атеросклерозом у

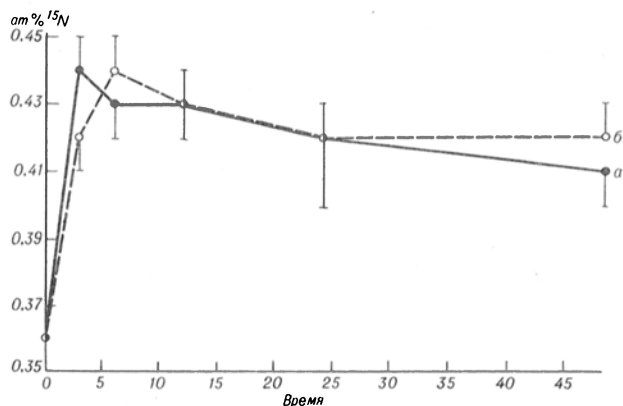


Рис. 4. Средние частоты изотопа ^{15}N в белке тромбоцитов ($\bar{x} \pm \text{SD}$) в зависимости от времени после приема метки у 5 здоровых (а) и 11 больных атеросклерозом (б).

По оси абсцисс — время (в ч).

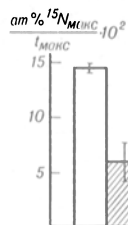


Рис. 5. Средние отношения между максимальными частотами изотопа ^{15}N в белке тромбоцитов и временем до достижения максимума ($x \pm SD$) у 5 здоровых (светлые столбики) и 11 больных атеросклерозом (заштрихованные столбики).

практически здоровых людей. Для оценки скорости включения ^{15}N в белок тромбоцитов мы и здесь рассчитали соотношение между максимальной частотой ^{15}N и временем, необходимым для достижения максимума. Рис. 5 показывает, что скорость включения ^{15}N в белок тромбоцитов у больных атеросклерозом была понижена.

Применение стабильных изотопов в медицине приобретает все большее значение [2]. Это обусловлено, с одной стороны, преимуществами применения стабильного изотопа у человека, что связано с отсутствием лучевой нагрузки и временного предела для изотопного анализа. С другой стороны, в настоящее время все большее внимание наряду с работами на молекулярном уровне обращают на состояние всего организма как комплексной системы [7].

При наших исследованиях мы исходили из следующих соображений. Во-первых, с помощью изотопа ^{15}N возможно исследование скорости обмена различных белков тела. Многообразие параметров позволяет получать информацию о печеночном обмене веществ (плазменный белок, фибрин), иммунной системе (лимфоциты, гранулоциты), системе свертывания крови (тромбоциты, фибрин) и костном мозге (тромбоциты, гранулоциты). Во-вторых, синтез белков представляет собой процесс, потребляющий энергию, и поэтому может быть изменен в зависимости от общего состояния организма. В-третьих, существуют данные о том, что при нарушениях липидного обмена состав внутренних и внешних клеточных мембран может изменяться. Это оказывает влияние на транспорт веществ через мембраны, активность мембранных ферментов и обмен белков в клетке.

Наши исследования показали, что мечение внеклеточного остаточного азота плазмы крови у больных атеросклерозом существенно не отличалось от такового в контрольной группе. Таким образом, создана основная предпосылка для сравнения результатов включения метки в различные белки.

Ускоренное включение изотопа ^{15}N в общий белок плазмы крови у больных атеросклерозом показывает, что способность печени к синтезу белков у этих больных не понижена. Повышенная скорость включения ^{15}N в фибрин у больных атеросклерозом является выражением повышенной скорости обмена фибриногена у этих больных, что можно объяснить стимуляцией обмена фибриногена при атеросклерозе. Повышенная концентрация фибриногена плазмы крови является фактором риска для инфаркта миокарда и мозгового инсульта [9]. В то время как концентрация фибриногена в плазме крови дает мало информации об обмене фибриногена, представленный метод исследования позволяет полу-

чить дополнительные данные для диагностики и контроля течения атеросклероза.

При рассмотрении включения ^{15}N в белок тромбоцитов, которые живут 8—12 дней и только в ограниченной мере синтезируют специфические белки, можно предположить, что скорость включения ^{15}N в белок тромбоцитов отражает степень обновления клеток. Причины пониженной скорости включения ^{15}N в белок тромбоцитов предстоит еще выяснять. Этот результат противоречит данным других авторов, которые различными методами обнаруживали сокращение времени жизни и регенерации тромбоцитов у больных атеросклерозом [3, 4]. При этом надо иметь в виду, что принципы этих методов исследования во многом отличаются от нашего метода. В наших исследованиях изотоп ^{15}N встраивается в мегакариоциты костного мозга, прежде чем становится возможным обнаружить ^{15}N в тромбоцитах периферической крови.

Таким образом, исследование с помощью изотопа ^{15}N представляет собой новый перспективный метод для изучения обмена белков у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Методы исследования, основанные на применении стабильного нерadioактивного изотопа, являются инвазивными. Работая с простым индикаторным соединением $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, мы наблюдали различия в процессах включения ^{15}N в фибрин и белок тромбоцитов у больных атеросклерозом и клинически здоровых людей. Таким образом, открываются новые пути для биохимической диагностики и контроля течения атеросклероза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Böyum A. // Scand. J. Immunol.—1976.—Vol. 5, Suppl. 5.—P. 9—15.
2. Faust H., Jung K., Krumbiegel P. // Isotopenpraxis.—1981.—Bd 17.—S. 193—200.
3. Fuster V., Chesebro J. H., Frye R. L., Elveback L. R. // Circulation.—1981.—Vol. 63.—P. 546—551.
4. Hamsten A., Svensson J., Walldius G. et al. // Amer. Heart J.—1985.—Vol. 110.—P. 1154—1160.
5. Jung K., Faust H., Matkowitz R. // Z. med. Lab. diagn.—1989.—Bd 30.—S. 169—174.
6. Meyer G. // Isotopenpraxis.—1986.—Bd 22.—S. 181—184.
7. Waterlow J. C., Garlick P. J., Millward D. J. // Protein Turnover in Mammalian Tissue and in the Whole Body.—Amsterdam, 1978.—P. 32—38.
8. Wetzel K. // Use of Stable Isotopes in Clinical Research and Practice / Ed. H. Paust et al.—München, 1988.—P. 24—31.
9. Wilhelmsen L., Svardsudd K., Korsan-Bengtson K. et al. // New Engl. J. Med.—1984.—Vol. 311.—P. 501—505.
10. Zachmann M., Kempken B., Prader A. // ZfM—Mitt.—1983.—Bd 77.—S. 237—246.

Поступила 18.04.90

EVALUATION OF PROTEIN METABOLISM IN PATIENTS WITH ATHEROSCLEROSIS USING ^{15}N LABEL

H. Barleben, K. Vagenknecht, K. Yung, L. Yunker, H. Heine

Central Institute of Heart and Circulation Investigation, Berlin-Buch, Central Institute of Isotopes and Radiation Investigation, Leipzig

Incorporation of ^{15}N into blood plasma proteins and blood cells was studied in 11 patients with ischemic heart disease and peripheral atherosclerosis and in 7 healthy volunteers after oral administration of $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (95 atm%/15N) at a dose of 3 g per 70 kg of body mass. Metabolism of fibrinogen was stimulated, while incorporation of ^{15}N into thrombocyte proteins was decreased in the patients with atherosclerosis as compared with healthy persons. Possible reasons of these alterations are discussed.

П. Д. Рабинович, А. А. Гузачев

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ОБРАЗОВАНИЯ И ВЫДЕЛЕНИЯ ЖЕЛЧНЫХ КИСЛОТ ПРИ СПОНТАННОМ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ

Саратовский медицинский институт

Имеются данные о связи развития атеросклероза с увеличением пула холестерина в организме [10, 16]. Механизм этого явления при спонтанном атеросклерозе изучен недостаточно. Одной из его причин может быть неадекватность выведения холестерина [1]. Известно, что холестерин элиминируется в основном в виде продуктов гидроксилирования — желчных кислот (ЖК) [6, 15]. Ранее нами было показано, что выделение ЖК с калом при атеросклерозе больше, чем у здоровых молодых людей, но существенно меньше, чем у здоровых ровесников больных [7, 8]. Можно предположить, что возрастное увеличение пула холестерина организм пытается компенсировать усиленным выведением этого вещества. Более высокий уровень экскреции холестерина в виде ЖК у здоровых ровесников больных позволяет считать, что такая особенность метаболизма может предохранить от развития спонтанного атеросклероза.

Представляется важным выяснить причину различия интенсивности экскреции холестерина в виде ЖК у больных спонтанным атеросклерозом и у здоровых людей. Одной из причин такого различия может быть неодинаковый путь его катаболизма. Известно, что в гепатоцитах человека из холестерина формируются две первичные ЖК — холевая (ХК) и хенодезоксихолевая (ХДХК) [2, 12]. Для синтеза ХК требуются 10 преобразований и участие двух гидроксилаз — 7 α и 12 α , а для синтеза ХДХК — два преобразования при участии одной гидроксилазы — 7 α [3, 5]. Можно предполагать, что у людей с индивидуально запрограммированным преобладанием более короткого пути трансформации холестерина в ЖК этот процесс должен идти быстрее и поэтому элиминация должна быть большей.

Цель настоящего исследования состоит в выяснении роли индивидуальных особенностей катаболизма холестерина в механизме предрасположенности к развитию спонтанного атеросклероза. Для достижения этой цели мы измерили содержание ХК и ХДХК, а также их производных — образующихся микробной флорой кишечника дезоксихолевой (ДХК) и литохолевой (ЛХК) кислот — в кале и крови у больных спонтанным атеросклерозом, их практически здоровых ровесников и у практически здоровых молодых людей.

Методика. Обследовали 123 человека (82 мужчины и 41 женщина). Группу больных спонтанным атеросклерозом составили 65 пациентов (44 мужчины и 21 женщина, средний возраст $53,2 \pm 0,8$ года) с преимущественно коронарной локализацией процесса — ишемической болезнью сердца (ИБС). В группу практически здоровых ровесников больных включили 26 человек (18 мужчин и 8 женщин, средний возраст $50,9 \pm 1,3$ года). В группу практически здоровых молодых людей вошли 32 обследованных (20 мужчин и 12 женщин, средний возраст $26,0 \pm 0,8$ года). Диагноз коронарного атеросклероза устанавливали на основании типичной клинической картины, результатов электрокардиографии

с велоэргометрией, а также определения в крови количества липидов и липопротеинов. Содержание холестерина измеряли методом [11], триглицеридов — [13]. Электрофорез липопротеинов проводили в столбиках полиакриламидного геля [5]. Для уточнения диагноза 10 больным была выполнена селективная коронарография. Инфаркт миокарда в прошлом перенесли 22 пациента, у 27 наблюдалось повышение давления артериальной крови. Мы не обследовали людей с заболеваниями печени, кишечника, щитовидной железы, семейной гиперлипотеинемией, сахарным диабетом, желчнокаменной болезнью и ксантоматозом.

За 3 дня до начала исследования испытуемые переходили на прием пищи со средним суточным содержанием холестерина 495 мг. Расчет проводили по [9]. Весь период наблюдения, включая 3 дня, отведенные на подготовку, они не принимали лекарственных препаратов, влияющих на липидный обмен.

Определение содержания ЖК в кале проводили методом [14]. Кал собирали в течение суток в специальные металлические контейнеры, высушивали до постоянной массы, растирали до порошкообразного состояния. К 1 г порошка кала добавляли 20 мл кипящего 0,1 н. NaOH в 96 % этаноле. Затем приливали 10 мл дистиллированной воды и 50 мл петролейного эфира (точка кипения 40—70°), перемешивали и центрифугировали при 1000 g 5 мин. Нижний (спиртовой) слой переносили в колбу на 200 мл, добавляли 50 мл петролейного эфира, тщательно встряхивали и опять центрифугировали при тех же условиях. Эфирный слой отсасывали и объединяли с полученным при первом центрифугировании. Спиртовые слои тоже объединяли. Эфирные слои промывали в делительной воронке 10 мл 0,1 н. NaOH в 50 % этаноле. Нижний спиртовой слой из воронки переносили в спиртовой экстракт. К объединенному спиртовому экстракту добавляли 2 мл 10 н. NaOH и далее гидролизовали конъюгированные ЖК при 120°C 4 ч. По окончании гидролиза pH гидролизата доводили 6,0 н. HCl до 2. Затем из него дважды экстрагировали ЖК 50 мл смеси хлороформа с метанолом в соотношении 2:1. Экстракты упаривали досуха в ротационном испарителе. Осадок растворяли в 10 мл метанола. Из раствора отбирали 0,1 мл, добавляли 5 мл 70 % H₂SO₄ и 1 мл 0,25 % водного раствора фурфурола, перемешивали и оставляли на 1 ч при комнатной температуре, центрифугировали при 900 g 15 мин, надосадочную жидкость декантировали и колориметрировали при длине волны 510 нм. Содержание ЖК рассчитывали по калибровочному графику.

ЖК разделяли тонкослойной хроматографией (ТСХ) в силикагеле и газожидкостной хроматографией (ГЖХ). ТСХ проводили на пластинках «Силуфол» («Kavalier», Чехо-Словакия) в системе изооктан—этилацетат—ледяная уксусная кислота в соотношении 10:10:2. Количество каждой ЖК определяли по площади пятна [17]. Для ГЖХ использовали хроматограф «Цвет-106» со стеклянной колонкой длиной 2 м и диаметром 4 мм, наполненной инертном-супер (фракции 0,16—0,22 мм), пропитанным на 3 % по массе ХЕ-60 («Chetamol», Чехо-Словакия). Использовали газ-носитель азот (30 мл/мин) и ионизационный детектор. Температуру изменяли от 180 до 220 °C с интервалом 2 °C в 1 мин. Испаритель нагревали до 150 °C. ЖК метилировали 5 % раствором HCl в абсолютном метаноле и силикизировали смесью гексаметилдисалазан—триметилхлорсиланиридин (1:9:3), упаривали досуха и осадок растворяли в 0,05 мл ацетонитрила. В хроматограф вводили 1 мкл раствора.

Из крови ЖК экстрагировали по способу [3]. В 0,5 мл сыворотки вносили на кончике скальпеля активированный уголь. Затем приливали 5 мл кипящего абсолютного этанола, центрифугировали при 1000 g 10 мин, надосадочную жидкость отделяли, добавляли еще 5 мл кипящего абсолютного этанола, снова центрифугировали, центрифугаты объединяли и упаривали досуха. Осадок растворяли в 5 мл 5 % раствора NaOH и гидролизовали при 120 °C 4 ч. 6 н. HCl доводили pH гидролизата до 3,0. ЖК экстрагировали 3 объемами диэтилового эфира, упаривали досуха и осадок растворяли в 1 мл метанола. Количественное определение ЖК и разделение проводили как при исследовании кала.

Резервную способность организма к дополнительному выделению холестерина в виде ЖК органами пищеварения оценивали по реакции на нагрузку холестерином. Использовали однократную нагрузку этим веществом из желтков 2 вареных куриных яиц. Содержание холестерина в них составляло около 800 мг (в 1,8 раза больше фонового поступления с пищей). Обследованные собирали кал в течение суток до нагрузки, на ночь съедали два желтка и снова собирали как в течение суток. При отсутствии дефекации

Экскреция ЖК с калом у больных и здоровых людей до и после нагрузки пищевым холестерином

Группа обследованных	Показатели, ммоль/сут				
	общее количество	ХК	ДХК	ХДХК	ЛХК
Больные ИБС:					
с ГЛП (n=55)	5,68±0,18	2,25±0,17	1,66±0,05	0,85±0,07	0,90±0,05
	4,51±0,18	1,73±0,16	1,36±0,06	0,70±0,05	0,71±0,04
IIa тип (n=20)	6,56±0,35	3,61±0,18	1,59±0,09	0,60±0,06	0,70±0,06
	5,18±0,36	2,75±0,25	1,20±0,08	0,53±0,05	0,64±0,05
IIb тип (n=18)	5,73±0,35	1,82±0,19	1,66±0,08	1,40±0,13	0,82±0,06
	4,49±0,24	1,32±0,20	1,40±0,10	1,05±0,11	0,70±0,06
IV тип (n=17)	4,64±0,10	1,11±0,12	1,73±0,05	0,52±0,07	1,22±0,11
	3,75±0,18	0,98±0,10	1,50±0,11	0,46±0,05	0,79±0,09
с НЛП (n=10)	4,83±0,25	1,06±0,08	0,84±0,09	0,70±0,07	2,18±0,18
	3,70±0,14	0,98±0,08	0,71±0,10	0,63±0,05	1,36±0,10
Здоровые люди:					
ровесники больных (n=26)	7,87±0,28	1,29±0,06	0,91±0,04	2,50±0,16	3,15±0,10
	9,16±0,24	1,38±0,08	0,91±0,05	3,41±0,15	3,35±0,15
молодые (n=32)	4,22±0,14	1,01±0,07	1,05±0,05	0,85±0,06	1,31±0,06
	5,99±0,21	1,52±0,13	1,31±0,06	0,95±0,06	2,19±0,10

Примечание. В числителе — показатели до нагрузки холестерином, в знаменателе — после нее, *p* приведен в тексте при обсуждении результатов.

через сутки пробу повторяли через неделю. В кале измеряли количество ЖК и исследовали их спектр.

О достоверности выявленных различий судили путем расчета критерия *t* Стьюдента. Связи между установленными явлениями оценивали по коэффициентам корреляции *r* Пирсона. Достоверными считали различия и корреляцию при *p* < 0,05.

Результаты и обсуждение. Из табл. 1 видно, что самое большое количество ЖК в кале наблюдается у ровесников больных ИБС. Оно оказалось выше, чем у пациентов с гиперлипидемией (ГЛП), в 1,4 раза и с нормолipoproteinемией (НЛП) в 1,6 раза (*p* < 0,001), а также выше, чем у здоровых молодых людей в 1,6 раза (*p* < 0,001). У больных экскреция ЖК была наибольшей при IIa типе ГЛП и наименьшей при IV (соответственно 6,6±0,35 и 4,6±0,10 ммоль/сут; *p* < 0,001).

Высокий уровень элиминации ЖК с калом у здоровых ровесников больных ИБС, по-видимому, связан с большим поступлением в него ХДХК и ее производного ЛХК (см. табл. 1). Для ХДХК оно больше, чем у больных ИБС с ГЛП и здоровых молодых людей, в 2,9 раза и чем у больных с НЛП в 3,6 раза (соответственно 2,5±0,16, 0,85±0,07, 0,85±0,06 и 0,7±0,07 ммоль/сут; *p* < 0,001). По ЛК различие между больными ИБС с ГЛП и их здоровыми ровесниками оказалось еще большим (см. табл. 1) (в 3,5 раза больше у последних — соответственно 0,9±0,05 и 3,1±0,10 ммоль/сут; *p* < 0,001). Такое различие между здоровыми ровесниками больных ИБС, больными с НЛП и здоровыми молодыми людьми было несколько меньшим, чем по ХДХК, но все-таки достаточно большим (соответственно в 1,4 и 2,4 раза больше — 2,2±0,18 и 1,3±0,06 ммоль/сут; *p* < 0,001). Больные ИБС с НЛП экскретировали ЛХК с калом интенсивнее, чем здоровые молодые люди (в 1,7 раза; *p* < 0,001).

Элиминация с калом ХК оказалась самой высокой у больных ИБС с ГЛП (см. табл. 1). Их здоровые ровесники выделяли эту ЖК в количестве, в 1,7 раза меньшем, а пациенты, страдающие ИБС с НЛП, и здоровые молодые лю-

ди — в 2 раза меньшем (соответственно 2,2±0,17, 1,3±0,06, 1,1±0,08 и 1,0±0,07 ммоль/сут; *p* < 0,001). Содержание ДХК в кале у сравнивавшихся групп обследованных различалось так же, как количество ее источника ХК (см. табл. 1). Оно было самым высоким у больных с ГЛП: в 1,8 раза выше, чем у здоровых ровесников, в 2 раза выше, чем у больных с НЛП, и в 1,7 раза выше, чем у здоровых молодых людей (соответственно 1,7±0,05, 0,9±0,04, 0,8±0,04 и 1,0±0,05 ммоль/сут; *p* < 0,001).

Существенное влияние на спектр ЖК кала у больных ИБС с ГЛП оказывал тип последней (см. табл. 1). При IIa типе найдена особенно высокая экскреция ХК. Она была большей, чем в среднем по группе больных ИБС с ГЛП, в 1,6 раза (3,6±0,18 ммоль/сут; *p* < 0,001). При IIb типе выведение ХК оказалось меньшим, чем при IIa, в 2 раза (1,8±0,19 ммоль/сут; *p* < 0,001); при IV — еще меньшим (в 3,3 раза — 1,1±0,12 ммоль/сут; *p* < 0,001). Оно было ниже, чем при IIb, в 1,6 раза (*p* < 0,01) и не отличалось от установленного у здоровых людей (*p* > 0,05, см. табл. 1). Напротив, выведение ДХК имело несущественную тенденцию к увеличению при IV типе ГЛП и к уменьшению при IIa типа (*p* < 0,05). Повышенное количество ХДХК экскретировали пациенты с IIb типом ГЛП (1,4±0,13 ммоль/сут). Оно превышало таковое при IIa и IV типах в 2,3 и в 2,7 раза (*p* < 0,001). Тем не менее больные с IIb типом ГЛП выделяли значительно меньше (в 1,8 раза) ХДХК, чем их здоровые ровесники (*p* < 0,001) (см. табл. 1). ЛХК элиминировали интенсивнее пациенты с IV типом (см. табл. 1), у них уровень ее превышал обнаруженный при IIa в 1,7 раза и при IIb в 1,5 (соответственно 1,2±0,11, 0,7±0,06 и 0,8±0,06 ммоль/сут, *p* < 0,001 или < 0,01), но был значительно ниже (в 2,6 раза), чем у здоровых ровесников больных (*p* < 0,001).

У больных ИБС с ГЛП нагрузка пищевым холестерином вызвала уменьшение выделения всех определявшихся ЖК, причем по ХК, ДХК и ЛК

Концентрация ЖК в крови у больных и здоровых людей

Группа обследованных	Показатели, мкмоль/л			
	общее количество	ДХК	ХДХК	ЛХК
Больные ИБС:				
с ГЛП ($n=55$)	$50,5 \pm 1,55$	$31,4 \pm 1,27$	$11,6 \pm 0,81$	$7,6 \pm 0,60$
IIa тип ($n=20$)	$54,8 \pm 2,56$	$35,7 \pm 1,89$	$9,7 \pm 1,11$	$6,2 \pm 0,60$
IIb тип ($n=18$)	$56,4 \pm 2,32$	$30,1 \pm 2,11$	$11,7 \pm 1,55$	$11,0 \pm 1,34$
IV тип ($n=17$)	$50,3 \pm 3,64$	$27,8 \pm 2,42$	$13,7 \pm 1,55$	$5,7 \pm 0,63$
с НЛП ($n=10$)	$29,3 \pm 3,01$	$8,6 \pm 1,52$	$11,1 \pm 1,59$	$4,1 \pm 1,68$
Здоровые люди:				
ровесники больных ($n=26$)	$63,3 \pm 3,10$	$18,0 \pm 2,20$	$9,4 \pm 1,60$	$33,4 \pm 2,38$
молодые ($n=32$)	$15,2 \pm 1,57$	$7,5 \pm 0,86$	$2,6 \pm 0,41$	$5,2 \pm 0,38$

оно было статистически достоверно (соответственно с $2,2 \pm 0,17$ до $1,7 \pm 0,16$, с $1,7 \pm 0,05$ до $1,4 \pm 0,06$ и с $0,9 \pm 0,05$ до $0,7 \pm 0,04$ ммоль/сут; $p < 0,05$) (см. табл. 1). При НЛП после нагрузки существенно (в 1,6 раза) снизилась только элиминация ЛК, уровень которой был исходно повышен (с $2,2 \pm 0,18$ до $1,4 \pm 0,10$ ммоль/сут; $p < 0,02$). У ровесников больных ИБС после нагрузки в кале возросло содержание только ХДХК (в 1,4 раза — с $2,5 \pm 0,16$ до $3,4 \pm 0,15$ ммоль/сут; $p < 0,001$). В отличие от них здоровые молодые люди реагировали на нагрузку пищевым холестерином почти одинаковым ростом выделения ХК с ее производным ДХК и ХДХК с ее производным ЛК (соответственно в 1,8 и в 1,5 раза; $p < 0,001$) (см. табл. 1).

Расчет коэффициента корреляции показал, что у больных ИБС с ГЛП общее количество ЖК в кале зависит в большей степени от поступления в него ХК ($r=61$; $p < 0,05$) и ДХК ($r=46$; $p < 0,05$), чем ХДХК ($r=0,34$; $p < 0,05$). В отличие от больных у их здоровых ровесников связь между общим количеством ЖК, ХК и ДХК относительно невелика и несущественна (соответственно $r=0,24$; $p > 0,05$; $r=0,38$, $p > 0,05$), но она значительна и сильна с содержанием в кале ХДХК и ЛХК (соответственно $r=0,72$, $p < 0,05$; $r=0,75$, $p < 0,05$). У здоровых молодых людей была выявлена корреляция средней силы между этим показателем ХК и ДХК (соответственно $r=0,62$, $p < 0,05$; $r=0,52$, $p < 0,05$). С поступлением ЛХК в кал содержание в нем ЖК оказалось связанным слабо ($r=0,39$, $p > 0,05$). У больных НЛП была обнаружена только одна существенная корреляция, причем сильная — между общим количеством ЖК и ЛК ($r=0,75$, $p < 0,05$). С остальными ЖК она была несущественной ($r=0,11$ — $0,27$; $p > 0,05$).

Как видно из табл. 2, концентрация ЖК в сыворотке крови оказалась самой высокой, как и в кале, у здоровых ровесников больных ИБС ($63,3 \pm 3,10$ мкмоль/л). Она была существенно ниже у больных с ГЛП (в 1,2 раза — $50,5 \pm 1,55$ мкмоль/л; $p < 0,001$), НЛП (в 2,2 раза — $29,3 \pm 3,01$ мкмоль/л; $p < 0,001$) и особенно у здоровых молодых людей (в 4,2 раза — $15,2 \pm 1,57$ мкмоль/л). В сыворотке крови ХК обнаружить у обследованных не удалось. По содержанию ХДХК различие между больными ИБС и их здоровыми ровесниками оказалось несущественным ($p > 0,05$) (см. табл. 2). У молодых здоровых людей концентрация ХДХК в крови была значительно ниже (в 3,6—5,3 раза — $2,6 \pm 0,41$ мкмоль/л; $p < 0,001$). Концентрация

ДХК — продукта кишечной трансформации ХК — была как и в кале, самой высокой у больных ИБС с ГЛП ($31,4 \pm 1,27$ мкмоль/л) (см. табл. 2). У их здоровых ровесников она ниже в 1,7 раза ($18,0 \pm 2,20$ мкмоль/л; $p < 0,001$). У больных ИБС с НЛП и у здоровых людей ее уровень был еще ниже (в 3,7 и 4,2 раза — $8,6 \pm 1,52$ и $7,5 \pm 0,86$ мкмоль/л; $p < 0,001$). Концентрация в сыворотке крови ЛХК — производного ХДХК, как и в кале, была самой высокой у ровесников больных ИБС ($33,4 \pm 2,38$ мкмоль/л) (см. табл. 2). Она превышала обнаруженную у пациентов с ГЛП в 4,4 раза, с НЛП в 8 раз и у здоровых молодых людей в 1,6 раза (соответственно $7,6 \pm 0,60$, $4,1 \pm 1,68$ и $5,2 \pm 0,38$ мкмоль/л; $p < 0,001$). Различия по этому показателю между больными ИБС с ГЛП, с НЛП и здоровыми молодыми людьми оказались несущественными ($p > 0,05$).

Полученные данные подтверждают гипотезу, сформулированную нами выше. У больных со спонтанным коронарным атеросклерозом с ГЛП и у их здоровых ровесников основные пути катаболизма холестерина оказались разными. У первых независимо от типа ГЛП превалировал более длинный, заканчивающийся образованием ХК, а у вторых — короткий, останавливающийся на формировании ХДХК. О правильности этого положения свидетельствуют высокое содержание в кале больных ИБС с ГЛП ХК и ДХК, а у их здоровых ровесников — ХДХК и ЛХК увеличение концентрации в крови у больных ДХК, а у их ровесников — ЛХК. У больных ИБС с ГЛП общее количество ЖК в кале тесно коррелирует с ХК и ДХК, а у их здоровых ровесников — с ХДХК и ЛК. Вероятно, у здоровых ровесников больных большая элиминация ЖК связана с коротким путем трансформации в них холестерина. Более длинный путь оказался не только менее продуктивным, но и лишенным резервной способности к увеличению продукции ЖК, так как у больных нагрузка холестерином вызывала уменьшение элиминации ЖК преимущественно за счет ХК и ДХК, а у здоровых ровесников — увеличение за счет ХДХК. У здоровых молодых людей элиминация ЖК значительно ниже, чем у здоровых ровесников больных и в основном зависит от выделения ХК и ДХК. Видимо, способность к синтезу ЖК по короткому пути связана с индивидуальными особенностями катаболизма холестерина, а не с сохранением его профиля, присущего молодому возрасту.

Так как трансформация предшественника ХДХК в ХК начинается с 12 α -гидроксилирования, мож-

но думать, что у здоровых ровесников больных уменьшена активность 12 α -гидроксилазы в печени. Такая метаболическая особенность, по-видимому, защищает людей от развития спонтанного атеросклероза.

Данные, полученные при исследованиях больных ИБС с НЛП, существенно отличаются от установленных при ГЛП. Вероятно, патогенез этих форм атеросклероза имеет различия, требующие дальнейшего изучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арчаков А. И., Лопухин Ю. М. // Биологические мембраны и проблемы современной кардиологии.— М., 1979.— С. 20—21.
2. Громашевская Л. Л. // Биохимия животных и человека.— Киев, 1979.— Вып. 3.— С. 56—73.
3. Докусова Е. К. // Вопр. мед. химии.— 1975.— № 5.— С. 461—469.
4. Карпова Е. В. // Лаб. дело.— 1972.— № 9.— С. 539—541.
5. Магачева Е. Я. // Вопр. мед. химии.— 1973.— № 6.— С. 652—655.
6. Никитин Ю. П., Кирилович С. А., Давидик Г. С. // Печень и липидный обмен.— Новосибирск, 1985.— С. 192.
7. Рабинович П. Д., Гузачев А. А. // Кардиология.— 1987.— № 10.— С. 44—48.
8. Радомский В. Г., Рабинович П. Д. // Вопр. мед. химии.— 1981.— № 4.— С. 454—458.
9. Халтаев Н. Г., Деннис Б. // Кардиология.— 1976.— № 9.— С. 113—118.
10. Холестериноз / Лопухин Ю. М., Арчаков А. И., Владимиров Ю. А. и др.— М., 1983.— С. 352.
11. Abell L. L., Levy B. B., Kendall F. E. // J. biol. Chem.— 1952.— Vol. 195, N 1.— P. 357—366.
12. Elliot W., Hyde P. // Amer. J. Med.— 1973.— Vol. 51, N 25.— P. 568.
13. Foster L. B., Dunn R. T. // Clin. Chem.— 1973.— Vol. 19, N 3.— P. 338—340.
14. Grundy S. M., Ahrens E. H. Jr., Miettinen T. A. // J. Lipid Res.— 1965.— Vol. 6, N 3.— P. 397—410.
15. Mitropoulos K. A., Myant N. B., Gibbos G. F. et al. // J. biol. Chem.— 1974.— Vol. 249, N 19.— P. 6052—6056.
16. Myant N. B. The Biology of Cholesterol and Related Steroids.— London, 1981.
17. Purdy S. J., Truter E. V. // Analysis.— 1962.— Vol. 87, N 1039.— P. 802—809.

Поступила 09.02.90

SPECIFIC PROPERTIES OF BILE ACID FORMATION AND SECRETION IN SPONTANEOUS ATHEROSCLEROSIS

P. D. Rabinovich, A. A. Guzachev

Medical School, Saratov

Main pathways of cholesterol catabolism were found to be dissimilar in patients with spontaneous coronary atherosclerosis accompanied by hyperlipoproteinemia as compared with healthy persons of the same age. In the patients, independently of the hyperlipoproteinemia type, a longer pathway prevailed which terminated at the step of cholic acid formation, while in healthy persons the shorter pathway was found discontinuating after chenodeoxycholic acid production. The specific property of cholesterol catabolism in healthy persons appears to be due to a decrease in activity of V12 α -hydroxylase thus protecting against development of spontaneous atherosclerosis.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616-006.6-07:616.153.962.4-097-07

К. А. Ефетов, Г. В. Троицкий, С. В. Ефетов

УСТОЙЧИВОСТЬ КОНФОРМАЦИИ СЫВОРОТОЧНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ПРИ НЕКОТОРЫХ ОПУХОЛЯХ

Крымский медицинский институт, Симферополь

Цель данной работы заключалась в исследовании устойчивости сывороточных иммуноглобулинов к воздействию 2 М мочевины при некоторых опухолях человека. Одним из чувствительных методов, позволяющих следить за тонкими конформационными изменениями в молекуле белка, является температурно-пертурбационная дифференциальная спектрофотометрия (ТПДС). Суть этого метода заключается в регистрации разности спектров двух одинаковых белковых препаратов, но находящихся при разных температурах [1]. По интенсивности максимумов разностного спектра при длинах волн 288 и 295 нм можно следить за изменением микроокружения тирозиновых и триптофановых остатков (хромофоров) в молекуле белка. Переход хромофоров в более гидрофобное микроокружение сопровождается уменьшением амплитуды максимумов [6] и наоборот.

Ранее с помощью ТПДС было показано, что мочевина в небольших концентрациях (до 2—3 М), не вызывая нарушения вторичной структуры иммуноглобулинов G — IgG (данные дисперсии оптического вращения и кругового дихроизма), выделенных из сыворотки крови здоровых людей, приводит к уменьшению интенсивности тирозинового и триптофанового максимумов, что свидетельствует о конформационном переходе в белке [4]. С другой стороны, оказалось, что температурно-пертурбационные дифференциальные спектры сывороточных IgG больных хроническим лимфолейкозом практически не изменялись при воздействии на белок мочевины в тех же концентрациях, т. е. эти белки обладали большей устойчивостью конформации по сравнению с IgG здоровых людей [2]. Мы применили аналогичный подход для изучения IgG при раке желудка и опухолях некоторых других локализаций.

Методика. IgG выделяли из сыворотки крови здоровых и больных людей методом ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-трис-акриле М. Элюцию IgG проводили 0,025 М трис-HCl-буфером, содержащим 0,035 М NaCl, pH 8,8. Чистоту полученных белковых препаратов проверяли методом диск-электрофореза. Спектральные исследования белков проводили в 0,005 М фосфатном буфере, содержащем 0,15 М NaCl, pH 7,1—7,3 (ЗФР).

Температурно-пертурбационные дифференциальные спектры регистрировали на спектрофотометре «Specord UV VIS» в интервале длин волн 256—333 нм в кюветках длиной 1 см при интервале температур 5—45 °С. Для каждого препарата белка регистрировали 6—8 спектральных дифференциальных кривых в разных температурных интервалах. Высоту максимумов при 288 и 295 нм измеряли относительно показания прибора при 333 нм. Расчет числа пертурбируемых температурой тирозиновых и триптофановых остатков производили, как было описано ранее [4], с учетом взаимного вклада спектров хромофоров в максимумы при 288 и 295 нм по следующим формулам:

$$E_{288}^{\text{ТПР}} = 0,884 E_{288} + 0,416 E_{295},$$

$$E_{295}^{\text{ТПР}} = 0,884 E_{295} - 0,246 E_{288}.$$

где E_{288} и E_{295} — экстинкция в максимумах ТПДС соответственно при 288 и 295 нм; $E_{288}^{T_{288}}$ — экстинкция ТПДС при 288 нм, обусловленная тирозиновыми остатками; $E_{295}^{T_{295}}$ — экстинкция ТПДС при 295 нм, обусловленная триптофановыми остатками. Цифровые коэффициенты получены из спектров модельных растворов тирозина и триптофана с максимумами при этих же длинах волн. Общее число тирозиновых и триптофановых остатков в белке определяли спектрофотометрически [5]. Кровь брали из вены у больных с опухолевым процессом, находящихся в Крымском областном онкологическом диспансере, до начала радикального лечения. При этом отбирали таких больных, которым кровь не переливали, чтобы исключить возможность появления в кровяном русле чужих иммуноглобулинов. Для контроля исследовали кровь здоровых доноров, полученную на Симферопольской областной станции переливания крови.

Результаты и их обсуждение. Для всех препаратов иммуноглобулинов порядок исследования был стандартным: ТПДС в ЗФР, а затем ТПДС в 2 М мочеvine и ЗФР. Далее рассчитывали число пертурбируемых температурой тирозиновых остатков и находили разность (Δ) и отношение (x/y) первого и второго показателей. Чем больше были изменения в белке, вызванные 2 М мочевиной, тем соответственно выше были показатели Δ и x/y . Расчет количества пертурбируемых температурой триптофановых остатков показал наличие небольших флюктуаций их числа у всех белков, поэтому чтобы не загружать таблицы числовым материалом, далее мы приводим результаты только по тирозиновым остаткам.

Результаты ТПДС 11 препаратов IgG, выделенных из сыворотки крови здоровых людей, приведены в табл. 1. Видно, что присутствие 2 М мочевины в растворе приводит к значительному уменьшению числа пертурбируемых температурой тирозиновых остатков — более чем в 2 раза ($x/y=2,15\pm 0,28$). Исследование IgG, выделенных из сыворотки крови больных с различной локализацией опухолей, показало значительно большую устойчивость этих белков к воздействию 2 М мочевины (табл. 2). Практически не изменилось число пертурбируемых температурой тирозиновых остатков при раке желудка, раке легкого и меланоме кожи [3]. Наиболее выражен-

Таблица 1

Число пертурбируемых температурой тирозиновых остатков в молекулах IgG здоровых людей

№ препарата IgG	IgG в ЗФР (x)	IgG в 2 М мочеvine и ЗФР (y)	Δ (x-y)	x/y
1	32,1	15,7	16,4	2,04
2	31,9	6,5	25,4	4,91
3	25,2	12,5	12,7	2,02
4	34,3	17,7	16,6	1,94
5	42,9	23,8	19,1	1,80
6	31,1	14,2	16,9	2,19
7	35,3	20,1	15,2	1,76
8	37,0	21,5	15,5	1,72
9	33,4	22,9	10,5	1,46
10	35,3	16,4	18,9	2,15
11	42,5	26,2	16,3	1,62
M			16,7	2,15
σ			3,8	0,94
m			1,2	0,28

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3: M — среднее арифметическое, σ — среднее квадратическое отклонение, m — средняя ошибка среднего арифметического.

Таблица 2

Число пертурбируемых температурой тирозиновых остатков в молекулах IgG больных с новообразованиями различной локализации

Пациент	Диагноз	Стадия болезни	IgG в ЗФР (x)	IgG в 2 М мочеvine и ЗФР (y)	Δ (x-y)	x/y
K.	Рак легкого	III	28,9	29,6	-0,7	0,98
Б-а	Меланома кожи	III	24,7	20,8	3,9	1,19
З.	Рак желудка	III	28,2	26,8	1,4	1,05
П.	»	III	34,1	31,6	2,5	1,08
П.	» прямой кишки	III	45,2	31,6	13,6	1,43
K.	»	II	41,0	29,8	11,2	1,38
Б.	»	IV	33,2	23,8	9,4	1,39
Х-с	Рак кожи	II	47,0	30,6	16,4	1,54
Т.	» щитовидной железы	III	46,2	32,4	13,8	1,43
Л.	Миома матки	—	40,9	28,3	12,6	1,45
M					8,4	1,29
σ					6,1	0,20
m					1,9	0,06

ные изменения имели место при раке кожи и миоме матки. Для выяснения достоверности полученных результатов мы решили выбрать одну из локализаций опухолевого процесса. В табл. 3 представлены результаты ТПДС 10 больных раком желудка III—IV стадии. Оказалось, что x/y для IgG этих больных составил 1,05—1,47 (в среднем $1,21\pm 0,04$), что достоверно отличается от такового для IgG здоровых людей ($t=3,3$; $p>99\%$).

Взятие крови у больных в большинстве случаев производили сразу при поступлении их в клинику, когда результатов гистологического исследования

Таблица 3

Число пертурбируемых температурой тирозиновых остатков в молекулах IgG больных раком желудка и язвенной болезнью желудка

Пациент	Стадия болезни	IgG в ЗФР (x)	IgG в 2 М мочеvine и ЗФР (y)	Δ (x-y)	x/y
Рак желудка					
З.	III	28,2	26,8	1,4	1,05
Х.	IV	31,7	23,3	8,4	1,36
П.	III	34,1	31,6	2,5	1,08
И.	IV	34,0	30,9	3,1	1,10
Ф.	IV	40,9	33,5	7,4	1,22
С.	IV	30,7	27,9	2,8	1,10
А.	III	38,1	30,0	8,1	1,27
С-л	III	37,5	25,6	11,9	1,46
Б.	IV	35,5	29,7	5,8	1,20
В.	IV	33,8	26,7	7,1	1,27
M				5,9±	1,21±
σ				3,3	0,13
m				1,1	0,04
Язвенная болезнь желудка					
О.	—	36,5	15,6	20,9	2,34
Д.	—	46,6	23,1	23,5	2,02
М.	—	46,1	26,0	20,1	1,77
M				21,5	2,04
σ				1,8	0,29
m				1,0	0,16

еще не было. И только после получения результатов ТПДС они сопоставлялись с данными гистологии.

Заслуживает внимания исследование IgG у больного Д., который поступил в клинику с предположительным диагнозом рака желудка, основанном на клинических данных и результатах рентгенологического обследования (дефект наполнения в антральном отделе желудка и явления стеноза). С этим же диагнозом больной был оперирован. При операции было обнаружено патологическое образование, выглядевшее как опухоль тела желудка размером 6×5 см, прорастающая в правую долю печени; регионарные лимфатические узлы были увеличены до 1 см. Опухоль была отделена от печени и произведена гастрэктомия. При исследовании IgG, выделенного из сыворотки крови у больного при поступлении, оказалось, что 2 М мочевины вызывала уменьшение числа пертурбируемых температурой тирозиновых остатков вдвое ($x/y = 2,02$). Этот результат соизмерим с данными ТПДС IgG здоровых людей. Гистологическое исследование удаленного препарата показало отсутствие новообразования и наличие хронической пенетрирующей язвы желудка с псевдолимфоматозной инфильтрацией.

Нами были исследованы IgG, выделенные еще у 2 больных с язвенной болезнью желудка; результат оказался аналогичным: x/y составило 2,34 и 1,77 соответственно (см. табл. 3).

С целью изучения динамики результатов ТПДС в процессе болезни в течение 1,5 лет наблюдался больной З. с диагнозом рака желудка III стадии, у которого за это время 4 раза исследовали IgG: до операции, через 2 нед, 8 мес и 1,5 года после операции (см. рисунок). До операции величина x/y составляла 1,05, однако через 2 нед после удаления опухоли (комбинированной гастрэктомии) 2 М мочевины уже вызвала значительные изменения в ТПДС сывороточного IgG ($x/y = 1,80$). При поступлении больного на плановое обследование (через 8 мес после операции) при отсутствии каких-либо клинических проявлений распространения ракового процесса IgG, выделенный из сыворотки крови, был значительно более устойчив к воздействию 2 М мочевины ($x/y = 1,50$). Когда больной поступил через 1,5 года, у него клинически опреде-

лялись множественные метастазы в печень и IgG в растворе мочевины практически не изменялись ($x/y = 1,19$), т. е. результат приблизился к первоначальному (до удаления опухоли).

Таким образом, IgG, выделенные из сыворотки крови больных раком желудка и опухолями ряда других локализаций, обладают большей устойчивостью конформации по данным ТПДС к воздействию низких концентраций мочевины (2 М) по сравнению с IgG здоровых людей. IgG при язвенной болезни желудка при аналогичном исследовании не отличаются по своим параметрам от IgG здоровых людей. Устойчивость IgG к воздействию 2 М мочевины может изменяться в процессе течения заболевания и его лечения. Одна из возможных причин изменения IgG при новообразованиях заключается в их связывании с продуктами метаболизма опухолевой ткани.

ЛИТЕРАТУРА

1. Демченко А. П. Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков.— Киев, 1981.
2. Ефетов К. А., Тэттин С. Ю., Троицкий Г. В., Шидей В. З. // Докл. АН УССР. Сер. Б.— 1985.— № 8.— С. 68—71.
3. Ефетов К. А., Троицкий Г. В., Ефетов С. В. // Всесоюзная конф. по спектроскопии биополимеров, 6-я: Тезисы докладов.— Харьков, 1988.— С. 124—125.
4. Троицкий Г. В., Тэттин С. Ю., Ефетов К. А. // Биофизика.— 1984.— Т. 29, № 4.— С. 578—582.
5. Beaven G. H., Holiday E. R. // Advanc. Protein Chem.— 1952.— Vol. 7.— P. 319—386.
6. Nicola N. A., Leach S. J. // Int. J. Peptide Protein Res.— 1976.— Vol. 8, N 4.— P. 393—415.

Поступила 11.12.89

CONFORMATIONAL RESISTANCE OF BLOOD SERUM IMMUNOGLOBULINS IN SOME TUMORS

K. A. Efetov, G. V. Troitsky, S. V. Efetov

Crimean Medical School, Simpheropol

As shown by means of temperature-perturbation differential spectrophotometry blood serum immunoglobulins G from patients with gastric cancer and with some other tumors were more resistant to 2 M urea as compared with the immunoglobulins from healthy volunteers and patients with gastric ulcerous disease. The resistance of IgG conformation was altered in the course of gastric cancer treatment.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

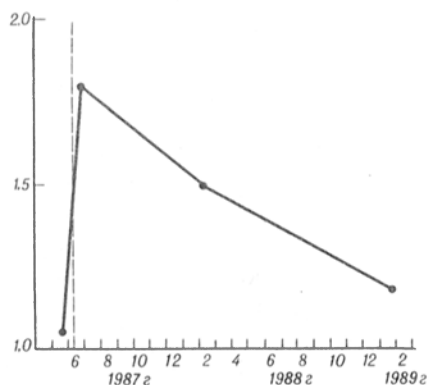
УДК 618.11-006.6-008.931:577.152.344]-074

Е. А. Козырева, К. И. Жордания, Л. С. Бассалык, А. В. Васильев

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ ЛИЗОСОМ ПРИ РАКЕ ЯИЧНИКОВ

ВОНЦ АМН СССР, Институт питания АМН СССР, Москва

Известно, что тканевые протеолитические ферменты принимают участие в процессах опухолевой инвазии и метастазирования, интенсивность которых определяет, как правило, течение заболевания у онкологических больных [10]. Полагают, что процесс опухолевой инвазии состоит из трех этапов: прикреплении опухолевых клеток к матриксу с помощью специфических гликопротеинов (ламинаина и фибронектина); секреции опухолевыми клетками гидролитических



Изменение показателя x/y для IgG больного З. в процессе течения заболевания. Диагноз: рак желудка III стадии.

По оси абсцисс — дата взятия крови; по оси ординат — x/y . Вертикальная пунктирная линия — дата операции.

ферментов, которые локально разрушают внеклеточный матрикс; локомоции опухолевых клеток при помощи хемотаксических факторов в область протеолитически модифицированного матрикса [6].

Поскольку протеолитический потенциал клеток в значительной степени определяется лизосомальным аппаратом, в настоящей работе была поставлена задача исследовать активность двух основных представителей лизосомальных эндонуклеаз — катепсина В и D — в злокачественных опухолях яичников. Исследование активности ферментов протеолиза в злокачественных опухолях яичников представляет интерес в связи с высокой степенью злокачественности этих опухолей, тенденцией к быстрому прогрессированию, диссеминацией опухолевых клеток по брюшине и образованию асцитов.

Методика. Для исследования были взяты образцы тканей злокачественных опухолей яичников, доброкачественных опухолей яичников, макроскопически неизмененных яичников, асцитическая жидкость и сыворотка крови первичных больных раком яичников. Материал был получен во время операций и хранился при температуре -70°C .

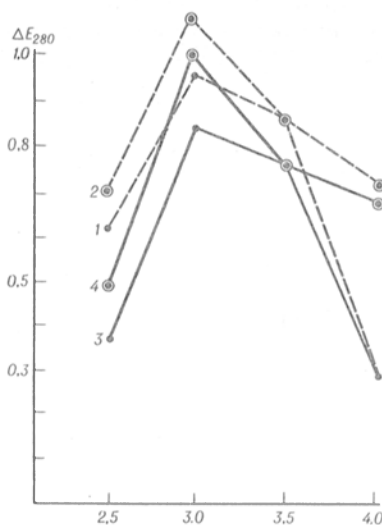
Исследуемые образцы тканей растирали в жидком азоте, гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера — Эльвейма на льду (1200 об/мин, 30 мин) с последующим центрифугированием гомогенатов при 1200 об/мин в течение 10 мин на центрифуге ЦЛР-13, используя в качестве среды суспендирования 0,25 М сахарозу, содержащий 1 мМ ЭДТА (рН 7,4). Активность ферментов определяли в полученной надосадочной жидкости. Асцитическую жидкость собирали в бутылки по 500 мл с добавлением раствора гепарина (5000 ЕД/мл) и центрифугировали 15 мин при 2000 об/мин на центрифуге РС-6. Определение активности ферментов проводили в надосадочной жидкости, не содержащей клеток.

Определение активности катепсина В проводили с помощью спектрофлуориметрического метода [4] с использованием в качестве субстрата N-бензоил-DL-аргинин- β -нафтиламида («Sigma», США) при рН 6,0 и длине волны 336 и 414 нм. Определение активности катепсина D проводили с помощью спектрофотометрического метода [4] в модификации [1] с использованием в качестве субстрата гемоглобина («Serva», ФРГ) при рН 3,0.

Для дифференцированной оценки участия тиоловых протеиназ и катепсина D в протеолизе белков ткани яичников в отдельной серии экспериментов в инкубационную смесь добавляли ЭДТА и дитиотреитол в конечной концентрации 80 и 30 мкг/мл соответственно или ингибитор катепсина D пепстатин в конечной концентрации 1,8 мкг/мл.

Результаты и обсуждение. В последние несколько лет значительное число работ посвящено изучению свойств аспарагиновой протеиназы лизосом катепсина D, высокая активность которого, а также наличие проформы фермента с мол. м. 52 кДа обнаружены в цитозоле клеток рака молочной железы, и показана возможность индукции синтеза прокатепсина D в клетках рака молочной железы эстрогенами. При этом активность фермента коррелировала со степенью злокачественности опухолей, что и позволило расценивать данный показатель как прогностический признак [12, 16]. Обнаружена также и возможность секреции катепсина D, активность которого в культуральной среде экспериментального рака молочной железы была выше, чем в среде роста фиброаденом молочной железы [11]. В совокупности полученные результаты позволяют рассматривать активность и содержание катепсина D в качестве маркера рака молочной железы [8].

Поскольку при определении активности катепсина D в тканях и биологических жидкостях



Протеолитическая активность в тканях опухолей яичников.

По оси абсцисс — pH; по оси ординат — опт. плотн. при 280 нм. 1 — активность в злокачественной опухоли; 2 — то же при введении в среду инкубации дитиотреитола; 3 — активность в доброкачественной опухоли; 4 — то же при введении в среду инкубации дитиотреитола.

больных раком яичников и здоровых женщин использовали в качестве субстрата гемоглобин, который, как известно, при определенных условиях может быть и субстратом для тиоловых протеиназ лизосом [5], на первом этапе работы исследовали вклад тиоловых протеиназ в гидролиз гемоглобина при различных значениях рН.

Как видно из рисунка, наиболее высокую активность катепсина D в малигнизированных тканях и тканях доброкачественных опухолей яичников наблюдали при рН 3,0. Ингибирование активности фермента пепстатином при рН 3,0 составляло 97 %, при рН буфера 3,5 — 95 %, при рН 4,0 — 77 %. При введении в инкубационную среду дитиотреитола при рН 3,0 и 3,5 выявлена лишь незначительная (0—10 %) доля участия тиоловых протеиназ лизосом в гидролизе гемоглобина, тогда как при рН 4,0 отмечено увеличение протеолитической активности в 2,8 раза.

Исходя из полученных данных, оптимальным для определения активности катепсина D следует считать рН 3,0. При исследовании катепсина D было установлено, что в злокачественных опухолях яичников активность его была в 2 и 2,6 раза выше, чем в нормальных яичниках и доброкачественных опухолях соответственно. Существенно, что активность катепсина D выявлена и в асцитических жидкостях больных раком (см. таблицу). Биологическое действие секретируемого катепсина D пока неизвестно, однако можно предположить, что фермент играет определенную роль в накоплении асцита путем индукции медиаторов, таких, как кинины или хемотаксические факторы, синтезируемые клетками злокачественной опухоли и способствующие процессам инвазии и метастазирования.

Исследование активности катепсина В в злокачественных и доброкачественных опухолях яичников, а также в тканях нормальных яичников позволило установить, что опухоли яичников, являющиеся в основном по гистологическому строению серозными аденокарциномами, отличаются от тканей нормальных яичников и доброкачественных опухолей весьма высокой активностью данного фермента (в 12 и 6 раз соответственно). Привлекает внимание тот факт, что активность катепсина В в злокачественных опу-

Активность лизосомальных протеиназ в злокачественных и доброкачественных опухолях яичников и биологических жидкостях первичных больных раком яичников

Исследуемый материал	Число случаев	Катепсин	
		В	Д
Ткань опухоли яичника, мкмоль/мин на 1 г белка:			
злокачественной	2	2,4±0,6***	73,0±11,7***
доброкачественной	7	0,13±0,07	27,2±6,6
Норма	8	0,2±0,02	32,5±6,2
Сыворотка крови, нмоль/мин/мл:			
больных раком	17	1,12±0,10	40,0±10,0
доноров	8	0,52±0,03	32,0±10,0
Асцитическая жидкость больных раком, нмоль/мин/мл	10	0,34±0,03	96,7±60,0

Примечание. Одна звездочка — $p < 0,05$ относительно нормы, две — $p < 0,05$ относительно доброкачественной опухоли.

хотях находилась в прямой зависимости от массы опухоли и степени инвазии в соседние органы и ткани (матка, мочевого пузыря, клетчатка малого таза), а также с распространением по брюшине, что согласуется с данными других авторов [14]. Катепсин В является лизосомальной тиоловой протеиназой, которая, помимо деградации внутриклеточных белков, играет существенную роль в их посттрансляционной модификации. Обнаружен катепсин В-подобный фермент в мембранах злокачественных клеток, в частности злокачественной меланомы В-16 [13], причем его активность была взаимосвязана с потенциальной возможностью меланомы к метастазированию в легкие. Поскольку особенностью некоторых злокачественных опухолей человека и животных (меланома, рак молочной железы, рак яичников) является способность клеток не только синтезировать, но и секретировать ряд таких протеолитических ферментов как активаторы плазминогена, протеиназы лизосом, коллагеназа, обеспечивающих деградацию белковых компонентов внеклеточного матрикса [7], есть основание предполагать возможность участия отдельных протеиназ во внутриклеточном процессе.

Активность катепсина В была обнаружена также во всех образцах асцитической жидкости первичных больных раком яичников. Появление катепсина В или катепсин В-подобного фермента в асцитах может происходить в результате как секреции его клетками первичной опухоли, клетками асцитической жидкости (раковыми клетками, макрофагами, лимфоцитами), так и снижении степени сродства фермента к поверхности мембран опухолевых клеток [14]. Низкая активность катепсина В в асцитах может быть обусловлена присутствием эндогенных ингибиторов цистеиновых протеиназ, которые, возможно, попадают в брюшную полость при протекании плазмы крови в процессе накопления асцита. Рядом авторов была исследована латентная тиоловая протеиназа из асцитной жидкости больных раком яичников, активация которой индуцировалась в присутствии пепсина, что дает основания предположить возможность существования латентного фермента в виде ферментно-

ингибиторного комплекса или в виде прокатепсина В-подобной формы [9].

При определении активности катепсина В в сыворотке крови первичных больных раком яичников и здоровых женщин получены данные, свидетельствующие об очень низкой активности фермента. Это, по-видимому, связано с достаточно высокой концентрацией в сыворотке как специфических, так и неспецифических (например, α_2 -макроглобулина) ингибиторов тиоловых протеиназ [15]. Не удалось выявить какой-либо достоверной связи между активностью катепсина В в сыворотке крови и особенностями гистологического строения и размеров опухоли, степенью распространенности опухолевого процесса.

Полученные данные свидетельствуют о высокой удельной активности катепсинов В и Д, относящихся к разным группам протеолитических ферментов лизосом, в злокачественных опухолях яичников по сравнению с доброкачественными опухолями и нормальными яичниками. Активность этих ферментов была обнаружена во всех исследованных образцах асцитической жидкости больных раком яичников. По-видимому, секретруемые формы катепсинов принимают участие в патофизиологических механизмах образования асцитов или способствуют инвазии опухолевых клеток в соседние органы и ткани и, что особенно важно, вовлечению в опухолевый процесс брюшины. Вероятно, протеиназы злокачественных опухолей не следует рассматривать однозначно как ферменты, принимающие участие только лишь в деградации белкового компонента внеклеточного матрикса. Поскольку протеолиз является особой формой биологического контроля [3], протеолитические ферменты в злокачественных опухолях обеспечивают процессы жизнедеятельности опухолевых клеток, участвуя не только в катаболизме белков клетки и регуляции их обновления, но и в образовании практически всех физиологически активных белков и пептидов, а также в процессах роста и размножения раковых клеток [2]. Целесообразно использование результатов определения активности лизосомальных протеиназ в биоптатах опухолей яичников для диагностических целей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильев А. В., Капелевич Т. А., Тутельян В. А. // *Вопр. мед. химии.* — 1983. — № 3. — С. 127—130.
2. Локишина Л. А., Дилакян Э. А. // *Молекул. биол.* — 1986. — Т. 20. — С. 1157—1175.
3. Орехович В. Н., Локишина Л. А., Елисеева Ю. Е. и др. // *Вести. АМН СССР.* — 1984. — № 8. — С. 3—11.
4. Barret A. J. // *Analyt. Biochem.* — 1972. — Vol. 47. — P. 280—293.
5. Huifman W. // *Degradation of Proteins by Lysosomes.* — Cromingen, 1974. — P. 60—64.
6. Liotta L. A., Rav S. N., Barsky S. H. // *Lab. Invest.* — 1983. — Vol. 49. — P. 636—649.
7. Jamaguchi N., Kawai K. // *Cancer Res.* — 1986. — Vol. 46. — P. 5353—5359.
8. Maudelonde T., Marlinex P., Brouillet J. P. et al. // *J. clin. Endocr. Metab.* — 1990. — Vol. 70. — P. 115—121.
9. Mort J. S., Ledue M., Recklies A. D. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1981. — Vol. 662. — P. 1173—1180.
10. Mullins D., Rohrllich R. T. // *Ibid.* — 1982. — Vol. 695. — P. 177—214.
11. Rocheford H. // *Biochemie.* — 1988. — Vol. 70. — P. 943—949.
12. Rocheford H., Augenzeau P., Brizzo P. et al. // *Ibid.* — P. 940—942.
13. Rozhin J., Robinson D., Stevens M. A. et al. // *Cancer Res.* — 1987. — Vol. 47. — P. 6620—6628.

14. Sloane B. F., Rozhin J., Johnson K. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1986.— Vol. 83.— P. 2483—2487.
15. Starkey P. M., Barret A. J. // Biochem. J.— 1973.— Vol. 131.— P. 825—831.
16. Tardon A. K., Clark J. M., Chamnen J. C. et al. // New Engl. J. Med.— 1990.— Vol. 322.— P. 297—302.

Поступила 30.10.90

LYSOSOMAL PROTEOLYTIC ENZYMES IN OVARY CANCER

E. A. Kozyreva, K. I. Zhordania, L. S. Bassalyk, A. V. Vasil'ev

All-Union Oncological Research Centre, Institute of Nutrition, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Activity of lysosomal proteinases cathepsins B and D was studied in normal tissues, malignant and benign ovary tumors, in blood sera and ascites fluid of patients with primary ovary cancer. The cathepsin B activity was 12-fold higher in tissues of ovary malignant tumors as compared with that of normal ovary and 6-fold higher — as compared with tissues of benign tumors. Activation of the enzyme depended directly on the mass of malignant tumors and on the intensity of their penetration into surrounding tissues (uterus, urinary bladder, small pelvic fat) and spreading over peritoneum. Activity of cathepsin D was 2- and 2.6-fold higher in malignant ovary tumors as compared with normal tissue and benign tumors, respectively. The data obtained suggest that estimation of cathepsins B and D activities in biotopic material from ovary tumors might be useful for diagnosis of the disease.

аспарагиновой (Асп) кислот, глутамин (Глу), аспарагина (Асп), серина (Сер) и глицина (Гли) методом тонкослойной хроматографии с применением дансилхлоридного зонда [5]; по содержанию ванилилминдальной (ВМК) и гомованилиновой (ГВК) кислот методом тонкослойной хроматографии [7]; по содержанию норадреналина (НА) и дофамина (ДА) флюориметрическим методом [4]; по активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ) и бутирилхолинэстеразы (БХЭ) гистохимическим методом [6]. Для статистической обработки данных применяли *t*-критерий Стьюдента.

Лапку с опухолью удаляли на 14-е сутки после перевивки под нембутал-эфирным наркозом (нембутал 40 мг/кг, эфир ингаляционно). Операцию производили при наложении перетягивающего жгута на уровне нижней трети бедра. Конечность ампутировали в области коленного сустава. Раневую поверхность обрабатывали йодом. Края раны зашивали узловатыми швами. В контрольных исследованиях удаляли здоровую лапку.

Результаты и обсуждение. Обнаружено, что удаление первичного опухолевого очага действительно сопровождается значительной стимуляцией метастазирования. Объем метастазов у животных опытной группы на 28-е сутки после перевивки опухоли более чем в 2 раза превысил контрольные показатели (контроль $112,3 \pm 7,6$ мм³, после удаления опухоли $313,6 \pm 18,3$ мм³). Активному росту метастазов предшествовали выраженные изменения биохимических характеристик медиаторных процессов в гипоталамусе, развивающиеся в ответ на хирургическое удаление опухоли.

Уже через 1 сут после удаления опухоли в гипоталамусе наблюдалась резкая нейромедиаторная активация систем, стимулирующих гипофизарно-надпочечниковый комплекс (табл. 1). Снижение уровня НА (в 2—3 раза) сочеталось с увеличением содержания ВМК. Активация глутамат- и аспартатергического возбуждения выразилась в снижении уровня Глу, Асп и интенсификации их утилизации, о чем свидетельствовало увеличение содержания Глн и Асн. Следует отметить, что аспартатергические механизмы активизировались в большей степени, чем глутаматергические. Особенно отчетливо проявлялось это на 3-и сутки после удаления опухоли. По всей вероятности, Асн играет важную роль в генерации возбуждения при действии чрезмерных нагрузок. Заметно активировалась холинергическая система: наряду с повышением активности АХЭ усиливалась и активность БХЭ.

В еще большей степени рассмотренные изменения проявились на 3-и сутки. Реакция медиаторных систем при удалении первичной опухоли, таким образом, чрезвычайно интенсивна и длительна и может быть охарактеризована как стрессорная. Следует отметить, что контрольное удаление лапки, которое практически не влияло на интенсивность метастазирования (объем метастазов в контроле $105,9 \pm 8,9$ мм³, после удаления лапки $131,4 \pm 14,6$ мм³), сопровождалось менее выраженными изменениями медиаторных механизмов возбуждения (табл. 2).

В ответ на активацию возбуждающих медиаторных систем в ранние сроки после хирургического удаления опухоли в гипоталамусе запускались и механизмы, ограничивающие процессы возбуждения: повышалась активность ГАМК-ергической, глипинергической и тауринергической систем. Однако уже на 3-и сутки после операции процессы возбуждения преобладали, к этому времени снижался уровень предшествен-

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616-006.6-092.9-033.2-039.36-02:616-006.6-021.3-089.87]-092:[616.831.41-008.94:577.175.82

З. О. Надирадзе, Ю. П. Шмалько,
А. Г. Гачечиладзе

БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕДИАТОРНЫХ СИСТЕМ ГОЛОВНОГО МОЗГА В УСЛОВИЯХ СТИМУЛЯЦИИ МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ ПРИ ХИРУРГИЧЕСКОМ УДАЛЕНИИ ОПУХОЛИ

Институт проблем онкологии им. Р. Е. Кавецкого АН УССР, Киев

Известен факт усиления процесса метастазирования при хирургическом удалении первичного опухолевого очага [8]. Показано, что стимуляция развития метастазов в определенной степени опосредуется нейрогуморальными регуляторными механизмами [2]. Важную роль при этом играют патологические изменения нейромедиаторных процессов головного мозга [1]. В задачу настоящего исследования входило изучение изменений биохимических характеристик медиаторных систем гипоталамуса у мышей линии С57В1 в условиях стимуляции метастазирования при хирургическом удалении карциномы легких Льюис.

Методика. Опыты проведены на 144 мышях-самцах линии С57В1, полученных из вивария Института проблем онкологии им. Р. Е. Кавецкого АН УССР, массой 25—30 г. Клетки карциномы легких Льюис 311 прививали в подушечку задней лапки в дозе $2 \cdot 10^5$ клеток в 0,05 мл физиологического раствора. Активность медиаторных процессов в гипоталамусе определяли: по содержанию триптофана (Три), 5-окситриптофана (5-ОТ), серотонина (Стн), 5-оксидолуксусной кислоты (5-ОИУК), тирозина (Тир), глицина (Гли), таурина (Тау), γ -аминомасляной кислоты (ГАМК); по активности L-глутаматдекарбоксилазы (ГДК) и ГАМК-трансферазы (ГАМК-Т); по содержанию глутаминовой (Глн),

Биохимическая характеристика медиаторных систем в гипоталамусе у мышей линии C57Bl после хирургического удаления карциномы Льюис ($M \pm m$; $n=6$)

Показатель	До прививки (контроль)	До операции (14)	Срок после удаления опухоли, сутки			
			1 (15)	3 (17)	7 (21)	14 (28)
Три	$0,40 \pm 0,04$	$0,30 \pm 0,02^*$	$0,23 \pm 0,02^{**}$	$0,28 \pm 0,03$	$0,20 \pm 0,03^{**}$	$0,21 \pm 0,02^{**}$
5-ОТ	$4,5 \pm 0,5$	$2,7 \pm 0,2^*$	$2,0 \pm 0,2^{**}$	$2,5 \pm 0,3$	$2,0 \pm 0,2^{**}$	$1,9 \pm 0,2^{**}$
Стн	$10,3 \pm 1,0$	$7,3 \pm 0,7^*$	$5,3 \pm 0,7$	$5,0 \pm 0,5^{**}$	$5,5 \pm 0,5$	$4,6 \pm 0,4^{**}$
5-ОИУК	$5,6 \pm 0,6$	$7,6 \pm 0,6^*$	$8,9 \pm 0,7$	$10,0 \pm 0,7^{**}$	$6,8 \pm 0,6$	$4,0 \pm 0,4^{**}$
Тир	$0,14 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,02$	$0,10 \pm 0,01^{**}$
НА	$8,7 \pm 0,8$	$10,1 \pm 0,8$	$5,3 \pm 0,6^{**}$	$3,7 \pm 0,4^{**}$	$4,8 \pm 0,5^{**}$	$4,0 \pm 0,3^{**}$
ВМК	$15,8 \pm 0,9$	$16,1 \pm 1,3$	$21,6 \pm 1,9^{**}$	$24,8 \pm 1,7^{**}$	$17,3 \pm 1,3$	$10,2 \pm 1,0^{**}$
ДА	$4,9 \pm 0,5$	$5,7 \pm 0,5$	$3,5 \pm 0,3$	$3,2 \pm 0,3^{**}$	$3,6 \pm 0,4^{**}$	$4,0 \pm 0,3^{**}$
ДА-К	$4,2 \pm 0,4$	$4,3 \pm 0,4$	$5,2 \pm 0,4$	$6,0 \pm 0,5^{**}$	$4,2 \pm 0,3$	$3,0 \pm 0,3^{**}$
ГВК	$10,2 \pm 1,0$	$9,3 \pm 0,7$	$12,1 \pm 0,9^{**}$	$13,1 \pm 1,1^{**}$	$9,6 \pm 0,8$	$7,3 \pm 0,6$
Глу	$10,3 \pm 1,0$	$9,0 \pm 0,8$	$6,1 \pm 0,5^{**}$	$4,2 \pm 0,5^{**}$	$4,4 \pm 0,4^{**}$	$6,0 \pm 0,5^{**}$
Гли	$2,5 \pm 0,2$	$2,4 \pm 0,2$	$3,6 \pm 0,4^{**}$	$4,1 \pm 0,4^{**}$	$2,1 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,2^{**}$
Асп	$2,4 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,2$	$0,7 \pm 0,1^{**}$	$1,1 \pm 0,1^{**}$	$1,1 \pm 0,1^{**}$
Асп	$1,7 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,3$	$3,3 \pm 0,4^{**}$	$1,9 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,1^{**}$
ГАМК	$3,2 \pm 0,3$	$3,2 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,2^{**}$	$2,9 \pm 0,3$	$3,4 \pm 0,4$	$4,1 \pm 0,3^{**}$
ГДК	$3,3 \pm 0,3$	$2,9 \pm 0,2$	$4,0 \pm 0,3^{**}$	$3,0 \pm 0,2$	$2,8 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,3$
ГАМК-Т	$1,9 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,2$	$3,4 \pm 0,4^{**}$	$2,6 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,1^{**}$	$1,3 \pm 0,1^{**}$
Сер	$2,3 \pm 0,2$	$2,5 \pm 0,2$	$3,5 \pm 0,3^{**}$	$3,0 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,3$	$2,4 \pm 0,2$
Гли	$2,0 \pm 0,3$	$2,1 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,2$
Тау	$1,9 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,1^{**}$	$1,2 \pm 0,2^{**}$	$1,5 \pm 0,3$	$3,7 \pm 0,3^{**}$
АХЭ	$1,1 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,1^{**}$	$2,0 \pm 0,1^{**}$	$1,7 \pm 0,2^{**}$	$0,5 \pm 0,2$
БХЭ	$0,3 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$

Примечание. Здесь и в табл. 2 содержание 5-ОТ, Стн, НА, ВМК, ДА, ГВК выражено в наномолях на 1 г, активность АХЭ и БХЭ — в условных единицах. В скобках — срок после прививки опухоли. Одна звездочка — $p < 0,05$ относительно контроля, две — $p < 0,05$ относительно дооперационных показателей (14-е сутки после прививки опухоли).

пика Сер Гли, падала активность ГДК и ГАМК-Т. При удалении здоровой лапки таких изменений обнаружено не было. Основную нагрузку в обеспечении внутривидового торможения в гипоталамусе в ответ на хирургическое удаление опухоли принимала на себя тауринергическая система — уровень активности Тау на 3-и сутки после удаления опухоли оставался существенно повышенным. Заслуживает внимания наблюдаемое в ранние сроки после операции преобладание серотонинергической системы над дофаминергической. В соответствии с данными литературы [3] можно предположить

патологическое влияние этих изменений на развитие иммунологических реакций.

На 7-е сутки после операции в гипоталамических структурах наблюдали угнетение серотонинергической системы, которое сопровождалось снижением уровня Три на фоне стабилизации выделения и катаболизма медиатора. К 7—14-м суткам после удаления опухоли в гипоталамусе развилось угнетение глутаматергической и аспартатергической систем. Снижение активности аспартатергических механизмов при этом было выражено в большей степени, что подтверждает наше предположение об особой роли Асп в усло-

Таблица 2

Биохимическая характеристика медиаторных систем в гипоталамусе у мышей линии C57Bl после хирургического удаления здоровой лапки ($M \pm m$; $n=6$)

Показатель	До прививки (контроль)	До операции (14)	Срок после удаления лапки, сутки			
			1 (15)	3 (17)	7 (21)	14 (28)
Три	$0,35 \pm 0,03$	$0,30 \pm 0,04$	$0,31 \pm 0,03$	$0,25 \pm 0,03$	$0,39 \pm 0,05$	$0,23 \pm 0,03$
5-ОТ	$4,9 \pm 0,3$	$2,0 \pm 0,3^*$	$1,8 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,2$
Стн	$9,8 \pm 0,7$	$9,4 \pm 1,1$	$7,9 \pm 0,8$	$6,8 \pm 0,9^{**}$	$10,2 \pm 0,9$	$8,3 \pm 0,7$
5-ОИУК	$5,2 \pm 0,5$	$8,1 \pm 0,9^*$	$7,8 \pm 0,8$	$9,8 \pm 0,7$	$6,7 \pm 0,4^{**}$	$5,3 \pm 0,6^{**}$
Тир	$0,16 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,2$	$0,12 \pm 0,01$
НА	$8,0 \pm 0,9$	$7,6 \pm 0,9$	$5,4 \pm 0,6^{**}$	$7,0 \pm 0,8^{**}$	$6,0 \pm 0,7$	$5,0 \pm 0,6$
ВМК	$12,6 \pm 1,1$	$13,8 \pm 1,5$	$18,1 \pm 2,1^{**}$	$19,1 \pm 2,6^{**}$	$20,3 \pm 1,8^{**}$	$10,1 \pm 0,8$
ДА	$4,2 \pm 0,3$	$3,9 \pm 0,4$	$3,4 \pm 0,5$	$3,0 \pm 0,4$	$2,9 \pm 0,3$	$2,7 \pm 0,3$
ДА-К	$4,1 \pm 0,4$	$4,3 \pm 0,3$	$3,9 \pm 0,2$	$4,5 \pm 0,4$	$4,2 \pm 0,5$	$3,6 \pm 0,3$
ГВК	$9,6 \pm 0,8$	$7,8 \pm 0,9$	$10,8 \pm 0,9^{**}$	$9,6 \pm 1,0$	$11,0 \pm 1,3$	$8,1 \pm 0,9$
Глу	$11,2 \pm 0,9$	$10,6 \pm 0,8$	$9,8 \pm 0,6$	$8,3 \pm 0,8^{**}$	$9,0 \pm 0,7$	$7,8 \pm 0,6^{**}$
Гли	$2,8 \pm 0,3$	$2,7 \pm 0,2$	$3,5 \pm 0,3$	$3,4 \pm 0,3$	$3,2 \pm 0,3$	$2,2 \pm 0,2$
Асп	$2,2 \pm 0,2$	$2,5 \pm 0,3$	$1,6 \pm 0,2^{**}$	$1,5 \pm 0,2^{**}$	$1,6 \pm 0,2^{**}$	$1,5 \pm 0,2^{**}$
Асп	$1,8 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,3$	$2,5 \pm 0,3^{**}$	$2,4 \pm 0,2^{**}$	$2,6 \pm 0,3^{**}$	$1,2 \pm 0,1$
ГАМК	$3,5 \pm 0,4$	$3,0 \pm 0,3$	$3,0 \pm 0,4$	$2,6 \pm 0,3$	$2,8 \pm 0,3$	$3,3 \pm 0,3$
ГДК	$3,0 \pm 0,3$	$3,4 \pm 0,4$	$4,8 \pm 0,4^{**}$	$4,1 \pm 0,3$	$3,2 \pm 0,4$	$2,9 \pm 0,3$
ГАМК-Т	$1,6 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,1^{**}$
Сер	$2,5 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,3$	$3,0 \pm 0,3$	$3,2 \pm 0,3$	$2,6 \pm 0,3$	$1,9 \pm 0,2^{**}$
Гли	$2,2 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,1^{**}$	$1,5 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,2$
Тау	$1,8 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,3^{**}$
АХЭ	$1,3 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,2^{**}$	$1,8 \pm 0,3$	$1,9 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,1$
БХЭ	$0,5 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$

виях чрезмерных физиологических нагрузок. На 7-е сутки после операции была отмечена тенденция к угнетению норадренергической и дофаминергической систем — уровень НА и ДА на фоне нормализации содержания ВМК, ДА-К и ГВК снизился. Процесс возбуждения в гипоталамусе поддерживался за счет активации холинергических механизмов.

На 14-е сутки после операции в гипоталамусе было обнаружено резкое угнетение большинства изученных нейромедиаторных механизмов. Исключение составляла глицинергическая система. Заслуживает внимания накопление Тау в гипоталамических структурах. По всей вероятности, чрезмерная перегрузка этой системы в условиях настоящего эксперимента приводит к повреждению механизмов деградации Тау. В пользу этого предположения свидетельствует аналогичное нарушение катаболизма ГАМК.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что хирургическое удаление опухоли, вызывающее стимуляцию метастазирования, сопровождается резкой активацией гипоталамических структур, которая приводит к генерализации нарушений медиаторных систем, завершаясь их истощением и срывом. Патологические изменения биохимических характеристик нейромедиаторных процессов головного мозга, обнаруженные при хирургическом удалении опухоли, значительно превосходят аналогичные изменения у неоперированных и ложнооперированных (удаление здоровой лапки) животных в соответствующие сроки после перевивки опухоли, коррелируя, таким образом, с интенсивностью метастазирования.

Учитывая тот факт, что удаление опухоли сопровождается сложными, многокомпонентными изменениями, выходящими за рамки деятельности ЦНС, невозможно окончательно судить, играют ли указанные выше нарушения нейромедиаторных процессов инициирующую роль в возникновении и росте метастазов или только сопутствуют им. Этот вопрос нуждается в дальнейшем изучении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балицкий К. П., Шмалько Ю. П. Стресс и метастазирование злокачественных опухолей. — Киев, 1987.
2. Балицкий К. П., Шмалько Ю. П., Придатко О. Е. и др. // Экспер. онкол. — 1984. — Т. 6, № 2. — С. 45—47.
3. Денисенко П. П. Роль холинореактивных систем в регуляторных процессах. М., 1980.
4. Кацнельсон З. С., Стабровский Е. М. Гистология и биохимия хромаффинной ткани надпочечников. — Л., 1975.
5. Осборн Н. П. Микрхимический анализ нервной ткани. — М., 1978.
6. Чернышевская И. А. Гистохимия холинэстераз коры головного мозга. — М., 1983.
7. Шаршунова М., Шварц В., Михалеч Ч. Тонкослойная хроматография в фармакологии и клинической биохимии. — М., 1980.
8. Gorelik E., Segal S., Feldman M. // Int. J. Cancer. — 1981. — Vol. 27, N 6. — P. 847.

Поступила 24.11.89

BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF BRAIN TRANSMITTER SYSTEMS IN SURGICAL REMOVAL OF TUMOR STIMULATING METASTATIC SPREADING

Z. O. Nadiradze, Yu. P. Shmal'ko, A. G. Gachechiladze

Institute of Oncology Problems, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

In cases of tumor surgical operation, which stimulated metastatic spreading, distinct activation of hypothalamic structures was observed simultaneously with generalization of impairments in the neurotransmitting systems, accompanied by their exhaustion and disturbance. Pathology-related alterations in brain neurotransmitting reactions, provoked by surgical operation in cases of tumors, considerably exceeded similar parameters in non-operated or sham-operated animals.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 612.649.015.1:577.152.143].088.1+618.36-008.931:577.152.144]-074

А. З. Киркель, Л. А. Тищенко, Л. Н. Аксенова, В. А. Пеккель, В. З. Горкин

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕМБРАННО-СВЯЗАННЫХ И ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МОНОАМИНОКСИДАЗ ПЛАЦЕНТЫ ЧЕЛОВЕКА

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Изучение флавиносодержащих моноаминоксидаз (МАО) (КФ 1.4.3.4) плаценты человека представляет значительный интерес в связи с возможным их участием в процессе родов и в развитии некоторых видов патологии беременности [1].

Накопленные к настоящему времени данные свидетельствуют о присутствии в плаценте человека МАО различных типов: МАО типа А (основной субстрат — серотонин), а также МАО типа Б (субстраты — бензиламин и β -фенилэтиламин) и МАО типа Б' (основной субстрат — бензиламин) [3].

В большинстве тканей МАО сосредоточена главным образом в митохондриальных мембранах; лишь в отдельных случаях МАО в значительных количествах обнаруживается в микросомальной фракции [9, 15]. Своеобразной особенностью плацентарной ткани является наличие высокой активности МАО в микросомальной фракции (до 36 %) и в цитозоле (7 % от общей аминоксидазной активности ткани) [3]. Происхождение этих ферментов изучено еще недостаточно. Можно предположить, что в быстрорастущей плацентарной ткани, где идет интенсивный синтез белка, скорость синтеза МАО превышает скорость включения ее в митохондриальную мембрану. По-видимому, в митохондриальную мембрану встраивается уже зрелая форма фермента [11], и вполне вероятно, что цитоплазматическая и микросомальная МАО обладают теми же свойствами, что и классическая митохондриальная МАО. С целью проверки этого предположения в настоящей работе было проведено сравнительное исследование каталитических и физико-химических свойств МАО из различных субклеточных фракций гомогената плаценты.

Методика. Плаценты получали в родильном доме № 6 Москвы при нормальных своевременных родах. Ткань отмывали от крови, отделяли от сосудистых оболочек, и все последующие операции производили при 4 °С.

Субклеточные фракции получали по предложенному нами ранее методу [3]. Полученную цитоплазматическую фракцию подвергали гель-фильтрации через молекулярные сита с различным размером пор, уравновешенные с 0,02 М калий-фосфатным буфером pH 7,0. Сгущение полученных фракций,

обладавших активностью MAO, проводили путем гель-фильтрации на мембране XM-50 («Amicon»).

Молекулярную массу MAO оценивали методом электрофореза на полиакриламидном геле (ПААГ) на пластинах в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) меченных ^3H -паргилином образцов MAO разных субклеточных фракций в системе Лэмли [10] с некоторой модификацией. В качестве денатурирующего агента, помимо ДСН и β -меркаптоэтанола, была добавлена 8 М мочевины.

Ферментные препараты перед нанесением инкубировали с ^3H -паргилином (на 100 мг белка добавляли 120 мкл ^3H -паргилина, содержащих 120 мкКи) в течение 18 ч при 30 °С. Несвязавшийся паргиллин отмывали путем переосаждения субклеточных фракций (кроме цитоплазматической). На каждую дорожку наносили по 50 мкг белка митохондриального или микросомального препарата и по 1000 мкг белка цитозольной фракции. В качестве маркерных белков использовали стандартный набор фирмы «Serva» (ФРГ). Электрофорез проводили в градиенте концентрации геля от 7,5 до 20 %, сила тока 13 мА, время 18 ч. После завершения электрофоретического разделения пластины геля фиксировали в 30 % растворе трихлоруксусной кислоты и обрабатывали 0,2 % раствором кумасси R-250 в 30 % трихлоруксусной кислоте. Затем пластину разрезали на дорожки, а каждую дорожку — на фрагменты по 1 мм, которые помещали во флаконы, высушивали и добавляли туда по 0,2 мл 30 % перекиси водорода. Пробы инкубировали в течение ночи при 60 °С, после чего в каждый флакон добавляли по 2 мл сцинтиллятора Optiphase (Швеция) и подсчитывали радиоактивность в сцинтилляционном счетчике «LKB Rackbeta 1219».

Расчет молекулярной массы субъединиц MAO производили исходя из электрофоретической подвижности образцов, сравнивая ее с электрофоретической подвижностью маркерных белков с известной молекулярной массой [16].

Активность MAO определяли радиометрическим методом аналогично описанному ранее [4]. При этом использовали ^{14}C -серотонин фирмы «Amersham» (Великобритания) в конечной концентрации 100 мкМ (удельная радиоактивность 2 Ки/моль), когда определяли активность мембранно-связанных MAO, или 100 мкМ (удельная радиоактивность 4 Ки/моль) в опытах с растворимым ферментом. При использовании β -фенилэтиламина в качестве субстрата создавали либо 10 мкМ конечную концентрацию (удельная радиоактивность 10 Ки/моль) для определения активности мембранно-связанных MAO, либо 10 мкМ концентрацию (удельная радиоактивность 20 Ки/моль) в случае тестирования активности растворимого фермента.

Для ингибиторного анализа использовали соединение Лилли 51641, полученное от проф. Р. Фуллера (США), как избирательный, необратимо действующий ингибитор MAO типа А и избирательный ингибитор MAO типа В депренил, полученный от проф. Й. Кнолля (Венгрия).

Результаты и обсуждение. Исследования показали, что свойства мембранно-связанных (митохондриальной и микросомальной), а также растворимой MAO оказались во многом сходными (табл. 1). Наилучшим субстратом плацентарной MAO во всех субклеточных фракциях является серотонин; β -фенилэтиламин, хотя и обладает высоким сродством к MAO, имеет в 3 раза меньшую максимальную скорость окисления, чем серотонин.

Таблица 1

Свойства MAO субклеточных фракций плаценты человека

Параметры	Субстрат	Митохондрии	Микросомы	Цитозоль
$V_{\text{макс}}$, нмоль NH_3 /мин/мг	Серотонин	27,0	25,5	0,56
	β -Фенилэтиламин	8,3	9,0	0,18
$S_{\text{насыщ}}$, мМ	Серотонин	1,0	1,0	5,0
K_m , мкМ	Серотонин	45,0	55,0	200,0
	(5—400 мкМ)			
	β -Фенилэтиламин	12,0	15,0	100,0
	(50—400 мкМ)			
Значение I_{50} , нМ (Лилли 51641)	Серотонин	5,0	3,2	9,0
	β -Фенилэтиламин	2,5	3,8	2,8
Значение I_{50} , нМ (депренил)	Серотонин	2500	2500	6300
	β -Фенилэтиламин	4200	2700	1800
pH-оптимум	Серотонин	8,3	8,3	8,3

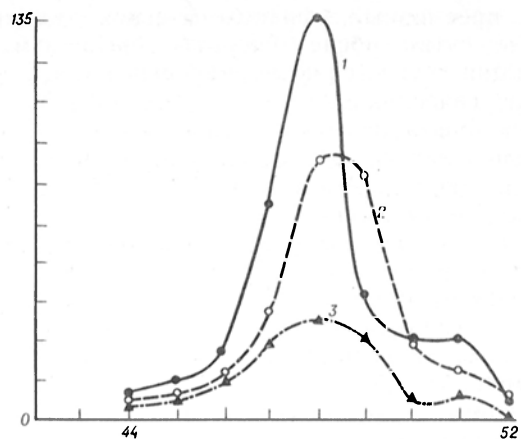


Рис. 1. Электрофореграмма меченных ^3H -паргилином препаратов плаценты человека.

По оси абсцисс — длина пробега (в мм) меченого белка в геле; по оси ординат — число распадов в 1 мин (расп/мин). 1 — митохондрии; 2 — микросомы; 3 — цитозоль.

Обе формы фермента проявляют максимальную активность при pH 8,3, т. е. имеют одинаковый оптимум pH. Обе в одинаковой степени ингибируются избирательными ингибиторами Лилли 51641 и депренилом (см. табл. 1).

Электрофоретический анализ плацентарной MAO в ПААГ в присутствии ДСН показал, что мол. м. субъединиц фермента из митохондрий, микросом и цитозоля примерно одинакова и составляет 62, 61 и 61 кДа соответственно (рис. 1).

Исследование изоферментного состава мембранных и цитоплазматической MAO с помощью избирательных ингибиторов и обнаруженные особенности кривых ингибирования окисления β -фенилэтиламина свидетельствуют о присутствии в плаценте человека двух форм фермента: MAO типа А и, высокочувствительной к депренилу

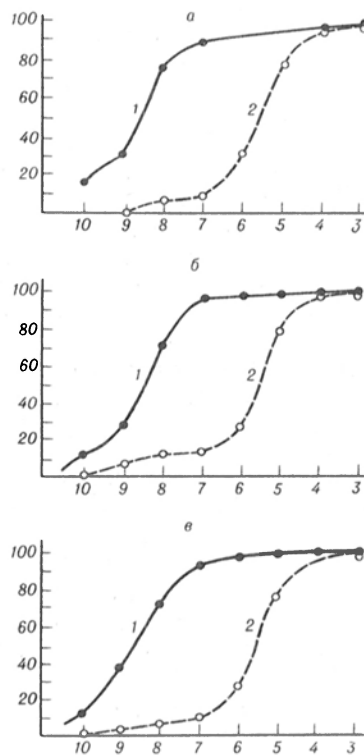


Рис. 2. Ингибирование (в %) окисления β -фенилэтиламина, катализируемого митохондриальной (а), микросомальной (б) и цитоплазматической (в) MAO.

По осям абсцисс — отрицательный логарифм молярной концентрации ингибиторов в пробе; по осям ординат — степень ингибирования (в %). 1 — соединение Лилли 51641; 2 — депренил. Препараты при 37 °С в течение 30 мин.

Агрегация цитоплазматической МАО при хранении

Срок хранения, дни	Количество белка, %		Общая активность, %	
	Р	А	Р	А
0	60	40	36	64
1	45	48	27	73
2	45	46	14	86
3	42	48	8	92

Примечание. Р — надосадочная жидкость после центрифугирования при 250 000 g в течение 60 мин; А — агрегированный белок (в осадке). При исследовании активности в качестве субстрата использовали серотонин.

МАО типа Б, участвующей в окислении β-фенилэтиламина (рис. 2). Судя по расположению плато на кривых ингибирования, вклад МАО типа Б в окисление β-фенилэтиламина во всех субклеточных фракциях примерно одинаков и равен 10 %. Эти результаты полностью подтверждаются и при электрофоретическом исследовании МАО из разных субклеточных фракций. На каждой электрофореграмме, представленной на рис. 1, отчетливо видно плечо в области меньших молекулярных масс, соответствующих мол. м. МАО типа Б. Рассчитанные мол. м. субъединиц МАО типа Б митохондрий, микросом и цитозоля составляют 51, 55 и 55 кДа соответственно. Все полученные данные находятся в хорошем соответствии с данными радиоиммунологического анализа, с помощью которого установлено количественное соотношение МАО типов А и Б в митохондриях плаценты, равное 86 и 14 % соответственно [7]. В связи со значительным преобладанием МАО типа А в исследуемых образцах все кинетические параметры, представленные в табл. 1, по-видимому, характеризуют этот изофермент.

Несмотря на сходство многих параметров мембранно-связанной и растворимой МАО, цитоплазматический фермент имеет свои отличительные особенности. Существенное отличие обнаруживается при исследовании характера взаимодействия МАО с соединением Лилли 51641. По литературным данным [12, 13], соединение Лилли 51641 является необратимым ферментативным ингибитором МАО типа А и, судя по графику Аккермана — Поттера (рис. 3), связывается с МАО митохондрий плаценты действительно необратимо. Цитоплазматическая МАО, ингибируемая соединением Лилли 51641 в том же диапазоне концентраций, что и митохондриальный фермент, взаимодействует с ингибитором только обратимо даже после 3-часовой преинкубации при 37 °С (см. рис. 3).

Другой особенностью цитоплазматической МАО служит довольно низкое по сравнению с мембранно-связанными МАО сродство к субстратам: в 4—5 раз более высокое значение K_m по отношению к серотонину и в 7—8 раз более высокое значение K_m — к β-фенилэтилмину (см. табл. 1). Кроме того, активные центры цитоплазматического фермента насыщаются серотонином при концентрации в 5 раз большей, чем активные цент-

ры митохондриальной МАО. Учитывая зависимость свойств МАО от липидного окружения [11], безусловно, разного в отдельных субклеточных фракциях, эти особенности можно объяснить различными конформационными состояниями фермента в мембране и цитозоле.

При обнаружении такой своеобразной формы фермента, как цитоплазматическая МАО, несомненно, возникает вопрос, является ли фермент истинно растворимым или попадает в цитозоль с обломками мембран. Для решения этой проблемы мы выделили цитоплазматическую фракцию плаценты сначала путем центрифугирования при 125 000 g, а затем с помощью ультрацентрифугирования при 250 000 g, удаляющего из надосадочной жидкости практически все мембранные образования и рибосомы. В процессе такого фракционирования уменьшения активности МАО в надосадочной жидкости не наблюдалось, хотя некоторая часть белка удалялась с осадком. Таким образом, наличие МАО в цитозоле не является следствием загрязнения его мембранами.

Во время хранения выделенной цитоплазматической фракции в замороженном состоянии (при -20 °С) некоторая часть МАО утрачивает растворимость и начинает осаждаться при центрифугировании (табл. 2). Образующийся осадок, очевидно, возникает в результате агрегации фермента. В отличие от мембранной МАО агрегированный фермент не солибилизируется детергентами тритоном X-100 и октилглюкозидом в концентрациях, не снижавших ферментативную активность (около 1 %).

Провоцирует агрегацию фермента также гель-фильтрация цитоплазматической фракции на молекулярных ситах. После гель-фильтрации растворимой фракции плаценты через «Tojoparl

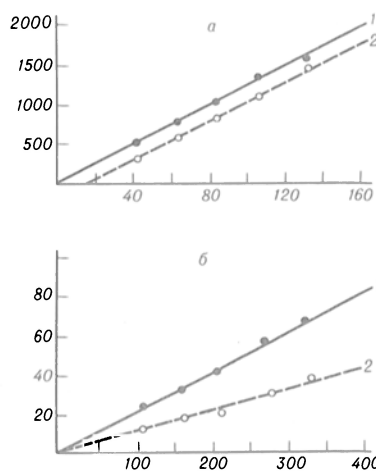


Рис. 3. Характер ингибирования МАО митохондрий (а) и цитозоля (б) соединением Лилли 51641.

По осям абсцисс — концентрация белка в пробе (в мг/мл); по осям ординат — активность МАО (в имп/мин). 1 — в отсутствие ингибитора; 2 — в присутствии $2 \cdot 10^{-5}$ М ингибитора. Преинкубация при 37 °С в течение 180 мин.

Таблица 3

Гель-фильтрация цитоплазматической МАО через «Tojoparl HW-55»

Материал	Объем, мл	Белок, мг/мл	Удельная активность, усл. ед./мг/мин	Выход, %	Очистка
Фракция цитозоля	28	14,2	1 066	100	1
V_0	67	0,19	32 707	90	30
Концентрат	15	0,76	28 425	72	27
Растворимая фракция	12	0,38	11 806	13	11
Осадок	3	2,0	38 762	55	36

Примечание. Активность измеряли с серотонином в качестве субстрата.

НВ-55» (табл. 3) МАО всегда обнаруживается в свободном объеме V_0 . Такое же явление наблюдается и при исследовании цитозольной МАО печени крысы [6]. После сгущения путем ультрафильтрации и последующего центрифугирования при 125 000 g 13 % активности МАО находится в растворе, а 55 % активности обнаруживается в осадке.

Исследование свойств МАО, находящихся в растворе и в осадке, показало, что агрегация фермента практически не оказывает влияния на его каталитические свойства: агрегированная и растворимая МАО имеют одинаковые оптимальные значения pH, равные 8,3, одинаковую чувствительность к избирательному ингибитору Лилли 51641; сохраняется и обратимый характер взаимодействия МАО с этим соединением.

Суммируя полученные результаты, а также данные литературы, можно заключить, что основные каталитические свойства МАО одинаковы во всех субклеточных фракциях плаценты человека. С этим выводом хорошо согласуются результаты иммунологического анализа высокоочищенных препаратов митохондриальной и цитоплазматической МАО мозга крысы [5], который продемонстрировал наличие у них перекрестной реактивности. Выявленные нами различия некоторых каталитических свойств, по-видимому, связаны с особенностями микроокружения, в котором находится фермент в той или иной фракции.

Относительно высокое содержание МАО в цитозоле, вероятно, связано с тем, что быстрорастущие плацентарные клетки способны создавать цитоплазматический пул митохондриальных белков подобно дрожжам. Данное предположение согласуется с современными представлениями о биосинтезе МАО [8]. Полагают, что МАО в клетке синтезируется как вполне зрелый белок, в котором ФАД-связывающий участок расположен на С-концевой стороне молекулы, а N-концевой участок служит как бы целевой сигнальной зоной, определяющей встраивание полной молекулы без какого-либо протеолитического процессинга в митохондриальную мембрану, где, очевидно, создаются наиболее благоприятные условия для функционирования фермента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Киркель А. З. // Вopr. мед. химии.— 1989.— № 1.— С. 11—18.
2. Киркель А. З., Романюк Ю. П., Давыдова Г. А. и др. // Там же.— 1986.— № 2.— С. 118—125.
3. Пеккель В. А., Киркель А. З. // Биохимия.— 1985.— Т. 50, № 2.— С. 289—299.
4. Пеккель В. А., Аксенова Л. Н., Боймурзаев М. И. // Лаб. дело.— 1987.— № 7.— С. 491—496.
5. Azam M., Baquer N. Z. // Neurochem. int.— 1989.— Vol. 14, N 3.— P. 321—326.
6. Copeland E. S., Campbell I. C., Murphy D. L. // Biochim. biophys. Acta.— 1983.— Vol. 743.— P. 186—194.
7. Denney R. M., Riley L. // Pharmacol. Res. Commun.— 1988.— Vol. 20, Suppl. 4.— P. 1—5.
8. Ito A., Kuwahara T., Inadome S., Sagara Y. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1988.— Vol. 157, N 3.— P. 970—976.
9. Kuzuya H., Murata K., Hashimoto S., Ikeno T. // Monoamine Oxidase: Basic and Clinical Frontiers / Ed. K. Kamijo et al.— Amsterdam, 1982.— P. 289—300.
10. Laemmli U. K. // Nature.— 1970.— Vol. 227.— P. 680—685.
11. Sagara Y., Ito A. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1982.— Vol. 109.— P. 1102—1107.

12. Singer T. P. // Monoamine Oxidase: Structure, Function and Altered Functions / Ed. T. P. Singer et al.— New York, 1979.— P. 7—24.
13. Singer T. P. // J. neural Transmiss.— 1987.— Vol. 23.— P. 1—23.
14. Tipton K. F., Housley M. D., Mantle T. J. // Monoamine Oxidase and its Inhibition.— Amsterdam, 1976.— P. 5—16.
15. Wibo M., Duong A. T., Godfraind T. // Europ. J. Biochem.— 1980.— Vol. 112.— P. 87—94.
16. Yoshino M., Obata T., Sho S., Kinemuchi H. // Jap. J. Pharmacol.— 1984.— Vol. 67.— P. 105—115.

Поступила 12.10.90

PROPERTIES OF MEMBRANE-BOUND AND CYTOPLASMIC MONOAMINE OXIDASE FROM HUMAN PLACENTA

A. Z. Kirkel, L. A. Tischenko, L. N. Axenova, V. A. Pekkel, V. Z. Gorkin

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

Catalytic and physico-chemical properties of human placental monoamine oxidases (MAO) were studied. Both forms of the enzyme, membrane-bound and soluble, exhibited similar properties: optimal activity at pH 8.3, equal rate of inhibition with selective MAO inhibitors, identical substrate specificity (the best substrate — serotonin). Some specific differences were found only for cytoplasmic (soluble) MAO: lower affinity for substrates as compared with membrane-bound enzymes, reversible interaction with an inhibitor Lilly 51641 even after long-term preincubation, whereas the mitochondrial MAO bound Lilly 51641 irreversibly. The property of cytoplasmic MAO to form aggregates during storage and/or in gel filtration and concentration did not affect the main catalytic properties of soluble enzyme. Analysis of isoenzyme spectra of membrane-bound and cytoplasmic MAO by means of selective inhibitors and electrophoresis showed that MAO of the two types — A and B were detected in all the subcellular fractions studied. Subunits of MAO of the A type had molecular masses 62, 61 and 61 kDa and of MAO of the B type — 51, 55 and 55 kDa in mitochondria, microsomes and cytosol, respectively.

© Н. Н. ВОЙТЕНКО, Н. К. ПОПОВА, 1991

УДК 612.822.1.015.1:577.152.14]:612.67

Н. Н. Войтенко, Н. К. Попова

МОНОАМИНОКСИДАЗЫ МОЗГА ПРИ СТАРЕНИИ

Институт цитологии и генетики Сибирского отделения АН СССР, Новосибирск

Дегенерация нейронов головного мозга является необратимым следствием старения [8, 12]. В процессе дегенерации дофаминовых нейронов существенную роль отводят моноаминоксидазе (МАО) [амин: кислород оксидоредуктаза (дезаминирующая) (содержащая флавин)] типа Б [5], поскольку предполагается существование еще неидентифицированного эндогенного соединения — субстрата МАО-Б, продукт окисления которого разрушает дофаминовые нейроны [20]. Дегенерацию дофаминовых нейронов головного мозга у старых особей [12] связывают с повышающейся активностью МАО-Б [1]. Молекулярные механизмы, лежащие в основе повышенной активности МАО-Б при старении, изучены мало. Имеются данные о том, что с возрастом увеличивается количество молекул фермента без изменения его сродства к субстрату [13]. Предполагают, что это может происходить в результате увеличения числа глиальных клеток, сопровождающегося дегенерацией нейронов [5]. Существуют ли эндогенные факторы, способные по-

Таблица 1

Влияние актиномицина D на активность МАО-Б (в нмоль аммиака на 1 мг белка в 1 мин) ствола и полушарий головного мозга молодых и старых крыс, подвергавшихся эмоциональному стрессу

Серия опытов	Молодые крысы	Старые крысы
Полушария		
Контроль (интактные)	1,92±0,23 (6)	2,86±0,23** (7)
Стресс	1,20±0,19* (7)	1,45±0,13* (7)
Актиномицин D	1,42±0,24 (7)	1,57±0,18* (4)
Актиномицин D+стресс	1,22±0,11 (7)	1,12±0,16 (4)
Ствол		
Контроль (интактные)	1,61±0,14 (6)	2,49±0,12** (5)
Стресс	0,92±0,18* (6)	1,52±0,06* (7)
Актиномицин D	1,43±0,27 (4)	1,90±0,40 (4)
Актиномицин D+стресс	1,37±0,16 (4)	1,54±0,20 (4)

Примечание: Здесь и в табл. 2: одна звездочка — достоверность различий ($p < 0,05$) по сравнению с интактными крысами; две звездочки — по сравнению с молодыми; в скобках — число животных.

Таблица 2

Влияние актиномицина D на активность МАО-А (в нмоль аммиака на 1 мг белка в 1 мин) ствола и полушарий головного мозга молодых и старых крыс, подвергавшихся эмоциональному стрессу

Серия опытов	Молодые крысы	Старые крысы
Полушария		
Контроль (интактные)	1,91±0,26 (6)	1,94±0,22 (7)
Стресс	2,94±0,20* (6)	3,05±0,24* (7)
Актиномицин D	2,83±0,16* (7)	2,15±0,25 (4)
Актиномицин D+стресс	2,59±0,19 (7)	1,86±0,20 (4)
Ствол		
Контроль (интактные)	3,32±0,16 (5)	2,72±0,10** (6)
Стресс	4,44±0,20* (6)	4,05±0,32* (6)
Актиномицин D	3,38±0,30 (4)	3,42±0,82 (4)
Актиномицин D+стресс	3,15±0,14 (4)	3,85±0,33 (4)

ность МАО-А и МАО-Б ствола и полушарий головного мозга (см. табл. 1 и 2).

Внутрибрюшинное введение ДСИП в дозе 120 мкг на 100 г массы у молодых крыс в стволе и полушариях головного мозга вызывало повышение активности МАО-А и понижение активности МАО-Б (рис. 1), как и в предыдущих исследованиях [6]. У старых крыс реакция МАО-А и МАО-Б на ДСИП различалась (рис. 2). Под влиянием ДСИП у старых крыс, как и у молодых, наблюдалось снижение активности МАО-Б, но активность МАО-А при этом существенно не изменялась ни в стволе, ни в полушариях головного мозга (см. рис. 1 и 2).

Отмеченное повышение активности МАО-Б мозга старых крыс (см. табл. 2) соответствует данным других исследователей [7, 14, 16].

низить активность МАО-Б у старых особей, остается неясным, хотя известно, что у животных, не достигших старческого возраста, активность МАО-Б понижает пептид дельта-сна [6], уровень которого в мозгу при стрессе резко возрастает [11]. Имеющиеся сведения об активности МАО-А у старых особей неоднородны и часто противоречивы [1, 2]. У старых крыс показано как понижение [4, 20] активности МАО-А в разных отделах головного мозга, так и ее повышение [7, 20, 21].

Цель настоящего исследования заключалась в сравнительном изучении активности МАО-А и МАО-Б мозга старых и молодых крыс линии Вистар, влияния на активность МАО мозга этих крыс эмоционального стресса, актиномицина D и пептида дельта-сна.

Методика. Работа выполнена на крысах-самцах линии Вистар. Группу молодых животных составляли крысы в возрасте 4 мес, группу старых — 19 мес. Животных содержали при свободном доступе к воде и корму. За 2 дня до эксперимента крыс помещали в индивидуальные клетки для снятия группового влияния содержания на активность МАО мозга и на поведение. Световой режим соответствовал сезону (январь). Эмоциональный стресс вызывали содержанием крыс в тесных проволочных клетках в течение 60 мин. Контролем служили крысы, находившиеся в это время в своих домашних клетках. Актиномицин D («Fluka», ФРГ) в дозе 10 мкг на 100 г массы [15] вводили крысам интраперитонеально за 60 мин до помещения крыс в тесную клетку. Контролем служили крысы, получавшие актиномицин D без последующего ограничения подвижности. В следующей серии опытов дельта-сон индуцирующий пептид (ДСИП) вводили (синтезирован в Институте биоорганической химии им. М. М. Шемякина и любезно предоставлен И. И. Михалевой) в дозе 120 мкг на 100 г массы [9] за 60 мин до декапитации. Контрольным крысам вводили интраперитонеально физиологический раствор. Крыс декапитировали, мозг выделяли на холоду. Неразделенную фракцию митохондрий P₂ получали путем дифференциального центрифугирования гомогената ткани мозга в 0,32 М сахарозе. Активность МАО определяли по [3]. В качестве субстрата МАО-А применяли 1 мМ серотонина креатин-сульфат («Reanal», Венгрия), в качестве субстрата МАО-Б — 1 мМ бензиламин солянокислый (Харьковский химико-фармацевтический завод). Активность МАО выражали в наномолях освобожденного аммиака на 1 мг белка в 1 мин. Белок определяли по Лоури.

Результаты и обсуждение. Полученные данные свидетельствуют о том, что у старых крыс в возрасте 19 мес активность МАО-Б в стволе и полушариях головного мозга существенно выше, чем у молодых крыс в возрасте 4 мес (табл. 1). Активность МАО-А умеренно понижалась в стволе головного мозга старых крыс и не изменялась в полушариях (табл. 2). Обнаружено неодинаковое влияние актиномицина D, ингибирующего ДНК-зависимый синтез РНК, на активность МАО-А и МАО-Б старых и молодых крыс. Эти различия были более выражены в полушариях головного мозга. Так, актиномицин D достоверно повышал активность МАО-А в полушариях молодых крыс (см. табл. 2), в то же время под влиянием актиномицина D в полушариях старых крыс понижалась активность МАО-Б (см. табл. 1).

Эмоциональный стресс у старых, как и у молодых крыс (что наблюдалось нами ранее [10]), вызывал сходные изменения активности обоих типов МАО — повышение активности МАО-А и понижение активности МАО-Б в стволе и полушариях головного мозга. Как у старых, так и у молодых крыс на фоне актиномицина D не было обнаружено заметного действия стресса на актив-

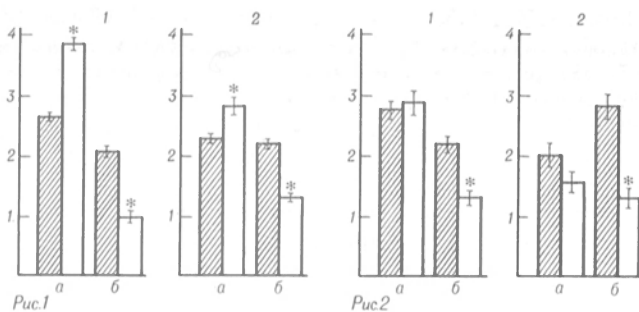


Рис. 1. Влияние ДСИП на активность MAO-A (a) и MAO-B (б) ствола (1) и полушарий (2) головного мозга молодых крыс линии Вистар.

Здесь и на рис. 2: по осям ординат — активность MAO-A и MAO-B (в нмоль аммиака на 1 мг белка в 1 мин). Заштрихованные столбики — физиологический раствор; незаштрихованные столбики — ДСИП. Звездочка — $p < 0.05$ по сравнению с физиологическим раствором.

Рис. 2. Влияние ДСИП на активность MAO-A (a) и MAO-B (б) ствола (1) и полушарий (2) головного мозга старых крыс линии Вистар.

Причина такого повышения активности MAO-B у старых особей может заключаться не только в повышении количества фермента вследствие увеличения числа глиальных клеток, содержащих MAO-B, как полагали ранее [13, 14, 19], но и в изменении молекулярных механизмов, регулирующих активность MAO-B мозга.

Полученные нами данные позволяют предположить, что у старых крыс в отличие от молодых повышена экспрессия гена, кодирующего MAO-B, поскольку под влиянием актиномицина D только у интактных, не подвергавшихся эмоциональному стрессу старых крыс понижалась активность MAO-B в полушариях головного мозга (см. табл. 1).

Кроме того, понижение активности MAO-B в стволе и полушариях головного мозга под влиянием стресса у старых крыс так же, как и у молодых (см. табл. 1), свидетельствует о том, что понизить активность MAO-B у старых крыс до уровня молодых может стресс. Вместе с тем полученные нами данные наводят на мысль о том, что у старых и молодых крыс существует определенный пороговый, базальный уровень активности MAO-B, на который не влияет ни актиномицин D, ни стресс, а у старых крыс в отличие от молодых существует еще и индуцибельная MAO-B, синтез которой подавляется актиномицином D и стрессом. Причем действие стресса и актиномицина D, по всей видимости, направлено на одно и то же звено в цепи регуляции активности MAO-B, поскольку аддитивный эффект этих двух факторов отсутствует (см. табл. 1).

Не исключено, что изучавшиеся нами старые крысы испытывают недостаток ДСИП, который ингибирует у них (см. рис. 2), как и у других животных [6], активность MAO-B. Молекулярные механизмы действия ДСИП на активность MAO пока неизвестны, можно предположить лишь, что ДСИП модифицирует регуляторные факторы, такие, как репрессоры и активаторы [17, 18] (см. рис. 2).

Найденное нами существенное понижение активности MAO-A в стволе мозга старых крыс соответствует литературным данным [4, 20]. Причину понижения активности MAO-A при старении ви-

дели в снижении количества фермента вследствие дегенерации нейронов, содержащих MAO-A [1]. Но причина эта, по-видимому, не единственная и включает в себя изменения в молекулярных механизмах регуляции активности MAO-A.

К факторам, понижающим активность MAO-A у старых крыс, следует, вероятно, отнести обратимую качественную модификацию MAO-A (трансформацию), которая стимулируется у старых особей повышенным перекислением липидов в биомембранах [4]. Устойчивость MAO-A у старых крыс к действию ДСИП следует, вероятно, также связывать с трансформацией MAO-A у этих животных (см. табл. 2).

Повышение активности MAO-A в стволе и полушариях головного мозга у старых крыс до уровня ее у молодых под влиянием стресса (см. табл. 2) свидетельствует о том, что ген MAO-A может функционировать в разном режиме. Предотвращение актиномицином D действия стресса на MAO-A связано, по всей видимости, с подавлением синтеза м-РНК — регуляторного белка-активатора.

Необходимо отметить, что только у молодых крыс под влиянием актиномицина D в полушариях мозга повышалась активность MAO-A (см. табл. 2). Следовательно, актиномицин D у молодых крыс подавлял синтез м-РНК, которая ингибирует проявление активности MAO-A. Эти данные позволяют заключить, что у молодых крыс существует еще и пептид или белок, ингибирующий активность MAO-A. У старых крыс в отличие от молодых актиномицин D не оказывал активирующего действия на MAO-A, и связано это, вероятно, также с измененной чувствительностью трансформированной MAO-A старых крыс к регуляторному пептиду или белку.

Таким образом, проведенные нами исследования показали, что изменение активности MAO-A и MAO-B мозга у крыс при старении связаны еще и с изменением молекулярных механизмов регуляции активности MAO мозга, а эмоциональный стресс, вероятно, может компенсировать измененную при старении активность MAO мозга.

ЛИТЕРАТУРА

- Бурчинский С. Г., Кузнецова С. М. // *Вопр. мед. химии*.— 1982.— № 4.— С. 2—9.
- Воскресенский О. Н., Журавев А. И., Бобырев В. И., Безуглый Ю. В. // *Там же*.— № 1.— С. 14—27.
- Горкин В. З. и др. // *Современные методы в биохимии*.— М., 1968.— Т. 2.— С. 155—177.
- Горкин В. З. Молекулярные и клеточные механизмы старения.— Киев, 1981.— С. 51—52.
- Горкин В. З. // *Пат. физиол.*— 1988.— № 2.— С. 89—93.
- Доведова Е. Л., Попова Н. С., Качалова Л. М. // *Нейрохимия*.— 1983.— Т. 2, № 2.— С. 138—147.
- Жубрикова Л. А. // *Актуальные проблемы возрастной физиологии, биохимии и биофизики*.— Киев, 1979.— С. 160—171.
- Канунго М. // *Биохимия старения*.— М., 1982.— С. 272.
- Кричевская А. А., Бондаренко Т. И., Грищенко Е. С. // *Всесоюзная конф. по биохимии нервной системы*, 10-я.— Горький, 1987.— С. 78—79.
- Попова Н. К., Войтенко Н. И., Маслова Л. Н. // *Вопр. мед. химии*.— 1989.— № 4.— С. 114—119.
- Рожанец В. В., Юханов Р. Ю., Чижевская М. А., Наволоцкая Е. В. // *Нейрохимия*.— 1983.— Т. 2, № 4.— С. 353—363.
- Фролькис В. В. // *Биология старения*.— Л., 1982.— С. 5—23.
- Arai Y., Kinemuchi A. // *J. neural Transmiss.*— 1988.— Vol. 72, N 2.— P. 99—105.

14. Fowler C. J., Wiherg A., Oreland L. et al. // *Ibid.*— 1980.— Vol. 49.— P. 1—20.
15. Gandhi B., Kanungo M. S. // *Indian J. Biochem. Biophys.*— 1974.— Vol. 11.— P. 102—104.
16. Hung Cao Danh, Strolin-Benedetti M., Dostert Ph., Moussel A. // *J. Pharm. Pharmacol.*— 1984.— Vol. 36.— P. 592—596.
17. Ivanov V., Stein B., Baumann I. et al. // *Mol. Cell Biol.*— 1988.— Vol. 9, N 11.— P. 4677—4686.
18. Haruo Kitado, Hung Fan // *J. Virol.*— 1989.— Vol. 63, N 7.— P. 3072—3079.
19. Oreland L., Gottlieb C.-G. // *Progr. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiat.*— 1986.— Vol. 10.— P. 533—540.
20. Singer Th., Castagnoli N. Jr., Ramsay R. R. // *J. Neurochem.*— 1987.— Vol. 49.— P. 1—8.
21. Strolin-Benedetti M., Veane P. E. // *Ibid.*— 1980.— Vol. 35.— P. 1026—1032.

Поступила 21.12.89

BRAIN MONOAMINE OXIDASE IN OLD RATS

N. N. Voitenko, N. K. Popova

Laboratory of Behavioral Phenogenetics, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk

MAO activities were studied in 4 months old and 19 months old Wistar rats. MAO-B activity was higher in brain stem and hemispheres of old rats as compared with that of young animals. MAO-A activity was lowered only in the stem and was not changed in the hemispheres of old rats. Actinomycin D increased MAO-A activity in the brain stem of young rats and lowered MAO-B activity in the hemispheres of old rats. Emotional stress increased MAO-A activity in the stem and hemispheres of both young and old animals. Actinomycin D abolished the stress effect on these two forms of MAO both young and old rats. Delta-sleep including peptide at the dose of 120 µg/100 g increased MAO-A activity and lowered MAO-B activity in young animals but did not affect the MAO-A activity in old rats.

© Е. М. ХВАТОВА, Т. С. СЕМЕНОВА, 1991

УДК 616.831-008.931:577.152.353]-02:615.31:547.963.3

Е. М. Хватова, Т. С. Семенова

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ КРЕАТИНКИНАЗЫ МОЗГА ПИРИДИНОВЫМИ НУКЛЕОТИДАМИ

Кафедра биохимии Нижегородского медицинского института

Главное патогенетическое звено в развитии сосудистых заболеваний мозга — ишемические нарушения тканевого энергообмена. Из комплекса метаболических расстройств при возникновении кислороддефицитного состояния выделяют выраженную активацию гликолитических процессов [10, 14, 19]. Повышенная утилизация глюкозы сопровождается ростом концентрации пирувата и восстановленных эквивалентов в виде цитоплазматического НАД·Н [18, 19]. В целом увеличение восстановленности ткани мозга при гипоксии изменяет соотношение окисленных и восстановленных форм пиридиннуклеотидов, которые, как полагают [19], имеют преимущество в регуляции метаболизма над адениловыми нуклеотидами. Важная роль пиридиннуклеотидов в интеграции клеточного обмена ставит вопрос об их участии в регуляции одного из ключевых ферментов энергообмена — креатинфосфокиназы.

Креатинфосфокиназа в цитоплазме клеток головного мозга представлена изоферментом мозгового типа. Являясь специфичным для нервной

ткани, ВВ изофермент составляет более 55—60 % от общей клеточной креатинкиназной активности [7, 13]. Столь значительное содержание ВВ изофермента определяет его важнейшую для нервной ткани роль — участие в энергообеспечении процессов активного транспорта ионов [16] и сохранение постоянства АТФ в клетке.

Цитоплазматическую форму креатинкиназы сердечной и скелетной мышц чаще всего связывают с регуляцией гликолитической энергопродукции [3, 17]. В мозговой ткани взаимосвязь между активностью гликолиза и цитоплазматической креатинкиназой менее выражена [5], что согласуется с известной для этой ткани независимостью процессов гликолиза и окислительного фосфорилирования.

Участие пиридиннуклеотидов в регуляции активности цитоплазматической креатинкиназы мало изучено. Единичные сведения указывают на то, что влияние НАД·Н на активность креатинкиназы в разных тканях различно. В сердечной мышце черепахи, имеющей развитую систему гликолиза, НАД·Н активирует цитоплазматическую креатинкиназу [20]. В скелетной мышце, напротив, НАД·Н угнетает фермент [9]. Имеются сведения о том, что НАД·Н вовсе не оказывает влияния на цитоплазматическую креатинкиназу сердца [8]. Сведения о регуляции креатинкиназы окисленной формой пиридиннуклеотида касаются лишь изофермента мышечного типа: показано 50 % ингибирование ММ формы креатинкиназы в присутствии 4 мМ НАД [9]. Данных о влиянии пиридиннуклеотидов на креатинфосфокиназу мозгового типа мы не встретили.

В задачу настоящего исследования входило изучение действия окисленных и восстановленных форм НАД на активность ВВ креатинкиназы в цитозоле головного мозга.

Методика. Активность ВВ креатинкиназы исследовали в цитоплазматической фракции головного мозга крыс, выделенной и очищенной методом дифференциального центрифугирования [4]. Контроль на чистоту цитоплазматической фракции, содержащей ВВ изофермент, проводили методом электрофореза на ацетатцеллюлозной пленке [7]. Активность креатинкиназы определяли по защелачиванию среды в процессе синтеза АТФ и креатинфосфата, которое регистрировали с помощью иономера ЭВ-74, связанного с автоматическим потенциометром-4 [1]. Начальную скорость реакции изучали при оптимальных концентрациях субстрата (фосфокреатина и Mg АДФ) в присутствии эффекторов (НАД и НАД·Н) и без них. Активность креатинкиназы выражали в микрограмм-эквивалентах Н⁺ на 1 мг белка в 1 мин.

Результаты и обсуждение. С целью изучения влияния окисленного НАД на активность цитоплазматической креатинкиназы мозга исследовали активность фермента в условиях оптимального насыщения субстратами (2 мМ Mg АДФ и 10 мМ ФК) до и после инкубации фермента с НАД.

На рис. 1, а видно, что добавление НАД в концентрациях от 1 до 4 мМ не приводит к видимым изменениям скорости реакции, наблюдаемой без эффекторов. Другими словами, для ВВ изофермента креатинкиназы мозга характерна низкая чувствительность к изменению содержания окисленного пиридиннуклеотида.

Влияние восстановленной формы НАД на активность цитоплазматической креатинкиназы мозга показано на рис. 1. Добавление в инкубационную среду минимальной концентрации НАД·Н

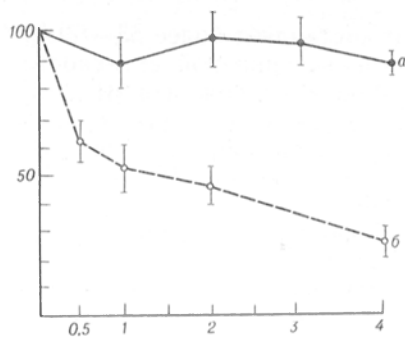


Рис. 1. Влияние окисленного (а) и восстановленного (б) НАД на активность ВВ креатинкиназы мозга. Концентрации субстратов насыщающие. За 100 % принята активность фермента без эффектора. По оси абсцисс — концентрация НАД (в мМ); по оси ординат — активность фермента (в %).

(0,5 мМ) приводит к снижению начальной скорости реакции на 38 % от исходной активности фермента, определяемой без эффекторов. С ростом содержания НАД·Н в пробе ингибирующий эффект возрастает: НАД·Н в концентрации 1 мМ вызывает угнетение креатинкиназной реакции на 50 %, при концентрации НАД·Н 4 мМ скорость реакции составляет лишь 26 % от исходной величины.

Способность НАД·Н ингибировать цитоплазматическую креатинкиназу мозга позволяет рассматривать его действие как отрицательное влияние на скорость креатинкиназной реакции.

Зависимость начальной скорости реакции от содержания креатинфосфата в присутствии фиксированных концентраций НАД·Н показана на рис. 2. Представление экспериментальных данных в двойных обратных величинах при различных концентрациях ингибитора дает семейство кривых, пересекающихся в одной точке ($-1/K_m$), что позволяет сделать вывод о неконкурентном механизме ингибирования цитоплазматической креатинкиназы мозга восстановленным пиридиннуклеотидом. Снижая каталитическую эффективность цитоплазматической креатинкиназы, НАД·Н не оказывает влияния на связывание фермента с субстратом.

Для установления кажущейся константы ингибирования (K_i) на основе данных графика

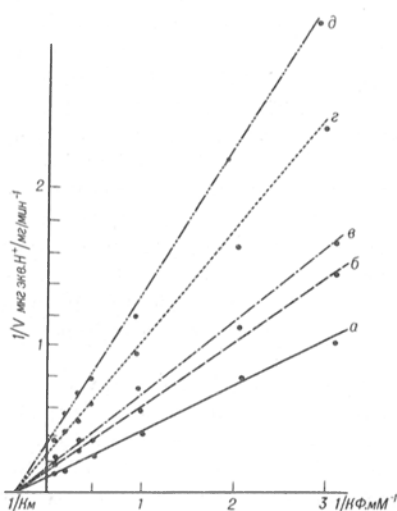


Рис. 2. Зависимость начальной скорости креатинкиназной реакции от концентрации креатинфосфата (КФ) в двойных обратных координатах в отсутствие эффектора (а) и в присутствии НАД·Н в концентрации 0,5 мМ (б), 1 мМ (в), 2 мМ (г) и 4 мМ (д).

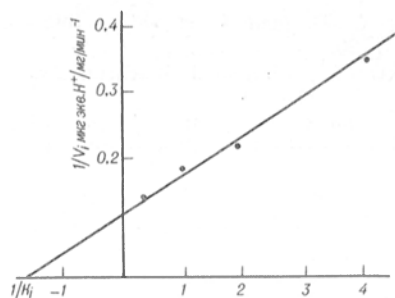


Рис. 3. График зависимости $1/V_i$ от концентрации НАД·Н.

(см. рис. 2) строили вторичный график зависимости $1/V_i$ от $1/\text{НАД} \cdot \text{Н}$ (рис. 3). При этом была получена прямая линия, пересекающая ось абсцисс в точке, соответствующей значению $-1/K_i$. Рассчитанная из данных графика кажущаяся K_i цитоплазматического изофермента креатинкиназы мозга крыс восстановленными пиридиннуклеотидами равна 1,5 мМ. Эта величина K_i для креатинкиназы из головного мозга составляет половину от известной величины K_i для цитоплазматического изофермента из скелетной мышцы [9], что свидетельствует о более высокой чувствительности ВВ изофермента к изменению содержания НАД·Н в клетке.

Можно предположить, что значение НАД·Н в регуляции цитоплазматического изофермента мозга еще более возрастает в условиях кислородного голодания, поскольку известно, что гипоксия характеризуется приростом концентрации гликолитических интермедиатов и сдвигом в сторону наличия НАД·Н [12]. При гипоксии в цитоплазме мозга снижается содержание окисленного НАД на 25 % и увеличивается образование восстановленных форм НАД на 57 % [15].

Участие восстановленного НАД в регуляции ВВ изофермента мозга, с одной стороны, и полная независимость активности фермента от окисленной формы НАД — с другой, позволяют считать, что одним из возможных механизмов регуляции ВВ креатинкиназы в цитозоле головного мозга является влияние изменяющейся концентрации восстановленных пиридиннуклеотидов. Участие протонов в качестве модификаторов фермента, вызывающих неконкурентное торможение, маловероятно. Для цитоплазматической формы креатинкиназы показана обратная зависимость в изменении активности фермента при подкислении среды, увеличивающей степень диссоциации молекул креатинкиназы с образованием более активных ди- и мономерных единиц [2].

Таким образом, зависимость активности ВВ изофермента креатинкиназы головного мозга от степени восстановленности пиридиннуклеотидов может указывать на наличие функциональной связи его с гликолитическими системами и возможностью его регуляции в условиях патологии, связанной с накоплением в ткани восстановительных эквивалентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белоусов Л. В., Ростовцев А. П., Москвитина Е. Л. // Биохимия и биофизика мышц. — М., 1983. — С. 129—141.
2. Липская Т. Ю., Кедишвили Н. Ю., Каленова М. Е. // Биохимия. — 1985. — Т. 50, № 10. — С. 1571—1581.
3. Лызлова С. Н., Стефанов В. Е., Таае Н. Метаболизм миокарда. — М., 1981. — С. 107—116.

4. Методы биохимических исследований / Под ред. М. И. Прохоровой.— Л., 1982.— С. 29—33.
5. Розанова И. А., Четверикова Е. П. // Биохимия.— 1975.— Т. 40, № 6.— С. 1299—1304.
6. Теленева В. М., Мештер Р. // Там же.— 1969.— Т. 34, № 2.— С. 160—162.
7. Хватова Е. М., Семенова Т. С., Савельева С. И. // Нейрохимия.— 1985.— Т. 4, № 3.— С. 343—344.
8. Чаговец Н. Р. // Докл. АН СССР.— 1972.— Т. 207.— С. 739—741.
9. Четверикова Е. П., Розанова И. А. // Там же.— 1976.— Т. 231, № 5.— С. 1263—1266.
10. Benzix G., Arrigoni E., Dadgani F., Pastoris O. // J. appl. Physiol.— 1978.— Vol. 45, N 2.— P. 312—319.
11. Bergmeyer H. U. // Methoden der enzymatischen Analyse.— Berlin, 1970.— Bd 3.— S. 2196.
12. Bicker P. E. // J. appl. Physiol.— 1988.— Vol. 65, N 1.— P. 428—433.
13. Brownlow E. K., Gammack D. D. // Biochem. J.— 1967.— Vol. 103, N 2.— P. 47—48.
14. Cohen P. J. // Anesthesiology.— 1972.— Vol. 37, N 2.— P. 148—171.
15. Eörs D., Chance B., Kovach A. // Kiserl. Orvostud.— 1979.— Vol. 31, N 2.— P. 123—129.
16. Friedhoff A. J., Lerner M. H. // Life Sci.— 1977.— Vol. 20.— P. 867—879.
17. Kemp R. Q. // J. biol. Chem.— 1973.— Vol. 248.— P. 3963—3967.
18. Norberg K., Siesjö B. // J. Neurochem.— 1974.— Vol. 22.— P. 1127—1129.
19. Siesjö B. K. Brain Energy Metabolism.— New York, 1978.— P. 607.
20. Storey K. B. // J. Biochem.— 1975.— Vol. 6.— P. 53—59.

Поступила 16.07.90

REGULATION OF BRAIN CYTOPLASMIC CREATINE KINASE ACTIVITY BY MEANS OF PYRIDINE NUCLEOTIDES

E. M. Khvatova, T. S. Semenova

Chair of Biochemistry, Medical School, Nizhny-Novgorod

Effect of oxidized and reduced forms of pyridine nucleotides on activity of creatine kinase BB was studied in rat brain. NAD did not affect the enzymatic activity at concentrations of 1.0-4.0 mM, while in presence of NADH activity of creatine kinase BB was gradually decreased as the coenzyme concentration increased. The plot of $1/V$ against $1/S$ at various NADH concentrations produced a series of lines intersecting at one point ($-1/K_m$), thus indicating the noncompetitive type of brain cytoplasmic creatine kinase inhibition by reduced pyridine nucleotides. Apparent K_i value for NADH was about 1.5 mM which was lower than the known parameter for cytoplasmic creatine kinase isozymes from skeletal and heart muscles. Dependence of brain creatine kinase BB on the rate of pyridine nucleotide reduction suggested a possible mechanism for the enzyme regulation under hypoxic conditions.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616.89-008.441.13-092.9-07: [616.831-008.931:577.152.34]

О. А. Гомазков, А. Д. Панфилов, А. П. Ростовцев, Н. В. Комиссарова, В. В. Фомин, О. О. Григорьянц

РЕГИОНАРНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭНКЕФАЛИН- И АНГИОТЕНЗИН II-ОБРАЗУЮЩИХ ПЕПТИДАЗ МОЗГА И ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ У КРЫС С РАЗЛИЧНЫМ ВЛЕЧЕНИЕМ К ЭТАНОЛУ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Участие регуляторных пептидов в реакциях организма, вызванных потреблением этанола, исследуется довольно подробно. Разнообразие проблем,

сопряженных с физиологическим действием этанола, неизбежно связывается с универсальностью регуляторной роли пептидов. В первую очередь внимание может быть обращено к опиоидным пептидам. В большой серии работ выявлены изменения уровня β -эндорфина в крови, гипофизе и отделах мозга при хроническом или однократном, добровольном или принудительном, потреблении этанола [11, 14, 16, 17, 21]. Длительное потребление этанола приводило к изменению содержания другой группы опиоидных пептидов — энкефалинов — в некоторых отделах мозга и базальных ганглиях [1, 4, 10, 25]. В аналогичных исследованиях были также обнаружены изменения активности ферментов, регулирующих метаболизм этих пептидов, — энкефалин-конвертазы и энкефалиназы А [2, 3].

Наши предыдущие работы выявили определенную сопряженность энкефалиновой и ангиотензиновой пептидных систем в регуляции некоторых форм поведения животных [6], а также при адаптации к стрессорному воздействию [5]. Очевидно, есть немало оснований подробнее рассмотреть роль ангиотензина II и соответственно всей ренин-ангиотензиновой системы в комплексе ситуаций, сопровождающих потребление этанола. Нужно иметь в виду, что этот пептид имеет существенное значение для поддержания артериального давления крови, а также в регуляции питьевого поведения, почечного кровотока и диуреза. Экспериментальные и эпидемиологические исследования выявили определенную связь между хроническим потреблением алкоголя и развитием гипертензивного состояния [13, 27]. Активность ангиотензин-превращающего фермента (АПФ), а также содержание иммунореактивного ангиотензина II в крови повышены у особей, длительно принимавших алкоголь [22, 28]. Были предприняты попытки использования ангиотензина II или ингибиторов АПФ как средств снижения алкогольного влечения [19, 26].

Задачей настоящей работы явились определение сопряженности физиологических ответов и активности энкефалин- и ангиотензин II-образующих пептидаз при длительном потреблении этанола у животных с разной степенью алкогольного влечения, а также оценка биохимической predisposition к алкогольному влечению, связанной с изменениями активности этих ферментов в регионах мозга и периферических тканях крыс.

Методика. Опыты проведены на 40 крысах-самцах линии Вистар, подвергнутых индивидуальным исследованиям в хроническом эксперименте. У животных, рассаживаемых в отдельные клетки, после двухнедельного исходного периода вода в поилках была заменена 20 % водным раствором этанола. При этом были учтены технические замечания [4], связанные с использованием поилок и измерением количества потребляемой крысами жидкости. Длительность периода «вынужденно свободного» потребления этанола, условно обозначенного как «нагрузка», составила 40 дней, после чего в клетки была установлена вторая поилка, с водой. На этом этапе, обозначенном как режим «выбор», животные получали возможность потребления этанола и (или) воды. Длительность эксперимента в режиме «выбора» составила 2 нед, после чего крыс забивали, мозг, гипофиз, сыворотку крови и периферические ткани брали для биохимического исследования. Контрольные крысы, находившиеся в аналогичных условиях, получали воду в течение всего срока эксперимента.

В течение 68 сут у каждой крысы регулярно определяли следующие показатели: массу тела животного, количество потребленной жидкости (воды, этанола или того и другого),

порог электроболевой чувствительности при постепенном увеличении силы тока на решетке пола. В биохимических исследованиях в зонах мозга и гипофизе, выделенных согласно [18], а также в надпочечниках определяли активность энкефалин-образующей карбоксипептидазы II (КП-II; КФ 3.4.17.10) и КП-I-B по методу [15], используя в качестве субстрата DNS-Phe-Ala-Arg («Calbiochem», США). В тех же тканях, а также в легких, почках и сыворотке крови определяли активность АПФ (КФ 3.4.15.1) по методу [24], используя в качестве субстрата Hip-His-Leu («Serva», ФРГ).

Опыты проводили в течение января—марта с периодичностью освещения в помещении 8 ч (свет) плюс 16 ч (темнота) в сутки. Животные получали в свободном доступе стандартный брикетный корм.

Результаты исследований обработаны статистически с использованием критерия *t* Стьюдента и критерия *R* Уилкоксона.

Результаты и обсуждение. В соответствии с конечным результатом исследования («выбор») животные могли быть разделены на предпочитавших только воду (ПВ), предпочитавших преимущественно этанол (ПЭ) и смешанную группу. Средние данные суточного потребления жидкости на 1 кг массы тела составили у ПВ $27,4 \pm 1,6$ мл воды и 0 этанола ($n=19$, 47,5 % от всей группы), у ПЭ $10,8 \pm 0,8$ мл воды и $16,1 \pm 0,9$ мл этанола ($n=10$), в смешанной группе $24,5 \pm 1,3$ мл воды и $3,5 \pm 0,4$ мл этанола ($n=11$). По этим результатам ретроспективно были отобраны и оценены показатели для групп ПВ и ПЭ крыс, которые приводятся ниже.

На рис. 1 приведены данные изменения массы тела крыс в процессе эксперимента. У контрольных животных, находившихся на свободном потреблении воды в течение всего срока, отмечалось линейное увеличение массы тела от 340 до 410—425 г, после чего кривая выходила на плато. У ПВ и ПЭ крыс в начальный период режима «нагрузка» происходит резкое замедление динамики массы и, несмотря на последующее линейное нарастание, разница по сравнению с контрольными животными сохраняется в течение всего периода режима «нагрузка». Следует отметить, что при переходе на режим «выбор» темп прироста массы тела у ПВ и ПЭ остается неизменным. На протяжении эксперимента (все три периода) не обнаруживается также различий между массой тела у ПВ и ПЭ.

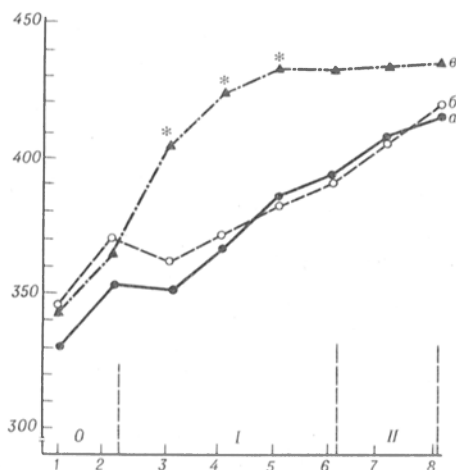


Рис. 1. Изменение массы тела у крыс с различной алкогольной мотивацией.

По оси абсцисс — число измерений (интервалы между измерениями 10 ± 1 день); по оси ординат — масса тела животного (в г). 0 — исходный период (потребление воды); I — «нагрузка» (20 % этанол); II — «выбор» (вода, этанол). а — ПЭ; б — ПВ; в — контроль. Звездочка — $p < 0,05$ относительно контроля.

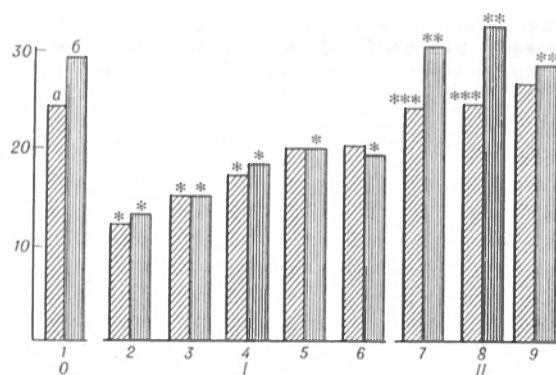


Рис. 2. Потребление жидкости животными с различной алкогольной мотивацией.

По оси абсцисс — обозначения те же, что на рис. 1 (интервалы между измерениями 8 ± 1 день); по оси ординат — потребление жидкости крысами (в мл/сут на 1 кг массы тела). а — ПЭ; б — ПВ. Одна звездочка — $p < 0,05$ относительно исходного периода, две — $p < 0,05$ относительно периодов I и II, три — $p < 0,05$ относительно ПВ и ПЭ.

В принципе подобная закономерность прослеживается при рассмотрении показателей потребления жидкости в разные периоды эксперимента. Начальная стадия режима «нагрузка» (рис. 2) характеризуется резким, на 50 %, снижением количества потребляемой жидкости, в данном случае раствора этанола. Однако постепенно количество потребляемого этанола увеличивается, причем нет существенной разницы в группах крыс ПВ и ПЭ. К концу этой стадии эксперимента (40 дней потребления этанола) объем выпиваемого в сутки раствора этанола составляет 70—80 % от исходного, фонового, уровня потребления воды. При переходе на режим «выбор» происходит дальнейшее увеличение суточного количества потребляемой жидкости, при этом четко выявляется различие между группами ПВ и ПЭ. Только к концу 2-й недели периода режима «выбор» разница между количеством потребляемой жидкости в группах ПВ и ПЭ практически сглаживается.

Период вынужденного потребления этанола сказывается также и на показателях электроболевой чувствительности (табл. 1). Исходные замеры контрольного порога не выявили разницы в группах ПВ и ПЭ. В условиях нагрузки этанолом порог электроболевой чувствительности достоверно увеличивается в обеих группах, однако разницы между группами ПВ и ПЭ опять-таки не обнаруживается. В период режима «выбор» порог болевой чувствительности снова снижается, возвращаясь к исходным величинам.

Таблица 1

Изменение порога электроболевой чувствительности (в В) у крыс с различной алкогольной мотивацией

Период исследований	Число измерений	ПВ (n=15)	ПЭ (n=8)
Исходный (вода)	1	$38,2 \pm 1,6$	$40,9 \pm 3,9$
«Нагрузка» (20 % этанол)	2	$33,7 \pm 1,3$	$35,6 \pm 2,2$
	3	$44,1 \pm 3,0^*$	$42,3 \pm 3,2$
«Выбор» (вода, этанол)	4	$47,1 \pm 3,1^*$	$39,9 \pm 2,4$
	5	$48,2 \pm 3,5^*$	$51,2 \pm 5,8^*$
	6	$33,2 \pm 2,9^{**}$	$36,3 \pm 3,6^{**}$
	7	$33,3 \pm 2,2^{**}$	$33,9 \pm 2,3^{**}$

Примечание. Интервалы между измерениями 10 ± 1 день. Одна звездочка — $p < 0,05$ относительно исходного периода, две — относительно режимов «выбор» и «нагрузка».

Активность КП-Н и КП-В (в нмоль/мин на 1 мг белка) в тканях крыс с различной алкогольной мотивацией

Исследуемая ткань	КП-Н			КП-В		
	контроль (n=4)	ПВ (n=9)	ПЭ (n=6)	контроль (n=4)	ПВ (n=9)	ПЭ (n=6)
Гипофиз	13,47±0,19	14,41±0,34	15,93±0,27*	2,31±0,17	2,80±0,13	3,22±0,22
Средний мозг	0,23±0,01	0,31±0,02*	0,29±0,02	0,24±0,01	0,44±0,03*	0,44±0,03*
Таламус+гипоталамус	0,42±0,01	0,43±0,02	0,43±0,02	0,19±0,01	0,20±0,03	0,20±0,04
Стриатум	0,62±0,02	0,83±0,02*	0,78±0,04*	0,30±0,02	0,43±0,02*	0,44±0,02*
Надпочечники	0,17±0,02	0,25±0,02*	0,20±0,01	0,28±0,02	0,31±0,03	0,28±0,02

Примечание. Звездочка — $p < 0,05$ относительно контроля.

По завершении экспериментов в режиме «выбор» в группах ПВ и ПЭ исследовали активности энкефалин- и ангиотензин-П-образующих пептидаз. Контролем служили интактные крысы, потреблявшие воду и находившиеся в индивидуальных клетках в течение всего срока эксперимента.

Представленные в табл. 2 результаты исследования активности КП-Н показывают, что в среднем мозгу, полосатом теле, а также в гипофизе и надпочечниках активность фермента увеличена в разной степени и статистически достоверна для среднего мозга и надпочечников (ПВ), для полосатого тела (обе группы), для гипофиза (ПЭ). Таким образом, речь идет о достаточно общей закономерности увеличения энкефалинообразующей активности в некоторых регионах мозга, гипофизе и надпочечниках. Изменения активности КП-Н могут быть сопоставлены с таковой КП-В, которая оказалась несколько иной. Значительно больше выражено увеличение активности этого фермента в среднем мозгу и полосатом теле, однако практически нет изменений в надпочечниках, специфическом энкефалинообразующем регионе. Изменения активности КП-В могут свидетельствовать об избирательной мобилизации активности лизосомальных ферментов. В тех же отделах мозга, гипофизе и надпочечниках, а также в сыворотке крови, легких и почках определяли активность АПФ (табл. 3). В первую очередь следует отметить увеличение активности АПФ в гипофизе (более значительное для ПЭ) и в полосатом теле. В таламогипоталамической области, наоборот; активность АПФ снижена вдвое у ПЭ. В мозжечке и среднем мозгу изменений не обнаружено. Следует также обратить внимание на увеличение активности АПФ в легких (более значительное у ПВ). В надпочечниках и сыворотке крови изменения активности этого фермента отсутствовали.

Можно сформулировать две позиции, в свете которых следует рассматривать полученные результаты. Первая — оценка предрасположенности животных к предпочтению алкоголя по выбранным физиологическим показателям. Вторая — рассмотрение периодов потребления этанола и «выбора» как состояний напряжения, адаптации и реадaptации у крыс с различным предпочтением этанола.

Изменение массы тела является одним из наиболее выразительных показателей общего состояния организма. Как указывалось выше, переход от исходного состояния к режиму потребления этанола явился значительной нагрузкой для крыс, что привело к замедлению роста массы тела. Последующее нарастание массы тела протекало линейно, включая переход на режим «выбор». Таким образом, можно говорить об адаптации крыс к нагрузке этанолом, сохраняющейся по показателям массы тела и в режиме «выбор». При этом не обнаруживается разницы у ПВ и ПЭ. В свою очередь переход на режим «выбор» сопровождается резким увеличением потребления этанола и (или) воды, при этом группы ПВ значительно отличаются от группы ПЭ и смешанной. Однако через 2 нед после перехода на режим «выбор» обе группы животных выпивают количество жидкости, соответствующее исходному уровню, несмотря на то что состав ее у ПЭ и ПВ существенно различается. Вынужденное потребление этанола приводит, как уже отмечалось, также и к изменению электроболевой чувствительности. Причем поскольку в период выбора ПЭ имеют такие же показатели, что и ПВ, увеличение порога болевой чувствительности в режиме нагрузки в обеих группах можно связывать с адаптивной реакцией животных, нежели с наркотизирующим действием этанола.

В целом обе группы крыс в течение различных

Таблица 3

Активность АПФ (в нмоль/мин на 1 мг белка) в тканях крыс с различной алкогольной мотивацией

Исследуемая ткань	Контроль (n=4)	ПВ (n=9)	ПЭ (n=6)
Гипофиз	15,82±1,56	23,58±1,79*	28,75±2,43*
Средний мозг	4,13±0,59	5,50±0,86	3,50±0,40
Таламус+гипоталамус	12,36±3,59	10,20±2,12	5,39±0,60***
Стриатум	7,21±0,75	10,56±1,58*	10,66±0,80*
Мозжечок	8,39±2,84	8,39±1,12	7,95±1,18
Сыворотка крови	1,19±0,09	1,31±0,12	1,32±0,08
Легкие	213,00±26,50	276,71±37,20*	312,20±22,20*
Почки	8,20±1,82	4,62±0,39*	7,89±1,01**
Надпочечники	1,26±0,10	1,24±0,10	1,36±0,13

Примечание. Одна звездочка — $p < 0,05$ относительно контроля; две — $p < 0,05$ относительно групп ПВ и ПЭ.

периодов эксперимента обнаруживают практически одинаковые изменения функционального статуса. Какой-либо особенности у крыс, predisposed к потреблению этанола, по показателям изменений массы тела, количества потребляемой жидкости и порога электрошолевой чувствительности не обнаруживается.

Однако разница между этими двумя группами животных становится очевидной при анализе регионарных изменений энкефалин- и ангиотензин II-образующих пептидаз. Активность КП-Н, как уже указывалось, увеличена в среднем мозгу, полосатом теле и надпочечниках у ПВ. Достоверное, но менее выраженное увеличение активности КП-Н отмечается у ПЭ только в гипофизе и полосатом теле. Следует ли рассматривать эти изменения энкефалинообразующей активности как химический след предшествовавшей этанольной нагрузки у ПВ? По крайней мере, у ПЭ и продолжающих потреблять преимущественно этанол в период выбора такие сдвиги ферментативной активности представлены менее значительно.

На первый взгляд, приведенные данные находятся в противоречии с исследованием лей-и метэнкефалинов в зонах мозга крыс, длительно потреблявших этанол. Ряд исследований [4, 10, 25] указывает на снижение содержания этих пептидов или на отсутствие каких-либо изменений [1, 12, 23]. Однако нужно отметить, что подобные результаты значительно зависят от сроков и формы применявшейся нагрузки этанолом (с пищей, искусственное введение внутрь, добровольное потребление). Отмечается также [4], что количество определяемого пептида является, по сути, интегративной величиной соотношения энкефалинообразующей и энкефалиндеградирующей активности в конкретном нейрональном регионе. Непосредственное определение активности этих пептидаз, проведенное в единичных исследованиях [2, 3], показывает неоднозначность таких изменений, трактовка которых представляется затруднительной.

Возвращаясь к оценке наших результатов и отмечая разницу в изменениях регионарной активности КП-Н у ПВ и ПЭ, выделим работу [20], в которой было показано, что внутрижелудочковое введение метэнкефалина крысам снижало добровольное потребление ими этанола и что такой эффект снимался налоксоном. Авторы считают, что дефицит энкефалинов в мозгу следует рассматривать как одну из причин формирования этанольной зависимости. Напомним, что в наших исследованиях уровень энкефалинообразующей активности был заметно выше у ПВ. В этом же контексте можно рассматривать исследование Майзелеса и соавт. [8], показавших, что аналог лейэнкефалина даларгин защищает от функциональных нарушений крыс, получавших этанол в период внутриутробного развития.

Значительные изменения активности в сравнении с контрольными крысами и различия между группами были обнаружены для АПФ. Повышение ангиотензин II-образующей активности было выявлено у ПВ и ПЭ в гипофизе, стриатуме, легких. Интересно рассмотрение данных по АПФ в таламогипоталамической области у ПВ и ПЭ. Если у первых активность АПФ не отличается от контроля, то у ПЭ таковая снижена вдвое. Как известно, ангиотензин II рассматривается в качестве одного

из важнейших факторов центральной регуляции питьевого поведения. Перифорникальная область гипоталамуса, где сосредоточена высокая активность АПФ, связывается с локализацией зоны питьевой мотивации и регуляции потребления жидкости. Согласно [9], субфорникальная область гипоталамуса причастна также к формированию алкогольного влечения. Электростимуляция этой области или хемостимуляция ацетилхолином приводила к повышенному потреблению этанола. Введение в перифорникальную область микроколичеств ангиотензина II вызывало увеличение питьевого рефлекса у ПВ и отсутствие какой-либо реакции у крыс с алкогольным влечением [7].

Судя по этим результатам, а также нашим данным (селективное снижение активности АПФ в таламогипоталамической области у ПЭ), предпочтение этанола связано с нарушением метаболизма ангиотензина в этом регионе. Цепочка таких изменений может рассматриваться как снижение активности АПФ, концентрации образующегося здесь пептида, реактивности соответствующих ангиотензиновых рецепторов. Связанное с гипоталамической областью снижение активности АПФ у ПЭ следует подчеркнуть особо, поскольку в целом такая активность в гипофизе, легких, почках у ПЭ значительно выше.

Резюмируя результаты биохимических исследований, следует отметить в целом разницу между ПВ и ПЭ на конечном этапе эксперимента. Обсуждая этот вывод, можно предложить следующие объяснения: 1) изменения активности исследованных пептидаз в регионах мозга и на периферии представляют собой след предшествовавшего периода этанольной нагрузки. Биохимические различия между группами соответствуют неодинаковой устойчивости к такому воздействию у ПВ и ПЭ. Giapoulakis и соавт. [16], показали, что нормализация биосинтеза β -эндорфина через 2 нед после отмены нагрузки этанолом сопровождается тем не менее повышенной активностью в гипофизе ацетилтрансферазы, ответственной за образование пептида; 2) по функциональным показателям, как отмечалось выше, в период нагрузки этанолом или в период режима «выбор» различий между ПВ и ПЭ не обнаруживалось. Более того, несмотря на то что одни животные в период режима «выбор» целиком переходят на потребление воды, а другие предпочитают этанол, функциональные показатели соответствуют норме. Можно высказать предположение, что именно различный уровень активности энкефалин- и ангиотензин II-образующих пептидаз (мозга, надпочечников, гипофиза, других тканей) является биохимической основой функционального благополучия этих двух групп крыс.

Однако оценка ферментативной активности может иметь и другую грань. Превалирующая активность АПФ в тканях крыс, длительно потреблявших этанол, может стать причиной формирования гипертензивных расстройств, что действительно подтверждается экспериментальными и клиническими наблюдениями [27]. Наши данные по АПФ подтверждают также обоснованность первых попыток лечебного применения ингибиторов этого фермента у лиц, злоупотребляющих алкоголем [26].

Изменения активности КП-Н и АПФ следует,

конечно, рассматривать как частные элементы цепи биосинтеза соответствующих физиологически активных пептидов и сопряженных с ними процессов регуляции гомеостаза в условиях алкогольной нагрузки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балакеевский А. И., Маслова И. В., Петренко С. В., Суриков П. М. // Бюл. exper. биол.— 1986.— № 3.— С. 291—294.
2. Беляев Н. А., Балакирева Н. Н., Брусов О. С., Панченко Л. Ф. // Биохимия.— 1984.— Т. 49, № 9.— С. 1425—1430.
3. Беляев Н. А., Генгин М. Т., Годына С. В. и др. // Вопр. мед. химии.— 1988.— № 4.— С. 118—121.
4. Буров Ю. В., Ведерникова Н. Н. Нейрохимия и фармакология алкоголизма.— М., 1985.
5. Гомазков О. А., Ростовцев А. И., Комиссарова И. В. и др. // Пат. физиол.— 1988.— № 5.— С. 52—57.
6. Гомазков О. А., Ростовцев А. И., Панфилов А. Д. // Нейрохимия.— 1989.— Т. 8, № 2.— С. 215—221.
7. Келешева Л. Ф., Котов А. В. // Журн. выпш. нервн. деят.— 1988.— № 3.— С. 540—545.
8. Майзелс М. Я., Заблудовский А. Л., Шихов С. Н. // Там же.— № 4.— С. 744—750.
9. Amit Z., Stern M., Wise B. // Psychopharmacology.— 1970.— Vol. 17, N 3.— P. 367.
10. Blum K., Briggs A., Elston S. // Science.— 1982.— Vol. 216.— P. 1425—1427.
11. Brambilla F. // Acta psychiat. scand.— 1988.— Vol. 77, N 1.— P. 63—66.
12. Cheng S. S., Tseng L. F. // Pharmacol. Res. Commun.— 1982.— Vol. 14, N 10.— P. 1001—1008.
13. Cooke K., Frost G., Stokes G. // Clin. exp. Pharmacol. Physiol.— 1983.— Vol. 10.— P. 229—233.
14. Dave J. R., Eiden L., Karanian J., Eskay R. // Endocrinology.— 1986.— Vol. 118.— P. 280—286.
15. Fricker L. D., Snyder S. H. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1982.— Vol. 79.— P. 3886—3890.
16. Gianoulakis C., Barcomb A. // Life Sci.— 1987.— Vol. 40, N 1.— P. 19—28.
17. Gainoulakis C., Hutchison W., Kalant H. // Endocrinology.— 1988.— Vol. 122, N 3.— P. 817—825.
18. Glowinsky J., Iversen L. J. // J. Neurochem.— 1966.— Vol. 13.— P. 655—669.
19. Grupp L. A. // Pharmacol. Biochem. Behav.— 1988.— Vol. 29, N 3.— P. 479—482.
20. Ito K. S., Rossi N. // J. Pharm. Pharmacol.— 1982.— Vol. 34, N 2.— P. 118—119.
21. Hutchison W., Gianoulakis C., Kalant H. // Pharmacol. Biochem. Behav.— 1988.— Vol. 30.— P. 933—939.
22. Okuno T. M. // Alcohol.— 1986.— Vol. 3, N 6.— P. 357—361.
23. Ryder S., Straus E., Lieber C. S., Yalow R. S. // Peptides.— 1981.— Vol. 2.— P. 223—226.
24. Santos R., Krieger E. M., Greene L. J. // Hypertension.— 1985.— Vol. 7, N 2.— P. 244—253.
25. Schulz R., Wuster M., Duka T., Herz A. // Psychopharmacology.— 1977.— Vol. 68.— P. 221—271.
26. Spinosa G., Perlanski E., Leenen F. et al. // Alcoholism.— 1988.— Vol. 12, N 1.— P. 65—70.
27. Wallace R., Lynch C. // Circulation.— 1981.— Vol. 64, Suppl. 111.— P. 111—41—111—47.
28. Wright J., Morseth S., Abhold R., Harding J. // Pharmacol. Biochem. Behav.— 1986.— Vol. 24.— P. 813—818.

Поступила 01.02.90

REGIONAL ACTIVITY OF ENKEPHALIN- AND ANGIOTENSIN II-FORMING PEPTIDASES IN BRAIN COMPARTMENTS AND PERIPHERAL TISSUES OF RATS WITH DIFFERENT ALCOHOL MOTIVATION

O. A. Gomazkov, A. D. Panfilov, A. P. Rostovtsev, N. V. Komissarova, V. V. Fomin, O. O. Grigoryantz

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

Activities of enkephalin- and angiotensin II-forming enzymes (carboxypeptidase H and angiotensin-converting enzyme, ACE) were changed in different brain regions and peripheral tissues of rats with various alcohol motivation. The carboxypeptidase H activity was elevated in midbrain, striatum, hypophysis and adrenal glands, while the ACE activity was increased in

hypophysis and striatum. The ACE activity was decreased two-fold in thalamo-hypothalamic region of ethanol-preferring rats.

© Т. М. АГАЕВ, А. Д. ГАФУЛОВА, 1991

УДК 612.825+612.827+612.843].015.3:[577.112.3+577.152.14].014.44

Т. М. Агаев, А. Д. Гафурова

ВЛИЯНИЕ РАННЕЙ ЗРИТЕЛЬНОЙ ДЕПРИВАЦИИ НА СОДЕРЖАНИЕ N-АЦЕТИЛ-I-АСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ И АКТИВНОСТЬ ФОСФАТ АКТИВИРУЕМОЙ ГЛУТАМИНАЗЫ В СТРУКТУРАХ ЗРИТЕЛЬНОГО АНАЛИЗАТОРА И РАЗНЫХ ОБЛАСТЯХ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА И В МОЗЖЕКЕ СОБАКИ

Институт физиологии им. А. И. Карасва АН Азербайджанской ССР, Баку

Нами [1—6, 14] было установлено, что при ранней зрительной депривации подавляется функционирование системы глутаминовой кислоты в синаптических структурах зрительного анализатора мозга собак, в особенности ферментов, участвующих в синтезе нейромедиаторных аминокислот: глутаминовой (ГК), аспарагиновой (АсК) и γ-аминомасляной кислоты (ГАМК). При этом в субклеточных структурах зрительного анализатора, а также в функционально взаимосвязанных областях коры головного мозга (двигательная и теменная) активность глутаматдекарбоксилазы (КФ 4.1.1.15), ГАМК-трансаминазы (КФ 2.6.1.19), глутаминсинтетазы (КФ 6.3.1.2), аспаратамиотрансферазы (КФ 2.6.1.1), аланинаминотрансферазы (КФ 2.6.1.2) при ранней зрительной депривации достоверно снижается. Отмечено, что в этих условиях в вышеуказанных образованиях мозга содержание ГАМК и активность фосфатактивируемой — глутаминазы — ФАГ (КФ 3.5.1.2) достоверно повышается.

Поскольку N-ацетил-I-аспарагиновая кислота и ФАГ участвуют в регуляции обмена ГК и АсК, особенно в стимуляции высвобождения и подавления захвата АсК и ГК из синапсом коры головного мозга [8—11], изучение этой аминокислоты и ФАГ в условиях зрительной депривации представляет несомненный интерес.

В задачу настоящего исследования входило изучение изменения содержания N-ацетил-I-аспарагиновой кислоты и активности ФАГ в условиях ранней зрительной депривации в тканях и митохондриальной фракции структур зрительного анализатора и субфракциях разных областей коры головного мозга и мозжечка собак.

Методика. Для исследования использовали следующие отделы зрительного анализатора мозга собак: зрительную кору (поле 17), переднее двухолмие (ПД), наружное коленичатое тело (НКТ), двигательную и теменную области коры, а также мозжечок. Кортиковые и подкорковые структуры зрительного анализатора разделяли в соответствии с атласом [7]. Подопытных собак с момента рождения до 45—90-дневного возраста содержали в полной темноте, контрольных — при нормальном освещении. После декапитации у животных извлекали мозг и помещали его на холод.

Митохондриальную фракцию выделяли в 0,32 М сахарозе методом дифференциального центрифугирования при 11 500 г в течение 20 мин [17]. Содержание N-ацетил-I-аспарагиновой кислоты в исследуемых пробах определяли по разности со-

Таблица 1

Содержание N-ацетил-1-аспарагиновой кислоты в структурах зрительного анализатора мозга собак при ранней зрительной депривации

Возраст животных, дни	Условия опыта	Зрительная кора (поле 17)	ПД	НКТ
Нефракционированный тканевый гомогенат, мкмоль на 1 г свежей ткани (n=8)				
45	Норма	1,46±0,08	1,65±0,09	2,35±0,15
	Депривация	1,73±0,12	1,07±0,09	1,35±0,05
	%	119	65	57
	p	<0,05	<0,05	<0,01
90	Норма	4,41±0,17	4,73±0,34	6,43±0,26
	Депривация	2,71±0,11	2,38±0,29	2,61±0,10
	%	62	50	41
	p	<0,01	<0,01	<0,01
Митохондриальная фракция, мкмоль на массу митохондрий, выделенных из 1 г свежей ткани (n=7)				
45	Норма	0,53±0,03	0,60±0,06	0,86±0,03
	Депривация	0,55±0,02	0,40±0,04	0,46±0,02
	%	104	67	54
	p	>0,1	<0,05	<0,01
90	Норма	1,07±0,08	0,89±0,04	1,21±0,04
	Депривация	0,24±0,02	0,29±0,02	0,50±0,01
	%	22	33	41
	p	<0,02	<0,01	<0,01

Примечание. Здесь и в табл. 2 % — процентное содержание по сравнению с нормой. p — достоверность различий по сравнению с нормой.

держания АсК, освобождающейся до и после гидролиза [18]. АсК выделяли методом высоковольтного электрофореза [10, 13]. Содержание АсК рассчитывали по калибровочным графикам. Субфракции исходных митохондриальных фракций (миеллина, фрагментов мембран и мелких синантосом, легких синантосом, тяжелых синантосом, митохондрий — соответственно субфракции А, В, С, Д, Е) разделяли в концентрационном градиенте сахарозы (1,4—0,8 М) [16, 17]. Активность ФАГ определяли по методу [15].

Результаты и обсуждение. Результаты проведенного исследования (табл. 1) показывают, что при 45-суточной депривации содержание N-ацетил-1-аспарагиновой кислоты достоверно повышается в нефракционированных тканевых гомогенатах зрительной коры (поле 17) на 19 % по сравнению с нормой, а в митохондриальной фракции зрительной коры (поле 17) мозга собак остается неизменной. В отличие от зрительной коры (поле 17) в подкорковых структурах зрительного анализатора мозга собак содержание N-ацетил-1-аспарагиновой кислоты как в тканях, так и в митохондриальной фракции достоверно снижается. При этом снижение N-ацетил-1-аспарагиновой кислоты в тканях ПД и НКТ составляет соответственно 35 и 43 %, а в митохондриальной фракции ПД и НКТ — 33 и 46 % по сравнению с нормой.

При удлинении сроков зрительной депривации до 90 сут содержание N-ацетил-1-аспарагиновой кислоты в тканях зрительной коры (поле 17), в ПД и НКТ достоверно уменьшается до 38—59 % по сравнению с нормой. При этом наиболее резкое снижение содержания N-ацетил-1-аспарагиновой кислоты отмечено в тканях НКТ — на 59 %. Следует отметить, что при 90-суточной зрительной депривации содержание N-ацетил-1-аспарагиновой кислоты претерпевает более значительные из-

менения в митохондриальной фракции структур зрительного анализатора мозга собак. Это снижение наиболее значительно в митохондриальной фракции зрительной коры (поле 17) — в 4,5 раза, а в НКТ и ПД — в 2,4—3,9 раза по сравнению с нормой.

Можно предположить, что в условиях зрительной депривации снижение содержания N-ацетил-1-аспарагиновой кислоты в гомогенатах и митохондриальной фракции структур зрительного анализатора мозга собак связано с подавлением системы ГК в синаптических структурах этих образований мозга собак [1, 6, 14]. Известно, что N-ацетил-1-аспарагиновая кислота стимулирует высвобождение и подавление захвата ГК и АсК как возбуждающий нейромедиатор в синаптических структурах головного мозга [8, 11, 14]. Более резкое снижение содержания этой аминокислоты в митохондриальной фракции зрительной коры (поле 17), ПД и НКТ в условиях зрительной депривации (особенно при 90-суточной зрительной депривации) свидетельствует о том, что эта аминокислота вместе с ГК, АсК и ГАМК локализована в синаптических структурах этих образований мозга и выполняет специфическую роль в функционировании зрительного анализатора как в норме, так и в условиях зрительной депривации.

На 45-е сутки зрительной депривации в отличие от 90-х суток уровень N-ацетил-1-аспарагиновой кислоты в тканях зрительной коры (поле 17) повышается и не изменяется в митохондриальной фракции, что связано со специфической ролью этой аминокислоты, особенно в зрительной коре в условиях ранней зрительной депривации. Известно, что обмен N-ацетил-1-аспарагиновой кислоты связан с обменом как ГК и АсК [8, 11, 12, 14], так и ГАМК [19], при этом зрительная депривация не препятствует развитию ГАМК-ергических нейронов коры головного мозга.

Высокий уровень ГАМК и N-ацетил-1-аспарагиновой кислоты в тканях зрительной коры (поле 17) при 45-суточной зрительной депривации можно рассматривать как отражение усиления тормозного состояния нейронов зрительной коры (поле 17), а также как косвенный показатель накопления ГАМК, участвующей в защитно-приспособительных реакциях организма.

В обмене ГК участвует не только N-ацетил-1-аспарагиновая кислота, но также фермент ФАГ, который катализирует переаминирования глутамин в головном мозгу, синтезируя ГК как в норме, так и в условиях зрительной депривации. Результаты этих исследований показывают, что в условиях 90-суточной зрительной депривации активность ФАГ (табл. 2) достоверно повышается в субклеточных фракциях двигательной и теменной областей коры головного мозга, а также в мозжечке, но в меньшей степени, чем в зрительной коре (поле 17). При этом активность фермента наиболее резко возрастает в субфракциях А, Д, Е и С зрительной коры (поле 17) соответственно на 271, 161, 131 и 111 % по сравнению с нормой, тогда как эти изменения в субклеточных фракциях А, В, С, Д и Е двигательной коры варьируют в пределах от 36 до 65 %, теменной коры — от 28 до 123 %, а в мозжечке — от 8 до 96 % по сравнению с нормой.

Общая активность ФАГ в субклеточных фракциях разных областей головного мозга собак в условиях 90-суточной зрительной депривации (в мкмоль N—NH₃ на массу субфракций, выделенных из 1 г свежей ткани за 1 ч (n=6—10))

Условия опыта	Субфракция				
	А	В	С	Д	Е
Зрительная кора (поле 17)					
Норма	10,1±0,15	18,4±0,32	85,9±0,15	152±1,24	41,4±0,76
Депривация	37,6±2,29	23,5±3,82	181,7±6,92	396±27,22	95,6±6,56
%	371	128	211	261	231
p	<0,001	>0,5	<0,001	<0,01	<0,01
Двигательная кора					
Норма	4,6±0,52	10,9±0,89	21,4±2,14	197±5,46	45,3±4,52
Депривация	7,7±1,45	15,4±1,26	29,5±4,6	267±10,06	65,7±8,23
%	165	142	138	136	145
p	<0,01	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Теменная кора					
Норма	3,8±0,43	7,7±0,78	32,3±5,53	173±4,96	14,2±1,23
Депривация	8,5±0,92	12,7±1,53	59,8±5,14	232±5,10	18,1±1,63
%	223	163	182	134	128
p	<0,001	<0,05	<0,01	<0,01	<0,05
Мозжечок					
Норма	5,83±0,93	7,26±0,88	11,80±0,52	14,28±0,92	5,56±0,96
Депривация	9,46±0,82	11,20±0,50	12,79±0,74	28,01±0,95	6,54±0,79
%	162	154	108	196	118
p	<0,05	<0,01	>0,5	<0,001	>0,5

Наши данные свидетельствуют о том, что световая импульсация играет существенную роль в обмене ГК, особенно в процессе морфофункционального формирования глутаматергических синапсов в зрительной системе мозга и главным образом в функционально сопряженных с ними двигательной или теменной коре и мозжечке.

В условиях ранней зрительной депривации активность ФАГ претерпевает значительные изменения не только в структурах зрительного анализатора мозга собак, но и (в меньшей мере) в двигательной, теменной коре и мозжечке собак. Изменения ФАГ в отдельных субклеточных органеллах теменной, двигательной коры и мозжечке в основном однонаправлены. Наиболее значительное повышение активности фермента отмечается в субфракциях А двигательной и теменной коры (на 65 и 123 %) и в субфракциях Д в мозжечке (на 96 % по сравнению с нормой), самое незначительное — в субфракциях С и Д двигательной коры (на 36 и 38 %), в субфракциях Д и Е теменной коры (на 34 и 28 %), в субфракциях С и Е в мозжечке (на 8 и 18 % по сравнению с нормой).

Фермент как в норме, так и в условиях зрительной депривации преимущественно локализован в синаптических структурах (легких и тяжелых синапсоммах) двигательной, теменной коры и мозжечка, а именно в синаптических митохондриях и мембранах исследуемых структур мозга. В условиях зрительной депривации в этих органеллах активность фермента претерпевает изменение в меньшей степени, чем в структурах зрительного анализатора мозга собак. ФАГ в основном локализован в глутаматергических синапсах и участвует в синтезе малого пула ГК-возбуждающего нейромедиатора в системе как зрительной (поле 17), так и теменной двигательной коры мозга и мозжечке в процессе развития и в условиях зрительной депривации; отмечена зависимость этих изменений

от специфических функций и функционального состояния отдельных образований мозга на раннем этапе постнатального развития в условиях зрительной депривации.

По-видимому, ФАГ способствует формированию специализации нейронов и их синапсов в отношении импульсов определенной модальности [2], что подтверждается в исследованиях двигательной и теменной коры мозга, а также мозжечка при 90-суточной зрительной депривации. Обнаруженные сдвиги характеризуют их определенную функциональную связь со зрительной импульсацией.

Изменения активности ФАГ в исследуемых образованиях мозга при зрительной депривации по характеру и диапазону не могут рассматриваться только как следствие неполноценного развития. Несомненно, что отражают и участие ФАГ и продуктов ферментативных реакций ГК в компенсаторных адаптационных перестройках обмена веществ в этих образованиях мозга при исключении зрительных импульсов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агаев Т. М. // Укр. биохим. журн.— 1979.— Т. 51, № 1.— С. 31—34.
2. Агаев Т. М. // Там же.— 1982.— Т. 54, № 54.— С. 414—417.
3. Агаев Т. М., Пигарева З. Д. // Структурно-функциональные основы организации мозга.— М., 1978.— С. 106—109.
4. Агаев Т. М., Пигарева З. Д., Ибраимова З. Н. // Вопр. мед. химии.— 1981.— № 5.— С. 611—615.
5. Агаев Т. М., Курбанова Г. А. // Там же.— 1988.— № 3.— С. 59—61.
6. Агаев Т. М., Сафарова Д. Р. // Интегративная деятельность мозга.— М., 1988.— Вып. 17.— С. 99—101.
7. Адрианов О. С., Меринг Т. А. Атлас мозга собаки.— М., 1959.
8. Априкян Г. В., Княрян В. А., Шагинян В. А., Ахвердян Э. С. // Нейрохимия.— 1987.— № 1.— С. 71—76.
9. Бунятян Г. Х., Априкян Г. В. // Вопросы биохимии.— Ереван, 1961.— Т. 2.— С. 5—15.
10. Бэйли Дж. Методы химии белков: Пер. с англ.— М., 1965.
11. Гекчян К. Г., Априкян Г. В. Молекулярные и функциональные механизмы онтогенеза.— Харьков, 1987.— С. 49—50.

12. Княрян В. А., Априкян Г. В. // Там же.— С. 88—89.
13. Козлов Э. А., Алиев Т. В. // Укр. биохим. журн.— 1972.— Т. 44, № 2.— С. 263—267.
14. Курбанова Г. А. // Пластичность нервной системы.— М., 1989.— С. 28—30.
15. Магеррамов А. Г., Зайкин А. А., Беляева Л. В. // Укр. биохим. журн.— 1979.— Т. 51, № 5.— С. 721—725.
16. De Robertis E., Pellegrino A., De Iraldi et al. // J. Neurochem.— 1962.— Vol. 9, N 1.— P. 23—25.
17. De Robertis E. // Science.— 1967.— Vol. 156.— P. 907—914.
18. Soube R. I., Konishi H., Nakajima P. K. // J. Neurochem.— 1975.— Vol. 24, N 5.— P. 1261—1262.
19. Tanaka K., Freeman K. D., Ramoa A. S. // Exp. Brain Res.— 1987.— Vol. 65, N 3.— P. 673—675.

Поступила 29.11.90

EFFECT OF THE EARLY VISUAL DEPRIVATION ON CONTENT OF N-ACETYL-L-ASPARTIC ACID AND ACTIVITY OF PHOSPHATE-DEPENDENT GLUTAMINASE IN STRUCTURES OF DOG VISUAL ANALYZER, DIFFERENT REGIONS OF BRAIN CORTEX AND CEREBELLUM

T. M. Agaev, A. D. Gafulova

A. I. Karayev Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Azerbaijan SSR, Baku

Under conditions of 45-days visual deprivation content of N-acetyl-L-aspartic acid was considerably increased in visual cortex (field 17) tissues and decreased in the superior colliculus and exterior geniculate body. At the same time, content of N-acetyl-L-aspartic acid was not altered in the visual cortex mitochondrial fraction; in the outer structures studied level of this amino acid was distinctly decreased both in tissues and mitochondrial fractions. After prolongation of the visual deprivation up to 90 days content of N-acetyl-L-aspartic acid was sharply decreased in tissues and mitochondrial fractions of all the formations studied of dog brain visual analyzer. The maximal 4.5-fold decrease was found in mitochondrial fractions of the visual analyzer (field 17), in the exterior geniculate body and superior colliculus content of the amino acid was decreased 2.4-3.9-fold as compared with controls. In 90 days-long visual deprivation total activity of phosphate-dependent glutaminase was considerably increased (1.18-3.71-fold as compared with controls) in myelinic (A), membranous (B), light (C), and heavy synaptosomal and synaptic mitochondrial (E) subfractions of the visual cortex (field 17). The rate of the enzyme activation was distinctly higher in these subfractions as compared with that of the motor and parietal cortical subfractions. After 90 days-long visual deprivation the similar alterations were found in A, B, D and E cerebellum subfractions but these alterations were less distinct as compared with the visual, motor and parietal subfractions.

© Б. А. Кудряшов, А. М. Ульянов, 1991

УДК 616.379-008.64-092.9-02:615.366.153.939.623-02:616.379-008.64]-085.31:547.995.17]-036.8:616.379-008.66

Б. А. Кудряшов, А. М. Ульянов

УСТОЙЧИВОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ ПРОДУКЦИИ ЭНДОГЕННОГО ИНСУЛИНА В ОРГАНИЗМЕ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИНСУЛИНЗАВИСИМОМ ДИАБЕТЕ

Московский университет им. М. В. Ломоносова

Ранее было показано, что при экспериментальном инсулинзависимом диабете [2, 14] и при I типе диабета у людей [3, 6, 8, 9, 14] в плазме крови содержится диабетогенный фактор (ДГФ), являющийся белком-альбумином с мол. м. 60 000 дальтон [11, 12, 19]. Этот фактор теряет свою специфическую активность при взаимодействии с гепарином *in vivo* и *in vitro* [2, 6, 8—10, 14, 17, 18], что

обусловлено образованием устойчивого комплекса гепарин — ДГФ [6, 7].

При внутривенном введении очищенного препарата ДГФ здоровым животным возникали высокая и длительная гипергликемия, резкое снижение концентрации инсулина в плазме крови, повышенная резистентность организма к инсулину [16] и значительное снижение содержания в плазме крови гепарина [13, 16]. Перечисленные явления сопровождалась блокадой функции противосвертывающей системы, что приводит к развитию претромботического состояния, в известных условиях переходящего в тромбоз [13].

Однако предварительная инъекция здоровым животным гепарина за 5 мин до введения им очищенного препарата ДГФ, выделенного из плазмы крови больных инсулинзависимым диабетом крыс [2, 12, 14] или людей [14], полностью предотвращала развитие гипергликемии. На экспериментальном [6, 13, 16] и клиническом [8, 9] материале было установлено, что систематическая длительная гепаринотерапия инсулинзависимого диабета обеспечивает ликвидацию ряда осложнений, присущих инсулинзависимому диабету, путем нейтрализации гепарином [6, 7] хронического токсического действия ДГФ, находящегося в плазме крови больных. Однако при этом не происходит исцеления от диабета, вследствие сохраняющегося недостатка или отсутствия в организме продукции эндогенного инсулина. Известно, что многочисленные экспериментальные и клинические попытки трансплантации β -клеток в больной диабетом организм приводили только к относительно кратковременному эффекту и не обеспечивали исцеления от диабета [5, 21—28].

На основе вышеизложенного материала у нас возникла идея, что недостаточная эффективность пересаженных здоровых β -клеток в больном организме объясняется хроническим токсическим действием на клетки ДГФ, устранение активности которого, вероятно, может привести к устойчивой продукции эндогенного инсулина.

Решению этой проблемы посвящено настоящее исследование.

Методика. Аллоксановый диабет вызывали у нелинейных крыс-самцов массой тела 200—220 г путем внутривенного введения аллоксана фирмы «Спофа» (Чехо-Словакия) в дозе 40 мг/кг после 24-часового голодания. В последующих опытах использовали животных только с устойчивым аллоксановым диабетом, у которых в течение не менее 1 мес сохранялась высокая гипергликемия (более 300 мг %) и гипоинсулинемия (концентрация в плазме крови иммунореактивного инсулина менее 1 мкМЕ/мл). Культуры островковых клеток поджелудочной железы получали, как описано ранее [1, 20, 21]. Функциональную активность β -клеток определяли по продукции инсулина до и через 18—24 ч после добавления к культуральной среде раствора глюкозы в концентрации 300 мг %.

Концентрацию сахара определяли по методу [4], концентрацию иммунореактивного инсулина в плазме крови — с использованием наборов «Insulin RIA HIT» (Венгрия), а также наборов для определения иммунореактивного инсулина отечественного производства (Минск).

Активность ДГФ в плазме крови определяли по методу [15]. Кровь для исследования брали из v. jugularis с цитратом натрия в соотношении 9:1 для определения сахара в крови либо с 1 % ЭДТА для определения концентрации инсулина.

В работе использовали препарат гепарина фирмы «Рихтер» (Венгрия). Результаты опытов обрабатывали статистически по методу Фишера — Стьюдента.

Крысам опытной группы, больным устойчивым аллоксановым диабетом, предварительно внутривенно вводили гепарин в дозе 500 МЕ на 1 кг массы тела. Через 5 мин после инъекции гепарина им имплантировали в прямую мышцу живота одно-

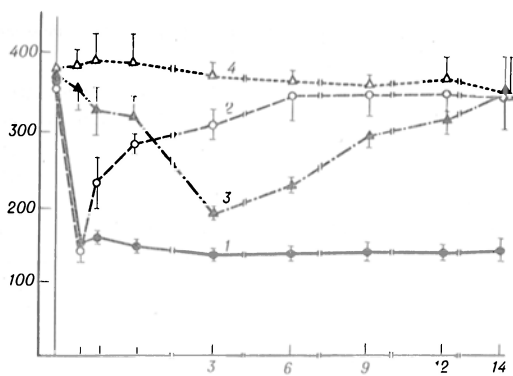


Рис. 1. Концентрация сахара (в мг %) в плазме крови животных.

По оси абсцисс — месяц; по оси ординат — концентрация сахара (в мг %). Здесь и на рис. 2: 1 — опит: введение гепарина (90 дней) при имплантации; 2 — контроль: имплантация β -клеток, введение физиологического раствора NaCl (90 дней); 3 — контроль: введение гепарина (90 дней); 4 — контроль: введение физиологического раствора NaCl (90 дней).

родную взвесь 5—7-дневной культуры островковых клеток, полученных из одной поджелудочной железы здоровых нелинейных крыс-самцов (масса тела 120—130 г). В последующем делали внутримышечные двукратные ежедневные (утром и вечером) инъекции гепарина в дозе 250—300 МЕ/кг в течение первых 3 мес после пересадки β -клеток.

Контролем служили 3 группы животных, больных устойчивым диабетом. Одной группе производили пересадки β -клеток на фоне инъекции физиологического раствора NaCl и в продолжение последующих 3 мес; другой контрольной группе животных делали инъекции гепарина 2 раза в день в течение 3 мес в той же дозе, что и в опытной группе; последняя группа контроля получала инъекции физиологического раствора в продолжение первых 3 мес. Всего в работе было использовано 225 животных.

Результаты и обсуждение. В эксперимент были взяты крысы, страдающие длительным аллоксановым диабетом, с уровнем сахара в крови 350—400 мг % и при концентрации имунореактивного инсулина менее 1 мкМЕ/мл.

Все животные были разделены на 4 группы.

Крысы 1-й опытной группы получали инъекции гепарина перед самой имплантацией β -клеток и ежедневно в течение последующих 3 мес после имплантации.

Начиная с 1-й недели опыта (рис. 1, кривая 1) кривая среднего содержания сахара в кровотоке крыс снизилась с 380 до 150 мг % и постепенно заняла положение, соответствующее примерно 140 мг %. Этот уровень сахара у крови, характерный для здоровых старых животных, сохранялся в течение 14 мес. В крови подопытных крыс

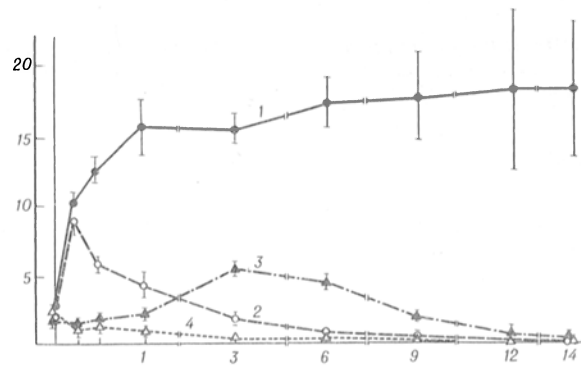


Рис. 2. Концентрация имунореактивного инсулина (в мкМЕ/мл) в плазме крови животных.

По оси абсцисс — месяц; по оси ординат — концентрация инсулина (в мкМЕ/мл).

в среднем возрастало содержание имунореактивного инсулина с 2,1 до 17 мкМЕ/мл в течение всего опыта (14 мес наблюдения). Из плазмы крови этих животных полностью исчез ДГФ (см. таблицу).

Крысам 2-й группы, являвшейся контролем, производили имплантацию β -клеток и внутримышечно вводили физиологический раствор NaCl вместо гепарина перед имплантацией и в течение последующих 90 дней опыта. В 1-ю неделю опыта наблюдали снижение уровня сахара в крови с 350 до 148 мг %, однако оно было кратковременным. Содержание сахара в крови вновь повысилось до 231 мг % к 15-му дню опыта и затем постепенно продолжало нарастать в течение последующих месяцев наблюдения, достигнув 346—349 мг % (см. рис. 1). Содержание в крови имунореактивного инсулина в первые дни после имплантации β -клеток без инъекций гепарина повышалось незначительно — до 6—7 мкМЕ/мл в среднем, а затем снижалось к концу 1-го месяца опыта до 4,1 мкМЕ/мл. В последующий период опыта оно достигло почти нулевого уровня (рис. 2). В течение всего срока опыта в плазме крови животных 2-й группы сохранялась высокая активность ДГФ (см. таблицу).

В 3-й группе животных (см. рис. 1, 2, кривая 3), являющейся вторым контролем, имплантацию β -клеток не производили. Животные получали ежедневно в продолжении 90 дней дважды в день инъекции гепарина. В этих условиях наблюдали значительное снижение уровня сахара в крови (с 380 до 319 мг %) в течение 1-го месяца опыта; затем происходило достоверное снижение уровня

Активность ДГФ в плазме крови крыс до и после пересадки им культуры β -клеток

Группа животных	Концентрация сахара (в мг %) в крови крыс-реципиентов									
	исходный уровень		через 3 мес		через 6 мес		через 9 мес		через 12 мес	
	до пересадки	через 7 сут	до пересадки	через 7 сут	до пересадки	через 7 сут	до пересадки	через 7 сут	до пересадки	через 7 сут
1-я	90,1 \pm 3,8 (13)	146,8 \pm 4,1 (13)	94,2 \pm 5,2 (13)	90,9 \pm 4,9 (13)	88,3 \pm 3,5 (12)	86,2 \pm 4,1 (11)	84,7 \pm 4,1 (12)	85,9 \pm 5,2 (12)	95,9 \pm 8,1 (6)	94,7 \pm 7,9 (6)
<i>p</i>		<0,001		>0,5		>0,5		>0,5		>0,5
2-я	87,7 \pm 2,9 (12)	144,5 \pm 5,4 (12)	90,1 \pm 4,3 (13)	145,0 \pm 4,9 (12)	85,1 \pm 4,2 (11)	152,3 \pm 6,0 (11)	87,8 \pm 5,2 (12)	156,4 \pm 8,1 (12)	82,0 \pm 7,8 (6)	152,1 \pm 12,3 (6)
<i>p</i>		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001
3-я	83,0 \pm 9,4 (11)	145,1 \pm 3,4 (11)	90,1 \pm 3,6 (13)	90,8 \pm 3,5 (13)	80,6 \pm 2,8 (12)	128,2 \pm 6,0 (12)	88,6 \pm 4,3 (12)	150,8 \pm 9,1 (11)	87,9 \pm 6,5 (6)	159,1 \pm 11,8 (6)
<i>p</i>		<0,001		>0,5		<0,001		<0,001		<0,001
4-я	82,4 \pm 3,6 (12)	142,2 \pm 4,3 (12)	84,2 \pm 4,1 (13)	148,6 \pm 3,0 (12)	89,2 \pm 3,2 (12)	150,7 \pm 6,1 (11)	89,2 \pm 3,9 (12)	156,3 \pm 7,1 (12)	95,0 \pm 7,7 (6)	171,8 \pm 14,1 (6)
<i>p</i>		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001

Примечание. Показатель достоверности *p* рассчитан по отношению к показателю «до»; в скобках указано число животных.

сахара до 196—234 мг % к 3—6-му месяцу опыта (см. рис. 1, кривая 3). После отмены на 90-й день опыта инъекций гепарина происходило постепенное повышение концентрации сахара в крови, достигавшее к концу опыта 300 мг %.

Параллельно с этим явлением наблюдали изменение содержания в крови иммунореактивного инсулина, достигшее максимума к 3—6-му месяцу опыта (до 5,7 и 4,1 мкМЕ/мл соответственно; см. рис. 2, кривая 3). Этот уровень гормона после отмены гепаринотерапии постепенно снизился до исходно низкого состояния. Однако в период инъекций гепарина в крови животных полностью исчезла активность ДГФ, которая вновь появлялась во второй половине опыта, протекающей после прекращения инъекций гепарина (см. таблицу).

В 4-й группе, также являющейся контролем, животные получали только инъекции физиологического раствора NaCl. У них сохранялось высокое содержание сахара в крови — около 400 мг % — в течение всего опыта (см. рис. 1, кривая 4). При этом наблюдалось отсутствие иммунореактивного инсулина в плазме крови в течение всего наблюдения (см. рис. 2, кривая 4) одновременно с постоянно высоким содержанием ДГФ (см. таблицу).

Итоги опытов, продолжавшихся 14 мес, свидетельствуют, что пересадка β -клеток в организм животных, больных инсулинзависимым диабетом, приводит к кратковременному незначительному эффекту, появлению иммунореактивного инсулина в крови, который начинает постепенно исчезать с 15—30-го дня опыта, что обусловлено, по-видимому, деградацией пересаженных β -клеток. Этот эффект согласуется с данными литературы о том, что имплантированные β -клетки больным инсулинзависимым диабетом животным сохраняют свою жизнедеятельность в течение 10—30 дней [23—28].

В клинических исследованиях также было установлено, что пересадка β -клеток больным диабетом I типа несколько снижает потребность в экзогенном инсулине и в начальном периоде после имплантации улучшает у части больных некоторые лабораторные и клинические показатели, но в конечном итоге не приводит к исцелению от диабета [5, 21, 22].

Гибель трансплантированных β -клеток в больном инсулинзависимым диабетом организме, по-видимому, объясняется не столько иммунной несовместимостью, сколько преимущественно тем, что в крови больных людей и животных содержится токсичный для β -клеток ДГФ [2, 3, 6, 8, 9, 12—14, 16].

В проведенных нами экспериментах, нацеленных на нейтрализацию гепарином активности содержащегося в организме животных ДГФ, токсичного для β -клеток, были созданы условия, обеспечивающие выживание и устойчивую гормональную активность пересаженных β -клеток. При этом восстанавливалось содержание иммунореактивного инсулина в плазме крови подопытных животных в среднем до 17 мкМЕ/мл, что приводило к резкому и устойчивому снижению уровня сахара в крови, сохранявшемуся на достигнутом уровне без изменений в течение 14 мес наблюдения. При этом в плазме подопытных животных полностью исчезал ДГФ не только во время гепа-

ринотерапии, но и после отмены ее, при развитии функции пересаженных β -клеток.

В контрольной группе пересадка β -клеток, не сопровождавшаяся инъекцией гепарина, не дала длительного положительного эффекта и завершилась потерей жизнедеятельности пересаженных β -клеток в течение 10—30 дней после имплантации, о чем свидетельствовало последующее повышение гипергликемии и приближение к нулю содержания иммунореактивного инсулина в плазме крови. В плазме крови животных этой группы ДГФ постоянно содержался в значительной концентрации.

Применение одного гепарина в течение 3 мес без пересадки β -клеток дало слабый, постепенно затухающий эффект снижения гипергликемии при крайне незначительном и кратковременном восстановлении уровня иммунореактивного инсулина. Это явление, по-видимому, объясняется временной активацией деятельности незначительного числа остаточных β -клеток, сохранившихся в организме больных диабетом животных, вызванной нейтрализацией гепарином ДГФ. Этот фактор действительно исчез из плазмы крови животных во время гепаринотерапии, но вновь появился вскоре после отмены инъекции гепарина. Проведенное исследование создает принципиально новую экспериментальную модель полноценного устойчивого восстановления естественной функции инсулярной системы в организме, страдавшем инсулинзависимым диабетом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабилова Р. А., Блюмкин В. Н., Шальнев Б. И., Полонская Л. Б. // Бюл. экспер. биол. — 1977. — № 3. — С. 350—353.
2. Баскакова Г. М., Кудряшов Б. А., Пытель Ю. А. // Пробл. эндокринологии. — 1981. — № 4. — С. 42—45.
3. Жуковский М. А., Кудряшов Б. А., Ульянов А. М. и др. // Педиатрия. — 1985. — № 2. — С. 7—9.
4. Конторович Л. С. А. с. 1583999 СССР.
5. Комиссаренко В. П., Турчин Н. С., Комиссаренко Н. В. и др. // Раннее распознавание эндокринных заболеваний и новые методы лечения. — М., 1984. — С. 104—105.
6. Кудряшов Б. А. // Сов. мед. — 1989. — № 7. — С. 51—54.
7. Кудряшов Б. А., Амосова Я. М., Ульянов А. М. // Фармакол. и токсикол. — 1987. — № 3. — С. 49—52.
8. Кудряшов Б. А., Балаболкин М. И., Ульянов А. М. и др. // Вопр. мед. химии. — 1990. — № 3. — С. 79—81.
9. Кудряшов Б. А., Жуковский М. А., Шербацева Л. Н. и др. // Педиатрия. — 1985. — № 8. — С. 46—47.
10. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 2. — С. 64—65.
11. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А., Азиева Л. Д. // Там же. — 1989. — № 6. — С. 63—66.
12. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А., Ульянов А. М. // Пробл. эндокринологии. — 1986. — № 6. — С. 51—53.
13. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А., Ульянов А. М. // Физиол. журн. СССР. — 1986. — № 3. — С. 373—376.
14. Кудряшов Б. А., Понасенкова Г. В., Пытель Ю. А. // Пробл. эндокринологии. — 1982. — № 5. — С. 61—64.
15. Кудряшов Б. А., Пытель Ю. А., Ульянов А. М., Тарасов Ю. А. // Бюл. экспер. биол. — 1986. — № 7. — С. 16—18.
16. Кудряшов Б. А., Ульянов А. М., Ляпина Л. А. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 5. — С. 57—59.
17. Кудряшов Б. А., Ульянов А. М., Пытель Ю. А. и др. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биол. — 1986. — № 1. — С. 52—54.
18. Кудряшов Б. А., Ульянов А. М., Тарасов Ю. А. // Вопр. мед. химии. — 1989. — № 6. — С. 80—82.
19. Ляпина Л. А., Кудряшов Б. А., Баратова Л. А. // Там же. — 1987. — № 6. — С. 69—71.
20. Федотов В. П., Блюмкин В. Н., Бабилова Р. А. и др. // Бюл. экспер. биол. — 1978. — № 8. — С. 235—238.
21. Шумаков В. И., Блюмкин В. Н., Бабилова Р. А. и др. // Там же. — 1979. — № 8. — С. 202—204.

22. Шумаков В. И., Блюмкин В. П., Игнатенко С. П. и др. // Раннее распознавание эндокринных заболеваний и новые методы лечения. — М., 1984. — С. 73—74.
23. Beyer M. M., Friedman E. A. // Transplant. Proc. — 1979. — Vol. 11, N 2. — P. 1436—1439.
24. Boschero A. C., Negreiros de Raiva C. E. // Acta physiol. lat. — 1977. — Vol. 7, N 1. — P. 1—6.
25. Bowen K. M., Andrus L. // Aust. J. exp. Biol. med. Sci. — 1980. — Vol. 58. — P. 441.
26. Bowen K. M., Andrus L., Lafferty K. I. // Diabetes. — 1980. — Vol. 29. — P. 98.
27. Laci P. S., Davie I. M., Finke E. H. // Science. — 1979. — Vol. 204. — P. 312.
28. Ueda T., Lee S., Stork G., Orloff M. J. // Microsurgery. — Amsterdam, 1979. — P. 423—424.

Поступила 22.10.90

PERSISTENT RESTORATION OF ENDOGENOUS INSULIN PRODUCTION IN ANIMALS WITH INSULIN-DEPENDENT DIABETES

B. A. Kudryashov, A. M. Ul'yanov

Laboratory of Physiology and Biochemistry of Blood Coagulation, M. V. Lomonosov State University, Moscow

Implantation of β -cells allogenic culture into animals with alloxan diabetes did not produce persistent positive effect. The implanted β -cells lost their viability as a result of toxic effect of natural diabetogenic factor occurring in blood plasma during insulin-dependent diabetes. Long-term administration of heparin into these animals within first 90 days of the experiment enabled to avoid the negative phenomenon and to neutralize the diabetogenic factor activity. Under these conditions the implanted β -cells effectively produced endogenous insulin and the symptoms of diabetes disappeared within 14 months.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616.37-002.1-07:616.37-008.93:577.112.8531-074

Л. Е. Панин, И. В. Лукьянов, Л. А. Храмцова,
Л. Ф. Никифоровская

ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНЫ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ОСТРОМ ПАНКРЕАТИТЕ

Институт биохимии Сибирского отделения АМН СССР, Новосибирск

Эпидемиологические исследования, проведенные в последние два десятилетия, свидетельствуют о продолжающемся повсеместно росте заболеваний поджелудочной железы, особенно острого и хронического панкреатита.

Известно, что при многих воспалительных заболеваниях в различных органах происходят количественные и качественные изменения белково-полисахаридных комплексов, которые являются составной частью соединительной ткани. Этим нарушениям отводится важная роль в развитии многих патологических процессов [5, 8, 9].

Особый интерес вызывает изучение гликозаминогликанов (ГАГ) в клинической гастроэнтерологии, и в частности при заболеваниях поджелудочной железы. Развитие воспалительно-дегенеративных изменений в поджелудочной железе сопровождается дезинтеграцией ацинарной ткани, нарушением структурной целостности протоков и выделением гликопротеидных секретов, что приводит к образованию в мелких протоках поджелудочной железы белковых пробок и острому нарушению функции органа [8].

Учитывая актуальность и недостаточную изученность данной проблемы, целью наших ис-

следований было проанализировать изменения качественного и количественного состава ГАГ ткани поджелудочной железы в динамике воспалительного процесса, выявить изменение их структуры в зависимости от тяжести заболевания на различных этапах развития острого панкреатита.

Методика. Объектом исследования явились 99 крыс-самцов линии Вистар массой 200—250 г. У подопытных животных вызывали острый панкреатит за счет образования замкнутой дуоденальной петли с последующим забросом желчи в панкреатические протоки. Панкреатит развивался уже с первых минут после рефлюкса желчи, введенной в двенадцатиперстную кишку под давлением, и достигал летальных форм через 20—22 ч. Экспериментальных животных декапитировали через 1, 2, 3, 4, 6, 10, 15, 20 ч от начала эксперимента. Одна группа животных была контрольной. После забоя для исследования у крыс извлекали поджелудочную железу.

Выделение ГАГ из ткани поджелудочной железы проводили по методу [1]. Поджелудочную железу освобождали от паренхимы жира и крови. Ткань измельчали в жидком азоте и получали ацетоновый порошок, который в дальнейшем дополнительно обезжиривали в аппарате Сокслета последовательно этанолом и эфиром. Высушивание ткани проводили в эксикаторе над хлористым кальцием до постоянной массы. Навеску сухой обезжиренной ткани заливали небольшим объемом дистиллированной воды до набухания. Экстракцию ГАГ проводили с применением предварительно активированного протеолитического фермента папаина [6] с последующим осаждением белков с помощью 10 % трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Экстракт диализовали против дистиллированной воды и осаждали 4 объемами спирта, насыщенного уксуснокислым натрием. Осадок получали центрифугированием, затем промывали абсолютным спиртом, эфиром и сушили в эксикаторе.

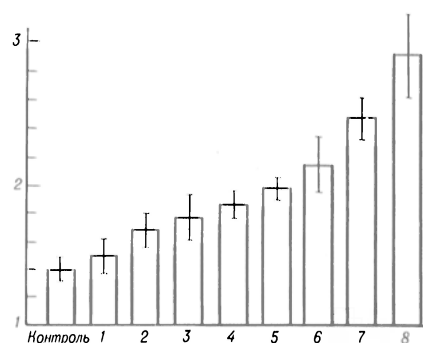
Содержание ГАГ определяли по количеству уроновых кислот карбазольным методом Динс [3] в модификации Биттера и Муира [2] и рассчитывали в миллиграммах на 1 г сухой ткани.

Фракционирование проводили на колонке 1,5×22 см с ДЭАЭ-сфадексом. Для этого выделенные ГАГ (3 мг) растворяли в воде и наносили на колонку. После нанесения образца для более полного разделения препаратов проводили ступенчатую элюцию следующими растворами с различной ионной силой и pH: 0,5 М NaCl — раствор № 1; 1,25 М NaCl с 0,01 М HCl — раствор № 2; 1,5 М NaCl с 0,01 М HCl — раствор № 3; 3 М NaCl с 0,1 М HCl — раствор № 4. Скорость элюирования изменялась в пределах 1—1,5 мл/мин. Элюат (по 4—6 мл) собирали коллектором фракций и анализировали на содержание уроновых кислот, по количеству которых определяли полноту элюции. Белок определяли по Лоури [4]. Количество гепариноподобных соединений определяли по методу [7].

Результаты и обсуждение. Выделение ГАГ осуществляли на всех стадиях развития острого панкреатита. Количество ГАГ в поджелудочной железе контрольных животных составляло $1,4 \pm 0,07$ мг на 1 г сухой ткани. В течение первых 4 ч эксперимента содержание ГАГ в поджелудочной железе увеличивалось практически линейно и составляло соответственно $1,51 \pm 0,12$ ($p < 0,1$), $1,67 \pm 0,11$ ($p < 0,02$), $1,78 \pm 0,15$ ($p < 0,05$) и $1,88 \pm 0,11$ ($p < 0,01$) мг на 1 г сухой ткани. Прирост ГАГ составлял 0,10—0,16 мг на 1 г сухой ткани за 1 ч (рис. 1). Таким образом, на 2, 3 и 4-м часу

Рис. 1. Изменение содержания ГАГ в поджелудочной железе в зависимости от продолжительности течения острого панкреатита.

По оси абсцисс — время (в ч); по оси ординат — содержание ГАГ (в мг на 1 г сухой ткани).



развития панкреатита количество ГАГ в поджелудочной железе превышало соответственно на 19, 27 и 34 % контрольные величины.

С увеличением сроков воспалительного процесса до 15 ч в панкреатической ткани тенденция к накоплению ГАГ сохранилась, но была менее выраженной в пересчете на 1 ч, чем в предыдущие сроки, составляя 0,04—0,06 мг на 1 г сухой ткани. Накопление ГАГ через 6, 10, 15 ч составляло соответственно 42, 53 и 77 % по отношению к контролю. В терминальный период, через 20 ч от начала эксперимента, содержание ГАГ в поджелудочной железе резко возрастало, составляя 210 % по отношению к контролю. Таким образом, уже на начальной стадии развития панкреатита наблюдается достоверное увеличение количества ГАГ в ткани поджелудочной железы, что, вероятно, связано с активацией их биосинтеза в очаге воспаления.

Для определения качественного состава ГАГ в ткани поджелудочной железы при остром панкреатите проводили хроматографию полученных препаратов ГАГ на ДЭАЭ-сефадексе. В I серии опытов определяли выход стандартных препаратов ГАГ. Для этого на колонку наносили отдельно препараты гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфата, гепарина, а также смесь гиалуроновой кислоты и хондроитинсульфата («Sigma», США).

Установлено, что гиалуроновая кислота не удерживается ДЭАЭ-сефадексом и выходит одним пиком в свободном объеме. При последующей элюции растворами № 2, 3 и 4 не наблюдали увеличения оптической плотности, поскольку гиалуроновая кислота полностью выходит одной фракцией в 0,5 М NaCl (рис. 2). Хондроитинсульфат в этих условиях остается на колонке и выходит отдельным пиком при использовании 1,25 М NaCl с 0,01 М HCl (раствор № 2). Дополнительное промывание колонки растворами № 3 и 4 не приводило к элюции веществ, содержащих уроновые кислоты.

Аналогичные результаты были получены при хроматографии смеси препаратов гиалуроновой кислоты и хондроитинсульфата. Наблюдали два

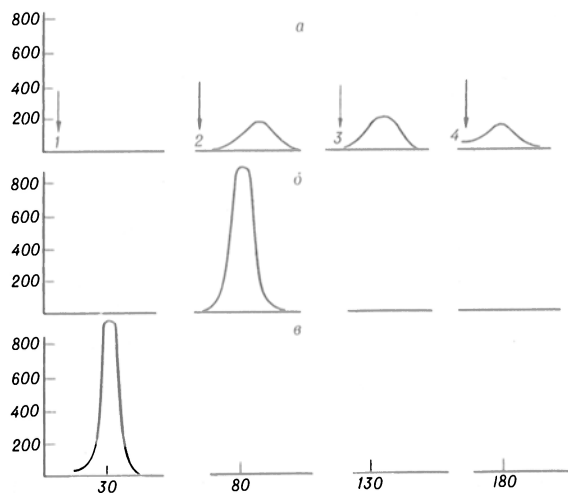


Рис. 2. Хроматография стандартных препаратов ГАГ на ДЭАЭ-сефадексе А-25.

а — гиалуроновая кислота; б — хондроитинсульфат; в — гепарин. По оси абсцисс — содержание элюата (в мл); по оси ординат — содержание уроновых кислот (в мг на пробу). 1—4 — растворы соответственно № 1—4 (см. «Методику»). Количество наносимого на колонку препарата 5 мг.

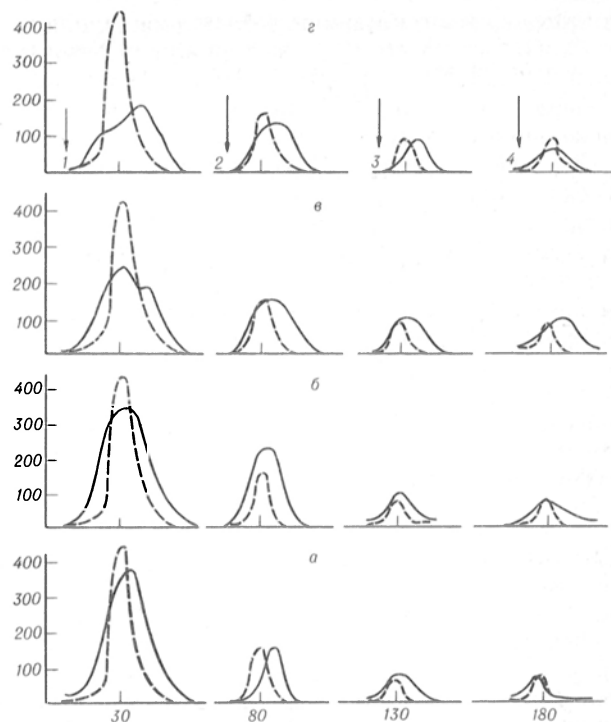


Рис. 3. Хроматография ГАГ, выделенных из поджелудочной железы крыс с острым панкреатитом на ДЭАЭ-сефадексе А-25.

а — 2 — соответственно 6, 10, 15, 20 ч от начала развития панкреатита. Штриховые линии — контрольные животные; сплошные линии — животные с панкреатитом. Остальные обозначения те же, что на рис. 2.

четко выраженных пика. Первый выходил с 0,5 М NaCl и соответствовал гиалуроновой кислоте, а второй — с 1,25 М NaCl и 0,01 М HCl и соответствовал хондроитинсульфату. Выход материала по количеству уроновых кислот при таком способе разделения для гиалуроновой кислоты составлял 89 %, для хондроитинсульфата — 92 %.

Во II серии опытов было проведено разделение ГАГ, выделенных из ткани поджелудочной железы экспериментальных животных. Для этого использовали описанный выше вариант хроматографии на ДЭАЭ-сефадексе. Несколько экстрактов ГАГ, выделенных из ткани поджелудочной железы, объединяли. Суммарный препарат ГАГ, помимо уроновых кислот, содержал в своем составе до 3—4 % белка, что указывает на присутствие в нем белково-полисахаридных комплексов. На рис. 3 показан пример хроматографического разделения препаратов ГАГ поджелудочной железы. Общий выход вещества составлял 80—98 %.

Вещества, содержащие уроновые кислоты, элюировали растворами NaCl и HCl, молярные концентрации которых были типичны для извлечения гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфата и гепарина. Поскольку стандартный гепарин элюировался растворами № 2, 3 и 4, можно допустить, что при элюировании природной смеси ГАГ NaCl в концентрации, равной таковой для извлечения хондроитинсульфата, в элюате возможно наличие гепариноподобных соединений. Для идентификации ГАГ, содержащихся в пике № 2, полученный материал обрабатывали азотистой кислотой, под влиянием которой происходит дезаминирование N-сульфатированных остатков гликоаминов, которые являются составной частью гепарина и гепаринсульфата. Анализ полученных результатов

показал, что гепариноподобные соединения составляют от 25 до 30 % материала, элюирующегося 1,25 М NaCl и 0,01 М HCl. Следовательно, в элюате раствора № 2, помимо хондроитинсульфата, присутствует гепарин.

При хроматографии ГАГ, полученных из ткани поджелудочной железы нормальных крыс, наблюдали два четко выраженных пика. Первый элюировался 0,5 М NaCl и соответствовал гиалуроновой кислоте, второй пик элюировался раствором № 2 и содержал 80 % хондроитинсульфата и 20 % гепарина. При элюции растворами № 3 и 4 выявили невыраженные пики, соответствующие отдельным фракциям гепарина (см. рис. 3).

При хроматографии образцов, выделенных из ткани поджелудочной железы с различной степенью развития панкреатита, также наблюдали четкое разделение смеси ГАГ на два хорошо выраженных пика, элюирующихся растворами № 1 и 2. При использовании растворов № 3 и 4 происходило размывание элюируемого материала (см. рис. 3). При хроматографии ГАГ поджелудочной железы с различной степенью развития панкреатита у крыс наблюдалось изменение формы пиков по сравнению с контрольными образцами. В контроле гиалуроновая кислота и хондроитинсульфат выходили в малом объеме (12—15 мл), при этом значительное количество уроновых кислот данного пика содержалось в 1—2 пробах; остальные пробы содержали малую концентрацию уроновых кислот. Эти данные свидетельствуют о том, что ГАГ в норме гомогенны по заряду и массе. В образцах ткани поджелудочной железы с максимальным развитием панкреатита материал пиков выходил в большем объеме (25—28 мл). Происходило размывание пика, что свидетельствует о гетерогенности молекул ГАГ.

Изменение массы и заряда молекул ГАГ может быть обусловлено изменением их структуры. Известно, что при остром и хроническом панкреатите происходит дезинтеграция поджелудочной железы в целом и отдельных структурных компонентов ткани, в том числе и протеогликанов, при этом смесь ГАГ становится более гетерогенной, что и наблюдается при хроматографии опытных образцов. В настоящее время механизм деградации углеводных цепей ГАГ точно не известен. Можно предположить, что этот процесс связан с действием лизосомальных гидролаз, активация которых наблюдалась нами уже в первые 30 мин развития воспалительного процесса. Необходимо отметить, что существует корреляция между тяжестью заболевания острым панкреатитом и степенью гетерогенности ГАГ. С прогрессированием заболевания количество и гетерогенность молекул ГАГ увеличиваются, что позволяет говорить о тяжести и плохом прогнозе течения панкреатита.

ЛИТЕРАТУРА

1. Никифоровская Л. Ф. // Вопр. мед. химии.— 1971.— № 3.— С. 282—286.
2. Bitter T., Muir H. // *Analyt. Biochem.*— 1962.— Vol. 4.— P. 330—335.
3. Dische Z. // *J. biol. Chem.*— 1941.— Vol. 167.— P. 189—192.
4. Lowry O., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // *Ibid.*— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
5. Charles H. // *Gut.*— 1971.— Vol. 12.— P. 377—389.
6. Schiller S., Slover G. // *J. biol. Chem.*— 1961.— Vol. 236.— P. 983—991.
7. Schively J., Conrad H. // *Biochemistry (Wash.)*.— 1976.— Vol. 15.— P. 3932—3940.
8. Takeda Y. // *Jap. J. Gastroent.*— 1975.— Vol. 72.— P. 491—499.
9. Wakabayashi A., Takeda Y. // *Amer. J. dig. Dis.*— 1976.— Vol. 21.— P. 607—612.

Поступила 06.10.89

GLYCOSAMINOGLYCANS OF RAT PANCREAS IN ACUTE PANCREATITIS

L. E. Panin, I. V. Lukyanov, L. A. Khramtsova, L. F. Nikiforovskaya

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

Content of glycosaminoglycans was increased in pancreas of rats with acute pancreatitis. With development of the disease not only content of glycosaminoglycans but heterogeneity of their molecules were increased. This suggests that carbohydrate chains of glycosaminoglycans were degraded; the rate of degradation correlated with severity of pancreatitis.

© В. В. ЛОБОВ, В. Д. КОНВАЙ, 1991

УДК 616-036.882-008.66-06:616.153.455-02:616.154.37:577.175.72

В. В. Лобов, В. Д. Конвай

НАРУШЕНИЕ РЕГУЛЯЦИИ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА И СОПРЯЖЕННЫХ С НИМ ПРОЦЕССОВ В ВОССТАНОВИТЕЛЬНОМ ПЕРИОДЕ ПОСЛЕ КЛИНИЧЕСКОЙ СМЕРТИ РАЗНОЙ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ

Омский медицинский институт

Нарушение углеводного обмена, проявляющееся в развитии гипергликемии, гиперлактацидемии и снижении фонда гликогена в печени, в значительной мере определяет исход оживления организма [4, 21]. Однако факторы, регулирующие эти процессы, особенно после длительной (более 5 мин) клинической смерти, остаются во многом неясными. Это существенно затрудняет разработку методов коррекции постреанимационных метаболических нарушений.

Цель настоящей работы — изучить взаимосвязь между нарушениями инкреции инсулина, глюкагона, аденокортикотропного гормона (АКТГ) и углеводного обмена, а также перекисного окисления липидов (ПОЛ) в восстановительном периоде после клинической смерти разной продолжительности.

Методика. Эксперименты проведены на 106 беспородных собаках массой 8—12 кг, наркотизированных нембуталом (10 мг/кг) на фоне введенного промедола (10 мг/кг). Моделировали различную степень тяжести постреанимационных повреждений, вызывая 1-, 5- и 10-минутную клиническую смерть от острого обескровливания (соответственно 1-я, 2-я и 3-я группы) с последующим оживлением комплексным методом [21]. В плазме крови через 5, 60 мин, 1, 3 и 7 сут после реанимации при помощи радиоиммунных наборов АКТНҚ-PR («Cea-Ire-Sorin», Франция) определяли концентрацию АКТГ, рино-ИНС-ПГ¹²⁵ (Институт органической химии АН БССР) инсулина и Glucagon KIT («Sergo Diagnostika GmbH», ФРГ) глюкагона. В крови также определяли содержание глюкозы о-толуидиновым методом, лактата по [19], свободных жирных кислот (СЖК) по [14], активность аспартатаминотрансферазы (АсАТ) и аланинаминотрансферазы (АлАТ) тест-наборами «Lachema» («Хемапол», Чехо-Словакия), а в эритроцитах концентрацию диеновых конъюгатов по [22] и липофусциноподобного пигмента (ЛПП) по [15]. За 100 единиц флюоресценции ЛПП принимали интенсивность свечения

Показатели	Клини- ческая смерть, мину- та	Исходный уровень	Время после оживления				
			5 мин	60 мин	1 сут	3 сут	7 сут
Глюкоза, ммоль/л	1-я	5,11±0,30	10,31±0,90 Δ	6,89±0,69 Δ	4,52±0,24	5,61±0,72	5,92±0,56
	5-я	4,97±0,27	10,44±0,55 Δ	7,78±0,47 Δ *	4,23±0,28	5,46±0,35	5,03±0,36**
	10-я	4,95±0,29	11,66±0,80 Δ	9,06±0,61 Δ	4,14±0,40	5,21±0,34	4,04±0,19 Δ *
Лактат, ммоль/л	1-я	1,66±0,26	4,44±0,32 Δ	4,30±0,44 Δ	1,28±0,18	1,90±0,38	2,43±0,30
	5-я	1,69±0,21	5,73±0,37 Δ **	4,99±0,37 Δ **	1,23±0,17	1,85±0,38	2,00±0,31
	10-я	1,49±0,20	6,64±0,43 Δ	5,56±0,49 Δ	1,03±0,06 Δ	1,71±0,29	1,37±0,19
Инсулин, мЕД/л	1-я	20,2±1,9	9,4±1,1 Δ	44,9±9,2 Δ	14,4±1,3 Δ	20,9±3,2	19,7±3,8
	5-я	21,4±2,2	17,9±3,1**	33,5±4,3 Δ	25,2±4,2**	22,8±3,8	21,5±3,3
	10-я	20,0±2,0	16,2±2,7	37,5±4,5 Δ	22,4±3,3	26,4±4,7	22,9±3,9
Глюкагон, нг/л	1-я	75,0±4,5	132,7±19,3 Δ	108,5±25,9*	98,8±14,8*	96,6±12,8	65,3±6,5
	5-я	72,6±9,3	205,7±39,4 Δ	203,9±36,2 Δ	208,5±19,0 Δ	117,3±25,1	81,4±17,8
	10-я	75,7±13,7	143,7±29,4 Δ	165,3±35,4 Δ	171,7±15,9 Δ	127,3±19,1 Δ	73,7±8,9
Свободные жирные кислоты, ммоль/л	1-я	0,66±0,08	0,54±0,08*	0,53±0,06	0,46±0,06 Δ *	0,35±0,07 Δ	0,36±0,06 Δ
	5-я	0,50±0,05	0,34±0,03 Δ	0,44±0,04	0,64±0,05 Δ *	0,33±0,05 Δ	0,23±0,04 Δ
	10-я	0,65±0,05	0,40±0,02 Δ	0,49±0,04 Δ	0,72±0,07	0,51±0,12	0,21±0,04 Δ
Диеновые конъюгаты, мкмоль на 1 мг липидов	1-я	3,40±0,55	6,07±1,24 Δ	5,28±0,91	5,18±1,05	4,02±0,82	3,78±0,97
	5-я	3,44±0,24	4,71±0,67**	3,94±0,62**	4,38±0,41 Δ **	2,54±0,33 Δ	2,28±0,31 Δ
	10-я	3,13±0,38	3,02±0,28	3,04±0,24	2,12±0,32*	2,02±0,31 Δ	2,21±0,33 Δ
ЛПНП сд. флюоресценции на 1 мг липидов	1-я	61,5±6,2	105,8±17,4 Δ	103,1±17,3 Δ	69,3±10,5	73,0±12,4	55,0±6,6
	5-я	55,2±6,7	83,8±11,3 Δ	81,2±8,4 Δ	85,3±16,3	69,4±9,0	58,5±6,7
	10-я	55,3±7,2	69,7±9,1	60,5±7,0**	57,7±7,1	67,0±15,6	64,1±9,2
АсАТ, ммоль/(л·мин)	1-я	1,43±0,11	1,66±0,14	2,13±0,14 Δ	2,55±0,28 Δ	2,09±0,35	1,89±0,39
	5-я	1,76±0,18	1,93±0,18**	2,39±0,23 Δ	2,79±0,29 Δ	1,77±0,23	1,74±0,23
	10-я	1,69±0,14	2,24±0,18 Δ	2,15±0,13 Δ	2,13±0,30	1,50±0,12	1,40±0,12
АлАТ, ммоль/(л·мин)	1-я	0,57±0,07	0,67±0,08*	0,65±0,08*	0,78±0,14*	0,87±0,18	0,69±0,12
	5-я	0,67±0,06	1,15±0,14 Δ **	1,03±0,14 Δ *	1,44±0,26 Δ	0,50±0,05	0,58±0,08
	10-я	0,67±0,07	0,96±0,09	1,17±0,12 Δ	1,01±0,14 Δ	0,70±0,16	0,75±0,12

Примечание. Треугольники — достоверные различия ($p \leq 0,05$) между исходными и опытными данными, одна звездочка — между показателями после 1- и 5- и 5- и 10-минутной клинической смерти, две звездочки — между показателями после 1- и 10-минутной клинической смерти. Число наблюдений в группах от 38 до 7.

0,01 % раствора хинин-сульфата в 0,1 % растворе серной кислоты. Полученные данные обработаны статистически с использованием критериев Стьюдента, знаков, Вилкоксона—Манна—Уитни и точного метода Фишера.

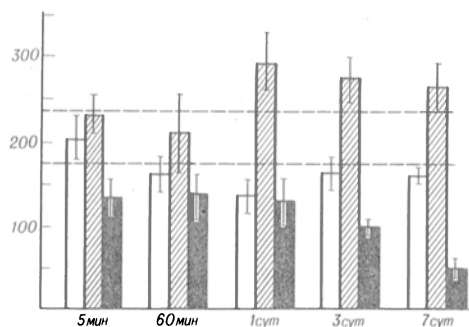
Результаты и обсуждение. Согласно данным, представленным в таблице, у всех животных в первые 60 мин постреанимационного периода увеличивается концентрация глюкозы в крови. Гипергликемия не обусловлена нарушением функционирования гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС), отмеченным нами ранее [5], особенно у собак после 5- или 10-минутной клинической смерти. Уровень АКТГ в крови в начале рецркуляции не увеличивается, а у животных 3-й группы даже снижается (см. рисунок).

Увеличение содержания глюкозы в крови можно было бы связать с усилением инкретии катехоламинов в первые минуты после восстановления сердечной деятельности [21]. Но повышение продукции адреналина наряду с усилением расщепления гликогена в печени [9] стимулирует также липолиз с последующим возрастанием уров-

ня СЖК в крови. Тем не менее в условиях нашего эксперимента этот показатель даже снижается, особенно у животных 2-й и 3-й групп. Данное противоречие можно объяснить тем, что после реанимации увеличивается инкретия лишь норадреналина, не способного усиливать липолиз [8], но не адреналина. Отсутствие повышения в крови СЖК может быть связано и с усиленным β -окислением их в митохондриях, а также нарушением сенсорной функции адренореактивных структур адипоцитов в течение первого часа постреанимационного периода.

Наиболее вероятной причиной гипергликемии в восстановительном периоде после оживления организма является усиление продукции глюкагона α -клетками островков Лангерганса в 2—3 раза (см. таблицу) у животных всех групп. По данным [2, 8], глюкагон не только стимулирует гидролиз гликогена в печени, но и способствует активации глюконеогенеза. Известно, что усиление секреции данного гормона приводит к увеличению уровня цАМФ с последующим снижением содержания фруктозо-2,6-бисфосфата. Вследствие этого активируется фруктозо-1,6-бисфосфатаза — ключевой фермент глюконеогенеза. Этот моносахарид является эффектором фосфофруктокиназы, и снижение его уровня приводит к торможению потребления углеводов тканями [11]. В первые 60 мин постреанимационного периода вышеуказанный эффект не проявляется, о чем свидетельствует повышенная концентрация молочной кислоты в крови.

Развитию гипергликемии в первые минуты постреанимационного периода благоприятствует также недостаточно эффективное поступление глюкозы в клетки вследствие снижения инкретии инсулина, особенно у собак 1-й группы. Вероятно, что это связано с уменьшением содержания глутатиона в тканях, обусловленным усиленным вовлечением его в реакции инактивации перекисных соединений. Известно, что недостаточная обеспеченность островкового аппарата поджелудочной же-



Изменение уровня АКТГ в крови в постреанимационном периоде.

По оси абсцисс — время после оживления организма; по оси ординат — концентрация гормона (в нг/л). Светлые, заштрихованные и темные столбцы — соответственно 1-, 5- и 10-минутная клиническая смерть; пунктирные линии — исходный уровень АКТГ ($M \pm m$)

лезы этим трипептидом тормозит продукцию инсулина [7]. Инкреция последнего в первые минуты рециркуляции может угнетаться также катехоламинами [17].

Отмеченное угнетение инсулярного аппарата оказывается кратковременным. Концентрация инсулина в крови к концу 60-й минуты восстановительного периода после клинической смерти разной продолжительности даже увеличивается (в 1,5—2 раза), что является компенсаторной реакцией организма на гипергликемию, обусловленную продолжающейся гиперсекрецией глюкагона. Эффект последнего связан с активацией фруктозо-1,6-бисфосфатазы вследствие снижения уровня фруктозо-2,6-бисфосфата. Торможение активности фосфофруктокиназы, как и на предыдущем этапе исследования, не проявляется. Интенсивность реакций гликолиза через 60 мин после оживления даже увеличена, о чем свидетельствует повышенная концентрация лактата в крови. Степень ее пропорциональна продолжительности предшествующей остановки кровообращения.

Увеличение концентрации лактата в крови в свою очередь способствует повышению активности АМФ-деаминазы, активируемой сдвигом рН в кислую сторону [23]. Образующийся при этом инозинмонофосфат расщепляется до инозина и гипоксантина. Усиленное вовлечение последнего в реакцию, катализируемую ксантиноксидазой, способной продуцировать супероксидные радикалы и перекись водорода [13], приводит к чрезмерной пероксидации фосфолипидов мембранных структур [10]. Можно полагать, что с активацией вышеуказанных реакций связано повышение содержания диеновых конъюгатов и ЛПП в эритроцитах, являющихся начальными и конечными продуктами ПОЛ.

Интересно, что степень увеличения уровня диеновых конъюгатов и ЛПП обратно пропорциональна длительности предшествующей клинической смерти. По-видимому, это связано с тем, что накопление в зрелых эритроцитах диеновых конъюгатов, а затем и малонового диальдегида, индуцирующего фагоцитоз этих клеток [18], приводит к депонированию их в селезенке с последующим выходом из костного мозга регенеративных форм эритроцитов, менее чувствительных к воздействию активных форм кислорода [12, 20]. Ранее нами показано, что у собак наблюдается мобилизация из депо резервных ретикулоцитов, выраженность которой пропорциональна продолжительности клинической смерти [6]. Эта закономерность, сохраняющаяся на протяжении раннего постреанимационного периода, характерна и для молодых форм ретикулоцитов (0-я, 1-я и 2-я по Гейльмейеру).

Вышесказанное подтверждается тем, что интенсивность ПОЛ в сердце и печени в отличие от эритроцитов по мере удлинения клинической смерти не снижается, а возрастает. Об этом свидетельствует увеличение активности АсАТ и АлАТ в плазме крови (см. таблицу). Известно, что эти ферменты, содержащиеся преимущественно в миокардиоцитах и гепатоцитах, выходят в кровь при нарушении проницаемости мембранных структур, обусловленных их чрезмерной пероксидацией [1].

Несоответствие между интенсивностью липопероксидации мембран эритроцитов и продолжи-

тельностью перенесенной клинической смерти может быть связано с ингибированием ксантиноксидазы уратом. Известно, что степень увеличения уровня продуктов катаболизма пуриновых мононуклеотидов пропорциональна длительности ишемии [3]. Мочевая кислота при этом не только способна ингибировать ксантиноксидазу как продукт реакции [16], но и является ловушкой свободных радикалов [13]. Отсутствие торможения уратом липопероксидации в сердце и печени можно объяснить вымыванием его из паренхиматозных органов в кровь с последующей экскрецией почками.

В дальнейшем через 1 и 3 сут после оживления организма концентрация глюкозы в крови снижается до контрольного уровня, несмотря на повышенную инкрецию глюкагона. Можно полагать, что в условиях усиленного окисления углеводов в тканях процессы глюконеогенеза не успевают восстанавливать фонд гликогена и глюкагон не оказывает должного эффекта. Уменьшение содержания гликогена в печени через 1 и 3 сут постреанимационного периода отмечено нами ранее [4]. Определенное значение в недостаточно эффективном восстановлении фонда гликогена может иметь дисфункция ГГНС, которая, по нашим данным, выражена в течение первых 3 сут после клинической смерти [5]. Инкреция АКТГ снижается к концу 1-х и 3-х суток, за исключением животных 2-й группы. По мере уменьшения уровня гликемии вновь понижается продукция инсулина поджелудочной железой, особенно у собак после 1-минутной клинической смерти.

При этом, по всей вероятности, не увеличена также инкреция адреналина. Усиление ее привело бы к активации липолиза с последующим возрастанием уровня СЖК в крови. В период же между 1-ми и 7-ми сутками постреанимационного периода этот показатель продолжает уменьшаться, по-видимому, вследствие повышенного включения СЖК в реакции β -окисления или в реакции глюконеогенеза. Интенсификации последних способствует гиперглюкагонемия [2].

Усиление аэробного окисления углеводов протекает на фоне снижения активности гликолитических процессов. Концентрация лактата в крови, начиная с конца 1-х суток, снижается до контрольного уровня. Вследствие этого, вероятно, уменьшается и скорость расщепления пуриновых мононуклеотидов, а также сопряженная с этим процессом пероксидация жирных кислот в мембранных структурах. Содержание диеновых конъюгатов и ЛПП в эритроцитах у животных в течение дальнейшего периода наблюдения ниже, чем в первые минуты рециркуляции. В то же время интенсивность ПОЛ в миокардиоцитах и гепатоцитах остается, вероятно, повышенной, особенно через 1 сут после оживления, когда у собак всех групп увеличена активность АсАТ и АлАТ в крови.

Таким образом, у животных, перенесших клиническую смерть разной продолжительности, в первый час рециркуляции развивается гипергликемия, обусловленная усиленной инкрецией глюкагона на фоне торможения функции ГГНС. Возникающая при этом гиперлактацидемия способствует усилению катаболизма пуринов с последующей стимуляцией процессов ПОЛ. Скорость липидов в эритроцитах обратно пропорциональна продолжительности перенесенной клинической смерти.

Начиная с конца 1-х суток пострестимуляционного периода, интенсивность вышеуказанных процессов снижается, достигая в дальнейшем контрольного уровня.

ЛИТЕРАТУРА

1. Долгих В. Т. // Пат. физиол.— 1986.— № 3.— С. 23—27.
2. Кендыш И. Н. Регуляция углеводного обмена.— М., 1985.
3. Киреев М. М., Конвай В. Д. // Вопр. мед. химии.— 1978.— № 5.— С. 629—632.
4. Конвай В. Д., Лукошкин А. В., Смирнова В. Б. // Пат. физиол.— 1984.— № 6.— С. 58—62.
5. Лобов В. В., Конвай В. Д., Лукошкин А. В. // Фармакол. и токсикол.— 1990.— № 1.— С. 53—54.
6. Лобов В. В., Пospelов В. С., Тагильцева М. П., Лукошкин А. В. // Центральная нервная система и пострестимуляционная патология организма.— М., 1989.— С. 154—155.
7. Мережинский М. Ф. // Здравоохран. Белоруссии.— 1961.— № 9.— С. 21—24.
8. Мецлер Д. Биохимия. Химические реакции в живой клетке: Пер. с англ.— М., 1980.— Т. 3.
9. Протасова Т. Н. Гормональная регуляция активности ферментов.— М., 1975.
10. Сороковой В. И., Владимиров Ю. А. // Биофизика: Молекулярная патология мембранных структур.— М., 1975.— Т. 5.— С. 21—55.
11. Чиркин А. А., Гидранович А. Г. // Успехи соврем. биол.— 1989.— Т. 107, № 1.— С. 34—40.
12. Филев А. В., Енохин С. Ф., Захаров И. И. и др. // Цитология.— 1989.— Т. 31, № 4.— С. 465—468.
13. Ames B. N., Cathcart R. C., Schwiers W., Hochstein P. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1981.— Vol. 78, N 11.— P. 6858—6862.
14. Duncombe W. G. // Clin. chim. Acta.— 1964.— N 9.— P. 122—129.
15. Fletcher B. L., Dillard C. J., Tappel A. L. // Analyt. Biochem.— 1973.— Vol. 52.— P. 1—9.
16. Galilea J. M., Canela E. I., Bozal J. // J. molec. Catalgs.— 1980.— Vol. 7, N 4.— P. 469—480.
17. Grodsky G. M. // Vitam. Hormon.— 1970.— Vol. 28.— P. 37—101.
18. Hebbel R. P., Miller W. J. // Amer. J. Hemat.— 1988.— Vol. 129.— P. 222—225.
19. Hohorst H. J. // Methoden des enzymatischen Analyse.— Berlin, 1970.— Bd 2.— S. 1425—1429.
20. Jain S. K. // Biochim. biophys. Acta.— 1988.— Vol. 937, N 2.— P. 205—210.
21. Negovsky V. A., Gurvitch A. M., Zolotokrylina E. S. Post-resuscitation Disease.— Amsterdam, 1983.
22. Plazer Z. // Nahrung.— 1968.— Bd 12.— S. 679—684.
23. Ogasawara N., Goto H., Yamada M. // Comp. Biochem. Physiol.— 1983.— Vol. 76, N 3.— P. 471—473.

Поступила 12.09.89

IMPAIRMENT OF CARBOHYDRATE METABOLISM AND RELATED PROCESSES DURING RESTORATION PERIOD AFTER CLINICAL DEATH OF VARIOUS DURATION

V. V. Lobov, V. D. Konvay

Medical School, Omsk

Hyperglycemia, caused by elevated incretion of glucagon simultaneously with inhibition of the hypophysis-hypothalamus-adrenal system, was developed in dogs after clinical death of various duration within the first hour of recirculation. Hyperlactemia produced under these conditions contributed to an increase in catabolism of purines followed by stimulation of lipid peroxidation in erythrocyte membranes. Beginning from the end of the first day of the postresuscitation period the intensity of these processes was decreased and gradually reached the control values.

© В. Г. МАКАРОВ, В. М. ТИМОФЕЕВА, 1991

УДК 612.014.462.6.014.45:612.66/.67

В. Г. Макаров, В. М. Тимофеева

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ СОСТОЯНИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ТКАНЕЙ КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ НА НИХ КРАТКОВРЕМЕННОЙ ВИБРАЦИИ

Ленинградский санитарно-гигиенический медицинский институт

Полагают, что продолжительность жизни во многом определяется эффективностью механизмов антиоксидантной защиты клетки от повреждающего воздействия свободных радикалов, перекисей и побочных продуктов метаболизма [1, 15]. Видовая продолжительность жизни тем больше, чем менее активны процессы образования предполагаемых эндогенных повреждающих агентов и чем более развита антиоксидантная защита.

Отмечены органотканевые, сезонные и суточные особенности изменения состояния компонентов антиоксидантной системы (АОС) в ходе постнатального онтогенеза [1, 3, 10]. Поэтому наряду с регистрацией стационарного состояния АОС в различные возрастные периоды перспективным становится изучение изменений ее компонентов в ответ на внешнее воздействие [1]. Представления об участии АОС в молекулярных механизмах адаптации могут быть существенно расширены, если произвести анализ характера приспособительных изменений с учетом исходного функционального уровня системы, обусловленного возрастом животных.

Для моделирования экстремального состояния применяли интенсивное кратковременное воздействие вертикальной вибрации, что является актуальным, учитывая важность изучения патогенеза вибрационной болезни.

Методика. В эксперименте использовали неполовозрелых (1 мес), взрослых (8—10 мес) и старых (23—25 мес) белых беспородных крыс-самцов. Исследования проводили в весенне-летний период во вторую половину суток. Животных содержали на обычном рационе вивария. Перед опытом животные не получали корм в течение 20 ч. Объектом изучения являлись кровь, головной мозг и печень крыс. В параллельных опытах животных опытной группы подвергали однократному воздействию вертикальной синусоидальной общей вибрации с частотой 60 Гц и уровнем скорости вибрации 135 дБ. Продолжительность воздействия составляла 10, 30, 60 мин.

В работе изучали основные звенья АОС. Из группы антиперекисных ферментов исследовали активность супероксиддисмутазы (СОД; КФ 1.15.1.1) в эритроцитах и цитозоле тканей [12], активность каталазы (Кат; КФ 1.11.1.6) в эритроцитах [14] и гомогенатах головного мозга и печени [13]. Активность СОД определяли по скорости торможения восстановления супероксидным анион-радикалом паранитротетразолия хлорида до формазана, концентрацию последнего регистрировали спектрофотометрически при длине волны 490 нм. Активность фермента рассчитывали при помощи калибровочных кривых, предварительно построенных для различных разведений цитозоля тканей, лизата эритроцитов и препарата фермента, полученного в Институте биохимии АН Армянской ССР. Активность Кат определяли спектрофотометрически при 230 нм по скорости убывания H_2O_2 .

Характеризуя состояние системы глутатиона и связанных с ним биоантиоксидантов, методом обратного амперометрического титрования определяли концентрацию низкомолекулярных тиолов (SH) и дисульфидов (SS) в гемолизате и гомогенате тканей [9], содержание в плазме крови и тканях [8] восстановленной аскорбиновой кислоты (АК) и ее окисленных

Изменение состояния компонентов АОС тканей в постнатальном онтогенезе белых крыс

Ткань	Возраст, мес	СОД, ед на 1 мг белка	Кат, ммоль/мин на 1 мг белка	SH/SS	АК/ОФ	ГР, ммоль/мин на 1 мг белка	Г-6-ФДГ, ммоль/мин на 1 мг белка
Кровь	1	18,4±1,0	36,9±1,0	2,31±0,23	1,03±0,09	0,38±0,03	9,4±0,5
	9	14,9±0,6	42,7±4,3	1,56±0,22	0,65±0,07	0,32±0,04	8,3±0,4
	24	14,1±1,0	37,3±3,4	1,24±0,08	0,55±0,10	0,10±0,01	8,0±0,4
Головной мозг	PQ	32±16	—	35±16	46±13	61±10	—
	p	<0,01	>0,05	<0,01	<0,001	<0,001	>0,05
Печень	1	124,7±4,1	305,4±28,8	0,89±0,14	5,01±0,41	11,4±1,1	17,4±1,0
	9	141,1±7,1	108,0±4,8	2,09±0,34	2,44±0,18	11,5±0,7	22,1±0,6
	24	187,3±16,5	253,2±25,8	2,60±0,17	2,42±0,15	6,9±0,5	16,9±1,0
	PQ	27±18	47±13	61±10	31±17	—	—
	p	<0,05	<0,001	<0,001	<0,05	>0,05	>0,05
	PQ	41±14	61±10	43±14	71±7	45±14	44±18
	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Примечание. PQ — влияние возраста на изменение показателей, выраженное в процентах от общей суммы всех действующих факторов и рассчитанное с помощью однофакторного дисперсионного анализа [7], с границами доверительного интервала, найденными при уровне достоверности <0,05

форм (ОФ), а также активность в эритроцитах [14] и цитозоле тканей [5] глутатионпероксидазы (ГР) (КФ 1.6.4.2). О способности тканей восстанавливать НАДФ⁺ судили, регистрируя активность в эритроцитах [14] и цитозоле головного мозга и печени [5] глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ). Скорость восстановления окисленного глутатиона оценивали по убыли концентрации НАДФ·Н, уменьшение оптической плотности которого измеряли спектрофотометрически в течение 5 мин при 340 нм. Об активности Г-6-ФДГ судили, оценивая скорость окисления Д-глюкозо-6-фосфата, которое сопровождается восстановлением НАДФ⁺. Регистрацию осуществляли спектрофотометрически при 340 нм в течение 5 мин. Удельную активность ферментов рассчитывали, определяя содержание белка в пробе по методу Лоури.

Полученные данные оценивали с помощью дисперсионного анализа и методом оценки достоверности разности по критерию Стьюдента [7]. Обработку результатов проводили на ЭВМ ЕС-1033, ЕС-1022.

Результаты и обсуждение. Данные о состоянии АОС тканей неполовозрелых, взрослых и старых крыс-самцов представлены в таблице. При рассмотрении полученных результатов обращает на себя внимание тканевая специфика возрастных изменений различных компонентов АОС, рассмотренная ранее [10].

Максимальный уровень восстановленности в системах низкомолекулярных тиолов и АК и наибольшая активность основных антиоксидантных ферментов наблюдаются в тканях неполовозрелых особей. По мере полового созревания

функциональная активность АОС снижается во всех исследованных тканях и продолжает уменьшаться в крови и головном мозгу двухгодовалых животных, тогда как в печени к старости она увеличивается.

При воздействии на животных общей вибрации с экспозицией 10, 30, 60 мин обнаружено фазовое изменение тиолдисульфидного соотношения в низкомолекулярной фракции тканей (рис. 1), что отражает процессы в АОС, направленные на адаптацию организма к действию экстремального фактора. На основании представлений В. В. Соколова [11] можно заключить, что в течение первых 10—30 мин воздействия вибрации в организме животных развивается реакция тревоги, которая сопровождается усилением интенсивности свободнорадикального и перекисного окисления [4] и постепенно сменяется стадией резистентности.

В тканях взрослых и старых крыс значения тиолдисульфидного соотношения возвращаются к исходному уровню к 60-й минуте воздействия, тогда как в тканях месячных животных этого не происходит. Можно предположить, что взрослые и старые животные быстрее адаптируются к действию вибрации заданных параметров, чем неполовозрелые особи. Причиной повышенной чувствительности 30-дневных крыс к кратковременной общей вертикальной вибрации являются, по-видимому, более глубокие и продолжительные нейрогуморальные сдвиги, которые установлены для этой возрастной группы в сравнении с новорожденными, 15-суточными и взрослыми животными [2]. У взрослых и старых крыс-самцов выраженность стресса, о которой судили, исследуя динамику уровня кортикостерона в плазме крови [16], не имела различий.

Наибольшая степень окисления низкомолекулярных тиолов наблюдается при получасовом воздействии, поэтому представлялось целесообразным исследовать воздействие вибрации на ос-

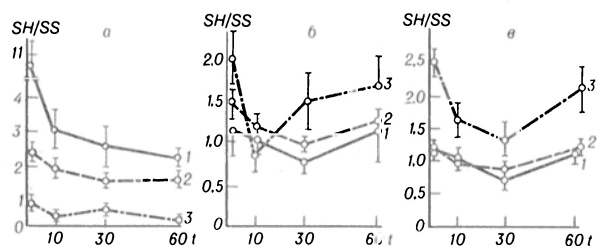


Рис. 1. Изменение тиолдисульфидного соотношения в низкомолекулярной фракции крови (1), в головном мозгу (2) и печени (3) неполовозрелых (а), взрослых (б) и старых (в) крыс при действии вибрации продолжительностью 10, 30, 60 мин.

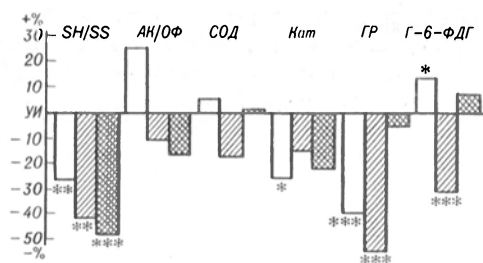


Рис. 2. Изменение состояния компонентов АОС тканей двух-годовалых крыс при действии 30-минутной вибрации.

Здесь и на рис. 3 и 4 УИ — уровень исходного состояния показателей у интактных крыс соответствующего возраста; светлые столбики — показатели в крови, столбики с косой штриховкой — в головном мозгу, столбики с двойной косой штриховкой — в печени, достоверность различий показателей интактных и подопытных крыс по критерию Стьюдента: одна звездочка — $p < 0,05$, две — $p < 0,01$, три — $p < 0,001$.

тальные звенья АОС, используя экспозицию 30 мин.

Наиболее низкое исходное тиолдисульфидное и аскорбатное соотношение, а также активность СОД и каталазы мы обнаружили в крови и тканях головного мозга старых крыс. Воздействие вибрации вызывает еще более глубокое окисление низкомолекулярных тиолов, что сопровождается изменением активности Г-6-ФДГ, ГР, Кат в эритроцитах и цитозоле головного мозга (рис. 2).

В печени старых животных содержание низкомолекулярных тиолов и активность СОД максимальны; действие стресс-фактора не отражается на активности антиоксидантных ферментов печени.

В крови неполовозрелых и взрослых животных отмечаются высокий уровень восстановленности в системах низкомолекулярных тиолов и АК, а также большая, чем у старых крыс, активность СОД. Кратковременная вибрация приводит лишь к накоплению окисленных эквивалентов низкомолекулярных антиоксидантов и уменьшению активности Кат. В этом случае на активность Кат, по-видимому, влияют два фактора. Во-первых, по мере окисления глутатиона увеличивается возможность образования неактивного комплекса, смешанного дисульфида фермента и глутатиона [6]. Во-вторых, в тканях уменьшается концентрация АК, которая снижается более выражено в плазме крови месячных крыс (рис. 3, 4).

При анализе изменений состояния АОС тканей головного мозга неполовозрелых и взрослых крыс, подвергавшихся действию вибрации, обращает на себя внимание синергизм функционирования двух систем низкомолекулярных биоантиоксидантов. Наиболее высокий уровень восстановленности в системе низкомолекулярных тиолов наблюдается

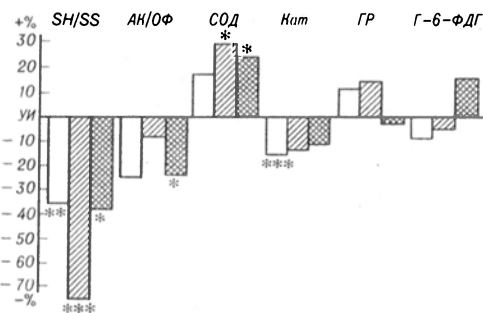


Рис. 3. Изменение состояния компонентов АОС тканей 30-дневных крыс при действии 30-минутной вибрации.

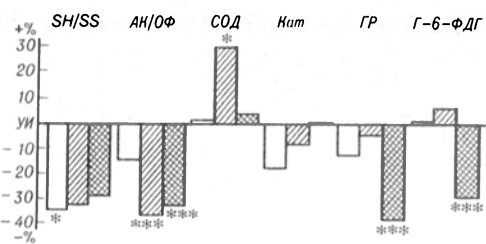


Рис. 4. Изменение состояния компонентов АОС тканей 9-месячных крыс при действии 30-минутной вибрации.

у месячных животных, а в системе АК — у взрослых особей. Окисление происходит в первую очередь в тех системах, где степень восстановленности максимальна и, следовательно, легче протекает прямая реакция. При этом увеличивается активность СОД цитозоля головного мозга, но активность тиоловых ферментов АОС (Г-6-ФДГ, ГР) не страдает. Отсутствие изменений активности Кат можно объяснить тем, что фермент, с одной стороны, активируется перекисью водорода, которая более интенсивно образуется в супероксиддисмутазной реакции, а с другой стороны, ингибируется в ходе окисления глутатиона и АК.

В печени неполовозрелых крыс низкие исходные значения SH/SS компенсируются высоким уровнем восстановленности в системе АК, которая и выступает в этом случае как ведущий антиоксидант. Адаптивное увеличение активности СОД в цитозоле печени также способствует сохранению активности Г-6-ФДГ, ГР и Кат. В печени 9-месячных животных низкое содержание АК и тиолов в сочетании с невысокой активностью Кат приводит к выраженному угнетению активности ГР и Г-6-ФДГ.

Таким образом, к механизмам срочной адаптации к действию вибрации следует отнести наиболее мощные звенья АОС, участвующие в непосредственном разрушении свободных радикалов, а именно СОД и окислительно-восстановительные системы низкомолекулярных тиолов и АК. Если защита с помощью этих звеньев осуществляется не полностью, то под влиянием свободных радикалов может угнетаться активность тиоловых ферментов АОС (ГР, Г-6-ФДГ) и происходить накопление неактивной глутатион-S-S-каталазы, что может способствовать дальнейшему нарушению функционирования АОС и появлению патологических изменений в организме. Напротив, если стационарный уровень буферной емкости достаточно высок, то после некоторого напряжения в системе, связанного с увеличением активности антиоксидантных ферментов и повышением биосинтеза низкомолекулярных компонентов, можно ожидать наступление устойчивой адаптации.

Исходя из наших данных, способность АОС противостоять 30-минутному действию вибрации зависит от состояния функциональной активности АОС и минимальна в крови и головном мозгу у старых крыс и в печени у взрослых животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воскресенский О. Н. // Итоги науки и техники: Общие проблемы биологии. — М., 1986. — Т. 5. — С. 163—201.
2. Дмитриев А. С., Пушкарьчук А. А., Тропникова Г. К. //

- Медиаторы в норме и патологии.— Казань, 1979.— С. 112—113.
3. Макаров В. Г. // Флюктуации состояния биохимических систем.— Л., 1986.— С. 12—18.
 4. Меерсон Ф. З. Адаптация, стресс и профилактика.— М., 1981.
 5. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен): Учеб. пособие / Под ред. М. И. Прохоровой.— Л., 1982.
 6. Панченко Л. С., Олферьев А. М., Уваров В. Ю., Коннершлегер К. // Всесоюзный симпозиум «Окислительные ферменты животной клетки и регуляции их активности»: Тезисы докладов.— Горький, 1978.— С. 25.
 7. Плохинский Н. А. Алгоритмы биометрии.— М., 1980.
 8. Соколовский В. В., Лебедева Л. В., Лизлуп Т. Б. // Лаб. дело.— 1974.— № 3.— С. 160—162.
 9. Соколовский В. В., Белозерова Л. А., Огурцова Р. Е. // Там же.— 1977.— № 1.— С. 26—27.
 10. Соколовский В. В., Макаров В. Г., Тимофеева В. М. // Журн. эволюц. биохим. и физиол.— 1988.— Т. 24, № 5.— С. 771—775.
 11. Соколовский В. В. // Вопр. мед. химии.— 1988.— № 6.— С. 2—11.
 12. Чумаков В. Н., Осинская Л. Ф. // Там же.— 1979.— № 5.— С. 712—716.
 13. Bergmeyer H. U. // Methods of enzymatic Analysis.— New York, 1963.— P. 886—888.
 14. Beutler E. Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods.— New York, 1975.
 15. Cutler R. G. // Mol. Biol. Aging.— New York, 1985.— P. 15—73.
 16. Phillips B. L., Chong G. S., Coule S., Levine S. // Neurobiol. Aging.— 1983.— Vol. 4, N 2.— P. 133—138.

Поступила 25.09.89

AGE-DEPENDENT STATE OF THE ANTIOXIDATIVE SYSTEM IN RAT TISSUES AFTER SHORT-TERM VIBRATION

V. G. Makarov, V. M. Timofeeva

Sanitary-Hygienic Medical School, Leningrad

Oxidation of low molecular thiols and ascorbic acid, alterations in superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities were observed in erythrocytes and tissues of rats after short-term total vertical vibration. The rate of alterations found depended on the initial state of the antioxidative system components as well as on the vibration duration. The most pronounced impairments of the antioxidative system were detected in blood and nervous system of old animals in which the initial level of the antioxidative system functional activity was minimal.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 612.351.1 + 612.617].015.1:577.152.112 + 612.351.1 + 612.617].015.3:547.915-39].06:612.273.2

В. С. Шугалей, А. А. Ананян, Н. П. Милютин, Чин Ким Тхий Тхоа

РЕГУЛЯЦИЯ АРГИНИНОМ АКТИВНОСТИ ЦИТОХРОМА Р-450 И ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ПЕЧЕНИ И СЕМЕННИКАХ КРЫС ПРИ ГИПОКСИИ

Ростовский университет

Аргинин используют в качестве лечебного препарата при заболеваниях печени, поскольку он усиливает выброс ряда гормонов, участвует в регуляции биосинтеза белка и нуклеиновых кислот [1, 12]. Реакции трансаминирования, трансгуанидирования и гидролитического расщепления аргинина в тканях приводят к образованию пролина, мочевины, полиаминов, гуанидиновых соединений, обладающих антиоксидантными свойствами и ока-

зывающих влияние на стабильность мембран и активность ферментов [1]. Отмечен защитный эффект аргинина при гипероксии и холодовом стрессе [1, 10]. Наличие гуанидиновой группы, способность к протонированию и образованию сшивок с альдегидами позволяют предположить, что сама молекула аргинина, а не только ее производные, может участвовать в регуляции перекисного окисления липидов (ПОЛ) при экстремальных воздействиях.

Важным показателем состояния мембран при усилении реакций свободнорадикального окисления является активность кислородзависимых мембранно-связанных ферментов, к которым относится цитохром Р-450. Интерес вызвало сопоставление динамики микросомального окисления в печени и семенниках, где цитохром Р-450 участвует в биосинтезе гормонов. Задачей настоящего исследования явилось изучение влияния аргинина на интенсивность ПОЛ и активность цитохрома Р-450 в микросомах печени и семенников крыс при гипоксии.

Методика. Опыты проведены на белых крысах-самцах массой 150—180 г., содержавшихся в стандартных условиях вивария. Животных разделили на 4 группы: 1-я группа — интактные животные, 2-я группа — животные, подвергавшиеся воздействию высотной гипоксии 9000 м над уровнем моря в течение 1 ч в барокамере со щелочным поглотителем; 3-я и 4-я группы — животные, которым внутрибрюшинно вводили аргинин-гидрохлорид в дозе 120 мг на 100 г массы. Через 30 мин после инъекции животных 3-й группы поместили в гипоксическую камеру, как описано выше, животных 4-й группы через 90 мин декантитировали. У животных изыскали печень, перфузировали 1,15 % раствором KCl, семенники очищали от кровеносных сосудов.

Микросомальную фракцию выделяли, как описано ранее [13]. При связывании субстратов окисления цитохромом Р-450 образуется два основных типа комплексов, различающихся по форме дифференциальных спектров поглощения [11]. В связи с этим ферментативную активность цитохрома Р-450 определяли по реакции с амидопирином (субстраты I типа), и анилином (субстрат II типа). Скорость деметилирования амидопирина и гидроксиглирования анилина оценивали по образованию формальдегида и р-аминофенола [7]. Содержание микросомного белка определяли методом Лоури. Об активности ПОЛ в мембранах микросом судили по количеству первичных (диеновые конъюгаты) и конечных (шиффовы основания) молекулярных продуктов ПОЛ. Из мембран экстрагировали липиды [14]. Содержание диеновых конъюгатов оценивали по характерному для них поглощению при 233 нм [4]. Количество шиффовых оснований определяли по интенсивности флуоресценции при 440 нм липидного экстракта (длина волны возбуждающего света 350 нм) [15]. В качестве стандарта использовали раствор сернокислого хирина в 0,1 н. серной кислоте (1 мг в 1 мл). Содержание общих липидов определяли сульфопосфотаниновым методом [9].

Микровязкость липидного бислоя мембран микросом оценивали с помощью флуоресцентного зонда пирена по соотношению интенсивности флуоресценции его эксимеров и мономеров (F_3/F_m) при длине волны возбуждения 334 нм, а микровязкость зон белок-липидного контакта — при максимуме возбуждающего света 286 нм [5]. Известно, что в вязкой среде эксимизация уменьшается [5]. Степень погружения белкового компонента в липидный матрикс мембран определяли по тушению белковой флуоресценции вследствие безызлучательного переноса энергии от триптофанилов мембранных белков на пирен при длине волны возбуждения 286 нм [5]. Суспензию мембран микросом разводили до концентрации фосфолипидов 0,1 мг в 1 мл [16]. Спектры флуоресценции регистрировали на флуоресцентном спектрофотометре «Hitachi 650-60» (Япония).

Достоверность различий между опытными и контрольными группами оценивали по критерию t Стьюдента [8].

Результаты и их обсуждение. В условиях высотной гипоксии наблюдается значительное накопление продуктов ПОЛ в микросомах печени и семенников крыс (табл. 1); уровень

Содержание диеновых конъюгатов и шиффовых оснований в микросомах печени и семенников крыс при гипоксии и внутрибрюшинном введении аргинина

Условия опытов	Диеновые конъюгаты, мкмоль на 1 мг липида		Шиффовы основания, отн. ед. флюоресценции на 1 мг липида	
	печень	семенники	печень	семенники
Контроль	$9,06 \pm 0,93$ (8)	$10,10 \pm 1,85$ (6)	$2,21 \pm 0,22$ (8)	$2,61 \pm 0,36$ (7)
Контроль + аргинин	$10,57 \pm 1,61$ (8)	$8,27 \pm 2,62$ (7)	$2,00 \pm 0,12$ (13)	$2,18 \pm 0,45$ (6)
p	$>0,2$	$>0,2$	$>0,5$	$>0,2$
Гипоксия	$18,20 \pm 1,08$ (9)	$31,23 \pm 2,59$ (6)	$2,83 \pm 0,20$ (11)	$3,21 \pm 0,81$ (7)
p	$<0,001$	$<0,001$	$<0,05$	$>0,05$
Гипоксия + аргинин	$10,53 \pm 2,43$ (7)	$11,27 \pm 2,08$ (9)	$2,42 \pm 0,62$ (8)	$2,99 \pm 0,55$ (7)
p	$>0,5$	$>0,5$	$>0,5$	$>0,5$
p_1	$<0,02$	$<0,001$	$>0,05$	$>0,1$

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3; p — достоверность изменений по отношению к контролю, p_1 — достоверность изменений по отношению к группе с гипоксией; в скобках — число животных.

диеновых конъюгатов возрастает на 100—209 %, а шиффовых оснований — на 28—23 % соответственно. Следует отметить, что в семенниках повышение содержания шиффовых оснований недостоверно вследствие большого разброса данных, что свидетельствует об индивидуальных различиях уровня антиоксидантной защиты в семенниках, не позволяющего протекать процессу ПОЛ до образования конечных продуктов типа шиффовых оснований. Экзогенный аргинин нормализует содержание молекулярных продуктов ПОЛ при гипоксии. Содержание диеновых конъюгатов в микросомах печени и семенников снижается на 42—64 %, а шиффовых оснований — на 15—7 % по сравнению с показателями у животных, подвергавшихся гипоксии без введения аргинина.

Согласно современным представлениям, изменение уровня ПОЛ в мембранах является специфическим механизмом срочной регуляции активности мембранно-связанных ферментов. Известно, что уровень ПОЛ оказывает значительное влияние на активность системы микросомального окисления, и в частности ее основного компонента — цитохрома Р-450. Проведенные исследования показали, что введение аргинина интактным животным, не изменяя уровень ПОЛ в мембранах, значительно активирует цитохром Р-450 в печени

крыс (табл. 2). При этом скорость гидроксилирования анилина увеличивается на 74 %, а деметилирования амидопирина — на 126 % по сравнению с контролем. Пребывание животных в условиях гипоксии вызывает качественно различную реакцию изучаемых изоформ цитохрома Р-450 в печени крыс. Так, скорость гидроксилирования анилина снижается на 44 % по сравнению с контролем при неизменном уровне деметилирования амидопирина. В микросомах семенников вследствие большого разброса данных отмеченные изменения были недостоверны.

Предварительное введение аргинина животным перед сеансом гипоксии активирует обе изучаемые изоформы цитохрома Р-450. Скорость гидроксилирования анилина в печени и семенниках увеличивается на 65—152 %, а деметилирование амидопирина — на 72—148 % соответственно по сравнению с показателями у животных, подвергавшихся гипоксии без введения аргинина.

Анализируя полученные данные, следует заключить, что в условиях гипоксии аргинин нивелирует характерную для этого состояния качественно различную реакцию изучаемых изоформ цитохрома Р-450, он активирует микросомальное окисление не только в печени, но и в семенниках.

Таблица 2

Каталитическая активность цитохрома Р-450 в микросомах печени и семенников крыс при гипоксии и внутрибрюшинном введении аргинина

Условия опытов	Анилин, нмоль/мг/мин		Амидопирин, нмоль/мг/мин	
	печень	семенники	печень	семенники
Контроль	$0,325 \pm 0,038$ (10)	$0,013 \pm 0,002$ (8)	$3,150 \pm 0,060$ (9)	$0,194 \pm 0,021$ (7)
Контроль + аргинин	$0,567 \pm 0,041$ (14)	$0,014 \pm 0,002$ (9)	$7,130 \pm 0,760$ (12)	$0,260 \pm 0,050$ (5)
p	$<0,001$	$>0,1$	$<0,001$	$>0,1$
Гипоксия	$0,184 \pm 0,025$ (11)	$0,009 \pm 0,002$ (7)	$3,110 \pm 0,032$ (8)	$0,228 \pm 0,046$ (6)
p	$<0,01$	$>0,1$	$>0,1$	$>0,1$
Гипоксия + аргинин	$0,304 \pm 0,024$ (7)	$0,022 \pm 0,003$ (8)	$5,350 \pm 0,939$ (13)	$0,565 \pm 0,051$ (5)
p	$>0,1$	$<0,02$	$<0,01$	$<0,001$
p_1	$<0,001$	$<0,002$	$<0,01$	$<0,002$

F_3/F_m и тушение белковой флюоресценции (ΔF) ниреном в мембранах микросом печени крыс при гипоксии и внутрибрюшинном введении аргинина

Показатель	Контроль	Контроль+аргинин	Гипоксия	Гипоксия+аргинин
F_3/F_m при возбуждении 334 нм	0,46±0,04 (10)	0,62±0,02 (5)	0,39±0,03 (7)	0,53±0,05 (10)
p		<0,001	>0,05	>0,05
p_1				<0,05
F_3/F_m при возбуждении 286 нм	0,44±0,05 (11)	0,51±0,03 (9)	0,25±0,05 (8)	0,46±0,03 (8)
p		>0,1	<0,05	>0,1
p_1				<0,05
ΔF , отн. ед. флюоресценции	12,67±1,08 (9)	19,57±0,78 (7)	11,50±0,69 (10)	12,12±1,17 (8)
p		<0,001	>0,05	>0,1
p_1				>0,1

Увеличение активности цитохрома Р-450 при гипоксии под влиянием аргинина требует более глубокого изучения механизмов его регуляции. Учитывая особенности химической структуры аргинина, можно предположить, что он может влиять на мембраны, изменяя их структурные характеристики.

Как следует из табл. 3, экзогенный аргинин снижает относительную микровязкость липидного бислоя в микросомальных мембранах печени, о чем свидетельствует повышение на 35 % степени эксимеризации пирена. Соотношение E_3/F_m (при длине волны возбуждающего света 286 нм), характеризующее относительную микровязкость зон белок-липидного контакта [9], не изменяется. Структурные перестройки в мембранах микросом печени под влиянием аргинина повышают эффективность безызлучательного переноса энергии с триптофана мембранных белков на пирен. Введение аргинина повышает тушение собственной флюоресценции белков пиреном в микросомальных мембранах на 54 %, что указывает на повышение степени погруженности белков в липидный матрикс мембран. Таким образом, аргинин оказывает значительное влияние на структурное состояние микросомальных мембран в норме.

Напротив, при гипоксии снижается соотношение F_3/F_m (при длине волны возбуждающего света 286 нм) на 45 %, что свидетельствует об увеличении относительной микровязкости зон белок-липидного контакта. Введение аргинина животным перед сеансом гипоксии препятствует характерному для гипоксического состояния увеличению микровязкости мембран. При гипоксии, так же как и в норме, аргинин снижает относительную микровязкость липидного бислоя на 36 %, а зон белок-липидного контакта на 84 % по сравнению с животными в состоянии гипоксии.

Таким образом, усиление ПОЛ при гипоксии повышает относительную микровязкость зон белок-липидных контактов микросомальных мембран печени, что может явиться причиной снижения скорости гидроксирования анилина, взаимодействующего с цитохромом в области гема [3]. В то же время скорость деметилирования амидопирин — субстрата I типа, образующего комплекс с ферментом в гидрофобной части молекулы [3], не изменяется.

Аргинин, проявляя антиоксидантные свойства, активирует обе исследованные изоформы цитохрома Р-450, при этом отмечено снижение микро-

вязкости липидного бислоя и повышение степени погруженности белков в мембраны.

Можно предположить, что, так же как низкомолекулярные полиолы, аргинин проникает в липидный бислой и повышает степень гидратации и латеральную подвижность фосфолипидов [6]. С другой стороны, фосфатидилхолин является важнейшим фосфолипидом и эффектором цитохрома Р-450 [2]. Вероятно, одинаковый заряд молекулы фосфатидилхолина и аргинина позволяет последнему выступать в роли своеобразного активатора цитохрома Р-450.

Таким образом, аргинин является активным внутриклеточным регулятором. При гипоксии он, проявляя свойства антиоксиданта, препятствует усилению ПОЛ, вызывает структурные перестройки мембран, снижает микровязкость зон белок-липидного контакта и повышает активность мембранно-связанного фермента — цитохрома Р-450 — в микросомах печени и семенников крыс. Введение аргинина может быть полезным при гипоксических состояниях, для стимуляции трансформации ксенобиотиков системой микросомального окисления печени, для активации синтеза гормонов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аминокислоты, их производные и регуляция метаболизма / Под ред. З. Г. Броницкой, 1983.
2. Бурлакова Е. Б., Джалилова М. И., Гвахария В. О. и др. // Биоантиоксиданты в регуляции метаболизма в норме и патологии. — М., 1982. — С. 113—140.
3. Винер Р. И., Новиков К. Н., Козлов Ю. Л., Каган В. Е. // Бюл. экпер. биол. — 1987. — № 3. — С. 304—306.
4. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М., 1972.
5. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. — М., 1980.
6. Еремин А. Н., Метелица Д. И. // Биохимия. — 1982. — Т. 47, № 7. — С. 1186—1192.
7. Карузина И. И., Арчаков А. И. // Современные методы в биохимии. — М., 1977. — С. 49—62.
8. Кокунин В. А. // Укр. биохим. журн. — 1975. — Т. 47, № 6. — С. 776—790.
9. Колб В. Г., Камышников В. С. Справочник по клинической химии. — Минск, 1982.
10. Кричевская А. А., Лукаш А. И., Броницкая З. Г. Биохимические механизмы кислородной интоксикации. — 1980.
11. Мазуров А. В., Тверитинов В. И., Карякин А. В., Арчаков А. И. // Биохимия. — 1980. — Т. 45, № 5. — С. 33—38.
12. Неклюдов А. Д. // Антибиотики. — 1990. — № 4. — С. 51—55.
13. Пугалей В. С., Ананян А. А., Козьмин В. В. // Вопр. мед. химии. — 1988. — № 8. — С. 62—64.
14. Bligh E., Dyer W. G. // Canad. biochem. Physiol. — 1959. — Vol. 37, N 8. — P. 911—917.

15. Bidlack W. R., Tappel A. L. // Lipid.— 1973.— Vol. 8, N 4.— P. 203—209.
16. Hartman L., Elias M., Cardoso T., Esteves W. // Analyst.— 1980.— Vol. 105, N 1247.— P. 173—176.

Поступила 13.11.89

EFFECT OF ARGININE ON CYTOCHROME P-450 ACTIVITY AND LIPID PEROXIDATION IN RAT LIVER AND TESTICULAR TISSUES DURING HYPOXIA,

V. S. Shugaley, A. A. Ananyan, N. P. Milyutina, Chin Kim Tchi Tchoa

Institute of Biology, State University, Rostov-on-Don

Arginine, preadministered intraperitoneally at a dose of 120 mg per 100 g of body mass before hypoxia, decreased content of diene conjugates by 42-64 % and Schiff bases by 7-15 % in rat liver and testicular microsomal membranes as compared with control rats nontreated with arginine. Under these conditions cytochrome P-450 catalytic activity with aniline as a substrate was increased by 65-152 % and with amidopyrine as a substrate — by 72-148 %, respectively. Exogenous arginine inhibited an increase in membranes microviscosity, specific for hypoxic state; relative microviscosity of lipid bilayer was decreased by 36 % and of the protein-lipid contact zones — by 84 % as compared with control hypoxic animals.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616.12-005.4+616.127-005.8]-092.9-085.272.4.014.425

Г. С. Полюхович, Л. П. Васильева, Г. Т. Маслова, Т. Л. Боборико, С. Д. Сперанский

ЭФФЕКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ АНТИОКСИДАНТОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИШЕМИИ И ИНФАРКТЕ МИОКАРДА У КРЫС

Белорусский университет им. В. И. Ленина, Минск

Активация перекисного окисления липидов (ПОЛ) является общим звеном многих патологических процессов, в том числе ишемии и инфаркта миокарда [1, 11, 13, 22]. В последние годы уделяется все больше внимания вопросам антиоксидантной коррекции этих повреждений. Показано, что кардиопротекторное действие на ишемизированный и инфарктированный миокард оказывают некоторые природные и синтетические антиоксиданты [5, 6, 10], а также экзогенные антиоксидантные ферменты и их индукторы [6, 7, 21].

В настоящей работе были поставлены две задачи. Во-первых, провести сравнительное изучение на модели коронароокклюзионного инфаркта миокарда защитных свойств известных антирадикальных соединений (витаминов Е, С, кверцетина — флавонола из группы витамина Р) и новых синтетических препаратов ряда ортобензохинона (ОБХ₂ и ОБХ₃), которые, восстанавливаясь, переходят в диоксибензолы — эффективные ловушки свободных радикалов [9], а также комплексов перечисленных веществ с аскорбиновой кислотой, выступающей как синергист витаминов Е [20], Р [12], а возможно, и других антиоксидантов. Во-вторых, провести исследование предполагаемых путей реализации антинекротического эффекта через ингибирование избыточного ПОЛ в кардиомиоцитах, мембранопротекторное действие и активацию ферментативной антиокислительной системы миокарда.

Методика. Исследования выполнены на крысах линии Вистар под гексеналовым или тиопенталовым наркозом. Экспе-

риментальные ишемии и инфаркт миокарда создавали лигированием нисходящей ветви левой коронарной артерии на 2 мм ниже ее основания [23].

Подопытным животным вводили следующие вещества: аскорбиновую кислоту (50 мг на 100 г массы тела) внутрибрюшинно в течение 3 дней; витамин Е (в виде α -токоферола ацетата 50 мг/кг) и кверцетин (20 мг/кг) внутривенно, ОБХ₂ и ОБХ₃ (соответственно 50 и 100 мг/кг) внутрибрюшинно за 2 ч до окклюзии коронарной артерии и по 1 разу на 2-е и 3-и сутки; в случае комплексных инъекций аскорбат вводили в дозе 100 мг на 100 г массы. В контрольной группе крысы с коронароокклюзией получали растворители (5 % раствор глюкозы или подсолнечное масло). Размеры зоны инфаркта на 4-е сутки после коронароокклюзии определяли морфо- и гравиметрически [4].

Биохимические исследования проводили через 15 мин после лигирования коронарной артерии на стадии обратимой ишемии и на 4-е сутки, на стадии некротизации и грануляции, параллельно на 3 группах животных: подопытных, контрольных и ложнооперированных (операция без перевязки коронарной артерии). Сердца тщательно отмывали и перфузировали охлажденным физиологическим раствором, после чего выделяли 3 зоны: зону ишемии или инфаркта, непораженную часть левого желудочка и правый желудочек, у ложнооперированных животных — левый и правый желудочек. В гомогенатах исследуемых зон миокарда определяли активность глутатионпероксидазы (КФ 1.11.1.9) [3], глутатионредуктазы (КФ 1.6.4.2) [24], содержание восстановленного глутатиона [15], изменение уровня первичных продуктов ПОЛ — диеновых конъюгатов [8]. Белок определяли по Лоури [19].

Устойчивость эритроцитарных мембран ложнооперированных, контрольных и подопытных животных на 4-е сутки после операции оценивали по выходу гемоглобина в среду при осмотическом гемолизе, а также по активности каталазы в гемолизате эритроцитов и плазме крови. Активность каталазы определяли по методу [17], концентрацию гемоглобина — по методу [16].

Результаты и их обсуждение. Введение крысам ОБХ₂ и ОБХ₃ не вызывало статистически достоверного защитного эффекта, однако отмечалось уменьшение размеров инфарктного поражения (на 12—14 % по сравнению с контрольными животными), что говорит о перспективности дальнейших изысканий в ряду этих соединений. При их совместных инъекциях с аскорбиновой кислотой сохранялась та же тенденция. Применение аскорбиновой кислоты и кверцетина с аскорбиновой кислотой не давало желаемого результата. Положительное действие α -токоферола проявлялось в заметном сокращении (в 1,6 раза; $p < 0,01$) площади инфарктирования; комплексное введение α -токоферола с аскорбиновой кислотой приводило к еще большему защитному эффекту: зона некроза уменьшалась в 1,8 раза ($p < 0,01$) по сравнению с контролем [2]. Усиление антиокислительных свойств α -токоферола в присутствии аскорбата было показано в экспериментах *in vitro* и в условиях некоторых патологических состояний [14, 18]. По-видимому, система витамин Е — витамин С, функционирующая в цитоплазме клеток и липидной фазе биомембран, является универсальным ингибитором радикальных процессов.

Выяснение конкретных механизмов реализации защитного действия витаминного комплекса показало, что одновременное введение крысам витаминов Е и С в течение 3 дней предотвращало повышение уровня диеновых конъюгатов, наблюдавшееся в зоне повреждения миокарда у контрольных животных (табл. 1), что может свидетельствовать о снижении интенсивности ПОЛ.

В то же время витамины Е и С увеличивали устойчивость мембран эритроцитов инфарктированных крыс к осмотическому гемолизу. Так, кон-

Уровень диеновых конъюгатов (D_{233} на 1 г ткани) в различных отделах сердца крыс при экспериментальных ишемии и инфаркте миокарда без введения и на фоне введения витаминов Е и С

Условия опыта	Ложная операция		Контроль (ишемия или инфаркт + подсолнечное масло)			Опыт (витамины Е и С + ишемия или инфаркт)		
	левый желудочек (1)	правый желудочек (2)	левый желудочек		правый желудочек (5)	левый желудочек		правый желудочек (8)
			зона поражения (3)	непораженный (4)		зона поражения (6)	непораженный (7)	
Ишемия	11,0±0,50	10,12±0,37	10,95±0,60	10,50±0,60	9,73±0,57	11,26±0,59	11,49±0,57 ↑ 9,4 %	11,48±0,95 ↑ 18 %
Инфаркт миокарда	9,75±0,56	9,95±0,89	13,15±1,16 ↑ 34,7 %*	11,62±0,83 ↑ 19 %	10,75±0,87 ↑ 8,0 %	10,30±0,69 ↓ 21,7 %*	12,44±0,73 ↑ 7,0 %	11,57±0,82 ↑ 7,6 %

Примечание. Здесь и в табл. 3 сравнивали столбцы: 1—3, 1—4, 2—5, 3—6, 4—7, 5—8. ↓ — снижение, ↑ — повышение уровня; звездочка — достоверные изменения при $p < 0,05$.

центрация гемоглобина в гемолизатах эритроцитов подопытных животных достоверно ниже, чем таковая контрольных и ложнооперированных (стрессорное, болевое воздействие; табл. 2), что связано, по-видимому, с меньшим повреждением мембран эритроцитов подопытных крыс и соответственно меньшим выходом гемоглобина после лизиса клеток. Подтверждением этому служит и тот факт, что в подопытных гемолизатах активность каталазы — цитоплазматического фермента — также значительно ниже (см. табл. 2).

Данные об активности каталазы в плазме крови позволяют косвенно судить и о целостности мембран кардиомиоцитов. Достоверное повышение активности каталазы плазмы крови у крыс с инфарктом миокарда по сравнению с таковой ложнооперированных животных (см. табл. 2) можно объяснить выходом каталазы в кровяное русло из поврежденных кардиомиоцитов, а существенное снижение ее активности после проведения антиоксидантной терапии (см. табл. 2) — стабилизацией мембран кардиомиоцитов и эритроцитов. Вероятно, введение α -токоферола с аскорбатом восполняло недостаток эндогенного токоферола, который, являясь структурным компонентом липидной фазы мембран, расходовался на процессы гашения свободных радикалов, образующихся при стрессорном и инфарктном повреждении.

Таблица 2

Концентрация гемоглобина (в $\text{мкмоль/мл} \cdot 10^{-3}$), активность каталазы (в $\text{мкмоль/мин} \cdot \text{мл} \cdot 10^3$) в гемолизате эритроцитов, активность каталазы (в $\text{мкмоль/мин} \cdot \text{мл}$) в плазме крови крыс с ложной операцией, инфарктом миокарда и инфарктом на фоне введения витаминов Е и С

Показатель	Ложная операция (1)	Инфаркт миокарда (2)	Инфаркт миокарда на фоне витаминов Е и С (3)
Концентрация гемоглобина в гемолизате эритроцитов	54,2±3,05	52,7±2,86	38,7±1,97*
Активность каталазы в гемолизате эритроцитов	37,2±2,4	35,4±1,8	19,8±1,8*
Активность каталазы в плазме крови	40,2±6,0	79,2±12,0**	31,8±3,0*

Примечание. Число животных в группах равно 10. Одна звездочка — достоверные различия ($p < 0,01$) между столбцами 2 и 3, две — достоверные различия ($p < 0,02$) между столбцами 1 и 2.

Изучали также влияние витаминов на активность антиоксидательных ферментов и содержание восстановленного глутатиона в динамике развития ишемии и инфаркта миокарда (за исходные величины принимали их значения у ложнооперированных крыс).

После 15-минутной окклюзии левой коронарной артерии активность глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы и содержание глутатиона снижались. Активность глутатионпероксидазы статистически достоверно снижалась в зоне ишемии на 17,1 %, активность глутатионредуктазы — в зоне ишемии и правом желудочке соответственно на 28 и 21,8 %, содержание глутатиона существенно убывало во всех 3 зонах на 36,6—50,8 % (табл. 3).

К 4-м суткам развития инфаркта миокарда активность ферментов и содержание глутатиона в целом возрастали, достигая исходных величин или даже превышая их. Возможно, эти изменения носили компенсаторный характер. Повышение активности глутатионредуктазы в зоне поражения (в 3 раза) и пограничных участках левого желудочка (в 1,5 раза) сопровождался увеличением в них количества восстановленного глутатиона до исходного уровня, в то же время в правом желудочке низкая активность глутатионредуктазы и достоверное возрастание активности глутатионпероксидазы (на 36,7 %) коррелировали с отсутствием изменений в содержании глутатиона.

На фоне комплексного введения витаминов Е и С активность глутатионпероксидазы во всех зонах миокарда незначительно снижалась в период обратимого ишемического повреждения и достоверно (на 24,3—35,4 %) — на стадии некротизации и грануляции; активность глутатионредуктазы не изменялась ни в том, ни в другом случае; не наблюдалось статистически достоверных изменений и в содержании глутатиона. Следовательно, опосредованного защитного эффекта витаминного комплекса в условиях ишемии и инфаркта миокарда через активацию антиоксидантных ферментных клеточных систем не выявлено.

Таким образом, из числа исследованных антиоксидантов (аскорбат, α -токоферол, кверцетин, ОБХ₂ и ОБХ₃) и их комплексов с витамином С наибольшее антинекротическое действие на модели экспериментального инфаркта миокарда оказывал комплекс витаминов Е и С. При его применении у крыс с ишемией и инфарктом миокарда

Активность глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы (в мкмоль/мин на 1 мг белка), содержание восстановленного глутатиона (в мкмоль на 1 мг белка) в различных отделах сердца крыс при экспериментальных ишемии и инфаркте миокарда без введения и на фоне введения витаминов Е и С

Фермент	Условия опыта	Локальная операция				Контроль (ишемия + подсолнечное масло)				Опыт (витамины Е и С + ишемия)			
		правый желудочек		левый желудочек		правый желудочек		левый желудочек		зона поражения		неповрежденный	
		левый (1)	правый (2)	левый (3)	правый (4)	левый (5)	правый (6)	левый (7)	правый (8)				
Глутатионпероксидаза	Ишемия 15 минут	1,43±0,07	1,38±0,09	1,18±0,08 ↓17,1%*	1,30±0,10 ↓9,2%*	1,14±0,08 ↓16,9%*	1,13±0,04 ↓4,2%*	1,15±0,09 ↑11,5%*	1,04±0,09 ↓8,8%*				
	Инфаркт 4 е сутки	1,51±0,07	1,22±0,07	1,61±0,05 ↑6,6%*	1,36±0,07 ↓9,9%*	1,67±0,10 ↑36,7%*	1,04±0,07 ↓35,4%*	1,03±0,07 ↓24,3%*	1,15±0,08 ↑31%*				
Глутатионредуктаза	Ишемия 15 мин	0,0391±0,0030	0,0422±0,0028	0,0283±0,0019 ↓28%*	0,0316±0,0026 ↓19%*	0,033±0,0022 ↓21,8%*	0,0287±0,0035	0,0299±0,0019 ↓5,4%*	0,0316±0,0016 ↓4,2%*				
	Инфаркт 4 е сутки	0,0184±0,0022	0,0275±0,0020	0,0571±0,0039 ↓210,3%*	0,0775±0,0025 ↓49,3%*	0,0323±0,0072 ↓17,4%*	0,0552±0,0058 ↓3,3%*	0,0256±0,0017 ↓7%*	0,0319±0,0032 ↓0,475±0,045 ↑13,9%*				
Восстановленный глутатион	Ишемия 15 мин	0,766±0,075	0,847±0,088	0,428±0,029 ↓44%*	0,486±0,032 ↓36,6%*	0,417±0,037 ↓50,8%*	0,509±0,056 ↑13,9%*	0,514±0,055 ↑3,7%*	0,475±0,045 ↑13,9%*				
	Инфаркт 4 е сутки	0,623±0,104	0,811±0,069	0,661±0,082 ↑6%*	0,588±0,132 ↓5,6%*	0,537±0,108 ↓33,8%*	0,485±0,068 ↑26,6%*	0,597±0,069 ↑14,5%*	0,615±0,053 ↑14,5%*				

да отмечались стабилизация ПОЛ в кардиомиоцитах, увеличение устойчивости биомембран, в то же время отсутствовали существенные изменения в антиоксидантной ферментной системе, на основании чего ведущим механизмом защитного действия витаминного комплекса следует считать антирадикальный.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бурлакова Е. Б. // Кардиология.— 1980.— № 8.— С. 48—52.
2. Васильева Л. П., Полюхович Г. С., Маслова Г. Т. и др. // Кислородные радикалы в химии, биологии и медицине.— Рига, 1988.— С. 77—80.
3. Гаврилова А. Р., Хмара Н. Ф. // Лаб. дело.— 1987.— № 12.— С. 721—724.
4. Коган А. Х., Миезгомбын А., Лосев Н. И. и др. // Пат. физиол.— 1984.— № 5.— С. 80—82.
5. Коновалова Г. Г., Черпаченко Н. М., Ланкин В. З. и др. // Бюл. exper. биол.— 1984.— № 8.— С. 153—156.
6. Коновалова Г. Г., Ланкин В. З. // Кислородные радикалы в химии, биологии и медицине.— Рига, 1988.— С. 130—132.
7. Коновалова Г. Г., Ланкин В. З., Богословская О. А. и др. // Бюл. exper. биол.— 1989.— № 12.— С. 154—157.
8. Костюк В. А., Потапович А. И., Лукец Е. Ф. // Вопр. мед. химии.— 1984.— № 4.— С. 125—127.
9. Костюк В. А., Потапович А. И. // Кислородные радикалы в химии, биологии и медицине.— Рига, 1988.— С. 43—45.
10. Кудрин А. Н., Нужный В. П., Николаев С. М. // Фармакол. и токсикол.— 1977.— № 6.— С. 706—709.
11. Ланкин В. З., Коган А. Х., Ковалевская А. Л. и др. // Бюл. exper. биол.— 1982.— № 5.— С. 58—60.
12. Машковский М. Д., Лекарственные средства.— Минск, 1987.— Ч. 2.— С. 526.
13. Меерсон Ф. З., Каган В. Е., Архипенко Ю. В. и др. // Кардиология.— 1981.— № 12.— С. 55—60.
14. Морозкина Т. С., Шкробнева Н. М., Полякова Ф. И. и др. // Здравоохр. Белоруссии.— 1988.— № 8.— С. 39—42.
15. Beutler E., Dubon O., Kelly B. // J. Lab. clin. Med.— 1963.— Vol. 61.— P. 882—888.
16. Drabkin D. Z., Austin J. H. // J. biol. Chem.— 1932.— Vol. 94, N 4.— P. 719—722.
17. Hugo Aebi // Meth. Enzymol.— 1984.— Vol. 105.— P. 121—126.
18. Leibler D. C., Kling D. S., Reed D. J. // J. biol. Chem.— 1986.— Vol. 261.— P. 1214—1219.
19. Lowry O. H., Passoneau J. V. // Ibid.— 1964.— Vol. 239.— P. 31—35.
20. McCay P. B. // Ann. Rev. Nutr.— 1985.— Vol. 5.— P. 323—340.
21. Naslund U., Haggmark S., Jahanesson I. et al. // J. molec. cell. Cardiol.— 1986.— Vol. 18, N 10.— P. 1077—1084.
22. Rao P. S., Cohen M. V., Mueller H. S. // Ibid.— 1983.— Vol. 15, N 10.— P. 713—716.
23. Selye H., Bajusz E., Grasso F. // Angiology.— 1960.— N 11.— P. 398—408.
24. Wendell P. Z. // Biochim. biophys. Acta.— 1968.— Vol. 159.— P. 179—181.

Поступила 22.08.89

EFFICIENCY OF SOME ANTIOXIDANTS IN ISCHEMIA AND MYOCARDIAL INFARCTION OF RATS

G. S. Polyukhovich, L. P. Vasil'eva, G. T. Maslova, T. L. Boboriko, S. D. Speransky

Byelorussian State University, Minsk

Complex of vitamins E and C showed the most effective antinecrotic action in rats with simulated myocardial infarction in series of antioxidants studied: ascorbate, α -tocopherol, quercetine, derivatives of o-benzoquinone OBQ₂ and OBQ₃. Stabilization of lipid peroxidation in cardiomyocytes, increase in biomembranes stability and absence of distinct alterations in the antioxidant enzymatic system were found in rats with ischemia and myocardial infarction after treatment with the complex. Protective effect of the vitamins E and C complex was realised via antiradical mechanism.

М. Ш. Промыслов, М. Л. Демчук, Л. И. Левченко,
Е. И. Старикова

ВЛИЯНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЦНС НА ПРОЦЕССЫ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ МОЗГА ПРИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Институт нейрохирургии им. Н. Н. Бурденко АМН СССР, Москва

Общей реакцией мозга на повреждение являются интенсификация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в нем и резкое подавление одной из его важнейших защитных реакций — антиоксидантной активности (АОА) [11]. Это, вероятно, связано с тем, что ткань мозга особенно подвержена воздействию свободных радикалов из-за ее значительного липидного компонента [12]. Активация быстропротекающих свободнорадикальных патологических реакций, инициируемых активными кислородными частицами, ведет к изменению физико-химических и структурных свойств биологических мембран клеток мозга и накоплению в нем токсичных продуктов ПОЛ [13, 15]. Именно нарушение этих процессов является первичным при черепно-мозговой травме (ЧМТ), и оно запускает всю цепь последующих нарушений обмена веществ в тканях мозга.

Использование антиоксидантов или ингибиторов ферментных систем для воздействия с целью регуляции этих процессов не всегда применимо при заболеваниях нервной системы в силу особенностей гематоэнцефалического барьера. В этих условиях важнейшим фактором, влияющим на обменные процессы мозга, может стать направленное изменение функционального состояния ЦНС.

Методика. Исследование проводили на кроликах-самцах породы шиншилла массой 2,5—3 кг. ЧМТ средней тяжести наносили стандартным методом [5].

С целью регуляции функционального состояния ЦНС травмированных животных были использованы в качестве стимуляторов фенамин и пиррацетам, для торможения ЦНС применяли люминал. Препараты вводили животным на 5-й минуте после травмы: фенамин — подкожно в дозе 0,6 мг на 1 кг массы животного, пиррацетам — внутривенно в дозе 150 мг/кг, люминал — внутривенно в дозе 15 мг/кг в 1 мл 30 % спиртового раствора. В таких же дозах вводили препараты контрольным животным.

Животных забивали воздушной эмболией через 1 сут после нанесения травмы, что связано с максимальным нарушением процессов дыхания и окислительного фосфорилирования в мозгу в этот период у подопытных животных [4]. Контрольных животных забивали через 1 сут после введения препаратов. Извлечение мозга и все последующие операции с ним производили на холоду. Ткань мозга гомогенизировали в фосфатно-солевом буфере pH 7,4 при соотношении ткань мозга:буфер 1:9.

Экстракцию липидов проводили методом Фолча. Содержание диеновых конъюгатов (ДК) определяли на спектрофотометре СФ-46 по поглощению растворов липидов в системе метанол — гексан (5:1) при длине волны 232 нм [10].

Основания Шиффа (ОШ) регистрировали по интенсивности флуоресценции хлороформенных растворов липидов на спектрофлуориметре «Hitachi-MPF 2a» при длине волны возбуждающего света 360 нм и максимуме испускания 420—440 нм. Контролем служила флуоресценция сернокислого хинина в 0,1 н. серной кислоте (1 мг/мл), интенсивность которого принимали за 100 % [16].

Содержание малонового диальдегида (МДА) определяли флюориметрическим методом [9].

О суммарной АОА судили по торможению накопления МДА при инкубации модельной системы при 37 °С в течение 60 мин. В качестве субстрата окисления нами была выбрана линоленовая кислота [10].

Результаты и обсуждение. Как показано нами ранее [2], при экспериментальной ЧМТ наблюдается нарастание продуктов ПОЛ при одновременном снижении АОА мозга.

Учитывая то обстоятельство, что нервная система на всякое патологическое раздражение отвечает, как правило, нарушением нормальных соотношений между возбуждательным и тормозным процессами, мы исследовали влияние на течение процессов ПОЛ ткани мозга травмированных животных веществ, стимулирующих или тормозящих деятельность ЦНС.

Одним из традиционных, используемых в эксперименте психостимуляторов, является фенамин [6]. Действие фенамина на ЦНС, по мнению авторов, основано на стимуляции поглощения кислорода тканями мозга и повышении резистентности животных к аноксии [14]. Как видно из представленных данных (табл. 1), у животных, получавших фенамин после травмы, отмечается достоверное (до уровня нормы) снижение концентрации всех исследованных продуктов ПОЛ во всех отделах мозга по сравнению с таковым у травмированных животных. При этом АОА во всех отделах мозга достигает величин, близких к контрольным.

Таким образом, стимуляция нервной системы травмированного животного фенамином оказывает благоприятное воздействие на течение процессов ПОЛ в ткани мозга и приводит к быстрому устранению имеющихся нарушений.

Для того чтобы выяснить, является ли нормализация процессов ПОЛ при введении фенамина после ЧМТ результатом его стимулирующего действия на ЦНС или его собственного антиоксидантного эффекта, нами была проведена серия экспериментов, в которых определяли АОА фенамина в пробах с гомогенатом мозга кролика [7] и линоленовой кислотой. Оказалось, что фенамин не обладает АОА. Поэтому отмеченное нами благоприятное действие фенамина следует отнести к его стимулирующему эффекту на нервную систему.

Мы исследовали также влияние другого психостимулятора — пиррацетама [8] — на процессы ПОЛ мозга при ЧМТ. В последнее время в литературе появилось много противоречивых данных о влиянии пиррацетама на процессы ПОЛ в мозгу. В одних работах указывают на антиоксидантные свойства пиррацетама [1], в других же, наоборот, описан его активирующий эффект на процессы ПОЛ [3].

Мы исследовали собственную АОА пиррацетама в указанных выше модельных системах и пришли к выводу о его нулевой АОА, что согласуется с данными [17]. В опытах с введением животным пиррацетама после нанесения им ЧМТ установлена та же закономерность, какую мы наблюдали в опытах с фенамином (табл. 2).

Полученные данные дают основание для вывода о том, что как в опытах с фенамином, так и в опытах с пиррацетамом наблюдается нормализация

Таблица 1

Действие фенамина на процессы ПОЛ мозга кроликов при ЧМТ

Показатель	Травма (1)			Травма+фенамин (2)			Норма+фенамин (3)		
	полушарие	ствол	мозжечок	полушарие	ствол	мозжечок	полушарие	ствол	мозжечок
ДК, нмоль на 100 г сырой ткани	33,8±4,4 (8)	31,7±3,0 (8)	39,2±2,0 (8)	12,9±2,2 (5) $p_1<0,001$	11,5±1,9 (5) $p_1<0,001$	14,1±5,1 (5) $p_1<0,001$	12,5±1,3 (5) $p_2>0,05$	13,1±2,0 (5) $p_2>0,05$	12,9±1,3 (5) $p_2>0,05$
МДА, нмоль на 100 г сырой ткани	8,3±0,6 (13)	8,7±0,8 (13)	6,1±0,6 (13)	3,0±0,5 (5) $p_1<0,001$	4,9±1,4 (5) $p_1<0,001$	2,9±0,5 (5) $p_1<0,001$	3,1±0,4 (5) $p_2>0,05$	4,4±0,3 (5) $p_2>0,05$	2,8±0,2 (5) $p_2>0,05$
ОШ, %	177,0±24,2 (5)	192,0±39,0 (5)	168,2±30,0 (5)	65,0±3,9 (5) $p_1<0,01$	63,2±7,4 (5) $p_1<0,02$	69,7±3,3 (5) $p_1<0,01$	55,2±6,1 (5) $p_2>0,05$	55,8±5,9 (5) $p_2>0,05$	57,7±5,2 (5) $p_2>0,05$
АОА, %	0 (6)	20,3±16,9 (6)	0 (6)	63,0±5,1 (6) $p_1<0,05$	64,1±2,5 (5) $p_1>0,05$	59,9±5,2 (5) $p_1<0,05$	80,0±2,6 (5) $p_2<0,05$	81,9±4,3 (5) $p_2<0,05$	79,2±2,1 (5) $p_2<0,05$

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3: p_1 — достоверность различий между столбцами 1 и 2, p_2 — достоверность различий между столбцами 2 и 3; представлены средние арифметические величины ±средние ошибки средних арифметических; в скобках — число опытов.

Таблица 2

Действие пирацетама на процессы ПОЛ мозга кроликов при ЧМТ

Показатель	Травма (1)			Травма+пирацетам (2)			Норма+пирацетам (3)		
	полушарие	ствол	мозжечок	полушарие	ствол	мозжечок	полушарие	ствол	мозжечок
ДК, нмоль на 100 г сырой ткани	33,8±4,4 (8)	31,7±3,0 (8)	39,2±2,0 (8)	16,9±3,3 (5) $p_1<0,01$	22,0±3,8 (5) $p_1<0,05$	15,5±0,5 (5) $p_1<0,02$	14,9±2,1 (5) $p_2>0,05$	15,0±1,0 (5) $p_2>0,05$	17,5±2,0 (5) $p_2>0,05$
МДА, нмоль на 100 г сырой ткани	8,3±0,6 (13)	8,7±0,8 (13)	6,1±0,6 (13)	2,2±0,8 (5) $p_1<0,001$	2,5±0,5 (5) $p_1<0,001$	2,9±0,5 (5) $p_1<0,001$	3,1±0,8 (5) $p_2>0,05$	3,6±0,6 (5) $p_2>0,05$	3,4±0,7 (5) $p_2>0,05$
ОШ, %	177,0±24,2 (5)	192,0±39,0 (5)	168,2±30,0 (5)	81,0±2,2 (5) $p_1<0,001$	93,8±14,9 (5) $p_1<0,05$	67,6±4,4 (5) $p_1<0,01$	62,0±13,3 (5) $p_2>0,05$	77,4±9,0 (5) $p_2>0,05$	76,3±7,3 (5) $p_2>0,05$
АОА, %	0 (6)	20,3±16,9 (6)	0 (6)	77,2±8,4 (5) $p_1<0,05$	78,3±8,5 (5) $p_1<0,05$	87,5±5,4 (5) $p_1<0,05$	74,8±5,8 (5) $p_2>0,05$	74,4±3,0 (5) $p_2>0,05$	69,8±5,2 (5) $p_2>0,05$

процессов ПОЛ, что является следствием стимулирующего ЦНС эффекта использованных препаратов.

Далее представляло интерес выяснить влияние торможения нервной деятельности у подопытных животных на процессы ПОЛ. С этой целью необходимо было подобрать такое спотворное, которое бы не обладало высокой собственной АОА. Наиболее подходящим, на наш взгляд, оказался люминал [18], собственная АОА которого в экспериментах на модельных системах не превышала 10 %. Как следует из табл. 3, значения ДК, МДА и ОШ остаются на достаточно высоком уровне: содержание МДА не отличается от такового при травме во всех отделах мозга, величины ДК и ОШ несколько ниже, чем при травме, но достоверно превышают показатели контрольных животных, получавших ту же дозу люминала. При этом АОА во всех отделах мозга остается на уровне, достоверно не отличающемся от величин, отмеченных при травме.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что после введения спотворного кроликам, перенесшим закрытую ЧМТ, у них наблюдается такая же картина нарушения процессов ПОЛ, как и у животных при ЧМТ без дополнительного воздействия.

Таким образом, показано, что различные функциональные состояния ЦНС животных в первые часы после травмы оказывают различное влияние на течение процессов ПОЛ во всех отделах мозга кроликов, причем состояние возбуждения ЦНС оказывает благоприятное воздействие, направленное на нормализацию этих процессов.

Следовательно, направленным изменением функционального состояния ЦНС при ЧМТ можно регулировать нарушенный обмен веществ в мозгу и восстановить его нормальное состояние, что должно играть важную роль в процессе терапии этого заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бенов Л., Маркова В., Тодорова Я. и др. // Мед.-биол. информ. (София).— 1978.— № 5.— С. 3—7.
2. Демчук М. Л., Левченко Л. И., Промыслов М. III. // Нейрохимия.— 1990.— № 1.— С. 103—105.
3. Карнищенко Н. // Фармакол. и токсикол.— 1986.— № 5.— С. 34—49.
4. Промыслов М. III. // Вестн. АМН СССР.— 1982.— № 9.— С. 81—86.
5. Промыслов М. III., Тиграмян Р. А. // Там же.— 1971.— № 11.— С. 28—31.
6. Радева В. К. // Журн. высш. нервн. деят.— 1951.— № 2.— С. 165—186.
7. Al-Timimi D. L., Dormandy J. L. // Biochem. J.— 1977.— Vol. 168, N 2.— P. 414—431.
8. Bente D. // Arzneimittel-Forsch.— 1978.— Bd 28, N 11.— S. 1529—1530.
9. Csullany A. S., Agas K. // Lipids.— 1976.— Vol. 11.— P. 412—414.
10. Curdus D., Vallbona C., Vogt F. B. et al. // Aerospace Med.— 1965.— Vol. 36.— P. 524—526.
11. Demopoulos H. B., Flamm E. et al. // Pathology of Oxygen.— 1982.— P. 127—155.
12. Demopoulos H. B., Miloy P., Kakari S. // Steroids in Brain Edema / Ed. H. J. Reulen, K. Shurman.— Berlin, 1982.— P. 29—33.
13. Kontos H. A. // Cent. Nerv. Syst. Trauma.— 1986.— Vol. 3, N 4.— P. 257—263.
14. Mann P., Quastel J. // Biochem. J.— 1940.— Vol. 34.— P. 414—431.
15. McCord J. M. // New Engl. J. Med.— 1985.— Vol. 312.— P. 159.
16. Omhawa H., Ohishi N., Jagi K. // Analyt. Biochem.— 1979.— Vol. 95.— P. 351—358.

Таблица 3

Действие люминала на процессы ПОЛ мозга кроликов при ЧМТ

Показатель	Травма (1)			Травма + люминал (2)			Норма + люминал (3)		
	полушарие	ствол	мозжечок	полушарие	ствол	мозжечок	полушарие	ствол	мозжечок
ДК, нмоль на 100 г сырой ткани	33,8±4,4 (8)	31,7±3,0 (8)	39,2±2,0 (8)	21,6±1,8 (5) $p_1 < 0,05$	26,5±1,9 (5) $p_1 > 0,05$	26,9±4,3 (5) $p_1 < 0,05$	13,7±0,5 (5) $p_2 < 0,01$	13,5±1,1 (5) $p_2 < 0,001$	11,0±1,3 (5) $p_2 < 0,001$
МДА, нмоль на 100 г сырой ткани	8,3±0,6 (13)	8,7±0,8 (13)	6,1±0,6 (13)	7,5±0,5 (5) $p_1 > 0,05$	9,6±0,2 (5) $p_1 > 0,05$	7,1±0,5 (5) $p_1 > 0,05$	3,4±0,5 (5) $p_2 < 0,001$	6,3±0,8 (5) $p_2 < 0,01$	3,3±0,2 (5) $p_2 < 0,001$
ОШ, %	177,0±24,2 (5)	192,0±39,0 (5)	168,2±30,0 (5)	138,4±9,2 (5) $p_1 > 0,05$	138,1±12,9 (5) $p_1 > 0,05$	136,1±4,4 (5) $p_1 > 0,05$	86,5±5,3 (5) $p_2 < 0,001$	74,5±7,3 (5) $p_2 < 0,01$	66,3±2,0 (5) $p_2 < 0,001$
АОА, %	0 (6)	20,3±16,9 (6)	0 (6)	12,3±5,0 (5) $p_1 > 0,05$	24,8±9,8 (5) $p_1 > 0,05$	10,0±4,1 (5) $p_1 > 0,05$	51,2±6,4 (5) $p_2 < 0,001$	65,2±3,2 (5) $p_2 < 0,02$	54,2±3,7 (5) $p_2 < 0,001$

17. Pavlik A., Benežová O. // Organic Brain Disorders / Ed. K. Maurer. — Prague, 1988. — P. 19—25.
18. Smith D. S., Rehnöna S., Westberg E. et al. // Acta physiol. scand. — 1979. — Vol. 105. — P. 527—529.

Поступила 16.07.90

INTERRELATIONSHIP BETWEEN FUNCTIONAL STATE OF CENTRAL NERVOUS SYSTEM AND LIPID PEROXIDATION IN BRAIN UNDER CONDITIONS OF EXPERIMENTAL CRANIOCEREBRAL TRAUMA

M. Sh. Promyslov, M. L. Demchuk, L. I. Levchenko, E. N. Starikova

N. N. Burdenko Institute of Neurosurgery, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Interrelationship between the functional state of central nervous system and brain metabolism was studied in animals with craniocerebral trauma. Stimulation of nervous activity was shown to prevent an increase in lipid peroxidation in brain of the experimental animals. A distinct decrease of the brain antioxidative activity was also noted. Lipid peroxidation and antioxidative activity were markedly impaired in the animals with craniocerebral trauma either after depression of central nervous system or without any additional treatment.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616.721-018.3-003.8-06:616.833]-07:[616.154:577.164.11

Э. А. Гриценко, И. П. Черникевич, А. Л. Дмитриев, А. В. Першукевич

МЕТАБОЛИЗМ ТИАМИНА, ЕГО ДИ- И ТРИФОСФОРНОГО ЭФИРОВ В КРОВИ БОЛЬНЫХ С НЕВРОЛОГИЧЕСКИМИ ПРОЯВЛЕНИЯМИ ОСТЕОХОНДРОЗА

Институт биохимии АН БССР, Гродно, Гродненский медицинский институт

Остеохондроз позвоночника — одна из сложных форм патологии соединительной ткани, в этиологии которой до настоящего времени не выделен доминирующий фактор. Согласно современным представлениям [2, 3, 11], неврологические проявления остеохондроза — результат нарушений обменных процессов на уровне целостного организма, приводящих к изменению содержания углеводов, белков крови, состояния микроциркуляторного гомеостаза, ферментного спектра соединительной ткани межпозвоночных дисков [16], катехоламинов и протеогликанов, в частности их небелковой части — гликозаминогликанов [5], уровень которых в соединительной ткани диска является тестом, определяющим его функциональную активность. Авторами многочисленных работ [1, 14, 18, 19] показано, что при этой форме патологии резко нарушаются окислительно-восстановительные процессы за счет метаболических сдвигов в обмене физиологически активных соединений, прямо или косвенно участвующих в работе периферической нервной системы. Наличие антиоксидантных свойств и непосредственное участие тиамина в реакциях окисления — восстановления, поддерживающих биоэнергетический потенциал клетки, позволяет отнести витамин В₁ к числу указанных выше метаболитов [22]. Особого внимания заслуживает наличие адре-

налин-тиаминовой окислительно-восстановительной системы [18], продуктами которой являются тиохром и медиатор симпатического возбуждения симпатин, ответственный за передачу нервного импульса. Функционирование этой системы в совокупности с тиаминдегидрогеназной реакцией обеспечивает реализацию влияния симпатической иннервации на кровеносные сосуды, поддерживает в норме тонус артериол и капилляров и их самостоятельное сокращение, обеспечивая тем самым трофику соединительной ткани [18, 19]. При дефиците витамина В₁ или нарушении обмена адреналина данный механизм отсутствует. В этом, по-видимому, проявляются нейрофизиологическая функция тиамина и его положительный эффект на периферическую нервную систему. С данной точки зрения представляет интерес изучить некоторые показатели обмена тиамина в крови больных остеохондрозом, включая ферменты синтеза и распада его фосфорилированных производных, с целью выявления особенностей метаболизма тиамина при неврологических проявлениях остеохондроза. Сведения по этому вопросу в литературе отсутствуют, хотя известно, что при рецидивирующем характере течения заболевания у больных в первые и последующие сутки снижается аппетит, что может быть причиной временного дефицита тиамина в организме. В этой ситуации фонд свободного тиамина в нервной ткани может быть частично восстановлен за счет его тканевого и межорганного перераспределения, гидролитического расщепления тиаминфосфатов — тиаминдифосфата и тиаминтрифосфата (соответственно ТДФ и ТТФ), как это было показано нами в опытах на животных [8, 12]. Однако дозы тиамина В₁, рекомендуемые в качестве противорецидивных средств при лечении неврологических проявлений остеохондроза [4, 10], назначаются без учета патогенеза клинических синдромов и, самое главное, без должной оценки тиаминового статуса организма больного при поступлении в стационар.

Методика. Обследовано 19 больных мужского и женского пола в возрасте 25—40 лет с неврологическими проявлениями остеохондроза поясничного отдела позвоночника — болями разной интенсивности в области пояснично-крестцового отдела с иррадиацией в одну или обе ноги (люмбаго, люмбаишалгия) с патологическим изменением тонуса мышц спины. Заболевание носило длительный характер — от 1 года до 7 лет. Обследование проводили в период обострения болезни. Поражения дисков L₅—S₁ были подтверждены рентгенологически.

Для исследования обмена тиамина использовали цельную кровь, взятую натощак у больных при поступлении в стационар до назначения лечения. Контролем служила группа доноров со станции переливания крови. Исследовали общий тиамин (сумма свободного тиамина и тиаминфосфатов — ТФ), общий ТДФ, его свободную и связанную формы, ТТФ, неорганический фосфор — Р_н; активность ферментов синтеза и распада тиамина В₁ — тиаминкиназы (Т-киназы, КФ 2.7.6.2), тиаминдифосфаткиназы (ТДФ-киназы, КФ 2.7.4.15), тиаминдифосфатазы (ТДФазы, КФ 3.6.1.6), тиаминтрифосфатазы (ТТФазы, КФ 3.6.1.28), а также транскетолазы (КФ 2.2.1.1) и ТДФ-эффект.

Концентрацию общего тиамина определяли флуориметрическим методом [27] в нашей модификации. Свежую гепаринизированную кровь (0,5 мл) предварительно гемолизировали дистиллированной водой (1:3) в течение 15 мин. Белки осаждали 20 % ТХУ с последующим центрифугированием в течение 15 мин при 3000 об/мин. Полученный центрифугат обрабатывали насыщенным водным раствором эфира до pH 5,0, и содержание общего тиамина рассчиты-

тивали по калибровочному графику с известными концентрациями витамина.

Уровень общего ТДФ определяли ферментативно [31] с помощью дрожжевой апопируватдекарбоксилазы. Активность рекомбинированной в течение 1 ч холопируватдекарбоксилазы (18 °С, 0,05 М фосфатный буфер, pH 6,8), пропорциональной содержанию ТДФ в пробах, фиксировали спектрофотометрически по убыли НАД·Н₂ в присутствии алкогольдегидрогеназы. Свободную и связанную формы ТДФ находили после разделения гемолизатов крови на колонке (1,8×50 см) с сефадексом G-25 [12], предварительно уравновешенной 0,01 М фосфатным буфером, pH 6,8. Содержание ТТФ (в 2 мл крови) определяли флуориметрически [27], фракционируя тиаминфосфаты на SP-сефадексе C-25 [15]. Неорганический фосфор определяли по методу [13].

Тиамин- и ТДФ-киназные активности определяли согласно известным методикам [7, 20], используя в качестве источника ферментов по 0,1 и 0,5 мл крови соответственно. Активность ТДФазы [23] определяли по приросту Р_н после инкубации образцов крови (0,5 мл) при 37 °С в течение 1 ч, активность ТТФазы — по количеству ТДФ, образовавшегося за время инкубации аликвот в стандартных условиях [28]. Транскетолазную активность определяли методом Брунса [24], ТДФ-эффект — согласно общепринятому тесту [25].

Результаты и обсуждение. Исследования метаболизма тиамин, его ди- и трифосфорного эфиров в крови доноров и больных с неврологическими проявлениями остеохондроза (люмбаго, люмбоишиалгия) не выявили выраженных нарушений метаболизма со стороны общего пула тиамин и его физиологически активной коферментной формы — ТДФ — у больных с неврологическими проявлениями остеохондроза (табл. 1). При дифференцированном определении белковосвязанного ТДФ, находящегося в сфере действия ТДФ-зависимых ферментов, и свободного ТДФ, имеющего значительно большую концентрацию и выполняющего депонирующую функцию в крови [9, 12], выявляется его частичное перераспределение в сторону снижения уровня белковосвязанного ($p > 0,1$) и повышения концентрации свободного ТДФ ($p < 0,1$), свидетельствующее о благополучном протекании процессов метаболизма обеих форм кофермента в организме больного. В связи с этим при избытке свободного ТДФ ожидать заметного изменения скорости реакций, протекающих при участии коферментной формы витамина В₁ по-видимому, не приходится, что нашло конкретное подтверждение в результатах исследования активности одного из ключевых энзимов углеводного обмена — ТДФ-зависимой транскетолазы, активность которой в крови больных не отличалась от таковой в крови доноров (табл. 2). Остаются нормальными и показатели второго, широко используемого в клинике теста на обеспеченность организма тиамин, так называемого ТДФ-эффекта ($p > 0,5$).

Однако, как следует из табл. 1, наряду с незна-

Таблица 1

Содержание Р_н тиамин и продуктов его метаболизма (в мкмоль/л) в крови доноров и больных остеохондрозом ($M \pm m$)

Показатель	Доноры	Больные остеохондрозом	p
Общий тиамин (тиамин+ТФ)	0,233±0,009 (43)	0,224±0,014 (19)	>0,5
Общий ТДФ	0,125±0,002 (27)	0,129±0,007 (19)	>0,5
Связанный ТДФ	0,035±0,004 (18)	0,026±0,002 (18)	>0,1
Свободный ТДФ	0,090±0,004 (18)	0,104±0,002 (18)	<0,1
ТТФ	0,066±0,003 (18)	0,034±0,002 (18)	<0,001
Р _н	698±16,0 (29)	539±19,8 (15)	<0,001

Примечание. Здесь и в табл. 2 в скобках — число обследованных.

чительным повышением концентрации свободного ТДФ, субстрата ТДФ-киназной реакции при остеохондрозе снижается уровень ТТФ, ответственного за трансмембранный перенос ионов Na⁺ и проведение нервного импульса [26]. Содержание трифосфорного эфира снижается наполовину. Одновременно достоверно повышается активность специфической тиаминтрифосфатазы крови, катализирующей деградацию ТТФ, что может указывать на усиление его утилизации при заболевании периферической нервной системы. Обращает на себя внимание и тот факт, что в условиях, максимально препятствующих дефосфорилизу ТТФ [8], концентрация последнего в крови достигает 28 % от общего пула витамина (см. табл. 1), существенно превышая тот же показатель, фиксируемый ранее другими исследователями [29, 30], не соблюдавшими в эксперименте приемов блокирования ТТФазной реакции. Полученные результаты подтверждают наше мнение [8], что, помимо непосредственного участия в проведении нервного импульса, трифосфорный эфир тиамин выполняет функцию депо ТДФ, пополняя в условиях его дефицита пул кофермента по механизму активного обмена: ТТФ → ТДФ + Р_н. В таком случае, несмотря на снижение активности ТДФ-синтезирующей системы (см. табл. 2), общий уровень кофермента, в особенности его свободной формы, остается в норме.

Количественное перераспределение тиаминди- и трифосфорного эфиров в крови больных с неврологическими проявлениями остеохондроза коррелирует с активностью ферментов синтеза и деградации фосфатов тиамин, отражаясь преимущественно на скорости протекания тиаминкиназной и тиаминтрифосфатазной реакций (см. табл. 2). Очевидно, что снижение активности тиаминкиназы, регуляторного фермента со стратегическим положением в обмене тиамин [7] приведет к одновременному снижению активности метаболически связанной с ней ТДФ-киназы крови, находящейся к тому же под регуляторным контролем своего продукта — ТТФ. Подключение в такой ситуации адаптивных механизмов регуляции обмена коферментной формы витамина В₁ на фоне локальных биохимических нарушений в соединительной ткани межпозвоночных дисков будет способствовать активации специфической ТТФазы крови и снижению общего уровня ТТФ. В связи с этим становится понятным разнонаправленное, нацеленное на поддержание постоянства концентрации ТДФ регуляторное действие тиаминди- и трифосфатаз.

Таблица 2

Активность ферментов метаболизма тиамин (в нкат), транскетолазы (в мкат) и ТДФ-эффект (в мкат) в крови доноров и больных остеохондрозом ($M \pm m$)

Показатель	Доноры	Больные остеохондрозом	p
Тиаминкиназа	0,805±0,023 (30)	0,467±0,032 (15)	<0,001
ТДФ-киназа	0,063±0,003 (20)	0,049±0,004 (18)	<0,01
ТДФаза	106±0,13 (20)	60,5±0,247 (19)	<0,001
ТТФаза	35,0±0,174 (22)	48,3±0,171 (18)	<0,001
Транскетолаза	15,3±0,44 (29)	15,6±0,61 (19)	<0,5
ТДФ-эффект	15,7±0,14 (29)	15,9±0,22 (19)	>0,5

Конкретный механизм регуляторного контроля тиаминфосфатов пока неясен. Его реализация на уровне углеводного обмена, по-видимому, проблематична — активность транскетолазы и ТДФ-эффект в крови больных остаются исходными. Такое соотношение подтверждается и наличием ряда заболеваний, причиной которых, например, служит недостаточность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, контролирующей первое звено пентозного цикла. Отмеченное нарушение тем не менее не влечет за собой регулярных приступов гемолитической анемии [18]. Совершенно бессимптомно протекает и заболевание, известное под названием «пентозурия», при котором нарушено образование рибозо-5-фосфата.

Наблюдающееся в случае неврологических проявлений остеохондроза снижение активности тиамин- и ТДФ-киназ в крови и P_n ($p < 0,001$) как показателя фосфатного потенциала системы, вероятно, объясняется дефицитом АТФ, возникающим у остеохондрозных больных в условиях гипоксического состояния. Известно, что локальная гипоксия неизменно выявляется при всех формах поражения периферической нервной системы [2] и сопровождается снижением уровня АТФ и накоплением АДФ [17]. Изменение соотношения АТФ/АДФ, а также скорости окисления пирувата [18], аллостерических эффекторов тиаминкиназной реакции [21] в условиях гипоксии окажутся существенным фактором нарушения процесса фосфорилирования тиаминина, влияющим на нормальное протекание реакций цикла Кребса и электрон-транспортной системы [6], контролирующих биоэнергетический потенциал клетки. Регистрируемое у больных остеохондрозом (см. табл. 1) снижение концентрации ТТФ при постоянстве уровня коферментной формы тиаминина — ТДФ, вероятно, может указывать на опосредование такого механизма через гормональные воздействия с помощью активации или ингибирования тиаминовых фосфатаз. Стимуляция путей тканевой утилизации тиаминфосфатов в патогенезе авитаминоза B_1 кортикостероидами считается фактом установленным [6].

Таким образом, результаты количественного определения тиаминфосфатов и активности ферментов его метаболизма в крови доноров и больных с неврологическими проявлениями остеохондроза свидетельствуют, что патологический процесс сопровождается снижением уровня наиболее фосфорилированной формы витамина B_1 — ТТФ при относительно постоянной концентрации коферментной формы — ТДФ. В поддержании метаболического гомеостаза тиаминина основную роль играют ферменты начального и конечного этапов биосинтеза и деградации его фосфорилированных производных. Усиленный процесс утилизации ТТФ, недостаток которого в крови больных, несомненно, будет сказываться на нормализации путей регенерации соединительной ткани межпозвоночных дисков, его высокая проницаемость и более выраженное по сравнению с тиаминном и ТДФ пролонгированное действие [8, 9] позволяют считать, что при заболеваниях периферической нервной системы трифосфорный эфир тиаминина окажется более эффективным лечебным препаратом, чем широко применяемая по настоящее время исходная, полностью дефосфорилированная форма витамина B_1 .

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреев С. В., Значкова А. А., Чечудин Ю. С. // Витамин: физиология, биохимия, клиника. — М., 1962. — С. 5—12.
2. Антонов И. П. // Журн. невропатол. и психиатр. — 1976. — № 6. — С. 808—813.
3. Антонов И. П., Титовец Э. П., Петровский Г. Г. и др. // Периферическая нервная система. — Минск, 1980. — Вып. 3. — С. 18—31.
4. Бротман М. К. Неврологические проявления поясничного остеохондроза. — Киев, 1975.
5. Верес А. И. // Периферическая нервная система. — Минск, 1982. — Вып. 5. — С. 728—734.
6. Виноградов В. В. Гормональные механизмы метаболического действия тиаминина. — Минск, 1984.
7. Воскобоев А. И., Черникевич И. П. // Биоорг. химия. — 1975. — Т. 1. — С. 1489—1497.
8. Воскобоев А. И., Гриценко Э. А., Островский Ю. М. // Вопр. мед. — 1984. — № 4. — С. 106—110.
9. Воскобоев А. И., Черникевич И. П. Биосинтез, деградация и транспорт фосфорных эфиров тиаминина. — Минск, 1987.
10. Дривотинов Б. В. // Неврологические нарушения при поясничном остеохондрозе. — Минск, 1979. — С. 105—113.
11. Латышева В. Я. // Периферическая нервная система. — Минск, 1982. — Вып. 5. — С. 50—58.
12. Островский Ю. М., Воскобоев А. И., Гриценко Э. А. и др. // Приклад. биохим. — 1979. — Т. 15. — С. 728—734.
13. Островский Ю. М. // Лаб. дело. — 1961. — № 1. — С. 193—195.
14. Петровский Г. Г., Титовец Э. П. // Периферическая нервная система. — Минск, 1978. — Вып. 1. — С. 15—19.
15. Рыбина А. А., Пархоменко Ю. М., Польшак Р. Б. // Укр. биохим. журн. — 1976. — Т. 48. — С. 384—387.
16. Слуцкий Л. И. // Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани. — Л., 1969. — С. 136—168.
17. Струмило С. А., Мацюк С. К., Виноградов В. В. // Вопр. мед. химии. — 1979. — № 6. — С. 734—738.
18. Титаев А. А. // Тиамин (обмен, механизмы действия). — М., 1978. — С. 85—107.
19. Хмара Н. Ф., Трухан А. С., Ивашина Е. Н. и др. // Периферическая нервная система. — Минск, 1980. — Вып. 3. — С. 184—191.
20. Черникевич И. П., Лучко В. С., Воскобоев А. И. // Биохимия. — 1984. — Т. 49. — С. 899—907.
21. Черникевич И. П., Воскобоев А. И., Островский Ю. М. // Там же. — 1988. — Т. 53. — С. 1728—1737.
22. Шолов П. И., Яковлев Т. И. // Основы клинической витаминологии. — Л., 1964. — С. 207—297.
23. Bruns F. H., Dünwald H., Nollmann E. // Biochem. Z. — 1958. — Bd 330, N 5. — S. 497—508.
24. Dreyfus K. H., Lundquist C. G. // New Engl. J. Med. — 1962. — Vol. 267. — P. 596—601.
25. Inoue A., Iwata H. // Biochim. biophys. Acta. — 1971. — Vol. 242. — P. 459—469.
26. Itokawa J., Cooper J. R. // Biochem. Pharmacol. — 1970. — Vol. 19. — P. 985—992.
27. Leveille G. A. // Amer. J. clin. Nutr. — 1972. — Vol. 25, N 3. — P. 273—274.
28. Penttinen H. K., Uotila L. J. // Med. Biol. — 1981. — Vol. 59. — P. 177—184.
29. Peterson J. W., Gubler C. J., Kuby S. A. // Biochim. biophys. Acta. — 1975. — Vol. 397, N 2. — P. 377—394.
30. Rindi G., Guiseppe L. // Int. Rev. Vitam. Res. — 1961. — Vol. 31, N 3. — P. 321—326.
31. Ullrich J. // Meth. Enzymol. — 1970. — Vol. 18-A. — P. 109—115.

Поступила 20.09.89

METABOLISM OF THIAMINE AND ITS DI- AND TRIPHOSPHATE ESTERS IN BLOOD OF PATIENTS WITH VERTEBRAL OSTEOCHONDROSIS

E. A. Gritsenko, I. P. Chernikevich, A. L. Dmitriev, A. V. Pershukovich

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

Concentrations of phosphate esters in blood of patients with vertebral osteochondrosis and activities of enzymes involved in thiamine metabolism have been investigated. The pathological processes were characterized by a decrease in content of thiamine triphosphate while concentration of coenzyme, thiamine

diphosphate, was relatively constant. The enzymes involved in the initial and final steps of biosynthesis and degradation of thiamine phosphorylated derivatives play the main role in maintaining vitamin B₁ metabolic homeostasis.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 612.822.1.015.6:577.164.15

Г. В. Чичковская, П. К. Пархомец,
Т. М. Кучмеровская, А. А. Халмурадов,
Г. В. Донченко, О. П. Рожанская

ФУНКЦИОНАЛЬНО-МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МОЗГЕ ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ОБЕСПЕЧЕННОСТИ ОРГАНИЗМА КРЫС ВИТАМИНОМ РР

Институт биохимии им. А. В. Палладина АН УССР, Киев

Среди физиологически активных соединений, обладающих широким спектром действия, особое место принадлежит никотиновой кислоте и ее производным — никотинамиду и никотинамидным коферментам (NADH и NADPH), химия и биохимия которых в достаточной мере изучена и освещена в научной литературе [12, 15]. Кроме общеизвестной коферментной функции этих соединений, в последнее время показано, что NAD является аллостерическим фактором активности некоторых ферментов [4], обязательным компонентом ДНК-лигазной реакции [23] и субстратом в процессах моно- и полирибозилирования ядерных белков и других макромолекул [14, 18].

Работами последних лет обнаружено, что витамин РР и никотинамидные коферменты участвуют также в функционировании центральной и периферической нервной систем [3, 8, 19].

Нами было показано [7] существование на синаптических мембранах головного мозга крыс высокоаффинной системы связывания никотинамидных нуклеотидов, в частности NAD, физиологическое значение которой заключается в модулирующем влиянии на высвобождение некоторых нейромедиаторов [6]. Целью настоящей работы явилось изучение функционально-метаболических изменений, происходящих в мозге крыс при различной обеспеченности организма витамином РР.

Методика. При моделировании повышенного синтеза NAD опыты проводили на белых крысах-самцах массой 150—180 г. Животным вводили никотинамид в дозе 500 мг на 1 кг массы тела внутривенно за 6 ч до забоя. РР-гиповитаминозное состояние вызывали у белых крыс-самцов массой 50 г при содержании их на полусинтетическом рационе, описанном ранее [1], а для торможения эндогенного синтеза никотинамидных коферментов из триптофана в диету добавляли 2 % лейцина [13]; группе животных, находившихся на РР-авитаминозном рационе за 3 дня до забоя вводили никотинамид в дозе 40 мг на 1 кг массы тела. Содержание окисленных и восстановленных никотинамидных коферментов (NADH, NADPH) определяли как описано ранее [11]. Синапсомы и синаптические мембраны головного мозга крыс выделяли по методу [10]. Методика определения связывания [¹⁴C]-NAD синаптическими мембранами описана в работе [7].

Изучение высвобождения [¹⁴C]-серотонина проводили согласно методу [6]. Поглощение [¹⁴C]-серотонина синапсомы головного мозга крыс изучали в инкубационной среде, содержащей 125 мМ NaCl, 1,43 мМ MgCl₂, 5 мМ KCl, 0,97 мМ CaCl₂, 11 мМ глюкозу, 0,1 М фосфатный буфер, рН 7,4; 1 мг белка и 1,48 мкМ [2-¹⁴C]-серотонин. Пробы инкубировали 5 мин при 37 °С и непоглотившую метку отделяли на миллипоровых фильтрах с диаметром пор 0,4 мкм. Фильтры промывали 15 мл холодного 0,1 М фосфатного буфера, высушивали, погружали в сцинтилляционную жидкость ЖС-1 (5 мл) и измеряли радиоактивность на счетчике SL-30 фирмы «Intertechnique» (Франция). Часть проб до внесения метки прединкубировали 15 мин с 1,1 мМ NAD.

Результаты и обсуждение. Воспроизведение пищевой недостаточности никотиновой кислоты у крыс вызывает затруднения в связи с наличием у этого вида животных пути биосинтеза никотинамидных коферментов из триптофана [17]. Включение в рацион 2 % лейцина для торможения образования NAD позволило вызвать у крыс РР-гиповитаминозное состояние с характерными для него признаками (пугливость животных, выпадение шерсти, появление язв на спине, замедленное прибавление массы тела).

Биохимическим критерием РР-недостаточности может служить уровень никотинамидных коферментов в тканях, который согласно данным литературы [9], снижается в печени крыс при РР-гиповитаминозе. Однако подобные данные для тканей мозга практически отсутствуют [21]. Как видно из табл. 1, в мозге крыс, получавших РР-авитаминозный рацион, содержание NAD снижается на 30 %, NADP — на 83 %, NADH — на 34 % и NADPH — на 33 % по сравнению с животными, получавшими полноценную полусинтетическую диету. Более значительное снижение уровня NADP по сравнению с NAD, по-видимому, можно

Таблица 1

Содержание никотинамидных нуклеотидов животных (в нмоль на 1 г ткани) в мозге крыс при различном состоянии ($M \pm m$; $n=10$)

Группа животных	NAD		NADP		NADH		NADPH	
	печень	мозг	печень	мозг	печень	мозг	печень	мозг
1-я — норма	640±21	215±12	64±3	24±2	152±11	120±9	230±12	32±3
2-я — норма+никотинамид 500 мг/кг	2560±115*	281±11	84±9	31±3	213±11	165±13	367±21	58±6
3-я — полноценная синтетическая диета (контроль)	629±30	219±10	70±6	22±3	130±10	122±11	226±12	33±4
4-я — РР-авитаминозный рацион	438±22**	152±10**	8,1±0,6**	4,0±0,4**	152±12	79±2*	143±14**	22±4**
5-я — РР-авитаминозный рацион+никотинамид (40 мг/кг)	680±15***	264±18***	58±7***	19±2***	170±21***	151±12***	209±19***	58,8±9,5***

Примечание. Одна звездочка — $p < 0,05$ относительно групп 1 и 2, две — относительно групп 3 и 4, три относительно групп 4 и 5.

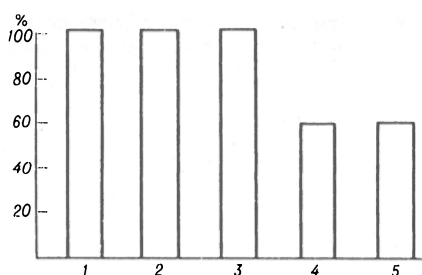


Рис. 1. Связывание $[^{14}\text{C}]$ -NAD синаптическими мембранами головного мозга при различной обеспеченности организма крыс витамином РР (в % от нормы).

1 — норма; 2 — норма + никотинамид, 500 мг/кг; 3 — полусинтетическая диета; 4 — РР-авитаминозный рацион; 5 — РР-авитаминозный рацион + никотинамид 40 мг/кг.

объяснить различной степенью их утилизации в пентозо-фосфатном пути и гликозе в условиях РР-гиповитаминоза [2]. Введение животным никотинамида в дозе 40 мг на 1 мг массы тела за 3 дня до забоя на фоне недостаточности никотиновой кислоты нормализует все измеряемые показатели как в печени, так и в мозге животных.

Ранее было показано [9], что максимальный синтез NAD в печени при введении крысам никотинамида в дозе 500 мг на 1 кг массы тела наблюдается через 6 ч. Изучение содержания окисленных и восстановленных никотинамидных коферментов в тканях животных, которым вводили никотинамид внутривнутривенно в дозе 500 мг на 1 кг массы тела, позволило установить, что в мозге достоверно повышается их уровень, хотя и в меньшей степени, чем в печени.

Таким образом, выбранные нами модели экспериментальных животных характеризуются различной степенью обеспеченности организма никотинамидными коферментами.

Известно, что рецепторы ряда гормонов, биологически активных веществ, нейромедиаторов изменяют свои свойства (сродство, емкость связывания и т. п.) при различных патологических состояниях животных [5]. С учетом полученных ранее данных [7] о наличии на синаптических мембранах головного мозга крыс высокоспецифических рецепторов для $[^{14}\text{C}]$ -NAD в дальнейшей работе нами был изучен процесс связывания в условиях повышенного и пониженного синтеза NAD в организме животных.

Согласно полученным данным (рис. 1), никотинамид в дозе 500 мг/кг при введении крысам, содержащимся на рационе вивария, не влияет на процесс рецепции NAD синаптическими мембранами, несмотря на некоторое повышение уровня этого кофермента в мозге. При этом сродство лиганда ($[^{14}\text{C}]$ -NAD) к рецептору синаптических мембран головного мозга и емкость связывающих мест не изменяется.

В условиях РР-гиповитаминоза специфическое связывание NAD снижается на 40 % по сравнению с контролем и не восстанавливается через 3 сут после введения животным никотинамида в дозе 40 мг/кг.

Анализ этих данных по Скэтчарду [20] позволил установить, что при содержании животных на РР-витаминозном рационе не изменяется сродство NAD к рецептору (K_{D1}) и K_{D2} не отличаются от контрольных значений), а снижается емкость участков связывания (рис. 2). Если допустить,

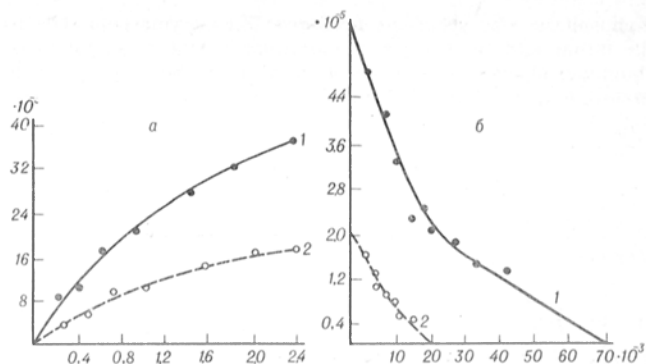


Рис. 2. Связывание $[^{14}\text{C}]$ -NAD синаптическими мембранами (а) и графический анализ в координатах Скэтчарда (б).

1 — контроль, 2 — РР — гиповитаминоз; по осям абсцисс: а — F — концентрация свободного $[^{14}\text{C}]$ -NAD, мкМ, б — B — концентрация связанного $[^{14}\text{C}]$ -NAD, нмоль на 1 мг белка. По осям ординат: а — B — нмоль на 1 мг белка; б — B/F . В контроле: $K_{D1}=0,55$ мкМ; $K_{D2}=2,5$ мкМ; $B_{\max}=31$ нмоль на 1 мг белка. При РР-гиповитаминозе: $K_{D1}=0,60$ мкМ; $K_{D2}=1,9$ мкМ, $B_{\max}=11$ нмоль на 1 мг белка.

что связывание $[^{14}\text{C}]$ -NAD синаптическими мембранами регулируется доступностью субстрата в мозге, то этот процесс должен был нормализоваться после введения РР-гиповитаминозным животным никотинамида. Несмотря на повышенный синтез NAD в этих условиях, связывание $[^{14}\text{C}]$ -NAD синаптическими мембранами остается низким. В связи с этим мы предположили, что уменьшение концентрации NAD-рецептора обусловлено нарушением биосинтеза белка при РР-гиповитаминозе [16], и этот процесс не восстанавливается через 3 сут после введения никотинамида.

Таким образом, при различной обеспеченности организма животных витамином РР изменяется система рецепции NAD синаптическими мембранами головного мозга крыс.

На основании полученных ранее данных [6] была сформулирована гипотеза модулирующего действия NAD на высвобождение серотонина и дофамина из синапсом головного мозга крыс. Кроме того, рядом исследователей [22] установлено повышение на 17 % уровня серотонина в мозге после инъекции животным никотинамида. Если учесть, что в тканях млекопитающих никотинамидные коферменты и серотонин имеют общий источник биогенеза — триптофан, то все выше сказанное свидетельствует в пользу взаимосвязи между системой рецепции NAD и серотонино-рецепторами в мозге.

В условиях наших опытов (табл. 1) NAD не влияет на захват $[^{14}\text{C}]$ -серотонина синапсосами головного мозга ни в норме, ни при различной обеспеченности организма животных витамином РР.

В то же время обнаружено стимулирующее влияние NAD на высвобождение $[2-^{14}\text{C}]$ -серотонина из предварительно нагруженных синапсом (см. табл. 2). При этом в контроле наблюдаемая стимуляция составляет 20 % от уровня спонтанного высвобождения, а при недостатке витамина РР в организме стимулирующий эффект снижается до 15 и 12 %, что, по-видимому, связано с установленным нами уменьшением емкости связывания NAD рецепторными участками синапсом мозга при РР-гиповитаминозе.

Таким образом, данные экспериментов свидетельствуют о функциональной зависимости систе-

Влияние NAD (10^{-3} М) на захват и высвобождение (14 С]-серотонина (в ими/мин на 1 мг белка) синапсосомами головного мозга крыс ($M \pm m$; $n=8-10$)

Условия эксперимента	Захват [14 С]-серотонина		Высвобождение [14 С]-серотонина	
	контроль	+NAD	спонтанное высвобождение	+NAD
Норма	4363 \pm 261	4295 \pm 214	5033 \pm 402	6287 \pm 358*
Норма+никотинамид (500 мг/кг)	3705 \pm 222	3416 \pm 170	6121 \pm 489	7371 \pm 442*
РР-гиповитаминоз	3730 \pm 223	3701 \pm 185	5255 \pm 404	6213 \pm 372*
РР-гиповитаминоз+никотинамид (40 мг/кг)	3086 \pm 185	2858 \pm 142	5435 \pm 355	6367 \pm 382*

Примечание. Звездочка — $p < 0,05$ относительно контроля.

мы рецепции NAD синаптическими мембранами головного мозга крыс от уровня обеспеченности организма витамином РР, что является экспериментальным подтверждением гипотезы модулирующего действия NAD на серотонинергическую систему мозга и указывает на специфичность участия витамина РР в этих процессах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Великий Н. П., Пархомец П. К. // Витамины. — Л., 1976. — Вып. 9. — С. 15.
2. Великий Н. П., Чаговец Р. В., Пархомец П. К. и др. // Укр. біохім. журн. — 1974. — Т. 46. — С. 275—283.
3. Ефремов В. В., Макарычев А. И., Тихомирова А. Н. // Вопр. питания. — 1954. — № 3. — С. 10—16.
4. Курганов Б. П. // Коферменты. — М., 1973. — С. 82—117.
5. Леви Д. // Взаимодействие гормонов с рецепторами. — М., 1979. — С. 10—39.
6. Халмуратов А. Г., Кучмеровская Т. М., Пархомец П. К. // Нейрохимия. — 1987. — Т. 6. — С. 495—502.
7. Халмуратов А. Г., Пархомец П. К., Кучмеровская Т. М., Чичковская Г. В. // Биохимия. — 1983. — Т. 48. — С. 1287—1292.
8. Халмуратов А. Г., Романенко А. В., Шуба М. Ф. // Укр. биохім. журн. — 1981. — Т. 53. — С. 79—82.
9. Чаговец Р. В., Пархомец П. К., Великий Н. П. и др. // Докл. АН СССР. — 1977. — № 4. — С. 347—350.
10. Abila J. B., Chicheportiche R., Schweitz H., Lazolunski M. // Biochemistry (Wash.). — 1977. — Vol. 16. — P. 1838—1864.
11. Methods of Enzymatic Analysis / Ed. H. U. Bergmeyer. — New York, 1963. — P. 528—538.
12. Chaykin S. // Ann. Rev. Biochem. — 1967. — Vol. 36. — P. 149—170.
13. Chofoorunissa A. C., Narasinga R. B. S. // Biochem. J. — 1973. — Vol. 134. — P. 425—430.
14. Fujimura S., Hasegawa S., Shimizu Y., Sugimura T. // Biochim. biophys. Acta. — 1967. — Vol. 145. — P. 247—259.
15. Kaplan W. O. // Enzymes. — 1960. — Vol. 3. — P. 105—169.
16. Katunuma N., Kito K., Kominami E. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1971. — Vol. 45. — P. 76—81.
17. Nakamura S., Ikeda M., Tsujr M. et al. // Ibid. — 1963. — Vol. 13. — P. 285—288.
18. Nischizuka J., Ueda K., Nakazawa K., Hayaishi O. // J. biol. Chem. — 1967. — Vol. 242. — P. 3164—3171.
19. Phyllis J. W., Kostopoulos Y. K., Limacher J. J. // Europ. J. Pharmacol. — 1975. — Vol. 30, N 1. — P. 125—129.
20. Scatchard C. // Ann. Molec. intern. — 1949. — Vol. 51. — P. 573—852.
21. Slater T. F., Sawyer B., Strauli U. // Arch. Physiol. Biochem. — 1964. — Vol. 72. — P. 427—447.
22. Wolley D. W. // Science. — 1958. — Vol. 128. — P. 1277—1278.
23. Zimmerman S. B., Little I. W., Oshinsky C. R., Gellert M. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1967. — Vol. 57. — P. 1841—1848.

Поступила 24.11.89

FUNCTIONAL-METABOLIC ALTERATIONS IN RAT BRAIN UNDER VARIOUS CONDITIONS OF VITAMIN PP CONSUMPTION

G. V. Chichkovskaya, P. K. Parkhomets, T. M. Kuchmerovskaya, A. A. Khalmuradov, G. V. Donchenko, O. P. Rozhanskaya

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Content of nicotinamide nucleotides, reception of NAD by synaptic membranes and the system of 14 C-serotonin uptake and liberation in rat brain nerve endings were studied under various conditions of vitamin PP consumption. In PP hypovitaminosis binding of 14 C-NAD was decreased in synaptic membranes as a result of alterations in capacity of receptor sites, which occurred simultaneously with low level of nicotinamide coenzymes in rat brain. These alterations led to deterioration of NAD modulating function in liberation of 14 C-serotonin from synaptosomes. The data obtained suggest that functional activity of NAD-receptor system in synaptic membranes of rat brain depends on the rate of vitamin PP consumption. These results might be considered in clinical research when vitamin PP is used for treatment of various diseases.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 612.351.1.015.6:[577.161.2+577.161.5].014.46:615.355.015.23+616.391:[577.161.2+577.161.5]-07:616.36-008.9-074

О. В. Тюлина, А. А. Сокольников, Т. В. Жарова, В. М. Коденцова, Ю. Н. Лейкин, В. Б. Спиричев

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ОБЕСПЕЧЕННОСТИ КРЫС ВИТАМИНАМИ D И K И ВВЕДЕНИИ ПЕЛЕНТАНА

Московский университет им. М. В. Ломоносова, Институт питания АМН СССР, Москва

Митохондрии благодаря их способности накапливать кальций участвуют в энергозависимом процессе поддержания внутриклеточного гомеостаза этого элемента [3]. Считают, что митохондрии играют важную роль в транспорте кальция через эпителий кишечника [2], причем этот процесс находится под контролем одного из активных метаболитов витамина D — $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [30]. Имеются также сведения об изменении содержания кальция в митохондриях скелетных мышц цыплят при дефиците витамина D [31]. Многочисленные работы посвящены исследованию взаимодействия витамина D с митохондриями почек крыс in vitro [16, 17].

Дефицит витамина K у крыс и кур приводит к значительному нарушению окислительного фосфорилирования и снижению его эффективности [5, 12]. Наконец, менадион (витамин K_3) в концентрациях, значительно превышающих физиологические, является одним из многочисленных агентов, вызывающих связанное с окислением никотинамидных коферментов освобождение каль-

Показатели крови крыс при различной обеспеченности витаминами К и D и введении пеллентана

Группа животных	Са, мМ (n=6)	25-ОН, нг/мл (n=5)	Протромбиновое время, с (n=8)
Контроль	2,40±0,03	33,2±8,5	19,5±1,0
—К	2,50±0,03	14,3±2,0*	25,4±1,0*
Пеллентан	Не определяли	30,3±3,8	31,2±2,5*
+К	»	25,0±4,3	20,5±1,0
—D	2,12±0,07*	<2,5	26,0±1,0*

Примечание. Звездочки — достоверное отличие ($p < 0,05$) от показателей 1-й группы.

ция как из изолированных митохондрий [15, 21, 29], так и из митохондрий интактных гепатоцитов [35]. Таким образом, изменение концентрации менадиона может играть роль фактора, регулирующего распределение ионизированного кальция по обе стороны внутренней мембраны митохондрий, и соответственно влиять на Са-зависимые реакции в матриксе и цитоплазме. Наряду с этим в опытах *in vitro* с использованием высоких концентраций менадиона был обнаружен цитотоксический эффект этого соединения, сопровождающийся морфологическими изменениями структуры клеток млекопитающих [19, 20, 23, 27]. Установлено, что такие изменения являются следствием окисления внутриклеточных сульфгидрильных групп, в частности белков цитоскелета. Для изучения роли витамина К часто используют эксперименты с введением антивитаминов К (пеллентан, синкумар), вызывающих нарушение системы микросомального витамин-К-зависимого γ -карбоксилирования глутаминной кислоты в белках [34]. Однако данные о влиянии антивитаминов К на функциональное состояние митохондрий весьма противоречивы [8]. Так, введение крысам синкумара оказывало разнонаправленное влияние на дыхательную активность митохондрий скелетных мышц и печени, вызывая в первом случае активирующее действие на скорость поглощения кислорода в состоянии как 4, так и 3, а во втором случае — выраженное ингибирующее действие на скорость поглощения кислорода в состоянии как 4, так и 3, а во втором случае — выраженное ингибирующее действие на скорость в состоянии 3. При этом в обоих случаях величина дыхательного контроля снижалась.

Таким образом, хотя влияние обеспеченности организма витаминами на функции митохондрий не вызывает сомнений, но все известные данные литературы получены при исследовании митохондрий, выделенных из разных тканей (почки, печень, слизистая тонкого кишечника) животных разных видов. В связи с этим в настоящей работе нами были охарактеризованы метаболические функции изолированных митохондрий печени крыс в зависимости от обеспеченности витаминами D и K, а также при введении антивитамина К — пеллентана.

Методика. В опыте использовали крыс-самцов породы Вистар с исходной массой тела 60 г, находившихся в течение 4 нед на полусинтетическом рационе, содержавшем 20 % казеина, отмытого от жирорастворимых витаминов [14], 43,7 % крахмала, 20 % глюкозы, 3 % целлюлозы, 4 % солевой смеси [25], 9 % подсолнечного масла, 0,2 % хлорида, 0,1 % смеси водорастворимых витаминов [14] (за исключением викасола) и витамин А в количестве 15 000 МЕ на 1 кг корма. Содержание кальция и фосфора в рационе составляло 0,61 и 0,51 % соответственно. Для предотвращения копрофагии крыс содержали в индивидуальных клетках с решетчатым дном. Животные были разделены на 5 групп. Животные 1-й группы (контроль) были обеспечены всеми витаминами в течение опыта. Животные 2-й группы (—К) не получали витамин К (алиментарный дефицит витамина К). Животным 3-й группы (пеллентан) в течение 3 нед перед забоем вводили *per os* пеллентан в виде водной суспензии в количестве 4 мг в день на 100 г массы тела. Животным 4-й группы (+К) в течение 3 нед перед забоем вводили *per os* избыток витамина К₃ (викасол) в количестве 10 мг в день на крысу. Животные 5-й группы (—D) не получали витамин D (алиментарный дефицит витамина D).

Животным 1, 2, 3 и 4-й групп вносили в рацион витамин

D₃ в количестве 20 000 МЕ на 1 кг корма, а в рацион 1, 3 и 5-й групп добавляли викасол в количестве 0,005 %.

Концентрацию кальция в сыворотке крови определяли комплексонометрическим титрованием [4]. Концентрацию в сыворотке крови основной транспортной формы витамина D — 25-гидроксивитамина D (25-ОНД) — определяли методом радиокоммерцентного белкового связывания с использованием набора реактивов «Vitamin D₃-Screening Kit» («Bühlmann Laboratories», Швейцария). Протромбиновое время определяли по методу Квика [32] с использованием экстракта тромбопластина, полученного из мозга кролика [1].

Митохондрии печени крыс выделяли дифференциальным центрифугированием гомогената в среде, содержащей 0,25 М сахарозу и 1 мМ ЭДТА, pH 7,4 [24]. После промывания средой без ЭДТА осадок митохондрий суспендировали в небольшом объеме 0,25 М сахарозы (концентрация белка в суспензии около 100 мг/мл) и на протяжении опыта хранили на льду. Концентрацию митохондриального белка определяли биуретовым методом, используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта [22].

Окислительную активность изолированных митохондрий в различных условиях измеряли полярографическим методом с помощью открытого платинового электрода в среде, содержащей 0,12 М сахарозу, 75 мМ KCl, 2,64 мМ MgCl₂, 10 мМ HEPES и 5 мМ K₂H₂PO₄, pH 7,4. В качестве субстратов окисления использовали 5 мМ сукцинат (в среде с 1 мМ ротеиноном) или 5 мМ α -кетоглутарат, β -оксипутират и изоцитрат.

Транспорт Са²⁺ регистрировали двухволновым спектрофотометрическим методом при длинах волн 507—540 нм с мурексидом в качестве индикатора [26].

Результаты и обсуждение. В табл. 1 представлены данные, характеризующие обеспеченность крыс витаминами D и K. На развитие дефицита витамина К у крыс, содержащихся на рационе, лишенном этого витамина (2-я группа), указывает увеличение протромбинового времени на 30 % по сравнению с таковым в контрольной группе. У крыс 3-й группы, получавших антивитамины К — пеллентан, аналогичный показатель увеличивался на 60 %, что свидетельствует о нарушениях систем свертывания крови, подобных таковым при алиментарном дефиците витамина К [34]. Введение 10-кратной дозы викасола (4-я группа) не влияло на протромбиновое время. Необычным фактом является увеличение этого показателя у дефицитных по витамину D крыс до величин, характерных для животных, лишенных витамина К. Возможно, это обусловлено либо непосредственным влиянием витамина D на синтез витамин К-зависимых факторов свертывания, либо его анаболическим эффектом, как у стероидных гормонов.

Лишение животных витамина D сопровождалось уменьшением концентрации 25-ОНД в сыворотке крови до следовых количеств и достоверным снижением концентрации кальция. В свою очередь при первичном дефиците витамина К (2-я груп-

Таблица 2

Влияние обеспеченности крыс витаминами К и D на дыхание митохондрий в состоянии 3 (субстрат — сукцинат)

Группа животных	Скорость поглощения кислорода в состоянии 3, мкА О/мин/мг	Скорость окислительного фосфорилирования, мкМ АДФ/мин/мг	Коэффициент дыхательного контроля	АДФ/О
Контроль	0,12	0,17	5,0	1,6
—К	0,08	0,12	4,2	1,4
Пелентан	0,13	0,19	5,2	1,6
+К	0,15	0,19	5,3	1,3
—D	0,13	0,18	4,9	1,5

па) также наблюдалось достоверное уменьшение этого показателя. Хотя концентрация 25-OHD при этом остается в пределах нормальной обеспеченности (нижняя граница нормы у крыс 5 нг/мл [13]), тем не менее это снижение может свидетельствовать об уменьшении его продукции или увеличении скорости метаболизма 25-OHD при дефиците витамина К.

В табл. 2 приведены данные по влиянию обеспеченности крыс витаминами К и D на дыхание митохондрий в состоянии [3]. Введение пелентана или избыточной дозы викасола, а также алиментарный дефицит витамина D не оказывали влияния на фосфорилирующее дыхание митохондрий. Алиментарный дефицит витамина К приводил к заметному падению скорости дыхания в присутствии АДФ и скорости окислительного фосфорилирования. Дефицит витамина К не влиял на сопряженность препарата, так как величины дыхательного контроля и АДФ/О в митохондриях, выделенных от контрольных и гиповитаминозных животных, не различались. Влияние дефицита витамина К на скорость окислительного фосфорилирования наблюдали в опытах, где в качестве субстрата дыхания использовали сукцинат. При замене сукцината на НАД-зависимые субстраты скорость поглощения кислорода в состоянии 3 в контрольных и опытных экспериментах не различалась. Ранее нами при использовании в качестве других НАД-зависимых субстратов дыхания — глутамата с малатом — было обнаружено снижение величин дыхательного контроля у животных, лишенных витамина К, по сравнению с крысами, обеспеченными этим витамином [5]. Возможно, что такое различие обусловлено нарушениями в функционировании малат-аспартатной челночной системы митохондрий [7].

Максимальная скорость дыхания митохондрий в присутствии разобщителя была одинаковой во всех исследуемых группах животных (табл. 3). Таким образом, падение скорости фосфорилирующего дыхания при дефиците витамина К не связано с инактивацией дыхательной цепи и может быть результатом снижения активности АТФ-синтетазы.

Значения оксидантной активности митохондрий в процессе активного транспорта кальция близки в опытных и контрольных группах животных (см. табл. 3). Однако результаты спектрофотометрических измерений показали, что скорость аккумуляции кальция сильно зависит от обеспеченности животного витаминами К и D. Так, алиментарный дефицит витамина К незначитель-

Таблица 3

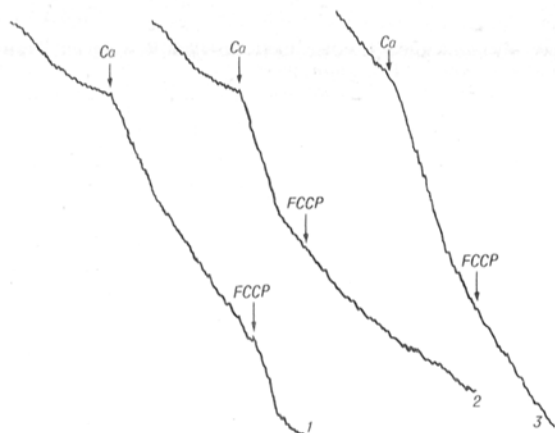
Влияние обеспеченности крыс витаминами К и D на взаимодействие митохондрий с кальцием

Субстрат	Группа животных	Скорость транспорта кальция, мкМ/мин/мг	Скорость Са-активированного дыхания, мкА О/мин/мг	Скорость F-ССР-активированного дыхания, мкА О/мин/мг
Сукцинат	Контроль	0,58	0,18	0,21
	—К	0,51	0,19	0,19
	Пелентан	0,58	0,19	0,18
	+К	0,43	0,22	0,22
α-Кетоглутарат	—D	0,43	0,15	0,20
	Контроль	0,38	0,05	0,06
	—К	0,32	0,06	0,06
	Пелентан	0,36	0,05	0,05
Изоцитрат	+К	0,21	0,08	0,08
	Контроль	0,40	0,06	0,08
	—К	0,30	0,07	0,11
	—К	0,30	0,07	0,11
β-Оксибутират	Пелентан	0,41	0,06	0,11
	+К	0,20	0,11	0,10
	Контроль	0,35	0,04	0,04
	—К	0,26	0,06	0,06
	Пелентан	0,30	0,06	0,07
	+К	0,12	0,05	0,05
	—D	0,21	0,05	0,06

но, а введение избытка викасола заметно снижали начальную скорость поглощения кальция. Вместе с тем введение животным пелентана не сказывалось на скорости этого процесса. Торможение активного транспорта кальция при недостатке и особенно избытке витамина К имело место независимо от того, какой субстрат дыхания использовали в опыте.

Известно, что накопление кальция в матриксе митохондрий влияет на функционирование ряда ферментных систем, локализованных в этих органеллах [18]. Как показали наши исследования, накопление ограниченных количеств кальция (около 70 нмоль на 1 мг белка) не приводило к изменению исходных свойств контрольного препарата митохондрий. На рисунке 1, показано, что добавление кальция в аэробную суспензию энергизованных митохондрий вызывало активацию дыхания, сменяющуюся выходом в контролируемое состояние. Скорость дыхания в контролируемом состоянии была равна скорости дыхания до добавления кальция, а последующая добавка разобщителя вновь приводила к активации дыхания. Митохондрии печени крыс, обработанных пелентаном, не отличались по ответу на кальций и разобщитель от контрольных (на рисунке не показано). На основании полученных данных можно заключить, что введение пелентана не сопровождается изменениями метаболических функций митохондрий.

Накопление кальция митохондриями печени гиповитаминозных и получавших избыток витамина К₃ крыс приводило к развивающемуся во времени торможению дыхательной цепи, так как добавление разобщителя к таким препаратам не вызывало активации дыхания (см. рисунок, 2 и 3). Следует заметить, что указанный эффект наблюдается только при аккумуляции кальция в присутствии НАД-зависимых субстратов и может быть связан с описанным нами ранее истощением фонда митохондриальных пиридиннуклеотидов [6]. Полярографический анализ взаимодействия кальция с митохондриями печени контроль-



Влияние кальция на дыхание митохондрий печени крыс, лишенных витамина К и получавших избыток викасола.

Измерения проводили в среде следующего состава: 120 мМ сахараза, 75 мМ KCl, 2,66 мМ MgCl₂, 10 мМ ПЕРЭС, 5 мМ KН₂РO₄ (рН 7,4), 5 мМ β-оксибутират. 1 — митохондрии печени контрольных животных, 2 — получавших избыток викасола, 3 — дефицитных по витамину К. Стрелками указано добавление 200 мкМ СаCl₂ и 1,25 мкМ FCCP.

ных и подопытных животных не обнаруживает различий при использовании сукцината в качестве субстрата дыхательной цепи.

Падение скорости транспорта кальция, а также вызванное накоплением кальция торможение дыхания митохондрий, окисляющих НАД-зависимые субстраты, наблюдали также в опытах с животными с дефицитом витамина D. Таким образом, как избыток, так и недостаток витамина К в рационе, а также гиповитаминоз D вызывают феноменологически сходные изменения свойств митохондрий печени крысы, в основе которых может лежать различие в проницаемости внутренней мембраны для никотинамидных коферментов.

Как уже отмечалось, дефицит витамина К сопровождается снижением на 57 % уровня основной транспортной формы витамина D — 25-ОН. Поскольку при этом дефицит витамина К оказывает одностороннее действие с недостаточностью витамина D на функциональное состояние митохондрий, решить вопрос о том, какому из этих двух витаминов принадлежит решающая роль в этих изменениях, на основании полученных данных нельзя. Возможной причиной таких нарушений является количественное изменение состава интегральных белков [9, 10] и липидов [11, 33] мембран митохондрий, наблюдающееся при дефиците как витамина К, так и витамина D.

Недавно из митохондрий сердца быка был выделен и охарактеризован гликопротеин-пептидный комплекс, участвующий в транспорте кальция через внутреннюю мембрану митохондрий, скорость которого зависит от степени восстановленности сульфгидрильных групп пептида [13, 28]. Принимая во внимание эти результаты, а также данные о токсическом действии высоких концентраций витамина К₃ в опытах *in vitro*, можно предположить, что торможение активного транспорта кальция при избыточном введении этого витамина крысам отчасти может быть обусловлено изменением степени восстановленности тиоловых групп. Еще раз следует подчеркнуть, что введение пелентана животным не сопровождается изменениями метаболических функций ми-

тохондрий, хотя и оказывает через систему карбоксилирования влияние на систему свертывания крови (увеличение протромбинового времени).

На основании этого можно предположить, что введение пелентана не вызывает снижения уровня витамина К в органах, а введение антивитамина К на фоне нормальной обеспеченности витамином К позволяет избирательно моделировать нарушение системы свертывания крови, которое не сопровождается изменениями других параметров, характерных для дефицита этого витамина (в данном случае метаболических функций изолированных митохондрий печени крысы).

ЛИТЕРАТУРА

1. Лабораторные методы исследования системы гемостаза / Балуда В. П., Баркаган З. С., Гольдберг Е. Д. и др. — Томск, 1980. — С. 169—170; 296—299.
2. Физиология всасывания / Под ред. А. М. Уголева, Н. Ш. Амирова, Р. О. Файтельберга и др. — Л., 1970. — С. 152—222.
3. Болдырев А. А., Мельгунов В. И. Транспортные АТФазы. — М., 1985.
4. Вичев Е. П., Каракашов А. В. // Вопр. мед. химии. — 1960. — № 6. — С. 435—438.
5. Колесова Г. М., Сокольников А. А., Коденцова В. М. // Там же. — 1988. — № 4. — С. 44—50.
6. Лейкин Ю. П., Виноградов А. Д. // Биохимия. — 1972. — Т. 37, № 2. — С. 243—247.
7. Ленинджер А. Основы биохимии: Пер. с англ. — М., 1985. — Т. 2. — С. 537—538.
8. Лидер В. А. Биохимическая характеристика влияния витаминов К и Е на структуры и функции биомембран: Дис. ... д-ра мед. наук. — Устинов, 1986.
9. Лидер В. А., Богданов Н. Г. // Укр. биохим. журн. — 1985. — Т. 57, № 1. — С. 82—85.
10. Лидер В. А., Богданов Н. Г. // Там же. — 1986. — Т. 58, № 4. — С. 82—86.
11. Морозова Р. П., Кокунин В. А., Николенко Т. А. и др. // Там же. — 1988. — Т. 60, № 3. — С. 60—64.
12. Основы биохимии: Пер. с англ. / Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э. и др. — М., 1981. — Т. 3.
13. Угешева Ж. А., Сирота Т. В., Миронова Г. Д. // Укр. биохим. журн. — 1989. — Т. 61, № 6. — С. 54—58.
14. Экспериментальная витаминология / Под ред. Ю. М. Островского. — Минск, 1979.
15. DeLuca H. F., Gran F. C., Steenbock H., Reiser S. // J. biol. Chem. — 1957. — Vol. 228. — P. 469—475.
16. DeLuca H. F., Engstrom G. W., Rasmussen H. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1962. — Vol. 48. — P. 1604.
17. Bellomo G., Jewell S. A., Orrenius S. // J. biol. Chem. — 1982. — Vol. 257. — P. 11558—11562.
18. Denton R. M., McCormac J. C. // Biochem. Soc. Trans. — 1980. — Vol. 8. — P. 266—268.
19. DiMonte D., Bellomom G., Thor H. et al. // Arch. Biochem. — 1984. — Vol. 235. — P. 342—350.
20. DiMonte D., Ross D., Bellomo G. et al. // Ibid. — P. 334—341.
21. Frei B., Winterhalter K. H., Richeter C. // Biochemistry (Wash.). — 1986. — Vol. 25, N 151. — P. 4438—4443.
22. Gornall A. G., Bardawill C. J., David M. M. // J. biol. Chem. — 1949. — Vol. 177, N 2. — P. 751—783.
23. Jewell S. A., Bellomo G., Thor H. et al. // Science. — 1982. — Vol. 217. — P. 1257—1259.
24. Johnson D., Lardy H. // Metj. Enzymol. — 1967. — Vol. 10. — P. 94—96.
25. Jones B. C., Foster C. // J. Nutr. — 1942. — Vol. 24. — P. 245.
26. Mela L., Chance B. // Biochemistry (Wash.). — 1968. — Vol. 7. — P. 4059—4063.
27. Mirabelli F., Salis A., Perotti M. et al. // Biochem. Pharmacol. — 1988. — Vol. 37, N 18. — P. 3423—3427.
28. Mironova G. D., Sirota T. V., Pronevich L. A. et al. // J. Bioenerg. Biomembr. — 1982. — Vol. 14, N 4. — P. 213—225.
29. Moore G. A., O'Brien P. J., Orrenius S. // Xenobiotica. — 1986. — Vol. 16, N 9. — P. 873—882.
30. Norman A. W., Miller B. E. // Handbook of Vitamins: Nutritional, Biochemical and Clinical Aspects. — New York, 1984. — P. 45—97.

31. *Pleasure D., Wyszynski B., Sumner A. et al. // J. clin. Invest.*— 1979.— Vol. 64.— P. 1157—1167.
32. *Quick A. J. // Amer. J. Physiol.*— 1944.— Vol. 140, N 2.— P. 212—220.
33. *Rasmussen H., Matsumoto T., Fontaine O. // Fed. Proc.*— 1982.— Vol. 41.— P. 72—77.
34. *Suttie J. W. // Handbook of Vitamins. Nutritional, Biochemical and Clinical Aspects.*— New York, 1984.— P. 147—198.
35. *Thor H., Smith M. T., Hartzell P. et al. // J. biol. Chem.*— 1982.— Vol. 257, N 20.— P. 12419—12425.

Поступила 26.10.90

METABOLIC FUNCTIONS OF ISOLATED RAT LIVER MITOCHONDRIA IN VARIOUS LEVELS OF VITAMIN D AND K AVAILABILITY AND AFTER TREATMENT WITH PELENTANE

O. V. Tyulina, A. A. Sokol'nikov, T. V. Zharova, V. M. Kodentsova, Yu. N. Leikin, V. B. Spirichev

M. V. Lomonosov State University, Institute of Nutrition, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Alimentary deficiency of vitamin K caused a decrease in the rate of respiration in presence of ADP and in the rate of oxidative phosphorylation in the presence of succinate. Administration of the antivitamin K pelentane, excess of vikasol and deficiency of vitamin D did not affect these parameters. As distinct from controls and rats treated with pelentane, transport of calcium was decreased in presence of all the substrates studied in mitochondria isolated from liver tissue of animals deprived of vitamins K and D as well as of animals treated with vikasol excess. At the same time, accumulation of calcium led to time-dependent inhibition of respiratory chain if NAD-dependent substrates were used. Possible reasons of dissimilarity observed are discussed; the phenomenon found may occur due to exhaustion of the mitochondrial pyridine nucleotides pool. The data obtained suggest that antivitamins K altered only some parameters of body status (prothrombin time) similarly to the alterations observed in alimentary deficiency of vitamin K.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616.24-002.54-092:616.24-008.94:577:175.822]-033.1-07

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

α -АДРЕНЕРГИЧЕСКИЕ РЕЦЕПТОРЫ ПАРЕНХИМЫ ЛЕГКИХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ДЕСТРУКТИВНОМ ТУБЕРКУЛЕЗЕ

Научный центр молекулярной диагностики Минздрава СССР, кафедра фтизиопульмонологии Московской медицинской академии им. И. М. Сеченова

В настоящее время установлена важная роль α -адренергических рецепторов в патогенезе ряда заболеваний легких (хронический бронхит, бронхиальная астма). По данным ряда авторов [1, 4, 6, 10], α -адренергические рецепторы активируются при хронических обструктивных заболеваниях дыхательных путей. При деструктивных процессах в легких α -адренергические рецепторы практически не изучены.

В настоящей работе нами использован антагонист α_1 -адренергических рецепторов ^3H -празозин (^3H -PRZ) для анализа ^3H -PRZ-связывающих участков в паренхиме легких человека.

Целью работы являлось изучение α -адренергических рецепторов у больных деструктивным туберкулезом легких.

Методика. Кусочки паренхимы легких были получены при торакотомии у 20 пациентов (курящих мужчин 35—

55 лет), разделенных на 2 группы: контрольную, в которой образцы получали от 10 пациентов с диагнозом туберкулемы при сегментарной резекции в пределах здоровых тканей, и группу из 10 больных деструктивным туберкулезом легких. Диагноз во всех случаях был подтвержден гистологическими исследованиями. Образцы после взятия немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -70°C .

Выделение мембран легких проводили по методу [5]. Ткань гомогенизировали в буфере, содержащем 50 мМ трис-HCl 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 g, полученный супернатант центрифугировали 40 мин при 40 000 g. Осадок суспендировали в 10 мл буфера, содержащего 50 мМ трис-HCl pH 7,4, 10 мМ MgCl_2 , и центрифугировали в тех же условиях. Конечный осадок суспендировали в 5 мл буфера и хранили при -70°C до анализа связывания.

Для анализа связывания ^3H -PRZ мембранные белки (200 мкг) инкубировали в общем объеме 1 мл с 50 мМ трис-HCl pH 7,5, 10 мМ MgCl_2 , 0,05—8 нМ ^3H -PRZ (24,4 Ки/ммоль, «Amersham», Англия) 20 мин при 25°C . Разделение свободного и связанного с мембранами лиганда проводили фильтрацией проб на фильтрах GF/C («Whatman», Англия). Фильтры высушивали и просчитывали на жидкостном радиоспектрометре «Rack-beta» (LKB, Швеция) с эффективностью счета 40 %.

Специфическое связывание ^3H -PRZ определяли как разницу между связыванием в присутствии и отсутствии 10 мМ фентоламина («Ciba-Geigy», Швейцария).

Анализ связывания ^3H -дигидроалprenолола (^3H -ДГА) — β -адренергического радиолиганда — проводили инкубированием мембранных белков (100 мкг) в общем объеме 500 мкл с 50 мМ трис-HCl pH 7,5, 10 мМ MgCl_2 , 0,1—5 нМ ^3H -ДГА (82 Ки/ммоль, «Amersham», Англия) 20 мин при 30°C . Специфическое связывание ^3H -ДГА определяли как разницу между связыванием в присутствии и отсутствие 10 мМ альprenолола («Sigma», США).

Анализ связывания ^3H -квинуклидинил-бензилата (^3H -QNB) — мускаринового антагониста — проводили инкубированием мембранных белков (200 мкг) при 37°C 60 мин в 1 мл Na — K-фосфатного буфера (81 мМ Na, 9 мМ K) pH 7,4 с 0,1—8 нМ ^3H -QNB (39 и 46 Ки/ммоль, «Amersham», Англия). Специфическое связывание ^3H -QNB определяли как разницу между связыванием в присутствии и отсутствие 10 мМ атропина («Sigma», США).

Концентрацию белка определяли по методу [2], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

Определение параметров рецепторного связывания (константа диссоциации — K_d , максимальное число мест связывания — B_{max}) проводили в координатах Скотчарда [8].

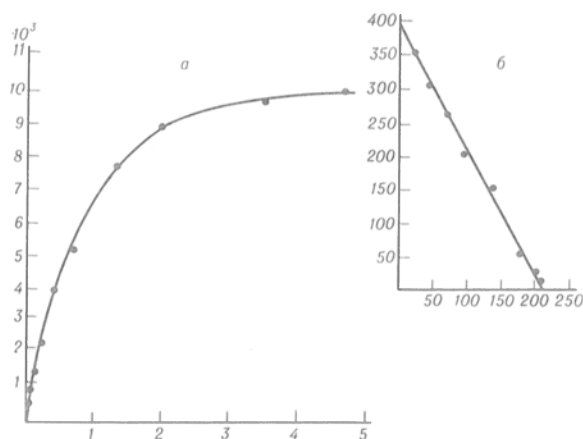


Рис. 1. Специфическое связывание ^3H -PRZ мембранами паренхимы легких (контрольная группа).

Здесь и на рис. 2: а — специфическое связывание ^3H -PRZ, по оси абсцисс — концентрация лиганда (в нМ), по оси ординат — специфическое связывание ^3H -PRZ (в CPM/мг белка); б — график в координатах Скотчарда, по оси абсцисс — В — связанный ^3H -PRZ (в фмоль/мг белка), по оси ординат — В/В — отношение связанного ^3H -PRZ к свободному (в фмоль/мг/нМ).

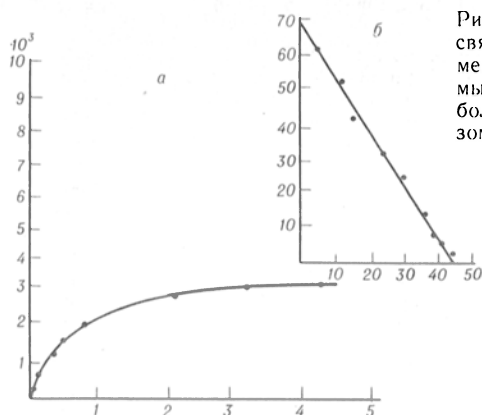


Рис. 2. Специфическое связывание ^3H -PRZ мембранами паренхимы легких (группа больных туберкулезом).

Результаты и обсуждение. Связывание α -адренергического радиолганда ^3H -PRZ мембранами паренхимы легких было насыщаемым и высокоаффинным (рис. 1 и 2). Насыщение наступало при концентрации лиганда 1,5 нМ. Анализ в координатах Скетчарда выявил следующие параметры связывания ^3H -PRZ в контрольных образцах: $K_d = 0,7 \pm 0,9$ нМ, $B_{\max} = 273,5 \pm 59,9$ фмоль на 1 мг белка (средние значения \pm SEM). Аффинность связывания ^3H -PRZ, а также величина B_{\max} согласуются с данными, полученными рядом авторов на легких собаки [4] или человека [6]. Анализ в координатах Скетчарда для группы больных туберкулезом показал, что аффинность связывания ^3H -PRZ практически не изменяется ($K_d = 0,5 \pm 0,07$ нМ; см. рис. 2). Однако число мест связывания ^3H -PRZ значительно снижается по сравнению с контролем ($B_{\max} = 51,1 \pm 7,5$ фмоль/мг, средние значения \pm SEM; см. рис. 2).

Исследование β -адренергических и мускариновых ацетилхолиновых рецепторов в паренхиме легких у больных туберкулезом показало, что параметры связывания β -адренергического лиганда ^3H -ДГА и мускаринового антагониста ^3H -QNB существенно не отличались от контроля (см. таблицу).

Изменения адренорецепторов при хронических обструктивных заболеваниях дыхательных путей были обнаружены в ряде лабораторий [3, 6, 7, 9].

В данной работе нами исследованы адренергические рецепторы в паренхиме легких при деструктивном туберкулезе. Показано, что максимальное число мест связывания ^3H -ДГА практически не изменяется, а число мест связывания ^3H -PRZ значительно снижается по сравнению со здоровой

тканью, что может свидетельствовать об изменении соотношения β - и α -адренорецепторов в паренхиме легких у больных туберкулезом ($\beta/\alpha = 1:1$ в здоровой ткани, $\beta/\alpha = 5:1$ при туберкулезе). Соотношение β - и α -адренорецепторов в здоровой ткани легких вполне согласуется с опубликованными данными [6]. Полученные данные могут свидетельствовать об уменьшении числа α -адренергических рецепторов в паренхиме легких человека при деструктивных процессах туберкулезной этиологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Barnes P. J., Kartliner J. S., Dollery C. T. // Clin. Sci.—1980.— Vol. 58.— P. 457—461.
2. Bradford M. M. // Analyt. Biochem.—1976.— Vol. 72.— P. 248—254.
3. van Koppen C. J., Hermanussen M. W., Verrijp K. N. et al. // Life Sci.—1987.— Vol. 40.— P. 2561—2570.
4. Kneussl M. P., Richardson J. B. // J. appl. Physiol.—1978.— Vol. 45.— P. 307—311.
5. Norman P., Abram T. S., Kluender H. C. et al. // Europ. J. Pharmacol.—1987.— Vol. 143.— P. 323—334.
6. Raaijmakers J. A. M., Wassink G. A., Kreukniet J., Terpstra G. K. // Europ. J. resp. Dis.—1984.— Vol. 65.— P. 215—220.
7. Raaijmakers J. A. M., Beneker C., Dol R., De Ruiter-Bootsma A. L. // Cell. molec. Biol.—1987.— Vol. 33.— P. 515—518.
8. Scatchard G. // Ann. N. Y. Acad. Sci.—1949.— Vol. 51.— P. 660—672.
9. Tashkin D. P., Conolly M. E., Deutsch R. J. et al. // Amer. Rev. resp. Dis.—1982.— Vol. 125.— P. 185—193.
10. Van Mieghem W., Stevens E., Billiet L. // Respiration.—1981.— Vol. 42.— P. 184—187.

Поступила 24.10.90

α -ADRENERGIC RECEPTORS OF HUMAN LUNG PARENCHYMA IN DESTRUCTIVE TUBERCULOSIS

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

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

Adrenergic receptors were studied in human lung parenchyma obtained from 10 patients with tuberculoma after segmental resection within the limits of surrounding normal tissues (controls) as well as from 10 patients with destructive pulmonary tuberculosis. Binding of α -adrenergic radioligand ^3H -prazosin was saturable with high rate of affinity in lung parenchymal membranes of both normal tissues and tissues impaired with tuberculosis. The Scatchard analysis indicated that the affinity of ^3H -prazosin binding was not altered in patients with tuberculosis, while amount of the ligand binding sites was significantly decreased as compared with control preparations ($K_D = 0,5 \pm 0,9$ нМ, $B_{\max} = 273,5 \pm 59,9$ фмоль/мг in controls; $K_D = 0,5 \pm 0,07$ нМ, $B_{\max} = 51,7 \pm 7,5$ фмоль/мг in tuberculous lung parenchyma). β -Adrenergic and muscarinic acetylcholinergic receptors were studied in lung parenchyma of patients with tuberculosis. Binding parameters of β -adrenergic ligand ^3H -dihydroalprenolol and muscarinic antagonist ^3H -quinuclidinyl benzylate were similar to those of control values. Amount of ^3H -dihydroalprenolol binding sites was not markedly altered while content of ^3H -prazosin binding sites was considerably decreased in lung parenchyma of patients with tuberculosis as compared with normal state. The data obtained suggest that population of α -adrenergic receptors was decreased in human lung parenchyma under conditions of destructive tuberculosis.

Характеристика адренергических и мускариновых ацетилхолиновых рецепторов паренхимы легких человека в норме и при деструктивном туберкулезе легких

Тип рецепторов	Контроль (n=10)	Туберкулез (n=10)
α -Адренорецепторы:		
^3H -PRZ:		
B_{\max} , фмоль/мг белка	$273,5 \pm 59,9$	$51,1 \pm 7,5$
K_d , нМ	$0,7 \pm 0,09$	$0,5 \pm 0,07$
^3H -ДГА:		
B_{\max} , фмоль/мг белка	$456,7 \pm 73,7$	$244,3 \pm 39,8$
K_d , нМ	$1,0 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,15$
Мускариновые (^3H -QNB):		
B_{\max} , фмоль/мг белка	$108,9 \pm 12,1$	$110,5 \pm 4,6$
K_d , нМ	$0,45 \pm 0,7$	$0,4 \pm 0,05$

Г. О. Каминская, Г. Ю. Блонская, Т. О. Омаров,
О. В. Ловачева

СОДЕРЖАНИЕ И СООТНОШЕНИЯ ПРОСТАГЛАНДИНОВ ГРУПП E и F_{2α} В БРОНХОАЛЬВЕОЛЯРНЫХ СМЫВАХ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

Центральный НИИ туберкулеза Минздрава СССР, Москва

Среди систем гуморальной регуляции воспаления большое внимание в последние годы привлекают эйкозаноиды и, в частности, простагландины (ПГ). Интерес к ПГ особенно велик в пульмонологии, поскольку установлено, что в физиологических условиях концентрации и соотношения ПГЕ и ПГF_{2α}, помимо регуляции клеточных взаимодействий на уровне всего организма, играют важную роль в сохранении нормального тонуса гладкой мускулатуры в легких и оптимальных вентиляционно-перфузионных соотношений [8, 11, 14, 15, 18, 20]. При развитии любого воспаления синтез и высвобождение ПГ резко возрастают. Источником ПГ могут быть практически любые клетки, но главным продуцентом ПГ, особенно ПГЕ, являются активированные макрофаги [6, 7, 16]. При превышении физиологических концентраций ПГ потенцируют действие других медиаторов и могут усиливать проявления воспалительной реакции, оказывать иммунодепрессивный эффект, подавлять защитные функции макрофагов и нейтрофилов. При этом влияние ПГЕ и ПГF_{2α} часто носит разнонаправленный характер, поэтому интерес представляют не только абсолютные концентрации, но и соотношения ПГ обеих групп [3, 13, 15, 17].

Работы, посвященные изменениям в системе ПГ при туберкулезе, единичны. Изучение уровня ПГЕ₁ и ПГF_{2α} в плазме крови больных туберкулезом легких [5] показало, что при данном заболевании повышается содержание обоих ПГ. Благоприятному течению процесса сопутствует преимущественное повышение содержания ПГЕ₁. При быстро прогрессирующем экссудативном варианте течения заболевания с развитием тканевой деструкции наблюдается преобладающее увеличение уровня ПГF_{2α}.

Изучена динамика изменения содержания ПГЕ и ПГF_{2α} в легочной ткани морских свинок в процессе развития у них экспериментального туберкулеза [1]. Показано, что повышение уровня ПГЕ является маркером активного воспаления при туберкулезе, а увеличение содержания ПГF_{2α} сопутствует фазе экссудативно-некротических изменений. Установлено, что изменения уровня ПГ в легочной ткани при туберкулезе носят фазовый характер и тесно взаимосвязаны с особенностями клеточных реакций.

Учитывая эти данные, а также большую роль, которую локальные концентрации и соотношения ПГ могут играть в возникновении бронхиальной обструкции, являющейся частым спутником туберкулеза [4], мы провели настоящее исследование.

Методика. Были обследованы 86 больных с различными формами туберкулеза легких, находившиеся на лечении в клиниках ЦНИИ туберкулеза Минздрава СССР. Среди обследованных было 53 мужчины и 33 женщины в возрасте от 20 до 52 лет. Преобладающее большинство составили больные с впервые выявленным инфильтративным (42) и очаговым (18) туберкулезом легких. Диссеминированный туберкулез имел место у 12, хронический фиброзно-кавернозный — у 14 больных. Фаза распада диагностирована у 43, бактериовыделение — у 50. Процесс был односторонним у 52, двусторонним у 34 больных.

Помимо обязательного клинко-рентгенологического и лабораторного обследования, у всех больных осуществляли фибро-бронхоскопию с проведением бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) по методике [2]. БАЛ проводили дистальнее бронхов 5—6-го порядка с введением дробными дозами 100 мл подогретого до 37 °С физиологического раствора с последующей немедленной его аспирацией. В соответствии с задачами исследования смыв получали как из пораженного, так и из контралатерального (при одностороннем процессе) легкого. В интактном легком смыв проводили из 3, 4 или 5-го сегментов, а со стороны поражения — из сегмента, непосредственно примыкающего к зоне специфического воспаления.

В целом БАЛ интактного легкого проведен у 19 больных, пораженного — у 49, а у 18 больных с односторонними процессами — одновременно из интактного и пораженного легкого (позиционный лаваж).

Функцию внешнего дыхания (ФВД) оценивали на аппарате «Пневмоскрип-2» («Eger», ФРГ). Учитывали показатели жизненной емкости легких, объем форсированного выдоха (ОФВ₁) за 1 с, а также показатели кривой поток — объем форсированного выдоха. Бронхологическое исследование с проведением БАЛ и исследование ФВД осуществляли в течение первых 2—3 нед после поступления больных в клинику.

Бронхоальвеолярный смыв (БАС) фильтровали через 2 слоя марли и центрифугировали в течение 15 мин при 360 g и 4 °С. Полученный бесклеточный супернатант разливали по аликвотам и сохраняли при —20 °С. Количественное определение ПГF_{2α} и суммарно группы ПГЕ проводили радиоиммунологическим методом с использованием стандартных методов и наборов «Izinta» (Венгрия) и «Clinical Assays» (США). Полученные значения содержания ПГ пересчитывали на 1 мг белка, который определяли микробиуретовым методом.

Результаты и их обсуждение. По нашим данным (см. таблицу), на стороне поражения концентрация обоих ПГ в бронхоальвеолярном пространстве была достоверно выше, чем в контралатеральном легком. Повышение уровня ПГЕ преобладало, что документировалось достоверным ростом соотношения ПГЕ/ПГF_{2α}. Разброс индивидуальных значений на стороне поражения был гораздо больше. В абсолютных величинах показатели ПГЕ в интактном легком колебались от 0 до 111 пг/мг, в пораженном легком — от 0 до 222 пг/мг. Для ПГF_{2α} эти колебания составили соответственно 0—70,5 и 0—129 пг/мг. Разброс соотношений в концентрациях обоих ПГ за счет резкого увеличения уровня ПГЕ оказался гораздо значительнее, чем было описано для плазмы крови [5] и легочной ткани морских свинок [1]. Выраженность обнаруженных изменений была отчетливо связана с формой туберкулезного процесса, т. е. с характером тканевых реакций (см. таблицу). У больных с впервые выявленным очаговым туберкулезом легких течение заболевания характеризовалось малой интенсивностью клинических проявлений и отсутствием отчетливой экссудативной реакции вокруг очагов. При этом содержание и соотношение ПГ в смывах из пораженного и интактного легкого достоверно не различались при значительном разбросе индивидуальных величин.

Иная картина обнаруживалась у больных инфильтративным туберкулезом, для которых харак-

Содержание и соотношение ПГ в бронхоальвеолярных смывах, полученных у больных туберкулезом легких со стороны поражения и из контралатерального легкого

№	Форма туберкулеза	Легкое	n	ПГЕ, нг/мг белка	ПГФ _{2α} нг/мг белка	ПГЕ/ПГФ _{2α}
Все больные		Интактное	34	44,3±11,8	26,5±7,56	5,69±1,76
		Пораженное	66	103,9±15,5*	52,8±9,4*	23,2±6,0*
1.	Очаговая	Интактное	6	45,2±26,3	27,9±17,9	5,42±3,37
		Пораженное	16	75,0±36,8	37,8±15,0	15,4±9,97
2.	Инфильтративная	Интактное	17	51,1±18,2	24,4±11,0	3,93±1,79
		Пораженное	26	107,8±18,7*	54,4±16,0**	24,2±9,45*
3.	Фиброзно-кавернозная	Интактное	5	7,02±2,84	23,3±13,9	8,19±5,39
		Пораженное	8	121,2±44,8*	99,9±15,6*	1,52±0,46**
				$p_{2a-3a} < 0,05$	$p_{16-36} < 0,01$ $p_{26-36} < 0,05$	$p_{26-36} < 0,02$

Примечание. p — достоверность различий между результатами исследования аналогичных смывов в разных группах больных. Одна звездочка — достоверность различий между показателями интактного и пораженного легкого ($p < 0,05$ и выше), две — достоверность различий между показателями интактного и пораженного легкого ($p < 0,1$).

терны наличие обширной экссудативной воспалительной реакции и выраженные явления интоксикации. У этих больных показатели интактного легкого не отличались существенно от таковых предыдущей группы, но концентрации ПГЕ в смыве с пораженного легкого вдвое превышали аналогичные показатели контралатеральной стороны. Такую же тенденцию обнаруживали показатели ПГФ_{2α}, однако повышение уровня ПГЕ явно превалировало.

Наконец, совсем особую группу по характеру неспецифической реактивности организма представляли больные хроническим фиброзно-кавернозным туберкулезом, у которых нередко наблюдается угнетение или истощение систем гуморальной компенсации и защиты. У этих больных в интактном легком содержание ПГЕ было достоверно ниже, чем у больных инфильтративным туберкулезом, тогда как на стороне поражения повышение уровня обоих ПГ было максимальным с отчетливым превалированием такового ПГФ_{2α} (см. таблицу). Особенно отчетливо эти явления были выражены у больных с большими и гигантскими (более 4 см в диаметре) кавернами, у которых на стороне поражения концентрация ПГФ_{2α} в смыве составляла $101,6 \pm 17,1$ нг/мг, а соотношение ПГЕ/ПГФ_{2α} снижалось до $0,53 \pm 0,36$. При диссеминированном туберкулезе подобный анализ оказался невозможным, поскольку процесс во всех случаях был двусторонним.

Определенное влияние на характер показателей ПГ в смывах оказывал фактор курения. На стороне поражения у курящих больных по сравнению с некурящими концентрация ПГФ_{2α} была достоверно выше, а соотношение ПГЕ/ПГФ_{2α} столь же достоверно снижено (соответственно $89,3 \pm 18,4$ и $30,6 \pm 8,6$ нг/мг; $p < 0,01$; $4,35 \pm 2,0$ и $38,3 \pm 9,6$; $p < 0,01$).

Учитывая выраженное влияние ПГЕ и ПГФ_{2α} на тонус бронхиальной мускулатуры, мы проанализировали их показатели в БАС в зависимости от состояния бронхиальной проходимости. При исследовании ФВД у 58 больных изменения отсутствовали, а у 40 были обнаружены явления обструкции бронхов различного уровня. Проведенный анализ показал, что в интактном легком у больных без бронхиальной обструкции содержа-

ние ПГЕ в БАС было достоверно выше ($60,7 \pm 18,3$ нг/мг против $19,4 \pm 9,76$ нг/мг; $p < 0,05$), а уровень ПГФ_{2α}, напротив, резко возрастал у больных с бронхиальной обструкцией, но на стороне поражения ($79,25 \pm 18,9$ нг/мг против $36,5 \pm 8,8$ нг/мг; $p < 0,05$).

Таким образом, проведенное исследование показало, что при развитии туберкулезного процесса в легких в органном метаболизме ПГ наступают глубокие изменения. Проявляются они прежде всего значительным нарастанием локального синтеза и высвобождения ПГЕ вблизи очага поражения. Если в условиях нормы в бронхоальвеолярном пространстве концентрация ПГЕ в 2—3 раза превышает таковую ПГФ_{2α}, что обеспечивает оптимальный для функции дыхания тонус бронхиальной мускулатуры [19], то у больных туберкулезом это соотношение на стороне поражения в среднем увеличивалось почти на порядок. Вместе с тем и в интактном легком коэффициент ПГЕ/ПГФ_{2α} в среднем составлял $5,69 \pm 1,76$, что примерно вдвое превышает физиологические соотношения.

В принципе высвобождение повышенных количеств ПГЕ в зоне любого воспаления известно и эволюционно носит защитный характер. Повышенные концентрации ПГЕ, вызывая увеличение внутриклеточного цАМФ, с одной стороны, обеспечивают энергетику тканей, а с другой — стабилизируют лизосомные мембраны и тем самым тормозят высвобождение медиаторов воспаления и протеолитических ферментов в зону поражения [9, 10, 12]. Для легких это имеет дополнительное значение, поскольку многие медиаторы воспаления (гистамин, серотонин и др.) одновременно являются медиаторами бронхоконстрикции, и, следовательно, высокие концентрации ПГЕ противодействуют обструкции бронхов в условиях воспаления не только непосредственно через собственный рецепторный аппарат, но и опосредованно, уменьшая реакции дегрануляции. При этом в предотвращении генерализованной бронхиальной обструкции основную роль, возможно, играет не продукция ПГЕ в зоне поражения, а универсальное умеренное повышение синтеза и высвобождения ПГЕ во всей респираторной системе, поскольку, как уже указывалось, у больных с бронхиальной обструкцией концентрации ПГЕ в интактном лег-

ком были в среднем в 3 раза ниже, чем у больных без нарушений функции внешнего дыхания.

О компенсаторном повышении синтеза ПГЕ во всей респираторной системе свидетельствует, по-видимому, и тот факт, что у больных хроническим фиброзно-кавернозным туберкулезом, у которых реакции метаболической адаптации часто бывают угнетены, содержание ПГЕ в интактном легком в среднем было в 7 раз ниже, чем у больных с впервые выявленным туберкулезом.

Изменения содержания $\text{PGF}_{2\alpha}$ носили несколько иной характер. Если повышение уровня ПГЕ на стороне активного туберкулезного воспаления было очень значительным независимо от формы заболевания, то увеличение содержания $\text{PGF}_{2\alpha}$ в пораженном легком было четко связано с характером процесса. Оно, по существу, отсутствовало у больных очаговым туберкулезом (см. таблицу), у которых воспаление носило продуктивный ограниченный характер и было гораздо более значительным при инфильтративном туберкулезе, сочетающемся с выраженной экссудативной воспалительной реакцией и начинающейся деструкцией, достигая максимума при фиброзно-кавернозном туберкулезе и у больных с гигантскими кавернами. Эти наблюдения согласуются с данными литературы о том, что $\text{PGF}_{2\alpha}$ стимулирует реакции дегрануляции тучных клеток, высвобождение лизосомных ферментов из фагоцитов, будучи одним из медиаторов реакций иммунного конфликта [15]. С учетом того что в течении туберкулеза значительную роль играют реакции гиперчувствительности замедленного типа, увеличение содержания $\text{PGF}_{2\alpha}$ в зоне поражения при неблагоприятном течении процесса могло свидетельствовать о том, что высокий уровень $\text{PGF}_{2\alpha}$ являлся не столько спутником, сколько одним из патогенетических факторов в формировании типа течения данного заболевания. Резкое снижение соотношения ПГЕ/ $\text{PGF}_{2\alpha}$ в пораженном легком у больных хроническим фиброзно-кавернозным туберкулезом и с гигантскими кавернами (соответственно $1,53 \pm 0,46$ и $0,53 \pm 0,73$) создавало метаболический фон не только для прогрессирования воспаления, но и для развития бронхиальной обструкции. Это предположение подтверждали результаты сопоставления показателей $\text{PGF}_{2\alpha}$ в смывах с пораженного легкого у больных с наличием и отсутствием бронхообструктивного синдрома.

У больных туберкулезом легких в бронхоальвеолярном пространстве резко изменяются концентрации и соотношения ПГ. По-видимому, увеличенная продукция ПГЕ является первой компенсаторной реакцией организма и реализуется не только в зоне поражения, но и на уровне всего органа, достигая максимума в области специфического воспаления. Повышение продукции $\text{PGF}_{2\alpha}$ имеет место преимущественно в зоне поражения и взаимосвязано с характером тканевых реакций, достигая максимальных значений при интенсивных деструктивных процессах в легочной ткани. Концентрации и соотношения ПГЕ и $\text{PGF}_{2\alpha}$ в бронхоальвеолярном пространстве у больных туберкулезом легких оказывают влияние на тонус бронхиальной мускулатуры и соответственно на состояние бронхиальной проходимости. Избыточное образование $\text{PGF}_{2\alpha}$ в зоне поражения влияет на формирование бронхообструктивного

синдрома, а увеличенная продукция ПГЕ на уровне всего легкого как органа носит защитный характер и противодействует развитию бронхиальной обструкции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Блонская Г. Ю. Изменения содержания простагландинов и циклических нуклеотидов в легочной ткани морских свинок при развитии туберкулеза: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 1989.
2. Диагностический бронхоальвеолярный лаваж: Метод. рекомендации. — М., 1986.
3. Каминская Г. О. // Пробл. туб. — 1982. — № 5. — С. 71—74.
4. Минстер В. А. // Там же. — 1985. — № 7. — С. 7—10.
5. Сокол Т. В. // Там же. — 1984. — № 11. — С. 24—27.
6. Bonta I. L., Parnham M. J. // Biochem. Pharmacol. — 1978. — Vol. 27. — P. 1611—1623.
7. Ferraris V. A., De Rubertis F. R. // J. clin. Invest. — 1974. — Vol. 54. — P. 378—386.
8. Gardiner P. J. // Prostaglandins. — 1975. — Vol. 10. — P. 607—616.
9. Gordon D., Bray M. A., Morley J. // Nature. — 1976. — Vol. 262. — P. 401—402.
10. Herscovitz H. B. // Prostaglandins. — 1975. — Vol. 10. — P. 87—99.
11. Horton E. W. // Brit. J. Pharmacol. Chemother. — 1965. — Vol. 24. — P. 470—478.
12. Kawarada Y., Lambek J., Matsumoto T. // Amer. J. Surg. — 1975. — Vol. 129. — P. 217—222.
13. Lewis G. P. // Brit. med. Bull. — 1983. — Vol. 39. — P. 243—248.
14. Mathe A. A., Hedqvist P. // Amer. Rev. resp. Dis. — 1975. — Vol. 111. — P. 313—320.
15. Mathe A. A. // Acta physiol. scand. — 1976. — Suppl. 441. — P. 5—55.
16. McDermot J., Kelsey C. R., Waddell K. A. et al. // Prostaglandins. — 1984. — Vol. 27. — P. 163—179.
17. Morley J., Bray M. A., Beets J. L., Paul W. // J. roy. Soc. Med. — 1980. — Vol. 73. — P. 443—447.
18. Schneider M. W., Drazen J. M. // Amer. Rev. resp. Dis. — 1980. — Vol. 121. — P. 835—842.
19. Shaw J. O., Moser K. M. // Chest. — 1975. — Vol. 68. — P. 75—80.
20. Sweatman W. J., Collier H. O. J. // Nature. — 1968. — Vol. 217. — P. 69—70.

Поступила 04.07.90

CONTENT AND RATIO OF PROSTAGLANDINS E AND $\text{F}_{2\alpha}$ IN BRONCHOALVEOLAR LAVAGES OF PATIENTS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS

G. O. Kaminskaya, G. Yu. Blonskaya, T. O. Omarov, O. V. Lovacheva

Central Institute of Tuberculosis, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

Content of prostaglandins PGE and $\text{PGF}_{2\alpha}$ was studied by means of radioimmunoassay; their ratio was calculated in bronchoalveolar lavages obtained from impaired lung and from contralateral, intact lung of 86 patients with various forms of pulmonary tuberculosis. Concentration of prostaglandins was calculated per 1 mg of protein in lavage to standardize the data obtained. In the patients with tuberculosis production of PGE was increased in both lungs. However, the prostaglandin content was distinctly higher in the impaired lung but approximately similar in various forms of the disease. Hyperproduction of $\text{PGF}_{2\alpha}$ occurred in the impaired lung and depended on the type of the process. Content of $\text{PGF}_{2\alpha}$ was maximal in complicated destructive forms of tuberculosis. Bronchial muscle tension depended on the ratio of both groups of prostaglandins in bronchoalveolar space. Bronchial obstruction was accompanied by a decrease of PGE content in intact lung and by high concentration of $\text{PGF}_{2\alpha}$ near the tuberculosis focus.

Ю. К. Башмаков, С. Е. Холин, Т. С. Брюзгина

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АЛЬВЕОЛЯРНОГО СУРФАКТАНТА ПРИ АЛЛЕРГИИ НЕМЕДЛЕННОГО ТИПА

Медицинский институт, Киев; Институт физической культуры, Львов

Разработка эффективных методов лечения респираторных атопий невозможна без глубокого понимания патогенеза дыхательной недостаточности при аллергии. Помимо трахеобронхиальной констрикции, важнейшими механизмами аллергической асфиксии являются отек слизистых оболочек и гиперсекреция слизи [7]. Несмотря на бесспорное значение секреторного механизма в развитии асфиксии при аллергических заболеваниях дыхательной системы, закономерности изменения в сенсibilизированном организме свойств системы альвеолярного сурфактанта, регулирующей физические свойства секрета на всем протяжении кондуктивной зоны легкого [4], остаются неизученными.

Целью настоящей работы является исследование физико-химических свойств альвеолярного сурфактанта в динамике формирования модельного процесса аллергии немедленного типа.

Методика. Опыты поставлены на крысах-самцах линии Вистар массой 180—200 г. Крыс сенсibilизировали однократным подкожным введением 0,1 мл адьюванта Фрейнда и 2 мг бычьего сывороточного альбумина [1]. Анафилактический шок вызывали на 12-е сутки развития сенсibilизации внутривенным введением 10 мг/мл гомологичного аллергена. Препараты альвеолярного сурфактанта выделяли методом дифференциального центрифугирования [10] из ткани легких крыс, деканитированных через 3 или 12 сут после инъекции сенсibilизирующей дозы аллергена, а также у крыс на 60-й минуте развития анафилактического шока. Исследование биохимических компонентов сурфактанта — общего белка, общих липидов, триглицеридов, холестерина, фосфолипидов и суммарной фракции липопротеидов низкой и очень низкой плотности (ЛПНП+ЛПОНП) — проведено фотометрическими методами на микроанализаторе FR-900 (Финляндия) с использованием химических реактивов фирмы «LabSystem» (Финляндия). Жирнокислотный состав фосфолипидов определяли на газожидкостном хроматографе «Цвет 164» с пламенно-ионизационным детектором [5].

Величину поверхностного натяжения определяли методом регистрации максимального давления в пузырьке [4]. Оценку смачивающей способности выстилающего комплекса проводили методом определения краевых углов смачивания сурфактантом монослоя перитонеальных сингенных макрофагов [3] по критериям косинуса краевого угла смачивания ($\cos \Theta$), коэффициента растекания (Δr), а также величины работ адгезии (W_a) и когезии (W_k).

Для контрольных исследований использованы интактные крысы, содержавшиеся в аналогичных условиях виварного и пищевого режимов. Статистическая обработка результатов проведена на ЭВМ методом Стьюдента и выборочно методом Вилкоксона — Манна — Уитни.

Результаты и их обсуждение. Поверхностное натяжение является интегральным критерием, зависящим от интенсивности секреции в бронхоальвеолярное пространство фосфолипидных поверхностно-активных веществ (ПАВ) и от содержания в сурфактанте факторов их метаболической инактивации [6]. Основной причиной снижения функциональной активности сурфактанта при сенсibilизации (табл. 1) представляется накопление в нем веществ, увеличивающих поверхностное натяжение дисперсных систем, — белков, липопротеидов, неполярных липидов [6]. Увеличение в выстилающем комплексе легких содержания сывороточных липопротеидов является косвенным свидетельством усиления процессов экссудации плазмы через аэрогематический барьер.

Однако усиление экссудации вряд ли является единственной причиной изменения свойств сурфактанта при сенсibilизации, на что указывает увеличение содержания в сурфактанте полярных липидов — фосфолипидов и холестерина, образование которых протекает в альвеолоцитах II типа [4, 6]. Прогрессирующая гипофосфолипидемия, отмечавшаяся нами ранее в аналогичных условиях эксперимента [2], позволяет расценивать увеличение содержания фосфолипидов в сурфактанте сенсibilизированных животных как проявление липогенной функции легких.

Механизмы метаболической компенсации, направленные на стабилизацию поверхностного натяжения сурфактантной системы, по-видимому, не ограничиваются накоплением в выстилающем комплексе легких полярных липидов. Вытеснение из жирнокислотного спектра фосфолипидов сурфактанта пентадециловой и олеиновой кислот ацила-

Таблица 1

Физико-химические показатели альвеолярного сурфактанта в динамике развития аллергии немедленного типа

Условия опыта	Поверхностное натяжение, эрг/см ²	Общий белок, г/л	ЛПОНП+ЛПНП, ммоль/л	Общие липиды, ммоль/л	Триглицериды, ммоль/л	Холестерин, ммоль/л	Фосфолипиды, ммоль/л
Контроль (интактные крысы; $n=9$)	42,48±1,13	13,03±1,20	0,41±0,06	7,37±0,15	1,88±0,08	0,62±0,03	1,62±0,05
Динамика формирования сенсibilизации — день исследования:							
3-й ($n=9$)	49,31±1,69	15,78±1,23	0,60±0,06	11,25±0,19	2,66±0,09	0,83±0,05	2,23±0,07
p	<0,05	>0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
p_w	<0,05	<0,05					
12-й ($n=9$)	51,59±1,60	19,09±0,92	0,90±0,11	9,63±0,12	2,18±0,04	0,85±0,04	2,14±0,07
p	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
p_w		<0,05					
Анафилактический шок ($n=9$)	58,51±2,18	14,96±0,49	0,64±0,03	7,72±0,49	1,81±0,04	0,86±0,04	1,02±0,09
p	<0,05	>0,05	<0,05	>0,05	>0,05	<0,05	<0,05

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3 p — показатель достоверности различия в сравнении с контролем по критерию Стьюдента (p) или критерию Вилкоксона — Манна — Уитни (p_w).

Содержание высших жирных кислот (в %) в фосфолипидах альвеолярного сурфактанта в динамике развития аллергии немедленного типа

Условия опыта	C _{15:1}	C _{16:0}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{20:3}	C _{20:4}
Контроль (интактные крысы; n=9)	9,46±2,56	43,47±3,79	11,10±0,57	24,21±0,90	5,58±1,01	1,60±0,48	4,41±0,52
Динамика формирования сенсибилизации — день исследования:							
3-й (n=9)	—	58,05±2,33	9,88±1,34	20,04±1,09	4,78±0,58	—	6,17±0,75
p		<0,05	>0,05	<0,05	>0,05		>0,05
p _W							<0,05
12-й (n=9)	4,61±0,98	57,74±1,87	10,50±0,53	15,47±0,97	4,77±0,21	—	7,70±0,45
p	<0,05	<0,05	>0,05	<0,05	>0,05		<0,05
Анафилактический шок (n=9)	2,68±0,32	45,61±0,95	13,86±1,36	20,81±0,99	7,62±0,62	—	8,35±0,31
p	<0,05	>0,05	>0,05	<0,05	>0,05		<0,05
p _W	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05		<0,05

Примечание. — жирные кислоты определяются в пробах в следовых количествах.

ми пальмитата (табл. 2) является оптимальной формой ацилирования фосфолипидных ПАВ сурфактанта, обеспечивающей максимальное проявление их поверхностной активности [4, 6]. Модификация жирнокислотного состава фосфолипидов сурфактанта протекает в ходе реакций трансацилирования фосфолипидов и нейтральных триглицеридов [4], накопление полярных молекул которых в сурфактанте сенсибилизированных животных может повышать поверхностное натяжение выстилающего комплекса легких. Увеличенное содержание в сурфактанте сенсибилизированных животных общих липидов, холестерина и фосфолипидов, даже при условии оптимизации формы жирнокислотного ацилирования последних, не становится полноценным механизмом метаболической адаптации, достаточным для поддержания поверхностного натяжения сурфактанта на гомеостатическом уровне.

Особенностью биохимического состава сурфактанта при анафилаксии являлась нормализация содержания в нем общего белка, липидов и триглицеридов. Это явление, равно как и частичная стабилизация содержания сывороточных липопротеидов в выстилающем комплексе сывороточных липопротеидов, позволяет относить установленные изменения на счет активации трансудативных процессов в аэрогематическом барьере и избыточной гидратации сурфактантного комплекса. Положительный водный баланс альвеолярной гипофазы может развиваться за счет проявления трансудативных эффектов пептидных эйкозаноидов [9] и ограничения экспираторных влагопотерь. Для астматического тахипноэ характерно охлаждение слизистых оболочек и воздушных масс трахеобронхиального дерева, способствующих угнетению парообразования в легких и формированию инспираторного потока конденсированной влаги [8].

Изменения биохимического состава сурфактанта при анафилактическом шоке выражались также в уменьшении содержания в выстилающем комплексе легких фосфолипидов. Замещение в фосфолипидах сурфактанта пальмитиновой кислоты, ацилирующей фосфолипиды выстилающего комплекса преимущественно в C₂-положении [4, 6], на стеарат, олеат, линолеат и арахидонат, позволяет предполагать причастность системы фосфолипазы A₂ к формированию нарушений метаболизма фосфолипидов в органах дыхания при анафилаксии. Поскольку наибольшая поверхностная активность свойственна фосфолипидным ПАВ, ацилированным насыщенными жирными кислотами [4], замещение C_{15:1} и C_{16:0} жирных кислот на ненасыщенные ацилы следует признать неблагоприятной формой эфирной изомеризации фосфолипидов при анафилактическом шоке. Включение в состав фосфолипидов арахидоната, имеющего в связи с полиненасыщенностью низкое значение степеней свободы углеводородной цепи, может также способствовать накоплению в выстилающем комплексе легкого неэффективного пула фосфолипидов.

Свидетельством некомпенсированности биохимических изменений в сурфактантной системе при анафилаксии является возрастание показателя работы когезии в сурфактанте (табл. 3), который отражает энергию межмолекулярных взаимодействий в альвеолярной гипофазе. По-видимому, в условиях дефицита и структурной неполноценности фосфолипидных ПАВ происходит истончение адсорбционных слоев ПАВ вокруг гидрофобных доменов макромолекул и усиление взаимодействий между их аниогенными и катиогенными группировками. На изменение структуры внешних адсорбционных слоев ПАВ, распределенных на границе раздела сурфактант — клеточный монослой, указывает увеличенный при

Таблица 3

Показатели смачивающей способности альвеолярного сурфактанта при развитии анафилактического шока

Условия опыта	cos θ	W _д , эрг/см ²	W _к , эрг/см ²	Δγ
Контроль (интактные крысы, n=8)	9,85±0,01	86,10±0,05	86,70±2,30	43,50±0,76
Анафилактический шок (n=8)	9,61±0,05	114,77±0,34	117,02±4,36	56,26±0,34
p	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

анафилактики показатель работы адгезии выстилающего комплекса. Усиление межмолекулярных взаимодействий внутри контура сурфактанта и по границе раздела с клеточным монослоем детерминирует снижение смачивающей способности и текучести выстилающего комплекса при анафилактическом шоке, что обеспечивает затруднение экспираторного потока бронхоальвеолярного сектара в верхние дыхательные пути. На фоне патогномичного для аллергии немедленного типа усиления бронхоальвеолярной секреции [7] недостаток и функциональная неполноценность фосфолипидных ПАВ, равно как и изменение адгезивно-когезивных свойств выстилающего комплекса, могут формировать важнейший патогенетический механизм обтурации дыхательных путей и развития асфиксии в сенсibilизированном организме.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адо А. Д. Общая аллергология. — М., 1978.
2. Башмаков Ю. К., Васильевич Л. Е. // Проблемы патологии в эксперименте и клинике. — 1989. — Т. 9. — С. 19—20.
3. Башмаков Ю. К. // Новое в лабораторной диагностике болезней внутренних органов. — Киев; Ворошиловград, 1989. — С. 12—14.
4. Березовский В. А., Арчаков В. Ю. Поверхностно-активные вещества легких. — Киев, 1982.
5. Процюк Р. Г., Брюзгина Т. С., Кравченко Э. Я. // Лаб. дело. — 1986. — № 6. — С. 342—343.
6. Сыромятникова Н. В., Гончарова В. А., Котенко Т. В. Метаболическая активность легких. — Л., 1987.
7. Ялкут С. И., Котова С. А. Циклические нуклеотиды и особенности гомеостаза при аллергии. — Киев, 1987.
8. Jilbert I. A., Fouke I. M., McFadden E. R. // J. appl. Physiol. — 1988. — Vol. 64, N 5. — P. 2167—2174.
9. Malik A., Perlman M. B., Cooper I. A. // Fed. Proc. — 1985. — Vol. 44, N 1. — P. 36—42.
10. Robertson I., Enhornring G. // Scand. J. clin. Lab. Invest. — 1972. — Vol. 29, N 1. — P. 45—49.

Поступила 11.07.89

PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF ALVEOLAR SURFACTANT IN ALLERGY OF THE IMMEDIATE TYPE.

Yu. K. Bashmakov, S. E. Kholin, T. S. Bryuzgina

Medical School, Kiev, Institute of Physical Culture, Lvov

Development of sensitization involved accumulation of protein, lipoproteins and neutral triglycerides in lung surfactant, which inactivated surface active phospholipids and decreased the surface activity of surfactant. In anaphylactic shock a decrease in content of phospholipids and alteration of their fatty acid spectrum occurred as a result of which the moistening capacity of the covering complex was lowered and expiration of the bronchoalveolar secretion was restricted thus contributing to formation of asphyxia.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 612.015.1:577.152.34].06:614.7](470.344)

Р. В. Степанов, Л. В. Платонова, В. Л. Сусликов, Т. С. Пасхина

АКТИВНОСТЬ ЭЛАСАЗОПОДОБНЫХ ПРОТЕИНАЗ И ИХ ИНГИБИТОРОВ У КОРЕННЫХ ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЖИТЕЛЕЙ В РАЗНЫХ БИОГЕОХИМИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ ЧУВАШСКОЙ АССР

Чувашский университет им. И. Н. Ульянова, Чебоксары, Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

В последние годы в связи с неоднородностью распространения в пределах отдельных регионов разных стран ишемической болезни сердца большую актуальность приобретает изучение влияния биогеохимических факторов на происхождение и развитие атеросклеротических процессов. Важным звеном патогенеза атеросклероза является деструкция соединительнотканых структур (эластина, коллагена) сосудистой стенки [6, 9, 11]. Основными эффекторами, участвующими в деградации структурных компонентов сосудистой стенки, являются клеточные протеиназы. В литературе приводятся доказательства участия эластазоподобных протеиназ в процессах деструкции компонентов стенки сосудов [4, 5, 9]. Эластазоподобные протеиназы, участвуя в расщеплении важнейших биологических субстратов, оказывают влияние на биохимические процессы в очаге воспаления, свертывания крови и фибринолиза, на гуморальный ответ, упругость и проницаемость сосудистой стенки [2, 8, 9]. Одним из главных механизмов регуляции активности эластазоподобных протеиназ является их взаимодействие с эндогенными белковыми ингибиторами протеиназ, такими как α_1 -протеиназный ингибитор (α_1 -ПИ), α_2 -макроглобулин (α_2 -МГ), кислотостабильный ингибитор протеиназ [7]. Выявление изменения протеиназно-ингибиторного баланса крови может указывать на наличие в организме атеросклеротических процессов.

В связи с вышесказанным особенно большой интерес представляет исследование протеолитических ферментов и их ингибиторов с позиции биогеохимической экологии и адаптации организма. Последнее послужило основанием для проведения сравнительного изучения эластазоподобной системы крови у коренных практически здоровых жителей двух субрегионов биосферы Чувашской АССР — Присурского (ПСБ) и Прикубинноцивилевского (ПЦСБ), существенно отличающихся по всем звеньям биогеохимической цепи макро- и микроэлементного состава и характеру проявления биологических реакций организма [3].

Методика. Обследованы коренные практически здоровые жители в возрасте от 30 до 49 лет: 86 человек (40 мужчин и 46 женщин) из ПСБ и 84 человека (40 мужчин и 44 женщины) из ПЦСБ, репрезентативные по национальности (чуваши) и профессии (сельскохозяйственные работники). Кровь для исследования брали натощак из локтевой вены, сыворотку крови хранили при -20°C .

Экспериментальные исследования проведены на беспородных крысах-самках с начальной массой 131 ± 12 г. Крыс разделили на две группы. 10 животных 1-й группы получали питьевую воду из источника ПСБ, 7 животных 2-й группы — из источника ПЦСБ при одинаковом питании по нормам, утвержденным для лабораторных животных Минздравом СССР. Кровь

Активность эластазоподобных протеиназ, α_1 -ПИ и α_2 -МГ в сыворотке крови коренных практически здоровых жителей ПСБ и ПЦСБ Чувашской АССР

Показатель	ПСБ		ПЦСБ		p
	n	M \pm m	n	M \pm m	
Эластазоподобная активность, нмоль/мин/мл	86	152,4 \pm 2,9	84	117,3 \pm 2,7	<0,001
Содержание ИЕ/мл:					
α_1 -ПИ	86	20,9 \pm 0,4	84	25,0 \pm 0,4	<0,001
α_2 -МГ	86	4,40 \pm 0,05	84	4,84 \pm 0,07	<0,05
α_1 -ПИ/эластазоподобная активность	—	0,14	—	0,21	—

у животных брали из хвостовой артерии через 9 мес после начала эксперимента. По окончании эксперимента крыс декапировали и подвергали патологоанатомическому вскрытию. Аорту, взятую на уровне дуги и бифуркации, фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина и заливали в парафин. Эластические волокна окрашивали резорцин-фуксином.

В работе использовали нитрофениловый эфир N-бутилокси-карбонил-L-аланина (БАНЭ), этиловый эфир N-бензоил-L-аргинина (БАЭЭ) фирмы «Reanal», (Венгрия), трипсин фирмы «Spofa» (Чехо-Словакия).

Эластазоподобную активность измеряли методом [10]: к 0,05 мл сыворотки крови обследуемых лиц приливали 2,85 мл 0,05 М Na-фосфатного буфера pH 6,5 и 0,1 мл 10^{-3} М БАНЭ. Изменение оптической плотности определяли спектрофотометрически при 347,5 нм при 25 °С против $3,3 \cdot 10^{-5}$ М раствора субстрата через 2—3 мин в течение 15 мин. Активность эластазоподобных протеиназ выражали в наномолях гидролизованного БАНЭ за 1 мин на 1 мл сыворотки крови.

Активность α_1 -ПИ и α_2 -МГ в сыворотке крови определяли методом [1] по торможению гидролиза БАЭЭ трипсином. Активность α_1 -ПИ и α_2 -МГ выражали в условных ингибиторных единицах (ИЕ) и 1 мл сыворотки крови, принимая за 1 ИЕ такое количество ингибитора, которое тормозит (α_1 -ПИ) или связывает (α_2 -МГ) активность 1 Е трипсина.

Макро- и микроэлементы в воде определяли на атомно-абсорбционном спектрофотометре ААС-JN (ГДР). Результаты обработаны методом вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Нами проанализирована заболеваемость населения Чувашской АССР инфарктом миокарда по данным отчетов центральных и городских больниц за 10 лет (1978—1988) с учетом административно-территориального деления, а также по материалам почвенного, гидрогеологического, биогеохимического районирования. Наиболее достоверные сведения получены по биогеохимическим провинциям и субрегионам. Так, показатель заболеваемости инфарктом миокарда у населения, проживающего в ПСБ (западная часть территории Чувашской АССР), на 100 000 населения составил $84,3 \pm 1,2$, тогда как в ПЦСБ (восточная часть территории) — $6,3 \pm 0,1$.

С целью выявления отличий в балансе протеиназно-ингибиторной системы крови коренных практически здоровых жителей двух контрастных по показателям заболеваемости инфарктом миокарда субрегионов биосферы определяли эластазоподобную активность, активность α_1 -ПИ и α_2 -МГ (табл. 1). У практически здоровых жителей ПСБ выявлен достоверно ($p < 0,001$) более высокий уровень эластазоподобных протеиназ по сравнению с таковым у жителей ПЦСБ. Активность α_1 -ПИ выше ($p < 0,001$) в сыворотке крови жителей ПЦСБ по сравнению с таковой у жителей ПСБ. Различия в активности α_2 -МГ у жителей двух субрегионов малодостоверны ($p < 0,05$). Наглядным доказательством вышесказанного является рис. 1, на котором показан разброс величин эластазоподобной активности, содержания α_1 -ПИ и

α_2 -МГ в крови обследованных лиц. Анализ эластазоингибиторного баланса крови у лиц двух субрегионов показал, что степень компенсации протеиназно-ингибиторной системы крови жителей ПЦСБ выше, чем у населения ПСБ (соотношение активности α_1 -ПИ к активности эластазоподобных протеиназ в 1,7 раза выше у жителей ПЦСБ по сравнению с таковым у населения ПСБ). Учитывая патогенетическое значение эластазоподобных протеиназ и компенсаторную функцию ингибиторов протеиназ, можно высказать предположение о том, что жители ПСБ в большей степени, чем жители ПЦСБ, подвержены риску развития атеросклеротического процесса.

Рассматривая результаты наших исследований с позиции адаптации организма человека к различным биогеохимическим условиям, мы обратили внимание на наличие существенной разницы химического состава питьевой воды сравниваемых субрегионов Чувашской АССР. Районы с высокой заболеваемостью населения инфарктом миокарда относятся к ПСБ, который имеет аномальные геохимические условия. В пределах ПСБ питьевая вода формируется в геологических отложениях, которые отсутствуют на территории ПЦСБ; условия формирования подземных вод отражаются в первую очередь на их химическом составе.

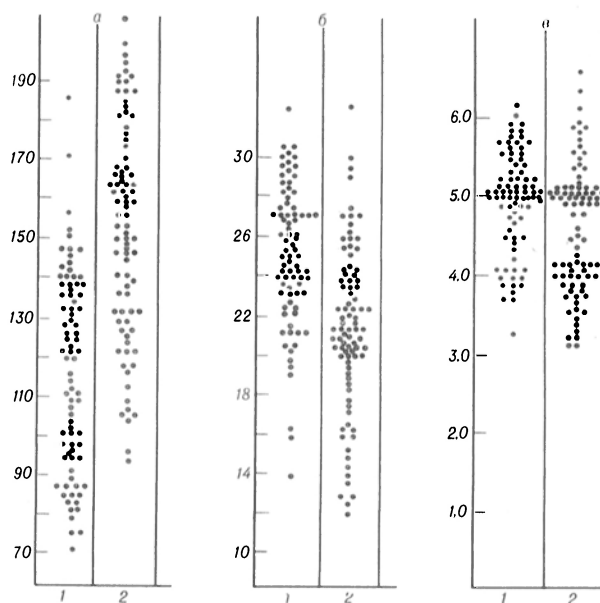


Рис. 1. Разброс величин эластазоподобной активности, активности α_1 -ПИ и α_2 -МГ в крови практически здоровых жителей ПСБ и ПЦСБ.

По оси ординат: а — эластазоподобная активность (в нмоль/мин/мл); б — активность α_1 -ПИ (в ИЕ/мл), в — α_2 -МГ (в ИЕ/мл); по оси абсцисс: 1 — ПЦСБ, 2 — ПСБ.

Таблица 2

Характеристика химического состава питьевой воды из источников ПСБ и ПЦСБ

Элемент, мг/л	ПСБ	ПЦСБ
Fe	0,6	0,7
Mn	0,02	0,01
F	1,3	0,7
Ca	86,0	110,0
Mg	9,0	32,0
Sr	0,7	0,36
Na	46,0	4,0
K	6,7	1,0
Li	0,0095	0,0085
Zn	<0,05	0,04
Pl	<0,05	<0,03
Co	0,06	0,2
Cu	0,07	0,06
Cd	<0,05	0,04
Ni	0,07	0,04
Cr	0,6	1,0
Si	14,6	3,0
Ba	6,0	60,0

В табл. 2 представлены данные, указывающие на наличие разницы в содержании многих элементов (Ca, Mg, Ba, Na, K, Si, F, Co) в питьевой воде источников ПСБ и ПЦСБ.

С целью выявления взаимосвязи между химическим составом питьевой воды и возможностью развития атеросклеротических процессов в организме животного, употреблявшего эту воду, нами определены эластазоподобная активность, активность α_1 -ПИ и α_2 -МГ в крови крыс, которые получали питьевую воду из источников сравниваемых субрегионов при одинаковом питании (табл. 3). Данные по протеиназно-ингибиторному балансу, полученные у экспериментальных животных, полностью коррелируют с таковыми, полученными при обследовании коренных жителей ПСБ и ПЦСБ (рис. 2). Гистологический анализ аорты крыс, употреблявших воду из источника ПСБ, обнаружил явления дезорганизации эластических волокон: во внутренней и средней части меди имелись фрагментация и распад на мелкие глыбки отдельных волокон с частичным расширением и деформацией промежутков между ними. Обнаруженные изменения в структуре эластических волокон характерны для начальной стадии атерогенеза. У животных, получавших воду из источника ПЦСБ, в кровеносных сосудах существенных изменений не выявлено.

Таким образом, однонаправленный характер сдвигов в эластазингибиторной системе крови у экспериментальных животных, употреблявших питьевую воду из источника ПСБ, и у коренных практически здоровых жителей, постоянно прожи-

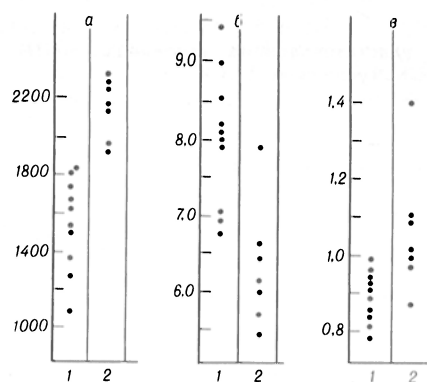


Рис. 2. Точечный разброс величин эластазоподобной активности (а, в нмоль/мин/мл), активность α_1 -ПИ (б, в ИЕ/мл) и α_2 -МГ (в, в ИЕ/мл) в крови экспериментальных животных, получавших питьевую воду из источников ПЦСБ (1) и ПСБ (2).

вающих в условиях ПСБ, убедительно свидетельствует об объективно существующей причинной связи между биогеохимическими характеристиками и формированием дисбаланса в протеиназно-ингибиторной системе у практически здоровых жителей ПСБ, что в итоге является одним из существенных моментов ее участия в патогенезе атеросклероза. Высокая распространенность инфаркта миокарда среди населения ПСБ, вероятно, может быть объяснена выявленной причинной связью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Нартикова В. Ф., Пасхина Т. С. // Вопр. мед. химии.— 1979.— Т. 25.— С. 494—500.
2. Парфенкова Г. А., Оглоблина О. Г., Домба Г. Ю. // Кардиология.— 1988.— № 10.— С. 82—83.
3. Сусликов В. Л., Семенов В. Д. // Труды биогеохимической лаборатории.— 1981.— Т. 19.— С. 65—85.
4. Bihary-Varga M., Keller L., Landi A., Robert L. // Atherosclerosis.— 1984.— Vol. 50.— P. 273—281.
5. Brechemier D., Hornebeck W., Bourdillon M. C. et al. // Artery.— 1980.— Vol. 8.— P. 342—347.
6. Hayashi K., Takamizawa K., Nakamura T. et al. // Atherosclerosis.— 1987.— Vol. 56.— P. 259—267.
7. Rabaud M., Lefebvre F., Dautel V. M. et al. // Clin. chim. Acta.— 1978.— Vol. 90.— P. 53—60.
8. Redini F., Lafuma C., Holnebeck W. et al. // Biochem. Pharmacol.— 1988.— Vol. 37.— P. 4257—4263.
9. Robert L., Jacob M. P., Frances C. et al. // Mech. Ageing Develop.— 1984.— Vol. 28.— P. 155—166.
10. Visser L., Blout E. R. // Biochim. biophys. Acta.— 1972.— Vol. 268.— P. 257—260.
11. Werb Z., Banga M. J., McKerrow V. H., Sandhaus R. A. // J. invest. Derm.— 1982.— Vol. 79, Suppl. 1.— P. 154—159.

Поступила 17.07.90

ACTIVITY OF ELASTASE-LIKE PROTEINASES AND THEIR INHIBITORS IN ABORIGINAL PRACTICALLY HEALTHY POPULATION UNDER VARIOUS BIOGEOCHEMICAL CONDITIONS OF THE CHUVASH ASSR

R. V. Stepanov, L. V. Platonova, V. L. Suslikov, T. S. Paskhina

I. N. Ul'yanov Chuvash State University, Cheboksary, Institute of Biological and Medical Chemistry. Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

A proteinase-inhibitory balance of blood (elastase-like activity, α_1 -proteinase inhibitor and α_2 -macroglobulin activities) was studied in practically healthy inhabitants of the Chuvash ASSR two subregions — Sura river basin and Cubninocivil region, which are distinctly dissimilar in all the biogeochemical parameters involving macro- and microtrace compositions. The

Таблица 3

Активность эластазоподобных протеиназ, содержание α_1 -ПИ и α_2 -МГ в сыворотке крови крыс, получавших питьевую воду из источников ПСБ и ПЦСБ

Показатель	ПСБ		ПЦСБ		p
	n	M \pm m	n	M \pm m	
Эластазоподобная активность, нмоль/мин/мл	10	2137 \pm 6	7	1558 \pm 8	<0,001
Содержание ИЕ/мл:					
α_1 -ПИ	10	6,3 \pm 0,3	7	7,9 \pm 0,2	<0,01
α_2 -МГ	10	1,06 \pm 0,10	7	0,86 \pm 0,02	<0,05

higher activity of elastase-like proteinases and decreased content of α_1 -proteinase inhibitor were detected in practically healthy inhabitants of the river Sura basin, where high incidence of myocardial infarction was found, as compared with those of the Cubninociv people. The similar alterations in the proteinase-inhibitory balance were observed in blood of experimental animals maintained on a diet containing fresh water from these subregions. The data obtained suggest that there exists causative relationship between biogeochemical parameters and development of imbalance in the proteinase-inhibitor system in practically healthy inhabitants of the river Sura basin. This imbalance is considered as a pathogenetic factor responsible for development of atherosclerosis.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 612.84.015.1:577.152.34].088.1

Т. П. Кузнецова, Н. Б. Чеснокова, Т. С. Пасхина

АКТИВНОСТЬ ТКАНЕВОГО И ПЛАЗМЕН- НОГО КАЛЛИКРЕИНОВ И УРОВЕНЬ ИХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ В ТКАНЕВЫХ СТРУКТУРАХ И СРЕДАХ ГЛАЗА ЗДОРОВО ГО КРОЛИКА

Московский НИИ глазных болезней им. Гельмгольца, Институт биологической и медицинской химии, АМН СССР, Москва

В настоящее время получены убедительные доказательства того, что калликреин-кининовые системы (ККС) плазмы крови и тканей различаются как по своим физиологическим функциям, так и по той роли, которую они играют при некоторых заболеваниях [2, 8, 9, 20, 24]. Дифференцированная оценка активности этих ферментных систем является одним из наиболее важных и сложных вопросов в изучении патогенеза воспалительных и посттравматических процессов, а также в разработке патогенетической терапии. В литературе имеются лишь единичные работы, посвященные изучению ККС в тканях глаза [1, 17], в которых отсутствуют данные о соотношении активности тканевого и плазменного калликреинов (соответственно ТК и ПК) и уровне их предшественников — прекалликреинов.

Целью данной работы явилось выяснение возможности применения флуорометрического метода для раздельного изучения активности ТК и ПК, а также определения содержания прекалликреинов в тканевых структурах и средах глаза здорового кролика.

Методика. В эксперименте использовали кроликов породы шиншилла массой 2–2,5 кг. Животных забивали воздушной эмболией. Водянистую влагу глаза забирали пластмассовым шприцем и переносили в пластмассовые пробирки с крышками. Глаза энуклеировали, выделяли радужку, цилиарное тело и другие ткани; ткани взвешивали и после предварительного измельчения гомогенизировали в 0,9 % NaCl в гомогенизаторе типа Поттера — Эльвегема с тefлоновым пестиком при 5000 об/мин в течение 1 мин (роговицу — 5 мин). Полученные 10 % (вес/объем) гомогенаты центрифугировали 15 мин при 5000 об/мин при комнатной температуре. Надосадочную жидкость сразу же использовали для анализа. Слезную жидкость собирали у живых кроликов при помощи кружков фильтровальной бумаги диаметром 6 мм, которые помещали за нижнее веко на 5 мин. Компоненты слезной жидкости элюировали 0,9 % NaCl в количестве 50 мкл на один кружок. Нерастворимые компоненты слезной жидкости и водянистой влаги глаза отделяли центрифугированием (15 мин при 5000 об/мин).

В работе использовали следующие реактивы: NaCl, трис, Z-Phe-Arg-MKA и метилкумаринамин (МКА) («Seriva», ФРГ), гордокс («Gedcon Richter», Венгрия), ингибитор трип-

сина из бобов сои (ИТБС) («Reanal», Венгрия), трипсин («Spofa», Чехо-Словакия), все остальные препараты отечественного производства квалификации х. ч. Для приготовления реактивов использовали бидистиллированную воду.

Для измерения общей амидазной активности протеиназ в пластмассовые микропробирки помещали от 25 до 50 мкл исследуемого материала и доводили 0,1 М трис-HCl-буфер pH 8,0, содержащий 0,15 М NaCl, до объема 100 мкл. Эззиматическую реакцию начинали добавлением 50 мкл Z-Phe-Arg-MKA, предварительно растворенного в диметилформамиде и доведенного тем же буфером до концентрации $1,3 \cdot 10^{-3}$ М. Пробу перемешивали и инкубировали при 37 °C в течение 10–15 мин в термостате («Labsystem Oy», Финляндия). Реакцию останавливали добавлением 300 мкл 17 % уксусной кислоты. Измерение интенсивности флуоресценции проводили на спектрофлуориметре «Shimadzu-540» (Япония) при $\lambda_{\text{воз}} = 365$ нм и $\lambda_{\text{исп}} = 470$ нм. Активность калликреина выражали в наномолях МКА за 1 мин в пересчете на 1 мг белка в пробе. Количество МКА в пробе устанавливали по калибровочному графику, который строили на основании измерения интенсивности флуоресценции при тех же условиях. Исходная концентрация МКА составляла $4 \cdot 10^{-5}$ М. Белок определяли по Лоури и соавт. [19].

Для определения активности ТК и ПК в пластмассовые микропробирки помещали 25 мкл исследуемого материала и 50 мкл ИТБС или гордокса, разведенных трис-HCl-буфером pH 8,0 соответственно до концентраций 10^{-5} М и $5 \cdot 10^{-6}$ М. После преинкубации с ингибиторами при 25 °C в течение 5 мин доводили объем пробы до 100 мкл тем же буфером и вносили 50 мкл Z-Phe-Arg-MKA в концентрации $1,3 \cdot 10^{-3}$ М. Дальнейшее определение активности проводили в условиях, аналогичных описанным выше. Расчет активности ТК и ПК проводили по следующим формулам:

$$A_{\text{ПК}} = A_{\text{общ}} - A_{\text{с}} \text{ и } A_{\text{ТК}} = A_{\text{с}} - A_{\text{г}},$$

где $A_{\text{общ}}$ — общая амидазная активность, измеренная без добавления ингибиторов; $A_{\text{с}}$ — активность, измеренная после добавления ИТБС; $A_{\text{г}}$ — активность, измеренная после добавления гордокса.

Для определения суммарного содержания прекалликреинов в пластмассовые микропробирки помещали 25 мкл исследуемого материала и 25 мкл трипсина, разведенного трис-HCl-буфером pH 8,0 до концентрации 75 мкг/мл. После 5-минутной инкубации при 25 °C трипсин инактивировали добавлением 50 мкл $3 \cdot 10^{-5}$ М раствора овомукоиды. После 5-минутной инкубации с овомукоидом добавляли 50 мкл $1,3 \cdot 10^{-3}$ М раствора Z-Phe-Arg-MKA и измерение активности проводили, как описано выше.

Результаты и обсуждение. На рис. 1–3 представлены данные по характеристике гидроли-

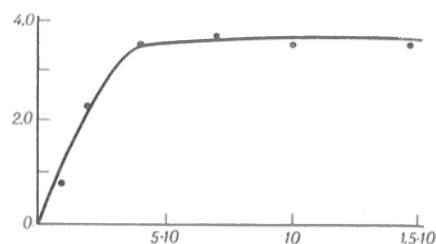


Рис. 1. Влияние концентрации субстрата (Z-Phe-Arg-MKA) на скорость его расщепления калликреином слезной жидкости кролика.

По оси абсцисс — концентрация Z-Phe-Arg-MKA (в М); по оси ординат — скорость отщепления МКА (в нмоль/мин).

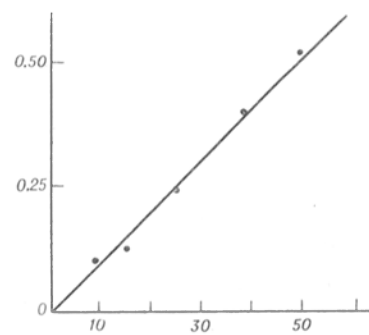


Рис. 2. Скорость гидролиза Z-Phe-Arg-MKA в зависимости от количества гомогената радужной оболочки глаза кролика.

По оси абсцисс — количество гомогената (в мкл); по оси ординат — скорость отщепления МКА (в нмоль/мин).

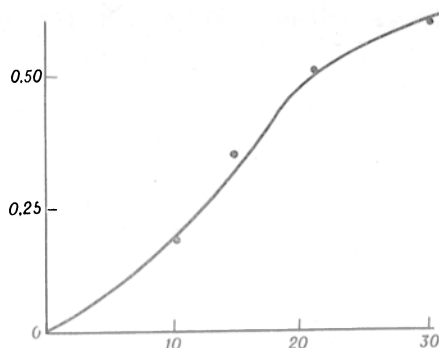


Рис. 3. Влияние времени на скорость расщепления Z-Phe-Arg-MKA калликреином цилиарного тела.

По оси абсцисс — время инкубации фермента с субстратом (в мин); по оси ординат — скорость отщепления МКА (в нмоль/мин).

за Z-Phe-Arg-MCA гомогенатами и жидкими средами глаза. Как видно на рис. 1, активность фермента возрастает с увеличением концентрации субстрата и достигает максимального значения при его концентрации $4 \cdot 10^{-4}$ М в конечном объеме пробы. Аналогичные результаты были получены и для других тканей. Исследование скорости отщепления МКА от субстрата в зависимости от количества внесенного в пробу гомогената, а также от времени инкубации приведено на рис. 2 и 3. Как видно из этих рисунков, для определения активности фермента оптимальными являются условия, при которых количество 10 % гомогената в пробе составляет 10—50 мкл, время инкубации — 10—15 мин. Именно при таких условиях соблюдается пропорциональная зависимость между скоростью отщепления МКА и количеством добавленного гомогената, а также временем инкубации.

Для раздельного определения активности ТК и ПК использовали принцип определения активности в комбинации с ингибиторами [25]. Принцип ингибированного анализа в данном случае основан на том, что ИТБС ингибирует только ПК, а гордокс, основным действующим компонентом которого является апротинин (основной панкреатический ингибитор типа Кунитца), ингибирует активность и ТК и ПК [6, 14, 16]. Концентрации ингибиторов, используемых в данной работе, были выбраны путем изучения зависимости активности ферментов от концентрации ингибиторов в инкубационной среде. Как видно, на рис. 4, в случае слезной жидкости максимальное ингибирование наблюдается при концентрации 10^{-5} М и $5 \cdot 10^{-6}$ М для ИТБС и гордокса соответственно.

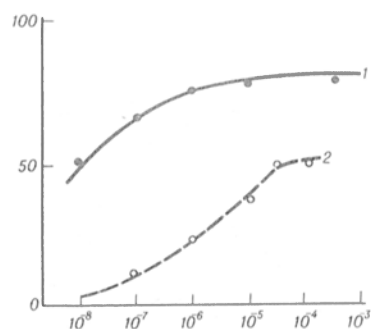


Рис. 4. Влияние ингибиторов протеиназ на гидролиз Z-Phe-Arg-MKA калликреином слезной жидкости здорового кролика.

По оси абсцисс — концентрация ингибиторов (в М); по оси ординат — активность калликреина (в %). 1 — влияние гордокса; 2 — влияние ИТБС.

Для определения прекалликреинов их переводят в активное состояние с помощью активаторов, в частности трипсина [10]. В настоящей работе с этой целью мы использовали 5-минутную инкубацию проб с трипсином, после чего инактивировали трипсин овомукоидом. Предварительные исследования показали, что используемая концентрация овомукоида вполне достаточна для полной инактивации добавленного к пробам трипсина. Как показали наши исследования, более длительная инкубация с трипсином не приводит к изменению суммарного содержания прекалликреинов. Учитывая эти данные, а также то, что в исследованных тканевых структурах и средах глаза присутствует значительно меньше ингибиторов, чем в плазме крови [11, 12, 15, 27], можно полагать, что эндогенные ингибиторы не оказывают существенного влияния на ферментативную активность после активации трипсином, как это имеет место в плазме крови [2].

Таким образом, из существующих методов определения компонентов ККС (биологических, радиоиммунохимических, спектрофотометрических, флуорометрических и др.), достоинства и недостатки которых были обобщены и проанализированы в ряде обзоров [3—5], нами был выбран метод с использованием флюорогенного субстрата Z-Phe-Arg-MKA [18]. Этот выбор был обусловлен тем, что методы с использованием флюорогенных пептидных субстратов являются наиболее, хотя и не абсолютно, специфическими. Кроме калликреинов, этот субстрат гидролизует плазмином, фактором X_1 и некоторыми другими сериновыми протеиназами, однако степень гидролиза невелика [18]. Нельзя не отметить тот факт, что флуоресцирующий компонент этого субстрата — 7-амино-4-метилкумарин — обладает сильной флуоресценцией, что обеспечивает высокую чувствительность метода [21, 26]. Это обстоятельство приобретает особое значение при исследовании ККС в микрообразцах, с которыми имеют дело исследователи, работающие в области офтальмопатологии. Необходимо подчеркнуть, что ПК значительно легче гидролизует Z-Phe-Arg-MKA, чем ТК [18, 21]. Это необходимо принимать во внимание при интерпретации данных о соотношении ТК и ПК в тканях.

Используя данный метод, мы показали (см. таблицу), что способностью гидролизовать Z-Phe-Arg-MKA обладают все исследованные тканевые структуры и среды глаза здорового кролика. При этом наибольшая активность обнаружена в слезной железе, в то время как в сосудистой оболочке, конъюнктиве и слезной жидкости в 2—3 раза ниже.

Обращает на себя внимание тот факт, что активность ТК в 1,5—4 раза превышает активность ПК практически во всех тканях, кроме роговицы. В воднистой влаге и слезной жидкости активность обоих ферментов представлена в равной степени. Если принять во внимание тот факт, что используемый субстрат легче гидролизуется ПК [18, 21], то преобладание активности ТК в тканевых структурах глаза кролика приобретают еще большую достоверность. Физиологические функции ТК разнообразны и до конца не изучены [20]. Известно, что ТК участвует в регуляции давления, абсорбции воды и солей в эпителии, утилизации глюкозы, в пролиферативных про-

Ткани	Белок, мг/мл	Общая амидазная активность	Активность ТК	Активность ПК	Суммарное содержание прекалликреинов
Слезная железа	3,4	0,390±0,080	0,286±0,030	0,065±0,019	0,91±0,093
Сосудистая оболочка	2,8	0,200±0,050	0,137±0,022	0,039±0,010	2,90±0,081
Конъюнктив	1,3	0,122±0,021	0,059±0,015	0,035±0,009	5,09±1,240
Слезная жидкость	2,8	0,128±0,025	0,059±0,012	0,041±0,013	1,29±0,160
Водянистая влага глаза	2,0	0,076±0,009	0,033±0,010	0,033±0,011	4,79±1,160
Роговица	2,1	0,094±0,018	0,024±0,008	0,037±0,008	2,61±0,780
Радужная оболочка	1,8	0,097±0,012	0,049±0,009	0,014±0,003	3,29±0,083
Цилиарное тело	2,5	0,083±0,011	0,056±0,002	0,005±0,001	3,00±0,079
Сетчатка	4,6	0,028±0,003	0,012±0,004	0,012±0,004	0,21±0,023

цессах [13, 20, 22]. Наличие этого фермента в активной форме в тканевых структурах глаза позволяет предположить его участие в регуляции внутриглазного давления, секреции водянистой влаги, пролиферативных процессах и др.

Как следует из приведенных результатов (см. таблицу), ТК и ПК присутствуют в тканевых структурах и средах глаза не только в активном состоянии, но и в виде предшественников — прекалликреинов. Наименьшее содержание прекалликреинов найдено в слезной железе и сетчатке, а наибольшее — в конъюнктиве, водянистой влаге, радужной оболочке и цилиарном теле. Как видно из таблицы, в слезной железе и сетчатке значительная часть калликреинов находится в активном состоянии. Соотношение активных калликреин/прекалликреин считают важным показателем степени активации ККС [3, 7]. Это соотношение в сосудистой оболочке и слезной жидкости приближается к уровню плазмы крови, а именно на порядок больше предшественников [10]. Интересно отметить, что в конъюнктиве, водянистой влаге, радужке и цилиарном теле практически весь калликреин находится в виде предшественника, а активный фермент составляет всего лишь 1—2 % от этого количества. По-видимому, это свидетельствует о большой потенциальной возможности к активизации ККС в этих структурах глаза при таких воспалительных заболеваниях органа зрения, как увеиты, иридоциклиты, конъюнктивиты и др.

Таким образом, результаты исследования позволяют считать, что флюоресцентный метод с использованием в качестве субстрата Z-Phe-Arg-MCA достаточно специфичен и чувствителен для определения активности ТК и ПК, а также прекалликреинов в тканевых структурах и средах глаза. Полученные данные свидетельствуют о различном функциональном назначении тканевой и плазменной ККС в тканевых структурах глаза, а также о возможности их участия в патогенезе некоторых заболеваний органа зрения.

ЛИТЕРАТУРА

- Бутюкова В. А., Смолякова Г. П., Терюханова О. В. // Офтальмол. журн.— 1984.— № 1.— С. 40—43.
- Доценко В. Л., Яровая Г. А., Ненашева Е. А. // Вопр. мед. химии.— 1989.— № 2.— С. 128—133.
- Доценко В. Л., Яровая Г. А., Пасхина Т. С. // Там же.— № 6.— С. 13—19.
- Киселев В. И., Куликов В. П. // Лаб. дело.— 1988.— № 7.— С. 27—32.
- Кузнецов В. А. // Там же.— 1981.— № 3.— С. 133—138.
- Ларионова Н. И., Макевнина Л. Г., Нартикова В. Ф., Пасхина Т. С. // Биохимия.— 1987.— № 5.— С. 825—831.

- Ненашева Н. М., Доценко В. Л., Горячкина Л. И., Яровая Г. А. // Вопр. мед. химии.— 1986.— № 5.— С. 106—111.
- Пасхина Т. С. Химические факторы регуляции активности и биосинтеза ферментов.— М., 1969.
- Пасхина Т. С. // Вестн. АМН СССР.— 1982.— № 9.— С. 50—56.
- Пасхина Т. С., Кринская А. В. // Современные методы в биохимии.— М., 1977.— С. 157—163.
- Чеснокова Н. Б., Бордюгова Г. Г., Багдаш С., Сосуллина Н. Е. // Офтальмол. журн.— 1987.— № 1.— С. 52—55.
- Чеснокова Н. Б., Касавина Б. С., Шипанова А. И. // Вестн. офтальмол.— 1983.— № 1.— С. 48—50.
- Abakumova O. Yu., Rabinovich S. E., Kutsenko N. G. // Biomed. Sci.— 1990.— Vol. 1, N 2.— P. 183—188.
- Back N., Steger R. // Fed. Proc.— 1968.— Vol. 27.— P. 96.
- Berman M., Gordon J., Garcia L. A., Gage J. // Exp. Eye Res.— 1975.— Vol. 20.— P. 231—244.
- Fritz H., Wunderer G. // Arzneimittel-Forsch.— 1983.— Bd 33, N 1.— S. 479—494.
- Igic R. // Exp. Eye Res.— 1985.— Vol. 41.— P. 117—120.
- Iwanaga S., Morita T., Kato H. et al. // Advanc. exp. Med. Biol.— 1979.— Vol. 120a.— P. 147—163.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem.— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
- MacDonald R. J., Margolius H. S., Erdős E. G. // Biochem. J.— 1988.— Vol. 153.— P. 313—321.
- Morita T., Kato H., Iwanaga S. et al. // J. Biochem.— 1977.— Vol. 82.— P. 1495—1498.
- Rubea H. // Kininogenases, Kallikrein 4 / Eds G. L. Haberland, J. Rohen, M. Suzuki.— Stuttgart, 1977.— P. 125—136.
- Schachter M. // Pharmacol. Rev.— 1979.— Vol. 31, N 1.— P. 1—17.
- Schütte B., Lindner J. // Kininogenases, Kallikrein 4 / Ed. G. L. Haberland, J. Rohen, M. Suzuki.— Stuttgart, 1977.— P. 161.
- Tans G., Janssen-Claessen T., Rosing J. H., Griffin J. H. // Europ. J. Biochem.— 1987.— Vol. 164.— P. 637—642.
- Zimmerman M., Yurewicz E. C., Patel G. // Analyt. Biochem.— 1976.— Vol. 70.— P. 258—262.
- Zirm M. // Klin. Mbl. Augenheilk.— 1980.— Bd 177.— S. 759—767.

Поступила 02.11.90

ACTIVITY OF TISSUE AND BLOOD PLASMA KALLIKREINS, CONTENT OF THEIR PRECURSORS IN EYE TISSUE STRUCTURES AND MEDIA OF RABBIT

T. P. Kuznetsova, N. B. Chesnokova, T. S. Pashkina

H. Helmholtz Institute of Eye Diseases, Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Activity of tissue and blood plasma kallikreins as well as total content of their inactive precursors were studied in rabbit eye structures and media: iris, ciliary body, cornea, vascular striatum, retina, aqueous humor, tear liquid, lacrimal gland by means of fluorimetric procedure using Z-Phe-Arg-MCA as a substrate. Dissimilar capacity of the trypsin soya bean inhibitor and of aprotinine (basic inhibitor of Kunitz type) to inhibit tissue and blood plasma kallikreins enabled to differentiate the enzymatic activity. Lacrimal gland contained the highest activity of tissue kallikrein which amounted to 70 % of total Z-Phe-Arg-MCA-hydrolyzing activity of the

homogenate. Total Z-Phe-Arg-MCA-amidase activity and activity of individual kallikreins was distinctly lower in all the eye structures and media studied as compared with that of lacrimal gland. Activity of tissue kallikrein was higher than blood serum kallikrein activity in iris, ciliary body, vascular striatum, retina and conjunctiva. The highest content of prekallikreins was found in conjunctiva, aqueous humor, iris and ciliary body. Tissue and blood plasma kallikrein-kinin systems appear to carry out dissimilar functions in eye tissue structures; they are apparently involved in pathogenesis of some eye diseases.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616.36-018.1-053.1-092.9-02: [615.357:577.175.53 + 615.214.2

В. И. Гудошников, И. П. Баранова, В. П. Федотов

РЕАКЦИИ ГЕПАТОЦИТОВ ПЛОДОВ КРЫС НА ГОРМОНЫ В ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУРАХ, ВЫРАЩЕННЫХ В СЕЛЕКТИВНОЙ СРЕДЕ С ДОБАВЛЕНИЕМ ГЛЮКОКОРТИКОИДА И БАРБИТУРАТА

Институт экспериментальной эндокринологии Всесоюзного эндокринологического научного центра АМН СССР, Москва

Ранее нами было установлено, что инсулин и кортизол обладают свойством повышать биосинтез суммарных РНК и белка в обогащенных гепатоцитами культурах клеток печени плодов крыс, выращенных на подложке из коллагена. При этом соматотропный гормон (СТГ) человека повышал синтез РНК, но не суммарного белка [2, 6]. С целью уменьшения числа непаренхиматозных клеток, контаминирующих культуры, нами предпринята попытка культивирования клеток печени плодов крыс в селективной среде, содержащей кортизол и барбитал натрия. В аналогичных исследованиях, проведенных с той же целью на культурах зрелых гепатоцитов, была использована среда, содержащая фенobarбитал, дексаметазон и инсулин [12]. Однако гормональные реакции гепатоцитов после культивирования в подобной селективной среде не изучены.

Необходимость в выполнении таких исследований диктовалась не только потребностями в проведении биотестов гормональных соединений, но и некоторыми соображениями теоретического характера. Действительно, перинатальный период является критическим для дифференцировки паренхиматозных клеток печени [7, 10], причем как гормоны, и в первую очередь глюкокортикоиды, так и некоторые ксенобиотики, например фенobarбитал, могут существенно изменять характеристики гепатоцитов в перинатальном периоде. Так, в определенных условиях глюкокортикоиды способны индуцировать образование структур, напоминающих желчные капилляры, в культурах гепатоцитов плодов крыс [11]. С другой стороны, описано увеличение количества мембран гладкого эндоплазматического ретикулаума в гепатоцитах новорожденных крысят в тканевых культурах печени, выращиваемых в присутствии фенobarбитала [9]. Возникает вопрос: изменяет ли длительное культивирование клеток печени плодов в присутствии высоких концентраций глюкокортикоида и барбитурата не только морфологические, но и функциональные свойства гепатоцитов, и в частности их реакции на гормоны? Такой вопрос

актуален еще и потому, что ранее было показано, с одной стороны, блокирование индуцирующего влияния кортизола на активность тирозинаминотрансферазы в печени крыс, которым неонатально вводили глюкокортикоид [5], а с другой стороны, стимуляция фенobarбиталом элиминации стероидных гормонов из организма взрослых животных за счет гипериндукции микросомальных ферментов печени [4]. В представленной работе рассмотрен сформулированный выше вопрос, причем полученные нами результаты свидетельствуют о наблюдаемом в культурах гепатоцитов феномене наподобие гормонального и (или) ферментативного импринтинга, описанного ранее для некоторых биологических систем, в том числе и печени [5, 7].

Методика. Суспензию клеток печени плодов крыс на 21–22-м дне беременности получали методом, описанным ранее [2, 6], однако ресуспендирование конечного осадка клеток, отмытых от коллагеназы, проводили в среде следующего состава: 90–95 % среды 199, содержащей 3,75 мМ барбитал натрия, 2,5 мкг/мл кортизола, 10 мМ HEPES, 2 мМ глутамин и 50 ЕД/мл бензилпенициллина + 5–10 % бычьей или эмбриональной телячьей сыворотки. Суспензию клеток в этой среде высевали из расчета $0,8–1,2 \cdot 10^6$ клеток/мл в 24-луночные пластмассовые панели ("Flow Lab.", Англия), дно которых предварительно было обработано бычьей сывороткой.

Культивирование в селективной среде проводили в течение 5–8 дней с периодическими сменами среды (через 1–3 дня). Затем в культуры вводили обычную ростовую среду (5–10 % бычьей или эмбриональной телячьей сыворотки в среде 199 с добавлением HEPES, глутамин и антибиотика), но без барбитала натрия и кортизола. За сутки до опыта содержание сыворотки в этой среде уменьшали до 1 %. опыты проводили на 7–9-дневных культурах. Гормоны вводили на 19–26 ч. За 2 ч до окончания инкубации в культуры добавляли ^3H -уридин и ^{14}C -лейцин. Биосинтез суммарных РНК и внутриклеточного белка оценивали по включению меченых предшественников в кислотонерастворимый компонент клеток, содержание белка в культурах измеряли колориметрическим методом, как описано ранее [6]. Статистическая обработка результатов произведена с использованием критерия *t* Стьюдента.

Результаты и обсуждение. В опыте 1 (табл. 1) на 6-й день культивирования из среды удаляли только кортизол, т. е. последующие 24-часовое культивирование и инкубация с гормонами проводились в среде с барбиталом натрия. В таких условиях в сравнении с исследованиями на обычных культурах клеток печени плодов [2, 6] инсулин сохранял способность повышать интенсивность синтеза РНК и белка, а СТГ — стимулировать включение ^3H -уридина в РНК. Однако после культивирования в селективной среде кортизол не влиял на синтез белка в гепатоцитах и парадоксально подавлял включение ^3H -уридина в РНК.

В последующих экспериментах были подробнее изучены изменения реакций гепатоцитов на инсулин и кортизол после выращивания в селективной среде. В опыте 2 кортизол и барбитал натрия удаляли из среды на 6-й день культивирования, за 2 сут до проведения инкубации с гормонами. И в этих условиях наблюдали как полную блокаду эффекта кортизола на синтез белка, так и парадоксальное ингибирующее влияние этого глюкокортикоида на включение ^3H -уридина в РНК (см. табл. 1). В опытах 3 и 4 кортизол и барбитал натрия удаляли из среды за 4 дня до проведения инкубации с гормонами. Как видно из табл. 2, продление срока культивирования гепатоцитов плодов крыс в среде без глюкокортикоида и барбитурата до 4 сут не изменяло существенно после-

Влияние инсулина, СТГ и кортизола на синтез суммарных РНК и белка и содержание суммарного белка в культуре клеток печени плодов крыс, выращенной в селективной среде

Группа	Включение, имп/мин/лунка		Белок, мкг/лунка
	³ H-уридина	¹⁴ C-лейцина	
Контроль (опыт 1)	82 345±5 610 (3)	73 295±3 400 (3)	123,7±4,29 (4)
Инсулин (5 мкг/мл)	153 495±5 035 (4)***	87 595±3 095 (4)*	122,0±4,89 (4)
СТГ (1 мкг/мл)	137 820±6 675 (4)**	80 820±3 900 (4)	127,0±5,1 (4)
Кортизол (0,5 мкг/мл)	41 095±310 (4)***	77 040±2 670 (4)	132,6±5,8 (4)
Контроль (опыт 2)	33 426±1 572 (4)	70 182±2 526 (4)	77,1±5,5 (4)
Кортизол	22 998±1 530 (4)**	68 508±4 224 (4)	72,2±5,25 (4)

Примечание. В опыте 1 кортизол из среды удаляли за 1 сут до инкубации с гормонами, в опыте 2 кортизол и барбитал натрия удаляли из среды за 2 сут до инкубации с гормоном. Здесь и в табл. 2 в скобках — число наблюдений; одна звездочка — $p<0,05$, две — $p<0,01$, три — $p<0,001$.

дующей реакции на инсулин и не восстанавливало реакции на кортизол со стороны биосинтеза суммарного белка. Для сравнения в той же таблице представлены результаты, полученные в опыте 5 с удалением кортизола и барбитала натрия из среды за сутки до проведения инкубации с гормонами. Характерно, что ни в одном из проведенных экспериментов не было обнаружено достоверных изменений содержания белка в культурах под влиянием изученных гормонов (см. табл. 1 и 2). Ранее в опытах *in vivo* было установлено, что вызванные трийодтиронином и оцениваемые по включению меченого предшественника изменения интенсивности биосинтеза белка в печени не сопровождаются заметными изменениями содержания суммарного белка [15]. Последний факт отчасти обусловлен высокой скоростью обновления внутриклеточных белков в гепатоцитах [16].

Впервые фенотарбитал был использован для повышения жизнеспособности гепатоцитов и обеспечения их избирательного роста в тканевой культуре печени новорожденных крысят [9]. Позже было показано, что фенотарбитал, особенно в сочетании с дексаметазоном и инсулином, способствует выживанию гепатоцитов взрослых крыс в первичных культурах [12]. Оказалось также, что не только фенотарбитал, но и другие производные барбитуровой кислоты поддерживают жизнеспособность культивируемых зрелых гепатоцитов [13].

Ранее глюкокортикоиды в высокой концентрации (10^{-5} М) были использованы для индукции

накопления гликогена в культурах гепатоцитов плодов крыс с целью последующего изучения регулирующих эффектов инсулина и глюкагона на синтез и распад гликогена [14]. На культурах зрелых гепатоцитов неоднократно было показано увеличение функциональной активности и жизнеспособности этих клеток под влиянием 10^{-6} — 10^{-5} М дексаметазона и других глюкокортикоидов (см., например, [8]). Однако наши попытки применить один кортизол в качестве агента, способствующего избирательному выживанию гепатоцитов плодов, были неудачными: в процессе длительного (72 ч) культивирования в присутствии этого гормона наблюдалось резкое уменьшение числа клеток в культуре (контроль $715\,743 \pm 21\,168$, 10^{-6} М кортизол $548\,982 \pm 15\,939$ клеток на лунку; $n=4$, $p<0,01$), что вполне соответствует сведениям литературы об ингибирующем влиянии глюкокортикоидов на пролиферацию клеток [3]. В то же время сочетанное применение кортизола и барбитала натрия позволило получить культуры гепатоцитов крыс с высокой интенсивностью биосинтетических процессов.

Однако главным для нас было выяснение вопроса о возможных изменениях гормональных реакций гепатоцитов после культивирования в селективной среде. Оказалось, что длительная обработка клеток печени плодов кортизолом и барбиталом натрия избирательно модифицирует последующие клеточные реакции на глюкокортикоид, не изменяя реакции на инсулин и СТГ, по крайней мере со стороны биосинтеза суммарных РНК и белка. Эта селективная модификация реактивности гепатоцитов может быть обусловлена процессами как гормонального, так и ферментативного импринтинга, сопровождающимися изменениями рецепции глюкокортикоидов и пострецепторных внутриклеточных процессов, в частности метаболизма стероидных гормонов в микросомах гепатоцитов [4, 5, 7].

В этом отношении весьма характерны данные, касающиеся гормонального импринтинга индукции микросомального фермента альдринэпоксидазы в культурах клеток печени плодов крыс [5]. Если гепатоциты плодов инкубировать сперва в течение 48 ч в присутствии дексаметазона (10^{-8} — 10^{-6} М), а затем еще 48 ч без дексаметазона, но с 2 мМ фенотарбиталом, то индуцирующее воздействие барбитурата на активность вышеуказанной монооксигеназы выражено тем более, чем выше концентрация глюкокортикоида во время

Таблица 2

Влияние инсулина (5 мкг/мл) и кортизола (0,5 мкг/мл) на синтез суммарного белка и содержание белка в культурах клеток печени плодов, выращенных в селективной среде

Группа	Включение ¹⁴ C-лейцина, имп/мин/лунка	Белок, мкг/лунка
Контроль (опыт 3)	42 220±915 (3)	98,8±6,25 (4)
Инсулин	60 415±6 470 (3)*	103,5±3,62 (4)
Контроль (опыт 4)	47 540±2 575 (3)	106,3±2,76 (4)
Кортизол	44 000±2 890 (3)	115,5±2,6 (4)
Контроль (опыт 5)	98 070±9 085 (3)	130,8±7,65 (4)
Инсулин	119 560±2 275 (3)*	135,2±8,35 (4)
Кортизол	98 745±6 555 (3)	136,3±5,85 (4)

Примечание. Кортизол и барбитал натрия удаляли из среды за 4 сут до инкубации с гормонами в опытах 3 и 4 и за 1 сут до инкубации в опыте 5.

преинкубации. Эти данные дают основание предполагать, что наблюдаемое нами изменение эффектов кортизола после культивирования в селективной среде может быть напрямую связано с индуцирующим воздействием глюкокортикоидов и барбитурата на биосинтез ряда внутриклеточных компонентов и структур, в частности гладкого эндоплазматического ретикула и ферментов системы цитохрома Р-450. В то же время конкретные механизмы, обеспечивающие парадоксальное ингибирующее действие кортизола на включение ^3H -уридина в РНК гепатоцитов, остаются неясными.

Разработанная нами модель гепатоцитов плодов, культивируемых в селективной среде, может найти применение как для проведения биоспектаний инсулина и некоторых других гормонов, так и для выяснения механизмов гормонального импринтинга клеток печени в перинатальном периоде. В связи с тем что в селективной среде возможно прикрепление и выживание гепатоцитов плодов на пластмассовой подложке, обработанной сывороткой, в существенной мере снижается трудоемкость приготовления и ведения культур. Кроме того, отсутствие коллагена в составе подложки облегчает изучение биосинтеза внутриклеточных белков. С другой стороны, можно предполагать, что явление импринтинга имеет место и для других гормонов, в частности тиреоидных, ибо, как показано в нашей предыдущей работе [1], направленность реакции культивируемых гепатоцитов на трийодтиронин со стороны продукции альбумина изменяется в раннем постнатальном онтогенезе. Для проверки этого предположения культура клеток печени плодов представляет уникальные возможности, поскольку позволяет смоделировать регулируемую гормонами дифференцировку клеток печени в строго контролируемых условиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баранова И. Н., Гудошников В. И., Федотов В. П. // Бюл. экспер. биол.— 1990.— № 6.— С. 581—583.
2. Гудошников В. И., Баранова И. Н., Федотов В. П. // Общая биология.— М., 1989.— С. 101—104.

3. Красильников М. А., Адлер В. В. // Успехи соврем. биол.— 1989.— Т. 108, № 1 (4).— С. 66—79.
4. Салганик Р. И., Неделькина С. В., Аругинская С. В., Кусмарцева Л. П. // Вопр. мед. химии.— 1974.— № 2.— С. 135—141.
5. Салганик Р. И., Соловьева Н. А., Манакова Н. М., Томсон В. П. // Там же.— 1982.— № 3.— С. 8—15.
6. Федотов В. П., Баранова И. Н., Гудошников В. И. // Пробл. эндокринолог.— 1989.— № 3.— С. 54—58.
7. Csaba G. // Horm. Metab. Res.— 1984.— Vol. 16.— P. 329—335.
8. Dich J., Vind C., Grunnet N. // Hepatology.— 1988.— Vol. 8.— P. 39—45.
9. Guillouzo A., Guguen-Guillouzo C., Boissard M. et al. // Exp. molec. Path.— 1978.— Vol. 28.— P. 1—9.
10. Kremers P. // Isolated and Cultured Hepatocytes.— Paris, 1986.— P. 285—312.
11. Lambiotte M., Vorbrodt A., Benedetti E. L. // Cell Differ.— 1973.— Vol. 2.— P. 43—53.
12. Miyazaki M., Handa Y., Oda M. et al. // Exp. Cell. Res.— 1985.— Vol. 159.— P. 179—190.
13. Miyazaki M., Handa Y., Suzuki Y., Sato J. // In Vitro.— 1987.— Vol. 23.— P. 2—9.
14. Plas C., Chapeville F., Jacquot R. // Develop. Biol.— 1973.— Vol. 32.— P. 82—91.
15. Tata J. R. // Biochem. J.— 1967.— Vol. 104.— P. 1—16.
16. Waterlow J. C., Garlick P. J., Millward D. J. Protein Turnover in Mammalian Tissues and in the Whole Body.— Amsterdam, 1978.

Поступила 31.05.90

RESPONSES OF FETAL RAT HEPATOCYTES TO HORMONES IN PRIMARY CULTURES GROWN IN SELECTIVE MEDIUM CONTAINING GLUCOCORTICOID AND BARBITURATE

V. I. Gudoshnikov, I. N. Baranova, V. P. Fedotov

All-Union Endocrinological Scientific Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

After growing of fetal rat hepatocytes in the medium containing cortisol and sodium barbital for 4-8 days and subsequent cultivation in the medium without glucocorticoid and barbital for 1-4 days insulin retained its ability to stimulate total RNA and protein synthesis, while human growth hormone kept its enhancing action on RNA biosynthesis. However, cortisol did not change protein synthesis and inhibited paradoxically incorporation of ^3H -uridine into total RNA, after preincubation of cells in the selective medium. This suggests that prolonged exposure of cultured fetal rat liver cells to cortisol and sodium barbital may cause phenomena similar to those of hormonal and/or enzymatic imprinting.

ФИРМА «ЭББОТТ ЛЭБОРАТОРИЗ» СООБЩАЕТ:

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 615.471.03:616-008.81.9-074

Е. П. Амон, А. А. Рудных, А. Г. Ахметшина, А. И. Грицук

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕАГЕНТОВ РАЗЛИЧНЫХ ФИРМ НА БИОХИМИЧЕСКОМ АНАЛИЗАТОРЕ «СПЕКТРУМ» ФИРМЫ «ЭББОТТ ЛЭБОРАТОРИЗ»

Свердловский диагностический центр

Внедрение в структуру медицинской службы СССР диагностических центров, интенсификация работы их биохимических лабораторий за счет использования биохимических анализаторов со-

пряжены со многими проблемами, главной из которых является бесперебойное снабжение лабораторий коммерческими наборами реактивов. В настоящее время решить эту проблему можно путем изучения возможности взаимозаменяемости коммерческих наборов, выпускаемых различными фирмами, что послужило целью данной работы.

Методика. Исследование контрольных сывороток фирм «Boehringer mannheim» Precipath U, «Kone» Quality, «Lab-systems» Assayed Control Serum Normal производили на автоматическом анализаторе «Spektrum» фирмы «Abbott Laboratories» (США) при t 37 °С. Активность ферментов определяли с помощью коммерческих наборов различных фирм: аланинаминотрансферазы (АЛТ; КФ 2.6.1.2), аспартатаминотрансферазы (АСТ; КФ 2.6.1.1) — «Kone» (Финляндия) и «Beckman» (США), щелочной фосфатазы (ЩФ; КФ 3.1.3.1) — «Kone» и «Abbott», γ -глутамилтранспептидазы (ГГТП; КФ 2.3.2.2) — «Kone» и «Reanal» (Венгрия). Активность трансаминазы определяли по убыли NADH в системе, со-

Используемый набор	Фирма	Объем сыворотки, мл	Адсорбция	Время считывания результатов, с			Диапазон линейности
				начало	окончание	интервал	
АСТ	"Abbott"	10	0,80—0,36	240	1560	60,0	2,0—500,0
	"Kone"	25	0,87—0,30	60	180	30,0	8,0—500,0
	"Beckman"	23,5	1,03—0,36	90	180	30,0	2,0—500,0
АЛТ	"Abbott"	5	0,80—0,36	240	1500	60,0	2,0—500,0
	"Kone"	25	0,80—0,36	90	180	30,0	2,0—500,0
	"Beckman"	23,5	0,84—0,36	90	180	30,0	2,0—500,0
ЩФ	"Abbott"	5	0,50—1,30	120	600	60,0	20—1200
	"Kone"	2,5	0,90—1,60	180	300	30,0	20—1200
ГГТП	"Abbott"	5	0,64—1,99	120	960	60,0	1,0—800,0
	"Kone"	12	1,30—2,0	60	180	60,0	1,0—800,0
	"Reanal"	24	1,30—2,0	60	180	60,0	1,0—800,0

приращенной с соответствующими оксидоредуктазами, поэтому увеличение активности ферментов регистрируется в виде падения адсорбции при λ 340 и 380 нм. Активность ЩФ и ГГТП определяли по приросту освобождающегося в среде хромогена, поэтому увеличение активности этих ферментов сопровождается увеличением адсорбции при 404 и 452 нм (ЩФ), 412 и 452 нм (ГГТП).

Результаты и обсуждение. Используемые наборы для одинаковых ферментов отличаются по своему количественному соотношению реагентов, поэтому их активность в контрольных сыворотках будет иметь сходное количественное выражение при изменении соотношения объемов реагента и образца сыворотки (см. таблицу).

В данной работе объем реагентов оставался постоянным и составлял 236 мкл, в то время как объем образцов сыворотки подбирался индивидуально для каждого фермента. Так, для наборов трансаминаз фирм «Kone» и «Beckman» он практически не отличался (соответственно 25 и

23,5 мкл), тогда как для определения активности ЩФ с использованием наборов фирмы «Kone» и ГГТП с использованием наборов фирмы «Reanal» требовался в 2 раза больший объем образца, чем в соответствующих наборах фирм «Abbott» и «Kone» соответственно.

Из-за различий в качественном составе и количественном соотношении реагентов коммерческих наборов изменялись величины начальной и конечной адсорбции, время достижения и диапазон устойчивой линейной зависимости активности ферментов.

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что для биохимического анализатора «Спектрум» фирмы «Эбботт» возможно использовать коммерческие наборы реактивов любой из перечисленных фирм, внося соответствующие коррективы.

Поступила 05.01.91

МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

© В. В. ПЕДЧЕНКО, В. Н. МАЛАХОВ, 1991

УДК 616.153.922-074:577.152.311 (048.8)

В. В. Педченко, В. Н. Малахов

ФЕРМЕНТНЫЕ МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩЕГО ХОЛЕСТЕРИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Всесоюзный научно-исследовательский центр профилактической медицины, Москва

Использование количественного определения общего холестерина — ОХС (сумма свободных количеств свободного ХС и его жирнокислотных эфиров) в медицине резко расширилось после того, как было установлено, что содержание ОХС в плазме (сыворотке) крови в значительной мере определяет риск развития атеросклероза кровеносных сосудов и связанных с ним сердечно-сосудистых и некоторых других заболеваний [1]. В настоящее время этот вид анализа стал одним из основных в практике клинко-диагностических

лабораторий и многих других исследовательских учреждений медицинского профиля.

Являясь водонерастворимыми, свободный ХС и эфиры ХС (ЭХС) существуют в плазме крови в виде мицеллярных ассоциатов липидов и белков — липопротеидов, содержащих, помимо ХС, ЭХС и белковых компонентов, триацилглицериды и фосфолипиды. Липопротеиды плазмы (сыворотки) крови разделяются по плавучей плотности на четыре основных класса, названных в порядке увеличения этого показателя хиломикронами, липопротеидами очень низкой (ЛОНП), низкой (ЛНП) и высокой (ЛВП) плотности. Большая часть ХС и ЭХС входит в состав ЛНП, значительная — в состав ЛВП и лишь небольшая — в состав ЛОНП, при этом общее количество ЭХС в 3—4 раза превышает количество неэтерифицированного ХС [2].

В последние годы традиционные химические методы количественного определения ОХС в значительной степени вытеснены ферментативными методами его определения, обладающими рядом несомненных достоинств и завоевавшими в силу

этого большую популярность. Эти методы просты и удобны в исполнении, так как в отличие от химических методов не требуют использования высококоррозийных реагентов (сильные окислители, кислоты и щелочи) и органических растворителей, что в значительной мере облегчает проведение анализа и позволяет выполнять их на биохимических автоанализаторах. В настоящее время, как правило, ферментативное определение ОХС проводится с помощью готовых наборов реактивов, выпускаемых рядом зарубежных фирм. Эти наборы содержат все необходимые для определения ОХС компоненты в точно отмеренных количествах, что еще более упрощает и ускоряет процедуру анализа.

Возможность применения ферментов для определения ХС путем окисления ХС микроорганизмами *Nocardia* sp. была впервые показана в 1954 г. [71]. Однако начало практического использования ферментов для анализа ОХС было положено работами, в которых сообщалось о получении высокоочищенной холестериноксидазы (ХО) из *Nocardia* sp. и применении данного фермента для определения ОХС в сыворотке крови без его предварительной экстракции [5, 59]. В предложенном Ричмондом [59] методе холестериноксидазной реакции предшествует обработка сыворотки спиртовым раствором щелочи, в результате которой происходят разрушение липопротеидных комплексов и гидролиз ЭХС. После нейтрализации гидролизата свободный ХС, находящийся в мицеллярной форме благодаря присутствию в нейтрализующем реактиве детергента (третон X-100), окисляется в присутствии ХО до холест-4-ен-3-она с образованием перекиси водорода. Последняя количественно определяется в реакции с ксиленовым оранжевым и 4-валентным титаном по поглощению образующегося при этом хелатного комплекса (550 нм).

В то же время было опубликовано исследование Флегга [33], который в качестве одной из стадий количественного анализа использовал окисление ХС частично очищенным препаратом ХО (названной в указанной работе холестериндегидрогеназой) из *Nocardia erythropolis*. При этом ОХС экстрагировали из сыворотки крови смесью этанол — диоксан, гидролизovali ЭХС гидроокисью калия и инкубировали гидролизат с ферментом при pH 7,2. Концентрацию ОХС определяли по поглощению при 240 нм, обусловленному холест-4-ен-3-оном, образующимся при ферментативном окислении ХС.

В зависимости от способа гидролиза ЭХС (химический или ферментативный) различают частично и полностью ферментативные методы определения ОХС. Возможность создания полностью ферментного метода появилась в начале 70-х годов, когда из сока поджелудочной железы крыс был получен гомогенный препарат холестеринэстеразы (ХЭ) (КФ 3.1.1.13), способной с высокой эффективностью превращать ЭХС в ХС и соответствующие жирные кислоты [41]. Первое сообщение о таком способе определения ОХС было сделано в 1974 г. [5]. Метод включает последовательное воздействие трех ферментов — ХЭ, ХО и пероксидазы (рис. 1). Для солиubilизации ХС из липопротеидных комплексов и поддержания его в виде мицеллярной суспензии в реакционную смесь добавляли полиэтилен-

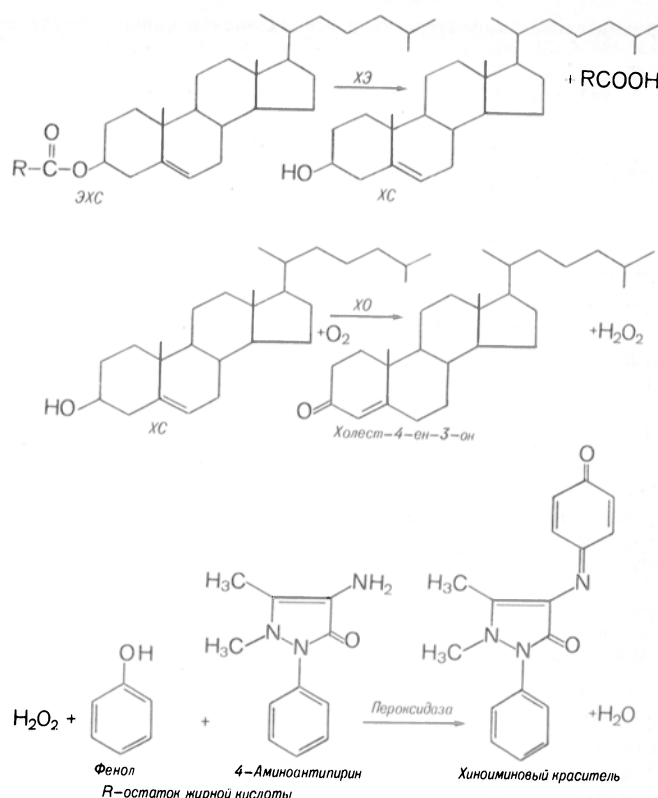


Рис. 1. Схема ферментативного определения ХС [5].

гликоль с мол. м. 6000 D. Активация ХЭ, катализирующей гидролиз ЭХС, достигается добавлением в реагент холата натрия. Свободный ХС, образующийся в результате эстеразной реакции, вместе с эндогенным ХС окисляется далее атмосферным кислородом под действием ХО. Образующаяся при этом перекись водорода определяется в катализируемой пероксидазой цветной реакции с фенолом и 4-аминоантипиринном [10].

Относительно специфичности действия ХО, во многом определяющей специфичность таких методов в целом, известно, что фермент катализирует окисление, помимо ХС, и других присутствующих в сыворотке крови 3β -стеролов, имеющих двойную связь в положении $\Delta 4$ и $\Delta 5$ [5, 59, 60], хотя ферментативное окисление последних происходит значительно медленнее [59, 60]. Невысокая концентрация указанных аналогов ХС в сыворотке крови (10—15 % от концентрации ОХС [51], или, по данным других авторов [27], на пределе чувствительности методов определения) и более медленное их окисление обеспечивают, по мнению многих исследователей, достаточно высокую специфичность фермента по отношению к ХС [5, 51, 59, 60, 63].

Разнообразие существующих в настоящее время разновидностей ферментного анализа ХС обуславливается различиями в способах определения продуктов его окисления, образующихся в результате холестериноксидазной реакции. Концентрация одного из продуктов этой реакции — холест-4-ен-3-она — может быть определена непосредственно по изменению поглощения реакционной смеси при 240 нм [59]. Наибольшее распространение, однако, получили фотометрические

Наиболее распространенные фотометрические ферментные методы количественного определения ХС в сыворотке крови

Употребляемое название метода	Система определения перекиси водорода	Условия анализа			Коэффициент вариации			Коэффициент корреляции с методом Абеля — Кендала	Линейность метода, ммоль/л	Источник литературы
		длина волны, нм	инкубация		отношение объемов пробы/реагент	внутри-серийный, %	межсерийный, %			
CHOD-PAP	4-ААД/фенол-пероксидаза	500 (546)	10 5	25 37	1/100	1,0—3,0	1,3—6,0	0,987	До 18—25	[22] [37] [38]
Метод Кагеяма	Метанол/каталаза Ацетилацетон/аммиак	405	60—75	37	1/250	2,0	3,0	0,996	До 25	[11, 27] [46, 60]
Метод Хеккеля — Перлика	Йодид калия	365 (405)	30 20	25 30	1/200	—	3,0	0,950	До 12—15	[12] [54]
Меркотест	Молибден аммония Этанол/каталаза НАДР/АДГ	340	20	21	1/100	—	3,0—4,4	0,950	До 11	[12] [47] [65]
АБТС	АБТС/пероксидаза	410 (650)	— КИН	30	1/250	0,2—1,1	—	0,990	До 13	[76]

Примечание. 4-ААП — 4-аминоантипирин; АДГ — альдегиддегидрогеназа; АБТС — 2,2-азиноди-(3-этилбензотиазол-лин-6-сульфоновая кислота); КИН — кинетический метод.

методы, основанные на количественном определении другого продукта холестериноксидазной реакции — перекиси водорода [12, 22, 30, 37, 38, 43, 47, 54, 64, 65, 70, 76]. В табл. 1 представлена сводная информация о современных фотометрических ферментных методах анализа ОХС в сыворотке и плазме крови, наиболее часто используемых в клинических лабораториях. Окрашенные продукты, образующиеся при взаимодействии перекиси с компонентами используемых при этом разных хромогенных систем, поглощают в видимой области спектра и стабильны в течение 60—90 мин, что в значительной степени упрощает фотометрирование и позволяет использовать наиболее распространенные в клинических лабораториях фотометры и автоанализаторы. Эти методы характеризуются хорошей воспроизводимостью, линейностью в широком диапазоне концентраций ОХС. Вследствие широкого использования таких методов на практике в литературе имеется целый ряд работ по их сравнению с другими методами определения ОХС [21, 34, 38, 44, 75].

В полностью ферментативном методе анализа ОХС часто используется реакция восстановления перекиси водорода метанолом в присутствии каталазы (реакция Кагеяма). Образующийся формальдегид далее реагирует с ионами аммония и

ацетилацетоном, образуя 3,5-диацетил-1,4-дигидролутидин с максимумом поглощения при 405—410 нм (рис. 2) [41, 64]. Предложены также некоторые другие индикаторные реакции [7, 37, 38, 43, 47, 49], в том числе флуориметрические [30, 52] и хемилюминесцентные [61] методы определения перекиси водорода. Однако вследствие излишне высокой чувствительности для анализа ОХС в сыворотке крови, обуславливающей необходимость дозирования микрообъемов или предварительного разбавления анализируемой пробы, а также низкой воспроизводимости и необходимости использования специального оборудования указанные методы не получили широкого распространения.

Окислительно-восстановительные свойства перекиси водорода позволяют количественно определять это соединение и в электрохимических реакциях. Так, использовали полярографическое измерение количества кислорода, образующегося при разложении перекиси водорода под действием каталазы [14, 45, 53]. Применяли ионселективный мембранный электрод в проточном анализаторе для измерения концентрации ионов йода, вступающего в реакцию с перекисью водорода [55]. Было предложено электрохимическое определение перекиси водорода [18, 67] с использованием диффузии последней через многослойную полупроницаемую мембрану к электроду. Применение подобных мембран помогает избежать влияния многих мешающих определению ХС соединений (аскорбиновой и мочевой кислот, билирубина и др.). Описан метод с использованием фторселективного электрода для определения перекиси водорода по ее реакции с фторорганическими соединениями в присутствии пероксидазы [69].

Значительным шагом в совершенствовании методов определения ОХС, позволяющим значительно снизить расход дорогостоящих ферментных препаратов, явилось использованием иммобилизованных ферментов. Описана амперометрическая ячейка для определения перекиси водорода с иммобилизованными в ней ХЭ и ХО [39]. Дальней-

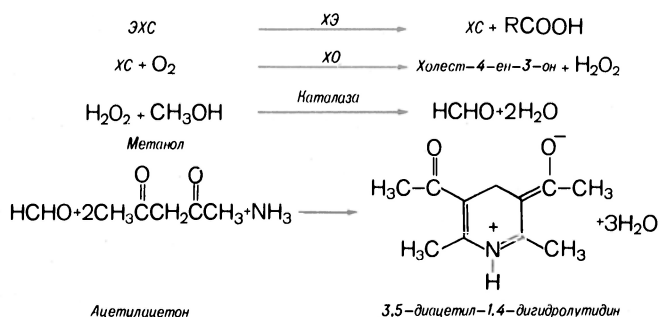


Рис. 2. Схема ферментативного определения ХС с использованием в качестве индикаторной системы реакции Кагеяма [64].

шее развитие этот метод получил в примененных для анализа ХС электродах с иммобилизованными ферментами [11, 17]. Опубликован метод [80], адаптированный к проточному анализатору, использованы два последовательных реактора, содержащих порознь иммобилизованные ХЭ и ХО, что позволило определять как ХС, так и ОХС. При этом для измерения содержания перекиси водорода использован электрод с иммобилизованной пероксидазой. Важным достоинством иммобилизованных ферментов является их повышенная стабильность и возможность многократного использования, что существенно снижает затраты на анализ. Сообщается о применении иммобилизованных ферментов в проточных анализаторах [30, 74], имеются сообщения об использовании иммобилизованных ферментов для определения ОХС в сыворотке [48, 62] микрокалориметрическими методами.

Помимо простоты исполнения, полностью ферментный метод определения ОХС в сыворотке крови имеет другие существенные преимущества по сравнению с методом Ричмонда (с химическим гидролизом). В частности, в процессе химического гидролиза ЭХС происходит денатурация белков сыворотки и в реакционной смеси накапливаются тиолы, обладающие высокой восстанавливающей способностью. Их концентрация в гидролизате сыворотки крови человека составляет 11—16 ммоль/л [24]. Тиолы мешают ферментативному определению ХС, основанному на количественном анализе перекиси водорода, восстанавливая последнюю и занижая тем самым результаты анализа [24, 60]. Кроме того, тиолы могут взаимодействовать с карбонильными соединениями, которые иногда присутствуют в гидролизующем реагенте в виде примесей к этанолу и вносят вклад в величину исходной оптической плотности реакционной среды. Такое взаимодействие приводит к неучитываемому уменьшению «бланка» в ходе анализа и занижению его результатов [60]. Добавление в нейтрализующий реагент окислителей или агентов, алкилирующих SH-группы (ионы ртути, йодацетамид, йодат лития и др.), позволяет уменьшить нежелательное действие тиолов, однако полностью устранить его не удается [24, 59, 60].

Важным фактором, влияющим на результаты ферментативного определения концентрации ОХС, является полнота гидролиза ЭХС под действием ХЭ, так как обычно 70—80 % ОХС в сыворотке крови человека присутствует в этерифицированном виде [64]. Эффективность ферментативного гидролиза ЭХС с длинноцепочечными жирными кислотами, составляющими основную часть ЭХС сыворотки (олеиновой, линолевой, арахидоновой, пальмитиновой и др.), во многом определяется источником ХЭ [38, 52, 70, 78]. Показано, что ХЭ из поджелудочной железы животных эффективно гидролизует все ЭХС сыворотки крови [52, 78]. Высокую эффективность гидролиза по отношению к пальмитиновому, олеиновому, линолевому и арахидоновым эфирам ХС имеет также ХЭ из микроорганизмов, используемая в наборе реактивов CHOD-PAP. ХЭ из микробного источника катализирует гидролиз арахидонового ЭХС значительно медленнее других ЭХС [85]. Более медленный (по сравнению с эфирами других длин-

ноцепочечных жирных кислот) и, следовательно, неполный за время проведения анализа ферментативный гидролиз холестерина арахидоната характерен и для ХЭ [75]. Это обстоятельство связано с ингибирующим влиянием на фермент свободной арахидоновой кислоты, образующейся в результате гидролиза [52].

Помимо природы источника фермента и вида жирнокислотного остатка ЭХС, эффективность гидролиза может определяться составом реакционной среды, в которой протекает ферментативная реакция (наличие активаторов, природа, pH и концентрация буфера, свойства и концентрация детергентов) [52, 78]. При выборе условий и состава среды для анализа ОХС ферментным методом необходимо иметь в виду, что условия, подобранные для ферментной аналитической системы в целом, могут оказаться недостаточно оптимальными для ХЭ, от активности которой зависят скорость и полнота гидролиза этерифицированного ХС.

Одним из следствий неполноты гидролиза ЭХС, по мнению многих исследователей [21, 38, 64, 75, 78], могут быть более низкие значения концентрации ОХС в сыворотке крови, получаемые некоторыми ферментативными методами, по сравнению со значениями, определяемыми химическим методом Абеля — Кендала [21, 38, 75, 78], который ввиду отсутствия заметных систематических погрешностей часто рассматривается как метод сравнения (эталонный метод). Концентрация ОХС в сыворотке, по данным ферментативных методов [34, 44], может быть выше, чем полученная методом Абеля — Кендала на 2,6—4,9 % [34, 44] и даже на 20 % [44].

Для проверки полноты ферментативного гидролиза ЭХС контролировали отсутствие в гидролизате негидролизированных ЭХС методом хроматографии в тонком слое [70]. При использовании набора реактивов «Monotest Cholesterol, High Performance» фирмы «Boehringer Mannheim GmbH» происходит полный гидролиз ЭХС как в коммерческой лиофилизированной контрольной сыворотке Precilip E. L., так и в нативной сыворотке крови человека. Это подтверждают и результаты анализа ОХС, получаемые при использовании этого ферментного набора, которые лишь незначительно отличаются от результатов анализа методом Абеля — Кендала [4, 70].

Кроме неполноты гидролиза ЭХС, причиной несколько заниженных по сравнению с химическим методом результатов ферментного анализа ОХС может быть более высокая специфичность последнего [33, 59, 75]. В табл. 2 приведены данные, характеризующие способность ряда стеролов, близких по своему строению к ХС, имитировать ХС при его анализе ферментативным методом и методом Абеля — Кендала [5]. Их приведенных данных следует, что 7-дегидрохолестерол, 7-холестен-3 β -ол и эргостерол вносят меньшую ошибку при определении ХС ферментным методом по сравнению с таковой в случае метода Абеля — Кендала, в то время как для 5-холестан-3 β -ола и 5-холестен-3 β -20 α -диола наблюдается обратное положение. Реальное соотношение концентраций указанных стеролов в сыворотке крови обуславливает, очевидно, меньшую погрешность ферментативного метода по сравнению с методом Абеля — Кендала.

Таблица 2

Способность некоторых стеролов имитировать ХС при его определении ферментным методом и методом Абеля — Кендала [7]

Стероид	Количество ХС, имитируемое 100 моль стерола, моль	
	ферментный метод	метод Абеля — Кен- дала
Холестерин	100	100
5-Холестан-3 β -ол	82	34
7-Дегидрохолестерол	66	160
5-Холестен-3 β -20 α -диол	82	46
7-Холестен-3 β -ол	80	154
Эргостерол	60	130

Сведения о содержании стеролов в сыворотке крови противоречивы. Утверждение о меньшей ошибке ферментного метода основано на данных о содержании стеролов в сыворотке [77]. Сведения о концентрации некоторых стеролов в крови считают завышенными [27]. Вопрос о том, какой из методов более специфичен в отношении ХС и его эфиров, в настоящее время не решен.

Важным моментом является адекватная калибровка метода. Калибровку ферментных методов определения ХС проводят при помощи первичных или вторичных стандартов. Первичные стандарты представляют собой растворы ХС или его эфиров в органических растворителях или в водных растворах детергентов [20]. В качестве вторичных стандартов используют сыворотки крови с известным содержанием ОХС (калибровочные сыворотки).

Указанные способы калибровки ферментного анализа ОХС были подробно изучены [20, 22]. Калибровка с использованием вторичных стандартов является предпочтительной в сравнении с калибровкой по первичным стандартам. В ряде случаев ферментативный гидролиз ЭХС проходит не до конца вследствие низкой скорости гидролиза ЭХС некоторых жирных кислот [20, 21]. Возникающее при этом занижение результатов анализа может быть в значительной мере уменьшено при калибровке по сывороточным стандартам, имеющим состав эфиров, близкий к таковому в анализируемой пробе.

Показано также, что скорость образования хромогена при анализе ОХС сыворотки крови выше, чем при анализе первичного стандарта [20—22, 75]. Использование первичных стандартов ХС для калибровки анализа ОХС в сыворотке может приводить к получению завышенных результатов по сравнению с калибровкой по вторичному стандарту (при фиксированном времени и условиях анализа), что следует принимать во внимание при выборе способа калибровки. Кроме того, калибровка ферментных методов по первичным стандартам затруднена и по ряду других причин. Так, приготовление водных стандартов осложнено плохой растворимостью ХС и его эфиров в воде даже в присутствии детергентов. При хранении в стандартных растворах ХС в изопропиловом спирте в результате взаимодействия ХС с кислородом воздуха может образовываться перекись, которая, реагируя подобно перекиси водорода с пероксидчувствительной хромогенной системой, приводит к завышенным результатам [60].

Кроме того, наличие детергентов, добавляемых в водные стандартные растворы ХС и его эфиров, а также присутствие спиртов, используемых для приготовления первичных стандартов [20], могут приводить к снижению ферментативной активности ХЭ и ХО [20].

Использование в качестве калибратора некоторых коммерческих сывороток может приводить к завышению результатов вследствие высокого содержания в них эфиров уксусной и арахидоновой кислот, добавляемых для повышения концентрации ОХС и гидролизующихся ХЭ с относительно низкой скоростью [24, 75]. Предполагается, кроме того, что ХЭ может инактивироваться в присутствии компонентов коммерческой сыворотки [75]. Применение в качестве калибратора нативной замороженной сыворотки с известным содержанием ОХС, которая по составу ЭХС мало отличается от анализируемой, является лучшим способом достижения высокой степени правильности получаемых результатов [22, 26, 78].

Несмотря на высокую специфичность, результаты, получаемые ферментными методами анализа зависят от влияния некоторых соединений, обычно присутствующих в сыворотке (гемоглобин, билирубин, мочевая кислота и др.) или введенных извне (лекарственные препараты) [38, 58]. Однако мешающее влияние мочевой кислоты и гемоглобина наблюдается лишь в концентрациях, значительно превышающих физиологические — 20 и 100 мг/дл соответственно [24, 38, 58]. При анализе сильно гемолизированной сыворотки методами, включающими фенол-4-аминоантипирин-пероксидазную систему, могут быть получены завышенные величины вследствие взаимодействия гемоглобина с хромогенной системой. Этот эффект может быть устранен путем вычитания оптического поглощения реакционной смеси, не содержащей ХО, из величины поглощения полной реакционной смеси [24, 57].

В отличие от гемоглобина присутствие билирубина в концентрациях, близких к физиологическим, приводит к занижению результатов на 1—6 % [24, 58]. В большей степени влиянию билирубина подвержены ферментные методы, основанные на стехиометрическом определении перекиси водорода [7, 24, 38, 58]. Эффект билирубина имеет двойную природу: с одной стороны, билирубин взаимодействует с гидроперекисью, образовавшейся в процессе реакции ХО, конкурируя за нее с пероксидазой и уменьшая количества гидроперекиси, вступающей в реакцию с хромогенной системой. С другой стороны, взаимодействуя с перекисью водорода, билирубин разрушается, что приводит к уменьшению поглощения этим соединением в области 500 нм [24, 79]. Влияние билирубина можно в значительной степени уменьшить, создав условия преимущественного протекания реакции по пероксидазному пути посредством увеличения концентрации пероксидазы в реакционной среде. Степень интерференции билирубина прямо пропорциональна его концентрации и не зависит от содержания ХС [24]. При анализе сывороток с известным содержанием билирубина расчет концентрации ХС может быть проведен с учетом соответствующей поправки. Эффективность такой коррекции была продемон-

стрирована на сыворотках крови, взятой у больных гепатитом, концентрация билирубина в которых обычно повышена по сравнению с нормой. Для уменьшения до минимума влияния билирубина предлагают добавлять в реакционную смесь ферроцианид калия [57].

Глюкоза и креатинин в концентрациях, в несколько раз превышающих физиологические, не оказывают заметного влияния на результаты анализа [5, 24]. Аскорбиновая кислота даже в физиологических концентрациях может занижать результаты анализа ХС ферментным методом на 1—8 % [24, 38, 58]. Присутствие в сыворотке этого соединения в терапевтических концентрациях (около 10 мг/дл) приводит к значительному (до 35 % [38, 58] и более 75 % [56]) занижению результатов.

Липемия может обуславливать небольшое (до 3 %) занижение результатов определения ОХС ферментным методом, причем степень этого занижения различна для разных методов [58].

Исследованные до сих пор антикоагулянты и лекарственные средства не мешают определению ОХС различными ферментными методами [38].

Помимо определения ОХС в сыворотке крови, методы ферментативного определения могут быть использованы и для определения ХС. Ввиду неспособности ХО взаимодействовать с ЭХС исключение ХЭ из реакционной смеси для определения ОХС обуславливает возможность определения свободного, т. е. неэстерифицированного, ХС, что используется при изучении некоторых нарушений липидного обмена [47, 50, 54, 60].

Ферментные аналитические системы с успехом используют при определении содержания ОХС в отдельных классах липопротеидов, полученных из сыворотки (плазмы) крови ультрацентрифугированием [28], электрофорезом [19], различными преципитационными методами разделения липопротеидов [28, 29]. Так, широкое применение нашло определение концентрации ХС ЛВП ферментными методами в надосадочной жидкости после осаждения ЛНП и ЛОНП в присутствии катионов двухвалентных металлов и полианионов: фосфовольфрамовой кислоты [29, 36], декстран-сульфата [29, 32], полиэтиленгликоля [6, 28] и гепарина [8, 9]. Ферментативный анализ ХС ЛВП после осаждения ЛОНП и ЛНП с помощью гепарин-марганцевой смеси может приводить к получению завышенных результатов вследствие взаимодействия ионов марганца с компонентами индикаторной системы, а также мутности реакционной среды, образующейся в результате взаимодействия этих ионов с другими компонентами реакционной смеси [8, 9, 72]. Предлагали удалять из надосадочной жидкости ионы марганца в виде нерастворимой гидроокиси, добавляя в пробы перед измерением ОХС бикарбонат натрия [9]. Другие авторы предлагают в тех же целях добавлять в реакционную смесь ЭДТА [72].

Со времени внедрения в клиническую практику ферментные методы количественного определения ОХС продолжают постоянно совершенствоваться: уточняются оптимальные условия протекания реакций, модифицируется состав реакционной смеси с целью повышения чувствительности системы и стабильности реагентов, разрабаты-

ваются новые способы определения продуктов реакции, катализируемой ХО. Описан [25] кинетический метод определения ОХС, основанный на изменении скорости его окисления в присутствии ХО. При этом в состав реакционной смеси был включен конкурентный ингибитор ХО — 3,4-дихлорфенол, который снижал скорость этой реакции, делая ее лимитирующей для всего процесса. В этих условиях индикаторная реакция следует псевдопервому порядку по отношению к ХС, т. е. ее скорость зависит только от концентрации ХС и не зависит от концентрации фермента, что позволило существенно повысить точность метода [16].

Простота методов ферментативного анализа ОХС, возможность проведения анализа при обычном температурном режиме (25—37 °С) сделали возможным их выполнение с использованием различных видов биохимических автоанализаторов [12, 31, 40, 50, 60, 76].

Удобны и просты для применения в клинической лаборатории ферментные методы определения ОХС на бумажных диагностических полосках [3], многослойных элементах [35], пленках [23], содержащих все необходимые компоненты реакционной среды [15, 73]. Как и при анализе других компонентов сыворотки крови методами сухой химии, анализируемая сыворотка без предварительного разбавления наносится на пленку и спустя 5 мин с использованием специально сконструированных для этих целей фотометров измеряется интенсивность окрашивания, пропорциональная концентрации ХС [23]. Широкое распространение такой способ анализа ОХС получил с выпуском фирмой «Boehringer Mannheim» фотометра «Reflo-tron», измеряющего интенсивность окрашивания в отраженном свете [63], и полосок «Reflotron[®] Cholesterol» [13, 63], которые позволяют за 45 с определять ОХС не только в сыворотке, но и в цельной крови. В последнее время методы сухой химии для анализа ОХС все чаще используются в клинических исследованиях [40, 66, 68].

В целом, несмотря на определенные проблемы, имеющие место в определении ОХС ферментными методами, рассмотренные выше присущие этим методам несомненные достоинства — быстрота проведения анализа, возможность применения всех реагентов в одной смеси и как следствие одностадийность анализа, отсутствие агрессивных сред и органических растворителей, возможность автоматизации — делают их наиболее простыми и удобными для практического использования. Ферментные методы определения концентрации ОХС в сыворотке крови вытесняют традиционные химические методы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дислипидемии и ишемическая болезнь сердца. — М., 1980.
2. Климов А. Н., Никуличева Н. Г. Липопротеиды, дислипидемии и атеросклероз. — Л., 1984.
3. Сонода М. Пат. 54—172755 Япония.
4. Abell L. L., Levy B. B., Brodie B. B., Kendall F. F. // J. biol. Chem. — 1952. — Vol. 195, — P. 357—366; 2042—2045.
5. Allain C. C., Poon L. S., Chan C. S. G. et al. // Clin. Chem. — 1974. — Vol. 20. — P. 470—475.
6. Allen J. K., Hensley W. J., Nicholls A. V., Whitfield J. B. // Ibid. — 1979. — Vol. 25. — P. 325—327.

7. Artiss J. D., Zak B. // *Microchem. J.*—1980.— Vol. 25.— P. 535—542.
8. Ash K. O., Hentschel W. M. // *Clin. Chem.*—1978.— Vol. 24.— P. 2160—2184.
9. Bachorik P. S., Walker R. E., Virgil D. G. // *Ibid.*—1984.— Vol. 30.— P. 839—842.
10. Barham D., Trinder P. // *Analyst.*—1972.— Vol. 97.— P. 142—145.
11. Bertrand C., Coulet P. R., Gautheron D. C. // *Analyt. Lett.*—1979.— Vol. 12.— P. 1477—1488.
12. Borner K., von Klose S. // *J. clin. Chem. clin. Biochem.*—1977.— Vol. 15.— P. 121—130.
13. Braun H.-P., Carlensen C. A., Rittersdorf W. // *Clin. Chem.*—1984.— Vol. 30.— P. 991.
14. Bronzert T. J., Brewer B. // *Ibid.*—1977.— Vol. 23.— P. 2089.
15. Brown S., Savory J., Wills M. R. // *Ibid.*—1983.— Vol. 29.— P. 844—846.
16. Bruckner A., Fritzsche W. // *Ärztl. Lab.*—1980.— Bd 26.— S. 323—327.
17. Clark L. C., Emory C., Glueck C. J., Campbell M. // *Enzyme Engineering.*—New York, 1978.— Vol. 3.— P. 409—426.
18. Clark L. C., Duggan C. A., Grooms T. A. et al. // *Clin. Chem.*—1981.— Vol. 27.— P. 1978—1982.
19. Cobb S. A., Sanders J. L. // *Ibid.*—1978.— Vol. 24.— P. 1116—1120.
20. Cooper G. R., Hazlehurst J. S., Duncan P. H. // *Ibid.*—1977.— Vol. 23.— P. 1153.
21. Cooper G. R., Ullman M. D., Hazlehurst J. et al. // *Ibid.*—1979.— Vol. 25.— P. 1074.
22. Cooper G. R., Duncan P. H., Hazlehurst J. S. et al. // *Selected Methods for the Small Clinical Chemistry Laboratory* / Ed. W. R. Faulkner, S. Meites.—Washington, 1981.— P. 165—174.
23. Dappen G. M., Cumbo P. E., Goodhue C. T. et al. // *Clin. Chem.*—1982.— Vol. 28.— P. 1159—1162.
24. Deacon A. C., Dawson P. J. G. // *Ibid.*—1979.— Vol. 25.— P. 976—984.
25. Deeg R., Ziegenhorn J. // *Ibid.*—1983.— Vol. 29.— P. 1798—1802.
26. Demacker P. N. M., Boerma G. J. M., Jansen A. P. // *Ibid.*—1984.— Vol. 30.— P. 875—878.
27. Devgun M. S., Paterson C. R. // *J. Chromatogr.*—1986.— Vol. 353.— P. 169—173.
28. Dias V. C., Parsons H. G., Boyd N. D., Keane P. // *Clin. Chem.*—1988.— Vol. 34.— P. 2322—2327.
29. Draeger B., Wahlefeld A. W. // *Lipoproteins and Coronary Heart Disease* / Ed. H. Greten, P. D. Lang, G. Schettler.—New York, 1980.— P. 38—42.
30. Fernandez-Romero J. M., de Castro L., Valcarcel M. // *Clin. chim. Acta.*—1987.— Vol. 161.— P. 97—101.
31. Fingerhut B. // *Clin. Chem.*—1978.— Vol. 24.— P. 1624—1627.
32. Finley P. R., Schifman R. B., Williams R. J., Licht D. A. // *Ibid.*—1978.— Vol. 24.— P. 931—933.
33. Flegg H. M. // *Ann. Clin. Biochem.*—1973.— Vol. 10.— P. 79—84.
34. Gent C. M. van, Voort H. A. van der, de Bruijn A. M., Klein F. // *Clin. chim. Acta.*—1977.— Vol. 75.— P. 243—251.
35. Goodhue C. T., Risley H. A., Snoe R. E., Underwood G. M. Pat. 565897 CIIA.
36. Grove T. H. // *Clin. Chem.*—1979.— Vol. 25.— P. 560—564.
37. Haeckel R., Perlick M. // *J. clin. Chem. clin. Biochem.*—1976.— Vol. 14.— P. 411—414.
38. Haeckel R., Sonntag O., Kulpmann W. R., Feldmann U. // *Ibid.*—1979.— Vol. 17.— P. 553—563.
39. Huang H., Kuan S. S., Guilbault G. G. // *Clin. Chem.*—1977.— Vol. 23.— P. 671—676.
40. Huang Y.-S., Kyle V. // *Ibid.*—1987.— Vol. 33.— P. 1071.
41. Hyun J., Steinberg M., Treadwell C. R., Vahouny G. V. // *Biochem. biophys. Res. Commun.*—1971.— Vol. 44.— P. 819—825.
42. Kageyama N. // *Clin. chim. Acta.*—1971.— Vol. 31.— P. 421—426.
43. Kattermann R. // *Internist (Berl.)*—1979.— Bd 20.— S. 201—203.
44. Kroll M. H., Lindsey H., Greene J. et al. // *Clin. Chem.*—1988.— Vol. 34.— P. 131—135.
45. Kumar A., Perry A., Polito C., Christian G. // *Ibid.*—1976.— Vol. 22.— P. 1194.
46. Kumar A., Christian G. D. // *Clin. chim. Acta.*—1977.— Vol. 74.— P. 101—108.
47. Majkic N., Berkevs I. // *Ibid.*—Vol. 80.— P. 121—131.
48. Mattiasson B., Danielsson B., Mosbach K. // *Analyt. Lett.*—1976.— Vol. 9.— P. 217—234.
49. McGowan M. W., Artiss J. D., Zak B. // *J. clin. Chem. clin. Biochem.*—1981.— Vol. 19.— P. 769—772.
50. Morin R. J. // *Clin. chim. Acta.*—1976.— Vol. 71.— P. 75—80.
51. Munster D. J., Lever M., Carrell R. W. // *Ibid.*—Vol. 68.— P. 167—175.
52. Noel S.-P., Dupras R., Filion A.-M. // *Analyt. Biochem.*—1983.— Vol. 129.— P. 464—471.
53. Noma A., Nakayama K. // *Clin. Chem.*—1976.— Vol. 22.— P. 336—340.
54. Otani T., Ishimaru K., Nakamura S. et al. // *Chem. pharm. Bull.*—1977.— Vol. 25.— P. 1452—1455.
55. Papastathopoulos D. S., Rechnitz G. A. // *Analyt. Chem.*—1975.— Vol. 47.— P. 1792—1796.
56. Peddicord C. H., Barnes W. A. // *Clin. Chem.*—1988.— Vol. 34.— P. 773—774.
57. Perlstein M. T., Thibert R. J., Zak B. // *Microchem. J.*—1977.— Vol. 22.— P. 403—419.
58. Pesce M. A., Bodourian S. H. // *Clin. Chem.*—1977.— Vol. 23.— P. 757—760.
59. Richmond W. // *Ibid.*—1973.— Vol. 19.— P. 1350—1356.
60. Richmond W. // *Ibid.*—1976.— Vol. 22.— P. 1579—1588.
61. Rigin V. I. // *J. clin. Chem. clin. Biochem.*—1981.— Vol. 19.— P. 815—817.
62. Rehak N. N., Young D. S. // *Clin. Chem.*—1982.— Vol. 28.— P. 2235—2240.
63. Roberts K., Tao I. // *Ibid.*—1986.— Vol. 32.— P. 1117.
64. Roschlau P. von, Bernt E., Gruber W. // *J. clin. Chem. clin. Biochem.*—1974.— Vol. 129.— P. 403—407.
65. Roschlau P. von, Bernt E., Gruber W. // *Clin. Chem.*—1975.— Vol. 21.— P. 941.
66. Sanguini L. C., Ceriotti F., Franzini C. et al. // *Ann. Biol. Clin.*—1988.— Vol. 46.— P. 319—321.
67. Sato I., Karube I., Suzuki S. // *Biotechnol. Bioeng.*—1977.— Vol. 19.— P. 1095.
68. Sedor F. A., Holleman C. H., Heyden S., Schneider K. A. // *Clin. Chem.*—1988.— Vol. 34.— P. 2542—2545.
69. Siddiqui I. W. // *Ibid.*—1982.— Vol. 28.— P. 1962—1967.
70. Siedel J., Hagele E. O., Ziegerhorn J., Wahlefeld A. W. // *Ibid.*—1983.— Vol. 29.— P. 1075—1080.
71. Stadman T. C., Cherkas A., Anfinsen C. B. // *J. biol. Chem.*—1954.— Vol. 206.— P. 511—515.
72. Steele B. W., Koehler D. F., Azar M. M. et al. // *Clin. Chem.*—1976.— Vol. 22.— P. 98—101.
73. Stevens J. F., Tsang W., Newall R. G. // *J. clin. Path.*—1983.— Vol. 36.— P. 598—601.
74. Tabata M., Endo J., Murachi T. // *J. appl. Biochem.*—1980.— Vol. 18.— P. 595—601.
75. Tel R. M., Berends G. T. // *J. clin. Chem. clin. Biochem.*—1980.— Vol. 18.— P. 595—601.
76. Wents P. W., Gross R. E., Savory J. // *Clin. Chem.*—1976.— Vol. 22.— P. 188—192.
77. Werner W., Ray H. G., Wielinger H. // *Z. analyt. Chem.*—1970.— Vol. 252.— P. 224.
78. Wiebe D. A., Bernert J. T. // *Clin. Chem.*—1984.— Vol. 30.— P. 352—356.
79. Witte D. L., Brown L. F., Feld R. D. // *Ibid.*—1978.— Vol. 24.— P. 1778—1782.
80. Yao T., Sato M., Kobayashi Y., Wasa T. // *Analyt. Biochem.*—1985.— Vol. 149.— P. 387—391.

Поступила 08.06.90

ENZYMATIC ASSAY OF TOTAL CHOLESTEROL CONTENT IN BLOOD SERUM

V. V. Pedchenko, V. N. Malakhov

All-Union Research Centre for Prophylactic Medicine, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Advantages and disadvantages of enzymatic assays of total cholesterol content in human blood serum are reviewed. Factors, affecting these assays are discussed: specificity of the enzymes used (cholesterolesterase and cholesteroxidase), conditions of analysis and composition of the reaction mixture, interference with components of blood serum. Adaptation of the enzymatic assays of total cholesterol estimation for various types of biochemical analyzers, including systems containing immobilized enzymes, is considered.

Е. И. Львовская, И. А. Волчегорский, С. Е. Шемяков, Р. И. Лифшиц

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЕЧНЫХ ПРОДУКТОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ

Кафедра биохимии Челябинского медицинского института

Продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ), а именно содержащие карбонильные группы, способны взаимодействовать со свободными аминокислотами различных веществ (фосфолипидов, аминокислот, белков и др.) с образованием соединений типа шиффовых оснований [1, 2]. Последняя группа соединений является структурной основой липофусцинов (керида), представляющих собой неметаболизируемые маркеры дистрофических процессов в клетке.

Общезвестным аналитическим подходом к определению конечных продуктов ПОЛ является флуоресцентная детекция этих соединений. (Спектрофотометрические методы не разработаны, поскольку шиффовы основания обладают высокой способностью к изомеризации, что существенно отражается на спектре поглощения.) Вместе с тем известно, что в области 401—404 нм находится изосбестическая точка для этих соединений, которая не зависит от вида изомеров [7]. Мы предприняли попытку разработки количественного спектрофотометрического определения конечных продуктов ПОЛ в липидных экстрактах биологического материала.

Методика. В работе использованы ткани головного мозга и печени человека, которые были получены от 12 трупов (8 мужчин и 4 женщин). Ткани для исследования получали в пределах 12 ч с момента наступления смерти.

Получение липидных экстрактов из 11 % гомогенатов тканей, а также определение первичных (гидроперекисей) и вторичных (карбонильных) продуктов ПОЛ проводили по разработанному ранее методу [3]. Содержание конечных продуктов ПОЛ определяли по величине оптической плотности гептановых и изопропанольных фаз липид-

ных экстрактов при 400 нм (толщина оптического слоя 2 см). Относительное содержание шиффовых оснований рассчитывали по отношению поглощения при 400 нм к оптической плотности при 220 нм. Последняя величина является функцией содержания изолированных двойных связей в экстрагированных липидах, которые являются субстратами ПОЛ.

Референтным методом определения конечных продуктов липидной перекисидации служил гистохимический метод определения липофусцина по Лилли с использованием нильского голубого с дифференцировкой липофусцина от меланина [5]. Анализ липидных экстрактов и гистохимическая часть работы выполнялись двумя отдельными независимыми группами авторов (с применением слепого контроля).

Результаты обработаны статистически с расчетом средних и их ошибок, а также с применением корреляционного анализа [4, 6].

Результаты и обсуждение. Как видно из данных, представленных в таблице, относительные величины содержания шиффовых оснований хорошо соответствовали референтным гистохимическим данным. Такое соответствие было выражено как для гептановой, так и для изопропанольной фазы липидных экстрактов изученных тканей. Так, между содержанием шиффовых оснований, определяемых по предложенной технологии, в гептановой фазе головного мозга и гистохимическими данными обнаружена прямая корреляционная связь ($r=0,815$; $p<0,002$). Соответствующая взаимосвязь найдена в изопропанольной фазе головного мозга ($r=0,884$; $p<0,001$) и в изопропанольной фазе печени ($r=0,827$; $p<0,002$). Данный факт свидетельствует, по нашему мнению, об адекватности предложенного метода целям количественного анализа конечных продуктов ПОЛ.

Известно, что накопление липофусцина в тканях является функцией возраста. Данные, полученные нами, подтверждают это положение. Содержание липофусцина в головном мозгу, определяемое гистохимически, имеет прямую корреляционную связь с возрастом ($r=0,887$; $p<0,01$) в печени ($r=0,824$; $p<0,002$). Важно отметить, что аналогичные закономерности характерны также для относительного содержания шиффовых оснований, определяемых по предложенному способу. В частности, между содержанием шиффовых оснований в изопропа-

Относительное содержание первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ в трупном материале

Больной	Возраст	Пол	Изопропанольная фаза						Гептановая фаза						Гистохимия	
			печень			мозг			печень			мозг			печень, баллы	мозг, баллы
			E ₂₃₂	E ₂₇₈	E ₄₀₀	E ₂₃₂	E ₂₇₈	E ₄₀₀	E ₂₃₂	E ₂₇₈	E ₄₀₀	E ₂₃₂	E ₂₇₈	E ₄₀₀		
			E ₂₂₀	E ₂₂₀	E ₂₂₀	E ₂₂₀	E ₂₂₀	E ₂₂₀	E ₂₂₀	E ₂₂₀	E ₂₂₀	E ₂₂₀	E ₂₂₀	E ₂₂₀		
К.	80 лет	Ж.	0,573	0,505	0,250	0,376	0,063	0,160	0,971	0,274	0,195	0,205	0,182	0,500	1,91	1,72
М.	59 лет	М.	0,682	0,938	0,210	—	—	—	0,687	0,517	0,055	—	—	—	1,87	—
У.	74 года	Ж.	0,581	0,534	0,190	0,500	0,198	0,020	0,710	0,330	0,120	0,693	1,129	0,085	1,91	1,52
И.	61 год	М.	0,614	0,635	0,120	0,514	0,159	0,100	0,699	0,304	0,0125	0,896	0,782	0,050	1,56	1,44
П.	78 лет	М.	0,851	0,643	0,100	0,774	0,093	0,175	0,540	0,158	0,250	0,467	0,170	0,290	1,84	1,72
А.	71 год	М.	0,603	1,409	0,080	—	—	—	0,783	0,567	0,045	—	—	—	1,74	—
З.	40 лет	М.	0,682	0,938	0,070	—	—	—	0,694	0,552	0,110	—	—	—	1,55	—
А.	42 года	М.	0,458	0,949	0,055	—	—	—	0,783	0,567	0,040	—	—	—	1,36	—
К.	78 лет	М.	—	—	—	0,790	0,086	0,180	—	—	—	0,717	0,230	0,290	—	1,69
П.	75 »	Ж.	0,594	0,746	0,250	0,243	0,121	0,015	1,132	0,318	0,120	0,942	0,791	0,005	2,04	1,27
С.	4 года	Ж.	—	—	—	0,231	0,116	0,055	—	—	—	0,851	0,149	0,005	—	1,0
К.	5 мес	М.	—	—	—	0,259	0,137	0,055	—	—	—	—	—	—	—	1,0

Примечание. $\frac{E_{232}}{E_{220}}$ — содержание первичных молекулярных продуктов ПОЛ; $\frac{E_{278}}{E_{220}}$ — содержание вторичных молекулярных продуктов ПОЛ; $\frac{E_{400}}{E_{220}}$ — содержание конечных продуктов ПОЛ.

нольной фазе липидных экстрактов головного мозга и возрастом ($r=0,595$; $p<0,05$), изопропанольных экстрактов печени ($r=0,686$; $p<0,002$). Этот факт подтверждает адекватность предложенной технологии. Известно, что накопление конечных продуктов ПОЛ в стадиях сформировавшегося дистрофического процесса находится в реципрокных отношениях с содержанием молекулярных продуктов ПОЛ, прежде всего вторичных (карбонильных).

Как видно из данных таблицы, существует, очевидно, выраженная обратная зависимость между содержанием вторичных молекулярных продуктов ПОЛ и содержанием шиффовых оснований. Так, например, в гептановой фазе экстрактов печени ($r=-0,689$; $p<0,02$) и соответственно в изопропанольных фазах головного мозга ($r=-0,800$; $p<0,01$), печени ($r=-0,672$; $p<0,05$).

Эти факты являются еще одним аргументом в пользу адекватности примененного спектрофотометрического метода.

Таким образом, очевидной представляется возможность простого и быстрого количественного определения конечных продуктов ПОЛ (типа шиффовых оснований) путем замера оптических плотностей в липидных экстрактах при 400 нм.

ЛИТЕРАТУРА

1. Биофизика, т. 18 // Проблемы анализа эндогенных продуктов перекисного окисления липидов.— М., 1986.— С. 95—96.
2. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.— М., 1972.
3. Волчегорский И. А., Налимов А. Г., Яровинский Б. Г., Лифшиц Р. И. // Вопр. мед. химии.— 1989.— № 1.— С. 127—131.
4. Кононский А. И. Гистохимия.— Киев, 1976.— С. 261—266.
5. Пирс Э. Гистохимия.— М., 1962.— С. 583; 586; 861.
6. Поляков И. В., Соколов Н. С. Практическое пособие по медицинской статистике.— Л., 1975.
7. Chio K. S., Tappel A. L. // Biochemistry (Wash.).— 1969.— Vol. 8, N 7.— P. 2821—2827.

Поступила 24.11.89

SPECTROPHOTOMETRIC ESTIMATION OF THE FINAL LIPOPEROXIDATION PRODUCTS

E. I. Lvovskaya, I. A. Volchegorsky, S. E. Shemyakov, R. I. Lifshitz

Medical School, Chelyabinsk

Spectrophotometric assay of the final lipoperoxidation products based upon light absorption at 400 nm was developed. Relative content of these products in different phases of lipid extract was calculated as E_{400}/E_{220} ratio. Data obtained by the technique developed were consistent with those of histochemical results. Appreciable correlation between the relative lipoperoxidation products content and age was demonstrated.

НЕКРОЛОГ

УДК 577.1+616-008.9-074]:92 Касавина

БЕАТРИСА СОЛОМОНОВНА КАСАВИНА
(1911—1990)



9 ноября 1990 г. скоропостижно скончалась доктор биологических наук профессор Беатриса Соломоновна Касавина — крупный ученый в области биохимии, посвятившая свою жизнь изучению патогенеза ряда заболеваний, связанных с изменением соединительной ткани и способов воздействия на эту ткань.

Беатриса Соломоновна Касавина родилась в 1911 г. в городе Старая Русса Ленинградской области в семье врача. В 1934 г. окончила Ленинградский университет по специальности биохимия. С 1936 г. работала ассистентом кафедры биохимии I ММИ, руководимой акад. Б. И. Збарским, сочетая большую педагогическую работу с научной деятельностью. В 1940 г. успешно защитила кандидатскую диссертацию, а в 1952 г. — докторскую, посвященную изучению белков мышечной ткани в онтогенезе.

С 1953 г. Беатриса Соломоновна — руководитель лаборатории биохимии Центрального НИИ травматологии и ортопедии им. Н. Н. Приорова. Многообразные подходы к изучению метаболизма тканей опорно-двигательного аппарата позволили ей впервые в нашей стране сформулировать концепцию фермент-субстратных взаимодействий компонентов соединительной ткани, разработать препараты — лидазу, ронидазу, луронит, хонсурид, нашедшие широкое применение в медицинской практике.

Последующая деятельность Беатрисы Соломоновны была посвящена вопросам эндокринологии и офтальмологии. В НИИ глазных болезней им. Гельмгольца ею проводились исследования по изучению тканей органа зрения на молекулярном уровне.

Беатриса Соломоновна длительное время была членом комиссии по координации и внедрению новой техники в медицинскую практику при Минздраве СССР.

Беатрисе Соломоновне принадлежит 10 авторских свидетельств, она автор свыше 200 пуб-

ликаций в отечественных и зарубежных журналах, 5 монографий. Беатриса Соломоновна всегда с большой любовью относилась к молодым научным кадрам, ею подготовлено свыше 30 докторов и кандидатов наук.

Беатриса Соломоновна была обаятельным, скромным, доброжелательным человеком. Высокая требовательность к себе, к своей работе сочеталась с принципиальностью, демократичностью и уважительным отношением ко всем, с кем она общалась. У всех, лично знавших Беатрису Соломонову, навсегда сохранится светлая память о ней.

СОДЕРЖАНИЕ

Обзор

Грибанов Г. А. Особенности структуры и биологическая роль лизофосфолипидов

Оригинальные статьи

- Денисенко В. А., Горбач З. В. Сорбитолдегидрогеназа почки: кинетический механизм
- Барлебен Х., Вагенкнехт К., Юнг К., Юнкер Л., Хайне Х. Исследования обмена белков у больных атеросклерозом с помощью изотопа ^{15}N
- Рабинович П. Д., Гузачев А. А. Некоторые особенности образования и выделения желчных кислот при спонтанном атеросклерозе
- Ефетов К. А., Троцкий Г. В., Ефетов С. В. Устойчивость конформации сывороточных иммуноглобулинов при некоторых опухолях
- Козырева Е. А., Жордания К. И., Бассалык Л. С., Васильев А. В. Протеолитические ферменты лизосом при раке яичников
- Надирадзе З. О., Шмалко Ю. П., Гачечиладзе А. Г. Биохимическая характеристика медиаторных систем головного мозга в условиях стимуляции метастазирования при хирургическом удалении опухоли
- ✓ Киркель А. З., Тищенко Л. А., Аксенова Л. П., Пеккель В. А., Горкин В. З. Сравнительная характеристика мембранно-связанных и цитоплазматической моноаминоксидаз плаценты человека
- Войтенко Н. Н., Попова Н. К. Моноаминоксидазы мозга при старении
- Хватова Е. М., Семенова Т. С. Регуляция активности цитоплазматической креатинкиназы мозга пиридиновыми нуклеотидами
- Гомазков О. А., Панфилов А. Д., Ростовцев А. П., Комиссарова Н. В., Фомин В. В., Григорьянц О. О. Региональная активность энкефалин- и ангиотензин II-образующих пептидаз мозга и периферических тканей у крыс с различным влечением к этанолу
- Агаев Т. М., Гафулова А. Д. Влияние ранней зрительной депривации на содержание N-ацетил-L-аспарагиновой кислоты и активность фосфатактивируемой глутаминазы в структурах зрительного анализатора и разных областях коры головного мозга и в мозжечке собаки
- Кудряшов Б. А., Ульянов А. М. Устойчивое восстановление продукции эндогенного инсулина в организме при экспериментальном инсулинзависимом диабете
- Панин Л. Е., Лукьянов И. В., Храмова Л. А., Никифоровская Л. Ф. Гликозаминогликаны поджелудочной железы при остром панкреатите

CONTENTS

Review of Literature

Gribanov, G. A. Structural features and biological role of lysophospholipids

Original Papers

- Denisenko, V. A., Gorbach, Z. V. Kidney tissue sorbitol dehydrogenase. Kinetic mechanism
- Barleben, H., Vagenknecht, K., Yung, K., Yunker, L., Heine, H. Evaluation of protein metabolism in patients with atherosclerosis using ^{15}N label
- Rabinovich, P. D., Guzachev, A. A. Specific properties of bile acid formation and secretion in spontaneous atherosclerosis
- Efetov, K. A., Troitsky, G. V., Efetov, S. V. Conformational resistance of blood serum immunoglobulins in some tumors
- Kozyreva, E. A., Zhordania, K. I., Bassalyk, L. S., Vasil'ev, A. V. Lysosomal proteolytic enzymes in ovary cancer
- Nadiradze, Z. O., Shmal'ko, Yu. P., Gachechiladze, A. G. Biochemical characteristics of brain transmitter systems in surgical removal of tumor stimulating metastatic spreading
- Kirkel, A. Z., Tischenko, L. A., Axenova, L. N., Pekkkel, V. A., Gorkin, V. Z. Properties of membrane-bound and cytoplasmic monoamine oxidase from human placenta
- Voitenko, N. N., Popova, N. K. Brain monoamine oxidase in old rats
- Khvatova, E. M., Semenova, T. S. Regulation of brain cytoplasmic creatine kinase activity by means of pyridine nucleotides
- Gomozkov, O. A., Panfilov, A. D., Rostovtsev, A. P., Komissarova, N. V., Fomin, V. V., Grigoryantz, O. O. Regional activity of enkephalin- and angiotensin II-forming peptidases in brain compartments and peripheral tissues of rats with different alcohol motivation
- Agayev, T. M., Gafulova, A. D. Effect of the early visual deprivation on content of N-acetyl-L-aspartic acid and activity of phosphate-dependent glutaminase in structures of dog visual analyzer, different regions of brain cortex and cerebellum
- Kudryashov, B. A., Ulanov, A. M. Persistent restoration of endogenous insulin production in animals with insulin-dependent diabetes
- Panin, L. E., Lukyanov, I. V., Khramtsova, L. A., Nikiforovskaya, L. F. Glycosaminoglycans of rat pancreas in acute pancreatitis