

ТОМ 38

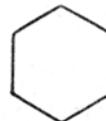
ВЫПУСК 2

МАРТ — АПРЕЛЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

# ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. А. ТУТЕЛЬЯН (зам. редактора), А. И. АРЧАКОВ, И. П. АШМАРИН, Т. Т. БЕРЕЗОВ,  
Ю. В. БУКИН, А. В. ВАСИЛЬЕВ, Е. Н. ГЕРАСИМОВА, В. З. ГОРКИН, И. Б. ЗБАРСКИЙ,  
В. Л. КОЗЕЛЬЦЕВ (ответственный секретарь), А. Н. КЛИМОВ, Б. Ф. КОРОВКИН,  
Л. А. ЛОКШИНА, В. Н. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАНЧЕНКО, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ,  
Ю. А. РОМАКОВ, В. А. САКС, С. Е. СЕВЕРИН, В. Б. СПИРИЧЕВ, Е. А. СТРОЕВ

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

Баев А. А. (Москва)  
Бычков С. М. (Москва)  
Константинов А. А. (Хабаровск)  
Кудряшов Б. А. (Москва)  
Ляхович В. В. (Новосибирск)  
Пасхина Т. С. (Москва)

Троицкий Г. В. (Симферополь)  
Туракулов Я. Х. (Ташкент)  
Тягепылд Л. Я. (Тарту)  
Яковлев Н. Н. (Санкт-Петербург)  
Ясайтис А. А. (Вильнюс)



© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1992  
УДК 576.311.344:576.343:577.122.5

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

**СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О БИОГЕНЕЗЕ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ БЕЛКОВ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ**

Институт питания АМН СССР, Москва

Вскоре после открытия лизосом [24] перед исследователями встал вопрос о происхождении этих органелл. К середине 70-х годов на основании электронно-микроскопических, цитохимических, энзимологических и радиоизотопных исследований было установлено, что лизосомальные ферменты синтезируются на рибосомах шероховатого эндоплазматического ретикулума (ЭПР), транспортируются по каналам гладкого ретикулума в аппарат Гольджи, подвергаются здесь гликозилированию и упаковке и затем отпочковываются от него в виде везикул (первичных лизосом) [5].

Вместе с тем продолжал оставаться невыясненным ряд важных вопросов. Во-первых, было неизвестно, как происходит сегрегация (отделение) лизосомальных ферментов от других белков, синтезирующихся в том же внутриклеточном компартменте и транспортирующихся тем же путем (например, белков плазматической мембраны и секреторных белков). Во-вторых, тот факт, что лизосомальные мембраны устойчивы к разрушению со стороны лизосомальных гидролаз, указывал на необычность ее белкового состава и, следовательно, на необходимость изучения особенностей строения и происхождения мембранных белков лизосом.

Значительный прогресс в изучении этих вопросов достигнут в последнее 10-летие благодаря использованию методов аффинной хроматографии, иммунохимического анализа, ауторадиографии и др. Ежегодно публикуется большое число работ в этой области. В последнее время появилось несколько обстоятельных научных обзоров [4, 47, 64, 89]. Однако в каждом из этих обзоров рассматривается лишь одна из сторон проблемы биогенеза лизосом: либо биогенез лизосомальных ферментов, либо биогенез мембранных белков. Нам представляется интересным объединить имеющиеся на сегодня данные по биогенезу основных классов лизосомальных белков. Это позволит, во-первых, подойти к обсуждению вопроса о том, как происходит соединение разных лизосомальных белков в единую структуру и, во-вторых, позволит шире взглянуть на проблему лизосомальной патологии.

В соответствии с изложенным в настоящем обзоре будут рассмотрены следующие основные вопросы: 1) особенности посттрансляционной модификации лизосомальных ферментов и подготовка

их к транспорту в лизосомы; 2) рецепция лизосомальных ферментов и структура соответствующих рецепторов; 3) строение и свойства специфических белков лизосомальной мембраны и особенности их биосинтеза; 4) нарушения биогенеза лизосомальных белков как факторы этиологии и патогенеза заболеваний человека.

*Синтез и процессинг лизосомальных ферментов*

Как уже указывалось, синтез лизосомальных ферментов осуществлялся на полисомах шероховатого ЭПР, т. е. там же, где синтезируются белки плазматической мембраны и секреторные белки [46, 64]. Все синтезированные белки имеют N-концевой гидрофобный сигнальный пептид, который взаимодействует с так называемой «узловой частью», представляющей собой 11S-рибонуклеопротеид, и перемещаются через мембрану ЭПР в люмен гладкого ЭПР [28]. Еще до окончания процесса трансляции происходит гликозилирование белков по остаткам аспарагина путем переноса олигосахарида, содержащего 3 остатка глюкозы, 9 остатков маннозы и 2 остатка N-ацетилглюкозамина, от гликолипидного компонента мембраны — долихолдифосфат-олигосахарида — на nascentный белок (рис. 1) [65]. После перемещения через мембрану ЭПР происходит реакция ограниченного

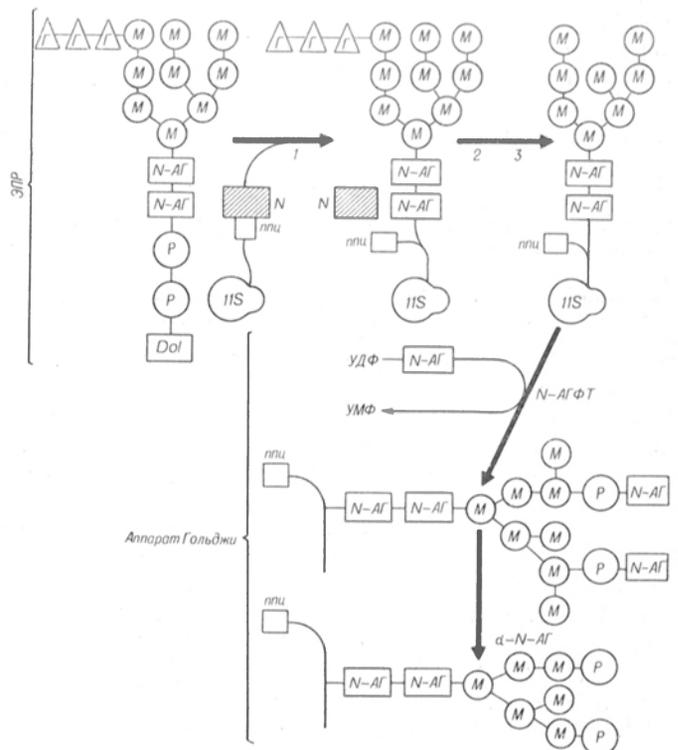


Рис. 1. Образование остатков маннозо-6-фосфата на олигосахаридной цепи лизосомальных ферментов.

1 — олигосахаридтрансфераза, 2 — α-глюкозидаза I и II, 3 — α-маннозидаза, 2 — глюкоза; М — манноза, P — фосфат; DoI — долихол; N — кощевой сигнальный пептид; ППЦ — полипептидная цепь лизосомального фермента. Остальные обозначения в тексте.

протеолиза: от пептидной цепи с помощью специальной пептидазы отщепляется N-концевой сигнальный пептид, содержащий обычно около 20 аминокислотных остатков [28]. Олигосахаридная цепь в большинстве случаев также укорачивается: от нее отщепляется 3 остатка глюкозы (с помощью  $\alpha$ -глюкозидаз I и II) и 1 остаток маннозы [65]. Отщепление маннозы катализирует  $\alpha$ -маннозидаза II [9], и значимость этой реакции можно установить с помощью специфического ингибитора этого фермента — свайнсонина [11]. В работе J. Тгореа и соавт. [118] на культуре перитонеальных макрофагов показано, что ингибирование  $\alpha$ -маннозидазы не нарушает дальнейший процессинг и рецепцию лизосомальных ферментов, т. е. отщепление от первичной олигосахаридной цепи остатка маннозы не имеет существенного значения. Напротив, отщепление остатков глюкозы имеет большое значение. Показано, что блокирование этой реакции останавливает транспорт катепсина D в ЭПР.

До этого момента судьба лизосомальных ферментов, белков плазматической мембраны и секреторных белков практически одинакова. В то же время дальнейший их транспорт происходит по-разному. Это достигается различиями в их последующей модификации и сортировке: к олигосахаридной цепи на секреторных и мембранных белках присоединяются сиаловые кислоты, а на олигосахаридной цепи лизосомальных ферментов происходит фосфорилирование остатков маннозы [3]. В этом важнейшем процессе участвуют 2 фермента, расположенные в цис-отсеках аппарата Гольджи: N-ацетилглюкозаминилфосфаттрансфераза (N-АГФТ) и  $\alpha$ -N-ацетилглюкозаминидаза ( $\alpha$ -N-АГ) [42].

N-АГФТ переносит N-ацетилглюкозамин-1-фосфат от УДФ-N-ацетилглюкозамина на определенные остатки маннозы с образованием фосфодиэфирного производного [96, 128]. Фосфорилирование идет по 1, 2 или 5 наружным остаткам маннозы на олигосахаридной цепи [120]. Хотя лизосомальный фермент имеет, как правило, несколько Асн-связанных олигосахаридных цепей, не все они подвергаются фосфорилированию. Так, у  $\beta$ -глюкуронидазы,  $\beta$ -гексозаминидазы и катепсина D фосфорилируется менее половины Асн-связанных цепей [42, 49]. N-АГФТ обладает высокой специфичностью к олигосахаридной цепи лизосомальных ферментов, другие гликопротеиды с аналогичной маннозосодержащей олигосахаридной цепью фосфорилируются в 100 раз медленнее [65, 129]. Не связанные с белком маннозосодержащие олигосахариды практически не являются субстратами этого фермента [65]. Все это указывает на важность высокоаффинного белок-белкового взаимодействия между N-АГФТ и лизосомальным ферментом и подтверждается тем, что нарушение конформации ферментного белка (например, при тепловой денатурации, обработке додецилсульфатом натрия и протеазами) лишает его возможности фосфорилироваться под действием N-АГФТ [65, 97]. Вероятно, N-АГФТ «узнает» в белковой молекуле какой-либо домен, общий для всех лизосомальных ферментов, но его природа пока неизвестна [64].

Второй фермент,  $\alpha$ -N-АГ, отщепляет от олигосахаридной цепи N-ацетилглюкозамин, образуя

тем самым остатки маннозо-6-фосфата на концах цепи [121]. Особенности функционирования и субстратная специфичность этого фермента изучены значительно слабее.

После модификации в цис-отсеках аппарата Гольджи все синтезированные на мембранах шероховатого ЭПР белки попадают в средние, а затем в терминальные транс-отсеки аппарата Гольджи, где происходит их сортировка. При этом белки плазматической мембраны с сигнальной углеводной цепью упаковываются в везикулы, которые отпочковываются от транс-отсеков и сливаются с плазматической мембраной [45]. Секреторные белки упаковываются в специальные секреторные везикулы и подвергаются экзоцитозу. Лизосомальные ферменты — единственные белки, имеющие на олигосахаридной цепи остатки маннозо-6-фосфата, связываются со специфическими рецепторами [103, 113, 125].

Таким образом, модификация синтезированных de novo лизосомальных ферментов заключается в их гликозилировании по остаткам аспарагина, транспорте из шероховатого ЭПР в гладкий, где происходит отщепление сигнального пептида, и последующем перемещении в аппарат Гольджи, где в результате нескольких ферментативных реакций на олигосахаридной цепи образуются остатки маннозо-6-фосфата. Такие лизосомальные ферменты готовы к связыванию со специфическими маннозо-6-фосфатными рецепторами.

#### *Структура и функции маннозо-6-фосфатных рецепторов*

В настоящее время изучено 2 различных белка-рецептора к маннозо-6-фосфату. Первый белок представляет собой одноцепочечный гликопротеид, связывающий лизосомальные ферменты независимо от наличия в среде двухвалентных катионов [115] и названный поэтому катион-независимый рецептор (КНР). Этот белок был выделен из клеток животных и человека с помощью аффинной хроматографии [104]. Его первичная структура установлена по анализу кодирующей ДНК. Мол. м. пептидной цепи КНР равна 270 кДа, а углеводного компонента — 20—30 кДа [89]. КНР представляет собой трансмембранный интегральный белок [106, 124]. Гидрофобный домен, располагающийся в толще мембраны, делит его на 2 основных участка: рецепторный, направленный внутрь цистерн аппарата Гольджи, и цитозольный. Рецепторный участок КНР человека состоит из 2265 аминокислотных остатков, богат цистеином, имеет 19 мест связывания углеводных цепей по аспарагину. Интересно, что он построен из 15 повторяющихся фрагментов по 145 аминокислотных остатков. Аналогичное строение имеет рецепторный участок КНР у животных [79, 87].

Цитозольный участок построен из 164 аминокислотных остатков, содержит по сравнению с рецепторным больше моноаминодикарбоновых аминокислот и проявляется большую видовую специфичность [76].

Не вполне ясен вопрос о форме существования КНР в клетке. Выше было указано, что его общая мол. м., определенная по анализу первичной структуры, составляет около 300 кДа (270 кДа —

пептидная часть и 20—30 кДа — углеводная часть). В то же время мол. м. КНР, определенная с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, равна 215—216 кДа [104, 115]. Данное несоответствие может быть связано с посттрансляционным ограниченным протеолизом рецепторного белка, но экспериментально это не доказано [87].

Вскоре после открытия КНР было обнаружено, что он, находясь в аппарате Гольджи, может фосфорилироваться по серину и треонину, однако значимость этого явления была неясна [105]. При изучении КНР из мозга обезьян, было показано, что фосфорилирование рецептора уменьшает его аффинность к лизосомальным ферментам, причем к разным ферментам в разной степени (к  $\alpha$ -фукозидазе — в 13,7 раза, к арилсульфатазе — в 2 раза, к  $\beta$ -глюкуронидазе — в 1,3 раза, к гексозаминидазе — в 1,2 раза). Эти авторы обнаружили также специфическую протеинкиназу, что свидетельствует о наличии в клетке сформированного механизма регуляции аффинности КНР [88].

Второй белок-рецептор к маннозо-6-фосфату был открыт на мышах линии P 388 D, у которых в макрофагах отсутствует КНР, но транспорт лизосомальных ферментов протекает нормально [32]. Было установлено, что он представляет собой гликопротеид с мол. м 46 кДа и его взаимодействие с лизосомальными ферментами требует наличия двухвалентных катионов  $Mn^{2+}$  или  $Mg^{2+}$  (отсюда название катионзависимый рецептор — КЗР). Вероятно, КЗР существует в клетке в форме димера [56].

Структура КЗР из ооцитов шпорцевой лягушки установлена по анализу кодирующей ДНК. Показано, что его пептидная часть имеет мол. м. 28 кДа, а углеводная — 18 кДа. Зрелый белок построен из 257 аминокислотных остатков. Так же как в КНР, в КЗР имеется гидрофобный внутримембранный домен, который делит белок на рецепторный участок, состоящий из 145 аминокислотных остатков, и цитозольный, состоящий из 67 аминокислотных остатков. Рецепторный участок имеет 5 мест связывания олигосахаридов по аспарагину. Оказалось, что рецепторный участок КЗР является копией повторяющегося фрагмента из 145 аминокислотных остатков на рецепторном участке КНР (рис. 2) [21]. КЗР человека имеет очень сходную структуру. Он синтезируется как предшественник из 277 аминокислотных остатков. При созревании сначала отщепляется N-концевой «сигнальный» пептид из 20 остатков, а затем — N-концевой гексапептид. В зрелом белке рецепторный участок построен из 154, мембранный домен — из 19, цитозольный — из 78 аминокислот [91]. 5 остатков аспарагина на рецепторном участке гликозилированы цепями комплексного типа [57, 124].

Сходство рецепторных участков КНР и КЗР указывает на одинаковый механизм связывания лизосомальных ферментов обоими рецепторами. Несмотря на разницу в размерах рецепторных участков (у КНР он в 15 раз больше, чем у КЗР), оба рецептора связывают по 2 молекулы маннозо-6-фосфата [89]. Вероятно, взаимодействие рецепторов с маннозо-6-фосфатом осуществляется с помощью остатков аргинина на рецепторном

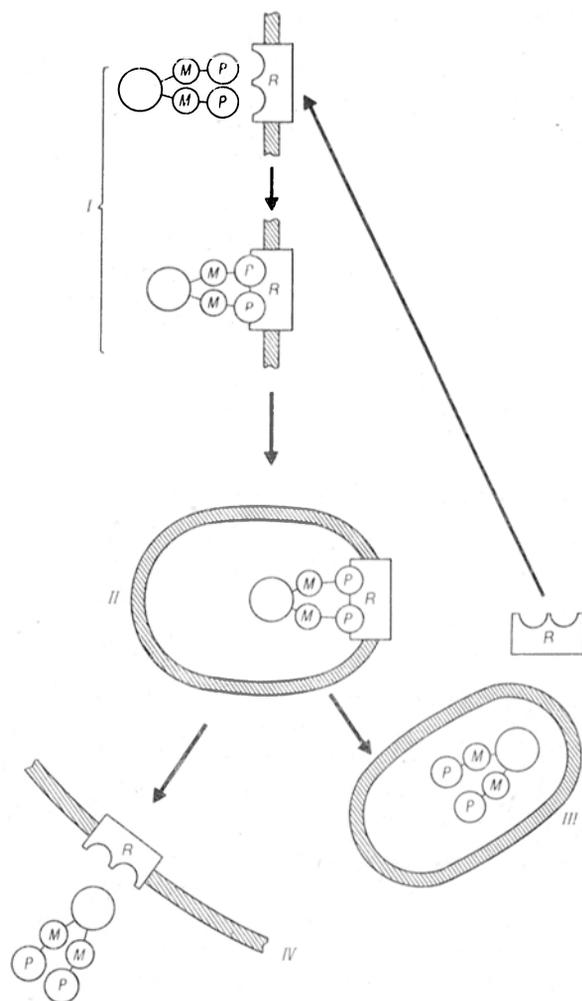


Рис. 2. Схема рецепции и транспорта лизосомальных ферментов.

М — Р — маннозо-6-фосфат; R — рецептор, I — аппарат Гольджи; II — окайвленная везикула; III — первичная лизосома; IV — плазмалемма. Объяснения в тексте.

участке. Модификация радикалов аргинина 1,2-циклогександионом лишает рецепторы способности связывать маннозо-6-фосфат [14].

Сходство в действии КНР и КЗР проявляется также в том, что связывание их с лизосомальными ферментами происходит в нейтральной среде, а отщепление — в кислой среде. Это связывание блокируется (конкурентно) маннозо-6-фосфатом и маннаном из дрожжей. Обработка лизосомальных ферментов щелочной фосфатазой, приводящая к гидролизу маннозо-6-фосфатных радикалов, также нарушает связывание лизосомальных ферментов с рецепторами [56, 64, 11].

Таким образом, в настоящее время накоплено множество данных о структуре маннозо-6-фосфатных рецепторов и их роли в специфическом связывании лизосомальных ферментов. Однако ряд вопросов остается нерешенным. Во-первых, наличие в клетке двух разных рецепторов (а во многих клетках КНР и КЗР находятся в эквимоллярных количествах [57]) ставит вопрос о значимости каждого из этих рецепторов для транспорта лизосомальных ферментов. С помощью специфических антител показано, что связывание КНР антителами, введенными в культуральную среду, вызывает нарушение транспорта лизосомальных ферментов в лизосомы и секрецию их из всех исследо-

ванных клеток [38]. В то же время антитела к КЗР не ингибируют транспорт лизосомальных ферментов в клетках [14], за исключением клеток крысиной гепатомы Мориса, в которых отсутствует КНР [127]. Таким образом, создается впечатление, что главную роль в транспорте лизосомальных ферментов в нормальных условиях играют КНР, а КЗР имеют второстепенное значение и работают только в случае недостаточности КНР. Это, однако, лишь одно из предположений, не исключающее совместной работы обоих рецепторов в нормальных условиях.

Во-вторых, неясен вопрос о специфичности действия рецепторов, т. е. способности КНР и КЗР связываться с разными лизосомальными ферментами или транспортировать их в разные подклассы лизосом, вовлеченные в выполнение различных функций [64]. В-третьих, неясно, существует ли транспорт лизосомальных ферментов, не опосредованный маннозо-6-фосфатными рецепторами, или они абсолютно необходимы для этого транспорта. С одной стороны, многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о необходимости этих рецепторов [64, 89]. Так, например, недавно показано, что блокада обоих рецепторов с помощью специфических антител нарушает нормальный транспорт лизосомальных ферментов и приводит к их экзоцитозу [85, 114]. С другой стороны, известно, что при 1-клеточной болезни, когда нарушено образование маннозо-6-фосфатных радикалов на олигосахаридных цепях лизосомальных ферментов и, естественно, не происходит связывания с маннозо-6-фосфатными рецепторами, лизосомальные ферменты во многих клетках перестают нормально транспортироваться, но в клетках печени, почки, селезенки и мозга транспорт лизосомальных ферментов не нарушен, т. е. как будто бы происходит без участия маннозо-6-фосфатных рецепторов [129]. Эти вопросы — о специфичности действия маннозо-6-фосфатных рецепторов и о существовании иного пути транспорта лизосомальных ферментов — ждут своего разрешения.

Также не окончательно выяснено, где происходит связывание лизосомальных ферментов с рецепторами. Большинство исследователей считает, что это происходит в транс-отсеках аппарата Гольджи [39, 103, 130]. Однако существует мнение, что рецепторы локализируются в цис-отсеках [12]. Убедительные доказательства в пользу первой версии приведены недавно в работе [26], в которой показано, что комплекс рецептор — антитело, образующийся при обработке клеток антителами к КНР на поверхности клетки, перемещается затем именно в транс-отсеки, а не в другие структуры аппарата Гольджи.

Вне зависимости от места связывания на следующем этапе фермент-рецепторный комплекс выходит из аппарата Гольджи в везикулах, покрытых белком клатрином (так называемые окаймленные везикулы), которые были обнаружены в самых различных тканях [15, 69, 108, 119]. Основная масса (80—90 %) этих везикул участвует в образовании лизосом [47]. Некоторая их часть подвергается экзоцитозу, что ведет к секреции лизосомальных ферментов. Считается, что по крайней мере 10—15 % синтезированных de novo лизосомальных ферментов в норме секретируются,

а затем вновь захватывается путем эндоцитоза [47, 69, 122]. Эти данные подтверждаются наличием на плазматической мембране маннозо-6-фосфатных рецепторов, очевидно, попадающих туда в составе окаймленных везикул. Например, на плазматической мембране фибробластов находится около 9 % маннозо-6-фосфатных рецепторов клетки [10]. Интересно, что их содержание на поверхности клетки может регулироваться. Так, дексаметазон вызывает увеличение числа рецепторов на поверхности макрофагов, вероятно, за счет ускорения их синтеза, так как циклогексимид подавляет эффект дексаметазона [111].

#### Завершающие стадии биогенеза лизосомальных ферментов

Как указывалось выше, фермент-рецепторный комплекс стабилен в нейтральной среде и нестойк в кислой среде. При преобразовании окаймленных везикул в первичные лизосомы (об этом процессе будет сказано ниже), когда происходит снижение pH среды, фермент-рецепторный комплекс диссоциирует и освобожденный рецептор возвращается в аппарат Гольджи, чтобы участвовать в следующем цикле транспорта лизосомальных ферментов [43, 126]. Возможно, также перемещение рецептора на плазматическую мембрану [10] или деградация. Во всяком случае, рецептор удаляется из образующейся лизосомы и в зрелых лизосомах не обнаруживается (рис. 3) [14, 40, 130].

Что касается лизосомальных ферментов, освобождающихся при диссоциации фермент-рецепторного комплекса, то они еще нуждаются в дозревании путем ограниченного протеолиза [13, 68, 101]. Уже указывалось, что первая реакция ограниченного протеолиза с отщеплением сигнального пептида происходит вскоре после трансляции. При созревании лизосом происходит, таким образом, вторая реакция ограниченного протеолиза, приводящая к образованию зрелых лизосомальных ферментов. Эта стадия необходима для всех исследованных лизосомальных ферментов, кроме  $\beta$ -глюкоцереброзидазы [98, 109]. Для ряда ферментов — катепсина D, карбоксипептидазы V, эта реакция протеолиза необходима как способ

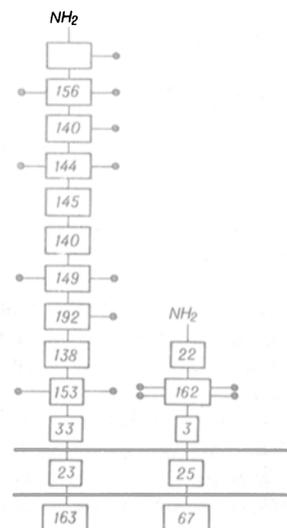


Рис. 3. Схема строения КНР и КЗР как трансмембранных гликопротеидов.

Цифрами обозначено количество аминокислотных остатков в доменах. Две параллельные линии — олигосахаридная цепь.

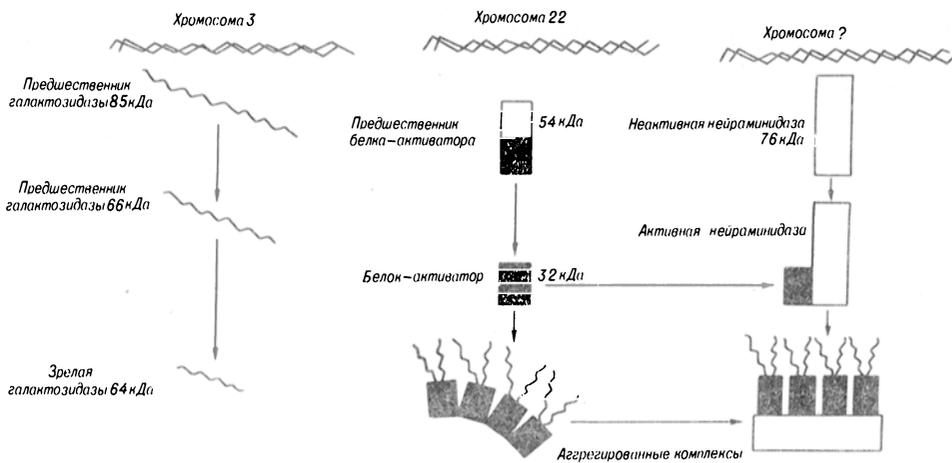


Рис. 4. Участие активаторного белка в агрегации  $\beta$ -галактозидазы и нейраминидазы.

Объяснение в тексте.

активации — превращения неактивного зимогена в активный фермент [51, 53]. В то же время другие ферменты активны уже до протеолиза, и для них смысл этой реакции не очень ясен [41]. Можно думать, что в этих случаях протеолиз способствует более правильной укладке ферментного белка и увеличивает его стабильность. Как правило, происходит отщепление олигопептида с N-конца фермента; лишь для  $\beta$ -глюкуронидазы и катепсина D показано отщепление пептида с C-конца [27, 74]. Во многих случаях внутрилизосомальный ограниченный протеолиз катализируется тиоловыми протеиназами.

Известно, что катепсин В, обладая дипептидилкарбоксипептидазной активностью, отщепляет от полипептидной цепи белков С-концевые фрагменты из 6—8 аминокислотных остатков [27, 62, 117]. Кроме того, тиоловым протеиназам, в частности катепсину В, может принадлежать существенная роль и в эндопротеолитических стадиях процессинга лизосомальных ферментов. Такой процесс обнаружен при созревании  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц  $\beta$ -гексозаминидазы [74, 78].

В качестве примера можно привести недавно изученный биогенез  $\alpha$ -цепи  $\beta$ -гексозаминидазы в фибробластах человека [74]. Синтезированный на рибосомах белок имеет мол. м. 65 кДа, затем после стадии гликозилирования образуется гликопротеин с мол. м. 67 кДа. В результате двух реакций ограниченного протеолиза образуется сначала промежуточная форма с мол. м. 56 кДа, а затем зрелая, с мол. м. 54 кДа. Первая стадия протеолиза протекает сразу после синтеза белка, а вторая — в лизосомах, причем уже до нее фермент функционально активен. Таким образом, по данным этих и других авторов [67, 69, 74, 118], окончательное созревание лизосомальных ферментов происходит в лизосомах. В то же время существуют данные, что в некоторых типах клеток (в частности, в лейкоцитах и макрофагах) созревание лизосомальных ферментов наблюдается до их попадания в лизосомы [86]. В настоящее время стало ясно, что место окончательного созревания ферментов зависит от выполняемых ими функций. Так, для большой группы лизосомальных протеиназ (катепсинов) заключительные стадии процессинга должны происходить в сформировавшейся первичной лизосоме (для предупреждения неконтролируемого неспецифического протеолиза собственных ферментов). Установлено, что активи-

зация катепсина D происходит в первичной лизосоме по механизму аутокатализа, характерному для аспарагиновых протеиназ [98, 109]. Превращение неактивных предшественников в активные катепсины В, Н и Л полностью подавляется пепстатином, но не блокируется соевым ингибитором трипсина и леуцитином. Это свидетельствует о том, что процессинг катепсинов В, Н и Л происходит под действием катепсина D [82—84]. Наконец, последней стадией биогенеза некоторых лизосомальных ферментов является их взаимодействие со специфическими внутрилизосомальными белками-активаторами. Такие активаторы обнаружены для цереброзидсульфатазы [30],  $\beta$ -гексозаминидазы А [20], арилсульфатазы А [110]. Хорошо изучена роль таких белков на примере активатора  $\beta$ -галактозидазы и нейраминидазы. Активатор — белок с мол. м. 32 кДа — во-первых, образует комплексы с  $\beta$ -галактозидазой, что приводит к превращению мономерной формы фермента (64 кДа) в мультимер с мол. м. 600—700 кДа [23, 59]. Это вызывает повышение активности и стабильности галактозидазы [58]. Во-вторых, активатор присоединяется к нейраминидазе, превращая ее из неактивной формы в активную [36]. В результате образуется высокоактивный и стабильный комплекс  $\beta$ -галактозидазы — активаторный белок — нейраминидаза (рис. 4).

Таким образом, биогенез лизосомальных ферментов, по современным представлениям, включает в себя две стадии ограниченного протеолиза, гликозилирование, фосфорилирование по остаткам маннозы и специфическую рецепцию, приводящую к транспорту ферментов в лизосомы.

#### Белки лизосомальной мембраны: строение, свойства и особенности биогенеза

Синтез, процессинг и транспорт специфических белков лизосомальной мембраны представляют собой вторую сторону биогенеза лизосом. Эти белки были выделены и изучены иммунохимическими методами в середине 80-х годов. Все они содержат в своем составе большое количество олигосахаридов, за что и получили название «лизосомальные гликопротеиды» (ЛГП) [7, 17, 18, 55, 70, 72, 73, 94]. Выделяя ЛГП из различных тканей, авторы присваивали им разные названия: LAMP-1 и 2 [17], Lgp 120 [70], gp 95—105 [72], LIMP-I, II и III [7], LEP 100 [29]. Вполне вероятно,

но, что несколько разных названий относятся к одному и тому же ЛГП. Так, четыре белка — LAMP-1, Lgr 120, gr 95—105 и LIMP-III близки по молекулярной массе, имеют одинаковые рI и могут оказаться идентичными по выполняемым функциям.

Сходство всех ЛГП заключается в том, что они имеют мол. м. белковой части 40—60 кДа и содержат большое количество N-связанных олигосахаридных цепей, так что общая мол. м. белков составляет 80—120 кДа. Функциями ЛГП в лизосомальной мембране, по современным представлениям, являются, во-первых, удержание кислых гидролаз внутри лизосомы, во-вторых, генерация и поддержание внутрилизосомального pH, в-третьих, транспорт продуктов гидролиза из лизосом и, наконец, в-четвертых, узнавание и специфическое слияние с другими органеллами клетки [61].

В качестве примера молекулярного строения ЛГП можно привести белок LEP 100, выделенный из мозга цыплят [29]. Белок состоит из 414 аминокислотных остатков. Его N-концевой участок (составляющий 75 % от всего размера молекулы) располагается внутри лизосомы и имеет 17 мест связывания олигосахаридных цепей. В толще лизосомальной мембраны располагается гидрофобный домен (24 аминокислотных остатка), и, наконец, в цитозоле находится C-концевой участок, имеющий 3 точки фосфорилирования. Таким образом, этот ЛГП представляет собой типичный интегральный белок, пронизывающий мембрану и имеющий различные функциональные участки в разных компартментах клетки.

Выделенные из клеток миелоидной лейкемии человека белки LAMP-1 и 2 имеют мол. м. около 120 кДа и состоят из 389 и 380 аминокислотных остатка соответственно. Внутрилизосомальный участок этих ЛГП (соответственно из 354 и 345 остатков) разделен на два аспарагинсодержащих домена, между которыми находится богатый пролином фрагмент из 22 остатков. Эти участки у LAMP-1 и 2 несут соответственно 19 и 16 мест связывания олигосахаридных цепей. Мембранный гидрофобный домен построен из 24 аминокислотных остатков, а цитозольный C-концевой участок — из 11 остатков [31]. Таким образом, сравнение молекулярной структуры LEP 100 птиц и LAMP-1 и 2 человека указывает на их близкое родство. Человеческие LAMP-1 и 2 также близки LAMP-1 и 2 мышей [16].

Особую роль в структуре и функциях ЛГП играют олигосахаридные цепи, составляющие 50—70 % от общей молекулярной массы гликопротеида и находящиеся исключительно на внутрилизосомальном участке ЛГП. Эти цепи у исследованных ЛГП имеют, как правило, 4-антенную структуру, причем одна из ветвей может быть представлена полиманнозной цепью, а другие — сложной гетерополисахаридной цепью, содержащей остатки галактозы, галактозамина и сиаловых кислот [61]. Степень сиализации молекул ЛГП может быть различной. При изоэлектрическом фокусировании LAMP-1 было обнаружено наличие множественных форм этого ЛГП с изоэлектрическими точками от 4,0 до 7,0. После обработки нейраминидазой происходило объединение этих изоформ в одну, имеющую рI 8,5 [18]. Изучая строение трех ЛГП (LIMP-I, II и III) J. Barrio-

сana и соавт. [7] обнаружили, что LIMP-I содержит только гетерополисахаридные цепи, а LIMP-II и III, кроме них, — еще и полиманнозные цепи. Количество N-связанных олигосахаридных цепей обычно составляет 16—18 на молекулу ЛГП [16].

Благодаря этим цепям ЛГП имеют выраженные кислотные свойства (рI 2—4) [70]. Большой отрицательный заряд на внутрилизосомальных участках ЛГП, вероятно, защищает их от разрушения лизосомальными ферментами и способствует поддержанию внутрилизосомального pH [61, 107]. Защитная роль олигосахаридных цепей подтверждена исследованиями, в которых показано, что ЛГП, синтезированные в присутствии антибиотика туникамицина, блокирующего процесс гликозилирования, имеют меньшее время полужизни [7].

Биосинтез ЛГП изучен слабее, чем биосинтез лизосомальных ферментов, но ясно, что они также синтезируются на полисомах шероховатого ЭПР. Поэтому, вероятно, первые этапы их модификации и транспорта аналогичны таковым для лизосомальных ферментов, секреторных белков и белков плазматической мембраны. Сразу после синтеза их N-концевой сигнальный пептид связывается с узнающим рибонуклеопротеидом для транспорта через мембрану ЭПР, а затем отщепляется [29].

В люменах ЭПР происходит гликозилирование ЛГП по остаткам аспарагина, причем так же, как и у лизосомальных ферментов, олигосахаридные цепи присоединяются N-гликозидной, но не O-гликозидной связью [7]. Однако неясно, является ли источником углеводной цепи долипирофосфат-олигосахарид или какое-либо другое соединение. Окончательное созревание ЛГП происходит в транс-отсеках комплекса Гольджи. Здесь локализуются  $\beta$ -галактозилтрансфераза и сиалилтрансфераза, которые катализируют перенос на олигосахаридную цепь ЛГП соответственно остатков галактозы и ацетилнейраминовой кислоты [8, 102].

Карбоксильный ионофор монензин, блокирующий созревание Asn-связанных олигосахаридов в аппарате Гольджи [77, 116], и  $\beta$ -D-ксилозид, блокирующий синтез ксилозо-связанных олигосахаридов [37], резко изменяют свойства синтезированных LAMP-1, подтверждая роль этих процессов в биогенезе ЛГП [18].

Из транс-отсеков ЛГП в окаймленных или неокймленных везикулах транспортируются в лизосомы, причем транспорт происходит достаточно быстро ( $t_{1/2} < 1$  ч) [44]. Механизм рецепции ЛГП неизвестен, но доказано, что она происходит без участия маннозо-6-фосфатных рецепторов [45]. Более того, оказалось, что ЛГП, синтезированные в присутствии туникамицина и лишённые углеводных компонентов, нормально транспортируются в лизосомы [7]. Это свидетельствует о том, что полисахаридные цепи не участвуют в рецепции ЛГП.

Финальным этапом биогенеза лизосом является объединение всех лизосомальных ферментов, ЛГП и других компонентов белковой и липидной природы в единую структуру — первичную лизосому. Где и как происходит встреча лизосомальных ферментов и ЛГП, неизвестно. По-видимому, существуют две возможности: объединение этих компонентов еще в транс-отсеках комплекса

Гольджи и выход их из комплекса Гольджи в общей окаймленной везикуле, превращающейся в первичную лизосому; выход лизосомальных ферментов и ЛГП в различных везикулах с последующим их соединением. Убедительных экспериментальных доказательств в пользу той или иной гипотезы в настоящее время не существует.

#### *Нарушения биогенеза лизосомальных белков в этиологии и патогенезе заболеваний человека*

Изучение биогенеза лизосом позволит углубить представления о развитии ряда врожденных и приобретенных заболеваний человека. В первую очередь это касается группы лизосомальных болезней, при которых вследствие генетических дефектов резко снижается активность одного или нескольких лизосомальных ферментов и происходит отложение в лизосомах негидролизованых органических веществ. В настоящее время становится ясно, что не только дефекты в системе оперона и структурного гена, кодирующего определенный лизосомальный фермент, но и различные мутации, затрагивающие этапы трансляции, транспорта и процессинга лизосомальных ферментов, могут вести к развитию лизосомальной болезни [3, 64, 127]. Вероятно, именно с этим явлением связано разнообразие клинического течения каждой лизосомальной болезни.

В 1984 г. K. von Figura и соавт. [123] предложили схему классификации лизосомальных болезней по характеру нарушения этапов биогенеза лизосом. По этой классификации выделяют следующие группы болезней: 1) при которых повреждена система оперона или структурного гена не синтезируется лизосомальный фермент; 2) синтезируется каталитически неактивный белок вследствие мутации структурного гена; 3) вследствие нарушения транспорта лизосомальных ферментов активный лизосомальный фермент не попадает в лизосомы; 4) лизосомальный фермент нестабилен и быстро разрушается в прелизосоме или лизосоме; 5) отсутствует белок-активатор вследствие нарушения в кодирующем его гене. Во всех этих случаях будут наблюдаться врожденные лизосомные болезни накопления. В 6-ю группу отнесены приобретенные болезни, при которых дефект лизосомальных ферментов связан с интоксикацией организма ингибиторами лизосомальных ферментов или веществами, нарушающими биогенез лизосом.

В плане данного обзора представляют интерес заболевания, относящиеся к 3, 4 и 5-й группам по этой классификации, т. е. заболевания, при которых нарушены транспорт, рецепция или модификация лизосомальных ферментов. Наиболее известные заболевания, относящиеся к 3-й группе, — это мукополипидоз II (I-клеточная болезнь) и мукополипидоз III (псевдополидистрофия Гурлер), представляющие собой типичные болезни накопления с образованием в цитоплазме клеток вакуолей, заполненных фрагментами мембран и веществами гликозаминопротеогликановой и гликолипидной природы [3]. В клетках резко (на 70—95 %) снижена активность многих лизосомальных ферментов [90, 127], но связано это не с уменьшением их синтеза *de novo*, а с тем, что синтезированные ферменты не транспортируются в

лизосомы, а секретируются из клетки. Соответственно, характерным проявлением этих заболеваний является увеличение активности лизосомальных ферментов в тканевой жидкости, лимфе и крови [25, 54]. В начале 80-х годов было выяснено, что причиной этих заболеваний является уменьшение (при мукополипидозе III) или отсутствие (при мукополипидозе II) активности N-АГФТ [43, 50, 98]. Это приводит к тому, что лизосомальные ферменты не фосфорилируются и как следствие не взаимодействуют с маннозо-6-фосфатными рецепторами и не транспортируются в лизосому [52]. Различия клинического течения мукополипидозов II и III связаны с различной степенью нарушения транспорта лизосомальных ферментов.

Нарушение фосфорилирования может происходить также в тех случаях, когда N-АГФТ перестает узнавать сигнальный домен в молекуле лизосомального фермента вследствие изменения его структуры. Соответственно нарушается транспорт данного конкретного фермента. Это явление в ряде случаев обнаружено, в частности, при мукополипидозе III. Оно также описано при одной из форм GM<sub>1</sub>-ганглиозидоза, при которой подавляются процессинг и фосфорилирование β-галактозидазы и нефосфорилированный фермент выводится из клетки [36, 60], и при одной из форм гликогеноза II типа (болезнь Помпе), когда наблюдается накопление нефосфорилированного предшественника α-глюкозидазы [99].

Теоретически сходная клиническая картина должна наблюдаться при снижении активности α-N-АГ или при полном отсутствии в клетках маннозо-6-фосфатных рецепторов. Действительно, выявлен дефицит α-N-АГ у 5 членов одной семьи, имеющих аномально высокий уровень активности лизосомальных ферментов в плазме. Было установлено, что пациенты являлись гетерозиготными по дефектному гену α-N-АГ и поэтому не имели выраженных клинических нарушений. Авторы считают, что у пациентов, гомозиготных по этой мутации, будет наблюдаться клиническая картина мукополипидоза II/III [6].

Заболевания, связанные с отсутствием маннозо-6-фосфатных рецепторов, у человека не описаны (как указано выше, такие мутации наблюдаются у крыс и мышей).

Нарушение транспорта лизосомальных ферментов может быть также связано с уменьшением их растворимости. Так, при одном из вариантов болезни Тея — Сакса в клетках накапливается малорастворимый предшественник α-цепи β-гесозаминидазы, неспособный транспортироваться в лизосомы [92].

Особая группа лизосомальных болезней (4-я группа по приведенной классификации) связана со снижением стабильности лизосомальных ферментов, вероятно, вследствие нарушения их структуры. К ним, в частности, относится один из вариантов метахроматической лейкодистрофии, причиной которого является быстрая дегградация активной арилсульфатазы А в лизосомах под действием тиоловых протеиназ. Доказательства того, что заболевание связано именно с уменьшением стабильности, но не активности синтезирующейся арилсульфатазы А, получены в экспериментах с ингибиторами тиоловых протеиназ. Об-

работка фибробластов от больных метахроматической лейкоцисторфией этими ингибиторами предупреждает деградацию арилсульфатазы А и восстанавливает способность клеток расщеплять цереброзидсульфат [126].

При одной из форм болезни Фабри в лизосомах фибробластов происходит быстрое разрушение  $\alpha$ -галактозидазы и ее остаточная активность составляет 2% от нормальной. Ингибиторы тиоловых протеиназ не оказывают в данном случае защитного влияния, что свидетельствует о вовлеченности в деградацию фермента других групп протеиназ [69].

Конкретные причины уменьшения стабильности активных лизосомальных ферментов при этих заболеваниях неизвестны. Вероятно, они связаны с нарушением гликозилирования или другими видами модификации ферментов, не приводящими к уменьшению активности и транспорта их в лизосомы.

Как отмечалось выше, ряд лизосомальных гидролаз требует специальной стадии активации или наличия специфического внутрилизосомального активатора. Соответственно некоторые формы лизосомальных болезней (5-я группа) могут быть связаны с нарушением этой стадии. При АВ-варианте  $GM_2$ -ганглиозидоза наблюдается дефицит активатора  $\beta$ -гексозаминидазы [20]. При одном из вариантов метахроматической лейкоцисторфии обнаружен дефицит активатора арилсульфатазы А [110]. При галактосиалидозе причиной заболевания может быть дефицит белка, активирующего и агрегирующего  $\beta$ -галактозидазу [23, 59]. Добавление в этих случаях в культуру клеток белков-активаторов способствует увеличению ферментативной активности и коррекции метаболических сдвигов в пораженных клетках [58].

Таким образом, анализ имеющихся в настоящее время данных позволяет сделать вывод, что любое нарушение биогенеза лизосомальных ферментов на стадии посттрансляционной модификации, рецепции, транспорта или активации может приводить к уменьшению их активности в лизосомах и развитию лизосомных болезней накопления. Хотя частота встречаемости этих нарушений пока неизвестна, можно предполагать, что они являются причиной значительного числа случаев лизосомных болезней, конкурируя в этом плане с дефектами структурных генов.

Значительно менее ясен вопрос, возможны ли нарушения биогенеза второй основной группы лизосомальных белков — ЛГП. Фактически в литературе нет ни одного четкого описания подобных случаев у человека и животных. Тем не менее, учитывая, что одной из основных функций ЛГП является транспорт низкомолекулярных продуктов гидролиза из лизосом в цитозоль, можно предполагать, что дефекты ЛГП лежат в основе патогенеза особой группы лизосомных болезней накопления, причиной которых является нарушение транспорта веществ через лизосомальную мембрану. К таким болезням относятся цистиноз, при котором в результате нарушения системы транспорта происходит накопление цистина в лизосомах клеток печени, почек, селезенки, кишечника и других тканей [33—35], и болезнь Салла, при которой нарушен транспорт ацетилнейраминной кислоты и происходит накопление ее в лизосомах [34, 95]. Известно также заболевание,

проявляющееся накоплением витамина  $B_{12}$  вследствие нарушения его транспорта из лизосом в цитозоль [100].

В настоящее время нет убедительных данных о связи между этими заболеваниями и дефектами определенных ЛГП, однако темпы изучения структуры и биогенеза белков лизосомальной мембраны дают основания надеяться на их скорое появление. Представляется весьма вероятным, что экспериментальное подтверждение этой гипотезы позволит дополнить классификацию лизосомальных болезней [123] выделением таких заболеваний в особый 7-й класс — болезни, вызванные нарушением биогенеза ЛГП.

Отдельной большой проблемой является изучение роли нарушений биогенеза лизосом в развитии приобретенных заболеваний человека, особенно сердечно-сосудистых и онкологических. В частности, не вызывает сомнения роль лизосомального компонента в патогенезе атеросклероза. При этом заболевании обнаружено уменьшение активности лизосомальных ферментов в клетках эндотелия аорты, гладкомышечных клетках интимы, изменение активности ферментов в тромбоцитах и нейтрофилах, увеличение секреции лизосомальных гидролаз макрофагами [1, 2, 19, 22, 48, 75].

Последний феномен представляет наибольший интерес, так как усиление секреции лизосомальных ферментов является характерным проявлением нарушения их биогенеза. Развивающееся при атеросклерозе уменьшение активности лизосомальных протеиназ, фосфолипаз и холестерол-эстеразы в клетках интимы артерий, происходящее на фоне значительного увеличения эндоцитоза специфических субстратов (липопротеидов низкой плотности — ЛПНП), также может быть связано с нарушением биогенеза лизосом. Поскольку снижение скорости катаболизма ЛПНП в интимацитах является ключевым звеном в процессе трансформации их в пенстые клетки, изучение биогенеза лизосомальных ферментов в этих клетках представляется весьма актуальным.

То же относится к изучению биогенеза лизосом в опухолевых клетках. В ряде работ показано, что клетки злокачественных опухолей секретируют лизосомальные ферменты:  $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидазу, гексозаминидазу [81, 112], катепсин В [80, 91, 95, 112], коллагеназу [71, 93] и с их помощью разрушают внеклеточный матрикс, что позволяет им инвазировать в окружающие ткани и пенетрировать эндотелиальные мембраны. По-видимому, это увеличение секреции лизосомальных ферментов может быть связано с возникающими при озлокачествлении опухолевых клеток нарушениями их биогенеза на стадии гликозилирования, рецепции или направленного транспорта в лизосомы. Экспериментальные данные, подтверждающие или опровергающие эту гипотезу, в настоящее время отсутствуют.

Расшифровка молекулярных механизмов биогенеза лизосомальных белков является крупным теоретическим достижением современной биохимии и цитологии. Появилась возможность детально проследить судьбу этих белков от момента рождения (трансляции) до момента смерти (тотальный протеолиз). Открыта специализированная, точно организованная система, обеспечиваю-

щая направленный транспорт лизосомальных ферментов. Заложены основы для дальнейшего изучения регуляции активности лизосомальных ферментов и функции лизосомальной мембраны.

В практическом отношении благодаря этим работам была раскрыта этиология таких заболеваний, как мукополипидоз II и псевдополидиострофия Гурлер. Была убедительно показана полиэтиологическая природа многих лизосомальных болезней.

При этом по-прежнему наиболее изученными остаются дефекты лизосомальных гликозидаз вследствие значительной распространенности мукополипидозов. В то же время практически неизвестны заболевания, связанные с нарушением синтеза, процессинга и транспорта такой важной группы ферментов, как протеиназы. Поскольку полное отсутствие в геноме животных и человека соответствующих мутаций представляется маловероятным, можно предполагать, что нарушение биогенеза лизосомальных протеиназ вызывает гибель организма на ранней эмбриональной стадии и поэтому клинически не проявляется. Вероятно, открытие этих энзимологических дефектов будет связано с развитием методов ранней пренатальной диагностики.

Широкие перспективы будут, несомненно, связаны с детальным изучением биогенеза ферментов, катализирующих гидролиз липопротеидов, — кислых фосфолипаз, холестеролэстеразы, катепсинов. Выявление врожденных и приобретенных нарушений синтеза, процессинга и транспорта этих лизосомальных гидролаз позволит значительно углубить наши представления о патогенезе гиперлипидемических состояний, атеросклероза и ишемической болезни.

Практическая значимость этих фундаментальных биохимических исследований будет по-настоящему оценена тогда, когда с помощью методов генной инженерии и заместительной терапии появится реальная возможность корректировать дефекты лизосом при врожденных и приобретенных заболеваниях. Такому лечению должно обязательно предшествовать точное выявление нарушенного этапа биогенеза лизосом для направленного терапевтического воздействия. Таким образом, истинная оценка практической значимости данной проблемы еще впереди.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Васильев А. В., Шимановская Н. П., Погожева А. В. и др. // *Вопр. питания.*—1988.— № 1.— С. 25—28.
2. Васильев А. В., Ли Ха Рен, Орехов А. Н. и др. // *Вопр. мед. химии.*—1989.— № 4.— С. 124—127.
3. Видершайн Б. Я. Биохимические основы гликозидов.— М., 1980.
4. Видершайн Г. Я. // *Вопр. мед. химии.*—1987.— № 5.— С. 24—33.
5. Покровский А. А., Тутельян В. А. Лизосомы.— М., 1976.
6. Alexander D., Deeb M., Talj F. // *Hum. Genet.*—1986.— Vol. 73.— P. 53—59.
7. Barriocanal J. G., Bonifacino J. S., Yuan L., Sandoval I. V. // *J. biol. Chem.*—1986.— Vol. 261.— P. 16755—16763.
8. Berger E. G., Hesford F. G. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.*—1985.— Vol. 82.— P. 4736—4739.
9. Bischoff J., Kornfeld R. // *J. biol. Chem.*—1983.— Vol. 258.— P. 7907—7910.
10. Braulke T., Gartung G., Hasilik A., von Figura K. // *J. Cell. Biol.*—1987.— Vol. 104.— P. 1735—1742.
11. Broquist H. P. // *Ann. Rev. Nutr.*—1985.— Vol. 5.— P. 391—409.
12. Brown W. J., Farquhar M. G. // *Cell.*—1984.— Vol. 36.— P. 295—307.
13. Brown J. A., Novak E. K., Swank R. T. // *J. Cell. Biol.*—1985.— Vol. 100.— P. 1894—1904.
14. Brown W. J., Goodhouse J., Farquhar M. G. // *Ibid.*—1986.— Vol. 103.— P. 1235—1247.
15. Campbell C. H., Rome L. H. // *J. biol. Chem.*—1983.— Vol. 258.— P. 13347—13352.
16. Carlsson S. R., Roth J., Piller F., Fukudo M. // *Ibid.*—1988.— Vol. 263.— P. 18911—18919.
17. Chen J. W., Murphy T., Willingham M. C. et al. // *J. Cell Biol.*—1985.— Vol. 101.— P. 85—95.
18. Chen J. W., Pan W., D'Sousa M. P., August J. Th. // *Arch. Biochem.*—1985.— Vol. 239.— P. 574—586.
19. Coates P. M., Langer T., Cortner J. A. // *Atherosclerosis.*—1986.— Vol. 62.— P. 11—20.
20. Conzelmann E., Sandhoff K. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.*—1978.— Vol. 75.— P. 3979—3983.
21. Dahms N. M., Lobel P., Breitmeyer J. et al. // *Cell.*—1987.— Vol. 50.— P. 181—192.
22. Daoud A. S., Fritz K. E., Jarmolych J., Frank A. S. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*—1985.— Vol. 454.— P. 101—114.
23. D'Azco A., Hoogeveen A., Robinson D., Galjaard H. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.*—1982.— Vol. 79.— P. 4535—4539.
24. De Duve C., Pressman B. C., Giabetto R. et al. // *Biochem. J.*—1955.— Vol. 60.— P. 604—617.
25. Den Tandt W. R., Lassila E., Phillipart M. // *J. Lab. clin. Med.*—1974.— Vol. 83.— P. 403—408.
26. Duncan J. R., Kornfeld S. // *J. Cell Biol.*—1988.— Vol. 106.— P. 617—628.
27. Erickson A. H., Blobel G. // *Biochemistry (Wash.).*—1983.— Vol. 22.— P. 5201—5205.
28. Erickson A. H., Walter P., Blobel G. // *Biochem. biophys. Res. Commun.*—1983.— Vol. 115.— P. 275—280.
29. Fambrough D. M., Taceyasu K., Lippincott-Schwarz J., Siegel N. R. // *J. Cell Biol.*—1988.— Vol. 106, N 1.— P. 61—67.
30. Fischer G., Jatzkewitz H. // *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.*—1975.— Bd 356.— S. 605—613.
31. Fukuda M., Vitala J., Matteson J., Carlsson S. R. // *J. biol. Chem.*—1988.— Vol. 263.— P. 18920—18928.
32. Gabel C. A., Goldberg D. E., Kornfeld S. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.*—1983.— Vol. 80.— P. 775—779.
33. Gahl W. A. // *Advanc. Pediat.*—1986.— Vol. 33.— P. 95—126.
34. Gahl W. A. // *Enzyme.*—1987.— Vol. 38.— P. 154—160.
35. Gahl W. A., Bashan N., Tietze F. et al. // *Science.*—1982.— Vol. 217.— P. 1263—1265.
36. Galjaard H., Willemsen R., Hoogeveen A. T. et al. // *Enzyme.*—1987.— Vol. 38.— P. 132—143.
37. Galligani L., Hopwood J., Schwartz N. B. // *J. biol. Chem.*—1975.— Vol. 250.— P. 5400—5406.
38. Gartung C., Braulke T., Hasilik A., von Figura K. // *Europ. molec. Biol. Org. J.*—1985.— Vol. 4.— P. 1725—1730.
39. Geuze H. J., Slot J. W., Strous G. J. et al. // *J. Cell Biol.*—1984.— Vol. 98.— P. 2047—2054.
40. Geuze H. J., Slot J. W., Strous J. A. M. et al. // *Ibid.*—1985.— Vol. 101.— P. 2253—2262.
41. Gieselmann V., Pohlmann R., Hasilik A., von Figura K. // *Ibid.*—1983.— Vol. 97.— P. 1—5.
42. Goldberg D. E., Kornfeld S. // *J. biol. Chem.*—1983.— Vol. 258.— P. 3159—3165.
43. Gonzalez-Noriega A., Grubb J. H., Talkad V., Sly W. S. // *J. Cell Biol.*—1980.— Vol. 85.— P. 839—852.
44. Green S. A., Zimmer K.-P., Griffiths G., Mellman J. // *Ibid.*—1987.— Vol. 105.— P. 1227—1240.
45. Griffiths G., Pfeiffer S., Simons K., Matlin K. // *Ibid.*—1985.— Vol. 101.— P. 949—964.
46. Griffiths G., Simmons K. // *Science.*—1986.— Vol. 234.— P. 438—443.
47. Griffiths G., Hoflack B., Simons K. et al. // *Cell.*—1988.— Vol. 52.— P. 329—341.
48. Hartung H.—P., Kladezky R. G., Hennerici M. // *FEBS Lett.*—1985.— Vol. 186.— P. 211—214.
49. Hasilik A., Klein U., Waheed A. et al. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.*—1980.— Vol. 77.— P. 7074—7078.
50. Hasilik A., Waheed A., von Figura K. // *Biochem. biophys. Res. Commun.*—1981.— Vol. 98.— P. 761—767.
51. Hasilik A., von Figura K., Conzelmann E. et al. // *Europ. J. Biochem.*—1982.— Vol. 125.— P. 317—321.

52. *Hasilik A., Waheed A., Gantz M., von Figura K.* // *Ibid.*—Vol. 122.—P. 119—123.
53. *Hemmings B. A., Zubenco G. S., Hasilik A., Jones E. W.* // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.*—1981.—Vol. 78.—P. 435—439.
54. *Herd J. K., Dvorak A. D., Willtze H. E.* et al. // *Amer. J. Dis. Child.*—1978.—Vol. 132.—P. 1181—1186.
55. *Ho M.-K., Springer T. A.* // *J. biol. Chem.*—1983.—Vol. 258.—P. 636—642.
56. *Hoflack B., Kornfeld S.* // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.*—1985.—Vol. 82.—P. 4128—4432.
57. *Hoflack B., Kornfeld S.* // *J. biol. Chem.*—1985.—Vol. 266.—P. 12008—12014.
58. *Hoogeveen A., D'Azzo A., Brossmer R., Galjaard H.* // *Biochem. biophys. Res. Commun.*—1981.—Vol. 103.—P. 292—300.
59. *Hoogeveen A. T., Verheijen F. W., Galjaard H.* // *J. biol. Chem.*—1983.—Vol. 258.—P. 12143—12146.
60. *Hoogeveen A. T., Reuser A. J. J., Kroos M., Galjaard H.* // *Ibid.*—1986.—Vol. 261.—P. 5702—5704.
61. *Howe C. L., Granger B. L., Hull M.* et al. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.*—1988.—Vol. 85.—P. 7577—7581.
62. *Ishidon K., Imajoh S., Emori Y.* et al. // *FEBS Lett.*—1987.—Vol. 226.—P. 69.
63. *Kaplan A., Achord D. T., Sly W. S.* // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.*—1977.—Vol. 74.—P. 2026—2030.
64. *Kornfeld S.* // *J. clin. Invest.*—1986.—Vol. 77.—P. 1—6.
65. *Kornfeld R., Kornfeld S.* // *Ann. Rev. Biochem.*—1985.—Vol. 54.—P. 631—664.
66. *Lang L., Reitman M., Tang J.* et al. // *J. biol. Chem.*—1984.—Vol. 259.—P. 14663—14671.
67. *Lemansky P., Gieselmann V., Hasilik A., von Figura K.* // *Ibid.*—P. 129—135.
68. *Lemansky P., Gieselmann V., Hasilik A.* et al. // *Ibid.*—1985.—Vol. 260.—P. 9023—9030.
69. *Lemansky P., Hasilik A., von Figura K.* et al. // *J. Cell Biol.*—1987.—Vol. 104.—P. 1743—1748.
70. *Lewis V.* // *Ibid.*—1985.—Vol. 100.—P. 1839—1847.
71. *Liotta L. A., Thorgeirsson U. P., Garbisa S.* // *Cancer Metastas. Rev.*—1982.—Vol. 1.—P. 277—288.
72. *Lippincott-Schwartz J., Fambrough D. M.* // *J. Cell Biol.*—1986.—Vol. 102.—P. 1593—1605.
73. *Lippincott-Schwartz J., Fambrough D. M.* // *Cell.*—1987.—Vol. 49.—P. 669—677.
74. *Little L. E., Lau M. M. H., Quon D. V. K.* et al. // *J. biol. Chem.*—1988.—Vol. 263.—P. 4288—4292.
75. *Loida Z., Ruzickova M., Havrankova E., Synkova V.* // *Histochem. J.*—1984.—Vol. 16.—P. 399—405.
76. *MacDonald R. G., Pfeiffer S. R., Coussens L.* et al. // *Science.*—1988.—Vol. 239.—P. 1134—1137.
77. *Machamer C. E., Cresswell P.* // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.*—1984.—Vol. 81.—P. 1287—1291.
78. *Mahuran D., Neote K., Klavins M.* et al. // *J. biol. Chem.*—1988.—Vol. 263.—P. 4612.
79. *Morgan D. O., Edman J. C., Strandberg D.* et al. // *Nature.*—1987.—Vol. 329.—P. 301—307.
80. *Mort J. S., Leduc M., Recklies A. D.* // *Biochim. biophys. Acta.*—1981.—Vol. 662.—P. 173—180.
81. *Niedbala M. J., Madiyalakan R., Malta K.* et al. // *Cancer Res.*—1987.—Vol. 47.—P. 4634—4641.
82. *Nishimura Y., Kato K.* // *Arch. Biochem.*—1989.—Vol. 260.—P. 712—718.
83. *Nishimura Y., Kato K.* // *Ibid.*—1989.—Vol. 261.—P. 64—71.
84. *Nishimura Y., Kato K.* // *Ibid.*—1989.—Vol. 263.—P. 107—117.
85. *Nolan C. M., Creek K. E., Grubb J. H., Sly W. S.* // *J. Cell. Biochem.*—1987.—Vol. 35.—P. 137—151.
86. *Olsen I., Abraham D., Shelton I.* et al. // *Biochim. biophys. Acta.*—1988.—Vol. 968.—P. 312—322.
87. *Oshima A., Nolan C. M., Kyle J. W.* et al. // *J. biol. Chem.*—1988.—Vol. 263.—P. 2553—2562.
88. *Pannerselvann K., Ramamoorthy S., Balasubrananian A. S.* // *Biochem. biophys. Res. Commun.*—1987.—Vol. 147.—P. 927—935.
89. *Pfeiffer S. R.* // *J. Membr. Biol.*—1988.—Vol. 103.—P. 7—16.
90. *Pittman R. C., Williams J. C., Miller L. A., Steinberg D.* // *Biochim. biophys. Acta.*—1979.—Vol. 575.—P. 399—409.
91. *Pohlmann R., Nagel G., Schmidt B.* et al. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.*—1987.—Vol. 84.—P. 5575—5579.
92. *Proia R., Neufeld E. F.* // *Ibid.*—1982.—Vol. 79.—P. 6360—6364.
93. *Recklies A. D., Tillman K. J., Stoker T., Poole A. R.* // *Cancer Res.*—1980.—Vol. 40.—P. 550—556.
94. *Reggio H., Bainton D., Harms E.* et al. // *J. Cell Biol.*—1984.—Vol. 99.—P. 1511—1526.
95. *Rehlund M., Tietze F., Gahl W. A.* // *Science.*—1986.—Vol. 232.—P. 759—762.
96. *Reitman M. L., Kornfeld S.* // *J. biol. Chem.*—1981.—Vol. 256.—P. 4275—4281.
97. *Reitman M. L., Kornfeld S.* // *Ibid.*—P. 11977—11980.
98. *Reitman M. L., Varki A., Kornfeld S.* // *J. clin. Invest.*—1981.—Vol. 67.—P. 1574—1579.
99. *Reuser A. J. J., Kroos M., Oude-Elferink R. P. J., Tager J. M.* // *J. biol. Chem.*—1985.—Vol. 260.—P. 8336—8341.
100. *Rosenblatt D. S., Hosak A., Maliaszuk B.* et al. // *Science.*—1985.—Vol. 228.—P. 1319—1321.
101. *Rosenfeld M. G., Kreibich G., Popov D.* et al. // *J. Cell Biol.*—1982.—Vol. 93.—P. 135—143.
102. *Roth J., Berger E. G.* // *Ibid.*—P. 223—229.
103. *Sahagian G. G.* // *Biol. Cell.*—1984.—Vol. 51.—P. 207—214.
104. *Sahagian G. G., Distler J., Jourdan G. W.* // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.*—1981.—Vol. 78.—P. 4289—4293.
105. *Sahagian G. G., Neufeld E. F.* // *J. biol. Chem.*—1983.—Vol. 258.—P. 7121—7128.
106. *Sahagian G. G., Steer C. J.* // *Ibid.*—1985.—Vol. 260.—P. 9838—9842.
107. *Schauer R., Wember M., Tschesche H.* // *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*—1984.—Bd 365.—S. 419—426.
108. *Schulze-Lohoff E., Hasilik A., von Figura K.* // *J. Cell Biol.*—1985.—Vol. 101.—P. 824—829.
109. *Scudlarek M. D., Novak E., Swank R. T.* // *Lysosomes in Biology and Pathology*/Ed J. Dingle et al.—Amsterdam, 1984.—Vol. 7.—P. 17—34.
110. *Shapiro L. J., Aleck K. A., Kaback M. M., Ytabashi H.* // *Pediat. Res.*—1979.—Vol. 13.—P. 1179—1181.
111. *Shepherd V. L., Konish M. G., Stahl P.* // *J. biol. Chem.*—1985.—Vol. 260.—P. 160—164.
112. *Sloane B. F., Rozhin J., Johnson K.* et al. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.*—1986.—Vol. 83.—P. 2483—2487.
113. *Sly W. S., Fischer H. D.* // *J. Cell Biochem.*—1982.—Vol. 18.—P. 67—85.
114. *Stein M., Braulke T., Krentler C.* et al. // *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.*—1987.—Vol. 368.—P. 927.
115. *Steiner A. W., Rome L. H.* // *Arch. Biochem.*—1982.—Vol. 214.—P. 681—687.
116. *Tartakoff A. M.* // *Cell.*—1983.—Vol. 32.—P. 1026—1028.
117. *Troen B. R., Gal S. S., Gottesman M. M.* // *Biochem. J.*—1987.—Vol. 246.—P. 731.
118. *Tropea J. E., Swank R. T., Segal H. I.* // *J. biol. Chem.*—1988.—Vol. 263.—P. 4309—4317.
119. *Tümmers S., Zühlendorf M., Robenek H.* et al. // *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*—1983.—Bd 364.—S. 1287—1295.
120. *Varki A., Kornfeld S.* // *J. biol. Chem.*—1980.—Vol. 255.—P. 10847—10858.
121. *Varki A., Kornfeld S.* // *Ibid.*—1981.—Vol. 256.—P. 9937—9943.
122. *Vladuliu G. D., Rattazzi M. C.* // *J. clin. Invest.*—1979.—Vol. 63.—P. 595—601.
123. *von Figura K., Hasilik A., Steckel F.* // *Molecular Basis of Lysosomal Storage Disorders*/Ed J. A. Barranger, R. O. Brady.—New York, 1984.—P. 133—146.
124. *von Figura K., Gieselmann V., Hasilik A.* // *Biochem. J.*—1985.—Vol. 255.—P. 543—547.
125. *von Figura K., Hasilik A.* // *Ann. Rev. Biochem.*—1986.—Vol. 55.—P. 167—193.
126. *von Figura K., Steckel F., Conary J.* et al. // *Amer. J. hum. Genet.*—1986.—Vol. 39.—P. 371—382.
127. *von Figura K., Hasilik A., Pohlmann R.* et al. // *Enzyme.*—1987.—Vol. 38.—P. 144—153.
128. *Waheed A., Hasilik A., von Figura K.* // *J. biol. Chem.*—1982.—Vol. 257.—P. 12322—12331.
129. *Waheed A., Pohlmann R., Hasilik A.* et al. // *Biochem. biophys. Res. Commun.*—1982.—Vol. 105.—P. 1052—1058.
130. *Willingham M. C., Pastan I., Sahagian G. G.* et al. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.*—1981.—Vol. 78.—P. 1104—1108.

С. А. Сторожок, С. В. Соловьев

**СТРУКТУРНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЦИТОСКЕЛЕТА МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТА**

Тюменский медицинский институт

Эритроцит представляет собой наиболее изученный в настоящее время клеточный объект, который, однако, по-прежнему остается предметом пристального внимания исследователей. Весьма интересной морфофункциональной структурой является цитоскелет мембраны эритроцита, который, как считают, ответствен за обеспечение двояковогнутой формы эритроцита и его реологические свойства [23]. Цитоскелет эритроцитарной мембраны — это прочная, эластичная белковая сеть, локализованная на внутренней поверхности липидного бислоя цитоплазматической мембраны эритроцита [20, 31].

Разделение белков мембраны эритроцита в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия дает ряд полос индивидуальных белков, которые нумеруют в порядке их расположения в столбике полиакриламидного геля от катода к аноду. Структурными компонентами цитоскелета являются белки полос 1, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.6, 4.1, 4.9, 5 и 7 [15] (рис. 1).

Основной белок цитоскелета мембраны эритроцита — спектрин, которому соответствуют на электрофореграмме полосы 1 и 2. Молекула спектрина состоит из двух субъединиц —  $\alpha$  и  $\beta$  — с мол. м. соответственно 240 000 и 220 000 [23]. Гетеродимеры спектрина самоассоциируются и формируют фибриллярную основу цитоскелета. При этом  $\alpha$ -субъединица одного гетеродимера нековалентно взаимодействует с  $\beta$ -субъединицей другого гетеродимера. В результате ассоциации молекул спектрина образуется двумерная белковая сеть [29]. Полагают, что в эритроцитах присутствуют как олигомеры, так и димеры и тетрамеры спектрина [11].

Другим важным компонентом цитоскелета мембраны эритроцита является актин, или белок

полосы 5 с мол. м. 43 000 [23]. Филаменты актина состоят из 12–17 мономеров. В нативном эритроците существуют две формы актина: G-актин, или неполимеризованный актин, и F-актин — полимеризованный [42, 45].

Следующий компонент цитоскелета — белок полосы 4.1 — представлен двумя полипептидами — а и б — с мол. м. соответственно 80 000 и 78 000 [23]. Полагают, что полипептиды белка полосы 4.1 локализованы на разных концах молекулы спектрина [21].

Группа белков 2.1, 2.2, 2.3, 2.6 с мол. м. 200 000, 190 000, 180 000 и 150 000 носит название «синдеины», или «анкирин». Эта группа белков постоянно присутствует в мембране нативного эритроцита и тесно связана со спектрином [22]. Молекула анкирина сферической формы, она состоит из двух доменов, один из которых фосфорилирован [49].

Минорный белок полосы 4.9 входит в состав комплекса спектрин — актин — белок 4.1. Это фосфопротеин с мол. м. 49 000 [23]. Он очень прочно ассоциирован со спектрин-актиновым комплексом и оказывает существенное влияние на полимеризацию актина [26].

Белок полосы 7, или тропомиозин, с мол. м. 29 000, также относят к белкам цитоскелета мембраны эритроцита [19]. Цитоскелет мембраны эритроцита имеет сложную пространственную структуру в форме гибкого многоугольника. В вершинах многоугольника, стороны которого образованы спектрином, локализованы молекулы актина, белков 4.1 и 4.9, тропомиозина и кальмодулинсвязывающего белка [32] (рис. 2).

Актиновые филаменты связаны с молекулой спектрина полимеризующимся концом, это ускоряет процесс полимеризации актина и способствует упрочнению структурных и функциональных взаимодействий молекул спектрина и актина [37]. Существенное влияние на взаимодействия спект-

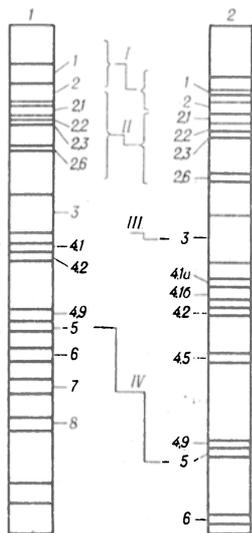


Рис. 1. Электрофореграмма белков мембраны эритроцита в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия.

I — 5% полиакриламидный гель; 2 — 7% полиакриламидный гель. I — спектрин, II — анкирин, III — полоса 3, IV — актин.

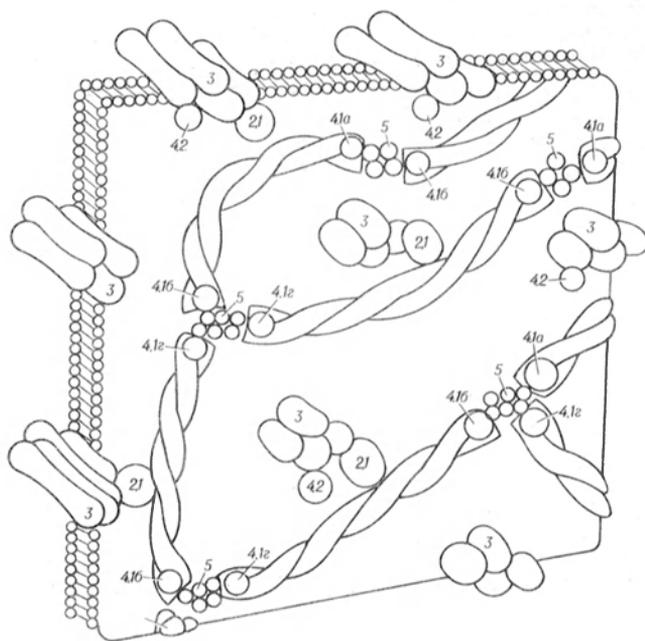


Рис. 2. Молекулярная организация цитоскелета эритроцитарной мембраны.

2.1 — анкирин; 3 — интегральный белок полосы 3; 4.1 а, б и г — белок 4.1; 4.2 — интегральный белок 4.2; 5 — актин [24].

рина с актином оказывает белок 4.1. Он ускоряет процесс полимеризации актина и способствует укорочению межмолекулярных связей структурных компонентов цитоскелета. Исходя из этого связь спектрина с актином называют 4.1-зависимой [21].

Минорный белок 4.9 связан с актином и оказывает на его полимеризацию действие, обратное действию белка 4.1. Белок 4.9 уменьшает степень полимеризации актина и способен сшивать актиновые волокна в пучки, тем самым снижая его активность [26].

С молекулой актина тесно связаны 2 молекулы тропомиозина, функциональная роль которого неизвестна [23].

Существенное влияние на связывание спектрина, белка 4.1, белка 4.9 с актиновыми филаментами оказывает процесс фосфорилирования этих белков. Считают, что под контролем фосфорилирования находятся все структурные связи цитоскелета [16].

Связь белкового цитоскелета с мембраной эритроцита обеспечивается взаимодействием спектрина — анкирина — интегральный белок полосы 3, который проникает в липидный бислой мембраны [5]. Анкирин, как известно, имеет в своем составе два домена. Фосфорилированный домен последнего связан с  $\beta$ -субъединицей спектрина, а посредством высокоаффинных взаимодействий — с белком полосы 3 и, следовательно, со всей мембраной в целом [50]. Связи в комплексе спектрин — анкирин — белок полосы 3 энергозависимы [8]. Так, при дефосфорилировании мобильность этого комплекса уменьшается [33].

Имеется еще один участок связывания цитоскелета с мембраной за счет взаимодействия белка 4.1 с доменом гликофорина C [35].

Таким образом, можно выделить два белковых комплекса, определяющих особенности структуры цитоскелета эритроцитарной мембраны. Это спектрин — белок 4.1 — актин — белок 4.9 и спектрин — анкирин — белок полосы 3 [32, 50].

По мнению ряда исследователей [16, 33], контроль за состоянием цитоскелета мембран эритроцитов реализуется через процесс фосфорилирования белков цитоскелета, что в свою очередь определяет форму клеток и их способность к деформации.

Спектрин среди белков цитоскелета эритроцитарной мембраны выделяется самым высоким уровнем фосфорилирования и очень высокой скоростью включения фосфора в белковую молекулу [24]. Фосфорилирование данного белка идет по его  $\beta$ -субъединице (главным образом по серину). В эритроцитах имеют место два процесса: фосфорилирование и дефосфорилирование спектрина [43]. Однако до настоящего времени остается невыясненным вопрос о том, какие из протеинкиназ катализируют процесс фосфорилирования спектрина. Полагают [38], что этот процесс контролирует система цАМФ-независимых протеинкиназ. Однако фосфорилирование обеспечивают и цАМФ-зависимые протеинкиназы [17]. Установлено, что эту реакцию катализирует особый фермент — спектринкиназа, активность которой зависит от присутствия ионов  $Mg^{2+}$  и

в меньшей степени ионов  $Ca^{2+}$ . Активность спектринкиназы не зависит от зрелости эритроцитов, но уровень фосфорилирования спектрина по мере старения клеток снижается. Объяснение этого явления находят в структурной модификации молекул спектрина [46].

Фосфорилирование белков 4.1 и 4.9 осуществляется главным образом по серину. В наибольшей степени этот процесс катализирует протеинкиназа C, хотя цАМФ-зависимые протеинкиназы также участвуют в этом, но их активность менее выражена [16]. Кроме того, в процессах фосфорилирования данных белков участвует  $Ca^{2+}$ -зависимая протеинкиназа [12]. Фосфорилирование анкирина опосредуется через цАМФ-зависимые протеинкиназы [38], но ведущей является реакция, катализируемая цАМФ-независимыми протеинкиназами [9]. Однако непосредственно анкирин фосфорилируется ничтожно мало [33].

Предполагают, что взаимодействие между белками цитоскелета и соответственно свойства мембраны эритроцита определяются уровнем фосфорилирования белковых компонентов [16]. Действительно, изменение уровня фосфорилирования спектрина влияет на степень полимеризации актиновых филаментов, что приводит к изменению вязкоэластических свойств мембраны эритроцита [48]. Показано, что даже незначительное снижение уровня фосфорилирования анкирина сопровождается изменениями формы клетки и механических свойств мембраны [33]. Весьма интересно, что цАМФ-зависимые протеинкиназы, фосфорилирующие анкирин, уменьшают сродство последнего к олигомерам и тетрамерам спектрина, но не влияют на взаимодействие анкирина с димерами спектрина. Полагают, что данное избирательное действие протеинкиназ обеспечивает возможность контролирования взаимодействий в комплексе спектрин — анкирин — белок полосы 3. Активация процесса фосфорилирования спектрина приводит к упрочению связей в комплексе спектрин — белок 4.1 — белок 4.9 и как следствие к повышению стабильности эритроцитарной мембраны [23]. Особого внимания заслуживает тот факт, что фосфорилирование белка 4.1, катализируемое протеинкиназой C, обеспечивает связь белка 4.1 с гликофоринном A и белком полосы 3, влияя тем самым на стабильность цитоскелета и мембраны в целом. В то же время при фосфорилировании белка 4.1 цАМФ-зависимыми протеинкиназами этого не происходит [13]. Фосфорилирование белка 4.9 цАМФ-зависимыми протеинкиназами приводит к нарушению его связей с актином и как следствие к активации процесса полимеризации актиновых филаментов и повышению стабильности цитоскелета [27].

Таким образом, представляется возможным эффективно влиять на свойства мембраны эритроцита через процесс фосфорилирования белков цитоскелета. Это в свою очередь ставит вопрос о механизмах, регулирующих уровень фосфорилирования мембранных белков эритроцита. Подобный контроль можно осуществлять, изменяя содержание в эритроцитах АТФ как донора фосфата для протеинкиназных реакций. Действительно, при снижении количества АТФ в эритроцитах происходит превращение дискоцитов в

эхиноциты [47]. Но, вероятно, более важным и тонким механизмом регуляции является гуморальный контроль при участии катехоламинов и простагландинов активности протсинкиназ, катализирующих процесс фосфорилирования белков цитоскелета мембраны эритроцита. Катехоламины через  $\alpha$ -адренергические рецепторы воздействуют на аденилатциклазную систему эритроцитов, которая посредством активации цАМФ-зависимых протеинкиназ катализирует фосфорилирование мембранных белков эритроцитов [7, 39, 40]. При воздействии простагландина  $E_1$  отмечалось значительное увеличение фосфорилирования белков цитоскелета, и прежде всего спектрина, в ретикулоцитах и молодой популяции эритроцитов [17].

Синтез белков цитоскелета выявлен на уровне ядерных предшественников эритроцитов — проэритробластов. Весьма интересно, что  $\alpha$ -субъединица спектрина синтезируется в 7 раз больше, чем  $\beta$ -субъединица, однако в цитоскелет они оказываются встроенными в равных количествах. По мере созревания эритроидных клеток синтез спектрина уменьшается и возрастает количество синтезируемых молекул анкирина и белка 4.1 [25]. На синтез белков цитоскелета и его сборку существенное влияние оказывает специфический гормон — эритропоэтин [28]. Экспрессия спектрина коррелирует с содержанием гликофорина А, который является ранним маркером клеток эритроидного ряда [4]. Применение флюоресцирующих антител к спектрину позволяет выявить клетки эритроидного ряда в препаратах костного мозга, что использовалось для диагностики эритролекемий [14].

Большое внимание уделяется изучению состояния цитоскелета мембран эритроцитов при различных типах анемий. Уменьшение числа мест связывания анкирина с белком 3 выявлено в случае пойкилоцитарной анемии [2]. Дефицит анкирина обнаружен при тяжелой форме сфероцитарной анемии [3]. Поскольку анкирин ковалентно связан с жирнокислотными остатками фосфолипидов мембраны эритроцита и это оказывает влияние на структурную организацию липидного бислоя мембраны [44], предполагают, что взаимодействие белков цитоскелета с фосфолипидами мембраны эритроцита определяет форму последнего [36, 41].

При сфероцитозе отмечен дефицит белка 4.1 [50]. Снижение стабильности эритроцитарной мембраны при эллиптоцитозе связывают с уменьшением количества белка 4.1 в комплексе спектрин — актин — белок 4.1. Это также наблюдается при пойкилоцитозе [34]. Но первопричиной нарушений, происходящих в цитоскелете, считают [1] дефект спектриновой молекулы или дефицит спектрина. Так, снижение содержания последнего до 200 000 молекул на эритроцит и менее приводит к развитию гемолитической анемии, а нарушение димер-димер-ассоциации спектриновых молекул наблюдается при наследственном пирропкойлоцитозе и наследственном эллиптоцитозе [1].

Изменение нативной структуры спектрина выявлено при взаимодействии последнего с дериватами гемоглобина; при этом наблюдалось увеличение диссоциации спектрина на  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы, уменьшение степени взаимодействия спектрина с белком 4.1 [30]. Повышенная ригид-

ность мембран эритроидных клеток отмечалась при наследственном сфероцитозе, серповидноклеточной анемии и  $\beta$ -талассемии [18]. Довольно существенную роль в этом играет спектрин, образующий комплекс с гемоглобином. Это позволяет объяснить изменения вязкоэластических свойств и формы эритроцитов при различных гемоглобинопатиях [6, 10].

Таким образом, белковый цитоскелет мембраны — сложное структурное образование — является весьма значимым для нормального функционирования эритроцита — обеспечения его двояковогнутой формы и способности к упругой деформации. Вероятно, это не единственные функции цитоскелета. Несомненный интерес представляет исследование роли цитоскелета мембран эритроидных клеток в механизмах трансмембранной передачи информации, что имеет важное значение для изучения вопросов регуляции дифференцирования и пролиферации эритроидных клеток.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Agre P., Orringer E. P., Chen D. H. K. et al. // J. clin. Invest.— 1981.— Vol. 68.— P. 1566.
2. Agre P., Orringer E. P., Bennett V. // New Engl. J. Med.— 1982.— Vol. 306.— P. 1155.
3. Agre P., Cassella J., Zinkman W. et al. // Nature.— 1985.— Vol. 314.— P. 381—383.
4. Anderson L. C., Cahmberg C. G., Teerenhovi L. et al. // J. Cancer.— 1979.— Vol. 23.— P. 717—720.
5. Bennett V. // Meth. Enzymol.— 1983.— Vol. 96.— P. 313—324.
6. Bessis M., Mohandas N. // Blood Cells.— 1977.— Vol. 3.— P. 229—239.
7. Bilezikian J. P., Spiegel A., Brown E. et al. // Molec. Pharmacol.— 1977.— Vol. 13.— P. 775—785.
8. Caret D. P., Fairbanks G. // J. cell Biochem.— 1984.— Vol. 24.— P. 385.
9. Cianci G., Giorgy M., Morrow J. S. // J. biol. Chem.— 1988.— Vol. 37, N 3.— P. 301—315.
10. Clark M. R., Mohandes N., Shohet S. B. // J. clin. Invest.— 1980.— Vol. 65.— P. 189—196.
11. Cohen C. M. // Semin. Hemat.— 1983.— Vol. 20.— P. 141—158.
12. Cohen C., Danilov Y., Fennel R. et al. // J. Cell Biochem.— 1989.— Suppl. 13-B.— P. 209.
13. Cohen C., Foley S. // J. biol. Chem.— 1986.— Vol. 261.— P. 7701—7709.
14. Ekblom M. // Scand. J. Haemat.— 1984.— Vol. 33.— P. 378—385.
15. Fairbanks G., Steck T. L., Wallach D. F. // Biochemistry (Wash.)— 1971.— Vol. 10.— P. 2606—2617.
16. Faquin W. C., Chanwala S. G., Hung J. et al. // J. cell Biol.— 1985.— Vol. 101.— P. 283.
17. Fischer S., Piau P., Delaunay J. et al. // Acta biol. med. germ.— 1981.— Bd 40.— S. 747—755.
18. Fortier N., Snyder L. M., Garver F. et al. // Blood.— 1988.— Vol. 71, N 5.— P. 1427—1431.
19. Fowler V., Davis J. Q., Bennett V. // J. cell Biol.— 1989.— Vol. 100.— P. 47—55.
20. Fujikawa S. // J. Ultrastruct.— 1983.— Vol. 84.— P. 286—289.
21. Gardner K., Bennett V. // Nature.— 1987.— Vol. 328.— P. 359—362.
22. Goodman S. R., Yu J., Whitfield C. F. et al. // J. biol. Chem.— 1982.— Vol. 257.— P. 4564—4569.
23. Goodman S. R., Shiffer K. A., Casiria L. et al. // Blood.— 1982.— Vol. 60.— P. 772—784.
24. Goodman S. R., Shiffer K. // Amer. J. Physiol.— 1983.— Vol. 244.— P. 121—141.
25. Hanspal N., Palek J. // J. Cell Biol.— 1987.— Vol. 105.— P. 1417—1424.
26. Husain A., Branton D. // Analyt. Biochem.— 1986.— Vol. 155.— P. 206—211.
27. Husain A., Branton D. // J. cell Biochem.— 1989.— Suppl. 13-B.— P. 210.
28. Kouri M. J., Bondurant M. C., Atkinson J. B. // J. cell Biol.— 1985.— Vol. 2.— P. 101.

29. Liu S., Windisch P., Kim S. et al. // Cell.— 1984.— Vol. 37.— P. 587—594.
30. Liu S., Zhai S., Lawler J. et al. // J. biol. Chem.— 1985.— Vol. 24.— P. 12234—12239.
31. Lux S. E. // Nature.— 1979.— Vol. 281.— P. 426.
32. Matsusaki F., Sulton K., Ikai A. // Europ. J. Cell Biol.— 1985.— Vol. 39.— P. 153—160.
33. Nakao M., Jinbu Y., Sato S. et al. // Biomed. biochim. Acta.— 1987.— Vol. 46.— P. 5—9.
34. O'Connell M., Swislocki N. // Mech. Develop.— 1983.— Vol. 22.— P. 51—70.
35. Owens J., Mueler T., Morrison M. // Arch. Biochem.— 1980.— Vol. 204.— P. 247—254.
36. Pank P. F. II., Op den Kamp J. A. F., Roelofsen B. et al. // Biochim. biophys. Acta.— 1986.— Vol. 857.— P. 127.
37. Pinder J. C., Weeds A. G., Gratzner W. B. // J. molec. Biol.— 1986.— Vol. 191.— P. 461—468.
38. Quiring K., Gauger D., Kaiser G. et al. // Experientia.— 1973.— Vol. 15, N 5.— P. 526—527.
39. Rasmussen H., Lake W., Allen J. // Biochim. biophys. Acta.— 1975.— Vol. 27.— P. 63—73.
40. Rubin C., Rozen O. // Ann. Rev. Biochem.— 1975.— Vol. 44.— P. 831—887.
41. Rubicki A. C., Health R., Lubin B. // J. clin. Invest.— 1988.— Vol. 81.— P. 255.
42. Shen B. M., Joseph R., Steck T. // J. cell. Biol.— 1984.— Vol. 99.— P. 810—822.
43. Snyder L., Fortier N., Trainor J. et al. // J. clin. Invest.— 1986.— Vol. 76.— P. 1971—1978.
44. Staufenbiel M., Lazarides E. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1986.— Vol. 83.— P. 318.
45. Stromqvist M., Backam L., Shanbhog V. P. // FEBS Lett.— 1985.— Vol. 190.— P. 15—20.
46. Tchernia G., Mohandas N., Shohet S. B. // J. clin. Invest.— 1981.— Vol. 68.— P. 454—460.
47. Tilley L., Ralston G. // Aust. J. biol. Sci.— 1987.— Vol. 40.— P. 27—36.
48. Waxman L. // Arch. Biochem.— 1979.— Vol. 195.— P. 300—314.
49. Weaver D. C., Marchesi V. T. // J. biol. Chem.— 1984.— Vol. 259.— P. 6165—6169.
50. Weaver D. C., Pasternak G. R., Marchesi V. T. // Ibid.— P. 6181—6186.

Поступила 03.06.90

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1992

УДК 616.153.915-391-07-092.9

Е. Б. Бурлакова, А. Е. Губарева, Г. В. Архипова,  
В. А. Розинский

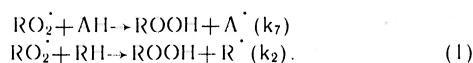
### МОДУЛЯЦИЯ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ БИОГЕННЫМИ АМИНАМИ В МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ

Институт химической физики АН СССР, Москва, Московская  
медицинская академия им. И. М. Сеченова

В результате исследований последних лет стали понятными многие механизмы действия биогенных аминов на процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) в организме. Эти механизмы весьма разнообразны — от генерации активных форм кислорода в процессе метаболизма [10] до активации фосфолипазы  $A_2$ , что приводит к структурной дезорганизации мембран, большей доступности липидов окислению и является существенным элементом повреждения мембран при стрессе [14]. Показано, что активные формы кислорода ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^{\cdot}$ ) образуются при окислении аминов моноаминоксидазой (МАО) [10, 24] и микросомальной системой с участием цитохрома P-450 [6]. В свою очередь активация ПОЛ в мембранах вызывает разнообразные изменения функциональной активности клеток. Интенсивность ПОЛ в липидах биологических мембран влияет на функциональную активность клеток различных тканей, но, вероятно, наиболее яркие доказательства этого получены для нервной ткани. Данные последних лет показывают, что существует зависимость между составом фосфолипидов синаптических мембран, интенсивностью процессов перекисного окисления в них и функциональной активностью ряда нейромедиаторных систем: холинергической, серотонинергической [2, 3, 12]. Показано, что электрическая активность нейронов [9], чувствительность рецепторов к медиаторам также зависят от активности ПОЛ в мембранах нервных клеток [17]. В процессе жизнедеятель-

ности в организме возникает много ситуаций [5, 15, 18], при которых мембраны клеток подвергаются действию факторов, стимулирующих ПОЛ, и одновременно контактируют с высокими концентрациями ( $10^{-4}$ — $10^{-5}$  М) биогенных аминов.

Задачей настоящей работы является исследование влияния биогенных аминов на ПОЛ в трех модельных системах: 1) в липосомах из природных фосфолипидов, т. е. на модели бислойных мембран; 2) в мицеллярном растворе линолевой кислоты — в условиях непосредственного взаимодействия водорастворимых аминов и субстрата ПОЛ и 3) в условиях иницированного окисления метиллинолеата (МЛ) в мицеллярных растворах, для определения реакционной способности биогенных аминов по отношению к перекисным радикалам. Последняя характеризовалась отношением констант скорости  $k_7/k_2$  реакций:



Использование этих трех модельных систем дает возможность сравнить прямое действие различных аминов на перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот с действием их на липиды в составе модельных мембран и выяснить механизм их действия. Для исследования использовали амины, отличающиеся по строению, заряду молекулы и биологическому действию. Представляет интерес, на наш взгляд, сравнение влияния на ПОЛ таких аминов, как норадреналин и серотонин, являющихся соответственно медиаторами стресс-реализующей и стресслимитирующей систем, так как в настоящее время установлено, что в развитии стрессорной реакции ведущим патогенетическим звеном является активация свободнорадикального окисления в мембранах клеток [14, 15].

Методика. Для получения липосом использовали фосфолипиды яичного желтка, которые получали общепринятым методом [7]. Состав фосфолипидов контролировали методом тонкослойной хроматографии на денситометре «Хромоскан» (Великобритания). Полученные фосфолипиды хранили при

температуре — 20 °С в запаянных ампулах в атмосфере аргона. Липосомы получали методом обращенных фаз [23], позволяющим получать большие однослойные липосомы [13, 19, 23]. Размер липосом и степень их однородности оценивали на автокорреляционном спектрофотометре «Nanosizer». Размер липосом составляет 210–230 нм. Липосомы и мицеллярные растворы линолевой кислоты готовили на фосфатном буфере pH 7,4. Конечная концентрация фосфолипидов в препарате липосом 3 мг/мл. Мицеллярный раствор линолевой кислоты («Sigma») с конечной концентрацией 10 мМ был получен при добавлении  $6 \cdot 10^{-3}$  М додецилсульфата натрия. Инкубацию липосом и раствора линолеата с биогенными аминами проводили при 37 °С. Для исследования использовали серотонин-креатинсульфат, тирамин·HCl, нордреналин·HCl, гистамин·2HCl («Sigma»). Инициацию перекисного окисления проводили с помощью Fe и аскорбиновой кислоты или только ионами железа ( $2 \cdot 10^{-5}$  М). По окончании инкубации, а также для контроля качества липосом отбирали аликвоты для определения (МДА) по реакции с тиобарбитуровой кислотой [11]. Для предотвращения окисления липидов при кипячении с тиобарбитуровой кислотой (что может существенно снизить результаты, как показано [22]) к пробе немедленно после окончания инкубации добавляли 5 мМ гидрохинон, растворенный в 2 мкл этанола [5]. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре «Вескман» при 565 нм.

В модели иницированного окисления [18] использовали ML («Sigma») без дополнительной очистки. Мицеллярные растворы SDS («Sigma») готовили на основе 0,05 М калий-фосфатного буфера pH 7,4, содержащего 0,2 мМ ЭДТА. В качестве источника радикалов использовали водорастворимый инициатор азобис (4-карбоксиизвалеронитрил) (AKVN) отечественного производства. Эксперименты проводили при следующих концентрациях компонентов: 0,2 М SDS, 20 мМ ML и 10 мМ AKVN.

Кинетику расходования  $O_2$  при окислении ML, изучали с помощью полярографического электрода Кларка на биологическом мониторе ISI 5300 («Yellow Springs Instrument», США) при 40 °С. Скорость иницирования определяли методом ингибиторов по времени окончания периода индукции ( $T_{инд}$ ) с помощью формулы:

$$W_{ин} = 2 \text{ PhON}_0 / T_{инд}$$

где  $\text{PhON}_0$  — начальная концентрация стандартного антиоксиданта (6-окси-2, 2, 5, 7, 8-пентаметилхроман). Как было показано в работе [4], зависимость скорости ингибированного окисления ( $W$ ) ML в мицеллярных растворах от концентрации антиоксиданта (АН), взаимодействующего с перекисными радикалами, описывается соотношением:

$$\frac{W_0}{W} = 1 + \frac{2 k_7 W_0}{k_2 [RH] W_{ин}} \cdot [АН], \quad (2)$$

где  $W_0$  — скорость окисления в отсутствие антиоксиданта.

Шиффовы основания, образующиеся в процессе инкубации биогенных аминов с липосомами, экстрагировали смесью гексан—этанол в соотношении 1:1 [17] и спектры флуоресценции снимали на флюориметре «Hitachi».

**Результаты и обсуждение.** При исследовании ПОЛ в системах с липосомами и в мицеллярном растворе линолевой кислоты использовали  $Fe^{2+}$  в концентрации  $2 \cdot 10^{-5}$  М и аскорбиновую кислоту в концентрации  $2,5 \cdot 10^{-4}$  М, как предложено в ряде работ [4]. Однако в наших экспериментах было показано, что аскорбиновая кислота в этих условиях проявляет антиоксидантное действие как в концентрации  $2,5 \cdot 10^{-4}$  М, так и в более низкой концентрации —  $2,5 \times 10^{-5}$  М (рис. 1). Антиоксидантное действие аскорбиновой кислоты сохраняется и в присутствии аминов. Вероятно, проявление аскорбиновой кислотой прооксидантных или антиоксидантных свойств зависит не только от ее концентрации, как показано в работе [1], но и от субстрата окисления и состава инкубационной среды (гомогенат ткани или модельные системы, содержащие только фосфолипиды). В наших условиях эксперимента не наблюдали прооксидантного действия аскорбиновой кислоты, которое в гомоген-

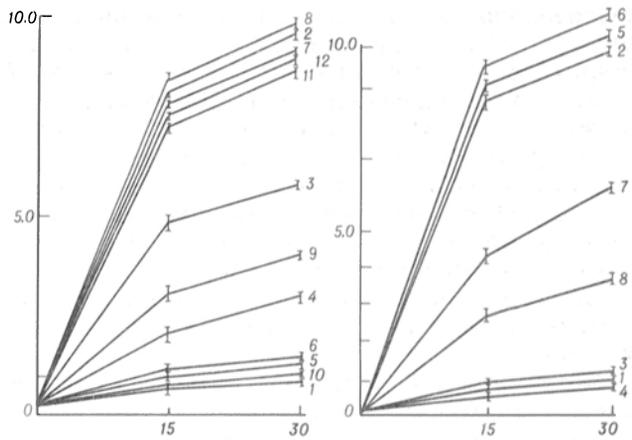


Рис. 1. Влияние аскорбиновой кислоты (АК), нордреналина (НА) и тирамина (Т) на накопление МДА (в мкМ) в липосомах.

Здесь и на рис. 2 и 3: по оси абсцисс — время, мин, по оси ординат — концентрация МДА, мкМ. 1 — липосомы (ЛС), концентрация фосфолипидов 3 мг/мл; 2 — ЛС+Fe,  $2 \cdot 10^{-5}$  М; 3 — ЛС+Fe+АК,  $2,5 \cdot 10^{-5}$  М; 4 — ЛС+Fe+АК,  $2,5 \times 10^{-4}$  М; 5 — ЛС+НА,  $10^{-7}$  М; 6 — ЛС+НА,  $10^{-6}$  М; 7 — ЛС+Fe+НА,  $10^{-7}$  М; 8 — ЛС+Fe+НА,  $10^{-7}$  М; 9 — ЛС+Fe+НА  $10^{-6}$  М+АК  $2,5 \cdot 10^{-4}$  М; 10 — ЛС+Т,  $10^{-6}$  М; 11 — ЛС+Fe+Т,  $10^{-7}$  М; 12 — ЛС+Fe+Т,  $10^{-6}$  М.

Рис. 2. Влияние гистамина (Г) и серотонина (С) на накопление МДА в липосомах.

1 — ЛС; 2 — ЛС+Fe,  $2 \cdot 10^{-5}$  М; 3 — ЛС+Г,  $10^{-6}$  М; 4 — ЛС+С,  $10^{-6}$  М; 5 — ЛС+Fe+Г,  $10^{-7}$  М; 6 — ЛС+Fe+Г,  $10^{-6}$  М; 7 — ЛС+Fe+С,  $10^{-7}$  М; 8 — ЛС+Fe+С,  $10^{-6}$  М.

натах тканей при таких концентрациях имеет место [4, 10]. Поэтому в дальнейших экспериментах в качестве прооксиданта использовали только  $Fe^{2+}$  в концентрации  $2 \cdot 10^{-5}$  М.

На рис. 1—3 показано влияние нордреналина, серотонина, тирамина и гистамина на накопление МДА. Для изучения действия каждого амина на ПОЛ определяли концентрацию МДА в следующих системах: контроль I — интактные инкубированные липосомы; контроль II — липосомы, инкубированные в присутствии только инициатора ПОЛ ( $Fe^{2+}$ ); контроль III — липосомы, инкубированные в присутствии только аминов; опыт — липосомы, инкубированные в присутствии инициатора ПОЛ и амина.

Такие же условия соблюдались и для мицеллярных растворов линолевой кислоты. Инкубация липосом с нордреналином привела к некоторому увеличению концентрации МДА как в контроле III, так и в опыте (см. рис. 1). Судя по характеру кривых опытных проб, это действие для нордреналина и ионов железа является аддитивным. Инкубация нордреналина с раствором линолевой кислоты показала его очень слабое антиоксидантное действие (см. рис. 3). Этот факт можно объяснить следующим образом. Нордреналин в исследуемых условиях обладает слабым влиянием на окисление липидов, что показано в системе с линоленовой кислотой; при инкубации с липосомами он незначительно активизирует окисление за счет дестабилизации мембран, происходящей в результате взаимодействия аминокислотной группы с отрицательно заряженными группами фосфолипидов в бислое. При изучении влияния тирамина на перекисное окисление липосом обнаружено сходное с нордреналином действие, в то же время при инкубации его с раствором линолевой кислоты выявлено отчетливое антиоксидантное действие уже в концентрации  $10^{-7}$  М. Это действие

пропорционально концентрации тирамина (см. рис. 3). Сравнение результатов действия норадреналина и тирамина на накопление МДА в системах с липосомами и растворе линолевой кислоты показывает, что у тирамина более выражено прямое ингибирующее действие на ПОЛ. Поэтому в системе с липосомами деструктурирующее действие тирамина на мембраны, подобно предложенному выше для норадреналина, компенсируется прямым ингибирующим действием и в результате концентрация МДА в инкубационной системе существенно не отличается от контрольных проб.

Гистамин также проявляет противоположное влияние на окисление липидов в составе липосом и в растворе линолевой кислоты (см. рис. 2, 3). Прямое ингибирующее его действие на окисление линолевой кислоты довольно значительно: в концентрации  $10^{-6}$  М гистамин уменьшает количество МДА почти в 2 раза (см. рис. 3). Таким образом,  $I_{0.5}$  — концентрация, при которой происходит 50 % ингибирования ПОЛ — для гистамина в мицеллярном растворе линолевой кислоты составляет  $10^{-6}$  М. В то же время гистамин, обладая выраженным положительным зарядом, может оказывать более сильное дестабилизирующее действие на мембраны липосом и таким образом в этих условиях незначительно активировать ПОЛ (см. рис. 2).

На рис. 2—3 показано ингибирующее действие серотонина на ПОЛ в липосомах и растворе линолеата. Выраженное действие на перекисное окисление этого амина проявляется уже в концентрации  $10^{-7}$  М, а при концентрации  $10^{-6}$  М он уменьшает количество МДА в 4 раза.  $I_{0.5}$  для серотонина в эмульсии линоленовой кислоты равна  $10^{-7}$  М. Ингибирующее действие серотонина выражено и в системе с липосомами. Механизм антиоксидантного действия аминов поясняют результаты исследования их реакционной способности по отношению к перекисным радика-

лам. На рис. 4 показана зависимость параметра  $W_0/W$  от концентрации биогенных аминов — серотонина, норадреналина и тирамина. Можно видеть, что уравнение (2) хорошо выполняется. Рассчитанные из тангенса угла наклона прямых рис. 4 значения  $k_7/k_2$  составляют  $72 \pm 6$ ,  $31 \pm 3$ ,  $8 \pm 2$  для серотонина, норадреналина и тирамина соответственно. Гистамин вплоть до концентраций 0,1 мМ не оказывает влияния на скорость окисления МЛ в мицеллярных растворах, для них  $k_7/k_2 < 1$ .

Как и следовало ожидать, выраженную активность в реакции с перекисными радикалами проявляют только те биогенные амины, в структуре которых имеются ОН-группы, присоединенные к ароматическому кольцу. Однако даже в случае наиболее активного соединения — серотонина, величина  $k_7/k_2$ , характеризующая его активность в реакции [7], сравнительно невелика, она ниже этой величины для таких фенольных антиоксидантов, как инол-240, аналоги  $\alpha$ -токоферола — 6-окси-2, 2, 5, 7, 8-пентаметилхроман-4400 и 6-окси-2-карбоксо-2, 5, 7, 8-тетраметилхроман-1600 [16]. Одна из причин сравнительно низкой активности рассматриваемых биогенных аминов — отсутствие ортоалкильного экранирования реакционноспособных ОН-групп. Последнее приводит к образованию Н-комплексов с молекулами воды, неактивных в реакции [7, 16].

Полученные результаты исследования влияния аминов на ПОЛ в трех модельных системах показывают, что в каждом конкретном случае результирующий эффект зависит от условий эксперимента и иногда может быть даже противоположным. Однако если одно из свойств, например, способность к антирадикальному действию у серотонина, выражено сильно, то оно и определяет характер его результирующего эффекта. Данные, приведенные в работе, показывают, что непосредственное влияние аминов на ПОЛ может быть довольно значительно, и это необходимо учитывать при интерпретации результатов, полученных *in vivo*. Изучая действие МАО [10], обнаружили, что при окислении фенилэтиламина, бензиламина, триптамина происходит активация ПОЛ в мембранах митохондрий. Авторы объяснили этот факт генерацией активных форм кислорода при действии ферментов на амины. При действии тирамина концентрация МДА не отличалась от контрольной, а при окислении серотонина наблюдали существенное снижение содержания МДА. Авторы пришли к выводу, что в этом случае происходит трансформация МАО как мембранно-связанного фермента под влиянием перекисей липидов. Полученные нами данные позволяют считать, что в этих условиях серотонин и тирамин проявляют свое непосредственное ингибирующее действие на окисление липидов мембран митохондрий, которое может преобладать над эффектом стимуляции ПОЛ активными формами кислорода, генерируемыми при работе МАО. Гистамин не взаимодействует с перекисными радикалами липидов, однако при индукции ПОЛ ионами железа в растворе линолеата он проявляет ингибирующее действие. Учитывая наличие в его имидазольном кольце атома азота, способного образовывать комплексы с ионами железа, можно предположить, что его ин-

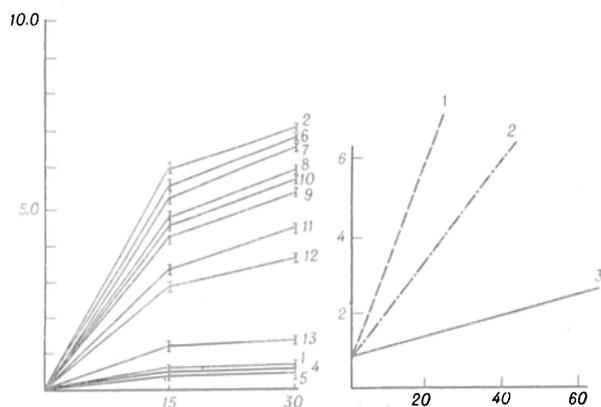


Рис. 3. Влияние аминов на накопление МДА в растворе линолевой кислоты (ЛК).

1 — ЛК, 3 мг/мл; 2 — ЛК+Fe,  $2,5 \cdot 10^{-5}$  М; 3 — ЛК+НА,  $10^{-6}$  М; 4 — ЛК+Г,  $10^{-6}$  М; 5 — ЛК+С,  $10^{-6}$  М; 6 — ЛК+Fe+НА,  $10^{-7}$  М; 7 — ЛК+Fe+НА,  $10^{-6}$  М; 8 — ЛК+Fe+Т,  $10^{-7}$  М; 9 — ЛК+Fe+Т,  $10^{-6}$  М; 10 — ЛК+Fe+Г,  $10^{-7}$  М; 11 — ЛК+Fe+Г,  $10^{-6}$  М; 12 — ЛК+Fe+С,  $10^{-7}$  М; 13 — ЛК+Fe+С,  $10^{-6}$  М;

Рис. 4. Зависимость величины  $W_0/W$  от концентрации серотонина (1), норадреналина (2) и тирамина (3) при окислении метилолеата в мицеллярных растворах при 40 °С.

По оси абсцисс — концентрация,  $10^{-6}$  М; по оси ординат — величина — отношения  $W_0/W$ .

гибирующее действие на ПОЛ обусловлено именно этим свойством.

В экспериментах с липосомами мы определяли содержание и другого конечного продукта ПОЛ — шиффовых оснований — через 10 ч инкубации в контрольных (I, II и III) и опытных пробах. Показано, что шиффовы основания, экстрагируемые смесью этанол—гексан в соотношении 1:1, имеют  $\lambda_{\text{ex}}$  340—455 нм и  $\lambda_{\text{em}}$  410—445 нм и образуются в процессе инкубации как в контрольных, так и в опытных пробах. Однако только серотонин существенно уменьшает образование шиффовых оснований (на одну треть по сравнению с контролем I).

Сопоставление результатов, полученных на трех моделях исследования влияния биогенных аминов на ПОЛ, позволяет сделать следующие выводы. Наиболее выраженным антиоксидантным свойством из исследованных аминов обладает серотонин. Его действие является антирадикальным за счет гидроксила в индольном кольце и сопоставимым с антирадикальным действием ионола в данной системе, соотношение  $k_7/k_2$  для которого равно 240. Антиоксидантное действие серотонина выражено как в микрогетерогенной среде, так и на модели мембран. Кроме того, серотонин уменьшает образование липофусцина в липидах липосом. Учитывая, что указанные выше свойства серотонина проявляет в физиологических концентрациях ( $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  М), можно предположить, что серотонин ингибирует ПОЛ *in vivo* при прямом взаимодействии с перекисными радикалами в мембранах клеток. Как считают [14], серотонин является одним из основных медиаторов стресслимитирующей системы. При стрессе концентрация серотонина в мозге повышается в 1,5—2 раза [20]. Возможно, что одним из элементов антистрессорного действия серотонина является его непосредственное ингибирующее влияние на окисление липидов, т. е. стабилизация мембран. Норадреналин является одним из медиаторов так называемой стрессреализующей системы, а активация перекисного окисления полиеновых кислот фосфолипидов мембран считается ключевым звеном стрессорного повреждения клеток. Норадреналин и продукты его метаболизма, обладая суммарным прооксидантным свойством, могут вносить вклад в локальное цитотоксическое действие катехоламинов в тех областях ЦНС, которые содержат норадренергические нейроны и участвуют в регуляции эмоционального состояния, внимания и т. д. [5, 15, 18].

Таким образом, медиаторы, постоянно контактирующие с мембранами клеток на протяжении жизни, кроме своего специфического, рецепторного действия, могут оказывать и неспецифическое, например антиоксидантное или прооксидантное. Очевидно, такого типа влияние является одним из факторов, объясняющих неоднородность распределения ТБК-реагирующих продуктов и липофусцина в различных областях мозга млекопитающих [8, 21]. В результате таких влияний при старении может изменяться баланс между нейромедиаторными системами, в которых медиаторы существенно отличаются по способности непосредственно влиять на липиды мембран при активации ПОЛ под действием различных факторов. Модифицирующее действие биогенных аминов на ПОЛ,

очевидно, зависит не только от изменений метаболизма клетки в результате специфического взаимодействия медиатора с рецептором, но и от непосредственного влияния аминов на радикальные процессы окисления.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Афанасьев И. Б. // Кислородные радикалы в химии, биологии и медицине. — Рига, 1988. — С. 23—25.
2. Боровок И. В., Молочкина Е. М., Дубинская И. И., Бурлакова Е. Б. // Нейрохимия. — 1988. — Т. 7, № 2. — С. 178—188.
3. Бурлакова Е. Б., Архипова Г. В., Чернявская Л. И. // Биол. мембраны. — 1987. — Т. 4, № 2. — С. 165—170.
4. Владымиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М., 1972.
5. Голубев А. Г. // Успехи соврем. биол. — 1989. — Т. 108, № 3 (6). — С. 414.
6. Дегтярев И. А., Бузуков А. А., Леонова Е. Ю., Заиков Г. Е. // Хим.-фарм. журн. — 1989. — № 4. — С. 398—403.
7. Кейтс М. Техника липидологии. — М., 1974.
8. Клименко Л. Л., Девв А. И., Фокин В. Ф. // Биофизика. — 1987. — Т. 32, № 4. — С. 691—692.
9. Клименко Л. Л., Коломина Л. Н., Фокин В. Ф. // Там же. — С. 689—691.
10. Коган В. Е., Смирнов А. В., Савов В. М., Горкин В. З. // Вопр. мед. химии. — 1984. — № 1. — С. 112—119.
11. Костюк В. А., Козынович А. И. // Там же. — 1987. — № 3. — С. 115—118.
12. Мальцева Е. Л., Бурлакова Е. Б. // Биол. мембраны. — 1986. — Т. 3, № 8. — С. 773—780.
13. Марголис Л. Б., Бергельсон Л. Д. Липосомы и их взаимодействие с клетками. — М., 1986.
14. Меерсон Ф. З., Пшеничкова М. Г. Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам. — М., 1983.
15. Никушин Е. В. // Нейрохимия. — 1989. — Т. 8, № 1. — С. 124—145.
16. Рогинский В. А. // Биол. мембраны. — 1990. — Т. 7, № 3. — С. 297—305.
17. Deber S. I. et al. // J. Neurochem. — 1986. — Vol. 47. — P. 1804—1813.
18. Lake C. R. The Catecholamines in Psychiatric and Neurologic Disorders. — New York, 1985.
19. Maikel R. C., Miller E. // Analyt. Chem. — 1966. — Vol. 30. — P. 1937.
20. Mann D. M. // Mech. Ageing Develop. — 1983. — Vol. 23. — P. 73.
21. Mizuno J. K., Ohta K. // J. Neurochem. — 1986. — Vol. 46. — P. 1344.
22. Shimazaki H. et al. // Biochim. biophys. Acta. — 1984. — Vol. 267, N 2. — P. 123—129.
23. Szoka F. C., Papahadjopoulos J. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1978. — Vol. 75, N 9. — P. 4194—4198.
24. Thor H. et al. // J. biol. Chem. — 1982. — Vol. 257. — P. 12419.

Поступила 07.03.91

#### MODULATION OF LIPID PEROXIDATION BY MEANS OF BIOGENIC AMINES IN MODEL SYSTEMS

E. B. Burlakova, A. E. Gubareva, G. V. Arkhipova, V. A. Roginsky

Institute of Chemical Physics, Academy of Sciences of the USSR, I. M. Sechenov Medical Academy, Moscow

Specific effects of serotonin, histamine, noradrenaline and tyramine on the rate of lipid peroxidation were studied in model systems by means of measurement of malonic dialdehyde and Schiff base concentration as well as of kinetics of  $O_2$  consumption. Alterations in the lipid peroxidation rate in the presence of biogenic amines occurred dissimilarly depending on localization of oxidation substrates either in bilayer membranes or in micellar solution. The antioxidative effect of serotonin was the most pronounced as a result of its ability to react with lipid peroxidation radicals

Л. Н. Маслов, Ю. Б. Лишманов

**ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ ОПИОИДНЫХ ПЕПТИДОВ В СЕРДЦЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ПРИ ОСТРОЙ ИШЕМИИ МИОКАРДА, ОСЛОЖНЕННОЙ ФИБРИЛЛЯЦИЕЙ ЖЕЛУДОЧКОВ**

НИИ кардиологии АМН СССР, Томск

Опиоидные пептиды (ОП) относят к стресслимитирующим системам, функциональное назначение которых сводится к ограничению стресс-реакции и защите организма от стрессорных повреждений [1]. Ключевую роль в патогенезе стрессорных повреждений сердца, нарушений сердечного ритма, вызванных коронароокклюзией, играет избыточная активация адренергического влияния на миокард [1, 10]. Имеются данные о свойстве энкефалинов ограничивать освобождение норадреналина из симпатических нервных окончаний, действуя на пресинаптические опиатные рецепторы, расположенные на симпатических терминалях [2, 6]. Роль опиоидергической системы в патогенезе нарушений сердечного ритма, вызванных острой ишемией миокарда (ОИМ), еще не изучена.

В настоящей работе сделана попытка исследовать взаимосвязь желудочковой фибрилляции (ЖФ) при экспериментальной коронароокклюзии с изменением уровня ОП в плазме крови и миокарде.

**Методика.** Эксперименты выполнены на 125 крысах-самцах линии Вистар массой 200–250 г, у которых под эфирным наркозом производили перевязку левой передней нисходящей коронарной артерии [3]. ЭКГ непрерывно регистрировали в течение 15 мин, что позволило всех животных разделить на две группы. В 1-ю группу были включены крысы, у которых в течение этого промежутка времени развилась необратимая ЖФ (длительностью не менее 3 мин). Ко 2-й группе были отнесены животные, у которых в течение 15 мин фибрилляции не наблюдалось или ее суммарная продолжительность не превышала 60 с. Необходимо подчеркнуть, что перевязка коронарной артерии у всех животных производилась на 3 мм ниже места ее отхождения, и тем не менее у одних животных ЖФ развивалась, а у других нет. Аналогичные факты описывают и другие исследователи [7]. Можно предположить, что вероятность развития ЖФ связана с индивидуальными особенностями

реакции миокарда на ишемию. Контролем служили интактные животные, наркотизированные эфиром. Кровь брали из пореза десны за 10 мин до окклюзии и второй раз после ОИМ. Материал от животных 1-й группы получали во время ЖФ, от животных 2-й группы — через 15 мин после коронароокклюзии. Кусочки ткани миокарда сразу после извлечения замораживали в жидком азоте. Для предотвращения энзиматического гидролиза ОП в пробирки для забора крови вносили натриевую соль ЭДТА в конечной концентрации 20 мкМ.

После забора крови пробирки центрифугировали в рефрижераторной центрифуге ЦЛ-3 при 2000 г в течение 15 мин при температуре 4 °С. Немедленно после забора плазму разделяли на аликвоты и хранили до анализа при -20 °С до экстракции ОП. Определение иммунореактивного β-эндорфина (БЭ) и энкефалинов производили с использованием стандартных РИА-наборов фирмы «Instar» (США). БЭ из плазмы экстрагировали методом аффинной хроматографии на сефарозе, связанной с антителами к БЭ [8]. Экстракцию энкефалинов из плазмы проводили добавлением к плазме крови метанольного раствора 0,1 М HCl (соотношение плазмы и экстрагирующей смеси 1:4), после чего пробы центрифугировали при 2500g в течение 20–30 мин. Надосадочную жидкость переносили в стеклянную пробирку и высушивали под вакуумом при температуре не более 50 °С. Перед анализом высушенный экстракт растворяли в буфере, входящем в состав набора.

Экстракцию энкефалинов из ткани миокарда производили тем же способом, который использовали для плазмы, с той разницей, что навески ткани гомогенизировали в метаноле 0,1 М HCl, БЭ в ткани миокарда не определяли, так как он не синтезируется в сердце [11].

В отдельной серии экспериментов, посвященных влиянию тотальной ишемии на уровень энкефалинов в миокарде, изолированные сердца интактных животных помещали во влажную, термостатируемую при 37 °С камеру.

Результаты обрабатывали статистически с использованием методов вариационной статистики.

**Результаты и обсуждение.** Как видно из табл. 1, острая коронарная ишемия сопровождалась достоверным увеличением концентрации метэнкефалина (МЭ), лейэнкефалина (ЛЭ) в плазме крови. Достоверных отличий по концентрации ОП в крови между животными с ЖФ и без нее выявить не удалось. Содержание БЭ в ответ на ОИМ также увеличивалось с  $3,8 \pm 0,8$  нг ( $n=10$ ) у интактных животных до  $6,4 \pm 0,4$  нг ( $n=11$ ;  $p<0,02$ ) у крыс с ОИМ, но без ЖФ и до  $8,2 \pm 0,5$  нг ( $n=10$ ;  $p<0,02$ ) у крыс с фибрилляцией. Однако выявить достоверные различия по уровню БЭ между животными первой и второй групп не удалось.

Увеличение концентрации энкефалинов в плазме крови животных с ОИМ является, скорее всего,

Таблица 1

Уровень опиоидных пептидов в миокарде и плазме крови при желудочковой фибрилляции у крыс с коронароокклюзией

Показатель	Интактные крысы	Крысы после коронароокклюзии			
		без фибрилляции		с фибрилляцией	
		интактная зона	зона ишемии	интактная зона	зона ишемии
ЛЭ в миокарде, нг/г	$36,8 \pm 5,0$ (32)	$26,3 \pm 5,5$ (9)	$49,5 \pm 12,1$ (7)	$9,7 \pm 1,6$ (8)	$19,9 \pm 4,4$ (12)
$p_1$		$>0,05$	$>0,05$	$<0,001$	$<0,05$
$p_2$				$<0,02$	$<0,05$
МЭ в миокарде, нг/г	$36,4 \pm 7,0$ (16)	$76,5 \pm 15,2$ (12)	$82,9 \pm 13,9$ (11)	$90,7 \pm 30,5$ (8)	$131,2 \pm 29,1$ (9)
$p_1$		$<0,001$	$<0,001$	$<0,05$	$<0,01$
$p_2$				$>0,05$	$>0,5$
ЛЭ в плазме крови, пг/мл	$13,3 \pm 4,6$ (10)		$40,0 \pm 11,6$ (13)		$112,3 \pm 43,0$ (7)
$p_1$			$<0,05$		$<0,05$
$p_2$					$>0,05$
МЭ в плазме крови, пг/мл	$33,9 \pm 8,2$ (9)		$197,1 \pm 29,8$ (16)		$204,3 \pm 67,4$ (5)
$p_1$			$<0,001$		$<0,05$
$p_2$					$>0,05$

Примечание.  $p_1$  — достоверность по отношению к интактным животным,  $p_2$  — достоверность по отношению к крысам без фибрилляции.

проявлением стресс-реакции и согласуется с литературными данными об увеличении уровня ОП при стрессе [5]. Необходимо отметить, что у животных с ЖФ концентрация ЛЭ в плазме была достоверно выше в 2 раза по сравнению с крысами, у которых ОИМ не сопровождалась развитием фибрилляции. Возможно, это связано с более выраженной стресс-реакцией в этой группе и соответственно с более интенсивной мобилизацией катехоламинов из хромоафинных гранул, а вместе с ними ЛЭ, депонирующегося в тех же гранулах, что и катехоламины. Достоверных отличий по исходному уровню ОП (за 10 мин до коронароокклюзии) между животными, у которых в дальнейшем развилась ЖФ, и крысами, у которых фибрилляция после окклюзии не возникла, нам выявить не удалось. Следовательно, циркулирующие в крови ОП не играют существенной роли в возникновении ЖФ при ОИМ.

Воспроизведение коронарной ишемии индуцировало достоверное уменьшение уровня ЛЭ в миокарде в случае возникновения ЖФ, в то время как у животных без ЖФ не удалось обнаружить достоверных изменений содержания этого пептида в сердечной мышце по сравнению с интактными крысами (см. табл. 1). При этом снижение указанного показателя в неишемизированном миокарде было в 2 раза более выраженным, чем в зоне ишемии. Причина такого изменения количества ЛЭ у животных с фибрилляцией осталась невыясненной. Можно предположить, что у крыс с ЖФ в миокарде происходило более интенсивное освобождение депонированных в симпатических нервных волокнах и хромоафинных гранулах ЛЭ [9] и как следствие повышение его доступности для энкефалиназ. Результатом активного расщепления свободного ЛЭ могло быть отмеченное выше уменьшение общего количества данного пептида в сердечной мышце. Обнаруженное нами снижение уровня ЛЭ имело обратную коррелятивную связь с суммарной длительностью фибрилляции: для ишемизированной зоны  $r = -0,51$  ( $p < 0,05$ ), для неишемизированной  $r = -0,56$  ( $p < 0,05$ ). На основании этих данных можно предположить, что ЛЭ играет определенную роль в поддержании нормального сердечного ритма, а уменьшение его содержания может быть одним из патогенетических факторов возникновения аритмий при ОИМ. Действительно, в отдельной серии экспериментов нами было установлено, что внутривенное введение синтетического энзиморезистентного аналога ЛЭ -- даларгина -- в дозе 0,1 мг/кг за 10 мин до коронароокклюзии в значительной степени предупреждает снижение электрической стабильности сердца при ОИМ. Так, у животных, получавших даларгин, порог

желудочковой фибрилляции через 5 мин после коронароокклюзии составил  $3,01 \pm 0,28$  мА ( $n = 27$ ), а у крыс без препарата --  $1,50 \pm 0,27$  мА ( $n = 25$ ;  $p < 0,001$ ).

Содержание МЭ в миокарде крыс при ОИМ, напротив, заметно повышалось (см. табл. 1). Повышение было достоверным как в зоне ишемии, так и вне ее. Достоверных различий в содержании МЭ у животных с ЖФ и без нее мы не обнаружили.

В механизме повышения уровня МЭ в сердечной мышце при ИМ может иметь значение ингибирование аминопептидаз и энкефалиназ, расщепляющих МЭ. Снижение активности этих ферментов может происходить под действием свободных эндогенных катехоламинов [2], высвобождение которых из симпатических терминалей усиливается при ОИМ [1, 4].

Вышепредставленные данные, демонстрируя достоверные изменения энкефалинов в крови и сердце при ОИМ, тем не менее не отвечают на вопрос, являются ли обнаруженные нами изменения уровня ОП результатом стрессорного воздействия на систему нейрогуморальной регуляции обмена энкефалинов в миокарде или же уровень энкефалинов в сердце реагирует на возникающую ишемию миокарда. Для решения этого вопроса потребовались дополнительные исследования, посвященные влиянию тотальной ишемии изолированного сердца на уровень энкефалинов в миокарде.

Как видно из табл. 2, тотальная ишемия изолированного сердца приводила к достоверному увеличению содержания МЭ в 2 раза уже через 1,5 мин. Повышенный уровень этого пептида сохранялся на протяжении всех 15 мин наблюдения. Динамика содержания ЛЭ носила несколько иной характер. Так, за кратковременным достоверным снижением уровня этого пептида в первые 1,5 мин следовало его повышение, которое через 15 мин становилось достоверным.

Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что снижение уровня ЛЭ, связанное с высвобождением его из депо и усиленным катаболизмом, по-видимому, носит защитный характер. В основе указанного эффекта ЛЭ может лежать его способность ингибировать освобождение катехоламинов из симпатических терминалей [2, 6]. По мнению многих исследователей, катехоламины играют ключевую роль в возникновении нарушений сердечного ритма при ОИМ [1, 2]. Вызванные ишемией миокарда изменения уровня ОП в плазме крови и МЭ в ткани сердца, по-видимому, не имеют существенного значения в возникновении ЖФ.

С учетом сказанного весьма логичным представляется предположение о том, что замести-

Таблица 2

Влияние тотальной ишемии на уровень энкефалинов в изолированном сердце

Показатель	Исходный уровень	Время от начала тотальной ишемии, мин			
		1,5	3,0	10	15
МЭ, нг/г	$32,6 \pm 3,8$ (9)	$66,7 \pm 12,3$ (7)	$73,2 \pm 7,9$ (8)	$57,6 \pm 6,0$ (8)	$78,6 \pm 8,3$ (8)
<i>p</i>		$< 0,02$	$< 0,001$	$< 0,01$	$< 0,001$
ЛЭ, нг/г	$19,1 \pm 7,2$ (9)	$2,3 \pm 0,9$ (6)	$45,1 \pm 11,8$ (9)	$46,9 \pm 15,7$	$49,2 \pm 9,6$ (10)
<i>p</i>		$< 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$	$< 0,05$

Примечание. *p* — достоверность по отношению к исходному уровню.

тельная терапия энзимостойчивыми аналогами ЛЭ или стимуляция синтеза эндогенных энкефалинов может оказаться нетрадиционными способами эффективной профилактики нарушений сердечного ритма при острой коронарной ишемии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Меерсон Ф. З., Пшеничкова М. Г. Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам.— М., 1988.
2. Caffrey J. L. // J. Amer. Osteopath. Ass.— 1988.— Vol. 84, N 1.— Suppl.— P. 135—142.
3. Fagbemi O., Kane K. A., Lepran I. // Brit. J. Pharmacol.— 1983.— Vol. 78.— P. 455—460.
4. Godin D., Campean N., Nadean R. // Canad. J. Pharmacol.— 1985.— Vol. 63, N 9.— P. 1088—1095.
5. Howlett T., Tomlin S., Ngahfoong L. // Brit. J. Med.— 1984.— Vol. 28.— P. 1950—1952.
6. Illes P., Ramme D., Starke K. // J. Physiol. (Lond.)— 1986.— Vol. 379.— P. 217—228.
7. Kane K. A., Morcillo E. J., Podger I. W. // Brit. J. Pharmacol.— 1984.— Vol. 82, Suppl.— P. 322.
8. Kikuchi K., Tanaka M., Abe K. // J. clin. Endocr. Metabol.— 1984.— Vol. 59, N 2.— P. 287—292.
9. Lang R. E., Hermann K., Dietz R. // Life Sci.— 1983.— Vol. 32, N 4.— P. 399—406.
10. Lombarde F., Verrier R., Lown B. // Amer. Heart. J.— 1983.— Vol. 105, N 6.— P. 958—965.
11. Wiehe E., McKnight A. T., Corbett A. D. // Life Sci.— 1983.— Vol. 33, Suppl. 1.— P. 711—714.

Поступила 26.07.90

#### ALTERATION OF OPIOID PEPTIDE CONTENT IN HEART AND BLOOD PLASMA UNDER CONDITIONS OF ACUTE MYOCARDIAL ISCHEMIA AGGRAVATED BY VENTRICULAR FIBRILLATION

L. N. Maslov, Yu. B. Lishmanov

Institute of Cardiology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Tomsk

After occlusion of the anterior descending coronary artery content of opioid peptides was increased 2-3-fold in blood plasma of all the rats with and without ventricular fibrillation. Content of Leu-enkephalin was decreased in ischemic and non-ischemic regions of myocardium under conditions of ventricular fibrillation. At the same time, concentration of Met-enkephalin in myocardium was increased in the acute ischemia independently on the effect of fibrillation. Synthetic enzyme-resistant derivative of Leu-enkephalin, administered before acute myocardial ischemia, prevented a decrease in the ventricular fibrillation threshold caused by the occlusion. Alteration of the Leu-enkephalin content in heart tissue appears to be importance in pathogenesis of ventricular fibrillation developed after acute myocardial ischemia.

© Л. А. ФУКАЛОВА, О. Н. ДУБИНИНА, 1992

УДК 612.015.33.014.46: [615.31:547.415.1].084

Л. А. Фукалова, О. Н. Дубинина

#### РЕАКЦИИ ДЕЗАМИНИРОВАНИЯ БИОГЕННЫХ АМИНОВ И ДРУГИХ АЗОТИСТЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ЭТИЛЕНДИАМИНА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА КРЫСАХ

Уфимский НИИ гигиены и профзаболеваний

Широкое применение этилендиамина (ЭДА) в синтезе лекарств, гербицидов и других биологически активных соединений [10] обуславливает актуальность всестороннего изучения биохимических механизмов его токсического действия на организм.

Клинико-гигиеническими исследованиями [3, 4, 13] показана этиологическая роль ЭДА как производственного фактора, ответственного за развитие аллергизации организма работающих и нарушения функционального состояния центральной нервной системы. Можно предположить, что в основе наблюдающихся заболеваний лежат нарушения обмена биогенных аминов (БА), о чем свидетельствуют данные литературы [5, 11, 16].

В то же время известно, что ключевые ферменты обмена БА-моноаминоксидазы (МАО; КФ 1.4.3.4), катализирующие окислительное дезаминирование многих аминов в тканях животных, под влиянием различных факторов могут претерпевать не только количественные (ингибирование, стимулирование), но и качественные изменения (трансформация МАО). Так, при лучевом поражении, злокачественном росте, гипервитаминозе D<sub>2</sub> [6], гипоксии и гипоксии [7], экспериментальном туберкулезе [8], экспериментальной гиперхолестеринемии [14], а также некоторых острых интоксикациях химическими веществами [2] наблюдается появление дезаминирования при участии МАО митохондрий гистамина, путресцина, аминоксахов, АМФ, лизина и других азотистых веществ, в норме не являющихся субстратами МАО.

Ранее в экспериментальных условиях при длительном вдыхании ЭДА в низких концентрациях (0,7—1,0 мг/м<sup>3</sup>) нами выявлено накопление серотонина в печени [12].

Целью настоящей работы была попытка вскрыть некоторые механизмы, лежащие в основе наблюдаемых сдвигов, а также испытать ряд лекарственных средств, обладающих различными фармакологическими свойствами для нормализации функций МАО.

Методика. Были проведены 2 серии опытов на 169 беспородных крысах-самцах. В I серии (80 крыс), проведенной с целью выявления трансформации МАО, определяли активность фермента с различными субстратами в динамике через 2 нед, через 1, 2 и 4 мес вдыхания ЭДА в концентрациях  $0,7 \pm 0,046$  мг/м<sup>3</sup>.

Активность МАО определяли в митохондриальной фракции печени, мозга и селезенки [6]. Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования. Об активности МАО судили по количеству аммиака, отщепленного при дезаминировании субстратов. В инкубационную пробу (конечный объем 1,8 мл) вносили по 3—4 мг митохондрий (в расчете на белок), суспендированных в 0,1 М фосфатном буфере рН 7,4 и один из субстратов в следующих предварительно подобранных в эксперименте оптимальных концентрациях: тирамингидрохлорид — 3 мМ, серотонин-креатинин-сульфат — 5 мМ. В качестве несвойственных для МАО субстратов были использованы: аденозин 5'-монофосфорной кислоты натриевая соль — 10 мМ, глюкозамин солянокислый — 10 мМ, гистамингидрохлорид — 0,1 мМ. Пробу инкубировали при 37 °С в атмосфере кислорода в течение 30 мин. После окончания инкубации пробы фиксировали добавлением трихлоруксусной кислоты (конечная концентрация 5%). Содержание белка в митохондриальной фракции органов определяли колориметрическим методом с реактивом Фолина, используя в качестве стандарта кристаллический бычий сывороточный альбумин [15]. Аммиак определяли методом изотермической отгонки по Конвею с последующей неселеризацией.

Во II серии опытов для нормализации функций МАО были испытаны следующие соединения: дибунол (2,6-дитретбутил-4 метил-фенол, полученный со Стерлитамакского нефтехимического завода), который использовали для ингибирования перекисного окисления липидов (ПОЛ), так как модификация МАО сопряжена с активацией ПОЛ [6]. Масляный раствор дибунола вводили животным ежедневно перорально в дозе 100 мг/кг; диэтон (2,6-диметил-3,5-диэтоксикорбонил-1,4-дигидропиридин, синтезированный в НИИ органи-

Деаминарование азотистых соединений (в нмоль аммиака на 1 мг белка за 1 мин) в пробах с различными субстратами через 2 мес воздействия ЭДА

Орган	Группа животных	Тирамин	Серотонин	Глюкозамин
Печень	Интактные	17,4±1,37	8,7±0,55	0
	Воздействие ЭДА	21,16±1,54	7,47±0,22	1,28±0,49 <i>p</i> <0,01
Мозг	Интактные	3,12±0,23	1,3±0,05	0
	Воздействие ЭДА	2,84±0,19	1,14±0,02 0,02< <i>p</i> <0,05	1,14±0,02 <i>p</i> <0,01
Селезенка	Интактные	2,8±0,8	5,1±1,0	0
	Воздействие ЭДА	5,6±0,86 0,02< <i>p</i> <0,05	3,2±0,8	1,5±0,6 <i>p</i> <0,01

Примечание. В каждой группе было по 10 крыс. Деаминарование гистамина, ЛМФ, ГАМК не было обнаружено ни в одной из групп.

ческого синтеза АН Латвийской ССР и любезно предоставленный Г. Я. Дубуром, за что мы приносим ему глубокую благодарность). Диетон животные получали в дозе 40 мг/кг в подсолнечном масле; антидепрессант пиразидол в дозе 50 мг/кг вводили в желудок 2 раза в сутки в виде водной суспензии.

Воздействие этих препаратов осуществлялось параллельно с началом вдыхания ЭДА в течение 2 мес с профилактической целью, после чего животных забивали. Для устранения развивающейся трансформации MAO мы испытывали аскорбиновую кислоту в дозе 100 мг/кг ежедневно начиная с 1,5 мес опыта в течение 30 дней. По истечении этого срока животных забивали; в органах исследовали реакции деаминарования биогенных аминов и других азотистых соединений.

При статистической обработке данных использовали *t*-критерий Стьюдента, величины, распределение которых отличалось от нормального, рассчитаны в альтернативной форме по Фишеру [9].

**Результаты и их обсуждение.** Известно, что существует как минимум два типа MAO [6]. MAO типа А блокируется низкими концентрациями хлоргиллина, специфически катализирует окисление серотонина и норадреналина. MAO типа В блокируется низкими концентрациями депренила и специфически катализирует окисление бензиламина, 2-фенилэтиламина; тирамин окисляется при участии MAO обоих типов.

В условиях хронического ингаляционного воздействия ЭДА мы не обнаружили изменения активности MAO через 2 нед и 1 мес опыта. Через 2 мес наблюдается снижение активности MAO мозга (субстрат серотонин), в пробах с тирамином активность MAO повышалась в селезенке. В этот же срок появляется глюкозаминдеаминазная активность в митохондриях всех исследованных органов, чего не обнаружено в контрольной группе (см. таблицу).

Можно предполагать, что при длительном воздействии ЭДА трансформация MAO происходит на фоне понижения активности MAO типа А (в тканях мозга), в то время как MAO типа В не изменяется или даже, возможно, активируется в тканях селезенки.

Результаты исследования корригирующего влияния различных химических соединений представлены на рис. 1--3.

Профилактическое введение дибунола предотвращает появление глюкозаминдеаминазной активности в митохондриальной фракции печени, мозга и селезенки. Использование аскорбиновой кислоты в ходе хронического опыта устраняет деаминарование глюкозамина в органах крыс. Диетон не предотвращает деаминарование глюкозамина и даже несколько усиливает его,

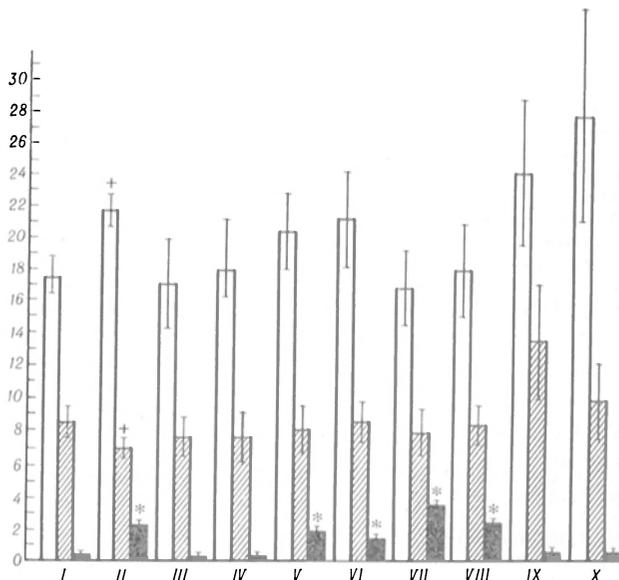


Рис. 1. Действие химических соединений на деаминарование азотистых субстратов в печени крыс.

Здесь и на рис. 2 и 3: по оси ординат — деаминарование (в нмоль аммиака на 1 мг белка за 1 мин); светлые столбики — тирамин, столбики с вертикальной штриховкой — глюкозамин, темные столбики — серотонин; звездочка — *p*≤0,05 (относительно интактных); I — интактные; II — ЭДА; III — дибунол; IV — дибунол+ЭДА; V — диетон; VI — диетон+ЭДА; VII — пиразидол; VIII — пиразидол+ЭДА; IX — аскорбиновая кислота; X — аскорбиновая кислота+ЭДА.

так как сам вызывает трансформацию MAO. Возможно, это объясняется взаимодействием азота пиридинового кольца с тиоловыми группами MAO. Пиразидол также не проявил протекторного действия. Тем не менее интересно отметить, что этот препарат способствует деаминарованию глюкозамина митохондриями печени и селезенки, которое снижается при совместном действии с ЭДА. Эти данные согласуются с результатами других авторов [1]. Следует также заметить, что

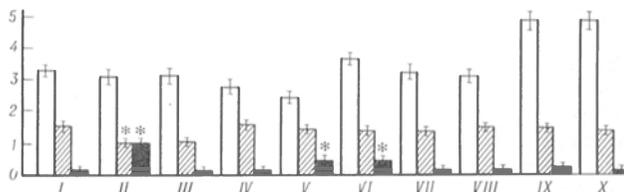


Рис. 2. Действие химических соединений на деаминарование азотистых субстратов в тканях мозга крыс.

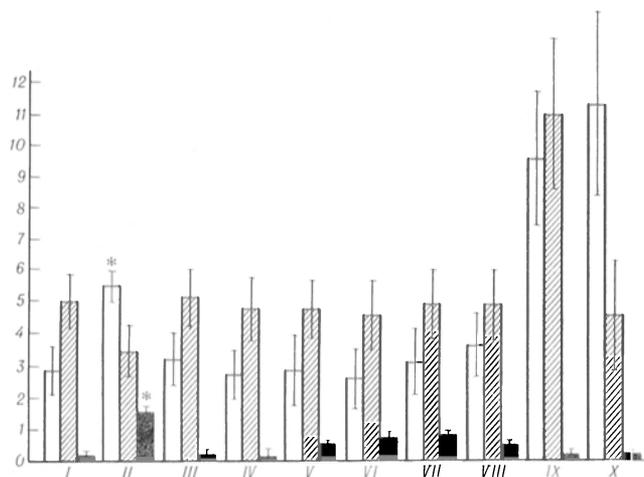


Рис. 3. Действие химических соединений на дезаминирование азотистых субстратов в селезенке крысы.

только дибунол и пиразидол нормализовали дезаминирование серотонина и тирамина.

Таким образом, выявленные нами в эксперименте изменения могут лежать в основе клинических синдромов, наблюдаемых у работающих в контакте с ЭДА. Здесь следует иметь в виду развивающиеся сдвиги в обмене БА, имеющих важнейшее значение в нормальном функционировании центральной нервной и иммунной систем организма.

С другой стороны, в условиях трансформации MAO объектом ее каталитической активности становятся соединения, несущие специфические биохимические функции. Полученные данные свидетельствуют о положительном эффекте антиоксиданта дибунола в условиях хронической интоксикации ЭДА, что наводит на мысль о том, что одним из механизмов токсического действия ЭДА является нарушение процессов свободнорадикального окисления в организме. В условиях наших исследований нарушение каталитической активности MAO развивается в результате длительного воздействия химического фактора в весьма низких концентрациях, не вызывающих выраженных признаков токсического действия. Выявленные сдвиги могут рассматриваться в качестве начальных проявлений развивающейся хронической интоксикации.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бауманис Э. А., Калнина И. Э., Иристе А. А., Горкин В. З. // Вопр. мед. химии.— 1981.— № 1.— С. 72—77.
2. Блюгер А. Ф., Ремберг Л. А., Майоре А. Я., Горкин В. З. // Успехи генетологии / Под ред А. Ф. Блюгера.— Рига, 1984.— С. 28—41.
3. Бронуцкая З. Г., Горошинская И. А., Кричевская А. Р. // Изв. Сев.-Кавк. науч. центра Высш. школы. Естеств. науки.— 1982.— № 1.— С. 77.
4. Валеева Х. П., Назмугдинова В. И., Мустаева И. А. и др. // Казан. мед. журн.— 1979.— № 4.— С. 74—76.
5. Валиев А. Г. // Институт гигиены труда и профзаболеваний АМН СССР: Конф. молодых науч. работников: Тезисы докладов.— М., 1966.— С. 82—83.
6. Горкин В. З. Аминоксидазы и их значение в медицине.— М., 1981.
7. Горкин В. З., Веревкина И. В., Гриднева Л. И. // Современные методы в биохимии.— М., 1968.— Т. 2.— С. 155.
8. Горкин В. З., Елистратова Н. Л. // Вопр. мед. химии.— 1979.— № 6.— Т. 743—748.

9. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях.— Л., 1973.
10. Лазарев Н. В. Вредные вещества в промышленности.— Л., 1976.— Т. 2.— С. 232—233.
11. Тиунов Л. А., Черненький И. К., Качурина Н. А. // Актуальные вопросы клинической и экспериментальной токсикологии.— Горький, 1971.— С. 118—119.
12. Фукалова Л. А., Дубинина О. Н. // Гигиена производственной и окружающей среды, охрана здоровья рабочих в нефтегазодобывающей и нефтехимической промышленности.— М., 1984.— С. 109—117.
13. Хафизуллин Э. У., Бакеева Р. С., Беломытцева Л. А. и др. // Гигиена труда и охрана здоровья рабочих в нефтяной и нефтехимической промышленности.— Уфа, 1972.— Т. 7.— С. 6—9.
14. Хужамбердиев М., Мамадиев М., Горкин В. З. // Вопр. мед. химии.— 1981.— № 6.— С. 829.
15. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem.— 1951.— Vol. 193, N 1.— P. 265.
16. Williams R. I. Detoxication Mechanisms.— London, 1959.

Поступила 04.06.90

#### DEAMINATION OF BIOGENIC AMINES AND OTHER NITROGEN-CONTAINING SUBSTANCES DURING LONG-TERM ADMINISTRATION OF ETHYLENE DIAMINE INTO RATS

L. A. Fukalova, O. N. Dubinina

Institute of Hygiene and Professional Diseases, Ufa

Activity and substrate specificity of monoamine oxidase (MAO) were studied in tissues of rats inhaling low concentrations of ethylene diamine for a long time. While the activity of MAO-A (serotonin as a substrate) was decreased in brain, functions of the enzyme were altered: the enzyme acquired the ability to deaminate glucosamine, which is not a substrate of MAO under normal conditions. Ethylene diamine-dependent modification of MAO was responsible for alterations of the enzyme catalytic properties involved in oxidation of substances with specific biochemical functions. A new drug diethon as well as ionol, pyrazidole and ascorbic acid were used in attempts to normalize the MAO properties; ionol proved to be the most effective compound. Detection of alterations in the MAO catalytic properties, developed after influence of the chemical factor at very low concentrations but without symptoms of toxicosis, may be used as a sensitive test for evaluation of early steps of ethylene diamine-produced intoxication. Ionol may be used for pathogenetic prophylaxis of ethylene diamine caused intoxication.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1992

УДК 616.831-008.931:577.152.143]-02:615.355]-07

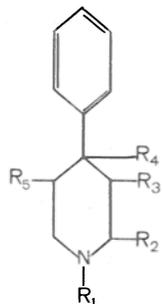
А. Г. Ишков, Н. В. Ермаков, С. В. Микеров, Ю. Ю. Кляцкий, Е. В. Мирошниченко

#### ПРОИЗВОДНЫЕ 4-ФЕНИЛПИПЕРИДИНА — СУБСТРАТЫ МОНОАМИНОКСИДАЗЫ МОЗГА КРЫСЫ

Научный центр молекулярной диагностики Минздрава СССР, Москва

Открытие того факта, что простые гетероциклические азотистые соединения вызывают нейрохимические изменения, которые сходны с идиопатической болезнью Паркинсона, привели к появлению гипотезы о том, что этиология этого заболевания может быть связана с нейрональными нарушениями, вызываемыми эндогенными и (или) экзогенными метилфенилтетрагидропиридинподобными [2, 3, 5, 7, 9]. Показано, что нарушение дофаминергической системы происходит после окисления метилфенилтетрагидропиридина (МФТП) при участии моноаминоксидазы (MAO)

Структурная формула 5-фенилпиперидина	Соединение	Условное обозначение	Заместители в R-группах					Интенсивность окисления, % от МФТП
			R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	
	4-фенилпиперидин	ФПП	H	H	H	H	H	16 (Б)
	1-метил, 4-фенил, 3-пиперидинол	ИК-3	CH <sub>3</sub>	H	OH	H	H	12 (Б)
	1-метил, 4-фенил, 4-пиперидинол	ИК-4	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	8 (А)
	1-метил, 4-фенил, 4ω-хлорбутироксипиперидин	ИК-7	CH <sub>3</sub>	H	H	-OC(O)-OH	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -Cl	9,5 (А)
	1-метил, 4-фенил, 4-(2'фторбензоилокси)пиперидин	ИК-10	CH <sub>3</sub>	H	H	-OC(O)-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (F)	H	105 (А)
	1-метил, 4-фенил, 4-пропионилоксипиперидин	ИК-13	CH <sub>3</sub>	H	H	-OC(O)-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	15,2 (А+Б)
	Бис(1-метил, 4-фенил, 4-пиперидин (терифталат))	ИК-14	CH <sub>3</sub>	H	H	-OC(O)-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (бис)-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (O)CO-	H	48 (А)
	1-метил, 4-фенил, 4-бензилоксипиперидин	ИК-16	CH <sub>3</sub>	H	H	-OC(O)-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	H	50 (А+Б)
	1-метил, 4-фенил, 3-пропионилоксипиперидин	ИК-33	CH <sub>3</sub>	H	-OC(O)-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	H	≤1 %
	1-метил, 4-фенил, 3-(4'фторбензоилокси)пиперидин	ИК-50	CH <sub>3</sub>	H	-OC(O)-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (F)	H	H	≤1 %
	1-метил, 4-фенил, 3-(2'фторбензоилокси)пиперидин	ИК-60	CH <sub>3</sub>	H	-OC(O)-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (F)	H	H	≤1 %
	1-метил, 4-фенил, 3-фторацетилоксипиперидин	ИК-61	CH <sub>3</sub>	H	-OC(O)-CH <sub>2</sub> F	H	H	6 (Б+А)
	1-метил, 4-фенил, 3-перметрилоксипиперидин	ИК-82	CH <sub>3</sub>	H		H	H	25 (Б+А)
	1-метил, 4-фенил, 1,2,3,6-тетрагидропиперидин	МФТП	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	100 (Б)



Примечание. В крайнем правом столбце в скобках — тип MAO.

мозга. Наличие двойной связи в пиридиновом кольце считают обязательным условием для окисления МФТП и его производных при участии МАО.

В настоящей работе исследовали окисление при участии МАО 4-фенилпиперидина (ФПП) и его производных, в азотистом гетероцикле которых двойная связь отсутствует.

**Методика.** Исследование окисления ФПП и его производных при участии МАО проводили в системах с препаратами биомембран из *corpus striatum* мозга крысы Sprague-Dowley [4]. Ткань гомогенизировали в охлажденной 0,32 М сахарозе, приготовленной на 0,1 М натрий-фосфатном буфере (рН 7,4), используя стеклянный гомогенизатор Поттера. Обломки клеток и ядра 10 % (объем/вес) гомогената удаляли центрифугированием при 200 g в течение 20 мин. Надосадочную жидкость, содержащую МАО митохондрий глимальных клеток и МАО синапсом, центрифугировали при 16 000 g в течение 10 мин. Осадок, содержащий митохондрии и синапсомы, в мембране которых, как известно, локализована МАО, промывали дважды 0,1 М натрий-фосфатным буфером рН 7,4 и затем суспендировали в нем (0,05—0,2 мг белка на 1 мл суспензии). В стеклянные пробирки вносили по 300 мкл полученной суспензии и инкубировали в течение 5 мин при 37 °С. Затем в пробы вводили по 50 мкл раствора хлоргидина и (или) депренила, с тем чтобы конечная концентрация этих селективных и необратимых ингибиторов МАО типов А и Б составляла  $1 \cdot 10^{-6}$  М; пробы инкубировали в течение 30 мин. Затем в пробы вносили по 50 мкл 8 мМ каждого из тестируемых химических соединений. Затем пробы инкубировали в течение 60 мин при 37 °С и при постоянном перемешивании. После окончания инкубации в пробах измеряли содержание перекиси водорода [8] и флуоресцирующих продуктов [1]. Содержание белка определяли по методу Лоури [6].

**Результаты и обсуждение.** В таблице показана интенсивность окисления при участии МАО ФПП и его производных (1 мМ) при их инкубации в описанных выше системах (см. раздел «Методика»). Вклад каждой из двух форм МАО в процесс окисления исследованных соединений представлен на рис. 1.

Показано, что отсутствие двойной связи в молекуле азотсодержащего гетероцикла не является препятствием для протекания реакции окисления субстрата, катализируемой МАО. Производные ФПП составляют основу некоторых лекарственных препаратов. Их возможный побочный нейротоксический эффект при условии проникновения через гематоэнцефалический барьер и взаимодействия с МАО мозга следовало бы принимать во внимание.

Наличие заместителя в положении 3 кольца пиперидина приводит, очевидно, к предпочтительному взаимодействию соединения с МАО-Б, а в положении 4 — с МАО-А. Наличие предельных заместителей в положении 4 подавляет катализируемое МАО окисление; наличие фторсодержащих

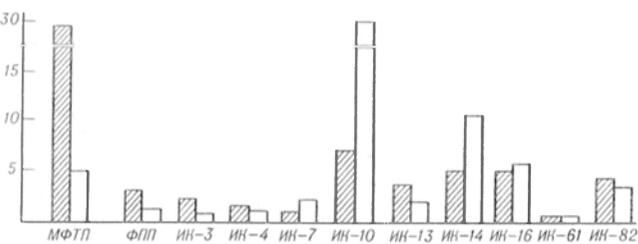


Рис. 1. Вклад МАО-А (светлые столбики) и МАО-Б (затененные столбики) мозга крысы в процессе окисления МФТП, ФПП и производных ФПП (все в концентрации 1 мМ).

По оси абсцисс — тестируемые химические соединения (см. таблицу); по оси ординат здесь и на рис. 3 — содержание перекиси водорода (в нмоль  $H_2O_2$  на 1 мг белка за 1 ч).

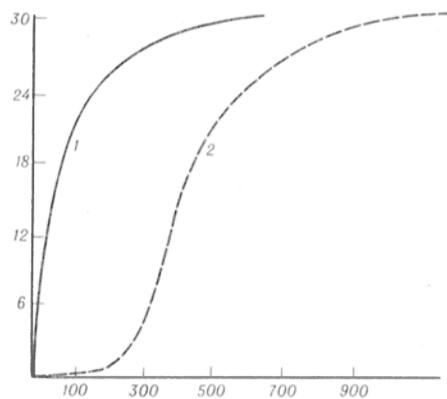


Рис. 2. Зависимость катализируемых МАО процессов окисления МФТП и ИК-10 от концентрации этих субстратов.

По оси абсцисс — концентрация (в мМ) субстратов. 1 — МФТП (окисление при участии МАО-Б); 2 — ИК-10 (окисление при участии МАО-А).

циклических структур повышает интенсивность окисления при участии МАО производных ФПП.

Для 3 производных ФПП (ИК-33, ИК-50, ИК-60) интенсивность окисления их в катализируемой МАО реакции составляло менее 1 % от интенсивности окисления МФТП.

На рис. 2 представлена зависимость интенсивности катализируемых МАО процессов от концентрации одного из двух субстратов — МФТП и ИК-10. МФТП окисляется при участии преимущественно МАО-Б (см. таблицу), как и можно было ожидать на основании литературных данных [3, 5, 7, 9]. Окисление ИК-10 (1 мМ) в пробах с МАО мозга протекало с такой же интенсивностью, как и процесс окисления МФТП. Но при низких концентрациях соединения ИК-10 практически не окислялось при участии МАО-А. Можно полагать, что такие концентрации ИК-10 в тканях мозга не приводили бы к развитию нейротоксического эффекта.

Тест-система, в которой в качестве содержащего МАО материала используются фрагменты биомембран головного мозга (см. раздел «Методика»), предназначена для исследования в качестве возможных субстратов МАО гетероциклических азотистых соединений в широком диапазоне концентраций (0—1 мМ). При дальнейшем исследовании ФПП и его 12 производных только в 6 случаях мы отмечали развитие нейротоксического эффекта, сопровождавшегося снижением дофамина в тканях мозга животных [7]. Для некоторых соединений была также отмечена нейротоксичность с использованием культур нервных клеток из эмбриона человека.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ермаков Н. В., Ишков А. Г., Микеров С. В., Мирошниченко Е. В. // *Вопр. мед. химии.* — 1991. — № 3. — С. 67—68.
2. Ишков А. Г., Согниченко А. И., Семенов С. Ю. // Конференция «Нейромедиаторы и поведение»: Материалы. — Новосибирск, 1988.
3. Booth R. G., Trevor A., Singer T. P., Castagnoli N. // *J. med. Chem.* — 1989. — Vol. 32. — P. 437—472.
4. Gray F. G., Whittaker V. P. // *J. Anat.* — 1962. — Vol. 96. — P. 79—88.
5. Heikkila R. E., Kindt M. V., Sonsalla P. K., Giovanni A. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.* — 1988. — Vol. 85. — P. 6172—6178.
6. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // *J. biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193. — P. 265—271.

7. *Riaachi N. J., Arora P. K., Sayre L. M., Haric S. I.* // *J. Neurochem.*— 1988.— Vol. 50.— P. 1319—1321.
8. *Szutowicz A., Kobes R. D., Orsulak P. J.* // *Analyt. Biochem.*— 1984.— Vol. 138.— P. 86—94.
9. *Yongster S. K., Sousalla P. K., Heikkila R. E.* // *J. Neurochem.*— 1987.— Vol. 48.— P. 929—934.

Поступила 20.11.90

#### DERIVATIVES OF 4-PHENYL PIPERIDINE AS POTENTIAL NEUROTOXINS AND SUBSTRATES OF BRAIN MONOAMINE OXIDASE

*A. G. Ishkov, N. V. Ermakov, S. V. Mikerov, Yu. Yu. Klyatsky, E. V. Miroshnichenko*

All-Union Research Center of Molecular Diagnosis, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

A rate of utilization of 4-phenyl piperidine and its 12 derivatives by brain monoamine oxidase (MAO) was studied as compared with typical neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). The enzyme was isolated from P<sub>2</sub> synaptosomal fraction of brain *corpus striatum* of Sprague-Dowley rats. 10 drugs were oxidized in the MAO-catalyzed reaction with the rate close or similar to the MPTP oxidation while 6 of them exhibited the neurotoxic effect. Analysis of MAO inhibition, using 1 μM of chlorgiline and/or deprenyl, enabled to evaluate the contribution of MAO-A and MAO-B forms to utilization of 1 mM content of the substances studied. MAO-B was shown to oxidize preferably the drugs radicals of which were substituted at 3rd position of the piperidine ring, while MAO-A preferred the derivatives with radical substitution at 4th position. The rate of substrate oxidation was decreased distinctly after introduction of complete substituents into the 3rd and 4th positions of the nitrogenous heterocycle; at the same time, presence of cyclic fluorine-containing structures increased the rate of utilization, similar to that of MPTP oxidation. Derivatives of 4-phenyl piperidine, which contained in a number of drugs, were oxidized in the MAO-catalyzed reactions and might exhibit direct- or side-neurotoxic effects.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1992

УДК 616-008.831.577.1.041-074

*В. З. Горкин, Л. В. Губский, Н. С. Камышанская, А. З. Киркель, Л. Н. Овчинникова*

#### О ПРИРОДНЫХ МОДУЛЯТОРАХ ФУНКЦИЙ СИСТЕМЫ АМИНОКСИДАЗ В ОРГАНИЗМЕ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Изучение природных модуляторов функций аминоксидаз [5] в норме и при патологических состояниях представляется актуальной проблемой, в частности в связи с исследованиями нейрохимических основ патогенеза алкоголизма и наркоманий [1, 4]. Комплексная оценка состояния системы природных модуляторов функций аминоксидаз в организме может служить одним из подходов к выяснению имеющих важное значение для медицины механизмов [1, 2] нарушений метаболизма дофамина и других биогенных аминов, а также биологических функций флавинозависимых моноаминоксидаз (MAO) и пирролохинолинхинонзависимых, медьсодержащих диаминоксидаз (DAO) в норме и при патологических состояниях.

Целью настоящей работы было выяснение вопроса о наличии и особенностях воздействия на каталитическую активность MAO типа А (из плаценты человека), MAO типа Б (из головного мозга крысы), а также диаминоксидазы (из плаценты человека) природных модуляторов функций ами-

ноксидаз спинномозговой жидкости (СМЖ) человека при хроническом алкоголизме.

**Методика.** Исследовали СМЖ, полученную в условиях стационара у 19 пациентов, которые были госпитализированы для обследования и лечения по поводу хронического алкоголизма. Все пациенты были мужского пола (возраст от 24 до 80 лет).

Для воспроизведения экспериментальной хронической алкогольной интоксикации белых беспородных крыс-самцов (масса тела в начале эксперимента 150—180 г) содержали 10 мес на рационе, в котором вода для питья была последовательно заменена (в течение 2 нед) на 5%, 10% и 15% водный раствор этанола. Контрольных животных содержали в идентичных условиях, но воду на этанол не заменяли. Контрольных и подопытных животных декапитировали, как описано в методических рекомендациях Минздрава СССР.

Для получения митохондриальных фракций немедленно после декапитации извлекали головной мозг, промывали ткань мозга охлажденным 0,9% раствором хлористого калия и гомогенизировали (1:9, тефлон — стекло) в 0,1 М калий-фосфатном буфере pH 7,4. Из полученного гомогената выделяли митохондриальную фракцию методом дифференциального центрифугирования, как было указано в предшествующих публикациях [6]. В случае необходимости митохондриальные фракции и СМЖ сохраняли до начала эксперимента при —20 °С.

Активность MAO определяли модифицированным радиометрическим методом [7], используя в качестве субстратов <sup>14</sup>C-серотонин-креатининсульфат («Амершам», Англия) в конечной концентрации 1,5·10<sup>-4</sup> М (удельная радиоактивность 10 Ки/моль) или <sup>14</sup>C-β-фенилэтиламин-хлоридат («Амершам», Англия) в конечной концентрации 1·10<sup>-4</sup> М (удельная радиоактивность 5 Ки/моль). При указанных низких концентрациях величина скорости окислительного дезаминирования серотонина и β-фенилэтиламина отражает каталитические свойства MAO типов А и Б соответственно [11]. При исследованиях воздействия модуляторов, имеющихся в СМЖ человека, на каталитическую активность MAO головного мозга крысы в инкубационные пробы вносили по 30 мкл 0,05 М калий-натрий фосфатного буфера pH 7,4, по 5 мкл суспензии митохондрий в указанном фосфатном буфере (по 28 мкл белка в пробу) и по 45 мкл СМЖ. Пробу преинкубировали 30 мин при 20 °С, после чего в них вносили по 20 мкл растворов одного из субстратов. Длительность инкубации при 37 °С проб с серотонином составляла 90 мин, с β-фенилэтиламином — 60 мин. За это время реакции окислительного дезаминирования биогенных аминов подчинялись уравнению реакций нулевого порядка. После окончания инкубации пробы фиксировали добавлением 0,1 мл 0,8 М серной кислоты (в опытах с серотонином) или 0,1 мл 1 М соляной кислоты (в опытах с β-фенилэтиламином). Экстракцию продуктов окислительного дезаминирования серотонина или β-фенилэтиламина проводили путем встряхивания проб со смесью этилацетат — сцинтилляционная жидкость ЖС-106 (1:1) или со сцинтилляционной жидкостью ЖС-106 соответственно. Подсчет импульсов осуществляли в жидкостном сцинтилляционном счетчике «Марк-2» («Нуклеар Чикаго», США).

Плаценту получали после нормальных своевременных родов в родильном доме № 6 Москвы. Ткань плаценты отмывали от крови, отделяли от сосудистых оболочек и готовили 30% гомогенат в 0,25 М сахарозе на 20 мМ фосфатном буфере pH 7,0, содержащем 0,5 мМ ЭДТА. Субклеточные фракции получали путем дифференциального центрифугирования приготвленных таким образом гомогенатов. Обрывки клеток и клеточные ядра осаждали при 1500 г в течение 15 мин и отбрасывали. Митохондрии осаждали путем центрифугирования (10 000 г, 20 мин). Полученную надосадочную жидкость центрифугировали дополнительно (20 000 г, 30 мин). Образовавшийся осадок отбрасывали, а из надосадочной жидкости осаждали микросомы ультрацентрифугированием (105 000 г, 60 мин). Митохондриальные и микросомальные фракции дважды промывали фосфатным буфером, суспендировали в нем и сохраняли при —20 °С.

Солубилизованные препараты MAO из митохондриальных и микросомальных фракций гомогенатов плаценты человека получали путем сочетанного воздействия низких концентраций поверхностно-активных веществ (ПАВ) различной природы: 0,2% дезоксихолата натрия («Кох-Лайт», Англия) и 0,4% октил-β-D-глюкопиранозид («Кальбайкем», США).

Из цитоплазматической фракции гомогената плаценты человека путем фракционирования сульфатом аммония (40—60% насыщения) с последующей гель-фильтрацией через колонку с тойопирл HW-55 («Тойо-Сода», Япония) и сгущения

активных фракций методом ультрафильтрации [8] получали частично очищенный препарат ДАО.

Каталитическую активность ДАО определяли радиометрическим методом, используя <sup>14</sup>C-путресцин в качестве субстрата [7]. В инкубационные пробы вносили по 160 мкл 0,05 М фосфатного буфера рН 7,0, по 20 мкл ферментного препарата и по 20 мкл 100 мкМ раствора путресцина с удельной радиоактивностью 10 Ки/моль. Пробы инкубировали 30 мин при 37 °С, после чего в пробы добавляли по 40 мкл насыщенного водного раствора бикарбоната натрия и по 2 мл толуольной сцинтилляционной жидкости ЖС-106. Для экстракции продуктов реакции пробы встряхивали в течение 3 мин при помощи механического встряхивателя.

Активность МАО в митохондриальных и микросомальных фракциях гомогената плаценты человека определяли модифицированным радиометрическим методом [7], используя в качестве субстрата <sup>14</sup>C-серотонин-креатининсульфат в конечной концентрации 4 мкМ (удельная радиоактивность 55 Ки/моль). В инкубационные пробы вносили по 160 мкл 0,05 М НЕРЕС-буфера (N-2-гидроксипиперидин-N'-2-этансульфокислота) рН 8,2, по 20 мкл ферментного препарата (по 20 мкг на пробу), по 20 мкл 40 мкМ раствора серотонина. Пробы инкубировали 30 мин при 37 °С, после чего их фиксировали добавлением 0,4 мл 0,2 М серной кислоты. Продукты реакции экстрагировали 2 мл смеси сцинтилляционной жидкости ЖС-106 и этилацетата (1:1).

При исследованиях модуляторов аминоксидазной активности в пробы вносили СМЖ (в соотношении 1:1,5 по содержанию белка в ферментном препарате: СМЖ). Пробы преинкубировали 30 мин при 20 °С, после чего реакцию начинали добавлением субстрата.

Методы определения содержания белка и статистической обработки полученных результатов указаны в предшествующих сообщениях [6].

**Результаты и обсуждение.** По нашим данным (табл. 1), все 19 исследованных образцов СМЖ оказывали определенное воздействие на активность МАО типов А и В митохондриальных фракций гомогенатов головного мозга крыс, но характер этого воздействия был различным в отдельных случаях. Условно можно отметить четыре варианта модулирующего эффекта: I — в большинстве случаев (9 из 19) в присутствии СМЖ имела место стимуляция активности как МАО-А, так и МАО-Б; II — в 7 случаях в присутствии СМЖ наблюдали стимуляцию активности МАО-А при одновременном ингибировании активности МАО-Б; III — в 2 случаях внесение в пробы СМЖ приводило к ингибированию активности МАО-А и МАО-Б; IV — СМЖ одного пациента оказывала стимулирующее воздействие на активность МАО-Б митохондриальной фракции гомогената головного мозга крыс, но практически не изменяла активность МАО-А в этом биологическом объекте.

При сопоставлении модулирующих эффектов образцов СМЖ, полученных от разных пациен-

тов, были отмечены значительные вариации, но результаты повторных исследований модулирующего действия СМЖ одного пациента на активность МАО-А и МАО-Б митохондриальной фракции гомогенатов мозга крыс обнаруживали хорошую воспроизводимость. Нам не удалось отметить зависимость между результатами клинических наблюдений за исследованными пациентами и особенностями модулирующего действия их СМЖ в системах с митохондриальными фракциями гомогенатов головного мозга крыс. Замена в таких системах митохондриальных фракций головного мозга контрольных (не контактировавших с алкоголем) крыс полученными в идентичных условиях митохондриальными фракциями гомогенатов головного мозга крыс, подвергавшихся хронической алкоголизации, не привела к изменениям характера модулирующего эффекта СМЖ обследованных пациентов на активность МАО-А или МАО-Б митохондрий мозга (11 пациентов).

Контролируемое прогревание (3 мин при 100 °С) СМЖ (2 пациента) не оказывало влияния на ее свойство стимулировать активность МАО-А, но предотвращало стимуляцию активности МАО-Б в митохондриальной фракции гомогената головного мозга крысы.

Нами было установлено, что инкубация СМЖ при рН 6,0–9,0 в течение 30 мин при 37 °С с серотонином, β-фенилэтиламинном или гистамином при конечных концентрациях одного из аминов 0,1 мМ или 1 мМ не приводила к их окислительному дезаминированию (4 пациента).

Длительный диализ (20 ч при 4 °С с тремя сменами 1000-кратного объема буферного раствора) предотвращал проявления свойства СМЖ (от 2 пациентов) стимулировать активность МАО-А, но не влиял на модулирующий эффект по отношению к МАО-Б митохондриальной фракции гомогената головного мозга крысы.

Используя в качестве биологического источника МАО-А митохондриальные или микросомальные фракции гомогената плаценты человека, мы установили, что СМЖ, полученная от 15 пациентов, страдавших хроническим алкоголизмом, во всех случаях обнаруживала свойство ингибировать активность МАО-А (табл. 2). В присутствии ПАВ этот ингибирующий эффект был выражен особенно четко.

В опытах с частично очищенным препаратом ДАО плаценты человека мы не обнаружили какого-либо модулирующего воздействия СМЖ (5 пациентов) на каталитическую активность этого фермента.

Полученные результаты могут быть объяснены, если допустить существование в СМЖ человека сложной системы модуляторов (активаторов и

Таблица 1

Изменения (в %) в присутствии СМЖ человека активности МАО-А (над чертой) и МАО-Б (под чертой) митохондриальных фракций гомогената головного мозга крысы

Вариант модулирующего эффекта	M	m	n	Предел вариаций
I	132	31	9	109—217
	217	40	9	118—548
II	131	17	7	106—150
	81	13	7	60—89
III	85; 83		2	
	46; 92		2	
IV	97		1	
	170		1	

Таблица 2

Ингибирование (в %) в присутствии СМЖ человека (n=15) активности МАО-А митохондриальной и микросомальной фракции плаценты человека

Фракция	M	m	Предел вариаций
Митохондрии	28	15	12—64
Митохондрии+ПАВ	51	24	13—85
Микросомы	34	18	10—66
Микросомы+ПАВ	65	23	20—100

ингибиторов) функций мембраносвязанных МАО. Эти модуляторы, по-видимому, неидентичны описанным ранее природным модуляторам функций МАО [3]. Так в СМЖ человека были обнаружены эндогенные белковые ингибиторы МАО типов А и Б [10]. Но природные, проникающие через диализационную мембрану и термостабильные активаторы МАО-А мозга, обнаружены нами в СМЖ человека (в случаях хронического алкоголизма) впервые. Для выявления этих стимулирующих воздействий, очевидно, важны не только свойства СМЖ, но также свойства препаратов МАО. Так, например, образцы СМЖ, стимулирующие активность МАО-А в митохондриальной фракции гомогената головного мозга крысы, где преобладают МАО-Б [4], в системе с митохондриальными или микросомальными фракциями гомогенатов плаценты человека, где преобладают МАО-А, ни в одном случае стимулирующий эффект не обнаруживали. В сыворотке крови человека имеются термостабильные и термолабильные модуляторы активности МАО гомогената печени крысы в системах с пара-нитрофенилэтиламином в качестве субстрата МАО типа Б [3]. Имеющаяся информация об этих модуляторах не позволяет идентифицировать их с теми модуляторами МАО типов А и Б, которые имеются, очевидно, в СМЖ человека при хроническом алкоголизме. По особенностям действия модуляторы МАО из СМЖ человека отличаются от таких низкомолекулярных природных ингибиторов, как трибулин (изатин) [12] или хинолиновая кислота [13], которые преимущественно ингибируют активность МАО типа Б.

Таким образом, в СМЖ больных хроническим алкоголизмом нами обнаружены ранее неизвестные природные модуляторы каталитической активности мембраносвязанных (флавиносодержащих) МАО митохондриальных фракций гомогенатов головного мозга крысы, а также митохондриальных и микросомальных фракций гомогенатов плаценты человека. Исследуемые модуляторы не оказывали воздействия на активность (субстрат —  $^{14}\text{C}$ -путресцин) частично очищенной ДАО (медь-зависимой аминоксидазы) из плаценты человека. Природные модуляторы активности МАО в СМЖ человека термостабильны (в течение 3 мин при  $100^\circ\text{C}$ ), проникают сквозь диализационную мембрану и по этим признакам отличаются от описанных ранее в СМЖ человека высокомолекулярных модуляторов МАО [10]. В системах с мембраносвязанными МАО плаценты человека, где преобладают МАО-А, исследуемые модуляторы преимущественно ингибировали ферментативную активность (субстрат —  $^{14}\text{C}$ -серотонин). Но в системах с мембраносвязанными МАО головного мозга крысы, где преобладают МАО-Б, модуляторы из СМЖ человека вызывали как ингибирование, так и стимуляцию реакций окислительного дезаминирования  $^{14}\text{C}$ -серотонина или  $^{14}\text{C}$ - $\beta$ -фенилэтиламина вне зависимости от особенностей клинических проявлений алкоголизма. Исследуемые модуляторы по особенностям действия неидентичны трибулину (изатину) [12] или хинолиновой кислоте [13].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Анохина И. П. // Медико-биологические проблемы алко-

- голизма / Под ред. Н. Н. Иванца. — М., 1988. — С. 3—6.  
 2. Анохина И. П., Коган Б. М. // Теоретические основы поиска средств для лечения алкоголизма. — М., 1984. — С. 151—178.  
 3. Гамалея Н. Б. // Алкоголизм. — М., 1981. — С. 75—81.  
 4. Москвитина Т. А., Камышанская И. С., Каверина Л. П., Горкин В. З. // Вопр. мед. химии. — 1977. — № 2. — С. 352—358.  
 5. Овчинникова Л. П. // Вопр. мед. химии. — 1988. — № 6. — С. 16—23.  
 6. Овчинникова Л. П., Горкин В. З., Анохина И. П. // Там же. — 1989. — № 2. — С. 124—128.  
 7. Пеккель В. А., Аксенова Л. П., Боймурзаев М. И. // Лаб. дело. — 1987. — № 7. — С. 491—496.  
 8. Пеккель В. А., Позднеев В. Ф., Киркель А. З. и др. // Биохимия. — 1989. — Т. 54, № 12. — С. 1986—1993.  
 9. Anokhina I. P., Ivanetz N. N., Burov Yu. V., Kogan B. M. // Brit. J. Addict. — 1987. — Vol. 82. — P. 23—30.  
 10. Becker R. E., Giambalvo V., Fox R. A., Macho M. // Science. — 1983. — Vol. 221. — P. 476—478.  
 11. Dostert P., Strolin-Benedetti M., Tipton K. F. // Med. Res. Rev. — 1989. — Vol. 9. — P. 45—90.  
 12. Glover V., Halket J. M., Watkins P. J. et al. // J. Neurochem. — 1988. — Vol. 51. — P. 656—659.  
 13. Naoi M., Ishiki P., Nomura V. et al. // Neurosci. Lett. — 1987. — Vol. 74. — P. 232—236.

Поступила 20.01.91

#### ON NATURAL MODULATORS OF AMINE OXIDASES

V. Z. Gorkin, L. V. Gubsky, N. S. Kamyshanskaya, A. Z. Kirkel, L. N. Ovchinnikova

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

In cerebrospinal fluid (CSF) obtained from patients with chronic alcoholism natural modulators of monoamine oxidase (MAO) activity, containing in human mitochondrial and microsomal fractions or in rat brain mitochondria, have been found. These modulators, which were previously unknown, did not affect the activity of partially purified diamine oxidase from human placenta with  $^{14}\text{C}$ -putrescine as a substrate. The MAO modulators from CSF were thermostable (during 3 min at  $100^\circ$ ), penetrated through dialysing membrane thus differing from high molecular modulators of MAO previously described. In the system containing membrane bound MAO from human placenta, where the MAO-A is predominating, the modulators studied mostly inhibited deamination of  $^{14}\text{C}$ -serotonin. However, in the system containing membrane bound MAO from rat brain with prevalence of the MAO-B, the modulators from human CSF caused either inhibition or stimulation of oxidative deamination of  $^{14}\text{C}$ -serotonin or  $^{14}\text{C}$ -beta-phenylethylamine used as substrates. The modulators studied were not similar to tribuline (isatin) or quinolinic acid in their effects on catalytic properties of the amine oxidases investigated.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1992

УДК 612.35.014:547.458.63].085.1

И. А. Попова, В. Н. Преснова, Т. П. Лавренова

#### ВЛИЯНИЕ БИОГЕННЫХ АМИНОВ НА ДЕГРАДАЦИЮ ГЛИКОГЕНА В ИЗОЛИРОВАННЫХ ГЕПАТОЦИТАХ КРЫСЫ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Известно, что врожденные энзимопатии гликозидаз, участвующих в обмене гликогена, могут привести к аномальному накоплению этого полисахарида в тканях и возникновению различных типов гликогенозов (гликогеновой болезни) как у человека, так и у животных. Кроме наследственных гликогенозов, вызванных генетическими дефектами ферментов, аналогичные заболевания мо-

гут возникать в результате применения некоторых лекарственных препаратов и других биологически активных соединений различной природы, являющихся ингибиторами ферментов, участвующих в обмене гликогена. Использование таких агентов *in vivo* или в условиях культивирования разных видов клеток позволяет получить искусственные модели гликогеновой болезни [4]. Поскольку действие большинства используемых для этой цели агентов обратимо, аналогия между полученными с их помощью моделями гликоноза и заболеваний, вызванными наследственными дефектами ферментов, весьма условна. Однако получение искусственных моделей гликоноза необходимо для разработки специфических методов коррекции этих тяжелых болезней.

В данной работе сделана попытка использовать в качестве агентов, нарушающих расщепление гликогена в клетке, некоторые биогенные амины. Основанием для этого послужил обнаруженный нами ранее факт ингибирования активности  $\alpha$ -глюкозидазы в органах крысы рядом биогенных аминов или их метаболитов [2]. Целью настоящей работы было изучение влияния серотонина и тирамина на содержание гликогена и активность расщепляющих его ферментов в изолированных гепатоцитах крысы.

**Методика.** Гепатоциты выделяли из печени крыс-самцов массой около 200 г, используя в качестве раствора для перфузии печени кребс-рингер-бикарбонатный буфер pH 7,4. Вначале в течение 3 мин печень перфузировали названным буфером в присутствии 0,5 мМ ЭГТА (без Са и Mg), а затем в течение 10--15 мин — с добавлением 0,03 % коллагеназы [6]. Из выделенных гепатоцитов готовили суспензию таким образом, чтобы инкубационная смесь для определения активности ферментов содержала  $1,0 - 0,5 \cdot 10^6$  клеток.

Содержание гликогена в гепатоцитах определяли после осаждения белков 10 % ТХУ, последующего осаждения холодным 95 % этанолом, растворения в воде и расщепления плесневой амилаглюкозидазой при pH 4,8 по образованию глюкозы, определяемой глюкозооксидазным методом. Способность клеток к образованию гликогена оценивали после их инкубации с субстратной смесью, содержащей 50 мМ глюкозу, 0,05 % гликоген, 0,15 мМ УДФГ и 1 мМ глюкозо-6-фосфат в течение 1,5 ч.

Активность общей фосфоорилазы определяли по методу [5], основанному на определении неорганического фосфата ( $P_{ii}$ ), освобождаемого из глюкозо-1-фосфата в реакции биосинтеза гликогена. Инкубационную смесь, состоящую из 50 мкл суспензии гепатоцитов и 50 мкл субстратной смеси (2 % гликогена, 0,1 М глюкозо-1-фосфат, 3 мМ 5'-АМФ, 0,2 М NaF, pH 6,1), инкубировали 10 мин при 37 °С. Реакцию останавливали добавлением 10 % ТХУ, затем приливали 3,7 мл холодной  $H_2O$  и центрифугировали 10 мин при 3000 g. В надосадочной жидкости определяли количество  $P_{ii}$  по методу Фиске и Суббароу. Активность фермента рассчитывали в микромолях  $P_{ii}$ , выделяемого в 1 мин 1 мл суспензии или 1 мг белка.

Активность амило-1,6-глюкозидазы определяли по методу [5], используя в качестве субстрата  $\phi$ -декстрин гликогена, а в качестве контрольного субстрата — гликоген, определяя количество образовавшейся глюкозы о-толуидиновым методом.

Для этого 50 мкл суспензии гепатоцитов смешивали с 50 мкл раствора субстрата (2 %  $\phi$ -декстрин или гликоген на

0,1 М гистидиноном буфере с 0,05 М ЭДТА pH 6,5) и инкубировали смесь при 37 °С в течение 2 ч. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 0,3 М  $Ba(OH)_2$  и 50 мкл 0,3 М  $ZnSO_4$ . Осадок удаляли центрифугированием и в надосадочной жидкости определяли количество образовавшейся глюкозы. Активность фермента выражали в миллимолях глюкозы в 1 мин на 1 мл суспензии или 1 мг белка.

При определении активности  $\alpha$ -амилазы использовали высокоспецифичный хромогенный субстрат альфахром, представляющий собой ковалентно связанную с красителем ремазолем бриллиантовым голубым карбоксиметиламинозу [3]. В нашем варианте метода 50 мкл 1,75 % раствора альфахрома, приготовленного на 10 мМ трис-маллеатном буфере pH 7,2, прибавляли к 50 мкл отдиализованной против этого же буфера суспензии гепатоцитов и 50 мкл 10 мМ  $CaCl_2$ . Смесь инкубировали при 40 °С в течение 30 мин. Реакцию останавливали добавлением 1,3 мл осаждающей смеси, состоящей из 80 % метилцеллозольва, содержащего 0,3 М  $CH_3COONa$  и 0,4 %  $(CH_3COO)_2Zn$ , быстро перемешивали и центрифугировали для осаждения и удаления из раствора нерасщепившегося субстрата. В надосадочной жидкости измеряли оптическую плотность при 590 нм. Активность фермента выражали величиной прироста оптической плотности за 1 мин на 1 мг белка. Кроме того, активность этого фермента определяли модифицированным методом, используя в качестве субстрата растворимый крахмал [8].

Определение активности кислой  $\alpha$ -глюкозидазы в гепатоцитах проводили с использованием как субстрата 4-метилумбеллиферил- $\alpha$ -D-глюкопиранозид. В этом случае к 50 мкл суспензии гепатоцитов добавляли 50 мкл 0,001 М 4-метилумбеллиферил- $\alpha$ -D-глюкопиранозид, 50 мкл 0,2 М ацетатного буфера pH 4,0 и смесь инкубировали в течение 30 мин при 37 °С. Реакцию останавливали добавлением 0,1 М раствора  $NaHCO_3$ , определяли количество образовавшегося флюорогенного продукта, рассчитывали количество глюкозы, выражая активность кислой  $\alpha$ -глюкозидазы в миллимолях глюкозы, образованной в 1 мин 1 мг белка. Белок определяли методом Лоури.

В работе использовали 5'-АМФ, УДФГ, глюкозо-1-фосфат, серотонин-креатинсульфат («Реанал», Венгрия), ЭГТА, коллагеназа («Сигма», США), 4-метилумбеллиферил- $\alpha$ -D-глюкопиранозид, альфахром, амилоглюкозидаза («Кох-Лайт», Англия), тирамина гидрохлорид («Мерк», ФРГ), гликоген и колючный  $\phi$ -декстрин гликогена получали из печени крысы в лаборатории.

**Результаты и обсуждение.** В приведенной ниже таблице представлены данные о влиянии серотонина и тирамина на обмен гликогена в изолированных гепатоцитах крысы. Как видно, при введении серотонина снижается содержание гликогена в гепатоцитах, что соответствует многочисленным данным литературы. Введение тирамина, напротив, вызывает увеличение содержания гликогена в этих клетках.

При введении серотонина наблюдается ингибирование активности гидролитических ферментов — кислой  $\alpha$ -глюкозидазы и  $\alpha$ -амилазы, но одновременно происходит заметная активация фосфоролиза в клетках. По-видимому, именно этой активацией фосфоролиза объясняется снижение количества гликогена в гепатоцитах в присутствии серотонина, несмотря на заметное ингибирование  $\alpha$ -глюкозидазы и амилазы. Тирамин оказывал иное влияние на вышеупомянутые ферменты в гепатоцитах. Ингибируя, как и серотонин, активность  $\alpha$ -глюкозидазы, он практически не влиял на

**Влияние биогенных аминов на содержание гликогена и активность ферментов, участвующих в его расщеплении, в гепатоцитах крысы**

Условия опыта	Гликоген, мкг на 1 мг белка за 1 ч	Фосфоролиза (общая), ммоль $P_{ii}$ на 1 мг белка за 1 мин	Кислая $\alpha$ -глюкозидаза, ммоль глюкозы на 1 мг белка за 1 мин	$\alpha$ -Амилаза, $\Delta E_{540}$ на 1 мг белка за 1 мин
Контроль	588,7 ± 15,8	0,371 ± 0,070	73,9 ± 6,6	0,102 ± 0,010
В присутствии тирамина	797,5 ± 42,1	0,377 ± 0,010	33,4 ± 5,6	0,102 ± 0,010
<i>p</i>	<0,01	>0,05	<0,01	
В присутствии серотонина	388,3 ± 14,2	0,523 ± 0,09	35,4 ± 5,5	0,028 ± 0,005
<i>p</i>	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

активность фосфоорилазы и  $\alpha$ -амилазы. Таким образом, наблюдаемое в присутствии тирамина увеличение количества гликогена в гепатоцитах было обусловлено, вероятно, ингибированием  $\alpha$ -глюкозидазы. Что касается еще одного фермента, участвующего в гидролизе гликогена, — амило-1,6-глюкозидазы, то активность его также не зависела от присутствия тирамина, в то время как серотонин ингибировал ее на 35 %.

Ранее подобное увеличение содержания гликогена в клетках животных или в различных типах клеток, культивируемых на питательных средах, получали экспериментально при введении соединений различной химической природы, являющихся ингибиторами ферментов. Получаемые при этом экспериментальные модели гликогенозов необходимы как для разработки методов заместительной энзимотерапии, так и для исследования действия лекарственных препаратов.

Впервые моделировать гликогеноз пытались Hllingworth-Brown и Brown в 1972 г. [7]. После добавления к культивируемым кожным фибробластам человека дисахарида трегалозы, являющегося специфическим ингибитором кислой  $\alpha$ -глюкозидазы [1], эти авторы обнаружили повышение содержания гликогена в клетках, значительно превышающее таковое в норме и близкое к наблюдаемому в таких же клетках у больных гликогенозом II типа.

В 1982 г. Lüllman-Rauch [9] в опытах на животных показал, что препарат акарбоза (BAU-g-5421), являющийся одним из ингибиторов кислой  $\alpha$ -глюкозидазы, введенный внутривентриально крысам, вызывает накопление гликогена в лизосомах гепатоцитов. Акарбоза, представляющая собой псевдотетрасахарид, выделяемый из культуры актиномицет *Ampulariella*, успешно применяли ранее в качестве одного из компонентов при терапии инсулинзависимого диабета у людей.

Примененный Saul и соавт. в 1985 г. индолизиновый алкалоид кастаноспермин (1,6,7,8-тетраоксиоктагидроиндолизин) оказывал ингибирующее действие не только на кислую, но и на нейтральные глюкозидазы, участвующие в процессе гликопротеидов. Введение крысам кастаноспермина в течение 3 дней сопровождалось резким снижением активности кислой  $\alpha$ -глюкозидазы в различных органах (печень, почки, мозг, селезенка) и значительному накоплению гликогена в лизосомах. Ингибирующее действие кастаноспермина было менее длительным, чем действие акарбозы [10].

Ингибирующим действием на  $\alpha$ - и  $\beta$ -глюкозидазы из разных источников обладал кондуритол- $\beta$ -эпоксид, связывающийся с активным центром фермента. Действие этого соединения в течение 24 ч при 37 °С полностью и необратимо ингибировало эти глюкозидазы [12]. Однако в связи с тем что указанный ингибитор обладает широкой специфичностью, получение модели гликогеновой болезни с его использованием довольно затруднительно.

Wisselaar и соавт. в 1989 г. показали, что аналог глюкозы N-оксиэтил-1-дезоксигиримидин (BAU m 1099), ингибировал на 70—90 % активность кислой и на 70 % активность нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы, вызывая накопление гликогена в лизосомах фибробластов человека и

клетках гепатомы Her G 2 [11]. Он оказывал также ингибирующее действие на активность кислой  $\alpha$ -глюкозидазы плаценты. В связи с тем что этот препарат, а также акарбоза используются при терапии диабета, применение их в высоких дозах, по-видимому, небезразлично для организма человека, так как способствует накоплению гликогена в лизосомах различных тканей, подобному наблюдаемому при гликогенозе II типа. Однако применение высоких доз этих ингибиторов, а также других ингибиторов  $\alpha$ -глюкозидаз, возможно, и некоторых биогенных аминов, безусловно, перспективно для получения моделей гликогеновой болезни, необходимых для исследования цитологических и патологических изменений, возникающих при гликогенозах, и для выяснения возможности их терапии.

Полученные нами данные о влиянии тирамина на расщепление гликогена в гепатоцитах представляются нам интересными по следующим причинам. В присутствии тирамина ингибирование  $\alpha$ -глюкозидазы, составляющее 55—70 % от контроля, что заметно ниже, чем в присутствии серотонина (до 87 %), приводит тем не менее к увеличению количества гликогена в гепатоцитах, что может быть использовано для моделирования гликогенозов. В отличие от упомянутых выше соединений, приводящих к накоплению гликогена в клетках, таких, как антидиабетические лекарства, кастаноспермин и кондуритол- $\beta$ -эпоксид, использованный нами тирамин является естественным продуктом обмена в организме человека и животных. Поэтому использование его для моделирования накопления гликогена в гепатоцитах представляется более целесообразным.

С другой стороны, до сих пор не во всех случаях гликогеноза типа II, заболевания, вызванного недостаточностью  $\alpha$ -глюкозидазы, выяснен механизм возникновения и развития болезни. Не исключено, что в тех случаях болезни, когда процессинг фермента не нарушен, может происходить ингибирование активности зрелого фермента аномальными продуктами до его попадания в лизосомы. Возможно, что таким аномальным продуктом может быть тирамин, накапливающийся при нарушении его обмена или обмена его предшественников, например тирозина.

*Авторы выражают благодарность проф. Е. Л. Розенфельд и доктору биол. наук И. В. Цветковой за обсуждение работы и ценные советы.*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Беденький Д. М., Розенфельд Е. Л. // Биохимия.— 1967.— Т. 32.— С. 1201—1208.
2. Попова И. А., Вережкина И. В. // Вопр. мед. химии.— 1983.— № 6.— С. 120—123.
3. Розе Л. В., Быковская К. Н. // Там же.— С. 117—120.
4. Розенфельд Е. Л., Попова И. А. // Врожденные нарушения обмена гликогена.— М., 1989.— С. 115—138.
5. Hers H. Y. // Advances in Metabolic Disorders / Eds. R. Levine, R. Luft.— New York, 1964.— Vol. 1.— P. 1—45.
6. Hue L., Bontemps F., Hers H. G. // Biochem. J.— 1975.— Vol. 152.— P. 105—114.
7. Hllingworth-Brown B., Brown D. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1972.— Vol. 46.— P. 1291—1298.
8. Karpiak S. E., Iwanowski H. // Arch. Immunol. Ther. exp.— 1969.— Vol. 13.— P. 368—370.
9. Lüllman-Rauch R. // Virchows Arch. Zell Path.— 1982.— Bd 39.— S. 187—202.
10. Saul R., Ghidoni J. J., Molyneux R. J. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1985.— Vol. 82.— P. 93—97.

11. Wisselaar H. A., van Dongen J. M., Reuser A. J. J. // Clin. chim. Acta.— 1989.— Vol. 182.— P. 45—52.  
 12. Yang S., Ge S., Zeng J. et al. // Biochim. biophys. Acta.— 1985.— Vol. 828.— P. 236—240.

Поступила 22.02.91

## EFFECT OF BIOGENIC AMINES ON DEGRADATION OF GLYCOGEN IN ISOLATED RAT HEPATOCYTES

I. A. Popova, V. N. Presnova, T. P. Laurenova

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

Serotonin and tyramine affected dissimilarly the enzyme activity involved in degradation of glycogen in isolated rat hepatocytes. Serotonin inhibited hydrolytic enzymes acid  $\alpha$ -glucosidase,  $\alpha$ -amylase and amylo-1,6-glucosidase but activated phosphorylase inducing a decrease of glycogen content in cells. Tyramine inhibited acid  $\alpha$ -glucosidase and amylo-1,6-glucosidase, did not affect the  $\alpha$ -amylase and phosphorylase activities and increased content of glycogen in cells. Tyramine may be used as stimulator of glycogen accumulation in liver cells.

© Т. Г. ДЖАНДЖГАВА, Р. Р. ШАКАРИШИВИЛИ, 1992

УДК 616.831-005.4-07: [616.153.915-39+616.153.1:577.152.1]-074

Т. Г. Джанджгава, Р. Р. Шакаришвили

## АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ АНТИОКСИЛИТЕЛЬНОЙ ЗАЩИТЫ И СОДЕРЖАНИЕ ПРОДУКТОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И ЦЕРЕБРОСПИНАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ МОЗГА

Институт неврологии Минздрава Грузинской ССР, Тбилиси

Свободнорадикальное перекисное окисление липидов (ПОЛ) является универсальным процессом, протекающим в физиологических условиях и активирующимся при патологических состояниях. Активация ПОЛ вызывает нарушение структуры и проницаемости клеточных мембран, повреждение мембранно-связанных ферментов, возникновение спивок в ДНК и т. д. [3, 5, 6, 23]. Для защиты клеток от повреждающего действия ПОЛ в организме существует сбалансированная система неферментных антиоксидантов ( $\alpha$ -токоферол, глутатион, аскорбат и др.) и антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза — СОД, каталаза, глутатионпероксидаза — ГПО, глутатионредуктаза — ГР [19, 20]).

За последние 15 лет в экспериментах на животных убедительно показано, что процессы ПОЛ активируются при ишемии различных органов, в том числе головного мозга. Активация ПОЛ вызывает накопление первичных и вторичных продуктов ПОЛ в мозговой ткани, а вследствие выхода этих веществ из ишемизированных клеток увеличивается также их концентрация в биологических жидкостях — крови и ликворе [1, 4, 9, 15, 24]. Аналогичные изменения наблюдаются у пациентов с острым нарушением мозгового кровообращения [2, 8, 12, 13].

Менее ясен вопрос о состоянии ферментной антиоксидантной системы при ишемии головного мозга. На модели экспериментальной ишемии мозга у животных обнаружено, что острая ишемия вызывает уменьшение активности СОД в мозговой

ткани при неизменной активности ГПО [18]. Напротив, в работе Г. Т. Масловой и Т. Л. Боборико [7] выявлено уменьшение активности ГПО, а также каталазы и ГР. Следует отметить, что состояние антиоксидантных ферментов в биологических жидкостях животных и человека при ишемии мозга практически не изучено. Единичные работы, проведенные на клиническом материале, посвящены исследованию активности СОД [14]. Целью данной работы явилось изучение активности антиоксидантных ферментов в сыворотке крови и ликворе больных с различными формами ишемической болезни мозга (ИБМ) — транзиторной ишемией и ишемическим инсультом разной степени тяжести.

Методика. Под наблюдением находились больные ИБМ с острым нарушением мозгового кровообращения, которые в зависимости от тяжести состояния были разделены на 4 группы: 1-я — транзиторная ишемия мозга (24 больных), 2-я — малый ишемический инсульт (26), 3-я — ишемический инсульт средней тяжести (24), 4-я — тяжелый ишемический инсульт без летального исхода (22) больных. У всех пациентов на 1—2, 7—8 и 14—15-й дни болезни проводили исследование активности антиоксидантных ферментов и содержания первичных (диеновые конъюгаты — ДК) и вторичных (малоновый диальдегид — МДА) продуктов ПОЛ в сыворотке и цереброспинальной жидкости. Активность СОД определяли по методу [22], активность каталазы — по методу [16], активность ГПО — по методу [21], активность ГР — по методу [17], содержание ДК и МДА — по [10, 11]. Контролем служили здоровые доноры и больные ишемической болезнью сердца без мозговой симптоматики.

Все цифровые данные обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Как видно из рис. 1, на 1—2-й день наблюдения уровень ДК в сыворотке больных транзиторной ишемией и малым инсультом не отличается от такового в контроле, а при среднетяжелой и тяжелой формах инсульта он достоверно увеличен. Через 7—8 дней после начала заболевания отмечается некоторое увеличение концентрации ДК при малом инсульте и значительное увеличение (на 80 %) при тяжелой форме инсульта.

На 15-й день наблюдения концентрация ДК у большинства больных возвращается к контрольному уровню и лишь у больных с тяжелой формой инсульта остается несколько повышенной (на 25 %).

Содержание МДА в сыворотке при всех формах ИБМ достоверно увеличено на 1—2-й и 7—8-й дни наблюдения, причем наибольший уровень МДА (350—400 % от контроля) отмечается при среднетяжелом и тяжелом течении инсульта.

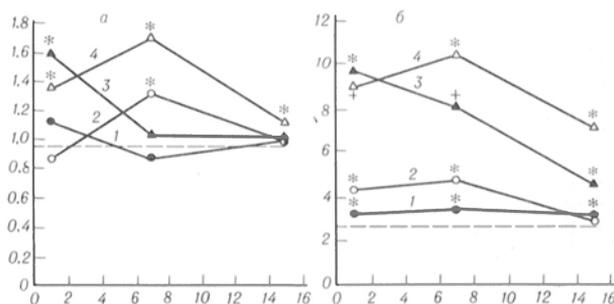


Рис. 1. Содержание продуктов ПОЛ в сыворотке больных ИБМ.

По оси ординат: а — содержание ДК (в D<sub>242</sub>/мл); б — МДА (в μmole/l). Здесь и на рис. 2—4: 1 — транзиторная ишемия, 2 — малый ишемический инсульт, 3 — ишемический инсульт средней тяжести, 4 — тяжелый ишемический инсульт; пунктирная линия — контроль; звездочка —  $p < 0.05$ , по оси абсцисс — срок исследования (дни).

К 14—15-му дню концентрация МДА у больных ИБМ снижается, но при среднетяжелой и тяжелой формах инсульта остается достоверно выше нормы (на 76 и 176 % соответственно).

Активность всех 4 ферментов антиоксидательной защиты (рис. 2) в сыворотке крови больных транзиторной ишемией и малым инсультом достоверно не изменяется и колеблется в течение 2 нед наблюдения в пределах 15—17 % от контрольного уровня. При среднетяжелом и тяжелом течении инсульта наблюдается достоверное уменьшение активности СОД на 1—2-й день наблюдения (на 20 и 43 % соответственно). Низкая активность этого фермента сохраняется на 7—8-й и 14—15-й дни наблюдения, оставаясь на 14—15-й день достоверно ниже контроля (на 26 и 30 % соответственно).

Активность каталазы при инсульте со средним и тяжелым течением также уменьшается на 1—2-й день болезни (на 22 и 20 % соответственно) и в еще большей степени на 7—8-й день болезни (на 27 и 33 % соответственно). К 14—15-му дню наблюдения активность каталазы в сыворотке этих больных не отличается от контроля.

Активность ГПО резко уменьшается в сыворотке больных со средним и тяжелым течением инсульта на 1—2-й день наблюдения (на 32 и 53 % соответственно) и остается достоверно сниженной в течение всего периода наблюдения.

Активность ГР при тяжелом инсульте также достоверно снижена на 1—15-й день заболевания (на 15—27 %), а при инсульте средней тяжести происходят снижение активности фермента на 1—2-й и 7—8-й дни наблюдения и нормализация активности к 14—15-му дню болезни.

Таким образом, у больных ИБМ увеличивается содержание первичных и вторичных продуктов ПОЛ в сыворотке. Степень этого увеличения зависит от тяжести заболевания и от срока наблюдения: оно наиболее выражено в течение первых 8 дней у больных ишемическим инсультом средней тяжести и тяжелым инсультом. Причиной этого явления, вероятно, служит выход продуктов ПОЛ из очагов ишемического повреждения мозга, и поэтому уровень ДК и МДА в

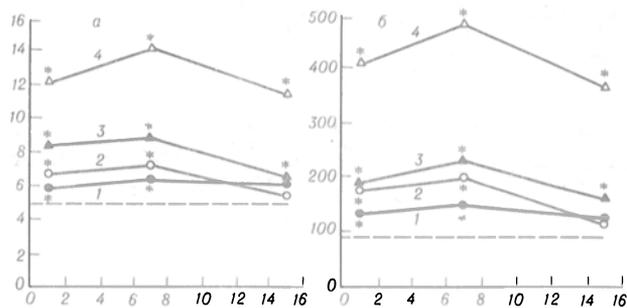


Рис. 3. Содержание продуктов ПОЛ в ликворе больных ИБМ. По оси ординат: а — содержание ДК (в  $10^3$ /мл · 10<sup>3</sup>), б — МДА (в нмоль/л).

сыворотке отражает интенсивность ПОЛ в пораженных участках мозга.

Основной тенденцией изменения активности антиоксидантных ферментов в сыворотке является ее уменьшение, наиболее выраженно при среднетяжелом и тяжелом инсульте на 1—8-й день болезни. По-видимому, эти изменения связаны с проникновением антиоксидантных ферментов из сыворотки в ишемизированные клетки мозга через поврежденные плазматические мембраны.

Данные о содержании продуктов ПОЛ в ликворе больных ИБМ представлены на рис. 3. Видно, что при всех формах ИБМ на раннем сроке наблюдения происходит достоверное увеличение содержания ДК в ликворе, степень которого строго зависит от тяжести заболевания. При транзиторной ишемии концентрация ДК повышается на 21 %, при малом инсульте — на 38 %, при инсульте средней тяжести — на 73 % и при тяжелом инсульте — на 150 %.

Через 7—8 дней после начала заболевания содержание ДК продолжает нарастать, а к 14—15-му дню заболевания снижается. У больных транзиторной ишемией и малым инсультом содержание ДК в ликворе на этом сроке уже не отличается от контроля, а у больных среднетяжелым и тяжелым инсультом остается достоверно увеличенным (на 33 и 134 % соответственно).

Аналогичный характер имеет динамика концентрации МДА в ликворе: наблюдается достоверное увеличение этого показателя при всех формах ИБМ на 1—2-й день наблюдения, дальнейшее увеличение к 7—8-му дню и снижение к 14—15-му дню заболевания. При транзиторной ишемии и малом инсульте содержание МДА возвращается к норме, а при средней и тяжелой формах болезни остается достоверно повышенным. Особо следует обратить внимание на очень большое увеличение содержания МДА при тяжелом инсульте. На протяжении всего периода наблюдения содержание МДА в ликворе у этих больных повышено в 3—5 раз.

Результаты определения активности антиоксидантных ферментов в ликворе представлены на рис. 4. Как видно, активность СОД достоверно снижена при всех формах ИБМ на всех сроках наблюдения. Наиболее (в 3 раза) выражено уменьшение активности фермента при тяжелой форме инсульта, наименее (в 1,4 раза) выражено при транзиторной ишемии. Активность каталазы в ликворе также резко снижена у всех больных ИБМ и не возвращается к контролю к 15-му дню

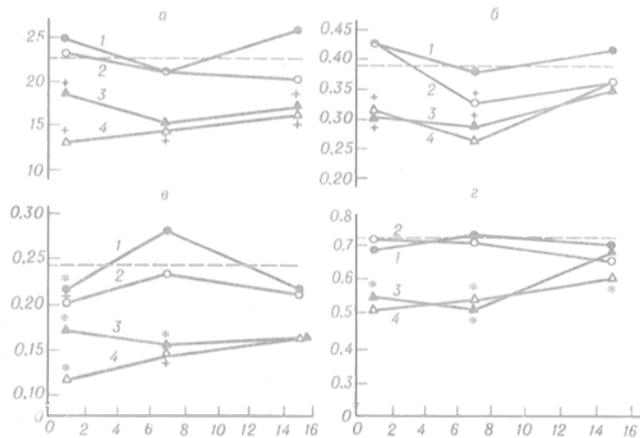


Рис. 2. Активность антиоксидантных ферментов в сыворотке больных ИБМ.

По оси ординат: а — активность СОД (в усл. ед./мл), б — каталазы (в ммоль/мл/мин), а — ГПО (в ммоль/мл/мин), б — ГР (в ммоль/мл/мин).

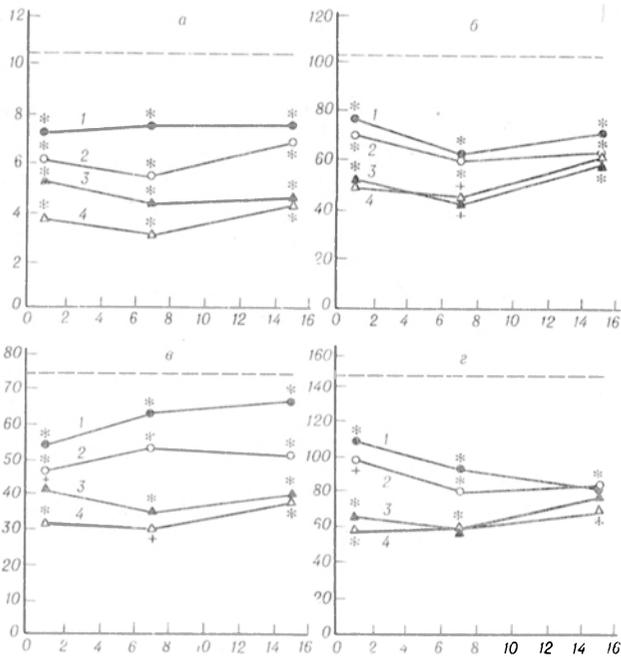


Рис. 4. Активность антиоксидантных ферментов в ликворе больных ИБМ.

По оси ординат: а — активность СОД (в усл. ед./мл), б — каталазы (в мкмоль/мл/мин), в — ГПО (в нмоль/мл/мин), г — ГР (в нмоль/мл/мин).

наблюдения. Наиболее резко (в 2,3—2,6 раза) уменьшена активность каталазы у больных со средней и тяжелой формами инсульта.

Такой же характер имеет динамика активности ферментов глутатионзависимой антиоксидантной системы. Активность ГПО наиболее (в 2—2,5 раза) снижена у больных тяжелым инсультом, наименее (на 15—28 %) снижена у больных транзиторной ишемией. Активность ГР при средней и тяжелой формах инсульта резко снижается на 1—2-й день наблюдения (на 55 и 62 % соответственно), а при транзиторной ишемии и малом инсульте происходит постепенное уменьшение активности фермента к 14—15-му дню наблюдения.

Таким образом, при всех формах ИБМ наблюдается достоверное и значительное уменьшение активности антиоксидантных ферментов в цереброспинальной жидкости. Следует подчеркнуть, что, как и в сыворотке, наблюдается четкая зависимость между степенью уменьшения активности ферментов и тяжестью заболевания.

По-видимому, снижение активности антиоксидантных ферментов в ликворе так же, как и в сыворотке, связано с их транслокацией в клетки мозга, что обусловлено нарушением структурной целостности плазматических мембран. На наш взгляд, данное явление может рассматриваться как компенсаторный процесс, направленный на увеличение эффективности антиоксидантной защиты клеток в условиях активации ПОЛ. С другой стороны, наличие четких корреляций между тяжестью клинического состояния больных и выраженностью биохимических сдвигов в сыворотке крови и ликворе позволяет использовать данные биохимические методы в диагностических и прогностических целях.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Биленко М. В., Тельпухов В. И., Чуракова Т. Д., Комаров П. Г. // Бюл. exper. биол.—1988.— № 4.— С. 394—397.
2. Бобырева Л. Е. Состояние свободнорадикального окисления липидов и пути его медикаментозной коррекции у больных церебральным атеросклерозом: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— Харьков, 1986.
3. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.— М., 1972.
4. Замуруев О. П. // Бюл. exper. биол.—1984.— № 11.— С. 523—525.
5. Каган В. Е. // Всесоюзный симпозиум по острой ишемии, 2-й.— М., 1978.— С. 108—109.
6. Козлов Ю. П. // Антиокислители.— М., 1975.— С. 5—8.
7. Маслова Г. Т., Боборико Т. Л. // Белорусское физиологическое о-во: Съезд, 7-й.— Витебск, 1987.— С. 153—154.
8. Никонов А. А. // Всесоюзный съезд невропатологов и психиатров, 7-й.— М., 1981.— Т. 2.— С. 215—218.
9. Семченко В. В., Полуэтов Л. В., Конвай В. Д. // Бюл. exper. биол.—1983.— № 7.— С. 12—14.
10. Стальная И. Д. // Современные методы в биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича.— М., 1977.— С. 63—64.
11. Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г. // Там же.— С. 66—68.
12. Циелава Р. Я., Натяжкина Г. М. // Конструктивная сосудистая хирургия при ишемии головного мозга.— Рига, 1989.— С. 41—44.
13. Шакаршвили Р. Р., Габашивили В. М. Свободнорадикальная патология нервной системы.— Тбилиси, 1988.
14. Шамсува Э. С. Клинико-патогенетическое обоснование антиоксидантной и мембранстабилизирующей терапии и профилактики осложнений при нарушениях мозгового кровообращения: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.— М., 1989.
15. Armstead W. M., Mirro R., Busija D. W. // Amer. J. Physiol.—1988.— Vol. 255.— P. 401—403.
16. Beutler E. // Red Cell Metabolism.— New York, 1975.— P. 86—89.
17. Carlberg I., Mannervik K. B. // J. biol. Chem.—1975.— Vol. 250.— P. 5475—5480.
18. Chan P. H., Chen S. F., Yu A. C. H. // J. Neurochem.—1988.— Vol. 50.— P. 1185—1193.
19. Chance B., Sies H., Boveris A. // Physiol. Rev.—1979.— Vol. 59.— P. 527—605.
20. Fridovich I. // Science.—1978.— Vol. 201.— P. 875—880.
21. Mills G. S. // J. biol. Chem.—1959.— Vol. 234.— P. 502—506.
22. Nishikimi M., Rao N., Yagi K. // Biochem. biophys. Res. Commun.—1972.— Vol. 46.— P. 849—854.
23. Tribble D. L., Aw T. Y., Jones D. P. // Hepatology.—1987.— Vol. 7.— P. 377—387.
24. Yoshida S., Asano T. // J. Neurosurg.—1980.— Vol. 53.— P. 323—331.

Поступила 03.12.90

## ACTIVITY OF ENZYMES INVOLVED IN ANTIOXIDATIVE PROTECTION AND CONTENT OF LIPID PEROXIDATION PRODUCTS IN BLOOD SERUM AND CEREBROSPINAL FLUID OF PATIENTS WITH BRAIN ISCHEMIC DISEASE

T. G. Dzhandzhava, R. R. Shakarishvili

Institute of Neurology, Ministry of Public Health of the Georgian SSR, Tbilisi

Activity of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase as well as content of diene conjugates and malonic dialdehyde were studied in blood serum and cerebrospinal fluid of patients with transitory ischemia, small ischemic insult, ischemic insult of middle severity and with severe ischemic insult without lethality within 1-2, 7-8 and 14-15 days of diseases. Content of lipid peroxidation products and activity of antioxidant enzymes were decreased in the biological fluids studied in all the forms of brain circulation impairments within early periods of pathology. These patterns tend to normalization within 14-15 days. The rate of biochemical alterations corresponded highly to severity of impairments developed and these patterns may be used for diagnostic and prognostic purposes.

Д. Е. Иванов, В. Н. Витвицкий

## СПЕЦИФИКА ИЗМЕНЕНИЙ РАЗНЫХ ГРУПП ФЕРМЕНТОВ В КОРЕ МОЗГА КРЫС ПОСЛЕ МЕЖЛИНЕЙНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ ТКАНИ

Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова АН СССР, Москва

Головной мозг животных является иммунологически «привилегированным» местом организма, и поэтому в него возможно пересаживать нервную ткань мозга эмбрионов.

В ряде работ показано, что после аллотрансплантации эмбриональной нервной ткани (ЭНТ) происходят изменения биосинтеза ДНК, белка и активности некоторых ферментов [3, 5, 11].

С другой стороны, возможна трансплантация ЭНТ, взятая от другой линии или даже вида животных. Так, А. Г. Брагин и О. С. Виноградова [1] трансплантировали ткань септума 17-дневных эмбрионов крыс в головной мозг кроликов, а В. А. Отеллин и Е. Г. Гилерович [6] — куски ткани мозга 8—11-недельных плодов человека в головной мозг взрослым крысам. В условиях ксенотрансплантации они наблюдали приживление, развитие и дифференцировку трансплантатов.

В настоящей работе сделан следующий шаг в изучении межвидовых и межлинейных трансплантаций: проведено сравнительное исследование изменения активности разных ферментов в коре мозга крыс линий Вистар и Август после трансплантации им ЭНТ крыс линии Вистар. Исследовали 8 ферментов, относящихся к разным классам, учитывая, что величина активности любого фермента в процессе онтогенеза изменяется строго определенным образом и эти изменения генетически детерминированы.

**Методика.** Работа проведена на 17 крысах-самцах линии Вистар и 12 самцах линии Август, массой 150—200 г. Трансплантацию ЭНТ в мозг взрослых животных проводили по методу, разработанному в лаборатории [8]. Реципиентами были взрослые самцы линий Вистар и Август, донорами — 17-дневные эмбрионы линии Вистар. Эмбриональную нервную ткань в объеме 5—6 мм<sup>3</sup> инъецировали в боковой желудочек мозга. Для наркоза использовали нембутал в дозе 40 мг/кг, который вводили внутривенно.

Локальное повреждение включало все процедуры операции трансплантации без введения трансплантата. Через 36 дней после операции крыс деканитировали, ткань коры гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера (стекло — стекло) в физиологическом растворе (масса:объем, 1:10) и затем центрифугировали при 20 000 г 30 мин при 4 °С. Концентрацию белка определяли по методу [2]. В надосадочной жидкости определяли активность ферментов, относящихся к классам оксидоредуктаз, трансфераз, гидролаз, лиаз: лактатдегидрогеназы (ЛДГ, КФ 1.1.1.27), аланинаминотрансферазы (АлАТ, КФ 2.6.1.2), эстераз (КФ 3.1.1), щелочной фосфатазы (ЩФ, КФ 3.1.3.1), кислой фосфатазы (КсФ, КФ 3.1.3.2), 5'-нуклеотидазы (КФ 3.1.3.5), К<sup>+</sup>-аденозинтрифосфатазы (АТФаза, КФ 3.6.1.3), альдолазы (КФ 4.1.2.13). Активность ЛДГ определяли по методике [4]. Активность АлАТ определяли по методу [13], активность ЩФ, КФ, АТФазы и 5'-нуклеотидазы — по модифицированному методу [7]. В качестве субстрата для определения активности ЩФ и КсФ использовали β-глицерофосфат («Мегск»), для определения активности АТФазы — аденозин-5-трифосфат («Reanal»). Инкубационная смесь содержала: 0,03 М КСl, 0,05 М трис-буфер рН 7,4,

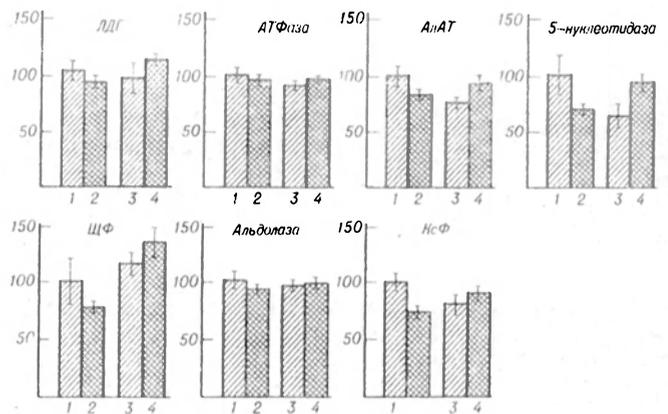


Рис. 1. Активность ферментов (в %) разных классов в коре мозга интактных крыс линий Вистар и Август и ее изменение через 36 дней после трансплантации ЭНТ.

За 100 % принята активность ферментов в коре мозга интактных крыс линии Вистар. 1 — активность в коре мозга интактных крыс линии Вистар ( $n=5$ ); 2 — активность в коре мозга интактных крыс линии Август ( $n=3$ ); 3 — активность после трансплантации в коре мозга крыс линии Вистар ( $n=6$ ); 4 — активность после трансплантации в коре мозга крыс линии Август ( $n=6$ ).

0,003 АТФ в конечном объеме 1 мл. Реакцию останавливали добавлением 1 мл холодной 10 % ТХУ. Для определения активности 5-нуклеотидазы в качестве субстрата использовали динатриевую соль аденозин-5-монофосфорной кислоты («Reanal»). Инкубационная смесь содержала 0,05 М трис-буфер рН 8,3, 0,005 М АМФ. Активность альдолазы определяли по модифицированному методу [7]. Электрофорез белков проводили в вертикальном блоке полиакриламидного геля (17×11×0,1 см) в специальной камере с использованием трис-ЭДТА-боратной буферной системы рН 8,3 в течение 1 ч при 280 В, 32 мА, 4 °С [12]. После электрофореза белковые фракции, обладающие эстеразной активностью, определяли по модифицированной нами методике [9] путем инкубации гелей в среде, содержащей 50 мг α-нафтилацетата, 60 мг прочного синего РР в 100 мл 0,1 М фосфатного буфера рН 6,6. Инкубацию проводили при комнатной температуре в течение 30 мин. Электрофореграммы сканировали на регистрирующем микроденситометре MD-100 («Carl Zeiss, Jena»).

Активность изоферментов определяли как площадь соответствующих пиков и выражали в процентах. Полученные данные статистически обрабатывали по критерию Вилкоксона — Манна — Уитни.

**Результаты и обсуждение.** Сравнительный анализ активности 8 ферментов в коре мозга крыс линий Вистар и Август показал, что активность большинства ферментов, изученных в работе, меньше у крыс линии Август, чем у крыс линии Вистар (рис. 1). Так, активность ЛДГ в коре мозга крыс линии Вистар достоверно выше таковой в коре мозга крыс линии Август на 20 %, АлАТ — на 13 %, ЩФ — на 9 %, КсФ — на 25 %, 5'-нуклеотидазы — на 30 %, альдолазы — на 10 %. Достоверных различий в активности АТФазы и эстераз не обнаружено.

Через 36 дней после операции трансплантации ЭНТ активность ЛДГ, АлАТ, КсФ, 5'-нуклеотидазы, АТФазы, альдолазы в коре мозга крыс линии Вистар была снижена по сравнению с таковой у интактных животных этой линии. Это снижение было достоверно для АлАТ, КсФ, 5'-нуклеотидазы ( $p<0,05$ ). Активность ЩФ и эстераз, гидролизующих α-нафтилацетат, повышалась по сравнению с таковой у интактных животных ( $p<0,05$ ). Эти изменения были идентичны полученным нами ранее при изучении аллотрансплантаций внутри линии Вистар и отражали влияние ЭНТ трансплан-

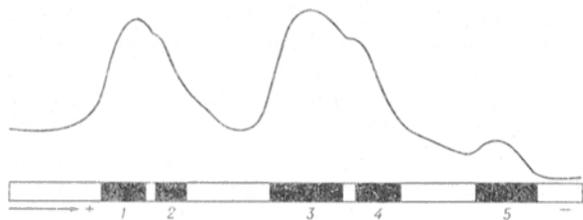


Рис. 2. Изоферментный спектр эстераз коры мозга крыс.

1-5 — зоны эстеразной активности.

тата на ткань соседних участков коры реципиента.

Через 36 дней после трансплантации ЭНТ крысы линии Вистар крысам линии Август обнаружена совершенно другая закономерность. Отмечено достоверное повышение активности почти всех исследованных ферментов: ЛДГ, АлАТ, 5'-нуклеотидазы, КсФ и альдолазы по сравнению с таковой у интактных животных. Активность АТФазы не изменилась.

Наблюдаемые изменения ферментативной активности могут быть обусловлены как количественными, так и качественными изменениями экспрессии, что требовало проведения соответствующих контрольных экспериментов. В одном из таких контрольных опытов исследовали изоферментный спектр эстераз крыс линий Вистар и Август после трансплантации ЭНТ. Спектр эстераз, гидролизующих  $\alpha$ -нафтилацетат, состоял из 5 зон. Для количественного обчета их удобно разделить на три группы: 1+2 (А), 3+4 (Б) и 5 (В) (рис. 2).

Через 36 дней после трансплантации ЭНТ наблюдалось повышение активности во всех зонах. Однако активность зон изоферментного спектра эстераз коры мозга крыс линии Август после трансплантации им ЭНТ от линии Вистар была выше, чем активность зон при трансплантации Вистар — Вистар (рис. 3).

Активность любого фермента в онтогенезе изменяется строго определенным образом. Например, активность АлАТ и 5'-нуклеотидазы значительно возрастает, а активность ЩФ снижается. После трансплантации ЭНТ крысам линии Вистар активность изученных ферментов изменялась в разной степени в сторону значений, характерных для ЭНТ: активность АлАТ, 5'-нуклеотидазы снижалась, а ЩФ повышалась.

Общая активность эстераз, гидролизующих

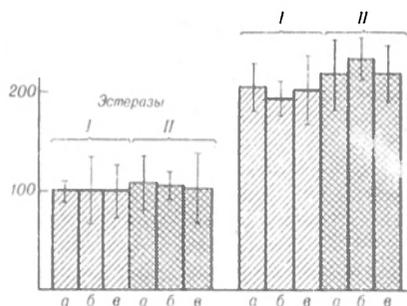


Рис. 3. Активность эстераз (в %) в коре мозга интактных крыс линий Вистар (I) и Август (II) (слева) и ее изменение через 36 дней после трансплантации ЭНТ (справа).

а — суммарная величина активности зон 1 и 2 изоферментного спектра; б — суммарная величина активности зон 3 и 4 изоферментного спектра; а — активность зоны 5 изоферментного спектра.

$\alpha$ -нафтилацетат, в мозге 30-дневных крыс (возраст нервной ткани которых соответствует возрасту пересаженной ЭНТ) значительно не отличается от активности в мозге животных-реципиентов [10]. Поэтому наблюдаемые изменения активности эстераз в клетках мозга реципиентов через 36 дней после аллотрансплантации ЭНТ нельзя объяснить только онтогенетическим изменением активности эстераз в пересаженной ЭНТ. Локальное повреждение ткани мозга, которое включало все процедуры операции трансплантации без внесения трансплантата, не привело к каким-либо изменениям активности ферментов. По-видимому, наблюдаемые после операции трансплантации длительные изменения активности ферментов происходят под влиянием индукторов, синтезируемых пересаженной ЭНТ.

Таким образом, данные об изменениях, происходящих в окружающих трансплантат клетках мозга взрослого животного после трансплантации ЭНТ, дают возможность сделать предположение об определенном влиянии ткани донора на экспрессию генома клеток мозга реципиента. Это предположение подтверждают полученные нами ранее результаты электрофоретических исследований трансплантата и окружающей ткани, а также изучение величины константы Михаэлиса ЛДГ после трансплантации ЭНТ, свидетельствующие о наличии в окружающих трансплантат клетках реципиента синтеза белков, которые по своим кинетическим параметрам близки к белкам, характерным для клеток мозга эмбриона. Синтез этих белков, возможно, связан также со стимуляцией компенсаторно-восстановительных процессов, которая наблюдается после трансплантации ЭНТ в мозг взрослых животных [8].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Брагин А. Г., Виноградова О. С. // Бюл. exper. биол.— 1981.— № 10.— С. 486—489.
2. Варбург Х. // Методы биологии развития.— М., 1974.— С. 322.
3. Витвицкий В. Н. Функциональные воздействия и трансплантация нервной ткани как факторы изменения макромолекулярных систем и регуляции биосинтеза в структурах головного мозга: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук.— М., 1987.
4. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии.— М., 1980.
5. Клецинов В. Н. // Докл. АН СССР.— 1989.— Т. 309, № 2.— С. 468—470.
6. Отеллин В. А., Гилерович Е. Г. // Развивающийся мозг.— Тбилиси, 1984.— С. 167—168.
7. Покровский А. А. // Биохимические методы исследования в клинике.— М., 1969.— С. 143—160.
8. Полежаев Л. В., Александрова М. А. Трансплантация ткани мозга в норме и патологии.— М., 1986.— С. 80.
9. Серов О. Л., Корочкин Л. И. // Онтогенез.— 1971.— Т. 2, № 2.— С. 199.
10. Bernsohn J., Barron K., Hoss A., Hedrick M. T. // Neurochemistry.— 1963.— Vol. 10.— P. 783.
11. Liska B., Brochtlova M., Tursky T. et al. // Molecular Basis of Neural Function.— Prague, 1986.— P. 345.
12. Peacock A., Bunting S., Quon K. // Science.— 1965.— Vol. 147.— P. 1451.
13. Reitman S., Frankel S. // Amer. J. clin. Path.— 1957.— Vol. 28, N 1.— P. 56.

Поступила 26.12.90

#### ALTERATION OF THE ENZYMATIC ACTIVITY IN RAT BRAIN CORTEX AFTER INTERSTRAIN TRANSPLANTATION OF EMBRYONAL NERVOUS TISSUE

D. E. Ivanov, V. N. Vitvitsky

Embryonal nervous tissue from Wistar rats was transplanted into male rats of Wistar and August strains. Activity of eight enzymes belonging to various systems was estimated in brain cortex of rats recipients within 36 days after the transplantation. Lactate dehydrogenase, alanine aminotransferase, acid phosphatase, 5'-nucleotidase, ATPase and aldolase exhibited the dissimilarly decreased rate of activity in brain cortex of Wistar rats after transplantation as compared with the enzymatic activity in intact animals of this strain, while activity of alkaline phosphatase and esterases hydrolyzing  $\alpha$ -naphthyl acetate was increased. Activation of almost all the enzymes studied was found within 36 days in Wistar rats after the transplantation. The rate of activity of zonal esterase isoenzymes was higher in brain cortex of August rats after transplantation of embryonal nervous tissue from Wistar strain as compared with that of Wistar to Wistar rats transplantation. The data obtained suggest that tissues of donors affected definitely the enzymatic activity in brain cells of rats-recipients as activity of most enzymes studied was higher in brain cortex of donors as compared with that of recipients.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1992

УДК 616.8-092:612.014.426]-07:616.831-008.9-074

*А. Н. Дрыгин, Р. В. Нечаева, В. К. Осипович, С. И. Павлова, Т. Н. Суровикина, Л. А. Шарова*

### БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПАТОГЕНЕЗА НАРУШЕНИЙ ФУНКЦИЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ МИКРОВОЛНОВОМ ОБЛУЧЕНИИ

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

Интенсивность воздействия неионизирующих излучений на человека и биосферу в целом нарастает [6]. Встречающиеся в настоящее время в окружающей среде уровни электромагнитных излучений превосходят максимальные значения природных на 6—7 порядков [7, 8, 19]. К числу наиболее информативных биохимических параметров, позволяющих оценить выраженность ответной реакции организма при воздействии факторов внешней среды и радиоизлучений, относятся интенсивность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), состояние антиокислительной системы (АОС), активность ферментов, уровень гормонов и медиаторов (моноаминов) в нервной ткани [2, 3, 14]. Особую роль отводят биогенным аминам — регуляторам секреции и синтеза гипоталамических нейропептидов (либеринов), ответственных за продукцию соответствующих троп-

ных гормонов (АКТГ, СТГ, ФСГ, ЛГ, МСГ и др.). Последние регулируют функцию периферических желез внутренней секреции.

Целью настоящей работы являлось выяснение влияния общего микроволнового облучения СВЧ-диапазона на метаболические процессы в различных структурах головного мозга. Мы исследовали особенности динамики показателей процессов ПОЛ, биогенных аминов и циклических нуклеотидов.

**Методика.** Исследования проводили на 168 беспородных белых крысах - самцах массой 170—200 г в возрасте 3—4 мес. Животных подвергали микроволновому облучению с использованием модифицированного генератора, созданного на основе передатчика РЛС П-35 (несущая частота 3,085 ГГц, частота следования модулирующих импульсов 400 Гц при длительности каждого импульса 1 мкс). Применяли две интенсивности воздействия: 5 и 46 мВт/см<sup>2</sup>. Время облучения составляло 24 мин. СВЧ-облучение крыс осуществляли в одноместных клетках из оргстекла в безэховой камере с коэффициентом отражения материала не более 3%. Крысы контрольной группы находились в условиях «ложного облучения». Для исключения стрессорного влияния временно меняющейся обстановки опыта проводили тренировку лабораторных животных в условиях эксперимента в течение 7 сут. У всех животных измеряли ректальную температуру до и после облучения. После СВЧ-воздействия 46 мВт/см<sup>2</sup> около 50% животных погибли в первые сутки; ректальная температура у крыс повышалась непосредственно после облучения в среднем на 4,9 °С. При облучении животных 5 мВт/см<sup>2</sup> прирост ректальной температуры составлял в среднем 0,4 °С.

Через 1 ч и 1 сут после облучения брали кровь путем декантации животных с последующим выделением структур головного мозга (кора больших полушарий, гипоталамус, четверохолмие, хвостатые ядра). В коре головного мозга определяли цАМФ и цГМФ с помощью реактивов фирмы «International CIS», шиффовы основания по [22], малоновый диальдегид по [20], диеновые конъюгаты по [25]. В подкорковых структурах определяли содержание серотонина, дофамина и норадреналина по [24], гистамина по [26], катионов меди по [21], неорганического фосфата по [11]. В цельной крови определяли концентрацию адреналина по [13], супероксиддисмутазы (СОД) по [23], глюкозы с использованием набора реактивов (ССР) для глюкозооксидазного метода и количество инсулинсодержащих эритроцитов (ИСЭ) по [16].

**Результаты и обсуждение.** Проведенные исследования показали, что облучение животных в течение 24 мин при 46 мВт/см<sup>2</sup> приводило к достоверному снижению уровня шиффовых оснований в коре головного мозга крыс опытной группы через 1 ч после воздействия. Однако через 1 сут после облучения их количество резко возросло (табл. 1). Подобная динамика наблюдалась и по таким показателям процесса ПОЛ, как малоновый диальдегид, диеновые конъюгаты. Ана-

Таблица 1

Биохимические изменения в коре головного мозга белых крыс-самцов при облучении в СВЧ-диапазоне (46 мВт/см<sup>2</sup> в течение 24 мин)

Группа животных	Время после воздействия, ч	Показатель				
		цАМФ, нмоль/г ткани	цГМФ, нмоль/г ткани	диеновые конъюгаты, нмоль/мг липидов	малоновый диальдегид, ед. интенсивности флуоресценции на 100 мг липидов	шиффовы основания, ед. интенсивности флуоресценции на 1 мг липидов
Контрольная (32)	—	126,6±4,7	0,99±0,05	0,280±0,015	201±14	6,24±0,24
Опытная (32)	1	152,4±8,6*	1,44±0,16*	0,270±0,020	182±14	4,10±0,41*
Опытная (32)	24	142,3±7,3*	1,41±0,13*	0,450±0,020*	190±15	10,60±1,04*

Примечание. Здесь и в табл. 2—4: в скобках — число животных; звездочка — достоверные ( $p < 0,05$ ) различия по отношению к контролю.

Биохимические изменения в гипоталамусе белых крыс-самцов при облучении в СВЧ-диапазоне (46 мВт/см<sup>2</sup> в течение 24 мин)

Группа животных	Время после воздействия, ч	Показатель				
		серотонин, нмоль/г ткани	гистамин, нмоль/г ткани	норадреналин, нмоль/г ткани	катионы меди, мкмоль/г ткани	неорганический фосфат, мкмоль/г ткани
Контрольная (32)	—	2,56±0,18	3,97±0,41	2,47±0,21	0,138±0,006	0,214±0,007
Опытная (32)	1	1,66±0,09*	1,10±0,32*	1,37±0,17*	0,118±0,004	0,226±0,008
Опытная (32)	24	1,04±0,10*	—	—	0,109±0,005*	0,454±0,012*

Таблица 3

Биохимические изменения в четверохолмии и хвостатых ядрах головного мозга белых крыс-самцов через 1 сут после облучения в СВЧ-диапазоне (46 мВт/см<sup>2</sup> в течение 24 мин)

Биологический объект	Показатель							
	серотонин, нмоль/г ткани		дофамин, нмоль/г ткани		катионы меди, мкмоль/г ткани		неорганический фосфат, мкмоль/г ткани	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
Четверохолмие (16)	1,36±0,10	2,34±0,11*	—	—	0,110±0,006	0,076±0,003*	0,210±0,017	0,223±0,012
Хвостатое ядро (16)	—	—	26,97±0,96	16,19±1,03*	—	—	—	—

логичную реакцию системы ПОЛ на облучение головы крыс в коре, продолговатом мозгу и гипоталамусе регистрировали и другие авторы [15, 18]. Снижение интенсивности процессов ПОЛ в первые часы после облучения, по-видимому, было обусловлено высоким антиокислительным потенциалом липидов нервной ткани, который достаточно быстро истощался параллельно с другими резервами антиоксидантной системы. Процессы ПОЛ усиливаются под действием различных стрессорных факторов [1, 5, 12]. Избыточное накопление продуктов ПОЛ сопровождается дестабилизацией мембран клеток, что приводит к нарушению их проницаемости [5]. Наличие в ткани мозга жиро- и водорастворимых антиоксидантов делает возможным одновременную защиту от свободных радикалов мембранных структур в водной и липидной фазах клетки [9, 10, 17]. Отдельные биоантиокислители формируют систему, определяющую суммарную антиокислительную активность тканей и обладающую определенной емкостью [9, 17]. Исследования антиокислительных свойств различных тканей позволили установить, что липидные фракции ткани головного мозга обладают максимальной антиокислительной активностью в сравнении с другими органами [10], превышая, например, АОС печени и сердца в 1,5—2,5 раза. Такой высокий антиокислительный эффект объясняют большим содержанием в ткани мозга фосфолипидов, которые, с одной стороны, представляют прекрасный субстрат для ПОЛ, а с другой — выполняют функцию жирорастворимых биоантиоксидантов, связывая с боль-

шой скоростью свободные радикалы.

Мы обнаружили также изменение активности циклазной системы, которая была достоверно выше в коре головного мозга подопытных животных по сравнению с контрольной группой через 1 и 24 ч после воздействия (см. табл. 1). Нами было изучено содержание дофамина, норадреналина и серотонина в различных структурах головного мозга (табл. 2 и 3). Обнаружено статистически достоверное снижение содержания серотонина, гистамина, норадреналина, катионов меди в гипоталамусе (см. табл. 2), дофамина в хвостатом ядре (см. табл. 3). В то же время выявлено значительное увеличение уровня серотонина в четверохолмии (см. табл. 3) и неорганического фосфата в гипоталамусе (см. табл. 2) после облучения животных опытных групп. Нарушения моноаминоергической активности в структурах головного мозга проявились в виде изменений содержания нейромедиаторов или нарушений их равновесия и ускорения процессов дефосфорилирования, что подтверждалось повышением концентрации неорганического фосфата.

Наиболее чувствительной структурой головного мозга к микроволновому облучению оказался гипоталамус. Изменение активности системы гипоталамус — гипофиз — кора надпочечников проявляется выбросом в периферическую кровь гормонов, в частности адреналина [4, 13]. Мы изучали концентрацию адреналина, количество ИСЭ, активность СОЦ и содержание глюкозы в периферической крови (табл. 4).

Таблица 4

Биохимические изменения в периферической крови белых крыс-самцов при облучении в СВЧ-диапазоне (46 мВт/см<sup>2</sup> в течение 24 мин)

Группа животных	Время после воздействия, ч	Показатель			
		адреналин, нмоль/мл	инсулинсодержащие эритроциты, %/во	глюкоза, ммоль/л	СОД, усл. ед. активности на 1 мл НВ
Контрольная (32)	—	3,08±0,29	600±17	4,59±0,20	2,59±0,09
Опытная (32)	1	5,95±0,24*	497±12*	4,88±0,22	2,67±0,11
Опытная (32)	24	5,90±0,63*	548±16*	5,63±0,30*	3,26±0,12*

Показано резкое увеличение ( $t=7,62$ ) уровня адреналина и выраженное уменьшение количества ИСЭ ( $t=8,40$ ) в день воздействия и через 1 сут после облучения в крови подошвчатых животных. Концентрация глюкозы и активность СОД достоверно повысились лишь через 1 сут. Это обстоятельство можно объяснить тем, что инсулин, депонированный на мембранах эритроцитов, первым включается в циркуляцию при транзиторных гипергликемиях. Запасы его невелики, но достаточны для компенсации гипергликемии в первые часы после облучения.

При облучении животных (в течение 24 мин при 5 мВт/см<sup>2</sup> через 1 сут после облучения отмечалось повышение содержания серотонина в подкорковых структурах головного мозга и восстановление количества ИСЭ в периферической крови.

Таким образом, полученные результаты показывают, что общее облучение лабораторных животных в течение 24 мин при 46 мВт/см<sup>2</sup> приводит к выраженному угнетению моноаминоэргической активности головного мозга, нарушению метаболических процессов, истощению АОС липидов коры головного мозга, повышению функции контринсулярного аппарата, т. е. сопровождается развитием острой стрессорной реакции. Выявлена высокая чувствительность гипоталамической области к изучаемому воздействию, что проявляется в нарушении ее адаптивных возможностей.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Агаджанов И. И. // Журн. exper. и клин. мед.— 1977.— № 5.— С. 68—77.
2. Ашмарин И. П. // Физиология пептидов.— Л., 1988.— С. 12—14.
3. Ашмарин И. П. // Вопр. мед. химии.— 1984.— № 3.— С. 2—8.
4. Васильев В. П., Чугунов В. С. Симпатико-адреналовая активность при различных функциональных состояниях человека.— М., 1985.
5. Владимиров В. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.— М., 1972.
6. Радиочастоты и микроволны: Пер. с англ.— М., 1984.— С. 15—17.
7. Десятков Н. Д. // Радиобиология.— 1983.— Т. 23, № 1.— С. 80—82.
8. Аягипенко Е. П., Ковешникова И. В. // Докл. АН СССР.— 1987.— Т. 296, № 3.— С. 724—726.
9. Журавлев А. И. Биохемилюминесценция.— М., 1983.— С. 3—29.
10. Журавлев А. И., Журавлева А. И. Сверхслабое облучение сыворотки крови и его значение в комплексной диагностике.— М., 1975.
11. Колб В. Г., Камышиников В. К. Клиническая биохимия.— Минск, 1976.— С. 209—211.
12. Куликов В. Ю., Стальная И. Д. // Вопр. мед. химии.— 1981.— № 4.— С. 463—468.
13. Маглина Э. Ш., Киселева З. М., Софиева И. Э. // Методы исследования некоторых гормонов и медиаторов.— М., 1965.— С. 25—28.
14. Миколайчик Г. // Механизмы биологического действия электромагнитных излучений.— Пуццино, 1987.— С. 33—34.
15. Морозов В. В., Иванов В. В., Колесова Н. И. // Там же.— С. 30—31.
16. Сандуляк Л. И. // Докл. АН СССР.— 1974.— Т. 219, № 4.— С. 1020—1022.
17. Соколовский В. В. // Вопр. мед. химии.— 1988.— № 6.— С. 2—11.
18. Тихончук В. С., Дробышев В. И., Федоров В. П. Механизмы биологического действия электромагнитных излучений.— Пуццино, 1987.— С. 54—55.
19. Серия технических докладов. Требования ВОЗ.— Женева, 1981.— Т. 6, ч. 1.— С. 81—116.
20. Федорова Т. П., Коршунова Т. С., Ларский Э. Г. // Лаб. дело.— 1983.— № 3.— С. 25—27.

21. Evenson T. A. // Clin. Chem.— 1975.— Vol. 21, N 4.— P. 619—624.
22. Fletcher B. L., Dillard C. G. // Analyt. Biochem.— 1973.— Vol. 52, N 1.— P. 1—9.
23. Fried R. // Biochemie.— 1975.— Vol. 57.— P. 657—660.
24. Maickel S. L., Cox R. H. et al. // Int. J. Neuropharmacol.— 1968.— Vol. 7.— P. 275—281.
25. Plazer L., Kuzela L. // Acta biol. med. germ.— 1968.— Bd 21.— S. 121.
26. Shore F. A., Burkhalter A. et al. // J. Pharmacol. exp. Ther.— 1959.— Vol. 127, N 3.— P. 182—186.

Поступила 07.05.90

#### BIOCHEMICAL MECHANISMS OF IMPAIRMENTS IN FUNCTIONS OF CENTRAL NERVOUS SYSTEM IN MICROWAVE IRRADIATION

A. N. Drygin, R. V. Nechaeva, V. K. Osipovich, S. I. Pavlova, T. N. Surovikina, L. A. Sharova

S. M. Kirov Military-Medical Academy, Leningrad

A rate of lipid peroxidation, content of biogenic amines and cyclic nucleotides were studied in various brain structures of 168 rats under conditions of microwave irradiation within 24 min at 46 mW/cm<sup>2</sup>. Total irradiation of animals was shown to result in distinct inhibition of monoaminergic activity of brain, especially of hypothalamus, in impairment of metabolic reactions, in exhaustion of the lipid antioxidative system of brain cortex and in stimulation of the contrainsular apparatus functions.

© М. А. ФЛЕРОВ, Т. И. ТОЛСТУХИНА, 1992

УДК 616.8-009.12-07: [616.831-091.81 + 616.831-091.94]-008.939.53-074

М. А. Флеров, Т. И. Толстухина

#### МЕТАБОЛИЗМ ФОСФОЛИПИДОВ НЕЙРОНОВ И НЕЙРОГЛИИ ПРИ СУДОРОГАХ

Физиологический институт им. А. А. Ухтомского Ленинградского университета

Одной из важнейших функций ЦНС являются генерация и проведение нервного импульса. Изучение метаболических процессов, протекающих на различных стадиях нервного импульса, тесно связано с исследованием экспериментально вызванных судорожных состояний. Проблема познания биохимических процессов при судорогах является актуальной как в теоретическом, так и в практическом плане, так как направлена на исследование механизмов одного из тяжелейших и загадочных заболеваний — эпилепсии. Ограниченность большинства биохимических исследований эпилепсии заключается главным образом в том, что изучение этого феномена проводится в основном на ткани головного мозга в целом без учета своеобразия структуры и функций входящих в его состав клеточных популяций. Однако уже в настоящее время в ряде работ обосновывается гипотеза, по которой в метаболических процессах при эпилептогенезе принимают участие не отдельные сообщества нейронов, а комплекс нейрон — нейроглия [7, 8]. По-видимому, основные биохимические процессы, приводящие к судорожной активности, протекают на уровне мембран нейронов и клеток нейроглии. В связи с этим очевидно необходимость изучения особенностей обмена мембранных компонентов, и в частности фосфолипидов, составляющих основу структурно-динамического матрикса мембраны, на котором протекают многочисленные регуляторные метаболические реакции. Следует отметить, что в лите-

ратуре имеются лишь единичные работы, посвященные метаболизму липидов в головном мозгу при судорогах [9, 15]. Что касается обмена фосфолипидов при судорожных припадках в нейронах и нейроглии, то такие работы полностью отсутствуют.

Целью настоящей работы явилось исследование метаболической активности индивидуальных фосфолипидов в нейронах и нейроглии при судорогах.

**Методика.** Опыты проводили на белых крысах-самцах массой 120—150 г. В качестве судорожного агента мы применили пикротоксин, который блокирует ГАМК-рецепторы, не изменяя уровня ГАМК, вызывая резкое повышение моторной активности и судороги у животных. Пикротоксин вводили внутривенно из расчета 0,2 мл 0,25 % раствора на 100 г массы животного. Радиоактивным предшественником биосинтеза фосфолипидов являлся  $2\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетат, который вводили подкожно из расчета 30 мкКи на 100 г массы животного, время радиоактивной экспозиции 60 мин. Крыс декапитировали на пике судорог, мозг быстро извлекали и отмывали от крови охлажденным физиологическим раствором. Кору больших полушарий помещали на охлажденные стеклянные пластинки, тщательно измельчали и выделяли фракции, обогащенные нейронами и нейроглией по методу Селлинжера и соавт. в нашей модификации [10, 22]. Индивидуальные фосфолипиды получали методом двухмерной хроматографии в тонком слое силикагеля КСК [21]. Идентификацию фосфолипидов проводили методом ИК-спектроскопии [11]. Количественное определение фосфолипидов проводили по Бартлету [13]. Радиоактивность фосфолипидов подсчитывали в толуольном сцинтилляторе, содержащем 300 мг 1,4-ди(5-фенил-2-оксозолилбензола) и 4 г 2,5-дифенилноксазола в 1 л толуола.

**Результаты и обсуждение.** Пикротоксин относится к группе аналгетических средств и является сильным возбуждающим агентом, влияющим преимущественно на высшие отделы ЦНС. При введении пикротоксина, как видно из табл. 1, наблюдается стимуляция включения радиоактивного углерода в нейроны.

Повышение уровня включения  $2\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетата в нейронах в среднем в 2 раза, по-видимому, нельзя объяснить увеличением проницаемости клеточной мембраны под действием пикротоксина, так как в нейроглии не наблюдается достоверного подъема удельной радиоактивности. Вполне вероятно, что увеличение скорости включения метки в нейроны обусловлено тем, что в результате действия пикротоксина наблюдается резкое увеличение содержания ацетилхолина в свободной форме [6]. Следствием увеличения концентрации ацетилхолина является усиление транспорта ионов

$\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ , которое влечет за собой увеличение интенсивности метаболизма в нейрональных клетках, о чем свидетельствует, в частности, и увеличение степени включения метки в липидную фракцию нейронов почти в 5 раз.

Для метаболизма липидов глии характерна большая резистентность по сравнению с нейронами, которая коррелирует с большей морфологической устойчивостью нейроглиальных клеток к воздействию экстремальных факторов [11]. Большая стабильность метаболических процессов в нейроглии при влиянии различных воздействий отмечена для нуклеиновых кислот, белков, интенсивности гликолиза и активности окислительных процессов [2, 17]. Известно, что при судорогах происходит усиление пассивного транспорта ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  [14]. Это может происходить либо за счет дополнительного появления новых ион-селективных каналов, либо за счет увеличения времени их работы [4]. В связи с этим естественно предположить, что липиды, входящие в состав ион-селективных каналов, отвечают более активным метаболизмом на изменение интенсивности деятельности последних. Особенно отчетливо об этом можно судить по изменению скорости обмена фосфолипидов, под непосредственным контролем которых находится работа ион-селективных каналов (табл. 2).

Обращает на себя внимание тот факт, что судорожные припадки как экстремальное воздействие усиливают метаболическую активность всех исследованных фосфолипидов нейрональных мембран. Скорость обмена фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина и сфингомиелина, соотношения которых в мембране определяет ее структурные особенности, увеличивается в 2—2,5 раза. Наиболее значительные изменения наблюдаются в метаболической активности минорных фосфолипидов. Следовательно, пикротоксин, вызвал генерализованный подъем обмена фосфолипидов нейрональных клеток, определяет долю метаболического участия индивидуальных фосфолипидов в крупномасштабных структурных перестройках в мембранах. Эти перестройки в мембранах вызывают изменения взаиморасположения и молекулярных взаимодействий у значительного количества мембранных компонентов, сопряженное с конформационной модификацией белков и липидов. Эти процессы находят отражение в изменении пассивного и активного транспорта в мембране, работе ионных каналов, изменении каталитической, транспортной и иммунологической активности белков. Фармакологические эксперименты установили влияние пикротоксина на уровень

Таблица 1

Удельная радиоактивность нейронов, нейроглии и их липидной фракции при введении пикротоксина

Исследуемый материал	Норма	Пикротоксин	П/Н
Нейроны	257 ± 49	570 ± 58	2,1
Нейроглия	333 ± 22	371 ± 23*	1,1
Липиды нейронов	568 ± 67	2595 ± 415	4,6
Липиды нейроглии	436 ± 42	904 ± 92	2,1

**Примечание.** Здесь и в табл. 2 и 3: удельная радиоактивность нейронов и нейроглии выражена в импульсах в 1 мин на 1 мг белка, удельная радиоактивность липидов — в импульсах в 1 мин на 1 мг углерода липидов; П/Н — отношение уровня радиоактивности при введении пикротоксина по сравнению с нормой; звездочка — различия статистически недостоверны.

Таблица 2

Удельная радиоактивность фосфолипидов нейронов при введении пикротоксина

Фосфолипиды	Норма	Пикротоксин	П/Н
Лизофосфатидилхолин	1060 ± 221	5 456 ± 451	5,1
Сфингомиелин	613 ± 34	1 707 ± 91	2,8
Фосфатидилсерин	719 ± 274	7 380 ± 104	10,3
Фосфатидилхолин	747 ± 106	1 608 ± 93	2,1
Фосфатидилинозит	902 ± 69	14 628 ± 1 115	16,2
Фосфатидилэтаноламин	682 ± 69	1 592 ± 125	2,3
Фосфатидная кислота	2 113 ± 722	14 337 ± 2 192	6,2

дофамина [3]. Вполне возможно, что увеличение скорости включения радиоактивного предшественника в лизофосфатидилхолин связано с тем, что этот фосфолипид может выступать в качестве эндогенного регулятора дофаминового рецептора [20]. Не исключено, что судорожные припадки влияют на процессы, неразрывно связанные с состоянием жидкокристаллических структур, а, как известно, лизофосфатидилхолин сдвигает точку плавления в область более низких температур, вследствие чего происходит изменение микровязкости липидного бислоя и физико-химических параметров мембран [1, 2].

Наиболее значительные изменения метаболизма отмечены для фосфатидилинозита. Уровень удельной радиоактивности фосфатидилинозита при судорогах в нейронах возрастает по сравнению с нормой более чем в 16 раз. В литературе имеются указания на усиление гидролиза фосфатидилинозитов при судорогах, когда не происходит накопления продуктов их распада — инозит-моно- и дифосфатов, а также фосфатидных кислот [25]. Вероятно, при судорогах происходит активация как распада, так и синтеза фосфатидилинозита. В пользу этого говорит факт значительного повышения при судорогах содержания простагландинов ПГЕ<sub>2</sub> и ПГФ<sub>2</sub>, обработка препаратов антиконвульсантами предотвращала этот процесс [19]. Активация метаболизма фосфатидилинозита приводит к образованию диацилглицерина — вторичного мессенджера, являющегося доминирующим фактором в активации протеинкиназы С [5, 16].

Одновременно с этим увеличивается интенсивность обновления фосфатидилсерина, метаболизм которого также тесно связан с активностью протеинкиназы С. Активирующее влияние фосфатидилсерина на протеинкиназу С имеет свои отличия от диацилглицерина. По-видимому, фосфатидилсерин обеспечивает связывание протеинкиназы С с рецепторами, локализованными в мембране [23, 24].

В нейроглии также наблюдается активация скорости включения радиоактивного углерода в фосфолипиды, что отчетливо видно из данных, представленных в табл. 3. В клетках глии, так же как и в нейронах, наибольшее влияние судороги оказывают на фосфоинозит и фосфатидилсерин, уровень метаболизма которых по сравнению с нормой увеличивается в 10 раз. Следует отметить, что если в нейронах достоверно повышалась метаболическая активность всех фосфолипидов при судорогах, то в нейроглии не удалось установить достоверных отличий для сфингомие-

лина и фосфатидилхолина. Имеющиеся общие черты в обмене фосфолипидов в нейронах и нейроглии свидетельствуют, с одной стороны, о единстве метаболической системы нейрон — нейроглия, а с другой — об универсальности клеточного ответа, осуществляемого фосфолипидами.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Брусованик В. И., Ерин А. Н., Сенищева А. А. и др. // Нейрохимия.—1986.— Т. 5.— С. 3—10.
2. Гейнисман Ю. Я. Структурные и метаболические проявления функции нейрона.— М., 1974.
3. Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н. // Успехи физиол. наук.— 1983.— Т. 14.— С. 102—119.
4. Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н. // Там же.— 1984.— Т. 15.— С. 83—107.
5. Долго-Сабуров В. Б. // Нейрохимия.—1986.— Т. 5.— С. 306—314.
6. Маслова И. В. Регуляция обмена ацетилхолина некоторыми нейротропными препаратами: Автореф. дис. ... канд. наук.— Минск, 1980.
7. Погодаев К. И. // Нейрохимические механизмы эпилепсии.— Тбилиси, 1980.— С. 229—240.
8. Погодаев К. И. Эпилептология и патохимия мозга.— М., 1986.— С. 104—125.
9. Тупеев И. Р., Бордюков М. М., Крыжановский Г. Н., Никушкин Е. В. // Бюл. exper. биол.—1987.— Т. 44.— С. 167—169.
10. Флеров М. А. // Вопр. мед. химии.—1978.— Т. 24.— С. 174—179.
11. Флеров М. А. // Нейрохимия.—1985.— Т. 4.— С. 393—401.
12. Чистяков И. Г., Усольцева В. А., Сельезнев С. А. // Успехи соврем. биол.—1976.— Т. 82.— С. 89—102.
13. Bartlett G. // J. biol. Chem.—1959.— Vol. 234.— P. 466—469.
14. Bolwig T. G., Astrup J., Christoffersen G. R. J. // Biomed. Express.—1977.— Vol. 27.— P. 99—102.
15. Gorazzi L., Piccinin G. L., Roberti R. et al. // Neurochem. Res.—1985.— Vol. 10.— P. 879—885.
16. Heymans F., Da Silva C., Marres N. et al. // FEBS Lett.—1987.— Vol. 218.— P. 35—40.
17. Hyden H. // Neurochemistry.—Springfield.—1962.— P. 331—375.
18. Kuffler S. W., Nicolls J. G. // Ergeb. Physiol.—1966.— Bd 57.— S. 1—90.
19. Lysz T. W., Centra M., Markey K., Kletting P. E. // Brain Res.— 1987.— Vol. 408.— P. 6—12.
20. Oliveira C. R., Duarte E. P., Carvalho A. P. // J. Neurochem.— 1984.— Vol. 43.— P. 455—465.
21. Pumphrey A. M. // Biochem. J.—1969.— Vol. 112.— P. 61—72.
22. Sellinger O. Z., Azcurra J. M., Johnson D. B. et al. // Nature. New Biol.—1971.— Vol. 230.— P. 253—256.
23. Wolf M., Sahyoun N. // J. biol. Chem.— 1986.— Vol. 261.— P. 13327—13332.
24. Wolf M., Burgess S., Misra U. K., Sahyoun N. // Biochem. biophys. Res. Commun.—1986.— Vol. 140.— P. 691—698.
25. Yoshida S., Ikeda M., Busto P. et al. // Brain Res.— 1987.— Vol. 412.— P. 1114—1124.

Поступила 20.02.90

#### METABOLISM OF NEURONE AND NEUROGLIA PHOSPHOLIPIDS IN CONVULSIONS

M. A. Flerov, T. I. Tolstukhina

A. A. Ukhtomsky Physiological Institute, State University, Leningrad

Metabolism of individual phospholipids was studied in neurones and neuroglia under conditions of convulsions caused by picrotoxin administration. Metabolic activity of all the phospholipids studied was increased in neuronal membranes under extremal conditions of convulsive attacks. The rate of metabolism of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and sphingomyelin was increased 2-2.5-fold approximately. The most distinct alterations of metabolic activity were observed in the fraction of minor phospholipids: specific radioactivity of phosphatidylserine was increased 10-fold and phosphatidylinositol — 16-fold. Metabolism of phosphatidic acid

Таблица 3

Удельная радиоактивность фосфолипидов нейроглии при введении пикротоксина

Фосфолипиды	Норма	Пикротоксин	П/Н
Лизофосфатидилхолин	492±117	2043±135	4,1
Сфингомиелин	372±120	552±98*	1,5
Фосфатидилсерин	326±23	3536±455	10,8
Фосфатидилхолин	640±153	651±40*	1,0
Фосфатидилинозит	414±98	4378±355	10,5
Фосфатидилэтаноламин	157±25	326±75	2,0
Фосфатидная кислота	1208±96	4807±996	4,0

and lysophosphatidylcholine was elevated more than 15-fold. Convulsions exhibited the most distinct effect on metabolism of phosphatidylinositol and phosphatidylserine in neuroglia cells. As distinct from neurones, metabolism of phosphatidylcholine and sphingomyelin was not markedly altered in neuroglia. Similar metabolism and universal cell response, carried out via phospholipids, appear to occur in the system neurone-neuroglia.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1992

УДК 615.272.4.014.425:547.283.2].036:[616.36-02:615.917].076.9

Я. И. Гонский, М. М. Корда, И. Н. Клищ

## АНТИОКСИДЛИТЕЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДА ПРИ ОСТРОМ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ ТЕТРАХЛОРМЕТАНОМ

Тернопольский медицинский институт

Процессы свободнорадикального окисления в клетке регулируются сложной антиоксидантной системой (АОС), которая обеспечивает нейтрализацию свободных радикалов и утилизацию продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Под воздействием различных внешних и внутренних факторов может нарушиться функционирование АОС, что приводит к развитию неспецифической патофизиологической реакции — синдрому перекисидации. Последнее имеет место при метаболизме  $CCl_4$  в монооксигеназной системе микросом печени, в результате чего продуцируются радикалы  $CCl_3$  и  $CCl_3O_2$ , которые взаимодействуют с молекулами жирных кислот и инициируют ПОЛ [3, 9, 17].

Снижает интенсивность  $CCl_4$ -индуцированного ПОЛ введение экзогенных антиоксидантов [1, 9, 11]. В литературе появилось несколько сообщений об антиоксидлительных свойствах диметилсульфоксида (ДМСО) [8, 10] — препарата с широким спектром фармакологического действия, включая анальгезирующую, противовоспалительную, противоишемическую активность [4, 16].

Целью настоящей работы явилось изучение способности ДМСО ингибировать  $CCl_4$ -зависимое ПОЛ и его влияние на АОС печени крыс.

**Методика.** Опыты проведены на белых беспородных крысах-самцах массой 180–200 г. Животных содержали на обычном рационе вивария. Токсический гепатит вызывали путем подкожного введения  $CCl_4$  в дозе 2 г/кг на протяжении 4 дней [7]. ДМСО в дозе 1 г/кг вводили подкожно ежедневно на протяжении всего опыта. Крыс разделили на три группы: I — интактные; II — контроль ( $CCl_4$ );

III —  $CCl_4$ +ДМСО. Животных декапитировали под легким эфирным наркозом на 4, 7 и 14-е сутки от начала введения  $CCl_4$ . Исследованию подвергали ткани печени. В 10 % печеночном гомогенате определяли интенсивность свободнорадикальных процессов по уровню диеновых конъюгатов (ДК) и ТБК (2-тиобарбитуровая кислота)-активных продуктов [12, 13], активность супероксиддисмутазы определяли по ее способности ингибировать восстановление нитротетразолия синего [15], активность глутатионпероксидазы — по методу [6], уровень  $\alpha$ -токоферола — флюорометрическим методом [14].

Исследовали также способность ДМСО ингибировать НАДФ-Н-зависимое ПОЛ в микросомах гепатоцитов *in vitro*. Печень промывали холодным 1,15 % раствором KCl и гомогенизировали в 3 объемах этого же раствора. Гомогенат центрифугировали при 0 °С в течение 15 мин при 9000 г. Надосадочную жидкость подвергали дальнейшему центрифугированию при 105 000 г в течение 60 мин. Осадок мембран эндоплазматической сети суспендировали в среде выделения: 1 мл среды на 1 г сырой массы печени давал суспензию микросомальной фракции с содержанием белка около 10 мг в 1 мл [5]. Состав реакционной среды: 50 мМ трис-HCl pH 7,4, 160 мМ KCl, 1 мМ НАДФ-Н, 20 мМ никотинамида, 4 мМ АДФ, 2,5 мкМ  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 10 мг/мл микросомального белка, 3,4 мМ  $CCl_4$ , различные концентрации ДМСО [2]. Конечный объем среды 2 мл. Смесь инкубировали при 37 °С на протяжении 1 ч при постоянном встряхивании. Для определения ТБК-активных продуктов отбирали из инкубационной смеси по 1 мл и переносили в пробирки, содержащие по 2 мл 30 % трихлоруксусной кислоты и 2 мл 0,8 % тиобарбитуровой кислоты. После 10 мин кипячения пробы центрифугировали и в надосаде определяли оптическую плотность при 532 нм. Концентрацию рассчитывали, исходя из коэффициента молярной экстинкции  $E=1,56 \times 10^5 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ .

**Результаты и обсуждение.** Интоксикация крыс  $CCl_4$  сопровождается резкой активацией процессов свободнорадикального окисления в печени и угнетением АОС (табл. 1). При этом максимальные изменения наблюдались на 7-е сутки от начала введения  $CCl_4$ . В этот срок содержание ТБК-активных продуктов повышалось в 5 раз, а ДК — в 2,5 раза. Активность супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы и уровень  $\alpha$ -токоферола находились в обратной зависимости от интенсивности ПОЛ. Ингибирование АОС при  $CCl_4$ -гепатите, очевидно, обусловлено усиленным расходом ее компонентов на нейтрализацию активных радикалов  $CCl_3$  и торможение интенсифицированных процессов ПОЛ. С другой стороны, как сами свободные радикалы, так и продукты ПОЛ обладают мембранодеструктивным свойством, нарушают функционирование мембранно-связанных ферментных комплексов и вызывают, таким образом, угнетение синтеза белков, в том числе и антиоксидантных ферментов.

Введение крысам ДМСО в дозе 1 г/кг при-

Таблица 1

Содержание продуктов ПОЛ и состояние АОС в печени интактных, контрольных и леченных ДМСО крыс (n=10)

Показатели	Интактные	4-й день		7-й день		14-й день	
		$CCl_4$	$CCl_4$ +ДМСО	$CCl_4$	$CCl_4$ +ДМСО	$CCl_4$	$CCl_4$ +ДМСО
ТБК-активные продукты, мкмоль/г	2,91±0,55	4,71±0,10*	4,24±0,22	14,59±0,20*	10,34±0,36**	9,13±0,21*	6,52±0,26**
Диеновые конъюгаты, ед/г	4,20±0,18	8,35±0,24*	6,88±0,30**	10,70±0,30*	9,20±0,50**	9,65±0,19*	8,14±0,10**
Супероксиддисмутазы, ед/мг	0,57±0,02	0,22±0,02*	0,42±0,03**	0,08±0,002*	0,33±0,06**	0,51±0,03	0,52±0,03
Глутатионпероксидазы, ед/(мин·г)	28,75±0,64	26,62±0,90*	26,44±1,23	14,12±0,41*	15,94±0,24**	16,63±0,86*	19,86±0,42**
$\alpha$ -Токоферол, нмоль/г	47,64±3,28	30,96±4,24*	32,28±2,14	30,01±1,44*	35,24±1,42**	37,16±2,14*	43,84±2,10**

Примечание. Одна звездочка — различия достоверны по сравнению с интактными животными ( $p < 0,05$ ), две — различия достоверны по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ).

Таблица 2

Скорость накопления ТБК-активных продуктов (в мкмоль на 1 мг белка за 1 ч) в микросомах печени крыс ( $n=6$ )

Условия опытов	Исходный фон	1 ч инкубации
Без ДМСО	2,24±0,44	57,69±2,44
Добавление ДМСО:		
1 г/л	2,16±0,62	26,14±4,95*
2 г/л	2,18±0,42	22,18±3,36*

Примечание. Звездочка -- различия достоверны по сравнению с пробами без ДМСО.

водило к достоверному улучшению показателей ПОЛ и АОС во все сроки исследования. Так, на 7-е сутки содержание ТБК-активных продуктов в печени леченых крыс по сравнению с контрольными уменьшилось на 150 %, ДК — на 36 %. Наиболее выраженное действие ДМСО оказал на супероксиддисмутазу — фермент, блокирующий цепь свободнорадикального окисления еще на стадии инициации. На 7-е сутки активность супероксиддисмутазы повысилась с 14 % (контроль) до 58 % (леченые животные). Содержание основного перехватчика свободных радикалов —  $\alpha$ -токоферола — под влиянием ДМСО также достоверно возросло (на 7-е сутки на 17 %). По-видимому, такое ингибирование процессов ПОЛ и улучшение компонентов АОС, ответственных за перехват свободных радикалов, обусловлены собственными антирадикальными свойствами ДМСО.

Антиокислительные свойства ДМСО подтверждаются и опытами *in vitro* (табл. 2). Инкубация микросом печени в течение 1 ч в присутствии катализаторов реакций липопероксидации  $CCl_4$ ,  $Fe^{2+}$  и веществ, восстанавливающих  $Fe^{3+}$  (никотинамид, АДФ, НАДФ·Н), сопровождалось выраженной активацией свободнорадикальных процессов, что проявлялось возрастанием количества продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, в 26 раз. Добавление в инкубационную смесь 1 г/л ДМСО приводило к существенному ингибированию интенсивности реакций ПОЛ (концентрация ТБК-активных продуктов увеличилась в 13 раз). ДМСО в дозе 2 г/л угнетал процессы ПОЛ в еще большей степени. Механизм антиокислительного эффекта ДМСО требует дальнейшего изучения. Возможно, он является следствием шунтирования НАДФ·Н-специфической цепи переноса электронов, обеспечивающей, с одной стороны, восстановление  $CCl_4$  в активный интермедиат  $CCl_3$ , а с другой — превращение неактивного железа  $Fe^{3+}$  в активное  $Fe^{2+}$ . Возможно, антиокислительное действие ДМСО обусловлено способностью связывать ионы железа или свободные радикалы типа  $CCl_3$ ,  $R^*$ ,  $OH^*$ .

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что ДМСО способен эффективно тормозить  $CCl_4$ -индуцированные процессы ПОЛ и улучшать состояние АОС гепатоцитов крыс. Антиокислительные свойства ДМСО проявляются как *in vivo*, так и *in vitro*.

Высокая лечебная эффективность, малая токсичность и хорошая переносимость ДМСО позволяют рекомендовать этот препарат для клини-

ческого изучения в условиях острой интоксикации тетрахлометаном.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М., 1972.
2. Гацко Г. Г., Мажуль Н. М., Позднякова Е. А. // Бюл. экпер. биол. — 1982. — № 4. — С. 30—32.
3. Губский Ю. И. Коррекция химического поражения печени. — Киев, 1989.
4. Даниленко М. В., Туркевич П. М. Клиническое применение димексида. — Киев, 1976.
5. Карузина И. И., Арчаков А. И. // Современные методы в биохимии / Под ред. В. П. Ореховича. — М., 1977. — С. 49—52.
6. Кругликова Г. О., Штутман Ц. М. // Укр. биохим. журн. — 1976. — Т. 47, № 2. — С. 223—228.
7. Левшина Б. И. Экспериментальная фармакотерапия препаратов селена и тиазолидина токсического повреждения печени: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Харьков, 1973.
8. Левшина И. П., Курочкина Е. В., Обидин А. Б., Гуляева Н. В. // Журн. высш. перн. деят. — 1988. — № 3. — С. 533—539.
9. Мхитарян В. Г., Агаджанов М. И., Геворкян Д. М., Микаелян Э. М. // Вестн. АМН СССР. — 1982. — № 9. — С. 15—18.
10. Обидин А. Б., Левшина И. П., Никонов Б. В., Гуляева Н. В. Свободные радикалы и биостабилизаторы. — София, 1987. — С. 104—108.
11. Потапович А. И., Костюк В. А. // Биохимия. — 1988. — Т. 53, № 2. — С. 233—237.
12. Стальная И. Д. // Современные методы в биохимии / Под ред. В. П. Ореховича. — М., 1977. — С. 49—52.
13. Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г. // Там же. — С. 66—68.
14. Черняускене Р. Ч., Варшклявичене З. З., Грибаускас П. С. // Лаб. дело. — 1984. — № 6. — С. 362—365.
15. Beachamp C., Fridovich J. // Analyt. Biochem. — 1974. — Vol. 44. — P. 276—280.
16. Kharasch N., Thyagarajan B. S. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1983. — Vol. 411. — P. 391—395.
17. Rosen G. M., Rauchman E. J. // Toxicol. Lett. — 1982. — Vol. 10, N 4. — P. 337—344.

Поступили 26.12.89

#### ANTIOXIDATIVE EFFECT OF DIMETHYL SULFOXIDE IN ACUTE IMPAIRMENT OF LIVER TISSUE WITH TETRACHLOROMETHANE

Ya. I. Gonsky, M. M. Korda, I. N. Klisch

Medical School, Ternopol

After subcutaneous administration of dimethyl sulfoxide into rats with toxic, tetrachloromethane-produced impairment of liver tissue, lipid peroxidation was effectively inhibited in hepatocytes and the state of antioxidation system was improved. Antioxidative properties of dimethyl sulfoxide were shown also *in vitro*.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1992

УДК 616.13-004.6-02: [615.917:547.262]-092-07

Г. Х. Божко, В. С. Чурсина, П. В. Волошин

#### АЛКОГОЛЬ И АТЕРОГЕНЕЗ: ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ И ВЫСОКИХ ДОЗ ЭТАНОЛА НА ХОЛЕСТЕРИН КРОВИ КРЫС

Харьковский НИИ неврологии и психиатрии

В последние годы значительно возрос интерес к изучению роли алкоголя в развитии атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний. Это обусловлено данными эпидемиологических исследований о кардиопротективных эффектах этанола, профилактическом его действии в отношении ише-

мической болезни сердца, более низкой смертности больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями, умеренно употребляющих алкоголь, по сравнению с трезвенниками, увеличении продолжительности жизни у лиц пожилого возраста при условии регулярного умеренного употребления алкоголя [13, 16]. Между тем каждое из отмеченных соображений встречает серьезные возражения [3, 5]. Отмечается ошибочность выводов эпидемиологических исследований о благоприятном влиянии алкоголя на сердечно-сосудистую систему, поскольку имело место некорректное формирование контрольных групп [17, 19, 21].

Механизмы благоприятного влияния алкоголя связывают с возрастанием уровня холестерина антиатерогенных липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), хотя данные об изменении содержания и состава липопротеинов при действии этанола весьма противоречивы [4, 9]. Одно из возможных объяснений неоднозначности результатов, которые привлекают для суждения о благоприятном или отрицательном влиянии алкоголя на процессы атерогенеза, может заключаться в наличии зависимости величины и направленности эффекта от количества и времени приема этанола. Совокупность полученных данных позволяет заключить, что граница, по одну сторону которой могут ожидать позитивные эффекты хронического действия этанола, а по другую — негативные, лежит вблизи значения 30—50 мл алкоголя в сутки (расчет на 100 % этанол) [15, 16, 18, 22].

В настоящей работе была поставлена задача сравнить в одних и тех же условиях экспериментов действие низких и высоких доз этанола на изменение концентрации и включения меченого холестерина в липопротеины плазмы и эритроциты крыс.

**Методика.** В опытах использовали 40 беспородных крыс-самцов массой 200—250 г в возрасте 6—7 мес. Острое действие этанола на изучаемые параметры исследовали через 2 ч после внутрибрюшинного введения 25 % раствора этанола. В хроническом эксперименте (в течение 30 сут) первые 2 нед животные получали этанол в составе рациона, в последующие 2 нед — внутрибрюшинно (25 % раствор). Изучаемые параметры в этом случае регистрировали на следующий день после отмены этанола. В контрольных опытах этанол заменяли физиологическим раствором.

При однократном и длительном введении исследовали эффекты двух различных доз этанола — 0,6 и 4 г на 1 кг массы тела, которые для удобства изложения результатов исследования обозначены нами как низкие и высокие соответственно. Несмотря на очевидную условность количественной характеристики вводимого этанола, при рассмотрении проблемы атерогенеза доза, меньшая чем 0,8 г/кг в сутки, уверенно может характеризоваться как низкая [10]. Утвердилось мнение, что превышение именно этой дозы нивелирует положительные эффекты этанола [9]. Количество алкоголя 4 г/кг массы тела на самом деле должно характеризоваться как доза средней токсичности, поскольку ее значение соответствует  $1/2$  полудетальной дозы этанола [11].

Плазму получали после центрифугирования крови в силиконизированных или гепаринизированных пробирках в течение 15 мин при 3000 об/мин. Осадок эритроцитов пятикратно отмывали изотоническим раствором NaCl. После подсчета количества эритроцитов суспензия служила для экстракции холестерина спирт-эфирной смесью [2]. Метод выделения липопротеинов и определение концентрации холестерина описаны в предыдущей работе [2].

Неопределенно меченый  $^3\text{H}$ -холестерин («Изотоп», СССР) с удельной активностью 14 МБк на 1 мг холестерина вводили внутрибрюшинно за 2 ч до начала эксперимента в количестве 8 МБк на 100 г массы тела. Радиоактивность измеряли на счетчике «Бета-1» в диоксановом сцинтиляторе [2]. Преимущественно использовали реактивы отечественного производства марки х. ч. или о. ч.

Статистический анализ полученных результатов проводили по методу Фишера — Стьюдента [12]. Различие между сравниваемыми группами считалось статистически значимым, если вероятность его случайного происхождения не превышала 5 % ( $p < 0,05$ ).

**Результаты и обсуждение.** Анализ полученных результатов (см. таблицу) показывает, что острое действие этанола характеризовалось уменьшением концентрации холестерина ЛПВП плазмы крови. Такой эффект вызывали обе исследованные дозы, причем величина изменений была близкой (30 и 38 %), хотя дозы отличались в 6,6 раза. Концентрация общего холестерина при однократном введении этанола также уменьшалась. Значение величины холестерина апо В-содержащих липопротеинов в результате острого действия меньших из исследованных доз этанола не изменялось, однако вдвое возрастало по сравнению с контролем после введения 4 г/кг этанола.

В результате длительного введения низкой дозы этанола наблюдалось значительное (на 118 %) увеличение содержания холестерина в эритроцитах. В этих условиях уровень холестерина ЛПВП

**Изменение концентрации холестерина плазмы крови (в мг/дл), эритроцитов (в мг на 1 эритроцит  $\cdot 10^{-10}$ ) и удельной радиоактивности (в имп/мин на 1 мг холестерина  $\cdot 10^{-3}$  и имп/мин на 1 эритроцит  $\cdot 10^{-7}$  соответственно) при действии этанола ( $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ )**

Условия опытов	Концентрация холестерина				Индекс атерогенности	Удельная радиоактивность		
	плазма крови	ЛПВП	эритроциты	апо В-содержащие липопротеины		плазма крови	ЛПВП	эритроциты
Контроль (n=16)	61 ± 5	53 ± 4	893 ± 97	8 ± 0,7	0,15	137 ± 12	128 ± 12	22,2 ± 2,1
<b>Высокие дозы этанола</b>								
Острое действие (n=8)	49 ± 2*	33 ± 2*	1090 ± 59	16 ± 1,5*	0,48	88 ± 7*	114 ± 9	28,5 ± 2,3
Хроническое действие (n=13)	56 ± 3	36 ± 3*	722 ± 94	20 ± 1,8*	0,55	137 ± 10	167 ± 12	55,6 ± 6,0*
<b>Низкие дозы этанола</b>								
Острое действие (n=6)	46 ± 3*	37 ± 2*	905 ± 71	9 ± 0,9	0,24	99 ± 6*	109 ± 11	30,1 ± 3,3
Хроническое действие (n=8)	70 ± 7	51 ± 5	1945 ± 197*	19,1 ± 1,8*	0,37	82 ± 8*	80 ± 7*	64,6 ± 5,4*

**Примечание.** Звездочка — изменение статистически значимо по сравнению с контролем. Холестериновый индекс атерогенности рассчитывали как ХС плазмы — ХС ЛПВП/ХС ЛПВП, где ХС — холестерин. Результаты исследований объединены в одну группу.

не изменялся, однако при высоких дозах происходило отчетливое его понижение. Концентрация холестерина апо-В-содержащих липопротеинов при хроническом действии этанола, напротив, увеличивалась. Такой эффект вызывали обе исследованные дозы этанола; изменение в 2,4–2,5 раза практически не зависело от величины дозы.

Развитие патологических процессов, связанных с атеросклерозом, часто сопровождается повышением относительного содержания холестерина в ЛПНП, ЛП очень низкой плотности, мембранах эритроцитов либо уменьшением количества холестерина ЛПВП плазмы крови [6]. Таким образом, полученные в работе данные в целом вполне могут рассматриваться как свидетельствующие о «проатерогенном» влиянии исследованных нами высоких и низких доз этанола. Справедливость этого заключения иллюстрируется сопоставлением величины холестеринового индекса атерогенности различных групп алкоголизированных животных (см. таблицу). Общеизвестно, что этот индекс является одним из наиболее информативных и надежных параметров, который характеризует атерогенные нарушения [6]. Его величина оказалась больше у всех групп подопытных животных по сравнению с контрольными. Обращает на себя внимание тот факт, что высокие дозы этанола характеризовались существенно большим эффектом, чем низкие, в остром и хроническом экспериментах; длительное действие этанола привело к большему возрастанию индекса атерогенности по сравнению с однократным. Таким образом, оценка значения интегрального параметра, который учитывает распределение холестерина между атерогенными и антиатерогенными классами липопротеинов, показывает, что низкие дозы этанола наряду с высокими сложно рассматривать в качестве превентивного фактора развития атерогенеза и связанных с ним сердечно-сосудистых заболеваний.

Полученные данные хорошо согласуются с результатами недавно опубликованной работы, в которой исследовалось изменение содержания холестерина плазмы и эритроцитов при остром и хроническом (1 мес) действии этанола [1]. Величина применявшейся для хронического воздействия дозы (2,5 г/кг интрагастрально) была промежуточной по сравнению с обозначенными в нашей работе как низкая и высокая. Сходство изменений отмечается в результате определения трех показателей: острое действие этанола снижает уровень холестерина ЛПВП, при однократном и длительном введении увеличивается количество апо В-содержащих липопротеинов, при хроническом действии этанола содержание холестерина возрастает в мембранах эритроцитов [1].

Как видно из данных, представленных в таблице, острое действие высоких и низких доз этанола вызывало уменьшение удельной радиоактивности общего холестерина плазмы. На основании определения интенсивности включения меченого стерина можно судить о том, что при хроническом введении этанола низкие дозы оказались более эффективными, чем высокие, в отношении действия на холестерин плазмы крови, так как в первом случае величина удельной радиоактивности общего холестерина и ЛПВП снижалась, а при введении больших доз не изменялась.

Можно предположить, что уменьшение включения  $^3\text{H}$ -холестерина в ЛПВП под влиянием длительного введения этанола свидетельствует о снижении холестерин-акцепторной функции этих липопротеидных частиц, что характерно для больных ишемической болезнью сердца, связанной с атеросклерозом коронарных артерий [8].

Изменение включения радиоактивной метки в эритроциты под влиянием обеих исследованных доз этанола было качественно одинаковым — уровень радиоактивности эритроцитов возрастал. Между эритроцитами и плазмой крови происходит постоянный обмен молекулами свободного холестерина. Общее количество эритроцитарного холестерина достаточно велико, превышая в 1,5–2 раза содержание его в плазме крови. Мембраны эритроцитов выступают в роли своеобразного холестеринового буфера [7]. Данные о распределении величины радиоактивности  $^3\text{H}$ -холестерина свидетельствуют о том, что в условиях интоксикации животных низкими дозами этанола равновесие холестерин плазмы/холестерин эритроцитов сдвинуто в направлении клеток крови. Это согласуется с тем фактором, что при действии низких доз этанола наблюдалось также значительное возрастание содержания холестерина в эритроцитах. Вероятно, что эти изменения отражают развитие адаптивных процессов, направленных на компенсацию дестабилизирующих клеточные мембраны прямых эффектов этанола или продуктов его превращения. Увеличение содержания свободного холестерина в плазматических мембранах обеспечивает поддержание упорядоченной структуры мембран и нормальную их функцию в присутствии этанола [14]. Соответствующие изменения содержания холестерина или молярного отношения холестерин/фосфолипиды в биологических мембранах больных хроническим алкоголизмом привлекаются для объяснения механизмов толерантности и зависимости от алкоголя [14].

Полагают, что решающее значение для воспроизведения антиатерогенного эффекта имеет доза алкоголя [20]. Результаты выполненной работы свидетельствуют, что при введении различного количества этанола изменения концентрации и удельной радиоактивности различных фондов холестерина крови, действительно, могут существенно различаться. Между тем уменьшение концентрации холестерина ЛПВП при однократном введении этанола, возрастание уровня холестерина апо-В-содержащих липопротеинов и повышение связывания меченого стерина с эритроцитами при длительном введении, увеличение холестеринового индекса атерогенности при однократном и длительном введении наблюдались низкими и высокими дозами этанола. Полученные данные не подтверждают точку зрения об антиатерогенном действии низких доз этанола.

Принимая во внимание, что результаты оценки клинического состояния больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями, данные литературы о благоприятном или отрицательном эффекте самых разных доз этанола на различные звенья патогенеза атеросклероза, структуру и функцию липопротеинов плазмы крови, непосредственно на содержание холестерина и частиц ЛПВП, далеко не однозначны, а многие важные механизмы метаболизма липопротеинов и транспорта холестерина

этим частицами плазмы крови под влиянием этанола вообще не исследовались, надо полагать, что заключение об антиатерогенных свойствах алкоголя, основанное на данных о повышении содержания холестерина ЛПВП, выглядит преждевременным.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бельченко Д. И., Ханина Н. Я. // Пат. физиол.— 1988.— № 5.— С. 20—23.
2. Божко Г. Х., Волошин П. В., Чурсина В. С. // Вопр. мед. химии.— 1988.— № 5.— С. 39—43.
3. Божко Г. Х., Волошин П. В. // Кардиология.— 1989.— № 8.— С. 114—118.
4. Божко Г. Х. // Там же.— 1990.— № 5.— С. 95—99.
5. Волошин П. В., Божко Г. Х. // Журн. невропатол. и психиатр.— 1989.— № 9.— С. 122—126.
6. Климов А. Н. // Превентивная кардиология.— М., 1987.— С. 239—315.
7. Лопухин Ю. М., Арчаков А. И., Халилов Э. М. // Кардиология.— 1980.— № 8.— С. 111—117.
8. Парфенова Н. С., Петрова-Маслакова Л. Г., Кузнецов Г. П. // Вопр. мед. химии.— 1988.— № 2.— С. 42—46.
9. Пауков В. С., Лебедев С. П. // Агр. науки и техники. Патологическая анатомия.— М., 1988.— Т. 5.— С. 100—138.
10. Пятницкая И. П. Алкоголизм.— М., 1988.— С. 39—42.
11. Успенский А. Е. // Клин. мед.— 1986.— № 6.— С. 128—135.
12. Фишер А. А. Статистические методы для исследований: Пер. с англ.— М., 1958.
13. Ashley M. J. // Res. Advanc. Alcohol. Drug. Probl.— 1984.— Vol. 8.— P. 99—147.
14. Benedetti A., Birarelli A. M., Brunelli E. // Pharmacol. Res. Commun.— 1987.— Vol. 19, N 10.— P. 651—662.
15. Burton J. // Int. J. Epidem.— 1988.— Vol. 17, N 4.— P. 927.
16. Criqui M. N., Cowan I. D., Tyroler H. A. // Amer. J. Epidem.— 1987.— Vol. 126, N 4.— P. 629—637.
17. Donahat R. P., Abboff R. D., Reed D. M. // J.A.M.A.— 1986.— Vol. 255, N 17.— P. 2311—2314.
18. Goto Y. // Asian med. J.— 1988.— Vol. 31, N 10.— P. 557—563.
19. Kaufman D. W., Rosenberg L., Helmrich S. P. // Amer. J. Epidem.— 1985.— Vol. 121, N 4.— P. 548—554.
20. Kennel W. B. // Proc. Nutr. Soc.— 1988.— Vol. 47, N 2.— P. 99—110.
21. Trell E., Henningsen N., Petersson B. // Acta med. scand.— 1985.— Suppl. 730.— P. 281—290.
22. Valimaki M., Taskinen M. R., Ylikahri R. // Europ. J. clin. Invest.— 1988.— Vol. 18, N 5.— P. 472—480.

Поступила 22.11.89

#### ALCOHOL AND ATHEROGENESIS: EFFECT OF LOW AND HIGH DOSES OF ETHANOL ON CONTENT OF CHOLESTEROL IN RAT BLOOD

G. Kh. Bozhko, V. S. Chursina, P. V. Voloshin

Institute of Neurology and Psychiatry, Kharkov

Alterations in content of cholesterol and specific radioactivity of erythrocyte lipoproteins were studied in rats after administration of labelled sterol under conditions of acute and chronic influence of low 0.6 g/kg and high 4.0 g/kg doses of ethanol. Both these doses caused a decrease in content of high density lipoproteins (HDL) after single ethanol administration, while content of apoB containing lipoproteins as well as binding of labelled sterol with erythrocytes were elevated after long-term ethanol treatment. Atherogenicity index was increased after single and chronic administration of either low or high doses of ethanol. In chronic administration of low doses of ethanol specific radioactivity of HDL was decreased, thus suggesting that cholesterol acceptory function of these particles was lowered.

© Е. В. АКИМОВА, 1992

УДК 616.127-005.4-056-053.2-07: [616.154:577.175.859

Е. В. Акимова

#### ПРОСТАЦИКЛИН-ТРОМБОКСАНОВАЯ СИСТЕМА У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ С ВЫСОКИМ РИСКОМ РАЗВИТИЯ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА

Харьковский НИИ охраны здоровья детей и подростков

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) ввиду широкого распространения и высокого удельного веса в структуре смертности и инвалидности лиц трудоспособного возраста является в настоящее время одной из наиболее актуальных проблем кардиологии. Несомненный вклад наследственных факторов в патогенетические механизмы и гетерогенность последних [7, 10, 17], начало атерогенетических процессов в детском возрасте [3, 7, 8, 14], существенная роль простациклин-тромбоксановой системы в генезе атеросклеротического поражения сосудов [4, 5, 12, 11, 25] явились основанием для изучения состояния простациклин-тромбоксановой системы у детей и подростков с отягощенной ИБС наследственностью, представляющих собой группу высокого риска развития ИБС.

**Методика.** Обследованы 284 человека. Основную группу составили 70 детей и подростков 7—18 лет, отцы которых перенесли инфаркт миокарда в возрасте до 45 лет, в том числе 48 мальчиков и 22 девочки, а также 38 их отцов и 48 матерей. Контрольную группу составили 53 их здоровых сверстника со здоровой в отношении ишемической патологии и сахарного диабета наследственностью по первой и второй линии родства, из них 31 мальчик и 22 девочки, а также 32 их отца и 43 матери. Среди детей и подростков основной группы 3 страдали ожирением II степени, 2 — хроническим гастритом, 2 — вегетососудистой дистонией, 1 — ревматическим миокардитом, у 1 мальчика были приступы пароксизмальной тахикардии, у 1 девушки — миокардитический кардиосклероз, у 2 детей — задержка роста, в том числе у 1 девочки дисгенезия гонад.

Уровень простациклина (ПЦ) и тромбоксана (ТХ) в плазме крови определяли радиоиммунным методом по их стабильным метаболитам — простагландину 6-кето  $F_{1\alpha}$  и ТХВ<sub>2</sub> с помощью радиоиммунных наборов производства Института изотопов (Будапешт, Венгрия) согласно известной методике [15]. Все члены семьи обследовались одновременно в утренние часы, девушки — в первую фазу менструального цикла. Родословные составляли на основе бесед и семейного анамнеза. Инфаркт миокарда верифицировали электрокардиограммами острого и холодного периодов с кодированием по Миннесотскому коду, а в ряде случаев — патологоанатомически. Накопление больных в родословной считали наличие более чем одного больного в одном или нескольких поколениях данной семьи. Статистическую обработку проводили с использованием параметрических и непараметрических критериев [2, 4]. Нормальность распределения в контрольной группе проверяли расчетным методом [9].

**Результаты и обсуждение.** Проведенный анализ показал отсутствие возрастных различий уровней ПЦ и ТХ у детей и подростков в обеих группах как по параметрическим, так и по непараметрическим критериям. Указанное обстоятельство позволило в дальнейшем рассматривать уровни указанных веществ без учета возрастного периода, что в отношении здоровых детей также согласуется с данными [16]. Соотношение ПЦ/ТХ у мальчиков контрольной группы составило  $2,24 \pm 0,37$ , у девочек —  $2,51 \pm 0,80$  и достоверно не различалось ( $p > 0,2$ ). В целом без учета особенностей родословной отношение

Уровни (в нг/мл) простаноидов у детей и подростков из семей с отягощенной ИБС и здоровой наследственностью и их родителей

Обследованные	ПЦ			ТХ		
	основная группа	контрольная группа	<i>p</i>	основная группа	контрольная группа	<i>p</i>
Мальчики	179,85±21,58 (48)	105,91±16,33 (31)	<0,01	192,14±33,32 (48)	81,43±9,12 (31)	<0,002
Девочки	113,68±16,04 (22)	113,72±23,39 (22)	>0,2	219,24±32,51 (22)	62,93±14,06 (22)	<0,001
Отцы	141,80±20,65 (38)	132,93±28,29 (32)	>0,2	202,75±33,93 (38)	87,54±23,44 (32)	<0,01
Матери	213,78±51,26 (48)	95,57±11,32 (43)	<0,05	167,52±30,74 (48)	85,14±14,51 (43)	<0,02

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

ПЦ/ТХ у мальчиков основной группы составило  $2,24 \pm 0,35$ , у девочек —  $0,90 \pm 0,18$  ( $p < 0,001$ ). Таким образом, соотношение ПЦ/ТХ у мальчиков в основной и контрольной группах не различалось, тогда как у девочек основной группы равновесие было резко смещено вправо, в сторону ТХ ( $p = 0,05$ ).

Характер распределения уровней простаноидов в контрольной группе соответствовал нормальному, что позволило в качестве отрезных точек выбрать значения ПЦ и ТХ, соответствующие уровню  $M \pm 1,5\sigma$  их в контрольной группе. Для ПЦ и ТХ указанные цифры составили соответственно 231,72 и 190,31 нг/мл. Достоверность различий уровней ПЦ и ТХ в основной и контрольной группах, представленных в табл. 1, подтверждена также с использованием критерия  $\chi_2$ . Обращает внимание существенное различие в уровнях ПЦ между девочками и мальчиками основной группы при отсутствии различий в уровнях ТХ (табл. 2). Так, установлено, что  $33,33 \pm 6,86\%$  мальчиков основной группы имели высокие уровни ПЦ; в то же время высокие уровни ТХ имели  $32,64 \pm 7,15\%$  мальчиков и  $60,62 \pm 10,0\%$  девочек основной группы (во всех случаях  $p < 0,01$ ) при отсутствии различий в уровнях ПЦ у девочек основной и контрольной группы. Определенный интерес представляет также характеристика уровней простаноидов у остальных членов семьи в основной группе (см. табл. 1). Так, наряду с высоким уровнем ТХ у перенесших инфаркт миокарда отцов у матерей в основной группе, не страдающих в подавляющем большинстве ИБС, отмечено сочетанное повышение ПЦ и ТХ.

Касаясь связи уровней простаноидов с особенностями родословной, следует отметить, что девочки с отягощенным анамнезом представляли неза-

висимо от его особенностей достаточно однородную группу, характеризующуюся при практически одинаковых с контролем уровнях ПЦ недостаточностью синтеза ТХ и смещением за счет этого баланса простаноидов вправо (см. табл. 2). В то же время мальчики с отягощенным анамнезом в зависимости от особенностей родословной были группой неоднородной: при возникновении у родителя заболевания впервые в родословной отмечалось сочетанное повышение уровней ПЦ и ТХ и смещение баланса между ними вправо, тогда как при накоплении больных в родословной преобладал напряженный синтез ПЦ без смещения баланса вправо. В отношении уровней ТХ следует отметить выраженную связь половых различий с характеристиками родословной: недостаточность синтеза ТХ отмечали у детей обоего пола при одном больном в родословной, тогда как при накоплении больных в поколениях его уровень повышался только у девочек.

Отмечено участие системы простаноидов в генезе атеросклероза [4, 5, 11, 12, 25], ИБС и инфаркта миокарда [1, 5, 6, 11, 13, 22, 26]. При этом характерны гиперпродукция ТХ и смещение баланса простаноидов вправо. Установлено также, что ранние стадии атеросклероза в эксперименте характеризуются транзитной фазой напряженного синтеза ПЦ с дальнейшим понижением его уровня [19, 20]. Половые различия влияют на характер взаимодействия между липопротеинами и синтезом ПЦ, что имеет значение для частоты ИБС у лиц разного пола [21]. Воздействие стресса, моделируемое у человека инфузией катехоламинов, физической нагрузкой, холодовой реакцией, вызывает повышение уровня ТХ [18, 23] и ПЦ [24]. В доступной литературе не найдено сведений о системе простаноидов в условиях хронического

Таблица 2

Уровни простаноидов (в нг/мл) и их соотношение в зависимости от особенностей родословной у детей и подростков с отягощенной ИБС наследственностью

Пол ребенка	Наличие в родословной одного больного			Накопление больных в родословной			<i>p</i> *
	ПЦ	ТХ	ПЦ/ТХ	ПЦ	ТХ	ПЦ/ТХ	
Девочки	104,32±20,14 (13)	247,74±46,70** (13)	0,73±0,19** (13)	123,91±20,62 (9)	204,40±20,51 (9)	0,87±0,22 (9)	1) >0,2 2) >0,2 3) >0,2
Мальчики	211,06±41,92** (28)	187,41±26,53** (28)	1,40±0,22** (28)	182,13±37,44** (20)	100,22±18,71 (20)	3,06±0,70 (20)	1) >0,2 2) <0,01 3) <0,01
<i>p</i>	<0,01	>0,2	<0,001	>0,2	<0,001	<0,001	

Примечание. Одна звездочка — достоверность различий содержания: 1 — ПЦ, 2 — ТХ, 3 — ПЦ/ТХ; две звездочки — достоверность различий по сравнению с адекватным контролем по параметрическим и непараметрическим критериям.

эмоционального стресса у человека; наши данные о повышении уровня ПЦ и ТХ у супруг больных мужей, мы полагаем, являются свидетельством эффекта длительных отрицательных эмоций. Учитывая роль стресса в генезе ИБС, одновременное повышение синтеза ПЦ у них является, возможно, компенсаторным механизмом. Рассматривая детей и подростков с отягощенной наследственностью как лиц высокого риска в отношении развития ИБС в молодом возрасте [3, 8, 14], повышение продукции ТХ у них, очевидно, следует расценивать как проявление активно протекающего атерогенетического процесса. Параллельное повышение синтеза ПЦ у мальчиков в этом случае следует, видимо, рассматривать как клиническое воспроизведение экспериментальной модели атеросклероза в ранних фазах развития. Выраженные половые различия в уровнях ПЦ и ТХ у детей и подростков с отягощенной ИБС наследственностью также, возможно, отражают различный характер взаимодействия половых гормонов и системы синтеза простаноидов на ранних этапах атерогенеза. Вместе с тем интерпретация изолированного повышения уровней ТХ при смещении одновременно баланса ПЦ/ТХ вправо у девочек как лиц менее поражаемого пола представляет известные трудности. Возможно, полученные данные характеризуют атерогенную направленность у них сдвигов в системе простаноидов, компенсируемую другими биохимическими механизмами.

Отсутствие в литературе сведений о взаимосвязи семейного анамнеза с характеристиками системы простаноидов затрудняет интерпретацию полученных результатов. Вместе с тем можно отметить, что девочки в этом отношении представляли собой достаточно однородную группу, характеризующуюся гиперпродукцией ТХ при резком смещении баланса ПЦ/ТХ вправо. Мальчики основной группы представляли выраженную неоднородность: гиперпродукция ПЦ у них отмечалась независимо от характеристик семейного анамнеза, накопление же больных в родословной ассоциировалось с невысокими уровнями ТХ и благоприятным соотношением ПЦ/ТХ, а при наличии в родословной одного больного уровня ПЦ и ТХ повышались сочетанно с одновременным смещением баланса вправо. Учитывая, что значимый для атерогенеза мутационный процесс может касаться как групп генов, определяющих липидный обмен, так и групп генов, контролируемых, в частности, ферменты биосинтеза простагландинов [17], необходимо, по-видимому, приведенные выше данные расценивать как отражение генетической гетерогенности ИБС.

Таким образом, отягощенная ИБС наследственность является фактором, существенно влияющим на состояние простаглицлин-тромбоксановой системы у детей и подростков. Дети и подростки с отягощенной ИБС наследственностью представляют собой с точки зрения состояния простаглицлин-тромбоксановой системы гетерогенную группу, характеризующуюся выраженными изменениями (гиперпродукция ТХ, сдвиг баланса простаноидов в сторону последнего) и значительным варьированием уровней простаноидов в зависимости от пола и особенностей родословной.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Аляви А. Л. Простаглицлин-тромбоксановая система, эритроцитарный гемостаз при остром инфаркте миокарда (патогенетические и терапевтические аспекты): Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Харьков, 1989.
2. Бейли П. Статистические методы в биологии: Пер. с англ. — М., 1962.
3. Белокопъ П. А. // Вопр. охр. мат. — 1984. — № 2. — С. 3—8.
4. Гублер Б. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. — Л., 1973.
5. Ефимов В. В., Ладный А. И. // Тер. арх. — 1985. — № 6. — С. 142—146.
6. Ефимов В. В., Ладный А. И. // Врач. дело. — 1986. — № 4. — С. 37—40.
7. Ильинский Б. В., Клюев С. К. Ишемическая болезнь сердца и наследственность. — Л., 1985.
8. Клиорин А. И. Атеросклероз у детей. — Л., 1981.
9. Котельников Р. Б. Анализ результатов наблюдений. — М., 1986.
10. Кошечкин В. А., Перова П. А., Чепурненко П. В. и др. // Вест. АМН СССР. — 1986. — № 9. — С. 25—33.
11. Ладный А. И. Простаглицлин-тромбоксановая система и гемостаз при атеросклерозе в клинике и эксперименте: терапевтические и патогенетические аспекты: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Харьков, 1986.
12. Ли Хава Рен, Васильев А. В., Орехов А. П. и др. // Вопр. мед. химии. — 1989. — № 2. — С. 112—115.
13. Марков Х. М. // Кардиология. — 1989. — № 9. — С. 5—9.
14. Метельская В. А., Андреевко Г. В., Белокопъ П. А. и др. // Клин. мед. — 1988. — № 6. — С. 36—40.
15. Смирненко Л. Л., Целуйко В. И. Радиоиммунологический метод определения 6-кето-простаглицлина  $F_{1\alpha}$  и тромбоксана  $B_2$ : Метод. рекомендации. — Харьков, 1984.
16. Смирнов И. Е. Динамика простаноидов при нарушениях сердечной деятельности: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1987.
17. Сургучев А. П. // Вопр. мед. химии. — 1989. — № 2. — С. 16—23.
18. Ablad B. // Therapiewoche. — 1988. — Bd 38, Sonderheft. — S. 22—26.
19. Beelens J. R., Coene M.-C., Verheyen A. et al. // Prostaglandins. — 1986. — Vol. 32, N 3. — P. 319—334.
20. Beelens J. R., Coene M.-C., Verheyen R. et al. // Ibid. — P. 335—352.
21. Beitz J., Forster W. // Prostagland. a. Med. — 1986. — Vol. 6. — P. 515.
22. Jouve R., Puddu P. E. // Cardiologia. — 1988. — Vol. 33, N 4. — P. 31—33.
23. Laustiola K., Kanninen S., Seppala E. et al. // Europ. J. clin. Invest. — 1986. — Vol. 16, N 6. — P. 473—479.
24. Neri Serneri G. G., Gensini G. F., Abbate R. et al. // Amer. Heart J. — 1985. — Vol. 110. — P. 5—8.
25. Rush D. S., Korstein M. D., Bellan J. R. et al. // Arteriosclerosis. — 1988. — Vol. 8, N 1. — P. 73—78.
26. Takatsu Y., Yui Y., Hattori R. et al. // Jap. Circulat. J. — 1988. — Vol. 52, N 4. — P. 314—320.

Поступила 15.10.90

## THE PROSTACYCLINE-THROMBOXANE SYSTEM IN CHILDREN AND JUVENILES WITH HIGH RISK OF ISCHEMIC HEART DISEASE

E. V. Akimova

Institute of Children and Juvenile Health Protection, Kharkov

Studies of the prostacycline-thromboxane system in children and juveniles of 7-18 years old with hereditary ischemic heart disease demonstrated that the hereditary factor proved to be of importance for the system state. Alterations of prostanooids in these children and juveniles were related to atherogenesis development, particularly to hyperproduction of thromboxane  $A_2$ , whereas patterns of the system studied varied depending on sex and family history.

*Н. В. Смирнова, И. С. Новодержкина, А. Г. Баснакьян, В. Л. Кожура*

## ОБНАРУЖЕНИЕ УСТОЙЧИВОГО ПОВЫШЕНИЯ ЭНДОНУКЛЕАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В КЛЕТОЧНЫХ ЯДРАХ ПЕЧЕНИ СОБАК ПРИ ДЛИТЕЛЬНОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПОТЕНЗИИ И В ПОСТРЕАНИМАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ

Институт общей реаниматологии АМН СССР, Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Возможность восстановления структуры и функции клеток ишемизированных органов зависит от скорости протекания процессов деструкции. При этом деструкция компонентов клеточного ядра, и в первую очередь ДНК, является определяющим фактором сохранения жизнеспособности клетки.

Среди ДНК-эндонуклеаз, расщепляющих ядерную ДНК, известны  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -зависимая эндонуклеаза, обладающая максимальной активностью в присутствии сочетания ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  (кальций-магниевый синергизм) [1, 7],  $\text{Mg}^{2+}$ -зависимая нуклеаза [1, 3] и  $\text{Mn}^{2+}$ -зависимая эндонуклеаза [1, 11], не обладающие  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -синергизмом, кислая эндонуклеаза, активируемая при кислых значениях pH и не требующая дивалентных катионов [1].

Роль этих ферментов в патогенезе деструктивных и репаративных процессов, протекающих в печени при терминальных состояниях и на этапах постреанимационного периода, до настоящего времени не изучалась. В литературе отсутствуют данные об изменении активности ДНК-эндонуклеаз во внутренних органах, в частности в печени, при геморрагическом шоке и в постреанимационном периоде.

Задачей настоящего исследования было изучение активности  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -зависимой эндонуклеазы в ткани печени при умирании собак на фоне 2- и 4-часовой артериальной гипотензии и в отдаленные (1—3 мес) сроки после реанимации.

**Методика.** Эксперименты были выполнены на 22 взрослых беспородных собаках обоего пола массой 9—17 кг. После премедикации промедолом (8 мг/кг) в условиях поверхностного нембуталового наркоза в сочетании с местной анестезией у гепаринизированных (500 МЕ/кг) собак проводили быстро, в течение 5—8 мин, кровопускание из бедренной артерии, снижая артериальное давление (АД) в среднем до 40 мм рт. ст., и поддерживали его на этом уровне в течение 4 ч. Общая кровопотеря к 4 ч артериальной гипотензии у этих животных составила  $45 \pm 2$  мл/кг. Реанимацию животных проводили внутриартериальной реинфузией выпущенной крови и дополнительной трансфузией плазмозамещающих растворов. За выжившими животными в условиях вивария проводили наблюдение в течение 1—3 мес. Через 2 ч (6 собак) и 4 ч артериальной гипотензии (12 собак), 1—3 мес постреанимационного периода (4 собаки) животных забивали электротоком от сети напряжения 127 В под нембуталовым наркозом. Контролем служили наркотизированные животные (10 собак), не перенесшие артериальной гипотензии. Ткань печени вырезали из центральной доли печени как в контроле, так и в эксперименте и помещали в лед.

**Выделение клеточных ядер печени** осуществляли детергентным методом. Извлеченную ткань печени помещали в охлажденный буфер А, содержащий 50 мМ трис-НСl pH 8,0, 0,25 М сахарозу, 10 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 5 мМ 2-меркаптоэтанол. Все процедуры проводили при 4 °С. Ткань измельчали в гомогенизаторе (тефлон — стекло) в буфере А. Гомогенат фильтро-

вали через 4 слоя марли и центрифугировали при 1500 g 10 мин. Осадок ядер промывали в буфере Б, содержащем 0,5 % тритон X-100 в буфере А. Промывку повторяли дважды. Для измерения ДНК клеточные ядра суспендировали в воде, затем добавляли ЭДТА (до 20 мМ) и додецилсульфат натрия (ДСН) (до 1 %) измеряли оптическую плотность при 260 нм. Считали, что 1 оптическая единица соответствует содержанию ДНК 40 мкг/мл.

**Определение эндонуклеазной активности.** ДНК ядерного экстракта осаждали добавлением 0,5 объема 18 % раствора полиэтиленгликоля-6000 в лизирующем буфере, содержащем 50 мМ трис-НСl pH 7,9, 2 М NaCl, 50 мМ ЭДТА, 5 мМ 2-меркаптоэтанол. Осадок отделяли центрифугированием при 10 000 g в течение 15 мин. Экстракт диализовали 12 ч против 10 мМ трис-НСl pH 8,0, 0,1 М ЭДТА, 0,5 М дитиотрейтол, 50 % глицерина и хранили при -20 °С. Для определения эндонуклеазной активности в качестве субстрата использовали ДНК плазмиды РИС 19, полученную нами по методике, описанной в руководстве [4].  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -зависимую эндонуклеазу определяли в инкубационной пробе объемом 20 мкл, содержащей 2 мкг ДНК, 10 мМ трис-НСl pH 7,4 при 37 °С, 25 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина (фракция V), 0,5 мМ дитиотрейтол, 1 мМ ЭДТА, ядерный экстракт в разведениях, 2 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ .

Активность кислой эндонуклеазы определяли в инкубационной пробе объемом 20 мкл, содержащей 2 мкг ДНК, 10 мМ натрий-ацетатный буфер pH 5,0, 25 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина (фракция V), 0,5 мМ дитиотрейтол, 1 мМ ЭДТА, ядерный экстракт в разведениях.

Пробы инкубировали 30 мин при 37 °С. Реакцию останавливали охлаждением проб, добавляли 5 мкл смеси 1 % ДСН, 0,2 М ЭДТА pH 8,0, 0,25 % бромфенолового синего и 50 % глицерина. Электрофорез проводили в 0,8 % агарозе («Хемапол», Чехословакия), электродный буфер: 0,04 М трис-ацетат pH 8,3, 0,02 М ацетат натрия, 0,002 М ЭДТА; напряжение 10 В/см, 1 ч. Гель обрабатывали 0,5 мкг/мл раствора бромистого этидия. Фотографирование гелей осуществляли в отраженном ультрафиолете через красный светофильтр. Негативы сканировали на денситометре «Хромоскан-200». За единицу эндонуклеазной активности принимали количество фермента, необходимое для расщепления 1 мкг ДНК (50 % ДНК пробы) за 30 мин при 37 °С. Количество белка в препаратах определяли по [10].

**Ауторасщепление ДНК хроматина нуклеазами** [5, 6]. Инкубацию ядер проводили в буфере А с добавлением 5 мМ  $\text{MgCl}_2$  и 2 мМ  $\text{CaCl}_2$  pH 8,0 при 37 °С и периодическом встряхивании. Контроль за глубиной расщепления ДНК в инкубируемых ядрах осуществляли по оптической плотности кислоторастворимой фракции при 260 нм после добавления к порциям ядерной суспензии на холоду равного объема 1 н.  $\text{HClO}_4$  и отделяя кислоторастворимый материал центрифугированием при 12 000 g при 4 °С в течение 10 мин. Результаты выражали в единицах оптической плотности.

**Результаты и обсуждение.** На рис. 1 представлена типичная кривая накопления кислоторастворимых продуктов расщепления ДНК хроматина клеточных ядер печени, инкубированных в буфере А с добавлением 5 мМ  $\text{MgCl}_2$  и 2 мМ  $\text{CaCl}_2$  pH 8,0. Как видно из приведенных данных, характер кривой в опытах с 2-часовой артериальной гипотензией в основном повторяет контроль, отличаясь от последнего лишь увеличенной скоростью процесса в течение первых 3—4 ч. В опыте с 4-часовой артериальной гипотензией количество кислоторастворимой фракции ДНК, высвобождающейся из ядер печени, возрастает пропорционально времени инкубации на протяжении 6 ч. Таким образом, характер кривой накопления кислоторастворимых продуктов расщепления ДНК хроматина при 2-часовой артериальной гипотензии принципиально отличается от таковой для 4-часовой артериальной гипотензии, причем скорость нарастания кислоторастворимой фракции ДНК находится в прямой зависимости от длительности артериальной гипотензии.

Нами сделана попытка дать количественную оценку изменению активности  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -зависимой эндонуклеазы ядер при геморрагическом

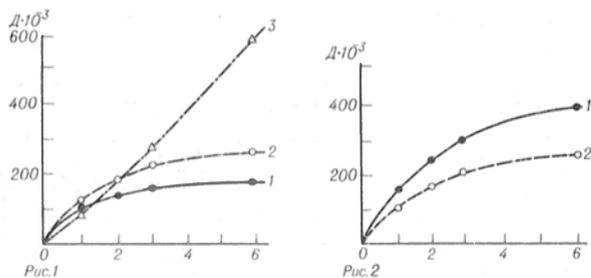


Рис. 1. Кинетика расщепления ДНК изолированных ядер печени эндогенными нуклеазами.

Здесь и на рис. 2: по оси абсцисс — время инкубации (в ч); по оси ординат — кислоторастворимая ДНК (в ед. опт. пл.). 1 — контроль; 2 — снижение АД до 40 мм рт. ст. в течение 2 ч, 3 — в течение 4 ч.

Рис. 2. Кинетика расщепления ДНК изолированных ядер печени в отдаленные (1—3 мес) сроки после реанимации. 1 — контроль; 2 — 1—3 мес после реанимации.

шоке. Активность  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -зависимой эндонуклеазы к 4 ч артериальной гипотензии достоверно увеличилась на 57 % и составила  $4536 \pm 804$  ед. на 1 мг белка ( $p < 0,001$ ) по сравнению с  $2881 \pm 448$  ед. на 1 мг белка в контроле. Такую же динамику изменения активности имеет кислая эндонуклеаза в ядрах печени при умирании. К 4 ч артериальной гипотензии активность фермента превысила контрольные величины на 44 % и составила  $4746 \pm 555$  ед./мг белка ( $p < 0,01$ ). Следовательно, кислая и щелочная эндонуклеазные активности в ядрах печени имеют одинаковую тенденцию к повышению при терминальном состоянии и, возможно, принадлежат одному ферменту. В течение 1—3 мес постреанимационного периода активность  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -зависимой эндонуклеазы не имела тенденции к нормализации и составила  $4327 \pm 852$  ед./мг белка ( $p < 0,01$ ) (рис. 2).

Таким образом, в процессе длительного умирания на фоне 4-часовой артериальной гипотензии происходит активация кислой и  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -ДНК-эндонуклеаз. Динамика роста кислоторастворимой фракции ДНК в клеточных ядрах печени принципиально различается в процессе умирания и в постреанимационном периоде и, как показано нами, не отражает абсолютного изменения активности эндонуклеаз. Известно, что ядерные ДНКазы нормальной клетки являются в основном репарационными ферментами [8, 9]. Их действие ограничено участками с нарушением первичной и вторичной структуры ДНК (участки локальной денатурации, апуриновая ДНК и др.). Гибель клетки сопровождается резким увеличением эндогенной эндонуклеазной  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -зависимой активности, что позволяет считать этот фермент фактором клеточной гибели [7]. Причина такого увеличения активности ДНКаз неясна, но косвенные данные указывают на возможность образования этих ферментов из неактивных белковых предшественников путем ограниченного протеолиза [1]. С другой стороны, сама  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -зависимая эндонуклеаза под действием эндогенных протеаз расщепляется до низкомолекулярных изоформ, среди которых выявлены ферменты с низким  $Ca$ ,  $Mg$ -синергизмом и активизируемые другими ионами [1]. Например, в гепатомах крыс с некротическим компонентом наблюдалось снижение активности  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -зависимой эндо-

нуклеазы при одновременном увеличении  $Mn^{2+}$ -зависимой эндонуклеазной активности [2].

Снижение активности (судя по кислоторастворимой фракции) в отдаленном восстановительном периоде при сохранении увеличенной активности (по данным электрофореза) объясняется, по-видимому, изменением изоферментного спектра эндонуклеаз ядер в сторону снижения активности мелкорасщепляющих эндонуклеаз. Для жизнеспособности клетки критическим фактором являются первые двуцепочные разрывы, поэтому увеличение активности, по данным электрофореза, может рассматриваться как более значимый маркер деструктивных изменений клетки, нежели накопление разрывов, приводящих к увеличению кислоторастворимой фракции, или появление низкомолекулярной ДНК.

Определение, какие из изоформ появляются в отдаленный восстановительный период, и подбор условий коррекции активности ДНКаз будут являться предметом дальнейших наших исследований.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Баснакьян А. Г., Бубнов Н. В., Вотрин И. И. // Биохимия. — 1989. — Т. 54. — С. 273—282.
2. Баснакьян А. Г., Бубнов Н. В., Кирсанова И. Д., Вотрин И. И. // Экспер. онкол. — 1989. — Т. 11. № 2. — С. 15—19.
3. Бубнов Н. В., Баснакьян А. Г., Вотрин И. И. // Биохимия. — 1986. — Т. 51. — С. 1194—1202.
4. Маниагис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование. — М., 1984.
5. Ходарев Н. Н., Вотрин И. И., Баснакьян А. Г., Дебов С. С. // Биохимия. — 1979. — Т. 44. — С. 622—627.
6. Ходарев Н. Н., Вотрин И. И., Дебов С. С. // Вопр. мед. химии. — 1981. — № 4. — С. 538—543.
7. McConkey D. J., Hartzell P. et al. // Faseb J. — 1989. — Vol. 3. — P. 1843—1848.
8. Ivanov V. A., Tretyak T. M., Afonin Y. N. // Europ. J. Biochem. — 1988. — Vol. 172. — P. 155—159.
9. Sansar A., Sansar G. B. // Ann. Rev. Biochem. — 1977. — Vol. 79. — P. 544—552.
10. Sedmark T. T., Grossberg S. E. // Analyt. Biochem. — 1977. — Vol. 79. — P. 544—552.
11. Tanigawa Y., Shimayama M. // J. Biol. Chem. — 1983. — Vol. 258. — P. 9184—9188.

Поступила 16.11.90

#### STABLE INCREASE OF THE ENDONUCLEASE ACTIVITY IN LIVER CELL NUCLEI AFTER LONG-TERM ARTERIAL HYPOTENSION AND DURING THE POSTRESUSCITATION PERIOD

N. V. Smirnova, I. S. Novoderzhkina, A. G. Basnakjan, V. L. Kozhura

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

Presence of  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -dependent endonuclease activity was found in dog liver cell nuclei. Specific characteristics of chromatin autolysis were also studied in liver cell nuclei after 2-4 hrs long arterial hypotension as compared with that within the later restoration period 1-3 months. The rate of DNA acid-soluble fraction accumulation correlated directly with the arterial hypotension duration. Quantitative evaluation of the liver tissue  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -dependent endonuclease activity was undertaken under conditions of hemorrhagic shock. The enzymatic activity was not normalized both after death and in the postresuscitation period. Analysis of the chromatin autolysis and of alterations in the enzymatic activity during postresuscitation period enabled to suggest that the isozyme spectrum of  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -dependent endonuclease was altered.

С. С. Абидова, Л. В. Жукова

## ЦИКЛИЧЕСКИЙ АДЕНОЗИНМОНОФОСФАТ И ЛИПИДЫ МИОКАРДА ПРИ ФТОРОТАНОВОЙ АНЕСТЕЗИИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОДЕРЖАНИЯ КИСЛОРОДА В ИНГАЛЯЦИОННОЙ СМЕСИ

Ташкентский филиал Всесоюзного научного центра хирургии АМН СССР

В настоящее время признана важная роль циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) в усилении функциональной и метаболической активности миокарда. цАМФ участвует в гормональной регуляции липолиза сердечной мышцы [1]. Нарушение гормональной регуляции сердечной мышцы, являющееся следствием или лежащее в основе многих заболеваний сердечно-сосудистой системы, влечет за собой изменение содержания и активности ферментов, участвующих в синтезе и распаде цАМФ, в частности аденилатциклазы [5].

Гипоксия — одна из важных проблем современной патологии. В настоящее время гипоксию характеризуют как недостаток кислорода в организме независимо от того, чем он вызван и неконкретно [6]. Выраженная гипоксия часто определяет тяжесть, а, следовательно, и прогноз того или иного заболевания. Возможность эффективного воздействия на кислородную недостаточность или предупреждение ее при экстремальных состояниях важно для благоприятного исхода большинства критических состояний [4].

Возможность возникновения клинически определяемой гипоксии в ходе наркоза общепризнана [6]. Целью настоящего исследования явилось изучение содержания цАМФ, триглицеридов (ТГ), пентерифицированных жирных кислот (НЭЖК) в ткани миокарда анестезированных фторотаном крыс в условиях спонтанного дыхания при недостатке и избытке кислорода в ингаляционной смеси.

Методика. Эксперименты были проведены на крысах-самцах линии Вистар массой 160–180 г. В I серии экспериментов животных помещали в специальную камеру, в которую подавали 1,5 об.% фторотана в потоке азота и кислорода в соотношении 4:1. Во II серии экспериментальным животным при тех же условиях подавали газонаркотическую смесь, содержащую 1,5 об.% фторотана в потоке азота и кислорода (1:4). Контролем служили крысы, получившие плацебо (0,85 % раствор хлорида натрия). Эксперимент продолжался в течение 2 ч и 15 мин. Клинические признаки анестезии контролировали по методике, разработанной в Ташкентском филиале

Всесоюзного научного центра хирургии [2].

Подопытных крыс декапитировали, ткань миокарда быстро замораживали в жидком азоте. Разделение липидов ткани миокарда на фракции производили методом тонкослойной хроматографии на силикагеле ЛС/40 («Lachema», Чехо-Словакия) с использованием системы растворителей гексан — этиловый эфир — уксусная кислота (80:20:1,5). Содержание НЭЖК в ткани миокарда определяли по [9], ТГ — по [8], цАМФ в ткани миокарда — при помощи наборов «<sup>3</sup>H-Cyclic AMP» («Amersham», Англия). При измерении активности использовали жидкостно-сцинтилляционный счетчик LS-230 («Beckmann», США).

Результаты и обсуждение. При 15-минутном повышении содержания кислорода в ингаляционной смеси отмечают незначительное увеличение содержания цАМФ в сердечной мышце, активация липолиза в сердце, снижение содержания ТГ в ткани миокарда и увеличение содержания НЭЖК (см. таблицу). Аналогичная картина наблюдается и при 2-часовой гипероксии. Уровень цАМФ увеличивается примерно на 25 % в сравнении с контрольной группой ( $p < 0,001$ ), почти в 2 раза уменьшается содержание ТГ, на 80 % растет содержание НЭЖК ( $p < 0,001$ ).

Можно заключить, что активация симпатико-адреналовой системы под действием избытка кислорода в ингаляционной смеси [3, 7] приводит к стимуляции аденилатциклазы кардиомиоцитов, что влечет за собой увеличение содержания цАМФ и усиление липолиза в сердечной мышце. Если при 15-минутной гипоксии снижение содержания ТГ и увеличение уровня НЭЖК незначительны, то увеличение содержания кислорода в ингаляционной смеси в течение 2 ч приводит к более значительному усилению интенсивности липолиза.

Когда фторотан подавали при сниженном содержании кислорода в ингаляционной смеси, то при гипоксии отмечали снижение содержания цАМФ в сердечной мышце; это снижение более выражено и статистически достоверно при 2-часовой гипоксии. Это приводит к снижению интенсивности липолиза с увеличением содержания ТГ сердца и нарушению окисления жирных кислот, уровень которых резко нарастает: при 15-минутной гипоксии на 130 %, при 2-часовой на 190 %.

При экстремальных ситуациях в сердце легко окисляются кетоновые тела, лактат, пируват [10].

### ЛИТЕРАТУРА

1. Воробьева Л. М. // Обмен и регуляторные эффекты моноаминов. — Красноярск, 1977. — С. 20–21.
2. Гиммельфарб Г. Н. Анестезия у экспериментальных животных. — Ташкент, 1984.
3. Дядюрко А. М., Пантелеев С. М. // Анест. и реаниматол. — 1987. — № 3. — С. 11–13.
4. Ефунин С. Н. Руководство по гипербарической оксигенации. — М., 1986.

Изменение содержания цАМФ и липидных фракций в миокарде под действием анестезии фторотаном в зависимости от содержания кислорода во вдыхаемой смеси

Показатель, на 1 г ткани	Контроль (I)	Гипоксия 15 мин (II)	Гипероксия 15 мин (III)	Гипоксия 2 ч (IV)	Гипероксия 2 ч (V)
цАМФ, пмоль	1000,0 ± 25,0	967,5 ± 25,0	1050,0 ± 55,0	902,5 ± 32,5	1290,0 ± 50,0
ТГ, мкмоль	2,4 ± 0,03	4,7 ± 0,2	2,25 ± 0,06	5,7 ± 1,3	1,3 ± 0,06
НЭЖК, мкмоль	10,1 ± 0,4	23,0 ± 0,4	11,5 ± 1,8	29,0 ± 4,0	18,0 ± 0,8
		$p_{I-II} < 0,001$	$p_{I-III} < 0,05$ $p_{II-III} < 0,001$	$p_{I-IV} < 0,05$	$p_{I-V} < 0,001$ $p_{IV-V} < 0,01$ $p_{I-IV} < 0,001$ $p_{IV-V} < 0,02$

5. Мирошниченко В. П., Зубовская А. М., Григорович Ю. А. и др. // Вопр. мед. химии. — 1981. — № 1. — С. 112—115.
6. Рябов Г. А. Гипоксия критических состояний. — М., 1988.
7. Рябов Г. А., Емцов Ю. Т., Коновалов Б. А., Титова И. Т. // Анаст. и реаниматол. — 1988. — № 3. — С. 28—31.
8. Amenta J. // Lipid Res. — 1964. — Vol. 50. — P. 270.
9. Dumcombe W. // Biochem. Res. — 1963. — Vol. 88. — P. 7.
10. Evans J. R., Opie L. H., Shipp J. C. // Amer. J. Physiol. — 1963. — Vol. 205. — P. 766—770.

Поступила 02.11.90

#### ALTERATIONS IN CONTENT OF cAMP AND MYOCARDIAL LIPIDS UNDER CONDITIONS OF FLUOTHANE ANESTHESIA DEPENDING ON CONCENTRATION OF OXYGEN IN THE INHALATION MIXTURE

S. S. Abidova, L. V. Zhukova

Tashkent Branch of the All-Union Research Centre of Surgery, Academy of Medical Sciences of the USSR

Content of cyclic adenosine monophosphate (cAMP), which involved in regulation of heart metabolism, was altered in myocardium depending on oxygen concentration in the inhalation mixture. Increase of oxygen concentration during gas anesthesia stimulated lipolysis and elevated cAMP content, while these parameters were lowered after decrease of oxygen content in the mixture.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1992

УДК 615.31:547.755].03: [616-092.19:612.273.2].015.4:616.1-008.1

Р. Д. Платонова, О. С. Медведев

#### СИСТЕМНАЯ И РЕГИОНАРНАЯ ГЕМОДИНАМИКА У КРЫС ПОСЛЕ ПРИМЕНЕНИЯ МЕКСАМИНА: К ВОПРОСУ О МЕХАНИЗМАХ «ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ ТРЕНИРОВКИ» К ГИПОКСИИ

Московский университет им. М. В. Ломоносова

Поиск путей повышения устойчивости организма к гипоксии является актуальной задачей современной науки. Существует несколько способов повышения устойчивости организма к недостатку кислорода во внешней среде, основанных на том, что повторяющаяся гипоксия активирует в организме собственные механизмы срочной адаптации и приводит к постепенной перестройке клеточно-тканевого метаболизма, направленной на повышение резистентности организма к недостатку кислорода. Наиболее существенными приспособительными реакциями, способствующими повышению устойчивости к гипоксии, являются изменения функционального состояния сердечно-сосудистой системы [6].

Нами был предложен новый способ повышения резистентности к гипоксии — «фармакологическая тренировка» мексamiном [8, 9] — аналогом серотонина, рекомендованным для профилактики радиационных поражений. Эффект мексamiна основан на его гипоксическом действии в отношении ряда органов и тканей [4].

Целью данной работы явилось изучение изменений функционального состояния сердечно-сосудистой системы (системной и регионарной гемодинамики) при однократном и длительном применении мексamiна.

Методика. Работа проводилась на 13 белых крысах-самцах линии Вистар массой 260—300 г. Животным импланти-

ровали полиэтиленовые катетеры в брюшную аорту и в левый желудочек сердца. Артериальное давление (АД) и частоту сердечных сокращений (ЧСС) измеряли с помощью электроманометров. Регистрацию осуществляли на самописце. Опыты проводили на бодрствующих животных через сутки после имплантации катетеров под нембуталовым наркозом (30 мг/кг внутривенно). Мексamiн растворяли в физиологическом растворе и вводили по 25 мг/кг внутривенно в объеме 0,1 мл на 100 г массы при однократном применении. При «фармакологической тренировке» мексamiн вводили ежедневно в течение 9 дней по 25 мг/кг. Эксперименты проводили в июле—августе в дневные часы.

Для изучения действия мексamiна на регионарную гемодинамику у бодрствующих животных использовали модифицированный метод меченых микросфер [7]. Определяли сердечный выброс (СВ), общее периферическое сосудистое сопротивление (ОПС), кровяток и сосудистое сопротивление в 12 сосудистых зонах. Однократно вводили около 100 тыс. микросфер в левый желудочек. Для определения величины СВ одновременно с введением микросфер производили забор крови из бедренной артерии. Кровяток в исследуемых органах определяли по радиоактивности, регистрируемой гамма-счетчиком.

В I серии экспериментов микросферы вводили до и через 30 мин после инъекции мексamiна, во II серии — на следующий день после окончания «фармакологической тренировки». Полиэтиленовые катетеры имплантировали животным за сутки до окончания тренировки.

Результаты представлены в виде  $M \pm m$ . Статистическая обработка результатов произведена с использованием *t*-критерия Стьюдента.

**Результаты и обсуждение.** Ранее нами было показано, что мексamiн вызывает повышение устойчивости организма к недостатку кислорода во внешней среде как при однократном, так и при многократном его применении [8, 9]. Основные показатели системной и регионарной гемодинамики при применении мексamiна представлены в табл. 1—3.

Таблица 1

Показатели системной гемодинамики у крыс в норме и после применения мексamiна

Показатель	Норма (n=6)	Однократное введение (n=6)	«Фармакологическая тренировка» (n=7)
АД, мм рт. ст.	91,1±3,3	95,1±4,8	87,7±3,6
ЧСС в минуту	410,0±17,9	470,2±21,8	423,3±13,7
СИ, мл/мин на 100 г массы	26,9±0,7	18,4±1,9**	53,0±5,7**
ОПС, мм рт. ст./мл/мин на 100 г массы	3,27±0,08	5,55±0,85*	1,78±0,22***

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3: одна звездочка —  $p < 0,05$ , две —  $p < 0,01$ , три —  $p < 0,001$ .

Таблица 2

Показатели сосудистого сопротивления в различных органах и тканях у крыс в норме и после применения мексamiна

Органы и ткани	Норма (n=6)	Однократное введение (n=7)	«Фармакологическая тренировка» (n=7)
Кожа	891,4±143,0	6283,0±2076,0***	743,7±108,2
Мышцы	937,5±171,0	2260,0±534,0***	810,5±99,1
Мозг	86,5±1,6	111,0±17,1	41,4±6,6***
Желудок	153,9±12,0	328,0±30,0	66,9±13,4***
Поджелудочная железа	134,5±22,6	138,0±20,1	38,2±5,6***
Тонкий кишечник	54,3±9,9	77,8±18,6	40,6±9,3
Селезенка	41,4±9,2	500,1±188,6***	51,6±10,2
Сердце	18,1±2,4	15,9±3,0	10,3±1,6*
Надпочечники	21,7±4,7	16,8±5,5	20,8±5,6
Семенники	300,4±38,3	2374,8±636,7***	203,5±34,8***
Почки	17,5±1,2	56,4±22,9***	23,5±2,4*
Диафрагма	105,3±16,0	76,5±21,5	71,8±18,8***

Таблица 3

Показатели регионарного кровотока в органах и тканях у крыс в норме и после применения мексамина

Органы и ткани	Норма (n=6)	Однократное введение (n=7)	«Фармакологическая тренировка» (n=7)
Кожа	0,10±0,01	0,03±0,01***	0,14±0,02
Мышцы	0,10±0,02	0,09±0,02	0,13±0,02
Мозг	1,01±0,03	1,02±0,14	2,25±0,44*
Желудок	0,58±0,06	0,31±0,02	1,74±0,28**
Поджелудочная железа	0,74±0,18	0,53±0,16	2,56±0,31***
Тонкий кишечник	1,51±0,37	1,42±0,34	2,93±0,63
Селезенка	2,51±0,65	0,52±0,30***	2,32±0,47
Сердце	5,09±0,6	7,11±1,1	10,49±1,48**
Надпочечники	4,70±1,00	7,70±2,10***	6,81±0,84
Семенники	0,31±0,05	0,09±0,04***	0,51±0,08
Почки	5,06±0,24	1,91±0,44***	3,87±0,46*
Диафрагма	0,88±0,10	1,42±0,27***	1,40±0,26***

Показано, что через 30 мин после введения мексамина АД не изменяется, а ЧСС увеличивается очень незначительно (всего на 15 % по сравнению с исходным уровнем). Значительно изменяются ОПС, которое на 67 % превышает фоновое значение, и сердечный индекс (СИ), который на 34 % ниже исходного уровня ( $p < 0,01$ ) (см. табл. 1).

Такая реакция сердечно-сосудистой системы объясняется, по-видимому, тем, что мексамин оказывает прямое сосудосуживающее действие, которое приводит к падению напряжения кислорода в различных органах и тканях [10], т. е. вызывает тканевую гипоксию.

Однако вазоконстрикторный эффект мексамина проявляется не во всех органах одинаково. В табл. 2 приведены данные по региональному сосудистому сопротивлению в различных органах. Повышение сопротивления сосудов особенно велико в коже (в 7 раз), в селезенке (в 12 раз), в семенниках (в 8 раз). Меньше выражено повышение в мышцах (всего в 2 раза) и в почках (в 3 раза). Что касается таких жизненно важных органов, как мозг, сердце, поджелудочная железа и надпочечники, то в них повышение сосудистого сопротивления не наблюдается.

Значительные изменения при действии мексамина отмечаются и в регионарном кровотоке (см. табл. 3). Наиболее заметное уменьшение кровотока отмечено в коже (в 3 раза), в селезенке (в 5 раз), в почках (в 2,5 раза), в семенниках (в 3,5 раза). В мозге же кровоток сохраняется на прежнем уровне, а в сердце и в надпочечниках даже увеличивается.

Сохранение кровотока на прежнем уровне в жизненно важных органах, по-видимому, связано с тем, что в экстремальных условиях гипоксии активируются срочные механизмы адаптации, приводящие к перераспределению кровотока в пользу головного мозга и сердца. Подтверждением этого предположения может служить тот факт, что кровоток в надпочечниках увеличивается почти в 2 раза, что свидетельствует об активации симпато-адреналовой системы, которая мобилизует защитно-приспособительные реакции организма в экстремальных условиях. Кроме того, мексамин, легко проникая через гематоэнцефали-

ческий барьер оказывает и центральное влияние на серотонинергические структуры головного мозга, непосредственно влияющие на гипоталамо-гипофизарную систему, также принимающую участие в приспособительных реакциях организма.

Таким образом, можно предположить, что мексамин, сам по себе оказывает двойственное влияние на организм: с одной стороны, он вызывает падение напряжения кислорода из-за резкого сужения сосудов, а с другой — способствует осуществлению активации адаптационных механизмов.

Гемодинамические показатели регистрировали также через сутки после окончания 9-дневного курса применения мексамина.

Показано, что после окончания «Фармакологической тренировки» мексamiном АД и ЧСС были такими же, как у крыс контрольной группы, хотя СВ и ОПС изменились очень значительно (см. табл. 1). СИ оказался в 2 раза выше, а ОПС — в 2 раза ниже, чем у нетренированных крыс.

Подобные результаты были получены другими авторами при обычной барокамерной тренировке. Последняя приводит к увеличению СВ и падению ОПС [5]. Этот эффект авторы связывают с тем, что в результате тренировки происходят открытие ранее нефункционирующих сосудов, а также рост новых. По-видимому, полученные нами результаты можно также объяснить новообразованием сосудов или открытием нефункционирующих, так как регионарное сосудистое сопротивление во всех органах, кроме селезенки и почек, оказалось равным или даже несколько меньшим по сравнению с контролем (см. табл. 3).

Регионарный кровоток в некоторых органах (кожа, мышцы, тонкий кишечник и семенники) не отличался от кровотока в этих органах у крыс, не подвергавшихся тренировке. В таких же жизненно важных органах, как мозг, сердце, желудок и поджелудочная железа, кровоток стал вдвое больше. Очевидно, в результате длительного воздействия на организм гипоксии, вызванной применением мексамина, происходит глубокая перестройка клеточно-тканевого метаболизма, направленная на повышение резистентности к гипоксии.

Такое же воздействие на регионарный кровоток в мозге и в сердце оказывают и тренировка в условиях высокогорья [2], барокамерная тренировка [3] и тренировка вдыханием газовых смесей с пониженным содержанием кислорода [11]. Все эти факты подтверждают точку зрения ряда авторов [1] о том, что реакция сердечно-сосудистой системы на гипоксию осуществляется по двум (в определенной мере противоположным) направлениям: с превалированием сосудистого компонента (уменьшение сердечного индекса, уменьшение мышечного и кожного кровотока, повышение периферического сопротивления); с превалированием сердечного компонента (увеличение сердечного индекса, уменьшение общего сосудистого тонуса).

В случае применения мексамина эти два пути прослеживаются достаточно четко: при однократном применении адаптация к гипоксии осуществляется с преобладанием сосудистого компонента, а в случае тренировки — с преобладанием сер-

дечного компонента.

Полученные результаты позволяют, таким образом, понять какие физиологические процессы лежат в основе эффективности «фармакологической тренировки» к гипоксии мексамином.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Агаджанян Н. А., Гневушев В. В., Катков А. Ю. Адаптация к гипоксии и биоэкономика внешнего дыхания.— М., 1987.— С. 185.
2. Адаптация и резистентность организма в условиях гор.— Киев, 1986.
3. Айдаралиев А. А. Физиологические механизмы адаптации и пути повышения резистентности организма к гипоксии.— Фрунзе, 1978.— С. 189.
4. Вайнсон А. А., Урюпов О. Ю. // Радиобиология.— 1986.— Т. 26, № 3.— С. 329—333.
5. Кошелев В. Б., Вакулина Т. П., Кондашевская М. В. и др. // Всесоюзный симпозиум «Кровообращение в условиях высокогорной и экспериментальной гипоксии», 3-й.— Фрунзе, 1986.— С. 82.
6. Малкин В. Б., Гиппенрейтер Е. Б. Острая и хроническая гипоксия.— М., 1977.
7. Медведев О. С., Мурашев А. Н., Местрицк Ф. Е., Дугин С. Р. // Физиол. журн. СССР.— 1988.— Т. 72, № 2.— С. 48—51.
8. Платонова Р. Д. // Всесоюзное совещание «Фармакологическая коррекция гипоксических состояний: Тезисы докладов.— М., 1988.— С. 22—24.
9. Платонова Р. Д. // Всесоюзное совещание «Способы коррекции гипоксии в тканях»: Тезисы докладов.— Нальчик, 1988.— С. 38—41.
10. Свердлов А. Г., Мартыничук Ю. Ф., Ярковец А. Г. // Радиобиология.— 1972.— Т. 12, № 3.— С. 12—14.
11. Стрелков Р. Б., Караш Ю. М., Чижов А. Я. и др. // Докл. АН СССР.— 1987.— Т. 293, № 2.— С. 18—22.

Поступила 09.02.91

#### THE SYSTEMIC AND REGIONAL HEMODYNAMICS IN RATS TREATED WITH 5-METHOXYTRYPTAMINE: ON THE MECHANISM OF "PHARMACOLOGICAL ADAPTATION" TO HYPOXIA

R. D. Platonova, O. S. Medvedev

M. V. Lomonosov State University, Moscow

Effects of 5-methoxytryptamine (5-MOT) on parameters of systemic and regional hemodynamics were studied in awake Wistar rats. Arterial pressure and pulse were measured using a direct procedure. Content of systolic blood and volume rate of blood flow in 12 vascular zones were estimated by means of the radioactive microsphere technique. The microspheres were inoculated in left heart ventricle under free conditions before, within 30 min and after termination of the "pharmacological training". Single intraperitoneal administration of 5-MOT, 25 mg/kg, led to increase in total peripheral resistance by 67 % and in cardiac index by 34 %. The rate of blood flow was decreased in skin, spleen, kidney and testicular tissues, while it was increased in heart and adrenal glands. "Pharmacological training", carried out within 9 days with daily administration of 5-MOT 25 mg/kg, resulted in a decrease in total peripheral vascular resistance by 46 %, while cardiac index was increased by 97 %; blood flow rate was increased in brain, stomach, heart and diaphragm.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1992

УДК 615.31:547.953].015.4:616.127-008.939.15-39-092.9

В. С. Гуревич, В. В. Елисеев, Л. В. Шатилина, И. Б. Крылова

#### ВЛИЯНИЕ ЭССЕНЦИАЛЬНЫХ ФОСФОЛИПИДОВ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ В МИОКАРДЕ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПОСТГИПОКСИЧЕСКОЙ РЕОКСИГЕНАЦИИ

Ленинградский НИИ кардиологии Минздрава РСФСР

В настоящее время интерес к фосфолипидам как к классу лекарственных препаратов значительно возрос. Установлено, что эссенциальные фосфолипиды при введении животным оказывают гепатопротекторное действие при экспериментальных повреждениях печени (интоксикации  $CCl_4$ , введении алкоголя и др.) [14, 16]. Показана возможность извлечения избыточного холестерина из мембран эритроцитов и тромбоцитов *in vivo* при внутривенном введении положительно заряженных мицелл и липосом фосфатидилхолина кроликам с экспериментальным атеросклерозом. При этом наблюдалось возрастание активности  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ -АТФаз эритроцитов и снижение АДФ- и коллагениндуцированной агрегации тромбоцитов [2]. Свое благоприятное действие эссенциальные фосфолипиды оказывают на различные звенья патогенеза атеросклероза путем изменения метаболизма сывороточных липидов и улучшения акцепторных свойств липопротеидов высокой плотности [7]. Фосфолипиды представляются также адекватным средством для устранения повреждений липидного бислоя мембран. Они способны восстанавливать матриксную функцию эндоплазматического ретикулума и эритроцитов, нарушенную в результате индукции перекисного окисления липидов и обогащения мембран холестерином [2].

Сравнительно недавно установлено, что повышение интенсивности перекисного окисления липидов и накопление его продуктов являются важными патогенетическими звеньями при ишемических и реоксигенационных повреждениях сердца [8]. Обоснование возможности применения эссенциальных фосфолипидов для защиты сердца от этих повреждений является важной задачей. Целью настоящей работы явилось изучение антиоксидантных свойств эссенциальных фосфолипидов, их влияния на интенсивность липопероксидации и активность супероксиддисмутазы в миокарде крыс при постгипоксической реоксигенации, а также в тромбоцитах и плазме крови здоровых людей.

**Методика.** Тромбоциты выделяли из богатой тромбоцитами плазмы дифференциальным центрифугированием [10]. Осадок тромбоцитов отмывали буфером Тироде рН 6,2, отмывые клетки ресуспендировали в том же буфере рН 7,4 без альбумина [9] и использовали в дальнейших экспериментах.

Антиоксидантные свойства эссенциальных фосфолипидов были изучены на модели гипоксии у крыс [8]. В работе использовался коммерческий препарат «Эссенциале» (фирма «Nattermann»), представляющий собой диглицерид — эфир — холинофосфорной кислоты природного происхождения в комбинации с преимущественно ненасыщенными жирными кислотами, в особенности с линолевой (70 %), линолоновой и олеиновой. Опыты выполнены на крысах-самках массой

140–160 г. Под наркозом (нембутал 50 мг/кг внутривенно) у животных производили трахеотомию и подключали аппарат искусственной вентиляции легких. В течение 5 мин проводили адаптацию животных к режиму искусственного дыхания. Гипоксию вызывали отключением дыхательного аппарата на 4 мин, после чего в течение 10 мин осуществляли реоксигенацию. Подопытным крысам на протяжении всего эксперимента (19 мин) проводили внутривенную инфузию эссенциальных фосфолипидов в дозе 0,03 мл/кг/мин. Контрольным животным вводили физиологический раствор. Базовый уровень показателей перекисного окисления липидов определяли у крыс, находящихся 20 мин в режиме искусственного дыхания. После окончания эксперимента ткань фиксировали в жидком азоте для последующего определения показателей липопероксидации.

Экстракцию липидов из ткани сердца и суспензии тромбоцитов проводили смесью хлороформа с метанолом в соотношении 2:1 [13]. Определение диеновых конъюгатов (ДК) проводили по методу [6], триеновых конъюгатов (ТК) — как в работе [3]. Содержание малонового диальдегида (МДА) оценивали по методу [17]. При работе с тромбоцитами для увеличения концентрации МДА в качестве прооксидантов использовали НАДФ·Н или аскорбиновую кислоту, а также ионы  $Fe^{2+}$ . Инкубационная смесь включала 50 мМ трис-НСl рН 7,4, 1 мМ НАДФ·Н или 0,5 мМ аскорбиновую кислоту, 0,7 мМ закисное железо, 0,2 мМ пиррофосфат натрия и эссенциальные фосфолипиды из расчета 0,1 мл препарата на 10 мл богатой тромбоцитами плазмы. О содержании шиффовых оснований (ШО) судили по методу [12] с использованием флуориметра ФМ-11-2 (СССР). Концентрацию общих липидов (ОЛ) определяли сульфанилловым методом [4], белок — микробиуретовым [5].

Определение активности супероксиддисмутазы (СОД) проводили по методу [15], основанному на способности фермента ингибировать восстановление нитросинего тетразолия в присутствии НАДФ·Н и феназине-метасульфата. Величину активности фермента определяли по формуле:

$$A = T \% / (100 \% - T \%),$$

где  $A$  — активность фермента (в усл. ед.), рассчитанная на 1 мг белка;  $T\%$  — процент торможения реакции восстановления нитросинего тетразолия в пробе за 1 мин (50% ингибирования этой реакции соответствует 1 усл. ед. [11]).

**Результаты и обсуждение.** В сердечной ткани крыс наблюдали увеличение уровня перекисного окисления липидов при гипоксии и реоксигенации с одновременным падением активности СОД (см. таблицу). При гипоксии по сравнению с аэробным режимом концентрация МДА увеличилась на 45%, ШО — на 18,7%, ДК — на 22,9%, ТК — на 31,8%, в то время как активность СОД уменьшилась на 34%. При восстановлении дыхания происходит дальнейшее повышение уровня продуктов липопероксидации (МДА на 47,5%, ШО на 35,4%, ДК на 36%) и падение активности СОД на 40%. На фоне введения эссенциальных фосфолипидов выявлено уменьшение содержания МДА на 24,2%, ШО на 53,3%, ДК на 29,1%, ТК на 29,8% и повышение активности СОД на 33,4% относительно периода реоксигенации. Эти результаты показывают, что эссенциальные фосфолипиды способны существенно ингибировать перекисное окисление липидов в условиях реоксигенации миокарда крыс.

Повышению адгезивной и агрегационной активности тромбоцитов отводится важная роль в патогенезе ИБС. Патологическая активация кровяных пластинок сопровождается нарушением реологических свойств крови, блокадой микроциркуляторного русла, повышением проницаемости кровеносных сосудов вследствие дисбаланса в системе тромбоцит — сосудистая стенка. Известно, что эссенциальные фосфолипиды снижают способность тромбоцитов к агрегации [1]. Изме-

#### Показатели перекисного окисления липидов в миокарде крыс при гипоксии и последующей реоксигенации

Исследуемый показатель	Искусственное дыхание (аэробный режим) (n=6)	Остановка дыхания (гипоксия) (n=6)	Восстановление дыхания (реоксигенация) (n=6)	Гипоксия с последующей реоксигенацией на фоне введения эссенциальных фосфолипидов (n=7)
МДА, нмоль/мг ОЛ в 1 г ткани	5,64±0,43	10,35±1,65*	0,75±1,53*	8,15±0,33**
ШО, усл. ед./мг ОЛ в 1 г ткани	30,37±4,62	37,34±2,23*	46,99±3,02*	21,96±5,14**
ДК, мкмоль/мг ОЛ в 1 г ткани	11,32±1,00	14,67±2,21	15,25±1,55*	10,81±1,39**
ТК, усл. ед. опт. пл/мг ОЛ в 1 г ткани	1,05±0,08	1,54±0,20	1,64±0,09*	1,15±0,14**
СОД, усл. ед./мг белка в 1 мин в 1 г ткани	7,20±0,80	4,78±0,71*	4,36±0,37*	7,17±0,61**

Примечание. Одна звездочка —  $p < 0,01 - 0,05$  относительно аэробного режима, две —  $p < 0,01 - 0,05$  относительно периода реоксигенации.

нение агрегационных свойств тромбоцитов в свою очередь сопряжено с изменением интенсивности в них перекисного окисления липидов. Это является важной предпосылкой для коррекции липопероксидации в тромбоцитах эссенциальными фосфолипидами.

При инкубации тромбоцитов и плазмы крови с фосфолипидами в модельной системе, где в качестве прооксидантов использовали НАДФ·Н или аскорбиновую кислоту, также наблюдали снижение интенсивности перекисного окисления липидов по сравнению с пробами, не содержащими препарат. Концентрация МДА в тромбоцитах при аскорбатзависимом инициировании снизилась на 43,2% (с 6,50 и 3,70 нмоль на 1 мг ОЛ), а при НАДФ·Н-зависимом инициировании — на 66,4% (с 11,61 до 3,91 нмоль на 1 мг ОЛ); в плазме крови эффект менее выражен: уровень МДА уменьшился на 22% (с 14,71 до 11,47 нмоль на 1 мл плазмы). Накопление ШО на фоне введения эссенциальных фосфолипидов в тромбоцитах снизилось на 22% (с 35,81 до 27,93 усл. ед. флуоресценции на 1 мг ОЛ) и в плазме крови на 24,2% (с 21,26 до 16,12 усл. ед. флуоресценции на 1 мл плазмы).

В целом полученные данные указывают на возможность применения препаратов, содержащих эссенциальные фосфолипиды, в клинической практике при лечении заболеваний, сопровождающихся повышенным уровнем перекисного окисления липидов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Алмазов В. А., Гуревич В. С., Красильникова Е. И. и др. // Гиперлипидопротеинемия как фактор риска и терапия «эссенциальными» фосфолипидами.— М., 1984.— С. 81—83.
2. Бородин Е. А. Восстановление фосфолипидами поврежденных биологических мембран: Дис. ... д-ра мед. наук.— М., 1986.
3. Владимиров Ю. А., Арчаков А. А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.— М., 1972.
4. Колб В. Г., Камышиников В. С. Справочник по клинической химии.— Минск, 1982.— С. 202—204; 208—219.
5. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии.— М., 1980.— С. 223—224.
6. Ланкин В. З., Поляков В. М., Архангельская А. В. и др. // Бюл. exper. биол.— 1979.— № 3.— С. 270—273.
7. Лопухин Ю. М., Маркин С. С., Бородин Е. А. и др. // Гиперлипидопротеинемия как фактор риска и терапия «эссенциальными» фосфолипидами.— М., 1984.— С. 41—46.
8. Меерсон Ф. З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца.— М., 1984.— С. 269.
9. Розенберг А. Е., Марков Х. М. // Кардиология.— 1983.— № 2.— С. 56—58.
10. Черняк Н. Б., Евлентьева Н. Е., Гуртовой И. М. // Пробл. гематол.— 1979.— № 11.— С. 54—56.
11. Beauchamp C., Fridovich I. // *Analyt. Biochem.*— 1971.— Vol. 44.— P. 276.
12. Fletcher B. Z., Dillard C. J., Tappel A. Y. // *Ibid.*— 1973.— Vol. 52.— P. 1—9.
13. Folch J., Lees M., Stanley G. // *J. biol. Chem.*— 1957.— Vol. 22.— P. 497—499.
14. Maros T. // *Arzneimittel-Forsch.*— 1973.— Bd 34, N 11.— S. 1538—1542.
15. Nishikimi N., Rao N. A., Yagi K. // *Biochem. biophys. Res. Commun.*— 1972.— Vol. 46.— P. 849.
16. Rauert H. M. // *Arzneimittel-Forsch.*— 1973.— Bd 27, N 9.— S. 1332—1334.
17. Smith J. B., Ingerman C. H., Silver M. J. // *J. Lab. clin. Med.*— 1976.— Vol. 8.— P. 167—172.

Поступила 02.11.90

### EFFECT OF ESSENTIAL PHOSPHOLIPIDS ON THE RATE OF LIPID PEROXIDATION IN THE MYOCARDIUM IN EXPERIMENTAL POSTHYPOXIC REOXYGENATION

V. S. Gurevich, V. V. Eliseev, L. V. Shatilina, I. B. Krylova  
Institute of Cardiology, RSFSR Ministry of Health, Leningrad

Correction of the lipid peroxidation rate using essential phospholipids was studied. The phospholipids were used in protection of heart tissue in experimental posthypoxic reoxygenation. Administration of essential phospholipids into the rats during myocardium reoxygenation led to an increase in activity of superoxide dismutase. The drugs containing essential phospholipids may be used in clinical practice for treatment of the impairments when elevated lipid peroxidation occurred.

## МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1992

УДК 616-008.839.6:547.962.91-074

К. С. Планутис, Г. Е. Морозевич, А. Е. Берман

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОПРОПЕПТИДА ПРОКОЛЛАГЕНА III ТИПА ТВЕРДОФАЗНЫМ МЕТОДОМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОНЬЮГАТА АНТИТЕЛ С ПЕРОКСИДАЗОЙ ИЛИ БЕЛКА А, МЕЧЕННОГО РАДИОАКТИВНЫМ ЙОДОМ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

N-концевой пропептид проколлагена типа III (РIII-NP) отщепляется от этого проколлагена специфической протеазой (N-концевой проколлаген-эндопептидазой) во внеклеточном пространстве. Концентрация N-пропептида в биологических жидкостях отражает степень метаболизма коллагеновых белков в норме и при различных патологических состояниях (фибротических процессах в печени и легких, неопластическом росте и др. [2, 7, 10, 12]) и является тестом при диагностике многих заболеваний.

Для определения содержания РIII-NP используют радиоиммунологические методы с применением в качестве антигена РIII-NP, меченного радиоактивным йодом [2, 6]. Для этого требуется регулярное получение меченных *in vitro* препаратов  $^{125}\text{I}$  этого пептида в связи с коротким периодом полураспада радиоактивного йода. Поэтому заслуживают внимания иммуоферментативные методы определения РIII-NP с использованием антител к этому пептиду в качестве первичных антител и последующей идентификацией комплекса

антиген — антитело с помощью вторичных антител, конъюгированных с ферментом (пероксидазой). Другая возможность — использование вместо вторичных антител коммерчески доступных препаратов белка А, меченного  $^{125}\text{I}$ , регулярно поставляемых изготовителями, в том числе отечественными. Указанные модификации определения РIII-NP в литературе не описаны.

Целью данного исследования была разработка универсального твердофазного метода определения содержания РIII-NP с применением вторичных антител, конъюгированных с ферментом, или с использованием белка А, меченного  $^{125}\text{I}$ .

Методика. Выделение и очистку препаратов проколлагена типа III, содержащего N-концевой пропептид p-N-III-коллагена из кожи эмбрионов телят, а также иммунизацию кроликов и получение антисыворотки к указанному коллагену проводили по описанному методу [6].

Для постановки иммуоферментной реакции использовали планшеты для иммунологических реакций (Ленинградский завод медицинских полимеров или Омский завод пластмасс). В каждую лунку планшета вносили по 0,2 мл PBS (13 мМ фосфатный буфер, содержащий 135 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl, pH 7,5) и добавляли 2 мкл раствора, содержащего 2,3 мг/мл p-N-III-коллагена в 0,01 % уксусной кислоте, инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Раствор сливали и в лунки вносили 5 % раствор сухого молока (Балтский молочноконсервный комбинат детских продуктов, УССР), приготовленного на PBST (13 мМ фосфатный буфер, содержащий 135 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl, 0,05 % неионного детергента твин-20, pH 7,5), для насыщения сорбционных центров на пластмассе. После инкубации при комнатной температуре в течение 1 ч удаляли раствор молока, в лунки вносили по 0,1 мл PBST — 5 % молоко, содержащее кроличью антисыворотку к p-N-III-коллагену в разведении 1:500, и по 0,1 мл раствора стандартных разведений антигена (p-N-III-коллагена) или раствора с неизвестной концентрацией антигена в различных разведениях, приготовленных на PBST — 5 % молоко. Растворы антител и антигена смешивали и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре перед внесением в лунки. В контрольные пробы вносили по 0,2 мл PBST — 5 % молоко. Смесь в лунках инкуби-

ровали в течение 12 ч при 4 °С. Лунки промывали 5 раз PBST и вносили по 0,2 мл раствора конъюгата антител к иммуноглобулинам кролика с пероксидазой (конъюгат поставляется прикладным центром биотехнологии, г. Пылава, Эстония) в разведении 1:100 на PBST. В случае йодированного белка А в лунки вносили 0,2 мл раствора  $^{125}$ I — белка А (40 мКи/мг, Ленинградское отделение Всесоюзного объединения «Изотоп») в PBST из расчета 600 000 имп/мин на пробу.

После инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре лунки промывали 5 раз PBST, один раз 0,02 М трис-НСl-буфером, содержащим 0,5 М NaCl, и определяли количество сорбированных вторых антител по пероксидазной реакции с о-фенилендиамин [1]. В случае белка А лунки вырезали из планшета и определяли радиоактивность в гамма-счетчике.

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях проводили по описанному методу [3].

**Результаты и обсуждение.** В качестве антигена для получения антител к N-концевому пропептиду (РIII-NP) были использованы очищенные препараты р-N-III-коллагена, содержащие N-пропептид и спирализованную область проколлагена типа III. Так как иммуногенная активность спирализованной области слабая, иммунный ответ в основном обусловлен пропептидным участком [6, 11]. Однако специфичность антител существенно зависит от чистоты коллагена, т. е. отсутствия в его препаратах неколлагеновых белков, обладающих высокой иммуногенной активностью.

Чистоту р-N-III-коллагена определяли с помощью электрофоретического анализа в денатурирующих условиях как восстановленных, так и невосстановленных препаратов белка. Как видно из рис. 1, при анализе обработанных и не обработанных пепсином препаратов на фореграмме выявляются в небольшом количестве  $\gamma$ -компоненты, а также  $\beta$ -компоненты и  $\alpha$ -цепи коллагена (для

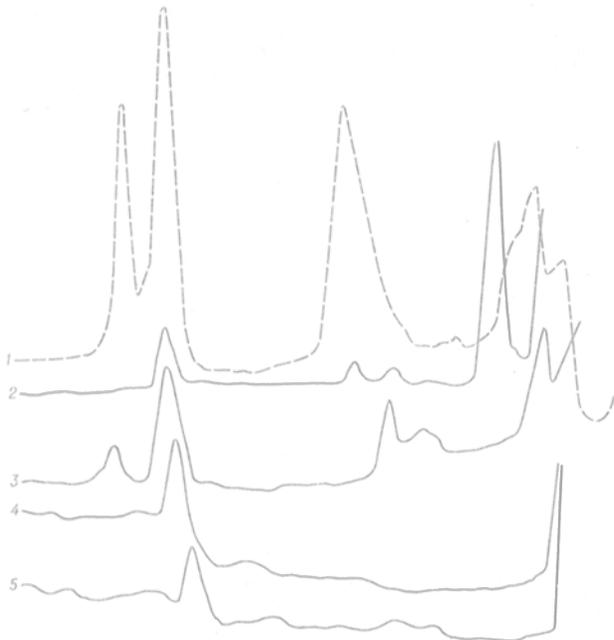


Рис. 1. Относительное содержание белков в полученных коллагеновых препаратах.

Окрашенный кумасси голубым 6 % гель сканировали на хромоскане 200 («Южис Лоебл», Англия). 1 — восстановленный коллаген-I; 2 — окисленный р-N-III-коллаген после пепсинолиза; 3 — окисленный р-N-III-коллаген; 4 — восстановленный р-N-III-коллаген после пепсинолиза; 5 — восстановленный р-N-III-коллаген. Здесь и на рис. 2 абсцисса показывает относительную миграцию справа налево, к аноду, ордината — относительную интенсивность окрашивания кумасси голубым.

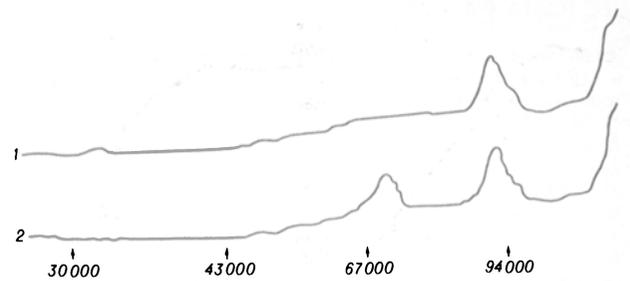


Рис. 2. Относительное содержание белков в коллагеназном гидролизате р-N-III-коллагена.

1 — контроль с чистой коллагеназой; 2 — коллагеназный гидролизат р-N-III-коллагена. Миграция справа налево при электрофорезе в 12 % ПААГ. Стрелки указывают положение маркеров молекулярных масс, приведенных под стрелками: (слева направо) карбоангидраза, овальбумин, альбумин, фосфорилаза б.

сравнения проведен электрофорез высокоочищенных препаратов коллагена типа I — трек 1). Наличие  $\alpha 2(I)$ -цепей указывает на некоторую примесь коллагена типа I. Наличие  $\gamma$ -компонента лишь в небольшом количестве объясняется тем, что основная масса проколлагена (трехспиральный мономер с мол. м. порядка 450 кДа) не мигрирует при электрофорезе в разделяющий гель. В случае обработки пепсином (т. е. удаления пропептидных и телопептидных участков), но без восстановления SS-связей картина существенно не изменяется, что характерно для коллагена типа III, в котором тройная спираль стабилизирована межцепевой SS-связью, локализованной в спирализованной области [4]. Однако в случае восстановления пепсинизированных препаратов (трек 4)  $\gamma$ - и  $\beta$ -компоненты полностью исчезают и резко возрастает содержание материала в области  $\alpha 1$ -цепи, в то время как содержание  $\alpha 2(I)$ -цепи не изменяется. Таким образом, полученный препарат в основном представлен рN-коллагеном типа III. О коллагеновой природе анализируемого белка свидетельствует также тот факт, что он практически полностью расщепляется высокоочищенными препаратами бактериальной коллагеназы до электрофоретически не обнаруживаемых фрагментов (рис. 2, трек 2). Как видно, в этом случае удается обнаружить лишь одну полосу с мол. м. порядка 70 кДа, что соответствует мол. массе N-концевого пропептида, который не расщепляется бактериальной коллагеназой при 37 °С [6].

При анализе калибровочного графика взаимодействия антител к р-N-III-коллагену с двумя видами антигенов (исходным, использованным для иммунизации, и этого же антигена, обработанного коллагеназой) видно, что в обоих случаях смещение кривых, обусловленное конкуренцией антигенов жидкой фазы с антигеном, сорбированным на пластике, практически одинаково (рис. 3). Это указывает, что анализируемая антисыворотка содержит в основном антитела, специфические для N-пропептида.

При сравнении иммуноферментного метода определения N-пропептида (рис. 4) и метода с использованием  $^{125}$ I-белка А (см. рис. 3) видно, что они мало различаются по чувствительности и обеспечивают достаточно надежное определение содержания р-N-III-коллагена в пределах 100—12 000 нг/мл. Учитывая, что содержание N-пропептида в р-N-III-коллагене составляет при-

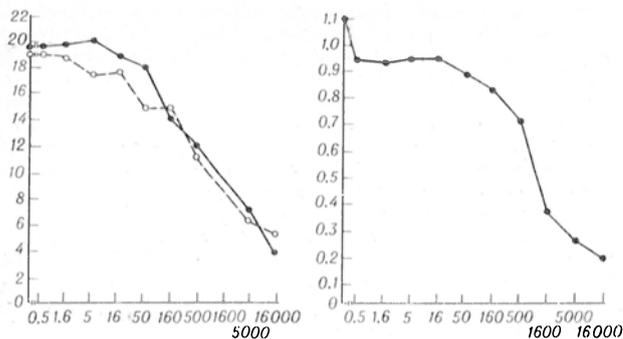


Рис. 3. Зависимость количества связанной антителами метки от количества РIII-NP в пробе до (темные кружки) и после (светлые кружки) коллагенолиза.

По оси абсцисс — количество РIII-NP в пробе, нг; по оси ординат — показания гамма-счетчика, тыс. имп/мин.

Рис. 4. Калибровочная кривая для определения РIII-NP иммуноферментным методом.

По оси абсцисс — количество РIII-NP, нг; по оси ординат — поглощение при 480 нм.

мерно 13 % (на основании аминокислотного состава) [9], указанные методы позволяют определять содержание N-пропептида типа III в биологических объектах в пределах 15—150 нг/мл. По литературным данным, содержание РIII-NP в сыроворотке крови, моче, асцитной жидкости у людей составляет соответственно 13—125, 29—310 нг/мл и 0,5—10 мкг/мл [5, 6, 8]. Проведенное нами определение содержания РIII-NP-подобной иммунореактивности в моче здоровых лиц с помощью <sup>125</sup>I-белка А с использованием в качестве конкурентного антигена р-N-III-коллагена дало величину  $95 \pm 5$  нг/мл.

Таким образом, предложенная процедура применима для определения аминокислотного проколлагена типа III в биологических жидкостях и исключает необходимость выделения, очистки и йодирования самого пропептида.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Berg R., Martin G. R., Foidart J. M., Robey P. G. // *Analyt. Biochem.*— 1980.— Vol. 104.— P. 205—214.
2. Kauppila A., Puistola U., Risteli J., Risteli L. // *Cancer Res.*— 1989.— Vol. 49.— P. 1885—1889.
3. Laemmli U. K. // *Nature.*— 1970.— Vol. 227.— P. 680—685.
4. Miller E. J., Rhodes R. K. // *Meth. Enzymol.*— 1982.— Vol. 82.— P. 33—64.
5. Niemela A. S. // *Clin. Chem.*— 1985.— Vol. 31.— P. 1301.
6. Pierard D., Nusgens B. V., Lapiere C. M. // *Analyt. Biochem.*— 1984.— Vol. 141.— P. 127—136.
7. Poole A., Myllyla B., Davies B. H. // *Life Sci.*— 1989.— Vol. 45.— P. 319—326.
8. Rohde H., Langer I., Krieg T., Timpl R. // *Collagen Relat. Res.*— 1983.— Vol. 3.— P. 371.
9. Sage H., Bornstein P. // *Meth. Enzymol.*— 1982.— Vol. 82.— P. 96—127.
10. Sato S. et al. // *J. A. M. A.*— 1986.— Vol. 3.— P. 1471—1473.
11. Timpl R. // *Meth. Enzymol.*— 1982.— Vol. 82.— P. 472—498.
12. Weigang K., Zaugg P.-Y., Zimmerman A. // *Hepatology.*— 1984.— Vol. 4.— P. 835—838.

Поступила 20.01.91

ESTIMATION OF PROCOLLAGEN III AMINOPROPEPTIDE BY MEANS OF SOLID-PHASE ASSAY INVOLVING CONJUGATES OF ANTIBODIES AND PEROXIDASE OR IODINE-LABELLED PROTEIN A

K. S. Planulis, G. E. Morozovich, A. E. Berman

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

A solid-phase assay was developed for estimation of procollagen III aminopropeptide which involved both immunoenzymatic and radioimmune procedures. The assay did not require the iodine-labelled aminopropeptide, while content of the antigen was estimated using the conjugate of secondary antibodies and peroxidase or iodine-labelled protein A. Substitution of the protein A for the antibodies conjugate and peroxidase enabled to abolish the radioactive materials use.

© Г. А. ГРИБАНОВ, М. В. МИНЛЕВ, 1992

УДК 577.125:577.152.31.08

Г. А. Грибанов, М. В. Минлев

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ХОЛЕСТЕРОЛЭСТЕРАЗ С ПРИМЕНЕНИЕМ МИКРОТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Тверской университет

В последние годы в связи с возросшим интересом к биохимии липидов большое внимание уделяется изучению ферментов, катализирующих их обмен [1]. Наряду с изучением структуры, механизма действия, биологической роли актуальной остается задача определения активности липолитических ферментов в биологических жидкостях, тканях и субклеточных структурах [4—7, 9].

Одной из задач, встающих перед исследователем при определении ферментативной активности, является выделение из реакционной смеси продуктов реакции или остатка субстрата для последующего количественного определения. Для этой цели достаточно часто используются хроматографические методы, например тонкослойная хроматография [2, 5, 8]. Рядом исследователей предложено использовать хроматографическую пластинку не только для разделения реакционной смеси, но и для ее инкубации [5—8]. Такой подход позволяет значительно сократить время исследования за счет изъятия ряда операций. Существенными недостатками подобных методов являются невозможность длительной инкубации смеси из-за быстрого испарения водной фазы, что частично решается увеличением ее объема [5, 8], и наличие в реакционной смеси органических растворителей, присутствие которых, несомненно, влияет на ход изучаемой реакции [5].

Предлагаемый в настоящей работе метод определения активности холестеролэстераз позволяет широко варьировать время инкубации, что особенно важно для липолитических ферментов (так как скорость катализируемых ими реакций относительно мала), путем выдерживания места нанесения смеси на пластинку в атмосфере насыщенного водяного пара, как предложено в работе [12] для протеолитических ферментов. Кроме того, настоящий метод позволяет отказаться от использования детергентов и органических растворителей непосредственно в реакционной смеси.

Методика. *Принцип метода.* На хроматографическую пластинку с тонким слоем силикагеля наносят в место старта раствор эфиров холестерина (ЭХ) в хлороформе. По

мере испарения растворителя ЭХ тонким слоем, распределяются по поверхности частиц силикагеля [4]. Благодаря этому при последующем нанесении источника фермента (гомогенат ткани, суспензия субклеточных структур и т. д.) создается достаточно развитая площадь поверхности раздела фаз липид-вода, стабильная все время инкубации. Кроме того, такая поверхность в отличие от эмульсий и коллоидных систем устойчива в достаточно широком диапазоне pH, что делает данный метод еще более универсальным. Приготовленную таким образом пластинку помещают в камеру предлагаемой конструкции, где в атмосфере насыщенного водяного пара находится только место нанесения реакционной смеси, в результате чего свойства силикагеля как носителя для хроматографии сохраняются на большей площади пластинки. После инкубации пластинку хроматографируют, как указано ниже.

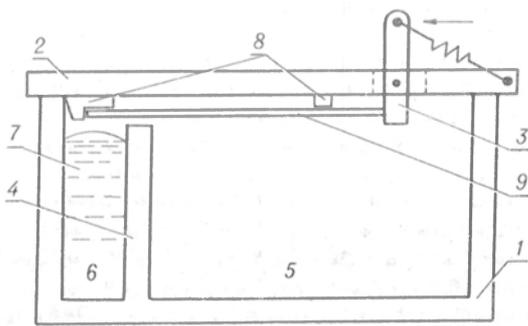
**Реактивы и оборудование.** Буферный раствор трис-HCl pH 7,2; хлороформ (перегонный); метанол (перегонный); гексан х. ч.; эфир диэтиловый; ледяная уксусная кислота; силикагель ЛС фирмы «Хемапол» (ЧСФР); H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (концентрированные фильтры обезжиренные; камера для инкубации (см. ниже); чашки Петри; стеклянные пластинки 50×75 мм; стеклянные стержни диаметром 5 мм; микродозаторы с ценой деления не более 1 мкл; пробирки термостойкие; пробирки мерные с притертыми пробками; пипетки на 10 и 2 мл; холодильник с морозильной камерой; термостат (37 °С); ФЭК (длина волны 400 нм), раствор ЭХ в хлороформе (0,4—1 мг/мл), полученный методом микротонкослойной хроматографии из сыворотки крови человека [3].

**Камера для проведения ферментативных реакций непосредственно на хроматографических пластинках.** Камера изготавливается из оргстекла толщиной 4—5 мм и состоит из собственно камеры (1) и крышки (2) с пружинным зажимом (3). Собственно камера делится перегородкой (4) на «сухую камеру» и «мокрую камеру» (соответственно 5 и 6). Стенки «мокрой камеры» покрыты изнутри парафином для придания поверхности воды (7) выпуклого профиля, что облегчает ее испарение (см. рисунок). Для крепления хроматографической пластинки необходимо: 1) перевернуть крышку (2) упорами (8) вверх и нажать на рычаг зажима (3) в направлении стрелки; 2) положить пластинку (9) слоем силикагеля вверх на упоры (8) так, чтобы место нанесения реакционной смеси располагалось в противоположном от зажима (3) конце крышки; 3) отпустить рычаг зажима (3); 4) перевернуть крышку пластинкой вниз и закрыть ею камеру, предварительно заполнив «мокрую камеру» водой.

**Определение холестеролэстеразной активности в гомогенате печени крысы.** 100 мг печени крысы гомогенизируют в предварительно охлажденной ступке с добавлением 1,5 мл буферного раствора трис-HCl pH 7,2. Полученный гомогенат переливают в пробирку, предварительно погруженную в ледяную ванну. В таком виде гомогенат может храниться в течение нескольких часов без заметного изменения активности холестеролэстераз, что было проверено экспериментально.

Способ приготовления пластинок для микротонкослойной хроматографии описан ранее [2, 3].

Готовые пластинки делают иглой на 4 дорожки и на каждую на расстоянии 3 мм от края в следующем порядке наносят: раствор ЭХ в хлороформе — 0,05 мл; гомогенат печени крыс — 0,002 мл; буферный раствор трис-HCl — 0,005 мл. После нанесения раствора ЭХ пластинку необходимо подсушить на воздухе в течение 10—15 мин для удаления хлороформа.



Камера для проведения ферментативных реакций непосредственно на хроматографических пластинках.

Объяснение в тексте.

Объем наносимого гомогената определяется количеством эндогенных ЭХ в ткани. Для определения активности фермента в других объектах (другие ткани, биологические жидкости, суспензии субклеточных структур) разведение и объем источника фермента определяются так, чтобы уровень фона эндогенных липидов был ниже разрешающей способности метода, используемого для количественного определения остатка субстрата. Нанесение буфера необходимо, чтобы стабилизировать pH и компенсировать испарение водной фазы за время нахождения пластинки вне камеры.

Гомогенат и буферный раствор необходимо наносить по возможности быстро, чтобы не допустить высыхания пятна. После этого пластинку сразу закрепляют в камере для инкубации, предварительно (за 30 мин) помещенной в термостат (37 °С) и оставляют на 2 ч.

Пока инкубируется опытная пластинка, имеется достаточно времени, чтобы приготовить контрольную. Пластинку готовят точно так же, как и опытную. Количество и порядок нанесения материалов должны точно соответствовать опыту. Контрольную пластинку, не проводя инкубацию, сушат на воздухе в течение 15—20 мин, после чего хроматографируют, как предложено ниже.

По истечении срока инкубации опытную пластинку вынимают из камеры и сушат 15—20 мин на воздухе. В качестве камеры для разделения используют чашки Петри, на дно которых помещают стеклянные стержни для поддержания пластинок. Систему для хроматографии (гексан — диэтиловый эфир — метанол — ледяная уксусная кислота в соотношении 9:2:0,2:0,3 по объему) в количестве 10 мл вносят в камеру для ее насыщения за 10 мин до разделения. Подведение системы растворителей к пластинке осуществляется с помощью обезжиренного бумажного фитилька. После прохождения растворителя до края пластинки хроматографирование продолжают еще в течение 5 мин, после чего пластинку вынимают, сушат на воздухе и проявляют в парах йода. Отдельные классы липидов при этом определяются в виде желтоватых пятен на белом фоне. Пятна, соответствующие ЭХ (RF — 0,8) очерчивают иглой, после чего пластинку оставляют на воздухе до исчезновения окраски. Затем фракции механическим путем снимают в пробирку. Элюирование производят смесью хлороформа с метанолом (3:2 по объему) дважды по 2 мл. Осадок на фильтре еще раз промывают 2 мл смеси. Растворитель выпаривают на водяной бане при 60 °С. Те же операции проделывают с контрольной пластинкой.

К высушенным пробам добавляют по 2 мл концентрированной H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и нагревают в сушильном шкафу при 180—200 °С в течение 15—20 мин. После охлаждения в каждую пробирку добавляют по 2 мл воды, перемешивают и определяют оптическую плотность на ФЭК при длине волны 400 нм в кюветах с расстоянием между рабочими гранями 10 мм против контроля на реактивы (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> — вода в соотношении 1:1 по объему). Кислоту в объеме 2 мл предварительно прогревают при 180—200 °С в течение 15—20 мин вместе с опытными пробами. Содержание ЭХ в пробе определяют по предварительно построенному калибровочному графику.

Количество белка в гомогенате определяют по методу Лоури.

Активность фермента рассчитывается по формуле:

$$A = \frac{C_2 - C_1}{C_3 \cdot t}$$

где C<sub>1</sub> — количество ЭХ в опыте (в мкг); C<sub>2</sub> — количество ЭХ в контроле (в мкг); C<sub>3</sub> — количество белка в пробе (в мг); t — время инкубации (в ч). Полученное значение активности выражается в микрограммах превращенного субстрата на 1 мг белка за 1 ч.

**Результаты и обсуждение.** В таблице приведены результаты определения активности холестеролэстераз в гомогенате печени крысы по предлагаемой в данной работе методике при инкубации в течение 2 ч.

Как видно, при помощи предложенного метода выявлено значительное уменьшение уровня ЭХ, что указывает на наличие в гомогенате печени холестеролэстеразной активности. Некоторый разброс результатов объясняется тем, что в таблице собраны данные нескольких экспериментов, проведенных в разное время. Несмотря на это, достоверность различия результатов в контроле и опыте

**Активность холинэстераз (в мкг/мг/ч) в гомогенате печени крысы**

Масса ЭХ, мкг	
контроль	опыт
48	32
53	38
53	46
53	46
60	48
72	48
56,5±3,17	43±2,09*

Примечание. Звездочка —  $p < 0,01$  между средними значениями контроля и опытом.

оказалась весьма высокой. Расчет активности проводился по указанной выше формуле, где за среднее количество белка в каждой пробе взята величина 0,04 мг, величина активности составила 168,75 мкг/мг белка за 1 ч.

Несмотря на то что различные методы определения липолитической активности, как правило, не дают однозначных результатов по причине различной степени дисперсности субстрата и присутствия или отсутствия в реакционной смеси различных эмульгаторов [1], мы в данной работе предприняли попытку повторить определение холинэстеразной активности в гомогенате печени крысы другим методом.

Эксперимент был проведен по следующей схеме: в пробирки поместили по 0,1 мл раствора ЭХ в хлороформе, после чего хлороформ выпарили при 40 °С. В те же пробирки после выпаривания растворителя поместили по 0,2 мл буферного раствора трис-НСl pH 7,2 и по 0,004 мл раствора тритона X-100, разведенного водой в соотношении 1:40 по объему. После этого пробирки энергично встряхивали в течение 1 мин. Затем в каждую пробирку добавили по 0,005 мл гомогената печени крысы и перемешали содержимое каждой пробирки. Увеличение объемов компонентов реакционной смеси оказалось необходимым по причине технических затруднений, встретившихся при работе с малыми количествами жидкости в пробирках. Тритон X-100 добавлялся для диспергирования ЭХ в воде.

Затем в контрольные пробирки сразу, а в опытные после инкубации (2 ч при 37 °С) добавили смесь хлороформа с метанолом (2:1 по объему) в количестве 3 мл и провели экстракцию общих липидов [3]. Из полученного экстракта методом микротонкослойной хроматографии были выделены ЭХ, которые затем были количественно определены, как указано выше.

Результаты проверки подтвердили наличие холинэстеразной активности в печени крысы, но значение активности оказалось примерно в 4 раза ниже (42,5 мкг/мг белка за 1 ч), чем определялось предлагаемым методом. Это можно объяснить следующими причинами: во-первых, ЭХ даже с такими ненасыщенными жирными кислотами, как линоленовая, при 37 °С находятся в твердом состоянии, поэтому скорость их ферментативного

гидролиза в большой степени зависит от способа их диспергирования [1]; во-вторых, значительно быстрее гидролизуются ЭХ, если они находятся в мицеллярной форме [10], медленнее гидролизуются микрокристаллы ЭХ, причем скорость гидролиза по этой причине может изменяться в несколько раз [11]; в-третьих, большое влияние на скорость гидролиза оказывает выбор вещества, стабилизирующего эмульсию липида в воде [11]. Вероятно, при распределении ЭХ по поверхности частиц силикагеля поверхность липидного слоя, обращенная к воде, приобретает свойства мицеллоподобных структур. Кроме того, тритон X-100, несомненно, оказывает влияние на ход данной реакции.

Таким образом, предлагаемая в данной работе методика обладает более высокой чувствительностью по сравнению с традиционными (предполагающими иной способ создания развитой поверхности раздела фаз), требует меньших затрат времени, реактивов и позволяет работать с микроколичествами тканей, биологических жидкостей или суспензий субклеточных структур (порядка 0,1 мг в 1 пробе).

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Брокерхоф Х., Дженсен Р. Липолитические ферменты.— М., 1978.
2. Грибанов Г. А., Сергеев С. А. // Вопр. мед. химии.— 1975.— № 6.— С. 654.
3. Грибанов Г. А. Методы анализа липидов.— Калинин, 1980.
4. Митрофанова А. П., Полторак О. М. // Вестн. Моск. ун-та. Химия.— 1973.— Т. 14, № 3.— С. 278.
5. Dutta J., Das Arun K., Saha S. // J. Chromatogr.— 1978.— Vol. 154, N 1.— P. 39.
6. Lentze M., Schaub J., Hartis H. // Clin. chim. Acta.— 1973.— Vol. 49, N 1.— P. 19.
7. Lombard A., Journ M. L., Butta M. // J. Chromatogr.— 1977.— Vol. 134, N 1.— P. 242.
8. Mandal S. B., Biswas S. K., Chakrabarti P. // Ibid.— 1980.— Vol. 188, N 1.— P. 292.
9. Treadwell C. R., Vahouny G. V. 1968.— Цит по Брокерхоф Х., Дженсен Р. Липолитические ферменты.— М., 1978.
10. Vahouny G. V., Borja C. R., Treadwell C. R. // Там же.
11. Vahouny G. V., Weersina S., Treadwell C. R. // Там же.
12. Zoch E. // J. Chromatogr.— 1970.— Vol. 48, N 3.— P. 558.

Поступила 15.12.90

**ESTIMATION OF CHOLINESTERASE ACTIVITY USING MICROTHIN-LAYER CHROMATOGRAPHY**

G. A. Gribanov, M. V. Minyaev

State University, Tver

A procedure is developed for estimation of the cholinesterase activity in biological materials immediately on the plates for microthin-layer chromatography using a chamber of original construction. The procedure involved incubation of cholesterol esters, used as substrates and biological materials containing the enzyme, directly on the chromatographic plates in the chamber and the subsequent chromatography of the hydrolysis products. The enzymatic activity was calculated on the basis of the decrease in the substrate content per min per mg of protein. The procedure is simple, convenient; it allows to vary the incubation time and to estimate the enzymatic activity in minimal samples of the biological material using only small amounts of reagents.

## СОДЕРЖАНИЕ

## Обзоры

- Тутельян В. А., Гуткин Д. В., Васильев А. В. Современные представления о биогенезе лизосомальных белков в норме и при патологии 4
- Сторожок С. А., Соловьев С. В. Структурные и функциональные особенности цитоскелета мембраны эритроцита 14

## Оригинальные статьи

- Бурлакова Е. Б., Губарева А. Е., Архипова Г. В., Рогинский В. А. Модуляция перекисного окисления липидов биогенными аминами в модельных системах 17
- Маслов Л. Н., Лешманов Ю. Б. Изменение уровня опиоидных пептидов в сердце и плазме крови при острой ишемии миокарда, осложненной фибрилляцией желудочков 21
- Фукалова Л. А., Дубинина О. Н. Реакции дезаминирования биогенных аминов и других азотистых соединений при длительном воздействии этилендиамина в эксперименте на крысах 23
- Ишков А. Г., Ермаков Н. В., Микеров С. В., Кляцкий Ю. Ю., Мирошниченко Е. В. Производные 4-фенилпиперидина — субстраты моноаминоксидазы мозга крысы 25
- Горкин В. З., Губский Л. В., Камышанская Н. С., Киркель А. З., Овчинникова Л. Н. О природных модуляторах функций системы аминоксидаз в организме 28
- Попова И. А., Преснова В. Н., Лавренова Т. П. Влияние биогенных аминов на деградацию гликогена в изолированных гепатоцитах крысы 30
- Джанджава Т. Г., Шакаршвили Р. Р. Активность ферментов антиокислительной защиты и содержание продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови и цереброспинальной жидкости больных ишемической болезнью мозга 33
- Иванов Д. Е., Витвицкий В. Н. Специфика изменений разных групп ферментов в коре мозга крыс после межлинейной трансплантации эмбриональной нервной ткани 36
- Дрыгин А. Н., Нечаева Р. В., Осипович В. К., Павлова С. И., Сурувикина Т. Н., Шарова Л. А. Биохимические аспекты патогенеза нарушений функций центральной нервной системы при микроволновом облучении 38
- Флеров М. А., Толстухина Т. И. Метаболизм фосфолипидов нейронов и нейроглии при судорогах 40
- Гонский Я. И., Корда М. М., Клиш И. Н. Антиокислительное действие диметилсульфоксида при остром поражении печени тетрахлометаном 43
- Божко Г. Х., Чурсина В. С., Волошин П. В. Алкоголь и атерогенез: влияние низких и высоких доз этанола на холестерин крови крыс 44
- Акимова Е. В. Простаглицлин-тромбоксановая система у детей и подростков с высоким риском развития ишемической болезни сердца 47
- Смирнова Н. В., Новодержкина И. С., Баснакьян А. Г., Кожура В. Л. Обнаружение устойчивого повышения эндонуклеазной активности в клеточных ядрах печени собак при длительной артериальной гипотензии и в постреанимационном периоде 50
- Абидова С. С., Жукова Л. В. Циклический аденозинмонофосфат и липиды миокарда при фторотановой анестезии в зависимости от содержания кислорода в ингаляционной смеси 52
- Платонова Р. Д., Медведев О. С. Системная и региональная гемодинамика у крыс после применения мексамина: к вопросу о механизмах «Фармакологической тренировки» к гипоксии 53
- Гуревич В. С., Елисеев В. В., Шатилина Л. В., Крылова И. Б. Влияние эссенциальных фосфолипидов на интенсивность липопероксидации в миокарде при экспериментальной постгипоксической реоксигенации 55

## Методы биохимических исследований

- Планулис К. С., Морозевич Г. Е., Берман А. Е. Определение аминокпропептида проколлагена III типа твердофазным методом с использованием конъюгата антител с пероксидазой или белка А, меченного радиоактивным йодом 57
- Грибанов Г. А., Миняев М. В. Определение активности

## CONTENTS

## Review of Literature

- Tutelyan, V. A., Gutkin, D. V., Vasilyev, A. V. Current concepts on biogenesis of lysosomal proteins under normal and pathological conditions 4
- Storozhok, S. A., Solovyev, S. V. Structural and functional features of erythrocyte membrane cytoskeleton 14

## Original Papers

- Burlakova, E. B., Gubareva, A. E., Arkhipova, G. V., Roginsky, V. A. Modulation of lipid peroxidation by means of biogenic amines in model systems 17
- Maslov, L. N., Lishmanov, Yu. B. Alteration of opioid peptides content in heart and blood plasma under conditions of acute myocardial ischemia aggravated by ventricular fibrillation 21
- Fukalova, L. A., Dubinina, O. N. Deamination of biogenic amines and other nitrogen-containing substances during long-term administration of ethylene diamine into rats 23
- Ishkov, A. G., Ermakov, N. V., Mikerov, S. V., Klyatskiy, Yu. Yu., Miroshnichenko, E. V. Derivatives of 4-phenyl piperidine as potential neurotoxins and substrates of brain monoamine oxidase 25
- Gorkin, V. Z., Gubsky, L. V., Kamyshanskaya, N. S., Kirkel, A. Z., Ovchinnikova, L. N. On natural modulators of amine oxidases 28
- Popova, I. A., Presnova, V. N., Lavrenova, T. P. Effect of biogenic amines on degradation of glycogen in isolated rat hepatocytes 30
- Dzhandzhava, T. G., Shakarishvili, R. R. Activity of enzymes involved in antioxidative protection and content of lipid peroxidation products in blood serum and cerebrospinal fluid of patients with brain ischemic disease 33
- Ivanov, D. E., Vitvitskiy, V. N. Alteration of the enzymatic activity in rat brain cortex after interstrain transplantation of embryonal nervous tissue 36
- Drygin, A. N., Nechaeva, R. V., Osipovich, V. K., Pavlova, S. I., Surovikina, T. N., Sharova, L. A. Biochemical mechanisms of impairments in functions of central nervous system in microwave irradiation 38
- Flerov, M. A., Tolstukhina, T. I. Metabolism of neurone and neuroglia phospholipids in convulsions 40
- Gonisky, Ya. I., Korda, M. M., Klisch, I. N. Antioxidative effect of dimethyl sulfoxide in acute impairment of liver tissue with tetrachloromethane 43
- Bozhko, G. Kh., Chursina, V. S., Voloshin, P. V. Alcohol and atherogenesis: effect of low and high doses of ethanol on content of cholesterol in rat blood 44
- Akimova, E. V. The prostacycline-thromboxane system in children and juveniles with high risk of ischemic heart disease 47
- Smirnova, N. V., Novoderzhkina, I. S., Basnakjan, A. G., Votrin, I. I., Kozhura, V. L. Stable increase of the endonuclease activity in liver cell nuclei after long-term arterial hypotension and during the postresuscitation period 50
- Abidova, S. S., Zhukova, L. V. Alterations in content of cAMP and myocardial lipids under conditions of fluothane anesthesia depending on concentration of oxygen in the inhalation mixture 52
- Platonova, R. D., Medvedev, O. S. The systemic and regional hemodynamics in rats treated with 5-methoxytryptamine: on the mechanism of "pharmacological adaptation" to hypoxia 53
- Gurevich, V. S., Eliseev, V. V., Shatilina, L. V., Krytova, I. B. Effect of essential phospholipids on the rate of lipid peroxidation in the myocardium in experimental posthypoxic reoxygenation 55

## Methods of Biochemical Investigations

- Planulis, K. S., Morozovich, G. E., Berman, A. E. Estimation of procollagen III aminopropeptide by means of solid-phase assay involving conjugates of antibodies and peroxidase or iodine-labelled protein A 57
- Gribanov, G. A., Minyaev, M. V. Estimation of cholinesterase