

ТОМ 38

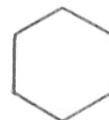
ВЫПУСК 5

СЕНТЯБРЬ — ОКТЯБРЬ

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

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

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

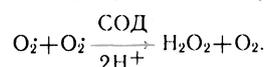


С. Чевари, Т. Андял, К. Бенкё, Я. Штрэнгер

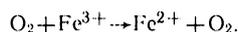
СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ И РАК

Объединенный центр медицинских учреждений, г. Печ, Городская больница, Сигетвар, Венгрия

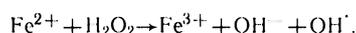
Регуляция многих жизненно важных процессов в организме основана на свободнорадикальном механизме [2, 4]. В физиологических условиях между естественными ингибиторами-антиоксидантами и свободными радикалами существует биологическое равновесие [1, 3]. С образованием супероксидного радикала O_2^- в организме начинается катализируемая супероксиддисмутазой (СОД) реакция дисмутации супероксидных радикалов [10]:



В результате этой реакции образуется менее активная перекись водорода, которая разрушается под действием каталазы. Супероксидный радикал легко отдает один электрон иону Fe^{3+} , восстанавливая его:



Двухвалентный ион железа Fe^{2+} легко вступает в реакцию с перекисью водорода, не расщепленной каталазой:



В результате этой реакции образуется весьма активный гидроксильный радикал OH^\cdot , участвующий в разрушении биологических структур и перекисидации липидов [6, 8].

Целью нашей работы было исследование изменений перекисного окисления липидов (по концентрации одного из его конечных продуктов — малонового диальдегида — МДА) и важных антиоксидантных энзимов: СОД и каталазы — в крови больных с опухолями желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) в зависимости от стадии заболевания.

Методика. Исследовали кровь с добавлением антикоагулянта этилендиаминтетраацетата. Обследованные были разделены на 4 группы: 1-я — 100 здоровых, средний возраст 56,3 года; 2-я — 7 больных раком ЖКТ, средний возраст 57,4 года; 3-я — 38 пациентов после лечения, средний возраст 55,3 года; 4-я — 18 больных раком с метастазами и кахексией, средний возраст 62,8 года. Методы опре-

Активность (в iU/мл крови) СОД и каталазы в крови больных при раке

Группа обследованных	СОД	Каталаза
1-я	2890 ± 324	4,9 ± 0,5 · 10 ⁴
2-я	1720 ± 200	7,4 ± 0,6 · 10 ⁴
3-я	2450 ± 580	4,3 ± 1,1 · 10 ⁴
4-я	1220 ± 210	2,8 ± 0,3 · 10 ⁴

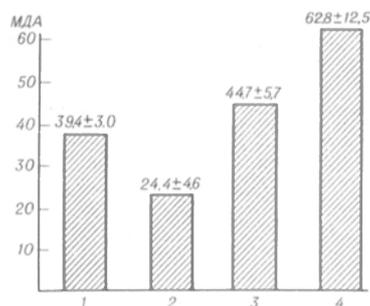
деления в крови активности каталазы, СОД и содержания МДА указаны в предыдущей работе [7].

Результаты и обсуждение. По сравнению с группой здоровых лиц активность СОД у больных в начальной стадии рака ЖКТ уменьшается, после радикального вмешательства нормализуется и в терминальной стадии заболевания снижается вновь более чем в 2,5 раза (см. таблицу). Активность каталазы в крови в начальный период заболевания значительно увеличивается по сравнению с нормой. После проведенной терапии активность каталазы нормализуется, а затем в стадии кахексии уменьшается почти в 2 раза по сравнению с нормой.

В начальный период заболевания раком ЖКТ концентрация МДА в крови уменьшается по сравнению с контрольной группой (см. рисунок). С развитием заболевания концентрация МДА в крови увеличивается и в конечной стадии доходит до весьма высоких уровней.

Полученные нами результаты подтверждают те концепции, согласно которым формирование опухоли связано с уменьшением и даже исчезновением СОД из опухолевой ткани [9]. В начальной стадии заболевания наблюдаемая нами высокая активность каталазы в крови, по-видимому, должна способствовать процессам пролиферации, освобождая их из-под контроля гидроксильных радикалов. На пониженный уровень гидроксильных радикалов косвенно указывает снижение концентрации МДА, наблюдаемое нами у больных 2-й группы (см. рисунок). Не исключено, что возникающие в терминальной стадии заболевания тяжелые токсические явления могут быть связаны с накоплением гидроксильных радикалов в организме [9].

Определение активности СОД, каталазы и содержания МДА в крови в настоящий момент едва ли может найти применение в лабораторной диагностике рака, поскольку подобные изменения свободнорадикальных механизмов могут наблюдаться и при других патологических состояниях [10].

**Концентрация МДА (в нмоль/мл) в крови больных раком ЖКТ.**

1 — средняя концентрация МДА в крови здоровых лиц (контрольная группа); 2 — концентрация МДА в крови больных в ранней стадии заболевания; 3 — концентрация МДА в крови больных после лечения (операция, облучение); 4 — концентрация МДА в крови больных с метастазами и кахексией.

ЛИТЕРАТУРА

1. Булакова Е. Б. // Докл. АН СССР.— 1965.— Т. 163.— С. 1278.
2. Владимирюв Ю. А. // Биофизика.— 1973.— Т. 18, № 1.— С. 148.
3. Горизонтов П. Д. Стресс и система крови.— М., 1983.
4. Ленингер А. Митохондрия.— М., 1967.
5. Пальмина Н. П. // Биофизика.— 1973.— Т. 18, № 1.— С. 166.
6. Соколовский В. В. // Вопр. мед. химии.— 1988.— № 5.— С. 2.
7. Csövari M., Angyal T., Strenger J. // Labordiagnosztika.— Budapest, 1990.— Vol. 17, N 1.— P. 23.
8. Feher J. // Orvosi hetil.— 1988.— Vol. 129, N 50.— P. 2667.
9. Oberley L. W. // Cancer Res.— 1979.— Vol. 59.— P. 1141.
10. Oberley L. W. // Free Radical in Aging and Degenerative Diseases.— New York, 1986.— P. 325.

Поступила 15.12.90

FREE RADICAL REACTIONS AND CANCER

S. Csövari, T. Angyal, K. Benko, J. Strenger

Joint Centre of Medicine, Pech, Sity Hospital, Sigetvar, Hungary

Activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase as well as content of malonyl dialdehyde (MDA) were estimated in the blood of patients with tumor of gastrointestinal tract. In the early stage of development of tumor SOD activity and concentration of MDA in whole blood was decreased while catalase activity was increased significantly. In the cases of metastases spreading and cachexia both SOD and catalase activities were greatly decreased; the content of MDA was increased.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1992

УДК 616.617-007.271-092.9-07:616.61-008.939.15-39

Э. Ф. Баринов, Э. В. Барабадзе, Ю. И. Жданюк

ДИНАМИКА И ФАКТОРЫ РЕГУЛЯЦИИ ИНТЕНСИВНОСТИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ ПРИ СУПРАВЕЗИКАЛЬНОМ БЛОКЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Донецкий медицинский институт им. М. Горького

Ранее была показана роль активации перекисного окисления липидов (ПОЛ) в повреждении мембранных структур почки при непроходимости мочеточников [1]. Привлекло внимание колебание

интенсивности свободнорадикальных процессов в заблокированной почке в зависимости от длительности окклюзии. Причины, лежащие в основе этого явления, установлены не были. Задачами настоящего исследования были характеристика свободнорадикального окисления липидов при суправезикальном блоке и выяснение основных факторов, влияющих на интенсивность ПОЛ в разные сроки окклюзии.

Методика. Объектом экспериментов служили 40 белых беспородных крыс массой 200—250 г, содержащихся на стандартной лабораторной диете. В экспериментальной группе после выполнения срединной лапаротомии осуществляли лигирование левого мочеточника. Сроки окклюзии составили 12, 24 и 72 ч (по 10 крыс на срок наблюдения). Контролем служили ложнопереоперированные животные. Все хирургические вмешательства, включая забор почек и крови, проводили в условиях внутривенного наркоза.

Изучали индуцированную ионами двухвалентного железа хемилюминесценцию (ХЛ) плазмы крови, гомогенатов корковой и мозговой вещества почки. Исследования проводили на хемилюминометре ХЛМЦ-01. В кювету хемилюминометра вносили 0,25 мл цельной плазмы или 0,25 мл гомогената ткани. Плазму отбирали после центрифугирования гепаринизированной крови при 1500 об/мин в течение 10 мин. Гомогенат готовили из расчета 200 мг влажной ткани на 1 мл фосфатного буфера рН 7,5. В кювету к исходной пробе приливали 5 мл фосфатного буфера, помещали ее в установку для регистрации сверхслабого свечения, после чего открывали светозатвор и вводили в кювету 0,25 мл 0,4 М раствора двухвалентного железа. С помощью счетчика фотонов и самоиницирующего устройства регистрировали ХЛ. Критериями оценки хемилюминограмм служили продолжительность латентного периода (ЛП; в секундах), тангенс угла подъема кривой медленной вспышки (tg α), амплитуда медленной вспышки (АМВ; в импульсах в 1 с), светосумма медленной вспышки (СМВ) за 15 мин регистрации свечения (в импульсах). Используя систему, содержащую желточные липопротеиды, параллельно оценивали антиокислительную активность плазмы [6]. Методом водородного клиренса [4] определяли локальный почечный кровоток в корковой и мозговой зонах почки. Расчет производили в миллилитрах в 1 мин на 1 г ткани. Содержание молекул средней массы (МСМ) в циркулирующей крови определяли методом [3] и выражали в относительных единицах оптической плотности. Для световой и электронной микроскопии использовали участки мозгового и коркового вещества окклюзированной почки. Проводку материала осуществляли общепринятыми методами. Результаты экспериментов подвергали статистической обработке по Стьюденту.

Результаты и обсуждение. Исследования ХЛ свидетельствуют о повышенном уровне

Таблица 1

Показатели хемилюминограмм плазмы крови и гомогенатов почки крыс с односторонней окклюзией мочеточника

Показатель	Ложнопереоперированные животные	Окклюзия мочеточника, ч		
		12	24	72
<i>Плазма крови</i>				
ЛП, с	251,25±44,21	175,00±33,07	142,40±41,78	172,50±38,61
tg α	0,696±0,099	0,962±0,081	1,048±0,075*	0,773±0,039
АМВ, имп/с	107,0±5,38	168,33±19,05*	252,00±17,15*	157,00±10,9*
СМВ, имп×1000	36,525±4,186	76,700±8,852*	98,285±6,945*	58,20±8,277*
<i>Корковая зона</i>				
ЛП, с	468,75±56,25	496,87±98,47	312,50±20,92*	356,25±40,79
tg α	0,721±0,029	5,430±0,961*	4,462±0,397*	1,229±0,201*
АМВ, имп/с	135,0±5,0	857,50±70,52*	1140,8±106,3*	476,67±66,4*
СМВ, имп×1000	60,375±7,125	433,12±82,18*	542,35±87,45*	266,58±61,6*
<i>Мозговая зона</i>				
ЛП, с	412,50±112,5	412,50±96,50	275,00±83,07	380,00±60,50
tg α	0,538±0,088	1,613±0,841	1,109±0,272	0,316±0,072
АМВ, имп/с	145,00±15,00	455,51±48,15*	353,33±40,64*	122,00±15,00
СМВ, имп×1000	51,937±4,312	141,90±22,34*	125,20±19,34*	41,25±5,414

Примечание. Здесь и в табл. 2 звездочка — достоверные отличия между средними величинами (p<0,05).

Таблица 2

Динамика изменений локального почечного кровотока, антиокислительной активности плазмы и содержания МСМ в крови крыс с односторонней окклюзией мочеточника

Показатель	Ложно-оперированные животные	Окклюзия мочеточника, ч		
		12	24	72
Локальный корковый кровоток, мл/мин/г	2,68±0,16	1,36±0,12*	1,02±0,09*	0,68±0,06*
Локальный мозговой кровоток, мл/мин/г	0,76±0,04	1,00±0,04*	0,45±0,04*	0,35±0,03*
Антиокислительная активность плазмы, %	70,05±2,39	42,82±8,58*	43,07±7,06*	59,34±6,87
Содержание МСМ, ед. опт. шт.	0,304±0,007	0,367±0,021*	0,557±0,052*	0,758±0,08*

свободнорадикальных процессов в условиях изучаемой патологии. Наиболее информативными оказались параметры АМВ и СМВ (табл. 1). Интенсивность свечения гомогенатов и плазмы в контрольной группе различалась незначительно, что отражает фоновый уровень радикалообразования в организме. В экспериментальной группе люминесценция гомогенатов почки, особенно коркового вещества, значительно превосходит уровень ХЛ плазмы. Используя показатель СМВ, удалось отметить высокую корреляционную зависимость между люминесценцией гомогенатов коркового вещества и плазмы ($r = -0,939$; $p < 0,02$). Эти факты свидетельствуют о том, что свободнорадикальные процессы первично разворачиваются в заблокированном органе, а в последующем на этом фоне происходит снижение антиокислительных свойств плазмы периферической крови.

Интенсификация ПОЛ почки отмечена уже в первые часы обструкции мочеточника. Тенденция к росту наблюдается на протяжении 1-х суток окклюзии. По истечении 24 ч показатели хемилюминограмм достигают максимальных значений. В дальнейшем наблюдается снижение уровня перекисного окисления. Через 72 ч после начала окклюзии выявлено уменьшение АМВ. Параметры ХЛ значительно снижены по сравнению с показателями, регистрируемыми в 1-е сутки эксперимента.

Через 12 ч окклюзии зарегистрировано характерное изменение почечного кровотока (табл. 2). Оно проявляется снижением корковой гемодинамики в сочетании с повышением кровотока в мозговом веществе экспериментальной почки. Подобные сдвиги опосредованы изменением функциональной активности инкреторных почечных структур [8]. Развивающаяся корковая ишемия, как и медулярная гипероксия, становится триггером каскада реакций, ведущих к избыточному образованию активных форм кислорода [2].

К концу 1-х суток обструкции мочеточника в поддержании высокого уровня ПОЛ важное значение приобретает иной фактор. Морфологические исследования, выполненные через 18—24 ч после начала эксперимента, позволили установить, что в интерстиции и капиллярах обструктивной почки начинают накапливаться лейкоциты, среди которых преобладают клетки системы фагоцитирующих мононуклеаров. Они образуют множественные контракты с базальными мембранами сосудов, эпителием нефронов, интерстициальными клетками мозгового вещества, в которых аккумуля-

лированы значительные запасы полиненасыщенных жирных кислот. Ультраструктурный анализ установил высокую степень функциональной активности клеток-пришельцев. Известно, что активация элементов фагоцитарной системы сопровождается увеличением продукции свободнорадикальных форм кислорода [5]. Инициация цепных реакций окисления радикалами лейкоцитов в данных условиях представляется весьма вероятной.

Однако, несмотря на высокий уровень ПОЛ, уже в этот период эксперимента формируются механизмы, которые в последующем существенно лимитируют его. Прогрессируя, гипоксия закономерно снижает напряжение кислорода в ткани почки, что существенно ограничивает образование высокорективных оксирадикалов и препятствует возникновению новых цепей окисления.

Динамические светооптические и ультраструктурные наблюдения позволили зарегистрировать нарастание протеолитического повреждения эпителия нефронов как в корковой, так и в мозговой зоне экспериментальной почки. Наблюдаются десквамация клеток канальцев, гомогенизация и вакуолизация цитоплазмы, разрушение митохондриальных крист. О серьезной альтерации свидетельствует прирост концентрации МСМ в циркулирующей крови. Следует учесть, что средние молекулярные пептиды являются не только маркерами тканевого повреждения. Обоснованно высказывается предположение о наличии у МСМ выраженных антиоксидантных свойств [7]. Результаты экспериментов свидетельствуют, что через 72 ч после начала окклюзии мочеточника корковый кровоток снижен в 4 раза, а уровень МСМ в 2,5 раза превышает показатели контрольной группы. В этих условиях снижение интенсивности свободнорадикального окисления представляется вполне логичным.

Таким образом, анализ полученных результатов позволил отметить двухфазное изменение интенсивности процессов ПОЛ почки в условиях экспериментальной односторонней окклюзии мочеточника. Первоначальная активация связана с гемодинамическими сдвигами и накоплением в интерстиции почки активированных лейкоцитов. Последующее снижение уровня перекисного окисления обусловлено, на наш взгляд, двумя причинами: угнетением образования активных форм кислорода ввиду снижения его напряжения в ткани и ростом содержания МСМ на фоне протеолитического повреждения органа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барабидзе Э. В. // Всесоюзная конф. по физиологии почек и водно-солевого обмена. 8-я. — Харьков, 1989. — С. 22—23.
2. Биленко М. В., Тельпухов В. И., Чуракова Т. Д. и др. // Бюл. экспер. биол. — 1988. — № 4. — М. 394—397.
3. Габриэлян Н. И., Липатова В. И. // Лаб. дело. — 1984. — № 3. — С. 138—140.
4. Ганин Ю. Я., Сучков В. В., Креер А. Х., Келер М. // Физиол. журн. СССР. — 1984. — Т. 70, № 1. — С. 48/53.
5. Земсков В. М., Барсуков А. А., Безносенко С. А. и др. // Иммунология. — 1985. — № 5. — С. 44—48.
6. Клебанов Г. И., Бабенкова И. В., Теселкин Ю. О. и др. // Лаб. дело. — 1988. — № 5. — С. 59—62.
7. Гупикова З. А. // Вопр. мед. химии. — 1983. — № 3. — С. 108—111.
8. Wilson D. R. // Kidney int. — 1981. — Vol. 18, N 3. — P. 281—292.

Поступила 17.07.91

E. F. Barinov, E. V. Barabadze, Yu. I. Zhdanyuka

M. Gorky Medical Institute, Donetsk

Two phase alterations of induced chemoluminescence were detected in kidney homogenates and blood plasma after unilateral ureteral occlusion in rats. A high correlation was observed between the rates of free radical oxidation in the blocked kidney tissue and blood plasma. Hemodynamic alterations in the kidney, accumulation of activated phagocytes in the interstitial space and elevation of medium-weight molecules were mainly responsible for the regulation of lipid peroxidation rates.

© А. Д. ТАГАНОВИЧ, 1992

УДК 612.112.95.015.06:612.212.014.1.014.462.8

А. Д. Таганович

РЕГУЛЯТОРНАЯ РОЛЬ СУРФАКТАНТА ЛЕГКИХ В МЕТАБОЛИЗМЕ МАКРОФАГОВ

Минский медицинский институт

Сурфактант легких представляет собой поверхностно-активный материал липопротеидной природы, выстилающий тонким слоем поверхность легочных альвеол млекопитающих. Это вещество синтезируют альвеолоциты II типа [17], которые и экскретируют его на поверхность альвеол легких. Основной функцией сурфактанта до настоящего времени считалась способность снижать поверхностное натяжение на границе раздела воздух — легочная ткань и таким образом предотвращать спадение легочных альвеол при дыхании.

Вопрос о влиянии сурфактанта на клетки, которые с ним контактируют в легких, является новым и разработан крайне недостаточно. Было показано, что сурфактант воздействует на морфологию альвеолярных макрофагов [10], стимулирует их бактериостатическую активность [11], мигрирует и таким образом модулирует защитную функцию легких [8]. Установлено, что фосфолипиды сурфактанта в зависимости от их соотношения способны ингибировать или активировать биосинтез ДНК, РНК и белка в лимфоцитах из крови [3, 20]. На основании этого сделан вывод об иммунорегуляторном действии сурфактанта. Приведенные данные дают основание для предположения о возможном влиянии сурфактанта на метаболические процессы в макрофагах легких.

Целью работы явилось изучение влияния сурфактанта легких крыс на синтез ДНК, РНК и белка в макрофагах путем измерения кинетики включения радиоактивных предшественников. Одновременно предпринята попытка оценки влияния сурфактанта на уровень эндогенных регуляторов метаболизма макрофагов — простагландинов E и F_{2α}, цАМФ и цГМФ.

Методика. В работе использовали крыс-самцов линии Вистар. У животных под наркозом (внутримышечное введение гексенала в количестве 20 мг на 100 г массы) выделяли легкие пересечением трахей после предварительной перфузии средой 199 (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН). Поскольку *in vivo* в альвеолах легких макрофаги контактируют с сурфактантом, а источником альвеолярных макрофагов является система моноцитов крови — интерстициальные макрофаги, наибольший интерес представляла оценка влияния сурфактанта на макрофаги сразу после попадания в альвеолы. Поэтому наиболее прием-

лемой моделью было изучение влияния сурфактанта на смешанную популяцию клеток, в которой присутствовали бы интерстициальные макрофаги. С этой целью в легких проводили сочетанную процедуру лаважа средой 199 с последующим измельчением пожницами легочной ткани, освобожденной от крупных бронхов и сосудов. Объединенную клеточную суспензию при 2 °С фильтровали через 8 слоев капроновой ткани. Фильтрат центрифугировали (300 г, 15—20 мин). Для лизирования эритроцитов осадок суспендировали в 20 мл 0,83 % раствора NH₄Cl, приготовленного на 0,01 M трис-HCl pH 7,4, и выдерживали 10 мин при 2 °С. После этого смесь центрифугировали (300 г, 6 мин). Осадок промывали дважды средой 199.

Макрофаги из суспензии свободных клеток легких в дальнейшем выделяли прилипанием в стеклянных культуральных флаконах [9]. Клетки соскребали и подсчитывали в камере Горяева. В полученной клеточной популяции макрофаги составляли 95—98 %. Жизнеспособность макрофагов оценивали с помощью окраски трипановым синим; их жизнеспособность составляла 85—90 %.

Сурфактант получали методом [2]. Для этого использовали супернатант, образовавшийся после первого центрифугирования объединенной клеточной суспензии (см. выше). Полученную сурфактантную фракцию суспендировали в изотоническом растворе NaCl. В суспензии сурфактанта определяли содержание фосфолипидного фосфора [16] и белка с использованием 0,5 % додецилсульфата натрия (DS-Na) («Serva», Германия) [6].

Синтез ДНК оценивали по количеству ³H-тимидина (Всеобщее объединение «Изотоп», включенного в ДНК макрофагов [14]. В качестве специфического предшественника в оценке синтеза РНК использовали ³H-уридин (Всеобщее объединение «Изотоп», который вводили в концентрации 5 мКи/мл в культуры макрофагов на весь период их культивирования. Для измерения синтеза белка в макрофагах использовали ¹⁴C-гидролизат белков хлореллы (UVVR, Чехо-Словакия), который добавляли в концентрации 2 мКи/мл на весь период культивирования.

Свежеизолированные макрофаги доводили средой 199 до концентрации 2—3·10⁶ клеток на 1 мл культуры. Сурфактант добавляли из расчета 0,4 мл суспензии (25—30 мкг белка, 6—8 мкг фосфолипидного фосфора) на 2 мл культуры. В качестве контроля служили пробы, к которым вместо сурфактанта добавляли соответствующий объем изотонического раствора NaCl. Клетки культивировали в течение 1, 3 и 6 ч при 37 °С. После окончания культивирования клетки обрабатывали 10 % раствором ТХУ. Нерастворимую фракцию переносили на мембранные фильтры («Millipore», Англия) и определяли их радиоактивность в сцинтилляционной жидкости (ЖС-8) на жидкостно-сцинтилляционном счетчике СБС-2).

Для контроля включения ³H-тимидина в ДНК макрофагов по окончании культивирования (6 ч) клетки лизировали в 2 % DS-Na и 2 % 2-меркаптоэтанол («Fishamed», Австрия) при 100 °С в течение 4 мин. Лизат подвергали гель-хроматографии на колонке (1,5×80 см), заполненной ToyorearI HW-60 («Toyo Soda», Япония) и уравновешенной раствором, содержащим 10 ммоль трис pH 7,2. Элюцию проводили тем же буфером со скоростью 20 мл/ч, собирая фракции по 2 мл. 0,25 мл каждой фракции переносили во флаконы с 8 мл сцинтиллятора и определяли радиоактивность на счетчике СБС-2.

При определении уровня простагландинов и циклических нуклеотидов макрофаги инкубировали с сурфактантом и без него 1, 3 и 6 ч при 37 °С. Содержание цАМФ и цГМФ в этаноловых экстрактах культур определяли радиококурентным методом с использованием наборов «Amersham» (Англия) и выражали в пикомолях на 5·10⁶ клеток. Экстракцию простагландинов из макрофагов осуществляли этилацетатом. Уровень простагландинов группы E определяли с использованием наборов «Clinical Assays» (США), а простагландина F_{2α} — «Изотоп» (Венгрия) и выражали в пикограммах на 3·10⁶ клеток. Радиоактивность проб определяли на жидкостном сцинтилляционном счетчике («Бэкман», США). Все результаты представляют среднее арифметическое определение в 5—6 параллельных культурах и обработаны общепринятыми методами вариационной статистики. Различия считались статистически достоверными при p ≤ 0,05.

Результаты и обсуждение. Обнаружен неоднозначный характер воздействия сурфактанта на синтез ДНК (рис. 1). Через 1 ч культивирования наблюдалось ингибирование включения ³H-тимидина в кислотоосаждаемый материал макрофагов. Последующее культивирование клеток

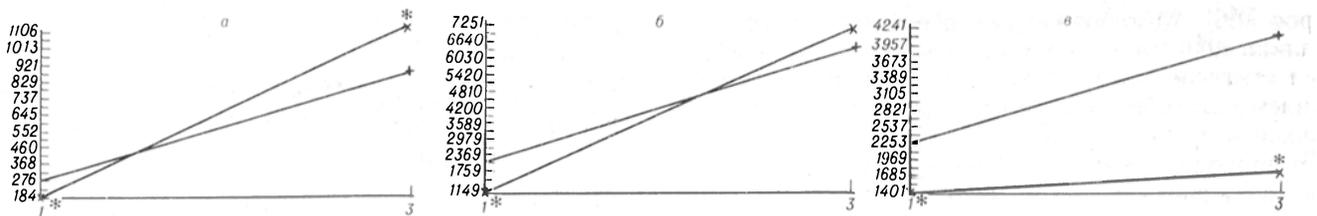


Рис. 1. Влияние сурфактанта на включение радиоактивных предшественников синтеза ДНК, РНК и белка в кислотоосаждаемый материал макрофагов легких.

Здесь и на рис. 2-4: плюс — культивирование макрофагов без сурфактанта (контроль), крестик — культивирование в присутствии сурфактанта. Здесь и на рис. 3 и 4: по осям абсцисс — длительность культивирования, ч; по осям ординат — радиоактивность ТХУ-устойчивой фракции, имп/мин. *а* — включение ^3H -тимидина; *б* — включение ^3H -уридина; *в* — включение ^{14}C -гидролизата белков; во всех опытах культивирование с сурфактантом и без него проводили одновременно с использованием одинакового количества клеток из одной и той же популяции. Здесь и на рис. 2-4 звездочка — статистически достоверная разница по сравнению с контролем.

нивелировало эффект ингибирования, однако темп прироста включения ^3H -тимидина в кислотоосаждаемую фракцию макрофагов в присутствии сурфактанта значительно опережал контрольный. Уже через 3 ч культивирования он был выше контрольного, а к концу 6-го часа превышение включения метки составляло 80 % (рис. 2).

Чтобы убедиться в том, что обнаруженная стимуляция включения ^3H -тимидина в макрофаги связана с усилением синтеза ДНК под влиянием сурфактанта, лизаты равного количества одной и той же популяции клеток спустя 6 ч культивирования с меткой были подвергнуты гель-хроматографии (см. рис. 2). Новосинтезированная ДНК выходила одним симметричным пиком в объеме выхода колонки (80 мл). Площадь пика ^3H -ДНК, полученного из лизата клеток, культивированных с сурфактантом, была гораздо больше, чем в контроле. Таким образом, было подтверждено, что сурфактант стимулирует синтез ДНК в макрофагах легких.

Аналогичные результаты были получены по влиянию сурфактанта на кинетику синтеза РНК и белков макрофагов (см. рис. 1 и 2). Активация синтеза белка под влиянием сурфактанта развивается позже, чем увеличение синтеза ДНК и РНК.

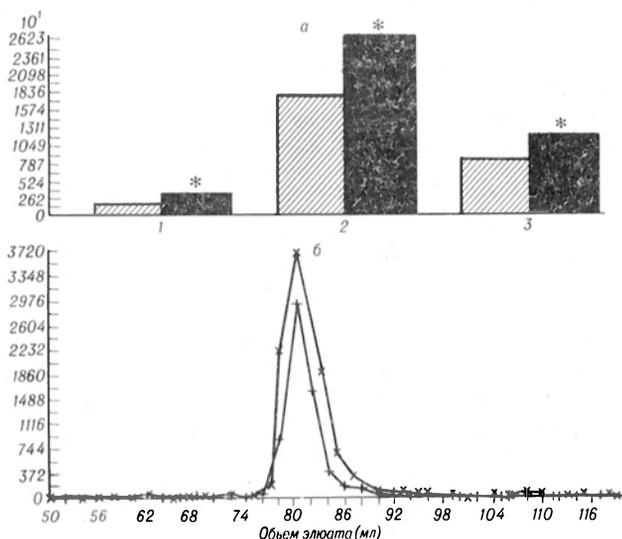


Рис. 2. Влияние сурфактанта на синтез ДНК, РНК и белка в макрофагах легких.

По осям ординат — радиоактивность, имп/мин. *а* — включение радиоактивных предшественников синтеза ДНК, РНК и белка в ТХУ-осаждаемый материал макрофагов через 6 ч культивирования клеток с сурфактантом и без него. Загнтрихованные столбики — контроль, темные столбики — сурфактант; 1 — синтез ДНК, 2 — синтез РНК, 3 — синтез белка; *б* — гель-хроматография лизатов макрофагов легких после культивирования клеток в присутствии ^3H -тимидина в течение 6 ч; по оси абсцисс на *б* — объем элюата, мл (объем выхода ДНК 80 мл, объем выхода свободной радиоактивной метки 180 мл).

Важно было ответить на вопрос, является ли увеличение синтеза белка ДНК-зависимым процессом. Поэтому на одной и той же культуре клеток мы исследовали одновременно кинетику включения ^3H -тимидина и ^{14}C -гидролизата белков в кислотоосаждаемый материал макрофагов. Во всех опытах первоначальный эффект ингибирования синтеза ДНК быстро сменялся активацией. Уже через 3 ч культивирования синтез ДНК в макрофагах, подвергнутых воздействию сурфактанта, был выше контрольного. Включение же ^{14}C -гидролизата белков только спустя 5 ч начинало опережать синтез белка в контрольных пробах. Обнаруженное явление указывает на обусловленность эффекта активации синтеза белка под влиянием сурфактанта новосинтезированной ДНК.

Синтез ДНК, РНК и белка — это многофакторные процессы, которые регулируются внутриклеточными посредниками. Циклические нуклеотиды являются ведущим эффекторным звеном, опосредующим влияние на клетку гормонов, нейромедиаторов и других биологически активных веществ. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что культивирование сурфактанта легких с макрофагами уже через 1 ч приводит к повышению уровня цАМФ (рис. 3). Иным образом изменялось содержание цГМФ (см. рис. 3). Не отличавшееся существенно от контрольного через 1 ч совместного культивирования кле-

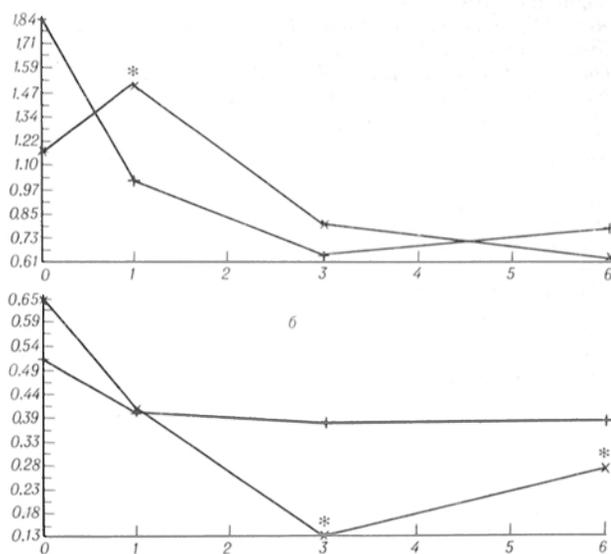


Рис. 3. Влияние сурфактанта на содержание циклических нуклеотидов в макрофагах легких.

По осям ординат — содержание, пкмоль в $5 \cdot 10^6$ клеток. *а* — цАМФ; *б* — цГМФ;

ток с сурфактантом, оно снижалось через 3 ч и в дальнейшем (через 6 ч) оставалось ниже контрольного уровня.

Механизм влияния сурфактанта на уровень циклических нуклеотидов, вероятно, опосредован изменением физико-химических характеристик мембран макрофагов. Основным компонентом сурфактанта является липидный, главное место в котором принадлежит фосфолипидам [17]. Установлен факт модификации липидного состава и жидкостных свойств мембран клеток в результате их контакта в процессе культивирования с липидами [18]. Перестройка липидов мембран приводит к изменению активности мембранно-связанных ферментов. Одним из таких ферментов является аденилатциклаза. Установлено, что для переноса сигнала с рецептора к его каталитической субъединице требуются фосфолипиды [12]. С другой стороны, повышение уровня цАМФ под влиянием сурфактанта может быть вызвано обнаруженным увеличением содержания простагландинов Е в макрофагах (рис. 4). Присутствие в культуральной среде сурфактанта приводило к увеличению уровня простагландинов группы Е в течение всего периода культивирования макрофагов. Особенно выраженной разницы по сравнению с контролем была через 6 ч. Неоднозначно изменялся уровень простагландина $F_{2\alpha}$ (см. рис. 4). В контрольных пробах он имел тенденцию к снижению в течение первых 3 ч культивирования, в дальнейшем происходил резкий подъем. В присутствии сурфактанта такого эффекта не наблюдалось.

При определении простагландинов группы Е в альвеолярных макрофагах радиоиммунным методом было показано, что простагландин E_2 составлял более 90 % и менее 10 % приходилось на простагландин E_1 [15]. Этот факт дает основание считать, что в наблюдаемом нами увеличении уровня простагландинов Е главное место принадлежит простагландину E_2 . Между тем в литературе встречаются указания на то, что простагландины E_2 увеличивают содержание цАМФ в клетках путем активации аденилатциклазы [1].

Можно предполагать двоякого рода механизм индукции сурфактантом повышенного уровня простагландинов Е в макрофагах. С одной стороны, описанная выше возможность модификации плазматической мембраны клеток способна привести к изменению активности ферментов циклоксигеназного пути превращения арахидоновой кислоты, которые являются мембранно-связанными. С другой стороны, показано, что сурфактант легкого эмбриона человека стимулирует продукцию простагландина Е в тканях [13]. Полагают, что сурфактант является важным источником арахидоната для клеток, контактирующих с ним, при синтезе простагландинов.

Поскольку наблюдаемые изменения уровня циклических нуклеотидов и простагландинов под влиянием сурфактанта происходят в тот же период, что и обнаруженные изменения в кинетике синтеза ДНК, РНК и белка в макрофагах легких, правомерным будет считать ДНК-индуцированную активацию синтеза белка в поздний период культивирования цАМФ/цГМФ простагландинзависимым процессом. Принадлежит ли изменениям простагландинов и циклических нук-

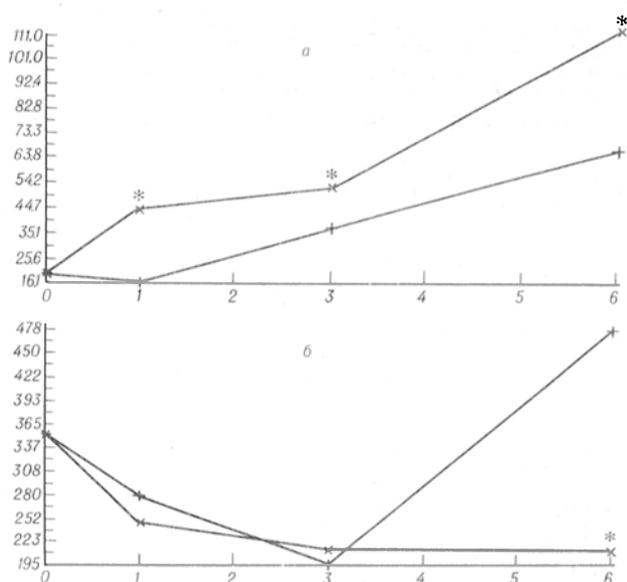


Рис. 4. Влияние сурфактанта на уровень простагландинов Е и $F_{2\alpha}$ в макрофагах легких.

По оси ординат — содержание, нкг в $3 \cdot 10^6$ клеток. а — простагландины Е; б — простагландин $F_{2\alpha}$.

леотидов определяющая роль в этом явлении, пока сказать трудно. Это связано с тем, что относительно роли циклических нуклеотидов и простагландинов в пролиферации клеток имеются две гипотезы. Согласно одной гипотезе, повышение их уровня стимулирует клеточную пролиферацию и обеспечивает ее обменные процессы. Согласно другой, они препятствуют синтезу ДНК и РНК в клетках, стимулируемых митогенами [1, 4, 5, 7]. Компромиссным вариантом можно назвать представление о том, что циклические нуклеотиды находятся в различных компартментах клетки; в одних компартментах они оказывают стимулирующее влияние, в других — ингибирующее [19].

Таким образом, проведенное исследование показало, что сурфактант может регулировать метаболизм макрофагов легких. Он изменяет в них уровень циклических нуклеотидов и простагландинов, увеличивает синтез ДНК, РНК и белка, что свидетельствует о метаболической активации этих клеток. Реализацией такого явления могут быть изменения различных функций альвеолярных макрофагов. Исследование влияния сурфактанта на внутриклеточные процессы в макрофагах *in vitro* следует проводить в кинетике, в противном случае можно наблюдать ингибирование, активацию или отсутствие эффекта в зависимости от избранного периода культивирования. Регуляторную функцию сурфактанта следует учитывать при изучении патогенеза заболеваний легких, особенно тех, при которых происходит изменение состава, количества сурфактанта, метаболизма макрофагов. Полученные данные открывают перспективу дальнейших исследований прямого и опосредованного влияния сурфактанта на обменные и функциональные процессы в клетках.

ЛИТЕРАТУРА

1. Нескоромный А. Г., Горюхина О. А., Васильев В. Ю. // Биохимия. — 1987. — Т. 52, № 5. — С. 484—492.
2. Abrams M. J. // J. appl. Physiol. — 1966. — Vol. 21. — P. 718—720.

3. Ansfield M. J., Benson B. J. // J. Immunol.— 1980.— Vol. 125, N 3.— P. 1093—1098.
4. Antoni F. // Orvostudomány.— 1977.— Vol. 28, N 3—4.— P. 427—467.
5. Danilowicz N., Eling T. // Molec. Pharmacol.— 1988.— Vol. 33, N 6.— P. 650—656.
6. Dulley J., Grieve P. // Analyt. Biochem.— 1975.— Vol. 64, N 1.— P. 136—141.
7. Fantone J. C., Ward P. A. // Amer. Rev. resp. Dis.— 1984.— Vol. 130, N 3.— P. 484—491.
8. Hoffman R. M., Claypool W., Katyal S. L. et al. // Ibid.— 1987.— Vol. 135, N 6.— P. 1358—1362.
9. Holt P. G. // J. Immunol. Meth.— 1979.— Vol. 27, N 2.— P. 189—198.
10. Horio S., Ando M., Ukeshima A., Sugimoto M. // J. Reticuloendoth. Soc.— 1981.— Vol. 29, N 2.— P. 137—152.
11. La Force F. M., Kelley W. J., Huber G. L. // Amer. Rev. resp. Dis.— 1973.— Vol. 108.— P. 784—790.
12. Lenaz G. // Subcellular Biochemistry.— London, 1979.— Vol. 6.— P. 233—343.
13. Lopez Bernal A., Newman G. E., Phizackerley P. J. R. et al. // Eicosanoids.— 1989.— Vol. 2, N 1.— P. 29—32.
14. Mills T. A. // J. Immunol.— 1966.— Vol. 97, N 2.— P. 239—247.
15. Monick M., Glazier J., Hunninghake G. W. // Amer. Rev. resp. Dis.— 1987.— Vol. 135, N 1.— P. 72—77.
16. Morrison W. R. // Analyt. Biochem.— 1964.— Vol. 7, N 2.— P. 218—224.
17. Rooney S. A. // Amer. Rev. resp. Dis.— 1985.— Vol. 131, N 3.— P. 439—460.
18. Tamura A., Morita K., Fuji T. // J. Biochem. (Tokyo).— 1982.— Vol. 91, N 1.— P. 73—78.
19. Wedner H. J. // Surv. Immunol. Res.— 1984.— Vol. 3, N 4.— P. 295—303.
20. Wilsher M. L., Hughes D. A., Haslam P. L. // Clin. exp. Immunol.— 1988.— Vol. 73, N 1.— P. 117—122.

Поступила 10.10.91

REGULATORY FUNCTION OF THE LUNG SURFACTANT IN MACROPHAGAL METABOLISM

A. D. Taganovich

Medical Institute, Minsk

The surfactant was isolated from rat lung tissue and its effect on biosynthesis of DNA, RNA and protein as well as content of cyclic nucleotides and prostaglandins was studied in macrophages. When the surfactant was incubated simultaneously with lung macrophages within 6 hrs, an initial inhibition and subsequent activation of DNA, RNA and protein synthesis were observed. Stimulation of protein synthesis was found to follow the increase in the biosynthesis of DNA and RNA. At the same time, the surfactant induced elevation of cAMP in the macrophages within 1 hr of cultivation, while content of cGMP was decreased within 3 and 6 hrs. Content of prostaglandins E was increased in the cells and concentration of prostaglandin F_{2α} was decreased within 6 hrs. The findings suggest that the surfactant-mediated increase of DNA-induced protein synthesis was cAMP-, cGMP- and prostaglandin-dependent.

© Г. Ю. МАЛЫЦЕВ, А. В. ВАСИЛЬЕВ, 1992

УДК 616.153.962.3-02:612.391]-092.9-07

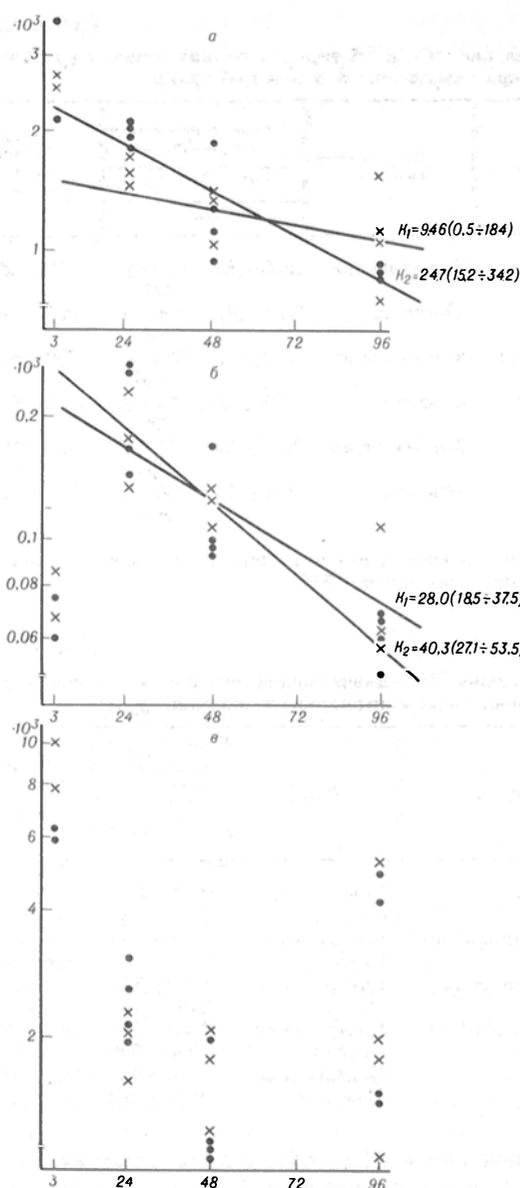
Г. Ю. Мальцев, А. В. Васильев

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕГРАДАЦИИ ЭНДО- И ЭКЗОГЕННОГО АЛЬБУМИНА У НОРМАЛЬНЫХ И ГОЛОДНЫХ КРЫС

Институт питания РАМН, Москва

В настоящее время установлено, что поддержание постоянного уровня белков в организме определяется не только интенсивностью его синтеза, но и скоростью распада, однако катаболизм белка в клетках изучен в значительно меньшей степени, чем его синтез [4, 8, 12].

Общепринято, что деградация циркулирующих



Кинетика деградации эндогенного (³H-) и экзогенного (¹⁴C-) альбумина у нормальных (крестики) и голодавших (точки) крыс.

а — эндогенный альбумин крови, б — экзогенный альбумин крови, в — альбумин тонкой кишки. По осям абсцисс — время исследования, ч; по осям ординат — радиоактивность ³H (а), ¹⁴C (б), ³H (в), дрт/мг белка. К — константа скорости деградации, %/сут; в скобках — 95 % доверительный интервал.

белков, как и внутриклеточных, является реакцией первого порядка [5]. Из этого следует, что изменение содержания белка в кровеносном русле, обусловленное физиологическим состоянием организма, определяется константой скорости деградации. Скорость деградации белков плазмы может быть определена, независимо от их синтеза, путем внутривенного введения исследуемого радиоактивно меченного белка с последующим изучением параметров его обновления и деградации. В этом случае целесообразно оценивать функциональное состояние клеточных систем, обеспечивающих тотальный протеолиз белка.

Среди белков плазмы как по содержанию, так и по функциональной значимости можно выделить альбумин, регуляция уровня которого, помимо процессов синтеза [7], обеспечивается и интенсивностью распада его нативных и модифици-

Таблица 1

Распределение ^{14}C - и ^3H -радиоизотопной метки в различных органах крыс контрольной и опытной групп

Органы	Группа животных	Исходная радиоактивность, дпм/мг		$T_{1/2}$ ^{14}C -радиоактивности, сутки*
		^{14}C	^3H	
		$\bar{x} \pm m$		
Печень	Контрольная	23,5±2,8	1160±108	12—28
	Опытная	34,6±4,6	2595±191	5,5—19
Стенка кишечника	Контрольная	55,1±5,7	3139±388	5,0—14,0
	Опытная	76,9±3,5	4609±109	2,2—3,1
Почки	Контрольная	25,1±8,8	1442±395	6,7—24
	Опытная	49,6±7,0	2861±387	2,2—4,8

Примечание. Здесь и в табл. 2: звездочка — доверительный интервал при $\alpha=5\%$.

Таблица 2

Распределение ^3H -радиоизотопной метки в субклеточных фракциях печени крыс контрольной и опытной групп

Фракция	Группа животных	Исходная радиоактивность, дпм/мг белка ($\bar{x} \pm m$)	$T_{1/2}$ ^3H -радиоактивности, сутки*
Ядерная	Контрольная	1076±198	>6,6
	Опытная	2587±132	3,1—4,1
Митохондриальная	Контрольная	758±154	3,5—8,2
	Опытная	1845±197	2,8—6,0
Лизосомальная	Контрольная	1292±198	>11
	Опытная	2491±162	4,1—7,3
Микросомальная	Контрольная	1062±249	4,3—14,0
	Опытная	1895±500	—
Цитозоль	Контрольная	2010±49	7,5—9,8
	Опытная	3647±162	2,5—3,1

рованных форм [10]. Поскольку альбумин является основным резервным белком и его концентрация зависит от белковой обеспеченности организма, представляло интерес исследовать особенности деградации эндогенного альбумина и аутологичного экзогенного альбумина в совокупности с оценкой активности протеолитической системы лизосом гепатоцитов при кратковременном голодании экспериментальных животных.

Методика. Крысы-самцы Вистар массой 280—300 г были разделены на две группы по 12 животных в каждой. Животные контрольной группы находились на стандартном рационе, крысы опытной — 48 ч в условиях полного голодания, но получали в течение этого времени воду ad libitum и комплекс витаминов [6]. Спустя 48 ч их переводили на рацион контрольной группы.

Для оценки скорости деградации экзогенного альбумина животным вводили в бедренную вену 1 мг аутологичного ^{14}C -альбумина в 0,9 % NaCl. Для получения ^{14}C -альбумина крысам внутривенно вводили ^{14}C -лейцин в суммарной дозе 0,7 мКи на 100 г массы тела, из собранной плазмы выделяли ^{14}C -альбумин путем солевого фракционирования и хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе с последующей лиофилизацией [11]. Удельная радиоактивность полученного ^{14}C -альбумина составляла 66 нКи/мл. Для оценки скорости деградации эндогенного альбумина одновременно внутривенно вводили 2,3- ^3H -L-лейцин в дозе 40 мКи на животное. Через 3, 24, 48 и 96 ч после введения меченого альбумина и ^3H -лейцина животных декапитировали. Навески печени, почек, селезенки и слизистой тонкой кишки гомогенизировали в 10 % ТХУ, центрифугировали, осадки промывали 5 % ТХУ, дважды — диэтиловым эфиром и растворяли в 0,1 н. NaOH. В полученном материале определяли содержание белка по Лоури и проводили подсчет радиоактивности по программе двойной метки на сцинтилляционном счетчике «Rackbeta-1215» с коррекцией на гашение. Альбумин плазмы выделяли аффинной хроматографией на сепарозе С14В, сшитой с цибахроновым голубым F3GA [11]. Скорость деградации рассчитывали на основе регрессионного анализа кривых выведения и выражали в виде константы деградации (Kd) [13].

В субклеточных фракциях печени, выделенных путем дифференциального центрифугирования, помимо подсчета ^{14}C - и ^3H -радиоактивности определяли активность 4 лизосомальных протеиназ — катепсинов А (КФ 3.4.12.1), В (КФ 3.4.22.1), С (КФ 3.4.14.1) и D (КФ 3.4.23.5), используя в качестве субстратов соответственно N-KB3-глу-тир, бензонил-арг-β-нафтиламид и гемоглобин с помощью спектрофлуориметрических и спектрофотометрических методов [11].

Результаты и обсуждение. Как показали результаты исследования кинетики деградации экзо- и эндогенного альбумина, Kd экзогенного альбумина была в 3 раза достоверно выше, чем Kd эндогенного альбумина. Кратковременное голодание приводило к существенному увеличению скорости деградации альбуминов обоих типов — соответственно в 1,4 и 2,6 раза (см. рисунок). Поскольку скорость деградации и время полувыведения ($T_{1/2}$) экзо- и эндогенного альбумина различаются и составляют соответственно 2,5 и 7,3 сут, встает вопрос о причинах данного явления. В связи с этим представляют интерес характер распределения и динамика включения метки в различных тканях. Анализ полученных результатов свидетельствует, что у голодавших животных уровень исходной ^{14}C - и ^3H -радиоактивности в белках печени, почках и стенке кишечника был выше на 47—98 и 47—124 % соответственно, при этом свободной (ТХУ-растворимой) ^{14}C -радиоактивности не обнаруживалось. Динамика выведения ^{14}C -метки позволяет сделать заключение об уменьшении условного периода полужизни экзогенного альбумина. Иными словами, создается впечатление, что кратковременное голодание приводит к интенсивному поглощению и деградации ^{14}C -экзогенного альбумина в стенке кишечника, печени и почках (табл. 1).

Присутствие ^3H -альбумина с высокой начальной радиоактивностью выявлено в содержимом тонкой

Таблица 3

Активность протеиназ (в мкмоль/мин/г белка) в лизосомах печени крыс контрольной и опытной групп ($\bar{x} \pm m$)

Период эксперимента, ч	Катепсин А		Катепсин В		Катепсин С		Катепсин D	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
3	54,1±2,11	57,1±3,12	5,31±0,12	5,04±0,14	24,1±1,36	26,2±1,09	14,2±0,52	12,9±0,43
24	50,1±2,67	74,2±4,10*	4,98±0,14	5,71±0,26	20,7±0,98	28,7±1,73	13,4±0,48	13,9±0,70
48	61,8±4,09	112,1±6,81*	5,78±0,22	6,32±0,29*	23,8±1,50	34,3±1,93*	14,9±0,67	18,6±0,74*
96	57,0±3,15	64,5±4,07*	5,47±0,36	6,03±0,31	22,0±1,12	23,2±1,68	13,7±0,61	11,9±0,59

Примечание. Звездочка — $p < 0,05$.

кишки в количестве около 3 мг (см. рисунок, в), тогда как ^{14}C -альбумина обнаружено не было. Это может отражать особенности обмена и обратной секреции внутривенно введенных и эндогенных гомологичных белков [2].

В табл. 2 представлены данные о распределении ^3H -радиоактивности в субклеточных фракциях печени.

Как видно из табл. 2, во всех исследованных фракциях голодавших животных исходная радиоактивность была в 1,8—2,4 раза выше, $7_{1/2}$ ^3H -радиоактивности — значительно ниже. При этом наиболее высокая степень включения метки обнаруживалась во фракции растворимых белков цитозоля, что может быть обусловлено активной реконструктивной деятельностью вторичных лизосом.

Эти результаты хорошо согласуются с данными о динамике состояния протеолитической системы лизосом (табл. 3). Как видно из табл. 3, через 48 ч после начала голодания активность синергистов тотального протеолиза — катепсинов А и D — возрастала на 96 и 44 % от исходной и на 81 и 25 % от контрольной величины соответственно ($p < 0,05$) с одновременным умеренным (на 25—44 %) увеличением активности и других лизосомальных протеиназ.

Следует особо отметить, что во фракциях печени животных обеих групп в отличие от общих белков ^{14}C -радиоактивность практически не удается обнаружить. Однако ускорение удаления экзогенного альбумина у голодавших животных также, вероятно связано с усилением протеолитической активности в печени. В целом имеются различия в характере деградации эндо- и экзогенных альбуминов, что, по-видимому, связано с определенной модификацией ^{14}C -альбумина в процессе выделения. Возможно, модификация альбумина (частичная денатурация) приводит к образованию активных лигандов [9] и это способствует быстрому выведению белка из системной циркуляции и деградации в лизосомальных системах организма. При этом структурная модификация белка делает его более доступным субстратом для протеолитических ферментов [3]. Таким образом, в основе особенностей обновления эндогенного и деградации экзогенного альбумина при определенных физиологических состояниях значительная роль принадлежит протеолитической системе лизосом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильев А. В., Капелевич Т. А., Тутельян В. А. // *Вопр. мед. химии*.— 1983.— № 3.— С. 127—130.
2. Шишова-Касаточкина О. А. // *Проблемы парентерального питания*.— Рига, 1969.— С. 43—54.
3. Шпикитер В. О. // *Вопр. мед. химии*.— 1987.— № 4.— С. 2—8.
4. Ballard F. J., Nield M. K., Francis G. L. et al. // *J. cell Physiol.*— 1982.— Vol. 110.— P. 249—254.
5. Buys C. Uptake and Degradation of Circulating Proteins by the Liver.— Groningen, 1976.
6. Cuthbertson W. F. J. // *Proc. Nutr. Soc.*— 1957.— Vol. 16.— P. 70—73.
7. Ericsson L. E., Glauman H. // *Plasma Protein Secreted by the Liver*.— London; New York, 1983.— P. 55—94.
8. Hershko A., Ciechanover A. // *Ann. Rev. Biochem.*— 1982.— Vol. 51.— P. 335—364.
9. Horiuchi S., Takata K., Murakami M., Morino Y. // *J. Protein Chem.*— 1987.— Vol. 6, N 3.— P. 191—205.

10. Khan M. Y., Agarwal S. K., Hangloo S. // *J. Biochem. (Tokyo)*.— 1987.— Vol. 102, N 5.— P. 1375—1384.
11. Travis J., Bowen J., Tewksbury D., Johnson D., Pannell R. // *Biochem. J.*— 1976.— Vol. 157.— P. 301—307.
12. Wheatley D. N. // *J. theor. Biol.*— 1982.— Vol. 98.— P. 283—300.
13. Zak R., Martin A. F., Blough R. // *Physiol. Rev.*— 1979.— Vol. 59, N 2.— P. 131—146.

Поступила 18.03.92

DEGRADATION OF ENDOGENOUS AND EXOGENOUS ALBUMINS IN RATS UNDER NORMAL CONDITIONS AND IN STARVATION.

G. Yu. Maltsev, A. V. Vasilev

Institute of Nutrition, Academy of Medical Sciences of the Russian Federation, Moscow.

A rate of degradation of homologous exogenous ^{14}C -albumin proved to be higher 3-fold as compared with that of endogenous ^{14}C -albumin, while the albuminolysis rate was additionally increased in starvation. Evaluation of ^{14}C - and ^3H -labels demonstrated that the protein hydrolysis occurred mainly in liver tissue, kidney and intestinal membrane and its rate was elevated in starvation. Dissimilar secretion of exo- and endogenous albumins into small intestine lumen was detected. Removal of albumins was found to depend on augmentation in the proteolytic potential and on reconstructive activity of secondary lysosomes.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1992

УДК 615.273.53:547.995.121.015.4

Н. Н. Дрозд, Г. В. Башков, В. А. Макаров, А. Б. Хейломский, И. Н. Горбачева

МЕХАНИЗМЫ АНТИКОАГУЛЯНТНОГО ДЕЙСТВИЯ СЕРНОКИСЛОГО ЭФИРА ХИТОЗАНА

Гематологический научный центр Минздрава России, Москва, Институт биоорганической химии и нефтехимии АН Украины, Киев, Московский текстильный институт им. А. Н. Косыгина

С момента открытия антикоагулянтной активности у гепарина последний широко применяется для профилактики и лечения тромбозов. Однако использование этого антикоагулянта сопровождается рядом побочных эффектов: тромбоцитопенией, геморрагиями, рикошетными тромбозами и др. В связи с этим среди сульфатированных полисахаридов продолжается поиск новых антикоагулянтов, лишенных данных побочных эффектов. В последние годы выделены и апробируются в клинике различные природные и полусинтетические антикоагулянты из группы гепарина и гепариноидов: низкомолекулярные гепарины, полисульфат пентозана, ORI 10172 (смесь гликозаминогликанов из дыхательного тракта крупного рогатого скота) и др. [6, 8, 9].

Сходство химического строения молекул хитина и гепарина, а также отдельные работы, в которых был показан антикоагулянтный эффект хитина [4], послужили основанием для поиска новых антикоагулянтов среди производных деацетилированного хитина — хитозана.

Целью настоящей работы является обнаружение антикоагулянтного эффекта у сернокислового эфира хитозана (СХ) и исследование механизмов его действия на гемостаз.

Методика. В экспериментах использован СХ (Московский текстильный институт им. А. Н. Косыгина). Мол. м. СХ, определенная методом гель-фильтрации на ко-

Влияние СХ на фибриногенсвертывающую активность тромбина

Концентрация СХ, ЕД/мл	Активность тромбина, НН ед/мл
0	7,2±0,5
0,03	6,8±0,8
0,06	5,7±0,4
0,12	4,5±0,2
0,24	3,2±0,2

лонке с Тойо-Перл НВ-55 («Тоуо Сода», Япония), составляла приблизительно 52 кДа, мол. м., рассчитанная на основании характеристической вязкости, — приблизительно 70 кДа. Содержание серы в препарате составляло 13,5–14,0%, степень замещения по SO_3Na — 1,22—1,30.

Антикоагулянтную активность СХ определяли методом активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) [2]. К 0,1 мл плазмы крови человека добавляли 0,01 мл раствора СХ в различных концентрациях и 0,1 мл смеси каолина с кефалином. Через 5 мин инкубации при 37 °С в пробы вносили 0,1 мл 0,025 М CaCl_2 . Влияние СХ на протромбиновое время плазмы крови оценивали, смешивая 0,1 мл плазмы с 0,02 мл раствора СХ в различных концентрациях. Пробы инкубировали 2 мин при 37 °С и добавляли 0,2 мл тромбопластин-кальциевой смеси («Boehringer Mannheim», Австрия). Антикоагулянтную активность СХ выражали в единицах активности гепарина (140 USP ЕД/мг, «Sigma», США). Изменение антипротромбиновой активности плазмы под влиянием антикоагулянтов определяли путем смешивания 0,1 мл дефибрированной термоденатурацией (56 °С, 5 мин) плазмы, разведенной в объемном соотношении 1:7 буфером, с 0,02 мл раствора гепарина или СХ в различных концентрациях. Смесь инкубировали 2 мин при 37 °С и добавляли 0,2 мл бычьего тромбина активностью 120 НН ед/мл. Через 30 с инкубации отбирали 0,2 мл смеси и добавляли к 0,2 мл 0,3% раствора бычьего фибриногена. Определяли остаточную свертывающую активность тромбина в НН-единицах на 1 мл.

Влияние антикоагулянтов на ингибирующую активность активированного тромбина (АТ) по отношению к тромбину оценивали, добавляя к 0,1 мл растворов препаратов различных концентраций 0,1 мл раствора АТ ($6,6 \cdot 10^{-6}$ М). Через каждую минуту в течение 6 мин инкубации (37 °С) отбирали аликвоты по 0,1 мл, инкубировали их 30 с с 0,1 мл раствора тромбина (120 НН ед/мл) и определяли свертывающую активность фермента, смешивая 0,1 мл инкубата с 0,1 мл 0,3% раствора фибриногена. Способность СХ катализировать инактивацию тромбина кофактором II гепарина (ГК II) оценивали методом, аналогичным описанному выше. Концентрация ГК II составляла $5 \cdot 10^{-5}$ М. Определяли константы псевдопервого порядка [10, 11] ингибирования тромбина АТ и ГК II в присутствии СХ и гепарина. АТ и ГК II выделяли из плазмы крови быка и человека ранее описанными методами аффинной хроматографии [1, 3]. АТ и ГК II были гомогенны при электрофорезе в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия и имели мол. массы примерно 65 и 72 кДа.

Влияние СХ на каталитическую активность тромбина по отношению к фибриногену определяли, смешивая 0,1 мл СХ (0,03–0,24 ЕД/мл) в 0,15 М NaCl с 0,1 мл тромбина (8,5 НН ед/мл) в 0,1 М натрий-фосфатном буфере pH 7,4. Через 3 мин инкубации при 22 °С определяли свертывающую активность тромбина путем добавления к 0,1 мл аликвоты из инкубационной смеси 0,1 мл 0,3% раствора фибриногена. Действие СХ на амидазную активность тромбина по отношению к высокоспецифичному синтетическому субстрату фермента — п-нитроанилиду N^{ϵ} -Тоз-Гли-Про-Прг (Институт биоорганической химии и нефтехимии АН УССР) исследовали спектрофотометрическим методом, добавляя к 0,1 мл буфера 0,01 мл СХ (0,03–0,24 ЕД/мл) и 0,01 мл раствора тромбина. Через 3 мин инкубации при 37 °С в кювету вносили 0,01 мл раствора субстрата (10^{-2} М) в бидистиллированной воде. Регистрировали изменение оптической плотности при длине волны 405 нм. Во всех случаях, кроме оговоренных особо, для приготовления растворов препаратов использовали 0,05 М трис- HCl -буфер pH 7,4, содержащий 0,15 М NaCl .

Результаты и обсуждение. При определении антикоагулянтной активности СХ по из-

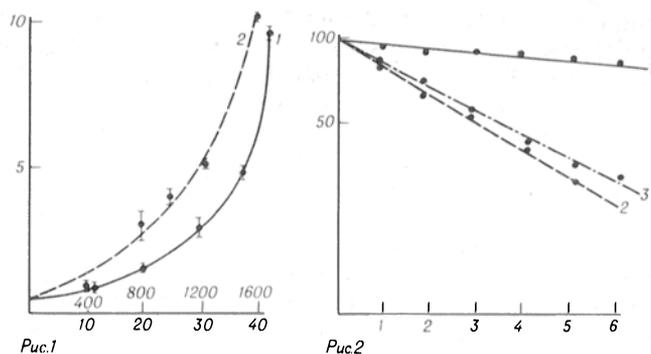


Рис. 1. Изменение протромбинового времени плазмы крови человека под влиянием СХ и гепарина.

По оси абсцисс — концентрация препаратов (над осью — СХ), ЕД/мл; по оси ординат — время свертывания, мин. 1 — СХ, 2 — гепарин.

Рис. 2. Влияние СХ и гепарина на антипротромбиновую активность плазмы крови.

По оси абсцисс — время инкубации препаратов с плазмой крови (см. раздел «Методика»); по оси ординат — активность тромбина, % по отношению к исходной. 1 — без добавления препаратов; 2 — гепарин (0,08 ЕД/мл); 3 — СХ (0,20 ЕД/мл).

менению АЧТВ обнаружено дозозависимое удлинение времени свертывания плазмы, что свидетельствует о торможении активности факторов внутреннего пути свертывания под его влиянием. Установлено, что в системе АЧТВ антикоагулянтная активность СХ составляет около 20 ЕД/мг. Исследование влияния СХ на активность компонентов внешнего пути свертывания крови по изменению протромбинового времени показало, что препарат также дозозависимо увеличивал время свертывания плазмы. При этом ингибирующая активность СХ была примерно в 60 раз меньше, чем у гепарина в соответствующей концентрации (рис. 1) и составляла примерно 2 ЕД/мг. Таким образом, СХ преимущественно тормозил свертывание крови по внутреннему пути, мало влияя на активность компонентов внешнего пути. Аналогичные, однако более выраженные действия оказывал гепарин, что обусловлено незначительной его способностью катализировать инактивацию плазменным АТ комплекса фактора свертывания крови VIIa с тканевым тромбопластином [5].

Известно, что антикоагулянтное действие гепарина связано с его способностью катализировать инактивацию ферментов системы гемостаза белковыми ингибиторами плазмы. Исходя из определенного сходства структуры и действий, оказываемых гепарином и СХ при активации свертывания крови по внутреннему и внешнему путям, исследовали влияние последнего на антипротромбиновую активность плазмы крови. Показано (рис. 2), что СХ (0,2 ЕД/мл) катализировал инактивацию тромбина плазменными ингибиторами с константой ингибирования псевдопервого порядка, равной $0,24 \text{ мин}^{-1}$. В присутствии гепарина (0,08 ЕД/мл) константа ингибирования свертывающей активности тромбина ингибиторами плазмы составляла $0,22 \text{ мин}^{-1}$. Из данных, представленных на рис. 2, видно, что для достижения одинаковой скорости инактивации тромбина плазменными ингибиторами в присутствии гепарина и СХ требовалось примерно в 2,5 раза больше последнего.

Поскольку антикоагулянтные эффекты гепари-

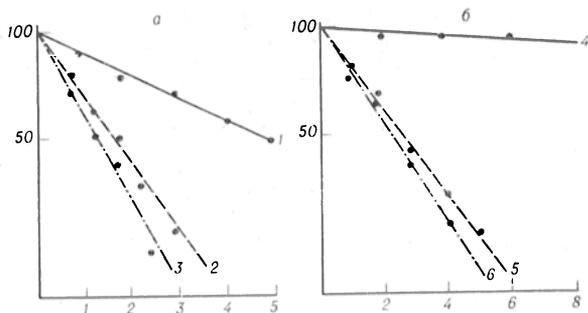


Рис. 3. Ингибирование тромбина АТ III (а) и ГК II (б) в присутствии гепарина и СХ.

По осям абсцисс — время инкубации препаратов с АТ и ГК II (см. раздел «Методика»); по осям ординат — активность тромбина, % по отношению к исходной. 1, 4 — без добавления препаратов; 2, 5 — СХ (0,032 и 2 ЕД/мл соответственно); 3, 6 — гепарин (0,013 и 2 ЕД/мл соответственно).

на реализуются посредством его взаимодействия с основными ингибиторами сериновых протеиназ системы гемостаза — АТ и ГК II, анализировали влияние СХ на ингибирующую активность АТ и ГК II по отношению к тромбину. Установлено, что СХ, подобно гепарину, ускорял инактивацию тромбина АТ и ГК II (рис. 3). Константы ингибирования псевдопервого порядка свертывающей активности тромбина АТ в присутствии гепарина (0,013 ЕД/мл) и СХ (0,032 ЕД/мл) были сопоставимы и составляли 0,43 и 0,46 мин⁻¹ соответственно. Следовательно, СХ обладал анти-IIа-активностью около 50—55 ЕД/мг. Константы ингибирования свертывающей активности тромбина ГК II в присутствии гепарина (2 ЕД/мл) и СХ (2 ЕД/мл) составляли 0,31 и 0,28 мин⁻¹ соответственно. Вероятно, способность СХ ускорять инактивацию тромбина ГК II сопоставима с таковой гепарина. Из данных, представленных на рис. 3, видно, что для достижения 50 % ингибирования свертывающей активности тромбина ГК II в присутствии СХ требовалось примерно в 100 раз больше СХ, чем для блокирования активности АТ. Следовательно, СХ, подобно гепарину, тормозил свертывание крови, преимущественно катализируя инактивацию тромбина плазменным АТ. Блокада свертывающей активности фермента ГК II возможна лишь при высоких концентрациях СХ в плазме крови. Гепарин также значительно ускоряет инактивацию тромбина ГК II лишь при его концентрации в плазме ≥ 5 ЕД/мл. Исходя из сопоставимости величин констант, описывающих скорость инактивации тромбина ГК II в присутствии одинаковых концентраций гепарина и СХ (2 ЕД/мл), можно полагать, что антикоагулянтный эффект последнего опосредуется ГК II лишь при высоком содержании СХ в крови.

В связи со способностью гепарина снижать ферментативную активность тромбина по отношению к фибриногену, взаимодействуя с катионным субцентром узнавания высокомолекулярных соединений [7], исследовали влияние СХ на фибриногенсвертывающую активность тромбина. Обнаружено, что СХ дозозависимо снижал каталитическую активность тромбина по отношению к основному субстрату — фибриногену (см. таблицу). Результаты экспериментов по влиянию СХ на амидазную активность тромбина по отношению к синтетическому *p*-нитроанилиду N⁴-Тоз-Гли-

Про-Арг также указывают на способность СХ ингибировать амидазную активность фермента (данные не приведены) в диапазоне концентраций от 0,014 до 0,480 ЕД/мл.

Полученные данные свидетельствуют о том, что СХ является антикоагулянтом, имеющим не только значительную структурную гомологию с гепарином, но и сходный механизм действия. СХ преимущественно тормозит свертывание крови по внутреннему пути, катализируя инактивацию тромбина АТ, и снижает удельную активность фермента, вероятно, путем непосредственного с ним взаимодействия. Кроме того, высокие концентрации СХ ускоряют ингибирование тромбина другим плазменным ингибитором сериновых протеиназ системы гемостаза — ГК II. Возможно, что СХ способен катализировать инактивацию ингибиторами плазмы не только тромбина, но и некоторых других гемокоагулирующих ферментов внутреннего пути свертывания. В связи с простотой получения и низкой стоимостью СХ может оказаться наряду с низкомолекулярными гепаринами и применяемыми в настоящее время гепариноидами перспективным антикоагулянтом нового поколения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Башков Г. В., Калишевская Т. М., Струкова В. М. // Биохимия.— 1989.— Т. 54, № 11.— С. 1797—1803.
2. Дегинкина Г. П., Дынкина И. М., Торик Ж. П., Шумбалова Л. Ф. // Лаб. дело.— 1984.— № 5.— С. 269—279.
3. Bashkov G., Kalichevskaya T., Makarov V. // Thrombos. Haemostas.— 1990.— Abstr. 1198.
4. Bergstrom G. // Physiol. Chem.— 1936.— Bd 28.— S. 163—168.
5. Broze I. J., Majrus P. W. // J. biol. Chem.— 1980.— Vol. 255.— P. 1242—1247.
6. Fisher A. M., Mauzac M., Tapon-Bretandiere I., Jozefowich J. // Biomaterials.— 1985.— Vol. 6.— P. 198—202.
7. Griffith M. J., Kindon H. S., Lindblad R. L. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1979.— Vol. 83.— P. 686—690.
8. Holmer E., Kurachi K., Soderstrom G. // Biochem. J.— 1981.— Vol. 193.— P. 427—433.
9. Mac Gregor P., Daroes J., Pepper D. // Thrombos. Haemostas.— 1985.— Vol. 53.— P. 411—433.
10. Machovich R., Nagy M., Gyorgyi-Edeleni J. et al. // Ibid.— 1986.— Vol. 56.— P. 398—400.
11. Pixley R., Shapira M., Colman R. // Blood.— 1985.— Vol. 66.— P. 197—203.

Поступила 07.10.90

MECHANISMS OF ANTICOAGULATIVE ACTION OF CHITOZAN SULFATE ESTER

N. N. Drozd, G. V. Bashkov, V. A. Makarov, A. B. Kheylomsky, I. N. Gorbacheva

All-Union Hematological Research Centre, Ministry of Public Health of the USSR, A. N. Kosygin Textile Institute, Moscow, Institute of Bioorganic and Petrol Chemistry, Kiev

Anticoagulation effect of chitozan sulfate ester and some mechanisms of its influence on hemostasis were studied *in vitro*. The chitozan sulfate ester catalyzed more effectively inactivation of the enzymes involved in the inner pathway of blood coagulation affecting only slightly the activity of outer pathway factors. The ester, similarly to heparin, inhibited blood coagulation mainly via accelerated thrombin inactivation by means of blood plasma antithrombin III. Inhibition of the enzyme coagulation activity using heparin cofactor II occurred only at high concentrations of chitozan sulfate ester in blood plasma. Besides, the ester decreased the thrombin catalytic activity in reactions with natural and synthetic peptide substrates. Thus, anticoagulation effect of chitozan sulfate ester is similar to that of heparin.

А. А. Сокольников, Т. Е. Шинкевич, В. М. Коленцова, О. А. Вржесинская, В. Б. Спиричев

АКТИВНОСТЬ МЕНАДИОНРЕДУКТАЗЫ И СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОХРОМОВ b_5 И Р-450 В ПЕЧЕНИ ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ОБЕСПЕЧЕННОСТИ КРЫС ВИТАМИНОМ К И ВВЕДЕНИИ ПЕЛЕНТАНА

Институт питания РАМН, Москва

Природные хиноны относятся к соединениям с окислительно-восстановительными свойствами и являются субстратами менадионредуктазы — фермента метаболизма витамина К, поддерживающего за счет окисления внутриклеточных фондов НАД·Н (НАДФ·Н) постоянную концентрацию восстановленной формы этого витамина — кофермента витамин К-зависимой карбоксилазы [20]. При дефиците витамина К в питании степень γ -карбоксилирования остатков глутаминовой кислоты в белках резко снижается. При этом активность самой карбоксилазы печени превышает активность этого фермента в норме [20], а функционирование митохондриальной менадионредуктазы не нарушается [6]. Антивитамины К — антикоагулянты кумаринового ряда, широко применяемые в медицинской практике, ингибируют 2,3-эпоксидредуктазу, блокируя рециклизацию эпоксида витамина К в нафтохинон, и тем самым лимитируют активность витамин К-зависимой карбоксилазы [20]. Это дало основание использовать введение антивитаминов К в экспериментах на животных в качестве модели дефицита витамина К [9, 10].

На изолированных митохондриях печени показано, что в присутствии хинонов (*in vitro*) могут формироваться новые пути переноса электронов (шунты) в митохондриальной дыхательной цепи [6, 8]. В опытах на перфузированном сердце получены первые обнадеживающие данные об исследовании витамина K_3 (в концентрации 10 мкМ) в качестве кардиопротектора-антигипоксанта в условиях гипоксии или ишемии средней тяжести [8], корректирующего функционирование дыхательной цепи. Считается, что препараты витамина К малотоксичны, однако передозировка водорастворимых препаратов (викасол) может вызывать гемолиз [4]. В литературе последних лет появились многочисленные сообщения о цитотоксическом действии *in vitro* высоких концентраций менадиона, в основе которого лежит окисление внутриклеточных сульфгидрильных групп, в том числе цитоскелета [13, 14, 16, 17]. В то же время данные о влиянии повышенных доз витамина К, поступающих перорально, на активность менадионредуктазы отсутствуют.

На основании вышеописанного представлялось целесообразным охарактеризовать активность растворимой менадионредуктазы в печени крыс, получавших избыток викасола, антивитамин К-пелентан, а также содержащихся на рационе, лишенном витамина К.

Помимо участия в системе γ -карбоксилирования, витамин К выполняет в организме другие функции, являясь минорным липидным компо-

нентом мембран и оказывая регулирующее влияние на состав структурных белков и фосфолипидов [2, 12, 19]. Принимая во внимание, что поступающие в организм в высоких дозах водорастворимые формы витамина К и антикоагулянты можно рассматривать как ксенобиотики, в метаболизме которых основная роль принадлежит микросомальным цитохромам Р-450, определенный интерес представляло исследовать содержание цитохромов b_5 и Р-450 в зависимости от обеспеченности животных витамином К и сопоставить эти параметры с аналогичными у животных, получавших пелентан.

Методика. В опыте использовали крыс-самцов Вистар с исходной массой тела 60 г, находившихся в течение 4 нед на полусинтетическом рационе, содержащем 20 % казеина, отмытого от жирорастворимых витаминов, 43,7 % крахмала, 20 % глюкозы, 3 % целлюлозы, 4 % солевой смеси, 9 % подсолнечного масла, 0,2 % холинхлорида, 0,1 % смеси водорастворимых витаминов (за исключением викасола), витамин А в количестве 15 000 МЕ и витамин Д₃ в количестве 20 000 МЕ на 1 кг корма [6]. Содержание кальция и фосфора в рационе составляло 0,61 и 0,51 % соответственно. Для предотвращения копрофагии крыс содержали в индивидуальных клетках с решетчатым дном. Животные были разделены на 4 группы. Животные 1-й группы (контроль) были обеспечены всеми витаминами в течение опыта. Животные 2-й группы не получали витамин К (пищевой дефицит витамина К). Животным 3-й группы в течение 3 нед перед забоем вводили рег ос пелентан в виде водной суспензии по 4 мг в день на 100 г массы тела. Животным 4-й группы (избыток витамина К) в течение 3 нед перед забоем вводили рег ос по 10 мг викасола на крысу в день. В рацион 1-й и 3-й групп добавляли викасол в количестве 0,005 %, что при потреблении в среднем 10–20 г корма обеспечивало поступление 1 мг викасола на крысу в день.

Содержание цитохрома b_5 и Р-450 в печени определяли по дифференциальному спектру между восстановленным дитионитом СО-аддуктом и восстановленным цитохромом [5].

Для получения частично очищенного препарата растворимой менадионредуктазы постмикросомальный супернатант гомогената печени подкисляли 0,1 н. НСl до pH 5,5, выпавший осадок отделяли центрифугированием при 13 000 g в течение 15 мин. Нейтрализованный 0,1 М NaOH надосадок хранили в течение 2–3 дней при 4 °С и использовали для определения менадионредуктазной активности [15] в среде объемом 3 мл следующего состава: 50 мМ трис-HCl pH 7,5, 10 мг/мл твина, 0,33 мМ NaCN, 1 мМ НАД·Н, 0,04 мМ дихлорфенолиндофенол (в качестве акцептора протона) [21]. Для расчета активности фермента использовали коэффициент молярной экстинкции дихлорфенолиндофенола 21000. Время реакции (2–3 мин) и количество белка находились в пределах, обеспечивающих линейное снижение оптической плотности при 600 нм.

Содержание общей аскорбиновой кислоты в печени определяли ранее описанным методом [11]. Концентрацию белка определяли биуретовым методом. Протромбиновое время определяли по методу Квика с использованием экстракта тромбопластина, полученного из мозга кролика [1]. Концентрацию в сыворотке крови 25-гидроксивитамина D (25-ОНD) определяли методом радиоконкурентного белко-

Таблица 1

Показатели обеспеченности крыс некоторыми витаминами

Условия эксперимента	Протромбиновое время, с (n=8)	Аскорбиновая кислота, мг на 100 г печени (n=3)	25-ОНD, нг/мл (n=5)
Контроль	19,5 ± 1,0	37,7 ± 4,2	33,2 ± 8,5
Пищевой дефицит витамина К	25,4 ± 1,0*	39,9 ± 5,9	14,3 ± 2,0*
Введение пелентана	31,2 ± 2,5*	41,3 ± 2,2	30,3 ± 3,8
Избыток витамина К	20,5 ± 1,0	37,0 ± 2,3	25,0 ± 4,3

Примечание. Здесь и в табл. 2 звездочка — достоверное различие ($p < 0,05$) от контроля.

Таблица 2

Активность менадионредуктазы и содержание цитохромов b_5 и P-450 в микросомах печени крыс при различной обеспеченности витамином К и введении пелентана

Условия эксперимента	Менадионредуктаза, нмоль/на 1 мг белка (n=5)	b_5 , нмоль/мг белка (n=3)	P=450, нмоль/мг белка (n=5)
Контроль	70±18	0,359±0,012	0,334±0,056
Пищевой дефицит витамина К	110±18*	0,394±0,005	0,237±0,031*
Введение пелентана	86±19	0,459±0,019*	0,353±0,041
Избыток витамина К	76±16	0,462±0,030*	0,368±0,056

вого связывания с использованием набора «Vitamin D₃ screening Kit» («Buhlmann Laboratories» Швейцария).

Результаты и обсуждение. В табл. 1 представлены данные, характеризующие обеспеченность крыс витаминами К, Д и С. На развитие умеренного дефицита витамина К у крыс, лишенных этого витамина (2-я группа), указывает увеличение протромбинового времени на 30 % по сравнению с контрольной группой. У животных, получавших пелентан, этот показатель увеличился на 60 %, что свидетельствует о нарушениях в системе свертывания крови, подобных наблюдаемым при алиментарном дефиците витамина К [20]. Введение 10-кратной дозы викасола не влияло на протромбиновое время.

По некоторым данным, недостаточность витамина К приводит к снижению уровня в организме витамина С [9]. Однако, как следует из полученных результатов, содержание суммарной аскорбиновой кислоты в печени животных всех групп не различалось.

Ранее в нашей лаборатории было обнаружено, что при дефиците витамина К изменяются некоторые витамин D-зависимые процессы и взаимодействие рецепторов витамина D с ДНК-целлюлозой в условиях *in vitro* [10]. В связи с этим в плазме крови была измерена концентрация 25-ОНD — параметра, отражающего обеспеченность животных витамином D. При первичном дефиците витамина К (2-я группа) наблюдалось достоверное уменьшение этого показателя приблизительно на 50 %. Введение пелентана или избытка викасола не отражалось на этом показателе.

В табл. 2 представлены результаты определения активности растворимой менадионредуктазы печени. Удельная активность этого фермента в расчете на 1 мг белка растворимой фракции, выделенной из печени животных, лишенных витамина К, была повышена приблизительно на 40 % по сравнению с животными контрольной группы. Такое изменение может быть обусловлено как абсолютным увеличением содержания или каталитической активности этого фермента, так и уменьшением количества других белков цитозоля. Наблюдаемое повышение активности менадионредуктазы, по-видимому, носит адаптационный характер, позволяя в условиях недостаточного поступления витамина К поддерживать концентрацию его восстановленной формы на достаточно высоком уровне. Как было показано ранее, дефицит витамина К не приводил к нарушению функционирования и митохондриальной

менадионредуктазы [6]. Введение пелентана или избыточной дозы викасола не влияло на активность растворимой менадионредуктазы.

Количественная оценка содержания цитохромов в микросомах печени показала, что введение избытка как викасола, так и пелентана увеличивает содержание цитохрома b_5 и не влияет на содержание цитохрома P-450 (см. табл. 2). Эти результаты согласуются с данными работы [3] об отсутствии индуцирующего действия пелентана на цитохром P-450.

Алиментарный дефицит витамина К, практически не отражаясь на содержании цитохрома b_5 , приводил к достоверному снижению содержания цитохрома P-450 на 30 %. Это означает, что даже умеренный дефицит витамина К может иметь существенные последствия для организма при контакте с ксенобиотиками. Аналогичные данные о снижении содержания в печени цитохрома P-450 при алиментарной недостаточности витамина А получены в других лабораториях [7, 18]. Снижение содержания цитохрома P-450 при пищевом дефиците витамина К отчасти может объяснить и уменьшение концентрации 25-ОНD в сыворотке крови, так как цитохром P-450 наряду с флавопротеидом является компонентом монооксигеназы, гидроксидирующей в печени витамин D [12].

Поскольку алиментарный дефицит витамина К, введение пелентана и избытка викасола не влияли на содержание в печени аскорбиновой кислоты, то это дает основание считать, что все обнаруживаемые изменения активности менадионредуктазы и содержания цитохромов не опосредованы изменениями в обеспеченности витамином С, а более прямо связаны с системой витамина К.

Таким образом, выявлено различие эффектов алиментарного дефицита витамина К и введения пелентана. Дефицит витамина К приводил к увеличению удельной активности растворимой менадионредуктазы и снижению содержания цитохрома P-450 в печени. Введение антивитамина К не сопровождалось изменением этих параметров, но приводило к увеличению содержания цитохрома b_5 , не изменяющемуся при недостаточности витамина К.

Суммируя полученные данные, можно заключить, что введение антивитаминов К, нарушающих γ -карбоксилирование белков, может вызывать состояние организма, лишь по некоторым параметрам (протромбиновое время) сходное с алиментарным дефицитом витамина К. Это означает, что введение пелентана, по-видимому, позволяет избирательно выявлять изменения, вызванные нарушением γ -карбоксилирования, но не может быть использовано в качестве модели истинного дефицита витамина К.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балуда В. П., Баркаган З. С., Гольдберг Е. Д. и др. // Лабораторные методы исследования системы гемостаза.— Томск, 1980.— С. 169—170.
2. Богданов Н. Г., Лидер В. А. // Вести. АМН СССР.— 1986.— № 12.— С. 31—37.
3. Бугина М. И., Легонькова Л. Ф. // Антивитамины в регуляции обмена веществ.— Гродно, 1983.— С. 9.
4. Витаминные препараты / Под ред. М. И. Смирнова.— М., 1989.
5. Карузина И. И., Арчаков А. И. // Современные методы в биохимии.— М., 1977.— С. 49—62.

6. Колесова Г. М., Сокольников А. А., Коденцова В. М. и др. // Вопр. мед. химии.— 1988.— № 4.— С. 46—50.
7. Ковь И. Я. // Вестн. АМН СССР.— 1986.— № 12.— С. 23—31.
8. Коркив А. А., Попова О. А., Замула С. В., Лукьянова Л. Д. // Бюл. Экспер. биол.— 1990.— № 7.— С. 60—63.
9. Пушина И. Г. // Вопр. питания.— 1982.— № 3.— С. 36—42.
10. Сергеев И. П., Спиричев В. Б. // Биохимия.— 1989.— № 10.— С. 1623—1629.
11. Соколовский В. В., Лебедева Л. В., Лизлуп Т. В. // Лаб. дело.— 1974.— № 3.— С. 160—162.
12. Спиричев В. Б., Ковь И. Я. Биологическая роль жирорастворимых витаминов.— М., 1989.
13. Dimonte D., Bellomo G., Thor H. et al. // Arch. Biochem.— 1984.— Vol. 235.— P. 342—350.
14. Dimonte D., Ross D., Bellomo G. et al. // Ibid.— P. 334—341.
15. Ernster L., Lind C., Rase B. // Europ. J. Biochem.— 1972.— Vol. 25.— P. 198—206.
16. Jewell S. A., Bellomo G., Thor H. et al. // Science.— 1982.— Vol. 217.— P. 1257—1259.
17. Mirabelli F., Salis A., Perotti M. et al. // Biochem. Pharmacol.— 1988.— Vol. 37, N 37.— P. 3423—3427.
18. Кон И. Я., Маттинчик А. Н., Матзев Г. Ю. // Nutr. Res.— 1988.— Vol. 2.— P. 178—184.
19. Konishi T., Baba S. // Chem. Pharm. Bull.— 1973.— Vol. 21.— P. 1906—1913.
20. Suttie J. W. // Handbook of Vitamins / Ed. L. J. Machlin.— New York, 1984.— P. 32.
21. Suzuki H., Nakao T., Higara K. // Toxicol. appl. Pharmacol.— 1979.— Vol. 50, N 2.— P. 261—266.

Поступила 11.03.91

ACTIVITY OF MENADIONE REDUCTASE AND CONTENT OF CYTOCHROMES b_5 AND P-450 IN RAT LIVER UNDER VARIOUS CONDITIONS OF VITAMIN K CONSUMPTION AND PELENTAN ADMINISTRATION

A. A. Sokolnikov, T. E. Shinkevich, V. M. Kodentsova, O. A. Vrzhesinskaya, V. B. Spirichev

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

Content of cytochromes b_5 and P-450 as well as activity of soluble menadione reductase were estimated in liver microsomes of rats deprived of vitamin K or maintained both on a diet containing excess of vicasol or antivitamin K — pelentan. Deficiency of vitamin K led to an increase in the specific activity of menadione reductase and in content of the cytochrome P-450. Administration of antivitamin K did not alter these parameters but caused an increase in the content of cytochrome b_5 , which was not changed in vitamin K deficiency. Dissimilar effects of alimentary deficiency in vitamin K and of pelentan administration suggest that administration of antivitamin K (although it allowed to discover alterations developed via the system of vitamin K-dependent carboxylation) could not be completely identified with alimentary vitamin K deficiency.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1992

УДК 616-008.927.2-008.641-02:615.3561-07

И. А. Алексеева, В. М. Коденцова, О. А. Вржесинская, Т. Е. Зверева, С. А. Хотимченко, В. Б. Спиричев

К ОЦЕНКЕ ОБЕСПЕЧЕННОСТИ ОРГАНИЗМА ВИТАМИНАМИ B_2 , B_6 , И РР ПО ДАННЫМ ЭКСКРЕЦИИ ВИТАМИНОВ И ИХ МЕТАБОЛИТОВ ПРИ АЛИМЕНТАРНОМ ДЕФИЦИТЕ ЖЕЛЕЗА И РИБОФЛАВИНА

Институт питания РАМН, Москва

Одним из распространенных методов оценки обеспеченности организма водорастворимыми витаминами является изучение экскреции витами-

нов или их метаболитов с мочой [3, 9]. Вместе с тем витамины являются кофакторами многих ферментов, активность которых может зависеть от обеспеченности организма другими нутриентами. Так, было обнаружено, что алиментарный дефицит витамина B_6 даже при нормальном содержании ниацина в рационе приводит к снижению экскреции с мочой 1-N-метилникотинамида (1-N-МНА), который является конечным продуктом катаболизма как самого ниацина, так и триптофана по кинурениновому пути [1]. Таким образом, параметры, используемые в качестве показателей обеспеченности организма ниацином, изменяются в данном случае вследствие дефицита витамина B_6 , а не РР.

По-видимому, еще более значительные нарушения метаболизма витамина B_6 и ниацина могут возникать при недостаточности рибофлавина (РФ), в связи с тем что в метаболизме витамина B_6 принимают участие ФМН-зависимая пиридоксаминфосфатоксидаза (КФ 1.4.3.5), катализирующая превращение пиридоксаминфосфата в пиридоксальфосфат (ПАЛФ), и ФАД-зависимая гемсодержащая альдегидоксидаза (КФ 1.2.3.1), окисляющая пиридоксаль до 4-пиридоксильной кислоты (4-ПК) [8, 9]. Активность пиридоксаминфосфатоксидазы и степень ее активации экзогенным ФМН в эритроцитах (ФМН-эффект) используется в настоящее время в качестве одного из показателей обеспеченности организма РФ [13]. Нарушение функционирования этого фермента приводит к изменению концентрации ПАЛФ в крови и тканях, т. е. к возникновению так называемого сопутствующего или вторичного дефицита витамина B_6 [12, 14].

Экскреция 1-N-МНА может также изменяться при недостаточности РФ как вследствие снижения активности ФАД-зависимой кинуренин-3-монооксигеназы (КФ 1.14.13.9), так и через изменение активности ряда ПАЛФ-зависимых ферментов (кинурениназа, КФ 3.7.1.3; кинуренинаминотрансфераза, КФ 2.6.1.7) [2, 7, 17]. Кроме того, на данном метаболическом пути функционируют железосодержащая 3-гидроксиантранилат-3,4-диоксигеназа (КФ 1.13.11.6) [4] и гемсодержащая триптофан-2,3-диоксигеназа (КФ 1.13.11.11) [7]. Активность обоих ферментов снижается при дефиците железа [4].

На основании вышесказанного можно предположить, что дефицит как РФ, так и железа, достаточно распространенный среди населения, может отразиться на величинах экскреции 4-ПК, 1-N-МНА и РФ, что приведет к неправильной оценке обеспеченности организма витаминами. В связи с этим нами было изучено влияние недостаточности железа и РФ на экскрецию с мочой РФ, 4-ПК и 1-N-МНА с целью оценки адекватности применяемых тестов для использования их в качестве показателей обеспеченности организма витаминами B_2 , B_6 и РР.

Методика. Исследования проведены на крысах-самках Вистар с исходной массой 45—50 г, находившихся на стандартном полусинтетическом рационе, содержащем 22 % казеина, 60,7 % кукурузного крахмала, 10 % подсолнечного масла, 3 % целлюлозы, 4 % солевой смеси, 0,2 % холинхлорида. Витаминная смесь (0,1 % рациона) имела следующий состав (в процентах): тиамин — 0,5, рибофлавин — 0,5, пиридоксин — 0,5, фолиевая кислота — 0,02, цианкобаламин — 0,002, никотиновая кислота — 2,0, пантотенат

Биохимическая характеристика обеспеченности организма крыс РФ и железом

День исследования	Группа животных	Гемоглобин, мг/100 мл крови, (n=4-10)	Активность глутатионредуктазы, нмоль/мл эритроцитов за 1 ч (n=6-8)	ФАД-эффект (n=6-8)	Общий РФ в эритроцитах, нг/мл (n=6-9)	Свободный РФ в плазме крови, нг/мл (n=6-9)
28-й	1-я (+Fe+B ₂)	12,9±0,3	42,0±2,7	1,12±0,02	77,5±8,4	11,6±0,7
	2-я (+Fe-B ₂)	12,6±0,5	21,4±0,4*	1,70±0,10*	56,1±13,5	7,3±1,0*
	3-я (-Fe+B ₂)	7,0±0,2***	48,3±1,8**	1,15±0,01**	108,8±8,0***	13,2±1,1**
	4-я (-Fe-B ₂)	6,7±0,6***	35,3±4,8***	1,21±0,05**	97,1±13,7	3,6±1,0***
42-й	1-я (+Fe+B ₂)	12,6±0,3	27,5±1,9	1,07±0,03	75,7±3,9	21,8±1,5
	2-я (+Fe-B ₂ , +B ₂)	13,1±0,4	27,7±3,9	1,11±0,02	84,0±2,9	20,6±0,8
	3-я (-Fe+B ₂ , +Fe)	12,1±0,8	43,3±4,6***	1,08±0,02	77,4±5,0	29,2±1,8
	4-я (-Fe-B ₂ , +Fe)	11,4±0,6	27,7±2,2**	1,39±0,04***	32,1±4,4***	8,4±0,6***
	5-я (-Fe-B ₂ , +B ₂)	5,8±0,3***	38,4±3,5*	1,05±0,08	98,8±7,8***	21,5±2,1

Примечание. Здесь и в табл. 2: одна звездочка — достоверное ($p < 0,05$) отличие от 1-й группы, две — от 2-й группы, три — от 3-й группы.

кальция — 2,8, биотин — 0,01, глюкоза — до 100. С подсолнечным маслом вносили ретинолпальмитат в количестве 15 000 МЕ/кг и витамин D₃ — 1000 МЕ/кг рациона. Витамин Е дополнительно не добавляли, так как его было достаточно в подсолнечном масле (50 мг/кг корма). Таким образом, РФ поступал с рационом в количестве 0,1 мг, а железо — 4,5 мг на крысу в сутки.

Все животные были разделены на 4 группы: 1-ю группу (+Fe+B₂) составили животные, получавшие сбалансированный по всем нутриентам рацион (контрольная группа); животные 2-й (+Fe-B₂) и 3-й (-Fe+B₂) групп находились на том же рационе, но не получали, соответственно РФ или железо [15]. Крысы 4-й группы (-Fe-B₂) были лишены как железа, так и РФ. Через 28 дней часть животных забивали, а оставшимся с 28-го по 42-й день эксперимента проводили коррекцию рациона: животным 2-й и 3-й групп добавляли в рацион недостающий нутриент в количествах, аналогичных рациону животных контрольной группы, а животные 4-й группы были разделены на 2 подгруппы, одной из которых добавляли железо, а другой — РФ в тех же дозах.

Сбор суточной мочи осуществлялся на 23, 37 и 42-е сутки эксперимента. РФ в моче и плазме крови определяли титрованием РФ-связывающим анбелком [16], 4-ПК и 1-N-МНА в моче — по методу [10, 11] с использованием внутренних стандартов, общий РФ в эритроцитах — люмифлавиновым методом [6]. В гемолизате эритроцитов определяли активность глутатионредуктазы (ГР) и ФАД-эффект [5]. Концентрацию гемоглобина в крови определяли циангемоглобиновым методом.

Результаты и обсуждение. Исключение РФ из рациона животных приводило к достоверному снижению концентрации свободного РФ в плазме крови, активности ГР эритроцитов и увеличению ФАД-эффекта при тенденции к уменьшению содержания общего РФ в эритроцитах (табл. 1). Все это указывало на развитие тканевого дефицита витамина B₂ и сопровождалось существенным снижением экскреции РФ с мочой (табл. 2). Вместе с тем дефицит РФ приводил к уменьшению экскреции 4-ПК и 1-N-МНА по сравнению с животными контрольной группы. Несколько иная картина имела место при дефиците железа. У животных этой группы развитие железodefицитной анемии сопровождалось увеличением концентрации свободного РФ в плазме крови, общего РФ в эритроцитах и активности ГР при том, что экскреция РФ, 4-ПК и 1-N-МНА с мочой была снижена, хотя и не так существенно, как у животных 2-й группы. Таким образом, по данным экскреции с мочой изученных витаминов или их метаболитов можно сделать заключение о нарушении метаболизма витаминов B₂, B₆ и РР при алиментарном дефиците железа и РФ.

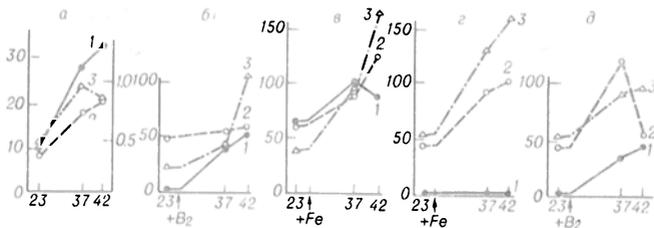
Сочетанная недостаточность РФ и железа приводила к снижению концентрации свободного РФ в плазме крови, однако концентрация общего РФ в эритроцитах была выше, чем у животных первых 2 групп. Активность ГР эритроцитов снижалась незначительно (по сравнению с контрольной группой), а ФАД-эффект в среднем указывал на умеренный дефицит витамина B₂. В то же время экскреция РФ с мочой была на уровне следовых количеств. У этой группы животных сочетанный дефицит РФ и железа оказывал неоднозначное влияние на экскрецию 4-ПК и 1-N-МНА. Так, экскреция 4-ПК у животных 4-й группы уменьшалась в среднем на 57 %, что было выше, чем при изолированном дефиците РФ или железа. Это дает основание предположить, что нарушение метаболизма пиридоксина в данном случае является результатом снижения активности ФАД-зависимой гемосодержащей альдегидоксидазы. Экскреция 4-ПК при дефиците обоих нутриентов составила лишь 43 % от уровня ее выделения у контрольной группы животных. По-видимому, это определяется не только глубиной их дефицита, но и тем, что реакция окисления ПАЛФ до 4-ПК, помимо альдегидоксидазы, может катализироваться НАД-зависимой пиридоксальдегидрогеназой. Полученные данные демонстрируют, что уменьшение экскреции с мочой 4-ПК не всегда является следствием недостаточности поступления витамина B₆ с пищей, так как в дан-

лось увеличением концентрации свободного РФ в плазме крови, общего РФ в эритроцитах и активности ГР при том, что экскреция РФ, 4-ПК и 1-N-МНА с мочой была снижена, хотя и не так существенно, как у животных 2-й группы. Таким образом, по данным экскреции с мочой изученных витаминов или их метаболитов можно сделать заключение о нарушении метаболизма витаминов B₂, B₆ и РР при алиментарном дефиците железа и РФ.

Таблица 2

Суточная экскреция с мочой РФ, 4-ПК и 1-N-МНА у животных на 23-й день от начала эксперимента

Группа животных	РФ, мкг	4-ПК, мкг	1-N-МНА, мкг
1-я (+Fe+B ₂) (n=6)	9,28±2,00	8,13±0,54	450±100
2-я (+Fe-B ₂) (n=10)	0,06±0,03*	4,02±0,85*	100±30*
3-я (-Fe+B ₂) (n=14)	5,79±1,00**	5,07±0,70*	170±30*
4-я (-Fe-B ₂) (n=18)	0,09±0,02***	3,53±0,49*	240±40**



Динамика изменения суточной экскреции РФ (1), 4-Н-ПК (2) и 1-Н-МНА (3).

По осям абсцисс — день эксперимента; по осям ординат: а — величина экскреции РФ, 4-ПК (в мкг) и 1-Н-МНА (в мг); б — д — экскреция РФ, 4-ПК и 1-Н-МНА, % от контроля; а — контроль, +Fe+B₂; б — +Fe-B₂; в — -Fe+B₂; д — -Fe-B₂. Стрелкой отмечено начало введения недостающего компонента в рацион.

ном случае причиной уменьшения экскреции этого метаболита является дефицит РФ и (или) железа.

Если сочетанная недостаточность РФ и железа снижала экскрецию 4-ПК более значимо, чем их изолированный дефицит, то экскреция с мочой 1-Н-МНА у животных 4-й группы была выше, чем у крыс 2-й и 3-й групп. По-видимому, уменьшение экскреции 1-Н-МНА в случае недостаточности лишь РФ можно объяснить снижением активности ФАД-зависимой кинуренин-3-монооксигеназы. Не исключено также, что определенную роль в этом может иметь и снижение активности ПАЛФ-зависимой кинурениназы — фермента, лимитирующего интенсивность метаболизма триптофана, вследствие возникновения сопутствующего дефицита витамина В₆ при недостаточности РФ. При дефиците железа снижение выделения 1-Н-МНА можно объяснить снижением активности железосодержащей 3-гидроксиантранилат-3,4-диоксигеназы и гемсодержащей триптофан-2,3-диоксигеназы. Некоторое увеличение экскреции этого метаболита при совместном дефиците РФ и железа по сравнению с его экскрецией при недостаточности одного РФ может быть обусловлено снижением дальнейшего окисления 1-Н-МНА до метилпиридонкарбоксамида — естественного продукта метаболизма ниацина, так как эта реакция катализируется ФАД-зависимой гемсодержащей альдегидоксидазой. Полученные данные свидетельствуют о том, что снижение экскреции 1-Н-МНА также не всегда является следствием недостаточного поступления ниацина с рационом.

Таким образом, можно заключить, что дефицит как РФ, так и железа приводит к снижению экскреции 4-ПК и 1-Н-МНА с мочой, хотя содержание этих витаминов в рационе находилось в пределах физиологических величин. Для выяснения причин снижения экскреции этих метаболитов с мочой нами был проведен второй этап эксперимента. Введение в рацион животных 2-й группы РФ в течение 8 сут (37-й день эксперимента) вызывало увеличение экскреции РФ, 1-Н-МНА и 4-ПК, однако во всех случаях эти величины были ниже, чем у контрольной группы животных, соответственно на 61, 58 и 45 % (см. рисунок). Дальнейшее введение в рацион РФ (42-й день эксперимента) сопровождалось полным восстановлением экскреции 1-Н-МНА, в то время как выделение РФ и 4-ПК еще оставалось сниженным при том, что концентрация РФ в эритроцитах и плазме крови и величина ФАД-эффекта

указывали на нормальную обеспеченность организма этих животных РФ. Полное восстановление экскреции 1-Н-МНА на 42-е сутки эксперимента при сохранившемся отставании в массе тела (на 41 % на 28-й день и на 40 % на 42-й день эксперимента по сравнению с контрольной группой) доказывает, что уменьшение экскреции этого метаболита является следствием недостаточности РФ, а не задержки роста и соответственно меньшего потребления корма. Неполное восстановление экскреции 4-ПК и РФ к 42-му дню хорошо объяснимо, если недостаточность витамина В₂ действительно приводит к снижению активности ФМН-зависимой пиридоксаминфосфатоксидазы и соответственно уменьшению образования ПАЛФ, поскольку экскреция 4-ПК может увеличиться только после полного насыщения организма витамином В₆. Другими словами, введение в рацион лишенных РФ животных этого витамина в первую очередь должно вызывать восстановление экскреции 1-Н-МНА и лишь затем — 4-ПК и РФ.

Введение железа в рацион животных 3-й группы в течение 8 сут сопровождается полным восстановлением экскреции РФ до уровня величин, имеющих место у контрольных животных (см. рисунок). За этот срок полностью восстанавливается экскреция 4-ПК и 1-Н-МНА, что хорошо согласуется с данными о том, что активность 3-оксиантранилатоксидазы, сниженная при дефиците железа, легко восстанавливается при его добавлении *in vitro* [4]. На фоне недостаточности РФ у животных с алиментарным дефицитом железа введение его вызывает незначительное увеличение экскреции 1-Н-МНА по сравнению с контрольной группой, что может объясняться ингибированием альдегидоксидазы и как следствие увеличением экскреции 1-Н-МНА и уменьшением выделения метилпиридонкарбоксамида.

Таким образом, полученные данные показывают, что снижение экскреции 4-ПК и 1-Н-МНА не всегда можно рассматривать как свидетельство недостаточной обеспеченности организма витаминами В₆ и РР. Снижение этих величин может быть следствием дефицита РФ или железа. О дефиците именно этих витаминов, по-видимому, можно говорить лишь либо при одновременном уменьшении содержания витаминов в крови и их метаболитов в моче, либо при уменьшении экскреции с мочой 1-Н-МНА и 4-ПК, когда выделение РФ находится в пределах нормальных величин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Глинка Е. Ю., Сокольников А. А., Куденцова В. М. // *Вопр. мед. химии.* — 1989. — № 2. — С. 52—59.
2. Межвитаминные отношения при ишемической болезни сердца и гипертонической болезни. — Минск, 1988.
3. Методы оценки обеспеченности населения витаминами. — М., 1987.
4. Основы биохимии / Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э. и др. — М., 1981.
5. Хотимченко С. А., Алексеева И. А., Гвоздова Л. Г., Смирнова А. П. // *Теоретические и клинические аспекты науки о питании: Методы оценки обеспеченности населения витаминами.* — М., 1987. — С. 98—109.
6. Чернышов В. Г. // *Лаб. дело.* — 1985. — № 3. — С. 171—173.
7. Bender D. A., Bender A. E. // *Nutr. Abstr. Rev. (Ser. A).* — 1986. — Vol. 56. — N 10. — P. 695—719.
8. Ebadi M. // *Vitamin B₆ Pyridoxal Phosphate: Chemical*

Влияние ОТ на активность транскетолазы в тканях мышей с асцитной карциномой Эрлиха

Исследуемые ткани	Группа животных		
	интактные	с АКЭ	АКЭ+ окситиамиин
Печень	106±7,8	100±4,3	70±3,4*
Селезенка	79±2,3	76±2,9	44±3,7*
Опухолевые клетки	—	26±3,3	18±0,28*

Примечание. Звездочка — $p < 0,001$ относительно животных с АКЭ.

тиаминдифосфат (ТДФ) синтез и утилизацию фофоментоз и NADPH в клетке.

Известно, что внутриклеточный уровень фосфорилбозилпирофосфата — предшественника пуриновых нуклеотидов в печени крыс — снижается после введения ОТ [1]. Ранее нами было показано, что ОТ подавляет рост и повреждает клетки карциносаркомы Уокер-256: достоверно снижается масса опухоли, изменяются ядерно-плазменное соотношение и диаметр клеток [9]. В клетках карциносаркомы Уокер-256 отмечены патологические митозы, количество которых повышается после введения ОТ. В связи с тем что отмечена выраженная способность ОТ подавлять опухолевый рост, представляет интерес дальнейшее изучение изменений опухолевых и нормальных клеток при введении этого фактора в организме опухоленосителя и интактного животного.

Нами было проведено изучение влияния ОТ на хромосомную структуру клеток асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) клеток костного мозга интактных мышей и мышей-опухоленосителей. Исследовано также влияние введения ОТ на активность транскетолазы в опухолевых и нормальных клетках организма, скорость опухолевого роста у мышей.

Методика. Мышам-самкам линии АФ (питомник «Рап-полово» РАМН), содержащимся в стандартных условиях, внутрибрюшинно прививали клетки АКЭ (гипердиплоидный штамм SL-44 хромосомы) в дозе 6×10^6 жизнеспособных клеток на мыш. Так как средство ОТ к тиаминпирофосфокиназе в 1000 раз меньше по сравнению с тиамином [6], то для успешной конкуренции его с витамином антивитамиин необходимо применять в больших дозах. Для выявления противоопухолевого эффекта препарат вводили однократно подкожно в объеме 0,2 мл через 2 сут после прививки мышам АКЭ. В каждой группе исследовали 12 животных. На 7-е сутки опухолевого роста животных забивали, асцитную жидкость удаляли и определяли количество опухолевых клеток. Активность транскетолазы как тест ингибирующего действия ОТ определяли в печени, селезенке и опухолевых клетках и выражали в микромолях седогентулозо-7-фосфата на 1 кг ткани за 1 с [7]. Для приготовления цитогенетических препаратов одновременно части мышной внутрибрюшинно вводили колхицин в дозе 0,01 мг на 1 г массы. Через 1 ч 45 мин животных забивали, получали опухолевые клетки и препарировали бедренные кости. Клетки костного мозга вымывали гипотоническим раствором (0,5 % КС1), а затем их и клетки АКЭ подвергали гипотонической обработке в течение 20 мин при 37 °С. Фиксацию проводили трижды смесью ледяной уксусной кислоты и этанола (1:3). Готовые препараты окрашивали по Романовскому — Гимзе. Проводили анализ числа и структуры хромосом, при цитогенетическом исследовании опухолевых клеток определяли маркерные хромосомы [10]. Для изучения особенностей уровня и характера поврежденных хромосом клеток костного мозга при действии ОТ проведен сравнительный цитогенетический анализ клеток костного мозга при введении мышам ОТ в дозе 400 мг/кг, а также 1500 мг/кг урета-

Biochemical and Medical Aspects.— New York, 1986.— Pt B.— P. 449—476.

- Handbook of Vitamins.— Basel, 1984.—
- Huff J. W., Perlzweig W. A. // J. biol. Chem.— 1944.— Vol. 155.— P. 345—355.
- Huff J. W., Perlzweig W. A. // Ibid.— 1947.— Vol. 167, N 1.— P. 157—167.
- Lakshmi A. V., Bamji M. S. // Indian. J. Biochem. Biophys.— 1975.— Vol. 12.— P. 136—138.
- Rasmussen K. M., Barsa P. M., McCormick D. B. // Proc. Soc. exp. Biol. (N. 7).— 1979.— Vol. 161.— P. 527—530.
- Sauberlich H. E. // Ann. N. Y. Acad. Sci.— 1980.— Vol. 355.— P. 80—97.
- Sirivech S., Driskell J., Frieden E. // J. Nutr.— 1977.— Vol. 107.— P. 739—745.
- Tillitson J. A., Bashor M. M. // Analyt. Biochem.— 1980.— Vol. 107.— P. 214—219.
- Tryfates G. P. // Vitamin B₆ Pyridoxal Phosphate: Chemical Biochemical and Medical Aspects.— New York, 1986.— Pt B.— P. 421—447.

Поступила 11.03.91

EVALUATION OF VITAMINS B₂, B₆ AND PP CONSUMPTION BY MEANS OF THE VITAMIN AND THEIR METABOLITE EXCRETION UNDER CONDITIONS OF ALIMENTARY IRON AND RIBOFLAVIN DEFICIENCY

I. A. Alexeeva, V. M. Kodentsova, O. A. Vrzhesinskaya, T. E. Zvereva, S. A. Kholimchenko, V. B. Spirichev

INSTITUTE OF NUTRITION, ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES OF THE USSR, MOSCOW

Alimentary deficiency in riboflavin and/or ferrum in rats involved distinct decrease in excretion of 4-pyridoxylic acid and 1-N-methyl nicotinamide — the metabolites considered as the indices of vitamins B₆ and PP consumption. The effect observed appears to occur due to a decrease in activity of some ferrum- and flavin-containing enzymes participating in the metabolism of pyridoxine and niacin. Addition to the diet of the deficient component normalized these patterns. Use of the data on excretion of 4-pyridoxylic acid and 1-N-methyl nicotinamide as criteria of consumption of pyridoxine and niacin is discussed.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ. 1992

УДК 616-006-018.1-055.5/.7-02:615.356:577.164.111]-07

P. В. Требухина, Г. В. Красковский, С. Б. Мельнов, Ж. В. Мотылевич, Н. И. Мельнова

ВЛИЯНИЕ ОКСИТИАМИНА НА ОПУХОЛЕВЫЙ РОСТ И НЕКОТОРЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Институт биохимии АН Беларуси, Гродно

Интерес к метаболизму антивитаминов вполне обоснован в связи с уже известными достижениями и перспективами в области химиотерапии [2]. Окситиамиин (ОТ) — структурный аналог витамина B₁ (тиамина) — можно рассматривать как соединение, специфическим образом включающееся в биохимические процессы, контролируемые витамином B₁ [5, 6]. Роль витамина B₁ при злокачественном росте определяется тем, что биосинтез нуклеиновых кислот и белков в клетках связан с реакциями, зависящими от обеспеченности организма тиаминном. К ним относится образование пентозофосфатов и восстановленных эквивалентов NADPH в пентозофосфатном цикле (ПФЦ), частью которого является фермент транскетолаза, регулирующий через кофермент

Влияние ОТ на хромосомную структуру асцитной карциномы Эрлиха

Условия опыта	Количество клеток с указанным число хромосом, %							Всего полиплоидов
	<i>n</i>	39-43	44	45	46-49	76-81	82-98	
Контроль	300	24,34	58,33	6,67	2,33	1,33	7,77	8,33
Окситиамин	300	26,34	57,01	6,67	2,66	0,0	7,32	7,32

Примечание. *n* — количество проанализированных клеток в стадии метафазы.

на и 100 мг/кг циклофосфана, способность которых поверждать хромосомы установлена [3]. Через 24 ч после введения этих препаратов мышам последним вводили по вышеизложенной методике колхицин и готовили цитогенетические препараты клеток костного мозга мышей.

Результаты и обсуждение. Особенностью биохимического действия ОТ на организм животных является подавление активности ТДФ-зависимых ферментов. При поступлении антивитамина в организм происходит его фосфорилирование с образованием окситиаминдифосфата (ОТДФ) — ложного кофермента. Антикоферментные свойства ОТДФ зависят от степени его сродства к апоферменту. Установлено, что сродство ТДФ и ОТДФ к апопируватдегидрогеназе практически одинаково, в связи с чем торможение активности фермента наступает быстро, уже через 3 ч после введения ОТ [8]. Иные взаимоотношения между коферментом и антикоферментом у транскетолазы. Ранее было установлено, что после однократной инъекции ОТ активность транскетолазы непрерывно падает в течение нескольких дней в ряде тканей, достигая пика к 3-м суткам, и не проявляет тенденции к нормализации в течение последующих 3—5 дней [4]. В связи с вышеизложенным можно предположить, что ОТДФ не вытесняет истинный кофермент, а конкурентно связывается с вновь синтезированной транскетолазой. Такой механизм взаимодействия может иметь принципиальное значение для быстропро-

лиферирующих тканей и злокачественных клеток. Используя ОТ в качестве высокоспецифического ингибитора транскетолазы, мы предполагали, что торможение активности ПФЦ, обеспечивающего клетки углеводными предшественниками NADPH, в первую очередь должно отразиться на быстроделющихся опухолевых клетках. Предварительные эксперименты на беспородных мышах показали, что ОТ в дозах 200 и 400 мг/кг массы достоверно снижают скорость роста АКЭ. В дальнейшей работе мы остановились на применении дозы 400 мг/кг. Эта доза в подавляющем большинстве случаев обеспечивает стабильное проявление признаков недостаточности витамина ввиду избирательного включения только специфических функций тиамин антивитамином [5]. Кроме того, доза 400 мг/кг составляет 1/2 от ЛД₁₀₀ для мышей. Введение ОТ в дозе 400 мг/кг массы блокирует активность транскетолазы в печени и опухолевых клетках на 30 %, а в селезенке на 43 % (табл. 1). Скорость роста опухолевых клеток при этом снижена в 3 раза ($328,9 \pm 34,8$ клеток АКЭ/мышь $\cdot 10^6$ без введения ОТ и $111,5 \pm 19,2$ клеток АКЭ/мышь $\cdot 10^6$ при введении ОТ). Несоответствие между «незначительным» торможением активности фермента и трехкратным снижением количества опухолевых клеток, на наш взгляд, связано с функциональной особенностью транскетолазы. Сравнение данных по распределению ³⁵S-тиамин в тканях с соответствующими результатами изучения активности транскетолазы указывает, что между содержанием витамина и активностью фермента прямая зависимость выявляется только к терминальному сроку развития тиаминного дефицита [4]. Введение мышам-опухоленосителям ОТ существенно не изменяет хромосомную структуру популяции клеток АКЭ (табл. 2). Не отмечено изменений пloidности стволовой линии опухолевых клеток (табл. 3). Однако наблюдается почти трехкратное достоверное ($p < 0,01$) возрастание количества маркерных хромосом типа А (контроль 0,67 %, опыт 1,67 %). Введение мышам ОТ в дозе 400 мг/кг массы значительно повышает уровень хромо-

Таблица 3
Влияние ОТ на хромосомную структуру клеток костного мозга мышей-опухоленосителей

Условия опыта	Количество аберраций на клетку	Тип хромосомных аберраций		Количество полиплоидных клеток
		одиночный фрагмент	парный фрагмент	
Окситиамин	0,07	18	3	8
Контроль	0,017	5	—	7

Примечание. В каждой группе 300 клеток в стадии метафазы.

Таблица 4

Мутагенный эффект циклофосфана, уретана и ОТ на клетки костного мозга мышей линии АФ

Условия опыта	Количество проанализированных клеток в стадии метафазы	Аберрации хромосом				Клетки с аберрацией хромосом		Полиплоидные клетки	
		пульверизация хромосом	аберрации обменного типа	фрагменты		абс.	%	абс.	%
				одиночные	парные				
Циклофосфан	200	24	28	107	25	95	47,5 ± 3,53	14	7,0 ± 1,8
Уретан	200	—	—	55	4	49	24,5 ± 3,04	—	—
ОТ	200	—	—	11	—	11	5,5 ± 1,61	—	—
Контроль	200	—	—	2	—	2	1,0 ± 0,60	—	—

сомных aberrаций в клетках костного мозга мышей-опухоленосителей и интактных мышей (табл. 4). Хромосомные повреждения характеризуются одиночными и парными фрагментами, возрастания ploidy как в нормальных, так и в опухолевых клетках не отмечено. Тип повреждения хромосом клеток костного мозга при действии ОТ сходен с типом повреждений хромосом, вызываемых введением уретана (см. табл. 4): одиночные и парные фрагменты хромосом, отсутствие их числовых aberrаций, но интенсивность их повреждения значительно выше при введении уретана. Циклофосфан в дозе 100 мг/кг по сравнению с указанными факторами вызывает более значительные повреждения хромосом клеток костного мозга, что проявляется как в более высокой частоте клеток с aberrациями, так и в более широком спектре повреждений хромосом. При введении циклофосфана обнаружены возрастание количества полиплоидных клеток, aberrации обменного типа, пульверизация хромосом. Таким образом, не выявлено изменений числа хромосом в клетках опухоли и костного мозга, но происходят выраженные повреждения структуры хромосом клеток костного мозга, что проявляется в возрастании числа клеток с хромосомными повреждениями на клетку, но эти повреждения менее выражены при введении ОТ, чем при введении таких мутагенов, как уретан и циклофосфан, что указывает на возможность использования этого антивитамина в составе комплексной химиотерапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Золотухина С. Ф. // Антивитамины в регуляции обмена веществ (эксперимент, клиника).— Гродно, 1963.— С. 19—29.
2. Ларионов Л. Ф. // Химиотерапия злокачественных опухолей.— М., 1962.— С. 463.
3. Леквичус Р. К. Химический мутагенез и загрязнение окружающей среды.— Вильнюс, 1983.
4. Островский Ю. М. // Тиамин.— Минск, 1971.— С. 145.
5. Островский Ю. М. // Антивитамины в экспериментальной и лечебной практике.— Минск, 1973.— С. 175.
6. Островский Ю. М., Черникевич И. П., Воскобоев А. И., Шленберг А. // Биоорганич. химия.— 1977.— Т. 3, № 6.— С. 1083—1089.
7. Островский Ю. М. // Экспериментальная витаминология.— Минск, 1979.— С. 552.
8. Островский Ю. М., Воскобоев А. И., Горенштейн В. И., Доста Г. А. // Биохимия.— 1979.— Т. 44, № 9.— С. 1551—1557.
9. Требухина Р. В., Кравчук Р. И., Михайльевич Г. И., Петушок В. Г. // Экспер. онкол.— 1987.— Т. 9, № 2.— С. 60—63.
10. Фомина М. И., Миненкова Е. А., Евсеев А. С. и др. // Цитология.— 1978.— Т. 20, № 5.— С. 563—569.

Поступила 20.02.91

EFFECT OF OXYTHIAMINE ON TUMORAL GROWTH AND SOME BIOCHEMICAL AND GENETIC PATTERNS OF NORMAL AND MALIGNANT CELLS

R. V. Trebukhina, G. V. Kraskovsky, S. B. Melnov, Zh. V. Motylevich, N. I. Melnova

Institute of biochemistry, academy of sciences of the Byelorussian SSR, Grodno

The effect of oxythiamine (400 mg/kg) on chromosomal structure of Ehrlich ascites carcinoma cells (EAC, hyperdiploid strain) and bone marrow cells was studied in intact AF mice. The influence of the antivitamin on the rate of tumor growth was investigated in tumor-bearing mice. Oxythiamine decreased transketolase activity in hepatocytes and tumoral cells

and markedly inhibited tumor growth. Amount of chromosomes was unaltered both in tumor cells and in bone marrow cells, which could be manifested as increased content of cells with impairment of chromosomal set calculated per a cell. However, the oxythiamine-induced impairment of chromosomal integrity was less distinct as compared with the effect of such mutagens as urethane and cyclophosphamide; hence, the antivitamin might be used in the courses of combined chemotherapy.

© В. В. Лелевич, Л. Ф. Панченко, 1992

УДК 616.89-008.441.13-092.9-07:616.153.455.623-074

В. В. Лелевич, Л. Ф. Панченко

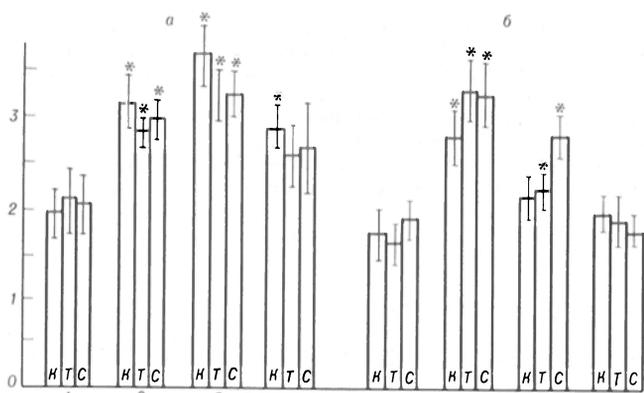
СОСТОЯНИЕ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА В ГОЛОВНОМ МОЗГУ КРЫС ПРИ АЛКОГОЛЬНОМ АБСТИНЕНТНОМ СИНДРОМЕ

Гродненский медицинский институт, Научный центр медико-биологических проблем наркологии Минздрава, Москва

Хроническая алкогольная интоксикация сопровождается нарушениями углеводного обмена в головном мозге [5, 16]. В процессе формирования алкоголизма в нервной ткани происходит снижение потребления кислорода, торможение утилизации макроэргов, замещение глюкозы в обмене нервных клеток другими субстратами [7, 15]. Прекращение поступления этанола в организм проявляется тяжелыми психическими и неврологическими нарушениями, классифицируемыми как алкогольный абстинентный синдром (ААС). Метаболические отклонения обмена глюкозы при ААС являются более выраженными, чем при потреблении алкоголя [2, 8, 13]. Это проявляется в развитии глубокой гипогликемии, гиперлактатемии и снижении уровня пирувата в крови [2]. Отмечают [10], что одним из механизмов, лежащих в основе формирования ААС, является развитие субстратного и соответственно энергетического дефицита в ЦНС. Это по вторичным, энергозависимым механизмам приводит к нарушениям нейромедиаторного обмена, и прежде всего тормозных медиаторов — ГАМК и дофамина [11]. Снижение окислительных процессов и уровня восстановленных нуклеотидов создает предпосылки для развития оксидативного клеточного стресса, который также способствует развитию ААС [17]. В 1-е сутки развития ААС в мозгу снижается уровень гликогена, АТФ и креатинфосфата [13]. В эти же сроки увеличивается захват 2-дезоксиглюкозы в ряде образований головного мозга [12]. Назначение совместно с этанолом солей молочной, β -оксимасляной и пировиноградной кислот препятствует развитию ААС [8], что связывают с нормализацией энергетического обмена за счет восполнения недостающих субстратов. Для расщепления механизмов выявленных изменений необходимы более детальные сведения о функционировании основных путей метаболизма глюкозы в мозгу в динамике развития ААС.

В настоящей работе была поставлена задача изучить ряд сопряженных показателей углеводного обмена в некоторых образованиях головного мозга крыс при ААС.

Методика. Опыты проводили на беспородных крысах-самцах массой 160–200 г (по 8–12 животных в группе). ААС моделировали методом интрагастральных интубаций по Майхровичу [14] в модификации [1]. Живот-



Содержание глюкозы (а) и лактата (б) (в ммоль/г) в головном мозге крыс в динамике ААС.

1—4 — группа животных; К — кора больших полушарий; Т — таламическая область; С — ствол мозга. Звездочка — $p < 0,05$ относительно 1-й группы (контроль).

ным внутривенно вводили 25 % раствор этанола в дозе 5 г/кг массы тела 2 раза в сутки с интервалом 12 ч на протяжении 5 дней. Крыс декапитировали через 3 ч, 1 и 3 сут после последнего введения этанола (2, 3 и 4-я группы соответственно). Контрольные животные (1-я группа) получали в аналогичные сроки эквивалентные количества физиологического раствора.

После декапитации извлекали головной мозг и на холоду выделяли кору больших полушарий, таламическую область и ствол головного мозга. В надосадочной фракции (10 000 г, 30 мин) определяли активность фосфофруктокиназы (ФФК) (КФ 2.7.1.11) [18] и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) (КФ 1.1.1.27) [6]. Содержание глюкозы и лактата определяли в безбелковых центрифугатах, получаемых с помощью 6 % хлорной кислоты из ткани, замороженной в жидком азоте. Глюкозу определяли в системе, содержащей глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу и гексокиназу [4], уровень лактата исследовали с помощью ЛДГ [9]. Концентрацию глюкозы в плазме крови устанавливали ортотолуидиновым методом с использованием стандартных наборов фирмы «Лаксма». Белок определяли по Лоури.

Результаты и обсуждение. Форсированная алкоголизация в течение 5 дней не изменяет уровень гликемии у исследуемых животных. Через 3 ч после последнего введения этанола (2-я группа) содержание глюкозы в крови не отличается от уровня контрольной группы ($5,75 \pm 0,48$ и $5,33 \pm 0,37$ ммоль/л соответственно; $p < 0,5$). Спустя 1 сут после прекращения введения алкоголя уровень гликемии достоверно возрастает в сравнении с контролем ($5,33 \pm 0,37$ и $6,91 \pm 0,58$ ммоль/л; $p < 0,05$), а через 3 сут нормализуется. Следовательно, 5-дневная алкоголизация не приводит к дезинтеграции сложной системы регуляции гликемии. Повышение содержания глюкозы в крови через 1 сут после прекращения назначения этанола соответствует максимальному проявлению поведенческих симптомов ААС и определяется, по всей вероятности, формированием стрессорного состояния [1, 14].

Содержание глюкозы в ткани мозга повышается после 5-дневного введения алкоголя, но в разной степени в исследуемых мозговых образованиях (см. рисунок). В коре больших полушарий уровень глюкозы увеличивается на 60 %, в стволе мозга — на 44 %, а в таламической области — на 33 % в сравнении с контрольной группой. Это согласуется с данными о замедлении катаболизма глюкозы в мозгу при острой и непродолжительной алкогольной интоксикации [5, 15]. Алкоголизация в течение 5 дней повы-

Активность ФФК и ЛДГ (в ммоль на 1 мг белка в 1 мин) в различных отделах головного мозга крыс при ААС

Группа животных	Кора	Таламическая область	Ствол мозга
ФФК			
1-я	$168,7 \pm 10,9$	$176,0 \pm 12,9$	$182,8 \pm 11,0$
2-я	$197,9 \pm 23,5$	$227,2 \pm 19,4^*$	$222,4 \pm 13,9^*$
3-я	$182,8 \pm 17,5$	$185,9 \pm 19,3$	$228,9 \pm 14,7^*$
4-я	$202,3 \pm 12,8$	$190,0 \pm 18,4$	$185,3 \pm 15,1$
ЛДГ			
1-я	$798 \pm 79,7$	$876 \pm 68,3$	$714 \pm 30,7$
2-я	$901 \pm 86,3$	$1092 \pm 63,6^*$	$872 \pm 55,4^*$
3-я	$857 \pm 60,9$	$984 \pm 77,1$	$1052 \pm 86,2^*$
4-я	$818 \pm 76,6$	$884 \pm 81,9$	$706 \pm 65,6$

Примечание. Звездочка — $p < 0,05$ относительно 1-й группы (контроль).

шает активность ФФК и ЛДГ в таламической области и стволе мозга, не изменяя ее в коре больших полушарий (см. таблицу). При острой алкогольной интоксикации нами выявлена активация этих же ферментов только в коре больших полушарий [3]. Следовательно, доза этанола и длительность его назначения определяют выраженность, локализацию и направленность метаболических отклонений обмена глюкозы в ткани головного мозга. Активация ФФК и ЛДГ в таламической области и стволе мозга при действии этанола обеспечивает, по всей вероятности, более низкий здесь прирост уровня глюкозы. Содержание лактата после 5-дневного введения алкоголя увеличивается во всех исследуемых отделах мозга, но в большей степени в таламической области и стволе мозга.

Через 1 сут после прекращения поступления этанола содержание глюкозы продолжает увеличиваться, превышая контрольный уровень в коре на 91 %, в таламической области на 54 % и в ствольной части мозга на 58 %. Этому способствуют развивающаяся гипергликемия, а также увеличение захвата глюкозы мозговой тканью, регистрируемое на этой стадии ААС [12]. Активность ФФК и ЛДГ в коре больших полушарий и таламической области снижается до уровня контрольной группы. В стволе мозга активность ФФК не изменяется, а ЛДГ — достоверно повышается в сравнении с таковой во 2-й группе. Содержание лактата через 1 сут после последнего введения этанола превышает уровень контрольной группы в таламической области и стволе мозга. При длительном поступлении этанола в нервной ткани происходит переход с утилизации привычного энергетического субстрата — глюкозы — на лактат и β -оксипутират [10, 11]. Развитие ААС сопровождается обратной трансформацией энергопроизводящих процессов. В этой связи повышение содержания глюкозы в ткани мозга к концу 1-х суток ААС можно рассматривать как адаптационную реакцию на снижение уровня характерных для форсированной алкоголизации энергетических субстратов.

Через 3 сут после прекращения назначения этанола содержание глюкозы остается повышенным в коре больших полушарий, тогда как в таламической области и стволе мозга оно снижается до значений контрольной группы. Активность ФФК и ЛДГ, концентрация лактата в ис-

следующих образованиях мозга к этому сроку не превышает уровня контрольной группы.

Таким образом, при ААС отмечается периодичность изменений углеводного обмена в ткани головного мозга. На фоне максимальных внешних проявлений ААС (через 1 сут) выявляется значительное, распространенное на все мозговые образования повышение содержания глюкозы. Концентрация лактата в этот период превышает таковую во 2-й группе в коре и таламической области. Это указывает на то, что после прекращения действия этанола не происходит простого обратимого снижения выраженности его эффектов в ткани головного мозга. Характер изменений углеводного обмена определяется переходом на утилизацию глюкозы как основного энергетического субстрата. Через 1 сут после окончания алкоголизации нервная ткань активно утилизирует этот субстрат из крови [12]. Поэтому на фоне предыдущего торможения этанолом катаболизма глюкозы в нейронах происходит повышение ее уровня в сравнении с периодом алкоголизации. Изменения активности ферментов гликолиза, по всей вероятности, интегрально отражают различную функциональную заинтересованность мозговых образований в патогенезе ААС и действие ряда регуляторных факторов. Сохранение повышенного содержания глюкозы в коре больших полушарий на 3-и сутки абстиненции свидетельствует о замедленной метаболической трансформации в данной структуре мозга.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абдрашитов А. Х., Листвина В. П., Пуужный В. П., Успенский А. Е. // Фармакол. и токсикол.— 1983.— № 6.— С. 94—98.
2. Косенко Е. А., Каминский Ю. Г. Углеводный обмен, печень и алкоголь.— Пущино, 1982.
3. Лелевич В. В. // Фармакол. и токсикол.— 1987.— № 6.— С. 85—87.
4. Мильман Л. С., Юровицкий Ю. Г., Ермолаева Л. П. // Методы биологии развития.— М., 1974.— С. 415—433.
5. Панченко Л. Ф., Лелевич В. В. // Пат. физиол.— 1989.— № 3.— С. 83—88.
6. Прохорова П. И. // Методы биохимических исследований.— Л., 1982.— С. 222—226.
7. Сытинский И. А. Биохимические основы действия этанола на центральную нервную систему.— М., 1980.
8. Успенский А. Е., Абдрашитов А. Х., Константинопольский М. А., Листвина В. П. // Медико-биологические проблемы алкоголизма.— М., 1988.— С. 114—118.
9. Bergmeyer H. // Methoden der enzymatischen Analyse.— Weinheim, 1962.— S. 253—259.
10. Derr R., Draves K., Derr M. // Life Sci.— 1983.— Vol. 32.— P. 2551—2554.
11. Derr R. // J. theor. Biol.— 1984.— Vol. 106.— P. 375—381.
12. Eckardt M., Campbell G., Marietta C. et al. // Brain Res.— 1986.— Vol. 366.— P. 1—9.
13. Hemmingsen R., Chapman A. // J. Neurochem.— 1980.— Vol. 34.— P. 1561—1566.
14. Majchrowich E. // Psychopharmacologia.— 1975.— Vol. 43.— P. 245—254.
15. Roach M., Reese W. // Biochem. Pharmacol.— 1971.— Vol. 20.— P. 2805—2812.
16. Sachs H., Russell J., Christman D., Cook B. // Arch. Neurol.— 1987.— Vol. 44.— P. 1242—1251.
17. Sklenovský A., Nauratil J., Chmela Z., Rypka M. // Activ. nerv. super.— 1989.— Vol. 31.— P. 129—131.
18. Underwood A., Newsholme E. // Biochem. J.— 1965.— Vol. 95.— P. 868—875.

Поступила 27.02.91

V. V. Lelevich, L. F. Panchenko

Medical Institute, Grodno, All-Union Research Centre of Medico-Biological Problems in Narcology, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

Periodically repeating alterations of carbohydrate metabolism were found in rat brain tissue under conditions of experimental alcohol withdrawal syndrome. Along with the maximal external manifestations of the withdrawal, a significantly higher glucose levels in all brain formations were observed, which was decreased within 3 days. Activity of the glycolytic enzymes was altered differentially in various brain structures.

© А. Н. Шаров, В. Е. Новиков, 1992

УДК 616.831-005.98-07:1616.831-018.1:576.311.3471-008.9

А. Н. Шаров, В. Е. Новиков

СОСТОЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ В МИТОХОНДРИЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ЕГО ТОКСИЧЕСКОМ И ТРАВМАТИЧЕСКОМ ОТЕКЕ-НАБУХАНИИ

Смоленский медицинский институт

Одним из факторов развития отека-набухания головного мозга (ОНГМ) считают нарушение биоэнергетических процессов в мозговой ткани [2]. Показано, что развитие ОНГМ характеризуется истощением энергетических ресурсов мозга. Энергетический дефицит ведет к угнетению активного транспорта ионов через мембраны, изменению осмотического градиента, нарушению водно-электролитного баланса и накоплению воды [3, 9]. Причиной энергетического дефицита может быть, вероятно, либо недостаточная скорость образования макроэргических фосфатов, либо их усиленный распад. К тому же некоторыми исследователями обнаружены структурные изменения митохондрий при ОНГМ [2, 5]. В связи с этим представляло интерес изучить состояние окислительного фосфорилирования в митохондриях мозга при различных формах ОНГМ.

Методика. Опыты проведены на белых беспородных крысах обоего пола массой 150—220 г. Токсический ОНГМ вызывали введением никотина [8], травматический — путем уколов иглой в мозговую ткань через трепанационное отверстие [6]. Все оперативные вмешательства проводили под эфирным наркозом. При токсическом ОНГМ животных деканитировали через 1 ч после введения никотина, при травматическом — через 1 сут (начало развития отека) и 4 сут (максимум развития отека) после травмы. Эти сроки деканитации установлены нами ранее по уровню общей воды и плотности мозга [4, 8]. Контролем служили интактные животные.

Выделение митохондрий из ткани головного мозга и последующее полярографическое определение состояния окислительного фосфорилирования проводили, как описано ранее [7]. Субстратом окисления являлась глутаминовая кислота (3 мМ). Из данных полярограммы рассчитывали: скорость дыхания митохондрий в различных метаболических состояниях (V_0 , V_3 , V_4); скорость разобценного 2,4-динитрофенолом (ДНФ) дыхания ($V_{днф}$) в μ -атомах кислорода в 1 мин на 1 мг белка; дыхательные контроли по Lagdy, Wellman ($ДК_w$) и по Chance, Williams ($ДК_w$); коэффициент $АДФ/О$; стимуляцию дыхания ДНФ; скорость фосфорилирования добавленного $АДФ$ ($АДФ/t$) — в μ -атомах кислорода в 1 мин на 1 мг белка [1]. Белок определяли по [10].

Результаты и их обсуждение. Через 1 сут после травмы наблюдается снижение всех скоростей окисления при сохранении сопряжения в дыхательной цепи. При этом степень сопряже-

Показатели	Контроль (n=13)	Травматический ОНГМ		Токсический ОНГМ (n=10)
		1-е сутки (n=12)	4-е сутки (n=8)	
V_0	24,90±2,47	17,37±0,85	26,65±1,66	17,11±1,04
p		<0,01	>0,05	<0,01
V_3	71,40±4,48	49,87±3,04	81,16±5,29	45,97±3,67
p		<0,001	>0,05	<0,001
V_4	35,97±3,23	19,32±1,25	35,32±2,89	19,21±1,22
p		<0,001	>0,05	<0,001
$V_{ДНФ}$	94,58±8,01	57,17±2,87	97,50±8,19	72,88±5,75
p		<0,001	>0,05	<0,05
$ДК_n$	3,09±0,29	2,93±0,15	3,06±0,19	2,70±0,16
p		>0,05	>0,05	>0,05
$ДК_n$	2,08±0,11	2,66±0,13	2,31±0,10	2,39±0,09
p		<0,01	>0,05	<0,05
$АДФ/О$	2,66±0,06	3,37±0,17	2,65±0,14	2,88±0,10
p		<0,01	>0,05	>0,05
$ДНФ$	2,71±0,14	3,02±0,15	2,80±0,16	3,78±0,12
p		>0,05	>0,05	<0,001
$АДФ/t$	191,16±14,14	172,94±9,50	208,37±9,83	131,72±10,88
p		>0,05	>0,05	<0,01

ния АДФ/О и $ДК_n$ несколько увеличены, что можно объяснить вероятными компенсаторными изменениями в митохондриях, направленными на поддержание нормального энергообеспечения. Тот факт, что снижается не только V_3 , но и $V_{ДНФ}$, свидетельствует об истощении резервных возможностей дыхательной цепи митохондрий к усилению дыхания. В то же время показатели сопряжения не изменены. Через 4 сут после травмы все показатели окисления и фосфорилирования были на уровне контрольных цифр (см. таблицу).

Анализ результатов изучения окислительного фосфорилирования митохондрий мозга в динамике травматического ОНГМ (на 1-е и 4-е сутки) показывает, что нарушаются в основном процессы окисления и изменения выражены через 1 сут после травматического воздействия.

Вызываемая нами травма мозга строго дозирована и локализована в определенном небольшом участке левой теменной доли мозга. Такое травматическое воздействие приводит к развитию отека мозга, который наиболее отчетливо выражен перифокально и не имеет диффузного распространения. Первые признаки отека по уровню общей воды и плотности мозга отмечаются уже через 1 сут после травмы, а к 4-м суткам он достигает максимального развития [4].

Обнаруженное в наших опытах быстрое восстановление до нормы процессов окислительного фосфорилирования (через 4 сут после травмы) может быть связано с тем, что реализуется известная биологическая особенность клетки восстанавливать целостность нарушенных структурных образований и функций в кратчайшие сроки. Не поврежденные отеком митохондрии усиливают свою функцию и компенсируют недостаточную работу пораженных структур. ОНГМ на нашей модели травмы формируется в основном перифокально, но мы выделяли митохондрии из всего полушария. Состояние митохондрий во время нашего исследования *in vitro* не может полностью отражать их состояние *in vivo* в пораженном очаге, где они находятся далеко не в таких оптимальных условиях.

При токсическом никотиновом ОНГМ наблюдается такая же направленность изменений энергетики митохондрий, как и в 1-е сутки травматического отека, — снижение интенсивности окисли-

тельных процессов. V_3 и V_4 снижаются наиболее резко. В то же время степень сопряжения АДФ/О остается на уровне контрольных цифр, а $ДК_n$ и степень стимуляции при добавлении ДНФ достоверно увеличены. Такое резкое снижение фосфорилирующего окисления V_3 при сохраненном АДФ/О приводит к снижению скорости синтеза АТФ в митохондриях (АДФ/t достоверно ниже контрольных цифр). Достоверное увеличение степени стимуляции дыхания ДНФ при сохранении прочих показателей сопряжения позволяет предположить, что в этом случае резервные возможности митохондрий к усилению окислительного фосфорилирования более выражены, чем при травматическом отеке.

Таким образом, при токсическом и в первые сутки развития травматического ОНГМ скорости окисления субстратов (в частности, глутаминовой кислоты) в митохондриях мозговой ткани существенно снижаются, что может приводить к снижению процессов снабжения клеток АТФ. Развивающийся энергодефицит способствует формированию и усугубляет течение ОНГМ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дедухова В. И., Мохова Е. Н. // Науч. докл. высш. школы биол. науки. — 1971. — № 4. — С. 129—137.
2. Квитницкий В. М., Рыжов Ю. П. Современное учение об отеке и набухании головного мозга. — Киев, 1988.
3. Новиков В. Е., Козлов С. Н., Яснецов В. С. // Фармакол. и токсикол. — 1984. — № 3. — С. 35—38.
4. Новиков В. Е., Яснецов В. С. // Рукопись деп. в ВИНТИ. — 1989. — № 2218—В89.
5. Промыслов М. Ш. Обмен веществ в мозге и его регуляция при черепно-мозговой травме. — М., 1984.
6. Самвелян В. М. // Пат. физиол. — 1966. — № 4. — С. 80—83.
7. Шаров А. Н., Козлов П. Б. // Нейрохимия. — 1982. — Т. 1, № 3. — С. 269—274.
8. Яснецов В. С., Новиков В. Е. // Бюл. eksper. биол. — 1985. — № 1. — С. 67—69.
9. Gazendam S., Kwartz E. // Pflüger's Arch. — 1980. — Bd 386, N 1. — S. 71—76.
10. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265—275.

Поступила 25.06.90

OXIDATIVE PHOSPHORYLATION IN BRAIN MITOCHONDRIAL TOXIC AND TRAUMATIC EDEMA

A. N. Sharov, V. E. Novikov

Medical School, Smolensk

A rate of oxidative reactions was decreased in brain mitochondria under conditions of toxic edema and within 1 day after traumatic impairment of brain tissue. Oxidative phosphorylation in mitochondria was normalized within 4 days after trauma. These alterations appear to depend on inhibition of oxidative enzymes in the respiration chain.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1992

УДК 616-036.882-08-039.72-036.8-07:616.153.45

В. В. Лобов, В. Д. Конвай, А. Н. Быховцев

МЕТАБОЛИЗМ УГЛЕВОДОВ В УСЛОВИЯХ НАРУШЕНИЯ МОНОАМИНЕРГИЧЕСКИХ РЕГУЛЯТОРНЫХ МЕХАНИЗМОВ, РАЗВИВШЕГОСЯ В РАННЕМ ПОСТРЕАНИМАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ

ЦНИЛ Омского медицинского института

Ранее установлено, что в постреанимационном периоде нарушается метаболизм углеводов. Это выражается в снижении запаса гликогена в печени, повышении концентрации глюкозы в крови на фоне изменения инкретиции инсулина, глюкагона, адренокортикотропного гормона и глюкокортикоидов [2, 3]. Вместе с тем факторы, регулирующие уровень гликемии в организме, особенно после тяжелого гипоксического повреждения, изучены недостаточно. Одним из них может быть торможение биосинтеза катехоламинов [6, 8], приводящее к нарушению регуляции метаболизма углеводов при терминальных состояниях. Восполнить дефицит данных гормонов можно введением их экзогенных предшественников. Широкому применению последних препятствует недостаточное понимание особенностей их эффекта при остановке кровообращения и последующей рециркуляции с реоксигенацией.

В настоящей работе изучали влияние экзогенного ДОФА на метаболизм углеводов в раннем постреанимационном периоде у животных, перенесших различную по длительности клиническую смерть.

Методика. Эксперименты проводили на 58 беспородных собаках обоего пола, наркотизированных нембуталом (10 мг/кг) с предварительной премедикацией промедолом (10 мг/кг). При моделировании 1-, 5- и 10-минутной клинической смерти от острого обескровливания с последующим оживлением комплексным методом [7] воспроизводили разные по степени тяжести постреанимационные повреждения центральной нервной системы (ЦНС). О последних судили

по времени появления первого самостоятельного вдоха и восстановлению роговичных рефлексов. Контрольных животных подвергали тем же манипуляциям, что и подопытных, за исключением кровопускания и реанимационных мероприятий. В 1-ю минуту после начала оживления и возобновления сердечной деятельности собакам внутрибрюшинно вводили D-L-ДОФА ("Reanal", Венгрия) в дозе 50 мг/кг (1-я группа). 2-ю группу составляли животные, перенесшие клиническую смерть, но не получавшие препарат. До начала кровопускания, а также через 2 ч после оживления у животных указанных групп забирали венозную кровь для определения уровня глюкозы о-толуидиновым методом и инсулина с помощью радиоиммунных наборов рино-ИНС-ПГ¹²⁵I (ИБОХ АН Беларуси). Путем прижизненной фиксации ткани головного мозга разработанным нами криоинструментом получали биоптаты, в которых исследовали содержание циклического адепозин-3', 5'-монофосфата (цАМФ) с использованием наборов для радиоиммунного анализа ("Lachema", ЧСФР). Экспериментальные данные обрабатывали статистически с применением параметрического и непараметрических критериев.

Результаты и обсуждение. При увеличении длительности клинической смерти от 1 до 5 и 10 мин отчетливо нарастала тяжесть постреанимационных повреждений ЦНС. При этом статистически достоверно увеличивались сроки восстановления самостоятельного дыхания и роговичных рефлексов.

Согласно данным, представленным в табл. 1, в крови у оживленных собак 2-й группы значительно увеличивалась концентрация глюкозы. Это не было связано с замедленным транспортом углеводов в клетки, обусловленным снижением инкретиции инсулина. Уровень последнего в крови через 1--2 ч после перенесенной клинической смерти разной продолжительности даже возрастал (табл. 2). При этом нами не отмечена взаимосвязь между его увеличением и выраженностью постреанимационных повреждений ЦНС. Можно полагать, что в случаях увеличения длительности остановки кровообращения до 10 мин функция островкового аппарата поджелудочной железы резко не нарушалась.

Гипергликемия, развивающаяся в раннем постреанимационном периоде, была обусловлена, вероятно, повышенной инкретией катехоламинов. Активация последними фосфоорилазы печени приводила к усиленному расщеплению гликогена. Выраженность и длительность указанных процессов были пропорциональны степени тяжести постреанимационных повреждений ЦНС. Если у животных 2-й группы, оживленных после 1-минутной клинической смерти, уровень глюкозы в крови возвращался к нормальному к концу 90-й минуты постреанимационного периода, то при увеличении

Таблица 1

Влияние ДОФА на уровень глюкозы в крови (в ммоль/л) в раннем постреанимационном периоде (n=7—9)

Группа животных	Продолжительность клинической смерти, мин	Исходный уровень	Постреанимационный период, мин				
			5	30	60	90	120
Контрольная	—	5,28±0,23	5,12±0,23	8,43±0,79**	10,51±1,34**	11,22±1,69**	10,35±1,75**
1-я	1	5,22±0,31	9,45±0,35**	8,78±0,47**	8,49±0,72**	9,54±0,92**	9,73±0,92**
2-я		5,11±0,30	10,31±0,90**	8,41±0,68**	6,89±0,69**	6,18±0,81*	5,60±0,79*
1-я	5	4,65±0,31	12,28±1,06**	9,94±0,69**	10,05±1,07**	11,11±1,21**,*	10,77±1,22**
2-я		4,97±0,27	10,44±0,55**	9,30±0,36**	7,78±0,47**,*	7,25±0,53**	6,17±0,54*
1-я	10	4,80±0,13	13,53±0,61**	13,24±0,67**	12,97±0,68**	12,78±0,87**	13,37±1,12**
2-я		4,95±0,29	11,66±0,80**	9,58±0,50**,*	9,06±0,61**,*	7,28±0,55**	6,02±0,55*

Примечание. Здесь и в табл. 2: одна звездочка — достоверные различия ($p \leq 0,05$) между показателями 1-й и 2-й групп, две — между опытными и исходными данными.

Таблица 2

Влияние ДОФА на уровень инсулина в крови (в мЕД/л) в раннем постреанимационном периоде (n=7-9)

Группа животных	Продолжительность клинической смерти, мин	Исходный уровень	Постреанимационный период, мин	
			60	90
Контрольная	—	19,1±2,0	23,8±2,5	34,1±6,5**
1-я	1	19,0±2,1	14,1±2,1*	14,3±1,2**
2-я	5	20,2±1,9	49,9±9,2**	40,0±7,9*
1-я	5	18,5±2,3	11,4±2,1**	10,1±1,0**
2-я	5	21,4±2,2	33,5±4,3**	46,0±8,7**
1-я	10	18,4±1,6	10,6±1,8**	6,9±1,3**
2-я	10	20,0±2,0	37,5±4,5**	38,6±3,4**

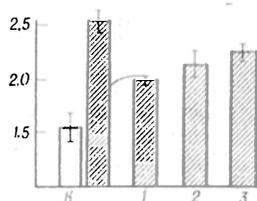
длительности остановки кровообращения до 5 или 10 мин — только через 2 ч рециркуляции.

Гипергликемию в раннем постреанимационном периоде можно рассматривать как защитно-приспособительную реакцию организма, направленную на более полное обеспечение тканей углеводами в условиях повышения потребности в них при усилении гликолитических процессов. Ее обеспечение осуществляется интенсификацией биосинтетической способности симпатико-адренальной системы. В частности, это происходит через активацию тирозин-3-гидроксилазы, при посредстве которой тирозин превращается в ДОФА [1]. Снижение активности этого фермента обусловливало, вероятно, недостаточную продукцию норадреналина и адреналина. У животных 1-й группы, перенесших 1-минутную остановку кровообращения, это состояние отмечалось к концу 1,5—2 ч постреанимационного периода. Введение экзогенного ДОФА увеличивало в этот период у оживленных животных уровень гликемии (см. табл. 1), как и у контрольных собак. На более ранних этапах исследования, когда организм в достаточной степени обеспечен эндогенным ДОФА, препарат не повышал концентрацию глюкозы в крови. При удлинении клинической смерти до 5 или 10 мин недостаточность ферментативных систем, обеспечивающих синтез катехоламинов, развивалась в более ранние сроки. У собак, перенесших 5-минутную клиническую смерть, гликемия в ответ на введение ДОФА увеличивалась к концу 60-й минуты постреанимационного периода, а у животных после 10-минутной остановки кровообращения — через 30 мин после оживления.

Интересно, что у оживленных собак после введения препарата развивающаяся гипергликемия не приводила к повышению инкретиции инсулина (см. табл. 2), как это отмечалось у контрольных животных. Концентрация этого гормона в крови не только не возросла, но даже снижалась. Это затрудняло проникновение глюкозы в клетки и в свою очередь способствовало развитию гипергликемии. При этом уменьшение уровня инсу-

Влияние ДОФА на содержание цАМФ в ткани головного мозга в раннем постреанимационном периоде.

По оси ординат — содержание цАМФ, имоль на 1 г ткани. К — контроль; 1—2 соответственно 1-, 5- и 10-минутная клиническая смерть. Светлый столбик — исходный уровень, заштрихованные — после введения препарата.



лина при фармакологической активации моноаминергических регуляторных систем находилось в прямой зависимости от степени тяжести постреанимационных повреждений ЦНС.

Не исключено, что это было связано с повреждающим действием на β -клетки поджелудочной железы избытка катехоламинов, являющихся гормональными антагонистами инсулина [4, 5]. Вместе с тем имеются сведения [9], что указанные моноамины через β -адренорецепторы островков Лангерганса усиливают продукцию инсулина, а через α -адренорецептивные структуры блокируют выделение инсулина в кровь. Поэтому уменьшение инкретиции инсулина могло быть обусловлено реципрокной активацией α -адренорецепторов поджелудочной железы при десинтизации β -адренорецепторов, связанной с длительным воздействием стимулирующего фактора [5]. Об этом свидетельствовало увеличенное содержание в ткани головного мозга цАМФ (на 19—35 %; $p < 0,01$), пропорциональное продолжительности предшествующей клинической смерти (см. рисунок). Интересно, что введение ДОФА контрольным собакам вызывает увеличение в мозге уровня цАМФ на 52 % ($p < 0,001$), более выраженное, чем у оживленных животных 1-й группы.

Таким образом, степень и продолжительность гипергликемии, развивающейся в раннем постреанимационном периоде вследствие усиленной инкретиции катехоламинов, а также время развития торможения активности тирозин-3-гидроксилазы зависят от длительности предшествующей остановки кровообращения и темпов неврологического восстановления животных. Вышеуказанные нарушения протекают на фоне усиленной инкретиции инсулина. Значительное уменьшение выработки последнего, обусловленное снижением чувствительности рецепторного аппарата поджелудочной железы при повреждающем действии катехоламинов, наблюдается через 1—2 ч после введения диоксифенилаланина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аничков С. В. Нейрофармакология. — Л., 1982.
2. Конаев В. Д., Лукошкин А. В., Смирнова В. Б. // Пат. физиол. — 1984. — № 6. — С. 58—62.
3. Лобов В. В., Поспелов В. С., Быховцев А. Н., Евсеевко Л. Н. // Нарушение механизмов регуляции и их коррекция. — М., 1989. — Т. 2. — С. 750.
4. Старкова Н. Т. Клиническая эндокринология (проблемы фармакотерапии). — М., 1983.
5. Теппермен Дж., Теппермен Х. Физиология обмена веществ и эндокринной системы. Пер. с англ. — М., 1989.
6. Свечић V., Мичић D. V., Мрсулја B. B. // Acta biol. jugosl. — 1984. — Vol. 20. — P. 109—115.
7. Negovsky V. A., Gurvitch A. M., Zolotokrylina E. S. Postresuscitation Disease. — Amsterdam, 1983.
8. Nemoto E. M. // Clin. Care Med. — 1978. — Vol. 6. — P. 203—214.
9. Porte D., Robertson R. P. // Fed. Proc. — 1973. — Vol. 32. — P. 1792—1796.

Поступила 10.09.90

CARBOHYDRATE METABOLISM IN IMPAIRMENT OF MONOAMINERGIC REGULATORY MECHANISMS DEVELOPING IN EARLY POSTRESUSCITATION PERIOD

V. V. Lobov, V. D. Konay, A. N. Bykhovtsev

Central Research Laboratory, Medical Institute, Omsk

Within the early period after clinical death of various duration, hyperglycemia developed in dogs as a result of increased

secretion of catecholamines; the rate of hyperglycemia depended on the severity of postresuscitation impairments of the central nervous system. Content of blood glucose was increased simultaneously with elevation of insulin production. Within 1-2 hrs after administration of dihydroxyphenylalanine the excessive

secretion of catecholamines altered adrenoceptor system sensitivity in Langerhans islands with the subsequent decrease in insulin production. Content of cAMP in brain of resuscitated dogs as compared with controls was increased less drastically.

МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1992

УДК 615.33:577.152.11.017:615.277.31.074

О. Л. Потапова, И. П. Смирнова, В. В. Турчинский, Т. Т. Березов

ПРИМЕНЕНИЕ ОРТОФЕНИЛЕНДИАМИНА В ОПРЕДЕЛЕНИИ АКТИВНОСТИ L-ЛИЗИН- α -ОКСИДАЗЫ И КОНЦЕНТРАЦИИ L-ЛИЗИНА

Университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы, Москва

В 1980 г. в лаборатории проф. Soda [5] был впервые выделен и получен в гомогенном состоянии микробный фермент L-лизин- α -оксидаза (КФ 1.4.3.14.), обладающий противоопухолевой активностью. Исследования оксидаз L-аминокислот до середины 80-х годов были ограничены ввиду использования неспецифических, трудоемких и дорогостоящих методов определения активности, основанных на измерении количества одного из продуктов реакции α -кетокислоты, аммиака или перекиси водорода. В 1984 г. в нашей лаборатории был разработан более простой, но достаточно чувствительный спектрофотометрический метод определения активности L-лизин- α -оксидазы, основанный на измерении количества образующейся в результате реакции перекиси водорода, которая в присутствии пероксидазы окисляет ортоданизиндингидрохлорид (3,3'-диметоксибензидингидрохлорид) с образованием интенсивно окрашенного вещества [3]. Однако существенным недостатком данного метода является не только плохая растворимость ортоданизиндингидрохлорида как в буферных смесях, так и в воде, но и, особенно, его канцерогенный и мутагенный эффекты. Учитывая эти обстоятельства, была предпринята попытка заменить о-гидроксилированное производное ароматического амина — ортоданизиндингидрохлорид — на его негидроксилированный аналог — 3,3', 5,5' — тетраметилбензидин (ТМБ), отсутствие канцерогенного действия которого было установлено экспериментально [2]. Однако использование тетраметилбензидина или дигидрохлорида тетраметилбензидина, также нерастворимого в буфер-

Сравнительная оценка воспроизводимости и чувствительности ОД- и ОФД-микрометодов определения активности L-лизин- α -оксидазы

Показатели воспроизводимости и чувствительности метода	ОД-микрометод	ОФД-микрометод
Средняя арифметическая, \bar{X}	0,270	0,310
Среднеквадратическое отклонение, S	0,019	0,012
Коэффициент вариации, V, %	7,030	3,880
Нижний предел чувствительности ($\bar{X}_{\text{ни}} + 3S$)	0,057	0,036

ных смесях и в воде, требовало добавок в реакционную смесь апротонных растворителей (диоксана, диметилформаида, диметилсульфоксида), а активность L-лизин- α -оксидазы регистрировалась при том значении pH, при котором проявлялось лишь 50 % исходной каталитической активности. Метод, кроме того, по сравнению с уже упомянутым ортоданизиндиновым имел низкую чувствительность [2].

Известно, что ортофенилендиамин [$C_6H_4(NH_2)_2$] близок по химическому строению к ортоданизидину, но в отличие от последнего представляет собой нелетучий таблетированный реактив, хорошо растворимый как в воде, так и в буферных смесях. Весьма важным является и тот факт, что ортофенилендиамин, как известно, представляет собой значительно более безопасный реактив, чем ортоданизидин.

В связи с этим целью настоящей работы были изучение возможности применения в качестве хромогенного донатора протонов в пероксидазной реакции ортофенилендиамины для разработки чувствительного и значительно менее опасного метода определения ферментативной активности L-лизин- α -оксидазы, а также подбор оптимальных условий инкубации реакционной среды.

Методика. В опытах использовали грибовую L-лизин- α -оксидазу, выделенную и очищенную ранее [1].

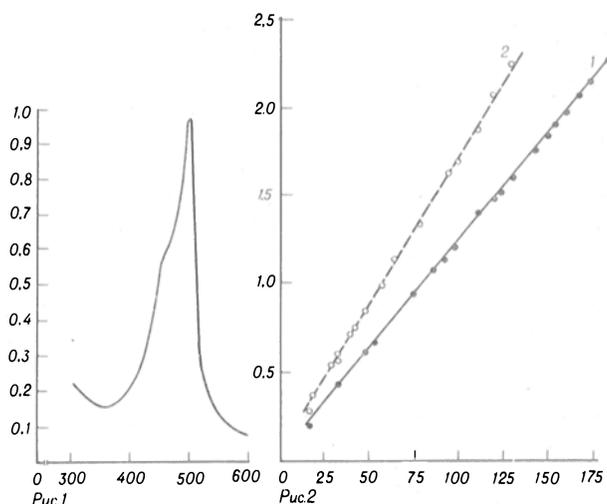


Рис. 1. Спектр оптического поглощения конечных продуктов окисления ОФД.

По оси абсцисс — длина волны, нм; по оси ординат — оптическая плотность.

Рис. 2. Зависимость оптического поглощения растворов с ОД и ОФД от концентрации перекиси водорода в реакционной смеси.

По оси абсцисс — концентрация перекиси водорода в реакционной смеси, нМ; по оси ординат — оптической плотности. 1 — ОД-метод (540 нм); 2 — ОФД-метод (495 нм).

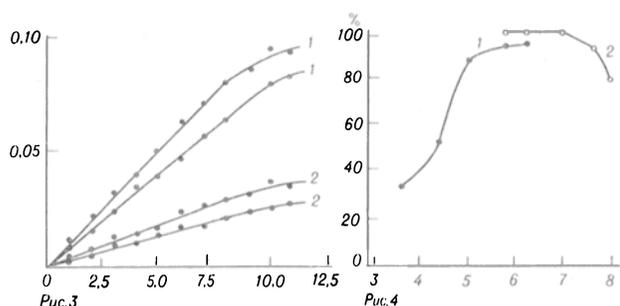


Рис. 3. Зависимость активности L-лизин- α -оксидазы от времени инкубации с ОД (1) и ОФД (2).

По оси абсцисс — время, мин; по оси ординат — активность L-лизин- α -оксидазы, Е/мл. 1 — активность L-лизин- α -оксидазы 0,072 Е/мл; 2 — активность L-лизин- α -оксидазы 0,025 Е/мл.

Рис. 4. Определение активности L-лизин- α -оксидазы ОФД-методом при различных значениях pH.

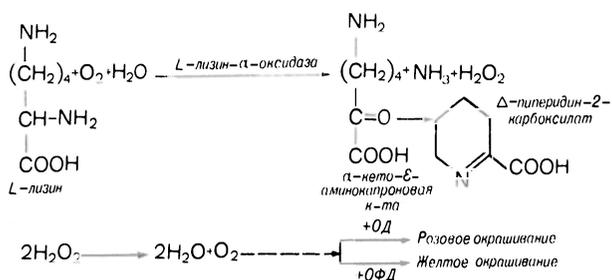
По оси абсцисс — значение pH; по оси ординат — активность L-лизин- α -оксидазы, % к максимальной. 1 — 0,1 М ацетатный буфер; 2 — 0,1 М натрий-фосфатный буфер.

Активность L-лизин- α -оксидазы в водном растворе фермента рассчитывали по простоте H_2O_2 , количество которой определяли спектрофотометрически ортофенилендиаминовым или ортоданизидиновым микрометодом. Сущность их заключается во взаимодействии освобождающейся в реакции H_2O_2 с о-фенилендиамином (ОФД) либо с о-данизидином (ОД). Инкубационная смесь содержала 20 мкг пероксидазы, 1 мг ОФД (или 250 мкг ОД). Субстрат L-лизин и буфер в каждой серии опытов добавляли в определенных концентрациях. Реакцию инцидировали введением 0,1 мл раствора L-лизин- α -оксидазы (одной из двух концентраций — 0,072 МЕ/мл или 0,025 МЕ/мл). После 8–10 мин инкубирования в термостате при 37 °С реакцию останавливали добавлением 1 мл 6 М соляной кислоты. Оптическую плотность окрашенных растворов опытной и контрольной (без субстрата) проб измеряли на спектрофотометре VSU-2P («Carl Zeiss Jena», Германия) при 495 нм против второй контрольной пробы (без пероксидазы) при использовании ОФД и при 540 нм при использовании ОД. Субстратом служил L-лизин («Reanal», Венгрия). В качестве катализатора пероксидазной реакции использовали пероксидазу («Reanal», Венгрия), а в качестве донатора протонов — ОФД или ОД («Serva», Германия).

Для поддержания постоянства pH среды реакционной смеси применяли 0,1 М натрий-фосфатный и 0,1 М ацетатный буферные смеси.

За единицу активности (Е) принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль H_2O_2 за 1 мин при 37 °С.

Результаты и обсуждение. Активность L-лизин- α -оксидазы определяется по количеству образующейся в процессе реакции окислительного дезаминирования перекиси водорода согласно схеме:



Благодаря сопряженной реакции с участием пероксидазы возможно определение количества перекиси водорода по изменению окраски ОД при 540 нм. ОФД также окисляется, однако с образованием продукта, окрашенного в желтый цвет,

максимум поглощения которого составляет 495 нм (рис. 1).

Далее была изучена зависимость оптической плотности окрашенных растворов с ОД и ОФД от концентрации перекиси водорода. Разница в углах наклона кривых на рис. 2 свидетельствует о большей аналитической чувствительности ОФД-микрометода по сравнению с ОД-микрометодом.

В следующей серии опытов была исследована в сравнительном плане кинетика окисления L-лизина ферментом L-лизин- α -оксидазой в реакциях с использованием ОД- и ОФД-хромогенов (рис. 3). Как видно на рис. 3 как в опыте с ОД, так и в опыте с ОФД кривые зависимости оптической плотности от времени инкубации реакционной смеси (при концентрациях субстрата и фермента, указанных выше) выходят на плато через 8 мин для ОФД- и через 10 мин для ОД-реагентов. Следовательно, целесообразно измерение активности фермента с использованием ОФД проводить через 8 мин инкубации пробы. На основании данных рис. 3 можно также сделать заключение, что предлагаемый метод обладает большей чувствительностью, чем ОД-микрометод.

При исследовании pH-зависимости реакции (в интервале 3,6–8,0) ОФД-методом показано (рис. 4), что в диапазоне значений pH 5,8–7,0 относительная активность фермента максимальна. Необходимо отметить, что данная реакция является сопряженной и оптимум pH L-лизин- α -оксидазы смещен к меньшим значениям вследствие присутствия пероксидазы, имеющей кислый pH-оптимум действия. Хромогенные субстраты, к которым относятся ОД, ТМБ и ОФД, также способны менять интенсивность оптического поглощения в зависимости от pH [2]. Из испытанных буферных систем наиболее оптимальным оказался 0,1 М натрий-фосфатный буфер. Однако значительного влияния на величину энзиматической активности состав буфера не оказывал. Для дальнейшей работы в наших условиях использовали 0,1 М натрий-фосфатный буфер pH 5,8.

При изучении наиболее оптимального соотношения компонентов инкубационной смеси при использовании ОФД-метода определения активности L-лизин- α -оксидазы было показано, что пероксидаза добавлена в избытке и изменения ее концентрации в сторону уменьшения или увеличения

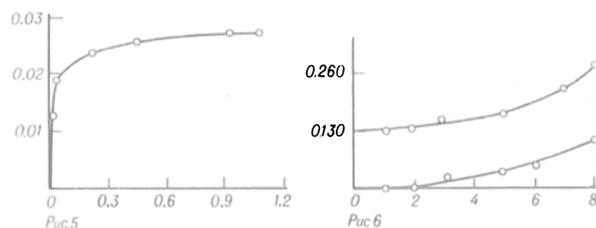


Рис. 5. Зависимость активности L-лизин- α -оксидазы от концентрации ОФД в реакционной смеси.

По оси абсцисс — концентрация ОФД, мг на 1 мл реакционной смеси; по оси ординат — активность L-лизин- α -оксидазы, Е/мл.

Рис. 6. Зависимость оптической плотности реакционной смеси от времени использования исходного раствора ОФД.

По оси абсцисс — время, ч; по оси ординат — оптическая плотность. 1 — контрольный раствор реакционной смеси с ОФД (без фермента); 2 — опытный раствор реакционной смеси.

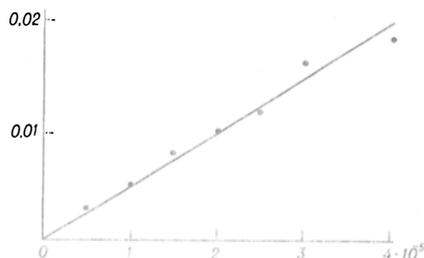


Рис. 7. Зависимость активности L-лизин- α -оксидазы от концентрации L-лизина в реакционной смеси.

По оси абсцисс — концентрация L-лизина, М, по оси ординат — активность L-лизин- α -оксидазы, Е/мл.

ния не оказывают существенного влияния на величину энзиматической активности. В то же время (рис. 5) увеличение концентрации ОФД в реакционной смеси приводит к увеличению оптической плотности, а снижение ее концентрации ниже 0,2 мг/мл — к падению величины ферментативной активности L-лизин- α -оксидазы. Наиболее оптимальной концентрацией ОФД в реакционной смеси является концентрация 1 мг/мл.

В следующей серии опытов изучали возможную продолжительность использования водного раствора ОФД. Как видно на рис. 6 (кривая 1), коэффициент молярной экстинкции (при 495 нм) контрольного раствора реакционной смеси с ОФД имеет тенденцию к увеличению. В случае использования опытного раствора реакционной смеси (кривая 2) наблюдается аналогичная тенденция, позволяющая сделать вывод, что рекомендуемое время использования исходного раствора ОФД в опытах 2 ч.

Представленные в таблице данные о воспроизводимости результатов определения активности противоракового фермента L-лизин- α -оксидазы с использованием ОФД свидетельствуют о том, что предложенный метод отличается не только высокой аналитической чувствительностью, но и хорошей воспроизводимостью и по этому показателю превосходит ОД-метод. Предлагаемый ОФД-метод может быть использован для определения активности не только L-лизин- α -оксидазы, но и оксидаз других L-аминокислот вообще.

При исследовании зависимости активности L-лизин- α -оксидазы от концентрации L-лизина в реакционной смеси была установлена линейная зависимость в пределах концентрации субстрата в среде $0,5 \cdot 10^{-5}$ — $3,5 \cdot 10^{-5}$ М. Кривая, изображенная на рис. 7, может быть использована для определения начальных концентраций L-лизина в биологических жидкостях в силу высокой субстратной специфичности и стереоспецифичности L-лизин- α -оксидазы [4].

Важно отметить, что предлагаемый метод измерения концентрации L-лизина отличается от ранее предложенных [2, 3, 6, 7] высокой чувствительностью, точностью и быстротой проведения анализа. Микрометод определения концентрации L-лизина с использованием ОФД может быть рекомендован для применения в биохимии, медицине, аналитической химии, пищевой и микробиологической промышленности, сельском хозяйстве.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лаугалене Н. Ф., Веса В. С., Янкявичене Р. П. и др. // Вопр. мед. химии. — 1990. — № 4. — С. 88—90.

2. Лукашева Е. В., Березов Т. Т. // Там же. — 1991. — № 3. — С. 39—42.
3. Смирнова И. П., Сяткин С. П., Березов Т. Т. // Там же. — 1984. — № 1. — С. 133—136.
4. Berезov T. T., Lukasheva E. V. // Biochem. int. — 1988. — Vol. 17, N 3. — P. 529—534.
5. Kusakabe H., Kodama K., Kuninaka A. et al. // J. Biol. Chem. — 1980. — Vol. 255, N 3. — P. 976—981.
6. Romette J. L., Yang J. S. // Biotech. a. Bioeng. — 1983. — Vol. 25. — P. 2557—2566.
7. Smirnova I. P., Berезov T. T., Denis G. I. // International Biotechnological Symposium, 8-th. — Paris, 1988. — P. 161.

Поступила 14.04.91

ESTIMATION OF L-LYSINE- α -OXIDASE ACTIVITY AND CONCENTRATION OF L-LYSINE USING O-PHENYLENE DIAMINE

O. I. Potapova, I. P. Smirnova, V. V. Turchinsky, T. T. Berезov

P. Lumumba People's Friendship University, Moscow

A spectrophotometric procedure for estimation of L-lysine- α -oxidase activity involved measurement of optical density in samples after reaction of the H_2O_2 formed with o-phenylene diamine. Suitable values of pH, o-phenylene diamine concentration and time of incubation were chosen. The procedure developed was distinctly dissimilar as compared with the methods currently widely used. Advantages of the new method are due to its sensitivity, reproducibility, accessibility, relative safety and short time of the reaction performance. The procedure may be used for estimation of L-lysine content in various biological materials.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1992

УДК 615.356:577.161.31.03:616.1-092.9

Ю. В. Хмелевский, Н. Б. Поберезкина, О. В. Заборина, О. И. Толстых, О. А. Васильченко

ВИТАМИН Е И ЕГО СИНТЕТИЧЕСКИЕ АНАЛОГИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ ПАТОЛОГИИ

Киевский медицинский институт им. А. А. Богомольца

Интенсивность аэробного метаболизма в миокарде предопределяет его высокую потребность в витаминах, ограничивающих активность свободнорадикального окисления.

При патологических состояниях зависимость функций сердца от обеспеченности витаминами возрастает.

Важный природный антиоксидант — витамин Е (α -токоферол) оказался эффективным при различных поражениях сердца и сосудов, сопровождающихся активацией перекисного окисления липидов (ПОЛ): стрессе, атеросклерозе, ишемии и др. [5, 6, 8, 9].

В настоящем сообщении обобщены результаты исследований последних лет, проведенных на кафедре биохимии Киевского медицинского института с целью обоснования в эксперименте эффективности витамина Е и его синтетических аналогов при поражениях миокарда различной природы: гемодинамических нарушениях (коарктация брюшной аорты), гипоксических и стрессорных воздействиях. Задача исследования состояла также в сравнении эффективности фармакопейного α -токоферола и его синтетических аналогов. С этой целью проведены исследования на модели Е-гиповитаминоза, а также в модельных системах *in vitro*.

Методика. Опыты проводили на белых крысах массой 160—220 и 60—80 г. Моделировали поражения сер-

ПОЛ и активность АОФ в миокарде при коарктации брюшной аорты и их коррекции витаминами

Показатель	День после операции					
	3-й		14-й		30-й	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
НЗП	3,5±0,4	5,0±0,34 (3,77±0,4)	3,2±0,45	4,2±0,32 (3,1±0,36)	3,04±0,3*	4,0±0,28
Г-6-ФД	6,85±0,34	8,23±0,23*	7,1±0,41	9,87±0,3*	7,0±0,3	9,0±0,4*
ГР	22,4±0,6	14,7±0,6*	21,3±0,5	17,6±0,3	21,5±0,2	19,8±0,5 (21,2±0,4)
ИЦД	135,2±9,5	119,5±9,8	140,3±8,1	165,7±8,7 (184,9±7,2)	138,6±8,7	177,4±9,3 (203±10,7)
ТК	7,6±0,4	6,6±0,2*	7,7±0,4	6,5±0,2*	7,6±0,3	6,8±0,2

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3 приведены средние данные из 6—11 опытов. Звездочка — различия с контролем достоверны. В скобках — достоверные изменения соответствующих показателей при коррекции витаминами Е и В₁. Активность ТК выражена в микромолях на 1 г ткани за 1 ч, активность других ферментов — в наномолях на 1 мг белка за 1 мин.

дечно-сосудистой системы: дозированную коарктацию брюшной аорты, сопровождающуюся нарушениями гемодинамики большого круга, развитием гипертрофии сердца [7]; (в модификации); гистотоксическое поражение миокарда при введении больших доз адреналина [2]; изолированное сердце на различных стадиях развития его гипертрофии [16]; острую гипоксическую гипоксию («подъем» крыс на высоту 11 000 м в барокамере с экспозицией 50 мин).

Е-гиповитаминоз воспроизводили путем содержания крысят-отъемышей на синтетической диете, лишенной витамина Е, в течение 2 мес [4]. При этом содержание витамина в крови составляло 10 % от исходного [1].

Витамин Е и его аналоги вводили перорально из расчета 50 мг на 1 кг массы.

Синтез аналогов α-токоферола осуществлялся в Институте органической химии и Институте биологической химии АН УССР (А. А. Свищук, В. А. Постоевко).

После декапитации животных субклеточные фракции ткани миокарда (митохондриальную, постмитохондриальную, саркоплазматический ретикулум) выделяли на холоду в 0,15 М КСl общепринятым методом дифференциального центрифугирования. В субклеточных фракциях миокарда (в ряде случаев печени, эритроцитах) определяли скорость образования малонового диальдегида (МДА) при стимуляции аскорбатом — АЗП (аскорбатзависимое ПОЛ) и НАДФ-Н — НЗП [3]; содержание свободных SH-групп с реактивом Эллмана; активность антиоксидантных ферментов (АОФ) и некоторых связанных с ними ферментов: глутатион-редуктазы (ГР; КФ 1.6.4.2) [11], глутатион-S-трансферазы (ГТ; КФ 2.5.1.18) [15], глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФД; КФ 1.1.1.49), изоцитратдегидрогеназы (ИЦД; КФ 1.1.1.42) [11], Cu, Zn-содержащей супероксиддисмутазы (СОД; КФ 1.15.1.11) [12], транскетолазы (ТК; КФ 2.2.1.1) [14]. Результаты обрабатывали статистически с вычислением критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. При коарктации брюшной аорты в хроническом эксперимен-

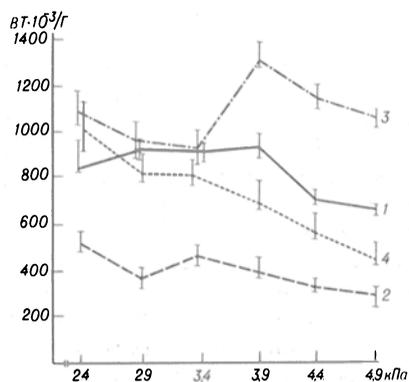


Рис. 1. Зависимость между аортальным давлением (в кПа) и минутной работой сердца (в Вт·10⁻³/г ткани) при коарктации брюшной аорты и ее коррекции витаминами Е и В₁.

1 — ложная операция; 2 — коарктация; 3 — ложная операция+витамины; 4 — коарктация+витамины.

те (30 сут) изучали возможность использования витамина Е в комплексе с тиаминном для коррекции метаболизма миокарда при развитии его гипертрофии и недостаточности. Контрольных животных в этих исследованиях также оперировали под гексеналовым наркозом (вскрывали брюшную полость, но без пережатия аорты). По нашим данным, у подопытных крыс в течение всего периода (3, 14 и 30-е сутки) отмечалась активация ПОЛ (в частности, НЗП), наиболее выраженная в начальной (аварийной) стадии (табл. 1). В это же время (3-и сутки) наиболее выражено снижение активности глутатионредуктазы, транскетолазы и изоцитратдегидрогеназы в сердце. Введение животным комплекса витаминов Е и В₁ эффективно предотвращало активацию НЗП в аварийном периоде, а при длительном введении (30-е сутки) отмечалась активация ферментов (см. табл. 1). Синтетические процессы в миокарде подопытных крыс усиливались (возрастала относительная масса сердца), но некоторые процессы оставались некомпенсированными: была снижена активность ТК и ГТ (до 0,44 мкмоль/мг белка при норме 0,58 мкмоль/мг), что, очевидно, свидетельствует о развитии сердечной недостаточности.

Интегральным показателем эффективности действия комплекса витаминов на миокард в условиях гемодинамических нарушений служили данные о функции изолированного сердца. Эти исследования показали, что комплекс витаминов Е и В₁ существенно увеличивает минутную работу сердца, т. е. способствует улучшению его сократительной функции, особенно в стадии стабиль-

Таблица 2

Активность АОФ и содержание SH-глутатиона в миокарде и крови крыс при гипоксических поражениях сердца

Показатель	Контроль	Гипоксическая гипоксия	Гистотоксическая (адреналиновая) гипоксия
СОД:			
миокарда, ед/мг ткани	1,55±0,2	1,20±0,2	6,2±0,5*
крови, ед/мкл	2,4±0,1	2,0±0,25	3,0±0,3
ГТ, мкм/мг белка/мин	0,58±0,05	0,54±0,03	0,44±0,04*
SH-глутатион:			
миокарда, мкм/г ткани	4,7±0,5	4,9±0,6	3,3±0,29*
эритроцитов, мкм/мл	2,2±0,3	2,0±0,2	2,5±0,3

Таблица 3

ПОЛ и активность АОФ при Е-гиповитаминозе и его коррекции препаратами витамина Е

Показатель	Контроль	Е-гиповита- миноз	α -Токофе- рол + E_{ϕ}	α -Токофе- рол + E_1
ПОЛ (миокард), нмоль МДА/мг белка за 15 мин:				
АЗП	1,25 ± 14,0	245,3 ± 52*	106,0 ± 28,5*	116,7 ± 12,0*
ИЗП	752,0 ± 208,0	815,0 ± 205,0	480,0 ± 100,0*	402,0 ± 95*
ГР (миокард), мкмоль/мг белка/ мин	18,2 ± 0,9	12,9 ± 0,25*	14,6 ± 0,8*	20,1 ± 0,35*
СОД (эритроциты), ед/мкл	12,0 ± 1,1	6,6 ± 0,5	8,2 ± 0,7	9,0 ± 1,0*

ной компенсации (рис. 1). Таким образом, можно рассматривать эффект комплекса витаминов Е и В₁ как положительный, предотвращающий развитие декомпенсации в условиях повышенной нагрузки на сердце.

При острой гипоксии («подъем» на высоту 11 000 м крыс массой 160—220 г), по нашим данным, не было отмечено существенных изменений в системе глутатиона и зависимых от него ферментов (табл. 2). Однако, по нашим данным, подтверждающим сообщение [13], снижения уровня ПОЛ, судя по скорости образования МДА, не отмечалось. Имелась даже тенденция к активации ПОЛ; снижение активности СОД в миокарде и крови не было достоверным. В ряде случаев у животных, находящихся в тяжелом состоянии, активность СОД крови была достоверно ниже нормы, однако уже через 30 мин после «спуска» активность нормализовалась. Очевидно, в системе АОФ при острой гипоксической гипоксии имеется запас прочности, и, таким образом, не имело смысла изучать коррекцию витамином Е этих показателей.

Наши предыдущие исследования показали, что фармакопейный α -токоферол и ряд синтетических производных (в первую очередь короткоцепочечный E_1) при их предварительном введении крысам за 3 ч до «подъема» в дозе 25 мг/кг массы увеличивают переживаемость животных на высоте 11 000 м. Два из исследуемых препарата были предложены как антигипоксические средства.

Гистологическое поражение сердца (так называемый адреналиновый миокардит) при введении больших доз катехоламина вызывает глубокие изменения структуры клеток миокарда, вплоть до микронекрозов, что сопровождается резкой активацией ПОЛ и соответственно нарушениями в системе антиоксидантов: исчерпываются запасы

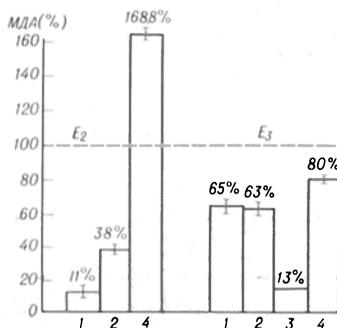


Рис. 2. Ингибирование АЗП синтетическими аналогами витамина Е — препаратами E_2 и E_3 — *in vitro*. Доза препарата, мг на пробу: 1 — 10, 2 — 50, 3 — 100, 4 — 150.

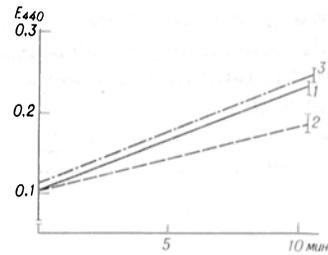


Рис. 3. Ингибирование синтетическим препаратом E_2 фотоокисления рибофлавина и восстановления тетразолия *in vitro*.

SH-глутатиона, а избыточное образование радикалов супероксида индуцирует СОД (см. табл. 2). В этой ситуации использование α -токоферолов (лечебная доза 50 мг/кг массы) патогенетически обосновано. По нашим данным, витамин Е фармакопейный (E_{ϕ}) и его синтетический аналог с укороченной боковой цепью (E_1) способствовали активации ГР и ГТ в миокарде (соответственно на 30 и 20%), повышению уровня свободных тиолов в ткани сердца и крови.

С целью изучения в сравнительном плане роли витамина Е и его аналогов, механизма их положительного эффекта при поражениях сердца ряд исследований проводили на модели Е-витаминовой недостаточности у крыс, а также *in vitro*. Обнаружено, что в условиях недостатка антиоксиданта в тканях Е-гиповитаминозных крыс существенно возрастают процессы ПОЛ, в сердце они также значительно выше нормы, особенно АЗП (табл. 3). Характерно снижение активности СОД в эритроцитах; α -токоферол считают индуктором СОД [10].

В результате активации ПОЛ страдают не только липидные, но и белковые структуры миокарда. При электрофорезе митохондриальных белков миокарда у Е-гиповитаминозных крыс обнаружено возрастание доли высокомолекулярных фракций и снижение фракции, соответствующей белку с мол. м. 68 кД, т. е. имеет место образование сшивок биополимеров-белков. Поражение сердца при Е-гиповитаминозе подтверждают и электрокардиографические данные: недостаток витамина Е вызывает нарушение метаболизма и функции сердца, а также нарушения электрической активности, характерные для гипоксии миокарда.

Для коррекции обнаруженных при Е-гиповитаминозе сдвигов использовали E_{ϕ} и E_1 . По нашим данным, синтетический препарат по эффективности не уступает фармакопейному (см. табл. 3).

Нами проведено изучение *in vitro* нового синтетического аналога α -токоферола с модификацией в хромановом кольце (E_2) и производного с укороченной насыщенной боковой цепью (E_3).

Изучали ингибирование неферментативного ПОЛ в системе, содержащей постмитохондриальную фракцию ткани печени, аскорбат и Fe^{2+} (2 мл), а также ингибирование электронного транспорта в системе фотоокисления рибофлавина и восстановления тетразолия. Препарат E_2 эффективно ингибировал ПОЛ в малых дозах (10 и 50 мкг на пробу), а доза 150 мкг оказалась прооксидантной; E_3 наибольший ингибирующий ПОЛ эффект давал в дозе 100 мкг (рис. 2).

В электронтранспортной системе E_2 также эффективен в малых дозах: даже 2,5 мкг на 1 мл

вызывает торможение восстановления тетразолия на 30 % (рис. 3). Очевидно, модификация кольца повышает гидрофильность соединения и способность ингибирования радикалов, но образовавшийся радикал такого аналога и сам может, особенно в больших дозах, активировать ПОЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Архипенко Ю. В., Джапаридзе Л. М., Гуткин Д. В. // Вopr. мед. химии.— 1987.— № 1.— С. 122—127.
2. Вишнева О. П. // Бюл. экспер. биол.— 1954.— № 10.— С. 29—31.
3. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.— М., 1972.
4. Донченко Г. В., Кузьменко И. В., Коваленко В. П., Халмуратов А. Г. // Укр. биохим. журн.— 1979.— Т. 51, № 5.— С. 530—536.
5. Джапаридзе Л. М., Белкина Л. М., Досмагамбетова Р. С. // Вopr. питания.— 1986.— № 3.— С. 41—46.
6. Калмыкова В. И. // Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии.— М., 1982.— С. 181—194.
7. Коган А. Х. // Бюл. экспер. биол.— 1961.— № 1.— С. 112—115.
8. Ланкин В. З., Котелевцева Н. В., Познахирев П. Р. // Биофизические и физико-химические исследования в витаминологии.— М., 1984.— С. 58—61.
9. Меерсон Ф. З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца.— М., 1984.
10. Побережкина Н. Б., Осинская Л. Ф. // Укр. биохим. журн.— 1989.— Т. 61, № 2.— С. 14—27.
11. Путилина Ф. Е., Зондзе С. Д. // Методы биохимических исследований.— Л., 1982.— С. 168—172.
12. Чумаков В. П., Осинская Л. Ф. // Вopr. мед. химии.— 1979.— № 3.— С. 261—266.
13. Шафран Л. М., Гукевич Е. К., Левицкий А. П. // Укр. биохим. журн.— 1979.— Т. 51, № 2.— С. 107—110.
14. Brunz F., Dünwald E., Noltmann E. // Biochem. Z.— 1958.— Bd 330.— S. 497—508.
15. Kraus P., Gross B. // Enzyme.— 1979.— Vol. 24, N 3.— P. 205—208.
16. Neely J. R., Leibermeister H., Battersly E. J., Morgan H. E. // Amer. J. Physiol.— 1967.— Vol. 212, N 4.— P. 804—814.

Поступила 08.08.91

VITAMIN E AND ITS SYNTHETIC ANALOGUES IN EXPERIMENTAL CARDIOVASCULAR PATHOLOGY

Yu. V. Khmelevsky, N. B. Poberezkina, O. V. Zadorina, O. I. Tolstykh, O. A. Vasilchenko

A. A. Bogomoletz Medical Institute, Kiev

Oxidative metabolism and the antioxidation system were studied in the myocardium of rats with various experimental impairments of heart tissue. Vitamin E and its synthetic derivatives proved to be effective in correction of the deteriorations observed.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1992

УДК 616-006.04-07.1616-008.94:577.164.11.151-085.356

Р. В. Требухина, Т. А. Колтанюк, В. Г. Петушок, Г. Н. Михальцевич, Л. К. Лашак, Э. А. Гриценко

ОБМЕН ВИТАМИНОВ В₁ И РР И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ОНКОЛОГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Институт биохимии АН Беларуси, Гродно

Развитие опухоли в организме больных сопровождается нарушением витаминного баланса [18]. Развитие гиповитаминозных состояний при злокачественной трансформации обосновывает целесообразность изучения возможности ис-

пользования витаминов для коррекции нарушенного обмена. Интерес к изучению роли тиамин при злокачественном росте определяется его коферментными свойствами. К ним относятся процессы образования рибозо-5-фосфата и восстановленных эквивалентов НАДФ в пентозофосфатном цикле, частью которого является фермент транскетолаза, регулирующий через кофермент тиаминдифосфат (ТДФ) биосинтез и утилизацию фосфопентоз в клетке [11]. Имеются данные о связи между уровнем НАД и синтезом ДНК [14, 15, 17]. Установлено [7], что в момент усиленного синтеза ДНК в клетках (злокачественный рост) наблюдается снижение уровня НАД. В этой связи несомненный интерес представляет изучение обмена пиацина (витамина РР) в организме, пораженном опухолью. Действие многих противоопухолевых препаратов основано на взаимодействии с ферментами, участвующими в биосинтезе предшественников составных частей молекул ДНК и РНК [12]. Можно предположить, что полихимиотерапия, включающая цитостатики с различными механизмами действия, может увеличивать витаминный дисбаланс. Примером может служить 5-фторурацил, который проявляет свойства антагониста ТДФ [8], или циклофосфан, поступающий в организм в неактивной транспортной форме. Представлялось целесообразным изучить обмен витаминов В₁ и РР в условиях химиотерапии и оценить вклад этих витаминов в составе комплексной онкотерапии.

Методика. Исследовали кровь 58 больных раком желудка при поступлении их в стационар, через 4 дня после поступления (период акклиматизации в больнице) и после курса химиотерапии. Циклофосфан больные получали в дозе 200 мг внутримышечно ежедневно 1 раз в день в течение 12 дней. Контрольными пробами служила кровь 20 здоровых доноров. Экспериментальная часть работы выполнена на мышах-гибридах С57 Black и С13 первого поколения разведения питомника «Ранолово» РАМН, содержащихся на обычном рационе вивария. Асцитную опухоль Эрлиха прививали в дозе 1,5·10⁶ клеток внутрибрюшинно от мышидонора на 8-е сутки роста опухоли. Всех животных-опухоленосителей разделили на 7 групп по 10 в каждой. Циклофосфан в дозе 100 мг/кг вводили внутрибрюшинно двукратно: через 24 ч и на 5-й день после инокуляции им опухоли. В промежутках между введением цитостатиков вводили витамин В₁ (0,5 мг/кг), или витамин РР (1 мг/кг), или смесь этих витаминов подкожно. Отдельно были исследованы группы животных, получавших витамины без циклофосфана. Декапитацию животных осуществляли на 8-й день после прививки им опухоли. Активность транскетолазы определяли по методу [3]. ТДФ-стимулирующий эффект выражали в процентах по отношению к пробе, incubированной в аналогичных условиях без добавления ТДФ. Уровень ТДФ определяли ферментативным методом [10]. Содержание НАД, НАДФ, НАДН, НАДФН определяли флуориметрически [10], активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы — спектрофотометрически [1], активность тиаминпирофосфатазы — по накоплению неорганического фосфата [21].

Результаты и обсуждение. Клинические формы дефицита тиамин, описанные как самостоятельные заболевания, характеризуются определенным комплексом симптомов, и точная диагностика их в этом случае не вызывает никаких трудностей [9]. Значительно сложнее обстоит дело с гиповитаминозными состояниями. Большая часть проявлений недостаточности тиамин является следствием первичных биохимических изменений. Так, снижение активности транскетолазы в эритроцитах при дефиците тиамин обусловлено недостатком его коферментной формы

Таблица 1

Показатели обмена витаминов В₁ и РР в крови больных раком желудка при послеоперационной химиотерапии

Исследуемый показатель	Контроль (доноры)	Больные		
		а	б	в
Транскетолаза, мкМ/л/с	3,99±0,13	3,25±0,11	3,23±0,09	2,9±0,07
ТДФ-эффект, %	11±0,97	17±0,25	16±0,11	25±0,04
Тиаминдифосфат, мкг/мл эритроцитов	0,129±0,009	0,111±0,003	0,127±0,001	0,095±0,01
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, мкМ НАДФН/л/с	15,03±0,08	22±0,041	15±0,013	16±0,012
НАД+НАДФ, мкг/мл	53,4±2,01	60,8±1,04	60,1±1,06	43,7±0,83
НАДН+НАДФН, мкг/мл	20±1,04	22,7±0,34	20±0,31	18,6±0,27

Примечание. а — при поступлении больных в стационар; б — перед химиотерапией; в — после химиотерапии.

ТДФ [24]. Активность транскетолазы в эритроцитах здоровых людей колеблется от 3,6 до 3,9 мкМ/л·с⁻¹ (табл. 1), ТДФ-эффект — от 0 до 11 %. Величина ТДФ-эффекта характеризует количество свободной (не насыщенной коферментом) транскетолазы [2, 6]. При профилактических осмотрах различных групп населения с обследованием витаминного статуса у отдельных лиц выявляется ТДФ-эффект до 10—15 % [20]. При обследовании доноров из 20 у 6 лиц мы обнаруживали ТДФ-эффект от 13 до 18 %. Полученные данные указывают на недостаточное обеспечение здоровых людей витамином В₁. Дополнительным подтверждением этого является уровень ТДФ в крови (0,129 мкг/мл). Данные литературы указывают на 0,160 мкг/мл как оптимальное обеспечение тиаминем здорового организма [10]. Уровень никотинамидных коферментов колеблется в крови в очень широких пределах — от 39 до 60 мг/л, поэтому приведенная в табл. 1 величина 53,4±0,08 мг/л (НАД+НАДФ) и 20±±1,04 мг/л для восстановленных никотинамидных коферментов соответствует норме. При поступлении больных раком желудка в стационар отмечено снижение активности транскетолазы на 20 %, аналогичное уменьшение количества кофермента и повышение ТДФ-эффекта в среднем до 17 %. Результаты наших исследований согласуются с данными литературы по другим видам опухолей [5, 18, 22] и указывают на развитие недостаточности тиамин у больных со злокачественным ростом. Уровень никотинамидных коферментов не изменяется в крови пациентов

Таблица 2

Содержание опухолевых клеток у мышей с АКЭ после введения им ЦФ, Т или витамина РР (n=10)

Условия опытов	Общий объем опухолевой взвеси, мл	Торможение, %	Число опухолевых клеток в 1 мл	Торможение, %
АКЭ без воздействий	6,07±0,33	—	1,42±0,05	—
АКЭ + ЦФ	2,06±0,35	67	0,67±0,11	53
АКЭ + Т	6,03±0,28	—	1,0±0,04	30
АКЭ + РР	5,05±0,17	17	0,93±0,04	35
АКЭ + Т + РР	5,83±0,11	4	0,83±0,03	42
АКЭ + ЦФ + Т	3,95±0,15	35	0,77±0,03	46
АКЭ + ЦФ + РР	2,62±0,29	57	0,80±0,04	44
АКЭ + ЦФ + РР + Т	2,02±0,36	67	0,9±0,01	37

Примечание. Здесь и в табл. 3 и 4: АКЭ — асцитная карцинома Эрлиха, ЦФ — циклофосфан, Т — тиамин.

при поступлении их в больницу, а активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы увеличивается на 46 %. Известно, что опухолевые клетки активно утилизируют глюкозу, а с момента малигнизации опухолевого очага организм становится объектом его системного действия [16].

После курса химиотерапии только у одного больного количество ТДФ в крови не изменилось. У остальных больных наблюдали снижение содержания кофермента на 20—40 % по сравнению с количеством ТДФ, которое определяли у пациентов при поступлении в стационар (см. табл. 1), т. е. до лечения. ТДФ-эффект после курса химиотерапии увеличился с 17 до 25 %. Отмечены колебания ТДФ-эффекта от 30 до 47 %, что является признаком умеренной (до 30 %) или тяжелой (более 40 %) биохимической недостаточности тиамин [2]. Окислительно-восстановительный потенциал крови после курса химиотерапии также нарушается. Количество окисленных никотинамидных коферментов после лечения больных циклофосфаном снижается на 30 %, а уровень НАДН+НАДФН — на 20 % (см. табл. 1). Имеются данные о том, что некоторые цитостатики могут способствовать развитию дефицита витаминов. Так, использование 5-фторурацила приводит к увеличению ТДФ-эффекта и снижению активности транскетолазы [19]. 5-Фторурацил конкурирует с ТДФ в реакции присоединения фосфата, переходя в активную форму — 5-фтор-2-дезоксисуридинмонофосфат. Высокие дозы алкилирующих агентов истощают в организме пул НАД [23]. Циклофосфан в ряду других цитостатиков, применяющихся в онкологии, занимает важное место. Вместе с тем он токсичен. Циклофосфан обладает иммунодефицитным свойством, расстраивает нуклеиновый обмен [4], а по нашим данным, усугубляет дефицит витаминов В₁ и РР.

Нами было проведено исследование на мышях с асцитной карциномой Эрлиха и дополнительным введением животным циклофосфана, витамина В₁, РР или смеси этих двух витаминов.

Дополнительные инъекции витаминов (раздельно либо совместно) повышали переносимость мышшей к вводимой дозе циклофосфана, не нарушая при этом его противоопухолевую активность (табл. 2). Циклофосфан тормозит рост опухоли на 53 %. Продолжительность жизни при этом снижается на 30 %. Введение циклофосфана совместно с тиамин или никотинамидом нейтрализует его токсичность и увеличивает продолжительность жизни животных в среднем на 60 % по сравнению с группой нелеченых мышшей.

Ни тиамин, ни никотинамид не стимулируют рост асцитной карциномы Эрлиха (см. табл. 2). Биохимические показатели нарушений обмена витаминов В₁ и РР в эритроцитах мышшей с асцитной карциномой Эрлиха аналогичны отмеченным у больных раком желудка. Активность транскетолазы в эритроцитах мышшей с асцитной карциномой Эрлиха снижена на 48 %, а при введении циклофосфана — на 65 %. ТДФ-эффект, отсутствующий в эритроцитах интактных мышшей, повышается на 18 % в крови животных-опухоленосителей, а при лечении циклофосфаном увеличивается до 30 %. Введение тиамин с циклофосфаном снижает ТДФ-эффект до 8 %, повышает

Показатели обмена тиамин в печени интактных мышей и мышей с АКЭ после введения им ЦФ, Т или витамина РР (n=10)

Условия опытов	Интактные мыши			Мыши с АКЭ		
	ТК	ТПФ-аза	ТДФ	ТК	ТПФ-аза	ТДФ
Контроль	106±7,8	3,91±0,31	6,4±0,46	76±6,3*	4,81±0,27	2,53±0,62*
ЦФ	98±4,7	5,07±0,10*	6,8±0,35	70±4,4	7,11±0,37*	1,8±0,33*
Т	103±3,4	3,77±0,13	8,0±0,49*	68±4,1	4,1±0,23	3,3±0,37
РР	93±3,1	4,01±0,14	6,9±0,34*	74±4,5	5,4±0,27	2,8±0,21
Т+РР	114±1,9	3,18±0,11	5,5±0,39	75±1,2	4,4±0,32	2,4±0,34
ЦФ+РР	99±3,1	4,24±0,22	6,3±0,27	78±3,5	5,5±0,35	3,5±0,42
ЦФ+Т	116±3,8	4,0±0,15	5,3±0,36	74±5,5	4,3±0,21	2,4±0,23
ЦФ+РР+Т	112±4,9	5,47±0,15	6,4±0,37	87±4,4	6,5±0,18	1,8±0,26

Примечание. ТК — транскетолаза (в мкМ седогентулозо-7-фосфата на 1 л крови в 1 с); ТПФ-аза — тиаминпирирофосфатаза (в мкг P_u на 1 мг белка); ТДФ в мг на 1 кг ткани. Здесь и в табл. 4 звездочка — статистически достоверные различия (p<0,05).

активность транскетолазы на 40 %, но не нормализует активность фермента до уровня интактных животных. Наиболее глубокие изменения обмена витаминов В₁ и РР при злокачественном росте происходят в гепатоцитах.

Уровень ТДФ в печени животных-опухоленосителей снижается на 61 % (табл. 3), а при лечении циклофосфаном содержание кофермента в гепатоцитах равно лишь 1,8 мг/кг (28 %). Количество ТДФ в печени находится в обратной зависимости с активностью тиаминпирирофосфатазы. При злокачественном росте ее активность повышается на 23 %, а при введении циклофосфана — почти в 2 раза. Введение тиамин способствует частичному восстановлению уровня кофермента в печени и снижению активности в ней тиаминпирирофосфатазы. Витамин РР не оказывает существенного действия на уровень ТДФ в гепатоцитах, однако введенный совместно с тиамин или в комплексе (тиамин, циклофосфан, никотинамид) нейтрализует позитивное действие тиамин на уровень кофермента в печени (см. табл. 3). Известно, что у молодых крыс, лишенных витаминов группы В, характерные признаки авитаминоза В₁ проявлялись даже в том случае, если они получали никотинамид в очень малых дозах [13]. Ранее нами было показано, что в основе девитаминизирующего действия опухоли на организм ее носителя лежит активная ассимиляция тиамин опухолевыми клетками [24]. Введение никотинамида таким животным совместно с тиамин нежелательно, так как оно способствует проявлению интенсивности авитаминоза В₁. С другой стороны, введение ин-

тактным мышам тиамин повышает на 25 % уровень ТДФ в печени, а совместные с никотинамидом инъекции снижают уровень кофермента на 15 %. Последствием длительного введения никотинамида в дозе, двукратно превышающей дозу тиамин, является провоцирование недостаточности витамина В₁.

В табл. 4 представлены некоторые показатели активности окислительных этапов пентозофосфатного пути обмена углеводов у мышей с асцитной карциномой Эрлиха. Введение циклофосфана и витаминов В₁ и РР не влияет существенно на уровень НАДФ и НАДФН в печени интактных мышей. Развитие опухоли в организме мышей сопровождается незначительным снижением количества НАДФ (на 13 %) и НАДФН (на 27 %). Инъекции циклофосфана еще более усугубляют падение уровня восстановленного НАДФН (до 60 %) по сравнению с интактными животными (см. табл. 4). Введение витаминов не изменяет ситуацию, и лишь совместное введение циклофосфана с никотинамидом повышает уровень НАДФН (всего на 14 %). Планируя введение тиамин или никотинамида в организм животных-опухоленосителей, мы исходили из того, что регуляция пентозофосфатного пути обмена углеводов может осуществляться двумя витаминами: на уровне окислительных реакций — никотиновой кислотой, предшественником НАДФ, а в транскетолазной реакции — витамином В₁ через ТДФ. Скорость окислительных и неокислительных реакций пентозофосфатного пути в свою очередь зависит от уровня насыщения тканей этими витаминами, а также от потребности клетки в

Таблица 4

Активность Г-6-ФДГ и уровень НАДФ и НАДФН в печени интактных мышей и мышей с АКЭ после введения им ЦФ, Т или витамина РР (n=10)

Условия опытов	Интактные мыши			Мыши с АКЭ		
	НАДФ, мг/кг	НАДФН, мг/кг	Г-6-ФДГ	НАДФ, мг/кг	НАДФН, мг/кг	Г-6-ФДГ
Контроль	57±2,7	163±5,5	213±4,4	50±6,3	120±6,6	317±5,8*
ЦФ	66±4,4	154±8,4	124±8,4*	68±4,4*	105±9,2	430±12,5
Т	48±4,3	151±7,9	141±5,3*	58±7,5	105±7,9*	377±7,0
РР	52±2,6	168±9,6	215±13,4	49±5,0	106±10,1	344±11,2
Т+РР	64±9,7	183±4,5*	153±8,1*	59±4,0	94±5,3*	504±9,9*
ЦФ+Т	46±2,1*	165±9,2	172±4,8*	70±4,0*	117±8,1	297±9,4
ЦФ+РР	49±2,7	163±10,4	123±9,7*	56±3,8	137±9,5	299±11,8
ЦФ+РР+Т	51±3,3	185±6,1*	160±3,0*	53±3,4	94±5,4	465±17,3*

Примечание. Г-6-ФДГ — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (в мк М НАДФН на 1 г белка в 1 с).

восстановительных эквивалентах (НАДФН) или субстратах-предшественниках (пентоз) для биосинтеза нуклеиновых кислот.

Образование пентозофосфатов в окислительных реакциях осуществляется с помощью ферментов глюкозо-6-фосфат- и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы. В печени мышей с асцитной карциномой Эрлиха при угнетении неокислительного образования пентоз через транскетолазную реакцию на 18 % и сниженном уровне ТДФ на 60 % (см. табл. 3) наблюдали обратную зависимость от интенсивности окисления пентозофосфатов; активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы повышалась на 49 % (см. табл. 4). При введении циклофосфана, который еще более усугубляет дефицит тиамина, активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы повышается почти в 2 раза по сравнению с активностью фермента у интактных животных (см. табл. 4).

Раздельно введенные витамины не изменяют активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в печени животных-опухоленосителей, а смесь тиамина и никотиамида повышает активность фермента на 58 %. Добавление к этим двум витаминам циклофосфана также повышает активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы на 47 %, т. е. при этом преобладает окислительный путь биосинтеза пентозофосфатов. Следует также отметить, что введение витаминов В₁, РР и циклофосфана интактным животным не всегда приводило к сходным результатам. Циклофосфан тормозил активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы на 42 % (см. табл. 4), а витамин РР, являющийся предшественником кофермента (НАДФ), не снимал ингибирующего действия циклофосфана.

ЛИТЕРАТУРА

1. Асатиани В. С. Ферментативные методы анализа. — М., 1969.
2. Бостон Л. Я. // Вопр. мед. химии. — 1975. — № 4. — С. 339—343.
3. Дьячкова Л. В., Шамаева Е. М., Платонова Г. П., Спиричев В. Б. // Вопр. питания. — 1972. — № 2. — С. 42—47.
4. Земсков А. М., Войтекунас Е. Б. // Вопр. онкол. — 1986. — № 6. — С. 98—101.
5. Исмаилова Т. С., Погосов В. С., Спиричев В. Б. // Вопр. мед. химии. — 1971. — № 1. — С. 76—82.
6. Кочетов Г. А. Тиаминовые ферменты. — М., 1978.
7. Михальцевич Г. П., Трехбукина Р. В. // Вестн АН БССР. — 1990. — № 3. — С. 63—66.
8. Ольшевская Е. В. // Актуальные вопросы искусственного питания в онкологии. — М., 1988. — С. 72—73.
9. Островский Ю. М. Тиамины. — Минск, 1971.
10. Островский Ю. М. Экспериментальная витаминология. — Минск, 1979.
11. Островский Ю. М. Активные центры и группировки в молекуле тиамина. — Минск, 1975.
12. Переводникова Н. И. Клиническая химиотерапия опухолевых заболеваний. — М., 1976.
13. Терриан Т. Взаимодействия витаминов. — М., 1969.
14. Халмурадов А. Г., Тоцкий В. Н., Чаговец Р. В. Мембранный транспорт коферментных витаминов и коферментов. — Киев, 1982.
15. Чаговец Р. В., Шушевич С. И., Халмурадов А. Г. // Укр. биохим. журн. — 1975. — № 5. — С. 635—648.
16. Шапот В. С. // Вопр. онкол. — 1980. — № 3. — С. 103—109.
17. Шушевич С. И., Халмурадов А. Г. // Витамины. — Киев, 1976. — Вып. 9. — С. 68—69.
18. Aksoy M. // Cancer. — 1981. — Vol. 11, N 1. — P. 41—54.
19. Aksoy M., Basu T. // Europ. J. Cancer. — 1980. — Vol. 16, N 8. — P. 1041—1045.
20. Chong Y. P. // Amer. J. clin. Nutr. — 1970. — Vol. 23. — P. 261—266.

21. Inove A., Iwata H. // Biochim. biophys. Acta. — 1971. — Vol. 242, N 2. — P. 459—469.
22. Naujokaitis S. A. // Res. Commun. chem. Path. Pharmacol. — 1981. — Vol. 32, N 2. — P. 317—327.
23. Rankin R., Jacobson M., Mitcehl V. // Cancer Res. — 1980. — Vol. 40. — P. 1803—1807.
24. Trebukhina R. V., Ostrovsky Y. M. et al. // J. Nutr. — 1983. — Vol. 113. — P. 1285—1291.

Поступила 08.08.91

METABOLISM OF VITAMINS B₁ AND PP; THEIR APPLICATION IN ONCOLOGICAL CARE

R. V. Trebukhina, T. A. Koltanyuk, V. G. Pelushok, G. N. Mikhaltsevich, I. K. Lashak, E. A. Gritsenko

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

Blood of patients with gastric tumor was studied after their admission to the hospital and after the chemotherapeutic course. Formation of the tumor was accompanied by development of hypovitaminoses B₁ and PP. The vitamin deficiency was more distinct after treatment of the patients with cyclophosphan: content of thiamine diphosphate (TDP) was decreased by 40 %; NAD⁺+NADP, by 30 % and NADH⁺+NADPH, by 20 %. In mice with Ehrlich ascites carcinoma, activity of transketolase in erythrocytes was decreased by 48 %, content of TDP, by 61 % and that of NADPH, by 27 %. The administration of cyclophosphan increased further thiamine deficiency in the tumor-bearing mice. Simultaneous administration of thiamine and cyclophosphan abolished the cytostatic toxic effect but did not affect their antitumoral properties. Under these conditions treatment with vitamins B₁ and PP complex was undesirable due to malignization. The vitamins B₁ and PP did not stimulate the tumor growth, partially restored impaired metabolism of the vitamins and may be included separately into combined multidrug oncotherapeutics.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1992

УДК 615.356.03:616-056.3-053.2

И. И. Балаболкин, Г. Ф. Гордеева, Е. Д. Гусева, А. Б. Джунелов, О. Л. Калугина, М. М. Хамидова

ПРИМЕНЕНИЕ ВИТАМИНОВ ПРИ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ У ДЕТЕЙ

НИИ педиатрии Российской академии медицинских наук, Москва

Доказано развитие при аллергических заболеваниях у детей белковой недостаточности, дезорганизации соединительной ткани, нарушения обмена пуриновых и пиримидиновых оснований [1], липидов [5, 7]. Установлено также вовлечение в патологический процесс гепатобилиарной системы [6], выявлены нарушения всасывания углеводов и белков [2]. У детей раннего возраста с аллергическими заболеваниями и реакциями часто выявляется нарушение биоценоза кишечника. Указанные факторы могут обусловить развитие недостаточности витаминов в организме детей с аллергической патологией. Необходимость использования витаминных препаратов при лечении аллергических болезней обусловлена также и свойством этих препаратов воздействовать на систему иммунного ответа.

Методика. При оценке терапевтической эффективности витамина В₆ (пиридоксина) изучали его влияние на содержание аминокислот в сыворотке крови и моче. Количественное определение свободных аминокислот в сыворотке крови и суточной моче проводили методом восходящей хроматографии на бумаге. Терапевтическую эффективность витамина Р (кверце-

тина) оценивали на основе динамического наблюдения за состоянием больных и метаболизма липидов у них. Биологическим материалом служили лимфоциты, выделенные из периферической крови больных в градиенте плотности раствора фиколл — верографина. Мембраны лимфоцитов получали путем осмотического шока клетки к последующим замораживанием — оттаиванием, после чего мембраны осаждали путем центрифугирования. Определение содержания продуктов перекисного окисления липидов (малонового диальдегида — МДА, гидроперекисей липидов — ГПЛ), активности антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы) выполняли с помощью спектрофотометрических методов на приборах СФ-26 (СССР) и ФП-901 (Финляндия). Для определения уровня общих липидов и фосфолипидов (ФЛ) в мембранах лимфоцитов использовались стандартные наборы фирмы «Лаксма» (ЧСФР). Анализ спектра ФЛ мембран лимфоцитов проводили методом одномерной тонкослойной хроматографии на пластинах с силуфолом. Количественное определение содержания лейкотриена В₄ (ЛТВ₄) производили с помощью стандартных радиоиммунологических наборов фирмы «Amersham» (Англия) на приборе «Fractovar 4200» фирмы «Carlo Erba» (Италия). Об эффективности витамина Е судили по результатам наблюдения за состоянием больных и динамическому наблюдению за изменением изучаемых показателей перекисного окисления липидов в мембранах эритроцитов. Механическую резистентность определяли в 5 % взвеси эритроцитов после их инкубации в трие-буфере в течение 10 мин при 37 °С и последующего центрифугирования. Перекисную резистентность определяли после инкубации проб с 1,5 % раствором перекиси водорода, гемолиз эритроцитов — в пробах с добавлением физиологических количеств витамина Е (10 мкг в пробу), свободно-радикальное окисление — по накоплению ТБК (тиобарбитуровая кислота) активных продуктов (МДА) после 10 мин инкубации при 37 °С без инициации, а также на фоне добавления двухвалентного железа с аскорбатом [3] и добавления в пробу с инициацией физиологических количеств витаминов Е и D₂ (30 мкг в пробу).

Результаты и обсуждение. Терапевтическую эффективность витамина В₆ изучали у детей с бронхиальной астмой и атопическим дерматитом. Под наблюдением находилось 90 детей с бронхиальной астмой в возрасте от 1 года 4 мес до 7 лет (55 больных с атопической, 20 со смешанной и 15 с инфекционно-аллергической формой болезни) и 48 детей с атопическим дерматитом в возрасте от 1,5 до 7 лет, из них у 8 больных аллергический процесс на коже сопровождался выраженным экссудативным компонентом и у 40 детей в клинической картине болезни преобладали инфильтративные изменения на коже. С терапевтической целью мы использовали пиридоксина гидрохлорид при максимальной лечебной дозе — 50—100 мг/сут. Детям до 3 лет пиридоксин назначали по 50 мг/сут, детям 3—7 лет — по 100 мг/сут в 2 приема. Продолжительность лечения при бронхиальной астме у 40 детей составила 1 мес, у 20 — от 1,5 до 2 мес и у 10 больных — от 2 до 3 мес. Длительность лечения у детей с атопическим дерматитом составила 3—4 нед. Во время лечения пиридоксином все дети получали питание с соответствующим возрасту содержанием белка, жиров и углеводов. При обострении бронхиальной астмы проводили лечение бронхоспазмолитиками и муколитическую терапию. При атопическом дерматите, помимо витамина В₆, назначали антигистаминные препараты и местную терапию с учетом характера воспалительного процесса на коже.

Включение пиридоксина в комплекс терапевтических мероприятий у 9 больных с астматическим состоянием в I стадии развития позволило ускорить выведение детей из него, что подтвердилось при сравнении с контрольной группой детей (9 человек), получавших инфузионную терапию

эуфилином, лечение муколитиками, но без введения пиридоксина. Продолжительность астматического состояния в контрольной группе составила $2,33 \pm 0,22$ сут. Среди детей, получавших пиридоксин, она была меньше и составила $1,83 \pm 0,11$ сут. Из 9 детей, леченных с использованием витамина В₆, 7 были выведены из астматического состояния без назначения глюкокортикостероидов. У 2 детей терапевтического влияния витамина В₆ не было выявлено. В контрольной группе астматический статус был снят без назначения глюкокортикостероидов у 6 из 9 детей, что существенно не отличалось от результатов лечения в основной группе ($p < 0,1$). Использование витамина В₆ у 39 детей с неустойчивым состоянием по бронхиальной астме показало возможность применения препарата с целью достижения ремиссии. Проведенная терапия оказала благоприятное влияние на течение болезни у 33 из 39 ($84,61 \pm 5,78$ %) больных. Так, если на протяжении 1 мес до начала лечения количество приступов бронхиальной астмы у одного больного в среднем составляло $2,82 \pm 0,63$, то на фоне лечения в течение этого же промежутка времени оно было значительно меньше — $0,92 \pm 0,07$ ($p < 0,01$), при этом и возникали они уже менее чем у половины детей (16 человек), что составило $41,02 \pm 7,92$, тогда как до начала лечения приступы регистрировали у всех детей ($p < 0,001$). В контрольной группе детей улучшение состояния после лечения бронхоспазмолитиками было отмечено реже — у 24 из 30 детей ($61,53 \pm 7,79$ %; $p < 0,02$). Частота приступов бронхиальной астмы у детей контрольной группы хотя и уменьшилась, но все же превышала таковую у детей, леченных витамином В₆, составляя $1,26 \pm 0,15$ ($p < 0,05$). В контрольной группе чаще отмечалось возникновение повторных приступов бронхиальной астмы на фоне продолжающегося лечения бронхоспазмолитиками (более чем у половины детей — 25 человек, что составило $61,1 \pm 7,68$ % случаев; $p < 0,1$ по отношению к основной группе).

Включение витамина В₆ в комплексную терапию, состоящую из назначения бронхоспазмолитиков, антигистаминных препаратов, интала, кальция пантогената, 3 детям с гормонально-зависимой бронхиальной астмой (поддерживающая доза 5—7,5 мг преднизолона) позволило у 2 из них добиться отмены глюкокортикостероидов.

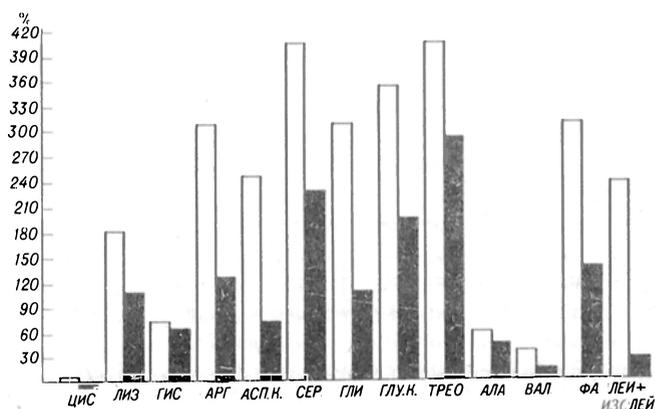


Рис. 1. Изменения содержания (в %) аминокислот в сыворотке крови детей с бронхиальной астмой до (светлые столбики) и после лечения (темные столбики) витамином В.

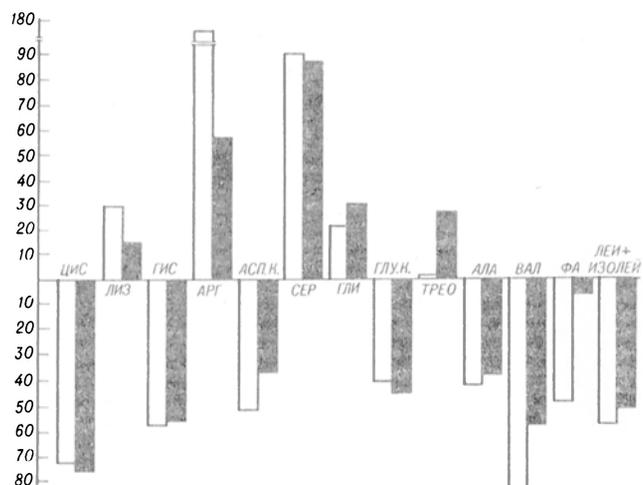


Рис. 2. Изменения содержания (в %) аминокислот в моче детей с бронхиальной астмой до (светлые столбики) и после лечения (темные столбики) витамином В₆.

Терапия витамином В₆ оказывала благоприятное влияние на обмен аминокислот, которое проявлялось уменьшением дис- и гипераминоацидемии за счет снижения содержания в сыворотке крови большинства аминокислот (рис. 1). По окончании терапии пиридоксином суммарная концентрация аминокислот сыворотки крови была на 35,2 % ниже исходного уровня; при этом отмечалась нормализация содержания аспарагиновой кислоты и валина, содержание цистеина оставалось в границах нормы, а концентрация остальных аминокислот несколько превышала норму. Влияние пиридоксина на содержание аминокислот в моче зависело от их исходного уровня. При выявлении высоких концентраций, что было характерно для лизина, аргинина, серина и глицина, происходило уменьшение экскреции аминокислот, а при выявлении исходно низких показателей (аспарагиновая кислота, аланин, фенилаланин, лейцин, глутаминовая кислота) наблюдали снижение содержания их в моче. При этом была отмечена нормализация выведения с мочой фенилаланина при тенденции к нормализации лизина. У детей с бронхиальной астмой, в комплексной терапии которых использовали пиридоксин, по окончании лечения отклонения в экскреции с мочой для большинства аминокислот были менее выраженными по сравнению с контрольной группой.

Терапия с витамином В₆ была эффективной и у детей с атоническим дерматитом. Из 40 детей с атоническим дерматитом, клинически характеризовавшихся наличием выраженных инфильтративных изменений на коже, при лечении витамином В₆ терапевтический эффект был получен у 36 (90,0 ± 4,74 %) детей, при этом у 26 из них удалось достигнуть ремиссии (у 10 — улучшения) в течении аллергического процесса на коже. Результат лечения был сравнен с контрольной группой детей (40 человек), у которых лечение атонического дерматита не сопровождалось назначением пиридоксина. Терапевтический эффект в этой группе был получен у 29 из 40 детей (72,5 ± 7,06 %; $p < 0,05$). В контрольной группе ремиссия была достигнута у 15 из 29 детей, тогда как у остальных детей имело место уменьшение воспалительного процесса

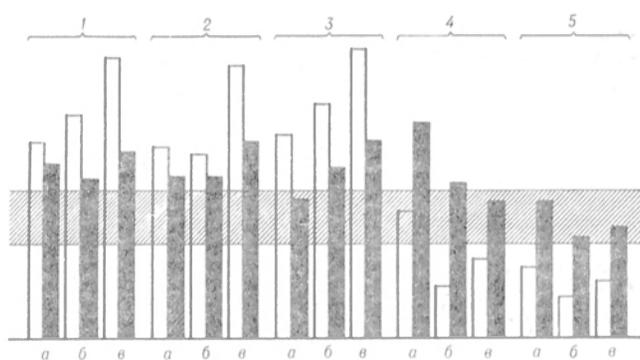


Рис. 3. Динамика показателей процессов ПОЛ и уровня активности антиоксидантных ферментов в период обострения и ремиссии поллиноза.

Светлые столбики — обострение поллиноза; темные столбики — ремиссия; заштрихованная зона — контроль. а — риноконъюнктивальный синдром; б — астматический бронхит; в — бронхиальная астма. 1 — МДА, 2 — ГПЛ, 3 — супероксиддисмутаза, 4 — каталаза, 5 — глутатионпероксидаза.

на коже. Назначение пиридоксина уже к концу 1-й и началу 2-й недели приводило к заметному улучшению состояния больных, что проявлялось в уменьшении зуда и воспалительной инфильтрации кожи, дети становились более спокойными, и обычно на 3-й неделе от начала терапии удавалось достигнуть ремиссии болезни; в среднем она наступала на $16,69 \pm 0,72$ -й день. Проведение терапии витамином В₆ способствовало обратному развитию атонического дерматита и при локализации аллергического процесса в области век. В контрольной группе детей ремиссия наступала значительно позднее — к концу 4-й недели от начала лечения (в среднем на $25,9 \pm 1,26$ -й день). Обнаруженное различие было статистически значимым ($p < 0,001$). Витамин В₆ был менее эффективен при атоническом дерматите при наличии выраженного экссудативного компонента. Положительный результат лечения был достигнут у 4 из 8 детей, у 2 детей удалось достичь ремиссии болезни к концу 3-й недели от начала лечения, у 2 детей на фоне лечения было отмечено уменьшение воспалительных изменений на коже.

Полученное под влиянием лечения пиридоксином улучшение состояния больных атоническим дерматитом сопровождалось уменьшением гипер- и дисаминоацидемии, причем к концу лечения суммарная концентрация аминокислот сыворотки крови снижалась на $1/3$ по сравнению с исходными данными. Отмечалась нормализация в содержании таких аминокислот, как цистеин, аспарагиновая кислота, аланин, валин, тогда как содержание остальных аминокислот хотя и существенно снижалось, но все же превышало норму. Уменьшение гипераминоацидемии у детей с атоническим дерматитом было более выраженным при включении в терапию пиридоксина, чем без него.

Суммарная концентрация выводимых с мочой аминокислот имела тенденцию к снижению (на 16,15 % по сравнению с исходными данными) за счет таких аминокислот, как лизин, аргинин, серин (рис. 2), концентрация которых в суточной моче до начала лечения существенно превышала уровень выведения их у здоровых детей, при этом имели место нормализация экскреции с мочой цистеина, треонина и тенденция к нормализации серина. Содержание остальных аминокислот

Динамика содержания общих липидов (ОЛ), общих ФЛ и изменений спектра фосфолипидов в мембранах лимфоцитов на фоне проведения терапии кварцетином у больных поллинозом детей

Показатели	Риноконъюнктивальный синдром		Бронхиальная астма		Здоровые дети
	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения	
ОЛ, мкг/10 ⁶ лимфоцитов	1,75±0,15* (19)	2,67±0,14** (7)	1,91±0,12* (30)	3,05±0,16** (16)	2,58±0,17 (17)
ФЛ, мкг/10 ⁶ лимфоцитов	1,13±0,11* (19)	1,77±0,15** (7)	1,36±0,09* (30)	2,03±0,12** (16)	1,71±0,09 (17)
Лизофосфатидилхолин, %	9,97±1,92* (16)	3,25±1,48** (10)	10,87±1,25* (16)	3,92±1,85** (6)	4,75±0,78 (17)
Сфингомиелин, %	10,48±1,41* (16)	9,36±1,79* (10)	9,78±1,49* (16)	9,25±2,88* (6)	15,04±1,20 (17)
Фосфатидилхолин, %	47,56±1,55* (16)	38,89±1,91** (10)	47,47±1,90* (16)	42,70±1,68* (6)	40,65±0,84 (17)
Фосфатидилэтаноламин, %	30,07±2,21 (16)	41,76±1,63*** (10)	30,52±2,29 (16)	39,10±1,63*** (6)	33,01±2,06 (17)
Кардиолипин, %	1,92±1,61* (16)	6,73±2,06 (10)	1,36±0,36* (16)	5,03±2,80 (6)	6,55±1,14 (17)

Примечание. Одна звездочка — достоверность различий ($p < 0,05 - 0,001$) по сравнению с данными контрольной группы здоровых детей; две — достоверность различий ($p < 0,05 - 0,001$) в зависимости от периода заболевания (до лечения, после лечения).

кислот в моче не претерпевало существенных изменений.

Достижимый при лечении витамином В₆ терапевтический эффект у детей с бронхиальной астмой и атопическим дерматитом может быть связан с корригирующим влиянием препарата на белковый обмен, на что указывает обнаруживаемое уменьшение гипераминоацидемии и изменение выведения аминокислот с мочой в сторону нормализации. Реализация обнаруживаемого влияния витамина В₆ на обмен аминокислот может осуществляться прежде всего через способность повышать активность трансаминаз [8, 9, 12, 13]. Повышение функциональной активности указанных ферментов способствует перемещению аминокислот из кровеносного русла в клеточные структуры тканей с последующим включением их в синтез белковых структур. Известно стимулирующее влияние пиридоксина на синтез соматотропного гормона [10]. В связи с этим обнаруженное нами корригирующее влияние пиридоксина на белковый обмен может быть обусловлено и повышением активности гормона роста. Присущее витамину В₆ благоприятное влияние на функциональную активность печени служит фактором, способствующим как улучшению состояния больных, так и уменьшению нарушений в системе обмена аминокислот за счет активации синтеза белков.

Выявленная на фоне лечения витамином В₆ тенденция в сторону нормализации экскреции аминокислот в известной мере свидетельствует и о благоприятном влиянии препарата на парциальные функции почек [4].

Терапевтическая эффективность обладающего Р-витаминной активностью кварцетина была изучена нами у 23 детей в возрасте от 7 до 13 лет с острыми проявлениями поллиноза: 7 больных с риноконъюнктивальным синдромом и 16 с бронхиальной астмой. Кварцетин назначали детям от 7 до 10 лет по 80—100 мг/сут, от 10 до 13 лет по 100—120 мг/сут в 4 приема в течение 3—4 нед. Наряду с кварцетином дети с риноконъюнктивальным синдромом получали перитол, а с бронхиальной астмой — перитол и зуфиллин. При этом нами не было выявлено существенного влияния кварцетина на клинические симптомы поллиноза и его течение. Так, если у детей, не получавших кварцетин, обрат-

ное развитие симптомов поллиноза отмечали на 6,7±0,65-й день, то у больных, получавших кварцетин, — на 5,3±0,71-й день ($p < 0,05$).

Использование кварцетина при комплексной терапии поллинозов оказывало благоприятное влияние на метаболизм липидов мембран лимфоцитов (рис. 3). Под влиянием кварцетина отмечали снижение продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) — МДА и ГПЛ (на 47 и 40 % соответственно), уменьшение дисбаланса в системе антиоксидантных ферментов. Активность каталазы у детей, леченных кварцетином, в период ремиссии была выше, чем у здоровых детей. Содержание общих липидов и ФЛ достигало исходных величин, а у больных с пыльцевой бронхиальной астмой оно превышало исходный уровень. В ходе лечения отмечалось выраженное снижение лизофосфатидилхолина (ЛФХ) в спектре ФЛ, что указывает на инактивацию процессов метилирования мембранных ФЛ. Выявлено существенное снижение в содержании фосфатидилхолина (ФТХ) у больных после лечения кварцетином, что свидетельствует об ингибировании кварцетином избыточного синтеза арахидоновой кислоты (табл. 1).

Исследование влияния антиоксидантной терапии кварцетином на синтез ЛТВ₄ и тромбоксана В₂ (ТхВ₂) в мембранах лимфоцитов у детей с поллинозом не выявило существенных различий в содержании этих медиаторов у больных, получавших и не получавших указанную терапию. В то же время более выраженное снижение ЛТВ₄ отмечали у больных, леченных кварцети-

Таблица 2

Динамика содержания ЛТВ₄ и ТхВ₂ в мембранах лимфоцитов детей, больных поллинозом, под влиянием терапии кварцетином

Группа больных	ЛТВ ₄ , пг/10 ⁶ лимфоцитов		ТхВ ₂ , пг/10 ⁶ лимфоцитов	
	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения
Получавшие кварцетин	214,2±15,31 (7)	101,7±15,8 (7)	631,8±17,34 (7)	215,6±16,7 (7)
Не получавшие кварцетин	210,1±16,2 (10)	132,6±11,0 (8)	644,9±16,93 (10)	217,6±14,9 (8)

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3 в скобках — число больных.

Влияние витамина Е на состояние ПОЛ в мембранах эритроцитов у детей с атоическим дерматитом

Показатели	До лечения (6)	После лечения (6)	p	Здоровые дети
Гемолиз, %:				
до активации	2,00±0,3	2,0±0,6	<0,5	3,88±0,57
после активации	3,2±0,6	2,0±0,5	<0,5<0,1	4,33±0,60
после активации H ₂ O ₂ +витамины Е	4,1±0,4	2,9±0,3	<0,05	3,80±0,75
Содержание МДА нмоль/10 ⁶ эритроцитов:				
без иницирования O ₂	1,24±0,3	0,87±0,12	<0,5	3,0±0,37
с иницированием O ₂	1,29±0,15	3,73±0,17	<0,01	5,44±0,56
с иницированием витамином Е	1,33±0,25	8,79±0,3	<0,01	3,48±0,62
с иницированием витамином D	5,58±0,75	6,7±0,9	<0,5	12,25±1,64
Содержание витамина Е, ммоль/л:				
в эритроцитах	11,0±4,0	15,0±9,0	<0,5	16,0±2,0
в плазме	14,0±4,0	16,0±5,0	<0,5	6,0±1,0

Примечание. p — достоверность различий между показателями до и после лечения.

ном, а уровень T_xV₂ не претерпевал существенно значимых изменений, что указывает на ингибирующее преимущественно липооксигеназного пути метаболизма арахидоновой кислоты (табл. 2).

Полученные нами результаты совпадают с данными литературы о способности флавоноидов ингибировать активность липооксигеназ, мембранных фосфолипаз, освобождение гистамина и процессы избыточного ПОЛ [11, 14].

Отмеченное нами отсутствие выраженного влияния кверцетина на клиническую картину поллинозов в период его манифестации, по-видимому, обусловлено тем, что препарат назначали в условиях уже развившегося процесса, тогда как, по экспериментальным данным, он эффективен на ранних этапах развития аллергической реакции.

Результаты наших исследований указывают на перспективность использования кверцетина с профилактической целью при поллинозах у детей.

Терапевтическая эффективность витамина Е была изучена у 6 детей с атоическим дерматитом в возрасте от 3 до 7 лет. Препарат назначали по 15 мг 1 раз в день в течение 2 нед. Применение препарата не оказывало существенного влияния на выраженность зуда и воспалительных изменений на коже или их продолжительность. Назначение витамина Е привело к небольшому увеличению его концентрации в эритроцитах и плазме крови, но это изменение не было существенным, p<0,5 (табл. 3). Под влиянием терапии витамином Е наблюдали уменьшение интенсивности гемолиза в пробах с гидروперекисью и гидроперекиси с витамином Е, увеличение концентрации МДА в пробах с иницированием O₂ и витамином Е, что свидетельствует о недостаточности антиоксидантного действия витамина Е у детей с атоическим дерматитом.

Таким образом, результаты проведенных нами исследований свидетельствуют о перспективности использования витаминов в лечении аллергических болезней у детей с целью как достижения терапевтического эффекта, так и коррекции метаболических нарушений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балаболкин И. И., Юрков Ю. А., Герасимова Ю. В. и др. // Всероссийский съезд детских врачей, 5-й: Материалы.— Казань, 1977.— С. 242—243.
2. Балаболкин И. И., Омельницкая И. И., Мазо В. К.,

Сашенкова И. Ф. // Педиатрия.— 1988.— № 5.— С. 52—54.

3. Владимиров Ю. В., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.— М., 1972.
4. Князев Ю. В., Таболин В. А., Лебедев В. П., Логачев М. Ф. // Актуальные проблемы витаминологии.— М., 1978.— Т. 2.— С. 74—75.
5. Олехнович В. М., Крылов В. И. // Педиатрия.— 1981.— № 11.— С. 75.
6. Омельницкая И. И. Состояние гепатобилиарной системы у детей с кожными и дермо-респираторными проявлениями аллергии: Дис. ... канд. мед. наук.— М., 1988.
7. Святкина О. Б. // Проблемы мембранной патологии.— М., 1984.— С. 64—72.
8. Чайковский В. С. // Обмен веществ и биохимическая оценка тренированного спортсмена.— Л., 1984.— С. 49—54.
9. Arakawa M. // Vitamins.— 1967.— Vol. 36, N 5.— P. 447—451.
10. Delition G., Masala A., Devita L. // J. clin. Endocr. Metabol.— 1976.— Vol. 42, N 3.— P. 603.
11. Foreman J. C. // J. Allergy.— 1984.— Vol. 73, N 6.— P. 769—774.
12. Yung K., Bohm M. // Enzyme.— 1978.— Vol. 23, N 3.— P. 201—205.
13. Lusting V., Patten R. // Clin. chim. Acta.— 1976.— Vol. 69, N 1.— P. 101—103.
14. Middleton E., Drzewiecki G., Tatum J. // Planta med.— 1987.— Vol. 53, N 4.— P. 325—328.

Поступила 08.08.91

VITAMIN THERAPY OF ALLERGIC DISEASES IN CHILDREN

I. I. Balabolkin, G. F. Gordeeva, E. D. Guseva, A. B. Dzhunelov, O. L. Kalugina, M. M. Khamidova

Institute of Pediatrics, Russian Academy of Medical Sciences Moscow

Therapeutic efficacy of vitamins B₆, P and E was studied in children with allergic diseases. Bronchial asthma and atopic dermatitis were treated more effectively if maximal doses of vitamin B₆ were used. Quercetin was found to be useful for treatment of children with pollinosis in order to correct impairments in metabolism of lymphocyte membrane lipids. Only slight efficacy of vitamin E was detected in atopic dermatitis of children.

Н. И. Просольная

ЗАВИСИМОСТЬ НАЧАЛЬНЫХ ЭТАПОВ ПЕНТОЗОФОСФАТНОГО ЦИКЛА ОТ ОБМЕНА ВИТАМИНА С ПРИ ПАТОЛОГИИ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

Нижегородский научно-исследовательский кожно-венерологический институт

Вопросы этиологии и патогенеза диффузных болезней соединительной ткани, в частности системной красной волчанки (СКВ), привлекают в последнее время все более пристальное внимание с целью поиска новых методов диагностики, терапии, а также выявления пусковых механизмов этой тяжелой патологии. При СКВ наблюдается разнообразный спектр нарушений метаболизма, однако роль витаминов в этом процессе изучена недостаточно. Общеизвестны данные о влиянии витамина С на активность ферментов, контролирующих метаболизм соединительной ткани [11, 37]. Очень чувствительна к недостатку витамина С и система иммунитета, особенно его клеточная часть [1, 16], что весьма существенно для заболеваний, в патогенезе которых установлена ведущая роль Т-лимфоцитов [15].

Учитывая редкость возникновения скорбута в наше время, представляют несомненный интерес ранние проявления витаминной недостаточности, стимулирующие начавшийся патологический процесс. Трудности в установлении начальных стадий авитаминоза заключаются еще и в том, что не всегда наблюдается соответствие между концентрацией витамина С в тканях, моче, форменных элементах крови.

Аскорбиновую кислоту (АК) рассматривают обычно как специфический кофактор реакции гидроксилирования пролина и лизина, где требуется повышенная концентрация свободных радикалов, образующихся при ее окислении [11, 39]. Роль окислительно-восстановительной системы АК — дигидроаскорбиновая кислота (ДАК) для жизнедеятельности организма, по-видимому, шире, так как она быстро реагирует на многочисленные изменения внешних и внутренних факторов, а при патологии ее значение еще более возрастает [24]. Это подтверждают и существенные изменения содержания АК и ее форм при различных патологических процессах, а также снижение сопротивляемости и адаптивности организма при дефиците витамина С [17]. Показано, что при СКВ и ревматоидном артрите у 75—99 % больных обнаруживается гиповитаминозное состояние по витамину С, В₁, В₆ и другим [33, 38], причем прослеживается соответствие между степенью витаминной недостаточности и тяжестью заболевания. Кроме того, состояние витаминной обеспеченности необходимо учитывать при применении гормонов и нестероидных противовоспалительных средств при терапии диффузных поражений соединительной ткани, поскольку эти препараты сами по себе вызывают снижение концентрации витаминов [27, 31].

Известно, что синтез витамина С происходит на пути уроновой кислоты, где вырабатывается также и глюкуронат, необходимый для метаболизма соединительной ткани. Среди образующих этот путь реакций две НАДФН-зависимы. По гипотезе А. Лабори [9], нормальный метаболизм глюкозамингликанов возможен только при оптимальном функционировании пути уроновой кислоты и достаточном количестве НАДФН в клетке. Как известно, пентозофосфатный цикл (ПФЦ) — это один из основных источников НАДФН, а глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г-6-ФДГ; КФ 1.1.1.49) — первый фермент окислительной части ПФЦ — является продуцентом восстановленного НАДФ и во многом определяет протекание дальнейших реакций в цикле [3, 5, 14]. Транскетолаза (ТК; КФ 2.2.1.1) лимитирует неокислительную часть ПФЦ, что позволяет ей быть ферментом-триггером, посредством которого осуществляется регуляция обмена глюкозо-6-фосфата, а также выработка рибозо-5-фосфата [3, 5]. Исследований, касающихся участия пентозного цикла в патогенезе диффузной патологии соединительной ткани, недостаточно, хотя при СКВ и ревматоидном артрите отмечена корреляция между нарастанием активности ферментов ПФЦ в плазме и форменных элементах крови со степенью воспалительного процесса [32]. Учитывая роль обмена витамина С и начальных этапов ПФЦ для метаболизма соединительной ткани, исследование этих сторон метаболизма позволит уточнить причину возникновения данной патологии и подойти к решению проблемы ее пусковых механизмов.

Методика. Работа проведена на 113 крысах-самцах Вистар. Диффузную патологию соединительной ткани, подобную СКВ, вызывали по методу [25]. Животные находились под наблюдением от 90 до 270 дней и были разделены на 3 группы: 1-я — интактные (контрольные); 2-я — животные с экспериментальным диффузным поражением соединительной ткани, получавшие АК в дозе 50 мг в день в течение 2 нед. Внешний вид, изменения на коже, артриты, наличие белка в моче, нарастание остаточного азота, изменения в периферической крови служили критерием развития патологии. Кроме того, рассматривали состояние гуморального иммунитета [20], а ткань почек в дальнейшем подвергали морфологическому и иммунофлюоресцентному анализу [29].

Вышедших из опыта животных декапитировали. Печень и почки перфузировали охлажденным физиологическим раствором. Гомогенаты готовили в соответствии 1:9 (вес/объем). Исследование ферментативной активности в коже, обладающей высокой метаболической активностью, методически слабо разработано в связи со спецификой кожи как объекта исследования. Механический перенос способов подготовки других тканей для определения ферментативной активности и молекулярной гетерогенности энзимов в коже, как правило, дает малоприменимые для интерпретации результаты. Разработанный нами способ подготовки кожи позволил четко разделить изоферментные фракции Г-6-ФДГ [21]. Для определения АК и ее форм в тканях использовали метод в модификации, описанной в работе [23]. Содержание АК в форменных элементах периферической крови определяли по методу [34], выделение витамина С с мочой — апробированным методом Тильманса. Определение активности ферментов окислительного и неокислительного этапов ПФЦ в тканях проводили в супернатанте при оптимальном рН 7,4 и температуре 37 °С в присутствии насыщающей концентрации субстрата. Изоферментный спектр Г-6-ФДГ оценивали после электрофореза в полиакриламидном геле в системе № 1 [10], как описано в работе [18]. Для количественной оценки активности проводили измерение интенсивности окраски зон локализации Г-6-ФДГ на денситометре «Carl Zeiss JENA ERI-10». Ферментативную активность рассчитывали

Таблица 1

Содержание АК и АК+ДАК (в % от контроля) в органах крыс с экспериментальным диффузным поражением соединительной ткани

Орган	А		Б	
	АК	АК+ДАК	АК	АК+ДАК
Печень	21,1	35,6	31,9	56,8
Почки	36,9	59,1	80,0	91,0
Кожа	12,0	17,9	40,9	57,6

Примечание. А — животные с диффузным поражением соединительной ткани; Б — животные с диффузным поражением соединительной ткани +50 мг АК в течение 2 нед.

тывали как сумму активностей изоферментов в условных единицах оптической плотности в пересчете на 1 мг белка за 1 мин при 37 °С. Количественное соотношение энзимов выражали в процентах. Седогентулозо-7-фосфат определяли по цветной реакции с цистеином при нагревании проб с концентрированной серной кислотой и судили об активности ТК [35, 36]. Экспериментальные данные обработаны с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Анализ полученных данных показал, что максимальные концентрации АК и суммы АК+ДАК у интактных крыс обнаруживаются в печени. Концентрация АК в коже составляла всего одну треть от ее содержания в печени, а ткань почек занимает промежуточное положение при сравнении концентраций АК и АК+ДАК. В форменных элементах периферической крови концентрация витамина С выше в лимфоцитах, чем в нейтрофилах.

Диффузное поражение соединительной ткани у крыс вызывает значительное снижение концентрации АК, а также АК+ДАК. Наиболее низкие концентрации выявлены в коже (табл. 1). Уменьшается также концентрация витамина С в нейтрофилах и лимфоцитах (табл. 2), причем необходимо отметить, что в форменных элементах крови снижение происходит в меньшей степени, чем в печени, почках и коже. При этом резко возрастает выведение витамина С из организма (см. табл. 2). Патология соединительной ткани вызывает усиление окислительных процессов в ткани почек, что способствует превращению АК в ДАК; об этом свидетельствует неизменность концентрации ДАК ($28,4 \pm 6,0$ мг% у интактных крыс, $29,3 \pm 8,8$ мг% у крыс с экспериментальным диффузным поражением соединительной ткани) при довольно низких значениях АК у экспериментальных животных [12]. Следовательно, можно заключить, что изменения концентрации витамина С в лимфоцитах и нейтрофилах периферической крови всего на 34,6—26,9 % соответствуют глубоким нарушениям в метаболизме витамина С.

Таблица 2

Средний цитохимический показатель (СЦП) содержания АК в нейтрофилах и лимфоцитах периферической крови и выделение витамина С с мочой (в мг%) за сутки при экспериментальном диффузном поражении соединительной ткани

Группа животных	Лимфоциты	Нейтрофилы	Витамин С в моче
Интактные	$1,04 \pm 0,04$	$0,94 \pm 0,09$	$0,19 \pm 0,05$
Животные с диффузным поражением соединительной ткани	$0,68 \pm 0,03$	$0,68 \pm 0,03$	$6,8 \pm 1,24$
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001
Животные с диффузным поражением соединительной ткани + 50 мг АК в течение 2 нед	$1,38 \pm 0,06$	$1,36 \pm 0,06$	$3,4 \pm 0,79$
<i>p</i>	<0,002	<0,002	<0,001

Таблица 3

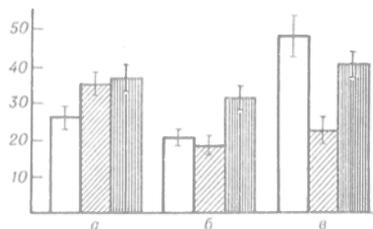
Активность ТК (в нмоль седогентулозо-7-фосфата на 1 мг белка за 1 мин) в тканях крыс с экспериментальным диффузным поражением соединительной ткани

Группа животных	Печень	Почки	Кожа
Интактные	$15,1 \pm 0,82$	$11,8 \pm 0,92$	$8,5 \pm 0,59$
Животные с диффузным поражением соединительной ткани	$13,6 \pm 0,99$	$15,2 \pm 0,83$	$8,2 \pm 0,87$
<i>p</i>		<0,02	
Животные с диффузным поражением соединительной ткани + 50 мг АК в течение 2 нед	$15,3 \pm 0,13$	$15,1 \pm 0,27$	$7,7 \pm 0,64$
<i>p</i>		<0,01	

По-видимому, при диффузной патологии соединительной ткани нарушения в синтезе и метаболизации витамина С столь значительны, что поддержать необходимый уровень АК не могут даже такие животные, как крысы, которые способны к синтезу витамина С. В печени при С-гиповитаминозе угнетается активность фосфогексоизомеразы [7], а при гипериммунизации крыс, имевшей место в наших экспериментах, в печени увеличивается количество гликогена [21]. По-видимому, это способствует поступлению глюкозо-6-фосфата в пентозный цикл и усилению его метаболизации в окислительной части, поскольку активность ТК у экспериментальных животных в печени имеет тенденцию к снижению (табл. 3), а Г-6-ФДГ повышается на 35 %, в основном за счет медленных фракций 3 и 4. С одной стороны, это способствует включению НАДФН в целый ряд восстановительных синтезов, таких, например, как биосинтез жирных кислот, активно идущих в печени. С другой стороны, известно, что снижение активности ТК в тканях может происходить лишь после значительных потерь органами кофермента; в первую очередь его теряют ткани, обладающие способностью накапливать тиамин, а именно печень [13, 30].

Дефицит витамина С в коже увеличивает амилолитический распад гликогена [4] и снижает активность гексокиназы [6], что, по-видимому, тормозит образование глюкозо-6-фосфата, уменьшая его поступление в пентозный цикл. В связи с этим снижается активность Г-6-ФДГ в коже крыс с диффузным поражением соединительной ткани за счет угнетения высокоактивной фракции 1 энзима, что может приводить к истощению запасов НАДФН в коже (см. рисунок). Однако при этом ТК сохраняет свою активность (см. табл. 3), что, по-видимому, способствует созданию фонда фосфопентоз и свидетельствует о некоторой сохранности тиамина в коже.

Тенденция к снижению активности Г-6-ФДГ в ткани почек (см. рисунок) при одновременном возрастании активности ТК на 28,8 % у экспериментальных животных свидетельствует об ориентации ПФЦ при данной патологии на образование пентозофосфатов, что и оправдано, так как гипертрофия органа требует повышенного содержания рибозо-5-фосфата [15]. Кроме того, известно, что окисленная форма витамина С ослабляет фракционирование окислительной части ПФЦ [2]. Увеличение ТК, возможно, обусловлено еще и тем, что ткань почек может дополнительно использовать кофермент из депонирующей



Активность Г-6-ФДГ (в ед. опт. пл. на 1 мг белка за 1 мин) в органах крыс с экспериментальным диффузным поражением соединительной ткани.

а — печень; б — почки; в — кожа. Светлые столбики — интактные животные; столбики с косой штриховкой — крысы с диффузным поражением соединительной ткани; с вертикальной штриховкой — крысы с диффузным поражением соединительной ткани + 50 мг АК в день в течение 2 нед.

щих его тканей, в частности печени, которая легко отдает тиамин [13].

Устранение дефицита витамина С двухнедельным его введением сопровождалось некоторой нормализацией содержания АК и АК+ДАК в почках, однако в коже и печени существенных изменений не было выявлено (см. табл. 1). Накопление витамина С в форменных элементах крови, превышающее значения у интактных крыс, и некоторое уменьшение в сравнении с больными животными выделения витамина С с мочой (см. табл. 2) приводили к постепенной нормализации функционирования ПФЦ. Хотя в ткани печени активность Г-6-ФДГ оставалась повышенной, как и у больных крыс, активность ТК возрастала до уровня ее значений у интактных животных, что подтверждает берегающее воздействие АК на содержание тиамин в печени [28]. В почках и коже происходила заметная активация Г-6-ФДГ (на 83 и 66 % соответственно) за счет медленных фракций 3 и 4, причем активность ТК в этих органах не изменялась при дополнительном введении витамина С. Выявленный характер динамики активности окислительных и неокислительных ферментов ПФЦ может свидетельствовать о большей пластичности Г-6-ФДГ, чем ТК, в зависимости от концентрации витамина С. Необходимо отметить и благоприятный эффект дополнительного введения витамина С, особенно для кожи. Введение АК стимулирует фосфоглюкоматазу кожи [8] при почти неизменном гликолизе [19], что сдвигает ход реакции глюкозо-6-фосфат → глюкозо-1-фосфат вправо, направляя поступление глюкозо-6-фосфата на путь урановой кислоты через уридиндифосфатглюкозу. При активации Г-6-ФДГ увеличивается и количество НАДФН, что способствует нормализации обмена глюкозамингликанов.

Итак, в настоящем исследовании установлены особенности протекания окислительных и неокислительных реакций в ПФЦ при различном содержании витамина С у животных с экспериментальной патологией соединительной ткани. При этом отмечена более тесная связь активности Г-6-ФДГ, чем ТК, с концентрацией АК в органах. Кроме того, необходимо отметить, что определение содержания витамина С только по форменным элементам крови (нейтрофилы и лимфоциты) не отражает истинного его количества в органах и требует индивидуализации подхода к коррекции С-витаминовой недостаточности при патологии соединительной ткани для умень-

шения риска прогрессирования данной патологии. Обсуждая регулируемость ферментов ПФЦ в зависимости от С-витаминовой обеспеченности организма, необходимо отметить, что разбалансировка начальных этапов ПФЦ может явиться, на наш взгляд, метаболическим механизмом развития диффузной патологии соединительной ткани. Вероятно резкое изменение внешних (инсоляция, переохлаждение) и внутренних (изменение гормонального фона при беременности, половом созревании) факторов, с одной стороны, приводит к изменению содержания компонентов окислительно-восстановительной системы АК — ДАК, а с другой — вызывает сдвиги начальных этапов пентозного цикла. В норме эти перестройки происходят бесследно, а в экстремальных ситуациях, вероятно, данная система утрачивает способность к адекватным адаптационным перестройкам. Изменения в ПФЦ на фоне сниженного содержания АК ведут к изменению функционирования не только этого цикла, но и связанных с ним через НАДФН и фосфопентозы других метаболических путей, в частности пути урановой кислоты. Это может вести к нарушению метаболизма глюкозамингликанов, приводящих в свою очередь к цепи характерных для диффузной патологии соединительной ткани реакций — накоплению глюкозамингликанов, возникновению в этом месте воспалительных реакций, где в дальнейшем и происходит отложение иммунных комплексов, характерных для данной патологии [26]. Отложения последних выявлялись и у наших животных с экспериментальным диффузным поражением соединительной ткани не только в ткани почек, но и на участках видимо непораженной кожи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильев В. С., Комар В. И. // Вопр. питания.— 1988.— № 4.— С. 31—34.
2. Власенко Н. С. // Пентозофосфатный путь превращения углеводов и его регуляция. — Гродно, 1978.— С. 32.
3. Горбач З. В., Манглыш С. С., Кубышин В. М. и др. // Биохимия.— 1985.— Т. 50, № 8.— С. 1261—1268.
4. Киверин М. Д. Об аμιлолитическом пути распада полисахаридов и некоторых факторах, влияющих на уровень сахара в коже и кожном лоскуте: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.— Л., 1963.
5. Кудрявцева Г. В. // Успехи соврем. биол.— 1978.— Т. 86, № 3(6)— С. 315—330.
6. Курицина Л. В., Смирнова М. Г., Ширвинская П. А. // Биохимия кожи.— 1971.— С. 60—67.
7. Копылова З. А., Рябец Л. И., Андрияшевская С. И. // Вопр. питания.— 1979.— № 4.— С. 40—43.
8. Киверин М. Д., Строкун Н. А. // Биохимия кожи.— 1977.— С. 95—102.
9. Лабори А. Регуляция обменных процессов: Пер. с фр.— М., 1970.
10. Маурер Г. Диск-электрофорез: Пер. с нем.— М., 1971.
11. Матусис И. И. // Витамины.— М., 1974.— С. 384—414.
12. Никифорова В. И. // Тер. арх.— 1981.— № 6.— С. 128—132.
13. Островский Ю. М. // Витамины.— М., 1974.— С. 173—214.
14. Панин Л. Е., Третьякова Г. А., Русских Т. С., Войцеховская Е. Э. // Вопр. мед. химии.— 1982.— № 2.— С. 26—30.
15. Петров В. В., Ковальчук Л. В., Павлюк А. С. и др. // Иммунология.— 1980.— № 5.— С. 67—71.
16. Плецкий К. Д. // Вопр. питания.— 1979.— № 4.— С. 18—25.
17. Плецкий К. Д. // Тер. арх.— 1980.— № 2.— С. 131—140.
18. Покровский А. А., Коровников К. А. // Биохимия.— 1970.— Т. 35, № 1.— С. 159—166.
19. Порядин В. Б. // Вопр. питания.— 1978.— № 1.— С. 32—35.

20. Просольная П. И., Комарова В. Д., Павловская В. Е. // Системные дерматозы. — Горький, 1985. — С. 14—20.
21. Просольная П. И. // Метаболические аспекты в дерматовенерологии. — Горький, 1984. — С. 9—14.
22. Розе Л. В., Розенфельд Е. Л., Попова И. А. и др. // Вопр. мед. химии. — 1982. — № 4. — С. 484—491.
23. Соколовский В. В., Лебедева Л. В., Лизлуп Т. Б. // Лаб. дело. — 1974. — № 3. — С. 160—162.
24. Соколовский В. В. // Вопр. мед. химии. — 1988. — № 6. — С. 2—11.
25. Сура В. В., Колаев В. А., Константинова Н. В. // Бюл. exper. биол. — 1964. — № 9. — С. 97—102.
26. Струков А. И., Копылова Т. П., Макарова С. В. // Арх. пат. — 1983. — № 11. — С. 44—50.
27. Смирнов М. И., Ермилова Л. И. // Вопр. питания. — 1968. — № 2. — С. 11—15.
28. Терруан Т. Взаимодействие витаминов: Пер. с фр. — М., 1969.
29. Торгушина Н. С., Просольная П. И., Матусис Л. И. и др. // Системные дерматозы. — Горький, 1985. — С. 21—26.
30. Туманов В. И., Требухина В. В. // Вопр. питания. — 1987. — № 6. — С. 49—52.
31. Шарифетдинов Х. Х., Денисов Л. П., Самсонов М. А. и др. // Там же. — 1990. — № 1. — С. 18—22.
32. Шишкин В. И., Кудрявцева Г. В., Макарова С. А. // Вопр. мед. химии. — 1988. — № 6. — С. 40—45.
33. Шинский Г. Э. Функциональное состояние внутренних органов (печень, желудок) и некоторые показатели обеспеченности витаминами больных красной волчанкой: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Донецк, 1963.
34. Эсдова Э. М. // Лаб. дело. — 1966. — № 2. — С. 70—72.
35. Brownstone J. S., Denstedt O. F. // Canad. J. Biochem. Physiol. — 1961. — Vol. 39. — P. 527—540.
36. Dishe Z. // J. biol. Chem. — 1953. — Vol. 204. — P. 983—997.
37. Jonis V., Boegnet J., Pajol J.-P. et al. // FEBS Lett. — 1985. — Vol. 38, N 2. — P. 233—240.
38. Mullen A., Wilson G. // Proc. Nutr. Soc. — 1976. — Vol. N 1. — P. A.8—A.9.
39. Roach H. J., Hiller K., Shearer J. R. // Biochim. biophys. Acta. — 1985. — Vol. 49, N 2—3. — P. 139—145.

Поступила 08.08.91

RELATION OF EARLY STAGES OF THE PENTOSE PHOSPHATE PATHWAY TO VITAMIN C METABOLISM IN IMPAIRMENTS OF CONNECTIVE TISSUE

N. I. Prosolnaya

Research Dermatovenerologic Institute, RSFSR Ministry of Public Health, Nizhni-Novgorod.

Correlation between rates of oxidative and non-oxidative steps of the pentose phosphate pathway and vitamin C concentration was studied in experimental diffuse impairment of connective tissue. As compared with transketolase, activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase was more closely dependent on concentration of ascorbic acid. Content of vitamin C was considerably altered in tissues thus demonstrating profound deterioration of vitamin C metabolism under these conditions. Simultaneous impairment of the pentose phosphate pathway primary steps and of vitamin C metabolism appear to be responsible for initiation of the diffuse injury of the connective tissue.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1992

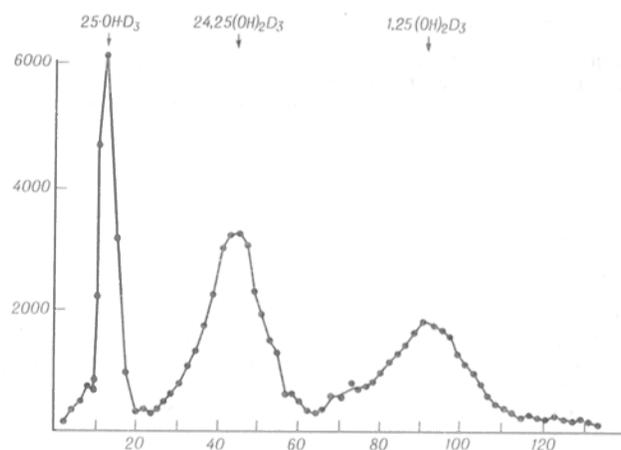
УДК 616.61-089.87-06:618.31-092.9-089.168-07:616.154:577.161.2

С. П. Ивашкевич, Т. Г. Ширанкова,
Л. И. Апуховская, Л. И. Омельченко

ВЛИЯНИЕ ОДНОСТОРОННЕЙ НЕФРЭКТОМИИ НА ОБМЕН ВИТАМИНА D У БЕРЕМЕННЫХ КРЫС

Институт педиатрии, акушерства и гинекологии им. П. М. Буйко, Киев

Почки играют существенную роль в регуляции обмена витамина D, являясь основным органом, где осуществляется превращение 25-гидроксико-



Профиль элюции меченных тритием метаболитов витамина D.

Условия хроматографии: колонка (10×0,6 см), заполненная сефадексом G-11-20 («Pharmacia», Швеция), элюирующая система — гексан — хлороформ (1:1); в колонку вносили по 670 Бк каждого метаболита. По оси абсцисс — количество элюента, мл; по оси ординат — радиоактивность, имп/мин.

лекальциферола (25-ОН-D) в более полярные и биологически активные метаболиты [6, 9, 11, 26]. Одним из наиболее важных метаболитов витамина D является 1,25 (ОН)₂D, регулирующий транспорт минеральных компонентов в кишечнике [5]. Известно, что статус витамина D у плода зависит от его концентрации у матери [17, 25]. Однако если большинством авторов отмечена корреляция между уровнем 25-ОНД у плода и матери, то такой зависимости не отмечается в отношении 1,25(ОН)₂D, в связи с тем что синтез этого метаболита в процессе беременности происходит также и в плаценте [1, 10]. Ответственная за его синтез 1α-гидроксилаза 25-гидроксивитамина D₃ локализуется в митохондриях трофобластов плаценты [20].

Считают, что увеличение концентрации 1,25(ОН)₂D во время беременности является одним из механизмов, с помощью которого усиливаются абсорбция кальция в кишечнике и его транспорт к плоду [23]. Нарушение этих процессов может привести к изменению минерального гомеостаза и костеобразования плода, а в отдельных случаях и к развитию признаков D-гиповитаминоза в антенатальном периоде. Необходимо учитывать также, что 1,25(ОН)₂D ответствен не только за минеральный обмен в организме, но он необходим для многих жизненно важных процессов [8, 12, 15, 27, 28]. В то же время известно, что при заболеваниях почек в организме отмечается снижение содержания активных метаболитов витамина D в сыворотке крови [16, 29]. Поэтому недостаточность витамина D у беременных при нефрэктомии может привести к нарушению ряда биохимических реакций в организме, структуры и функции некоторых органов плода и новорожденных.

Исходя из вышеизложенного, целью данной работы явилось изучение обмена витамина D у плода и самки с односторонней нефрэктомией.

Методика. Опыты проводили на половозрелых самках линии Вистар с исходной массой тела 120±2,5 г, содержащихся на полноценной диете вивария. Животным производили левостороннюю нефрэктомию. Контрольной группой служили ложнопериованные самки. Через 7 дней после операции спаривали самок с самцами. Кровь у самок забирали

Содержание активных метаболитов витамина D, неорганических компонентов и кальцийрегулирующих гормонов в сыворотке крови беременных крыс с односторонней нефрэктомией ($n=10$)

Исследуемый показатель	Небеременные самки	Беременные ложнооперированные самки		Беременные самки с односторонней нефрэктомией	
		14-й день беременности	21-й день беременности	14-й день беременности	21-й день беременности
Кальций, ммоль/л	2,50±0,05	2,32±0,02	1,89±0,08*	2,00±0,09**	1,42±0,07**
Фосфор, ммоль/л	1,98±0,10	1,90±0,06	1,71±0,09	1,76±0,11	1,12±0,08**
Щелочная фосфатаза, ед/л	175±15	197±32	173±32	265±12	295±19**
Кальцитонин, пг/мл	30,1±2,3	29,4±1,2	32,9±3,1	27,1±1,9	28,3±1,8
ПТГ, пг/мл	435,0±25,0	673,0±19,0	656,0±29,0*	843,0±11,0**	1622±29,0**
25-ОН-D, пг/мл	3,7±0,2	4,3±0,3	2,9±0,3	3,0±0,4**	2,6±0,7
24,25(ОН) ₂ D, пг/мл	1,2±0,4	2,2±0,2	1,6±0,4	1,7±0,2	0,9±0,3
1,25(ОН) ₂ D, пг/мл	83,0±9,0	163,0±2,0	200,0±5,0*	135,0±8,0**	83,0±2,0**

Примечание. Одна звездочка — достоверное отличие ($p<0,05$) от группы небеременных самок, две — то же от соответствующей группы ложнооперированных самок.

под легким эфирным наркозом из ретробульбарного синуса угла глаза до беременности, а также на 14-й и 21-й дни беременности. Содержание активных метаболитов витамина D определяли методом радиококурентного связывания [18] после трехкратной экстракции сыворотки крови диэтиловым эфиром в соотношении 1:16 на вихревом миксере в течение 10 мин с последующей экстракцией 96 % этиловым спиртом в соотношении 1:2. Объединенные экстракты упаривали на роторном испарителе при 45 °С.

Разделение активных метаболитов витамина D проводили на колонке (10×0,6 см), заполненной 3,5 г сефадекса LH-20. Согласно показанному на рисунке профилю элюции меченных тритием метаболитов собирали фракции 25-ОНD, 24,25(ОН)₂D и 1,25(ОН)₂D. В качестве связывающей системы для 25-ОНD и 24,25(ОН)₂D использовали сыворотку крови витамин D-дефицитных крыс, для 1,25(ОН)₂D — цитозольный белок слизистой оболочки кишечника кроликов массой тела 1500 г [13]. Белки хранили в запаянных ампулах при -20 °С. Немеченные метаболиты витамина D ("Hoffmann-La Roche", Швейцария) растворяли в абсолютном этиловом спирте и хранили при -20 °С. Растворы для калибровочных кривых готовили путем последовательного разведения абсолютным этиловым спиртом так, чтобы кривые для 25-ОНD и 24,24(ОН)₂D имели диапозоны от 25 до 800 пг в пробе, для 1,25(ОН)₂D — от 25 до 600 пг в пробе.

Коэффициент возврата метаболитов витамина D определяли путем добавления в сыворотку крови меченых метаболитов, которые перемешивали на вихревом миксере и инкубировали в течение часа при 4 °С с последующей экстракцией и хроматографическим разделением, как описано выше. Расчет количественного определения метаболитов витамина D проводили с учетом коэффициента возврата [3].

Уровень кальция и щелочной фосфатазы в сыворотке крови определяли с использованием биотест-наборов («Лахема», Чехо-Словакия), фосфора — как описано в работе [14], кальцитонина и паратгормона — радиоиммунным методом (тест-наборы «Mallinckrodt Diagnostica», Германия).

Различия между сравниваемыми средними величинами считали достоверными при $p<0,05$ (использовали критерий *t* Стьюдента).

Результаты и обсуждение. Проведенные нами исследования свидетельствуют, что у беременных крыс по сравнению с небеременными самками в сыворотке крови снижается содержание кальция при менее выраженном изменении фосфора (табл. 1). При этом повышается концентрация паратгормона (ПТГ), что в свою очередь усиливает синтез 1,25(ОН)₂D. Вновь синтезируемый метаболит витамина D повышает резорбцию кальция из костной ткани путем усиления активности остеокластов, увеличивает всасывание Ca²⁺ и повышает его резорбцию в дистальных канальцах почек [21]. Следствием включения указанных механизмов является более высокий уровень кальция у плода по сравнению с таковым у беременной крысы (табл. 2). Считают, что перенос Ca²⁺ в системе мать—плод осуществляется в двух направлениях: от матери к плоду и от плода к матери. В первом случае транспорт кальция направлен против градиента концентрации [2, 26]. У новорожденных его уровень падает, однако у крысят в возрасте 14 дней уровень кальция повышается и достигает величин, характерных для небеременных самок.

Аналогичен характер изменения уровня фосфора в сыворотке крови плодов, новорожденных и 14-дневных крысят. Однако необходимо отметить, что изменение концентрации фосфора в сыворотке крови менее выражено, чем кальция. Содержание кальцитонина в сыворотке крови плодов ложнооперированных самок снижено по сравнению с таковым у матери к концу беременности, однако

Таблица 2

Содержание активных метаболитов витамина D, неорганических компонентов и кальцийрегулирующих гормонов в сыворотке крови беременных, плодов, новорожденных и крысят, родившихся от самок с односторонней нефрэктомией ($n=6$)

Исследуемый показатель	Плоды		Новорожденные		Крысят в возрасте 14 дней	
	ложнооперированные	нефрэктомия	ложнооперированные	нефрэктомия	ложнооперированные	нефрэктомия
Кальций, ммоль/л	2,50±0,10	2,00±0,09*	1,81±0,04	1,21±0,04*	2,50±0,09	1,81±0,10*
Фосфор, ммоль/л	2,00±0,11	1,62±0,08*	1,68±0,07	1,21±0,05*	2,10±0,11	1,61±0,12*
Щелочная фосфатаза, ед/л	286,0±19,0	365,0±11,0*	310,0±18,0	395,0±11,0*	298,0±16,0	374±15,0*
Кальцитонин, пг/мл	13,2±1,2	17,9±3,4	25,4±1,4	28,6±1,2	46,9±9,1	43,7±3,0
ПТГ, пг/мл	2186±21	3240±52*	2188±28	2920±11*	1004±22	1575±23*
25-ОН-D, пг/мл	4,1±0,3	2,8±0,4*	3,0±0,4	2,1±0,1	5,0±0,4	3,4±0,2*
24,25(ОН) ₂ D, пг/мл	2,6±0,4	1,4±0,3	1,2±0,1	0,6±0,1*	3,0±0,2	1,6±0,2*
1,25(ОН) ₂ D, пг/мл	140,0±6,0	106,0±8,0*	140,0±4,0	78,0±5,0*	200,0±9,0	70,0±5,0*

Примечание. Звездочка — достоверное отличие ($p<0,05$) от ложнооперированных.

его уровень повышается у новорожденных, достигая нормальных величин у крысят в возрасте 14 дней. Повышение концентрации ПТГ в сыворотке крови плодов более выражено по сравнению с таковой у самок. У крысят в возрасте 14 дней отмечается значительное уменьшение концентрации гормона, однако последняя у них более чем в 2 раза превышает содержание ПТГ у небеременных самок.

Исследование обеспеченности матери и плода активными метаболитами витамина D показали, что у ложнооперированных самок на 14-й день беременности увеличивается концентрация 25-ОНD и 24,25(ОН)₂D с последующим ее снижением к концу беременности. В этот период содержание 25-ОНD в сыворотке крови беременных самок было ниже по сравнению с таковым до беременности.

Концентрация 1,25(ОН)₂D в сыворотке крови в процессе беременности увеличивается. На 21-й день беременности его уровень был более чем в 2 раза выше по сравнению с таковым у самок до беременности. Увеличение концентрации 1,25(ОН)₂D в крови в процессе беременности, по всей видимости, является следствием его интенсивного синтеза плацентой [29]. Другой возможной причиной повышения его концентрации в процессе беременности является увеличение концентрации ПТГ, стимулирующего образование 1,25(ОН)₂D в почках [21].

По всей видимости, повышение концентрации дигидроксиметаболитов витамина D к концу беременности физиологически обосновано их участием в процессе образования и минерализации костной ткани у плода [4].

В литературе существуют противоречивые данные в отношении содержания активных метаболитов витамина D в сыворотке крови плода. По данным одних авторов, концентрации 25-ОНD и 24,25(ОН)₂D в сыворотке крови матери и плода существенно не различаются, по данным других их уровень в сыворотке крови плода выше [19, 22]. По нашим данным, содержание 25-ОНD и 24,25(ОН)₂D в сыворотке крови плода выше, чем у матери. Уровень 25-ОНD практически не изменяется у новорожденных и повышается с возрастом. Концентрация 24,25(ОН)₂D в сыворотке крови новорожденных по сравнению с таковой у плодов уменьшается с последующим увеличением с возрастом. Концентрация 1,25(ОН)₂D у плодов существенно ниже, чем у матери, не изменяется у новорожденных и повышается с возрастом. В целом уровень основных активных метаболитов витамина D в сыворотке крови 14-дневных крысят выше, чем у матери и небеременных крыс. Факт увеличения концентрации 1,25(ОН)₂D в конце беременности, вероятно, свидетельствует либо о повышении активности 25-гидрокси-витамина D₃-1α-гидроксилазы плаценты, либо об интенсивном гидроксилировании 25-ОНD₃ в почках плода.

У беременных самок с односторонней нефрэктомией на 14-й день беременности не отмечается существенных изменений в уровне неорганических компонентов в сыворотке крови по сравнению с таковым у ложнооперированных животных. Однако к концу беременности у этих крыс развиваются гипокальциемия и гипофосфатемия. У самок с нефрэктомией повышена активность

щелочной фосфатазы и отмечается высокий уровень ПТГ. Односторонняя нефрэктомия приводит также к уменьшению в конце беременности концентрации дигидроксиметаболитов витамина D при неизменном уровне 25-ОНD.

Характер изменения неорганических компонентов в сыворотке крови плода, новорожденных и 14-дневных крысят, рожденных от самок с нефрэктомией и ложнооперированных, аналогичен. Однако уровень этих компонентов значительно ниже у плодов и крысят, рожденных от самок с нефрэктомией. При этом у них отмечается повышенный уровень ПТГ, калцитонина и увеличение активности щелочной фосфатазы.

Степень обеспеченности активными метаболитами витамина D плодов и крысят, рожденных от матерей с патологией и здоровых, различна. Концентрация 25-ОНD в сыворотке крови плода и матери с нефрэктомией не изменяется при дальнейшем повышении ее у крысят. Однако уровень 25-ОНD у крысят, рожденных от самок с нефрэктомией, ниже по сравнению с таковым у крысят, рожденных от ложнооперированных самок. Концентрация дигидроксиметаболитов витамина D в сыворотке крови плодов беременных крыс с нефрэктомией выше, чем у их матерей, но ниже таковых у плодов ложнооперированных самок. У новорожденных и крысят в возрасте 14 дней, рожденных от самок с патологией, концентрация 24,25(ОН)₂D и 1,25(ОН)₂D значительно ниже, чем у родившихся от здоровых.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что односторонняя нефрэктомия сопровождается снижением обеспеченности организма матери дигидроксиметаболитами витамина D, что коррелирует с развитием у них гипокальциемии и гипофосфатемии. Плоды этих самок менее обеспечены активными метаболитами витамина D и минеральными компонентами. Крысята, рожденные от самок с нефрэктомией, имеют признаки дефицита витамина D, которые проявляются в снижении уровня активных метаболитов витамина D и минеральных компонентов, повышении активности щелочной фосфатазы и концентрации ПТГ в сыворотке крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Abbas S. K., Care A. D., Van Baelen H., Bouillon R. // J. Endocr.— 1987.— Vol. 115.— P. 7—12.
2. Abramovich D. R., Dacke C. C., Elcock C., Page K. R. // J. Physiol. (Lond.)— 1987.— Vol. 382.— P. 397—410.
3. Belsky R. E., DeLuca H. F., Potts G. T. // J. clin. Endocr. Metab.— 1974.— Vol. 38.— P. 1046—1051.
4. Beresford G. N., Gallagher J. A., Russell R. G. C. // Endocrinology.— 1986.— P. 119.— P. 1176—1185.
5. Bishop C. W., Kendrick N. C., DeLuca H. F. // J. biol. Chem.— 1983.— Vol. 258.— P. 1305—1310.
6. Bronner G., Buckley M. // International Workshop on Phosphate and other Minerals, 5-th: Proceedings.— New York, London, 1982.— P. 355—360.
7. Chesney R. W. // Indian J. Pediat.— 1988.— Vol. 55.— P. 504—511.
8. Clark S. A., Stumpf W. E., DeLuca H. F. // Amer. J. Physiol.— 1987.— Vol. 253.— P. E99—E105.
9. Dahlback H., Wikvall K. // Biochem. J.— 1988.— Vol. 252.— P. 207—213.
10. Dalvin E. E., Arabin A., Glorieux F. H., Mamer O. A. // J. clin. Endocr. Metab.— 1985.— Vol. 60.— P. 880—885.
11. DeLuca H. F., Schnoess H. K. // Annu. Rep. med. Chem.— 1984.— Vol. 19.— P. 179—190.
12. Driftanti L., Boland A. R. de, Boland R. // Biochim. biophys. Acta.— 1987.— Vol. 918.— P. 83—92.

13. Duncan W. E., Aw T. C., Wash P. J., Haddad J. G. // *Analyt. Biochem.*— 1983.— Vol. 132.— P. 209—214.
14. Duce B. S., Bessman S. P. // *Environ. Health.*— 1973.— Vol. 27.— P. 205—207.
15. Fabian J., Kletter I., Rleiberg J. // *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*.— 1987.— Vol. 185.— P. 435—440.
16. Feinfeld D. A., Sherwood L. M. // *Kidney int.*— 1988.— Vol. 33.— P. 1049—1058.
17. Hillmann L. S., Haddad S. G. // *Pediatr. Res.*— 1977.— Vol. 11.— P. 515—518.
18. Justova V., Starka L. // *Radiochem. Radional. Lett.*— 1982.— Vol. 51.— P. 83—92.
19. Kubota M., Ohno S., Suda T. // *Endocrinology.*— 1982.— Vol. 110.— P. 1950—1956.
20. Lezwekh J. E., Brestau N. A. // *J. clin. Endocr. Metab.*— 1986.— Vol. 62.— P. 192—196.
21. Lo Cascio V., Adami S., Salvaini G. et al. // *International Symposium on Calcitropic Hormone Methods and Clinical Application, 3-rd: Abstracts.*— Milano, 1981.— P. s. a. 39.
22. Nguyen T. M., Guillozo M., Garabedian M., Balsan S. // *J. Endocr.*— 1988.— Vol. 116.— P. 381—385.
23. Ohara N., Morykawa H., Veja I., Mochizuki M. // *Folia endocr. jap.*— 1986.— Vol. 62.— P. 784—795.
24. Pitkin R. M. // *Amer. J. Obstet. Gynec.*— 1985.— Vol. 151.— P. 99—109.
25. Salle E. L., Glorieux E. H., Delvin E. E. // *Biol. Neonate.*— 1988.— Vol. 54.— P. 181—187.
26. Siegel N., Wongsurawat N., Armbecht H. J. // *J. biol. Chem.*— 1986.— Vol. 261.— P. 16998—17003.
27. Silver J., Nareh-Many I., Mayer H. // *J. clin. Invest.*— 1986.— Vol. 78.— P. 1296—1301.
28. Waishaar R. E., Simpson R. V. // *Amer. J. Physiol.*— 1987.— Vol. 253.— P. E675—E683.
29. Wilezek H., Justova V., Pacovsky V. // *Cas. Lek. cesk.*— 1988.— Vol. 127.— P. 780—782.

Поступила 17.07.91

EFFECT OF UNILATERAL NEPHRECTOMY ON METABOLISM OF VITAMIN D IN PREGNANT RATS.

S. P. Ivashkevich, T. G. Shirankova, L. I. Apukhovskaya, L. I. Omelchenko

Research Institute of Pediatrics, Gynecology and Obstetrics, Kiev

Unilateral nephrectomy causes a decrease in provision of vitamin D dihydro derivatives in pregnant rats, which correlated with the development of hypocalcemia and hypophosphatemia as well as with an increased content of parathyroid hormone. Fetuses of these females contained less amount of mineral components and active metabolites of vitamin D. Neonatases, being born by these females with the nephrectomy, had vitamin D deficiency, which was manifested as a decrease in content of active vitamin D metabolites and minerals as well as an increase in activity of alkaline phosphatase and in the content of parathyroid hormone.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1992

УДК 615.874.2:[613.263:635.655+613.268].03:616.127-005.4.015.4:616.153.915

М. А. Самсонов, А. В. Васильев, А. В. Погожева, Г. Р. Покровская, Г. Ю. Мальцев, И. Р. Бишева, Л. А. Орлова

ВЛИЯНИЕ ИЗОЛЯТА СОЕВОГО БЕЛКА И ИСТОЧНИКОВ ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ $\omega 3$ В СОСТАВЕ ПРОТИВОАТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКОЙ ДИЕТЫ НА ЛИПИДНЫЙ СПЕКТР СЫВОРОТКИ КРОВИ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ У БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА И ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ

Институт питания РАМН, Москва

Согласно концепции, рассматривающей атеросклероз как патологию иммунной системы, основная роль в развитии этого процесса отводится аутоиммунным комплексам липопротеид — антигено, формирование которых способствует повышению проницаемости и повреждению сосудистой стенки, что приводит к избыточному поступлению в интиму артерий атерогенных липопротеидов [2, 3, 6]. Повышение содержания в циркулирующих иммунных комплексах (ЦИК) холестерина, иммуноглобулинов G и M свидетельствуют об усилении атерогенных свойств сыворотки крови [5]. Очевидно, что эти иммунологические показатели могут быть приняты в качестве критериев для оценки эффективности противоатеросклеротических диет.

В наших предыдущих исследованиях было установлено противоатерогенное действие некоторых компонентов пищи, преимущественно используемых в виде нагрузок, — изолята соевого белка, растительного и рыбьего жира [1].

Целью настоящей работы явилось изучение влияния включения в течение 4 нед в противоатеросклеротическую диету А1 изолята соевого белка и ихтиенового масла на иммунологические и метаболические показатели у больных ишемической болезнью сердца (ИБС) и гипертонической болезнью (ГБ).

Методика. Было обследовано 58 больных в возрасте от 39 до 65 лет (49 мужчин и 9 женщин). У 29 из которых диагностирована ИБС с перенесенным инфарктом миокарда, остальные 29 человек страдали гипертонической болезнью II стадии. В течение 1-й недели после поступления в клинику все обследованные больные получали гипонатриевую противоатеросклеротическую диету А1, содержащую 98 г белка (соотношение животного и растительного жира 1:1), 88 г жира (из которого 30 г составляло растительное масло) и 320 г углеводов при энергетической ценности рациона 2500 ккал. В зависимости от модификации диеты больные были разделены на 2 группы. 1-я группа (11 больных с ИБС и 10 с ГБ) в течение 4 нед получали диету А1 с 40 г изолята сои (А1с), в которой соотношение животного и растительного белка изменялось в сторону преобладания последнего (1:2). Изолят соевого белка, приготовленный фирмой «Protein Technologies International», вводили в состав диеты взамен блюд — источников животного белка.

2-я группа (18 больных ИБС и 19 больных ГБ) в течение того же периода получали диету А1с 20 г ихтиенового масла (А1м), которое вводили взамен 20 г растительного. Через 1 нед после поступления в клинику и перед выпиской всем больным проводили клинико-инструментальное, биохимическое и иммунологическое исследования. Биохимические показатели определяли с помощью биохимического анализа-

Показатель	ИБС				ГБ			
	А1с		А1м		А1с		А1м	
	до	после	до	после	до	после	до	после
Возраст, годы	59,1±1,12	—	53,2±1,71	—	42,9±2,14	—	48,8±2,71	—
Рост, см	167,8±1,84	—	173,2±1,51	—	173,5±1,46	—	169,4±1,88	—
Масса тела, кг	73,6±3,12	71,6±2,89	81,4±3,02	77,8±2,57	79,3±3,36	77,4±3,14	81,7±2,77	77,7±2,60
САД, мм рт. ст.	143,0±5,97	122,0±3,51**	136,4±5,14	120,3±3,12**	164,5±8,18	129,0±3,14***	159,2±5,39	118,9±3,55***
ДАД, мм рт. ст.	89,0±3,48	76,5±2,11**	86,1±3,12	75,8±1,81**	99,0±3,14	83,5±1,83***	96,6±4,20	75,2±1,89***
ХС, ммоль/л	7,07±0,35	6,94±0,38	7,87±0,32	6,77±0,24***	6,05±0,32	6,43±0,32	6,31±0,40	5,06±0,28**
ХС ЛПВП, ммоль/л	1,20±0,05	1,26±0,08	0,84±0,08	0,95±0,06	1,19±0,06	1,23±0,07	0,83±0,04	1,16±0,08
Коэффициент атерогенности	4,89±0,21	1,50±0,16	8,36±0,42	6,12±0,30***	4,08±0,13	4,22±0,22	6,60±0,26	3,36±0,12***
ТГ, ммоль/л	1,16±0,13	1,24±0,27	3,86±0,39	2,34±0,27	1,45±0,13	1,49±0,22	2,86±0,44	1,34±0,30
Белок, г/л	70,1±1,05	75,5±1,62*	78,7±1,09	74,0±0,83**	71,1±1,14	73,7±1,13	80,3±1,36	76,8±1,22
Глюкоза, ммоль/л	5,05±0,14	4,94±0,19	6,32±0,21	5,85±0,24	5,41±0,23	5,19±0,32	5,34±0,17	5,78±0,18
Протромбин, %	89,6±1,47	85,2±3,83	88,6±2,23	85,9±1,45	91,7±1,32	80,7±0,60***	94,8±1,58	93,4±1,31
Фибриноген, мг	432,9±13,9	419,4±23,7	334,2±29,9	326,1±34,6	416,2±24,4	298,6±16,1***	327,2±25,6	327,1±24,8
Время фибринолиза, мин	174,5±18,7	203,3±18,6	166,0±15,4	150,0±18,1	213,5±19,0	203,0±13,4	193,6±13,7	214,6±1,45
Тромбоциты, тыс.	266,4±17,3	248,5±16,4	307,3±8,73	245,9±2,09***	272,2±17,7	252,8±17,6	304,2±7,91	893,3±3,26
Время свертывания, мин	10,74±0,79	8,17±0,41**	8,55±0,65	12,5±0,37***	11,9±0,49	8,76±0,89**	6,62±0,64	6,15±0,25
Время кровотоечения, мин	3,31±0,27	2,98±0,19	2,36±0,14	6,04±0,18***	3,58±0,42	4,05±0,48	2,44±0,09	2,16±0,02

Примечание. САД — систолическое артериальное давление; ДАД — диастолическое артериальное давление; ХС — холестерин (и в табл. 2); ХС ЛПВП — ХС липопротеидов высокой плотности; ТГ — триглицериды. Здесь и в табл. 2: одна звездочка — $p < 0,05$, две — $p < 0,01$, три — $p < 0,001$.

тора «Spectrum» Abbott, США, коэффициент атерогенности — расчетным способом.

ЦИК выделяли из сыворотки крови больных, взятой паточак, путем центрифугирования при 3000 об/мин в течение 10 мин [7]. Для определения содержания в них связанного холестерина использовали изопропанольный экстракт ЦИК. Определение холестерина также проводили на биохимическом анализаторе «Spectrum».

Иммуноглобулины, входящие в состав ЦИК, определяли на иммунохимическом анализаторе ICS-II фирмы (Beckmann, США) методом кинетической нефелометрии иммунных преципитатов с использованием набора стандартных антигенов. Имунная реакция происходила в присутствии фосфатного буфера при взаимодействии равных объемов (42 мкл) раствора стандартного антигена и разведенного в 3 раза дилуэнтном суспензии ЦИК. Для определения иммуноглобулинов сыворотки крови, α_1 -антитрипсина, α_2 -макроглобулина, также использовался метод кинетической нефелометрии.

Полученные результаты подвергали статистической обработке с оценкой достоверности различий по критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение. При анализе полученных результатов не было выявлено существенных различий в динамике клинической картины заболевания у больных обеих групп. Как видно из табл. 1, редукция массы тела для больных ИБС и ГБ, получавших диету А1с, составляла в среднем 2 кг, у больных, находившихся на диете А1м, — 4 кг. У больных ИБС — 1-й и 2-й групп отмечалось снижение степени выраженности клинических симптомов коронарной недостаточности, сопровождавшееся в 30—40 % случаев положительной динамикой ЭКГ. Уровень систолического и диастолического артериального давления снижался у больных, получавших А1с и А1м, в равной степени как в случае изначальной нормотонии у больных ИБС, так и при ГБ.

В то же время в процессе диетотерапии существенные различия в динамике биохимических показателей констатированы у больных обеих групп. Как видно из табл. 1, у больных ИБС и ГБ, получавших диету А1м, наблюдалось достоверное падение уровня холестерина в сыворотке крови (соответственно на 14 и 20 % по сравнению с исходным) на фоне явно выраженной тенденции к увеличению содержания холестерина в ЛВП. В результате этого коэффициент атерогенности у больных данной группы значительно снижался. Одно-

временно диета А1м способствовала достоверной редукции уровня триглицеридов в сыворотке крови больных ИБС. Напротив, диета А1с не оказывала выраженного противоатерогенного влияния при ИБС и ГБ. У обследованных этой группы в процессе лечения не отмечалось изменений в липидном спектре сыворотки крови и коэффициента атерогенности. При анализе других биохимических показателей у больных 1-й группы было выявлено некоторое увеличение содержания общего белка в сыворотке крови, в то время как у больных 2-й группы уровень его в процессе лечения снижался. Содержание в крови глюкозы у больных ИБС и ГБ под влиянием диет А1с и А1м практически не изменялось (см. табл. 1).

При оценке состояния свертывающей и противосвертывающей систем крови отмечалось достоверное снижение уровня протромбина и фибриногена у больных ГБ, получавших диету А1с. В то же время наиболее значительное увеличение времени свертывания крови и времени кровотоечения на фоне уменьшения числа тромбоцитов наблюдалось у больных ИБС под влиянием диеты А1м. По-видимому, исследуемые рационы оказывают воздействие на различные звенья системы гемостаза.

В свете иммунологической концепции патогенеза атеросклероза особый интерес представляло изучение иммунного статуса у больных ИБС и ГБ и изменение его под влиянием алиментарных воздействий. По литературным данным известен существенный дисбаланс иммунологических показателей у больных коронарным атеросклерозом, проявляющийся высокой активностью гуморального иммунитета, сопряженного с относительным дефицитом Т-клеточного иммунитета [3]. Это подтверждается данными табл. 2: у всех обследованных больных ИБС отмечался высокий исходный уровень иммуноглобулина А у больных ИБС, получавших диету А1м, содержание которого в сыворотке крови заметно снижалось в процессе диетотерапии. Уровень иммуноглобулинов у больных ГБ, зафиксированный при поступлении в клинику, был в пределах нормы и практически не изменялся в процессе лечения. Изменения содержания холестерина в ЦИК отражали динамику

Влияние диет А1с и А1м на иммунологические показатели (в мг/дл) в сыворотке крови больных ИБС и ГБ

Показатель	ИБС:				ГБ			
	А1с		А1м		А1с		А1м	
	до	после	до	после	до	после	до	после
IgA	—	—	435,7±52,7	391±39,2	299,3±39,2	336,4±70,4	282,7±32,3	283,3±29,0
IgG	1530,8±148,7	1262,1±91,8	1740,1±121,1	1484,6±119,0	1253,3±48,0	1292,2±135,8	1460,0±85,5	1400,8±85,3
IgM	202,7±41,2	169,5±20,4	296,4±39,3	332,6±104,5	165,6±37,0	206,8±34,3	268,4±54,1	223,9±41,2
ХС ЦИК	10,8±2,04	11,6±2,14	13,8±1,95	12,3±1,13	8,47±0,95	9,50±0,54	10,0±1,87	8,38±0,84
Белок ЦИК	0,138±0,023	0,180±0,030	0,470±0,03	0,488±0,04	0,194±0,03	0,196±0,03	0,62±0,13	0,28±0,05*
IgA ЦИК	1,14±0,07	1,33±0,29	1,44±0,23	1,20±0,33	1,21±0,09	1,27±0,12	1,92±0,44	1,37±0,10
IgG ЦИК	1,41±0,18	1,31±0,15	1,63±0,11	1,43±0,17	1,22±0,18	1,16±0,11	2,16±0,61	1,33±0,14
IgM ЦИК	2,14±0,33	1,70±0,15	1,78±0,43	1,51±0,25	1,94±0,28	1,26±0,12*	2,28±0,31	2,56±0,70
С3	142,5±14,7	124,0±7,63	154,5±7,39	140,2±7,72	135,8±17,0	125,9±10,5	137,1±6,3	130,6±7,6
С4	32,1±2,68	30,1±2,43	38,3±1,88	36,9±3,27	32,4±4,69	30,6±3,70	33,1±1,7	35,5±3,9
α ₂ -МГ	160,3±11,1	145,2±9,91	154,1±6,19	148,2±5,88	149,8±12,5	136,8±10,5	153,3±10,5	160,3±97,3
α ₁ -АТ	183,0±11,3	167,6±11,1	385,6±74,5	348,3±51,1	168,2±12,5	166,4±8,00	487,6±33,9	388,5±19,3

Примечание. α₂-МГ — α₂-макроглобулин; α₁-АТ — α₁-антитрипсин.

этого показателя в сыворотке крови. Так, если у больных 1-й группы уровень холестерина в ЦИК практически не изменялся, то во 2-й группе в процессе лечения содержание холестерина в ЦИК, так же как и в сыворотке крови, заметно снижалось. Аналогичный параллелизм наблюдался и в уровне общего белка в ЦИК и сыворотке крови. И в сыворотке крови, и ЦИК было выявлено повышение содержания белка у больных, получавших диету А1с, и его снижение на фоне диеты А1м. Наряду с этим у больных ИБС и ГБ в ЦИК отмечалось снижение содержания IgA и IgG под влиянием диеты А1м и IgM в результате лечения диетой А1с. Поскольку одним из иммунных критериев атерогенности сыворотки можно считать увеличение содержания IgG и IgM и холестерина ЦИК [5, 6], противоатеросклеротическое действие диеты А1м подтверждается не только биохимически (снижение уровня холестерина, триглицеридов, коэффициента атерогенности, повышение уровня холестерина в ЛВП), но и иммунологически (уменьшение содержания в составе ЦИК и в сыворотке крови IgA и IgG). Во то же время, несмотря на то что диета А1с не вызывала значительных изменений в сыворотке крови показателей, характеризующих состояние липидного обмена, а также уровня иммуноглобулина IgA, IgG и IgM, в составе ЦИК выявлено отчетливое снижение содержания IgM. Учитывая это обстоятельство, можно говорить об противоатеросклеротическом действии диеты А1с и расценивать определение содержания IgM в ЦИК как специфический показатель при оценке атерогенного потенциала сыворотки крови.

Наряду с этим высокая активность гуморального иммунитета у обследованных больных обеих групп проявлялась избыточным содержанием в сыворотке крови С3 компонента комплемента, которое в процессе лечения имело тенденцию к снижению. В то же время уровень С4 компонента практически не изменялся. Полученные данные подтверждают известную из литературы наибольшую патогенетическую значимость при атеросклерозе С3 компонента комплемента [3], и выявленная положительная динамика в процессе лечения этого показателя также характеризует антиатерогенную эффективность рационов А1с и А1м.

Принимая во внимание протекторное действие ингибиторов протеаз в иммунологических процессах [4], представлялось интересным изучение их динамики под влиянием противоатеросклеро-

тических диет А1с и А1м. Как видно из табл. 2, уровень α₁-антитрипсина и α₂-макроглобулина в сыворотке крови больных обеих групп в процессе лечения имел тенденцию к снижению, что по-видимому, отражает общую направленность иммунологических реакций к уменьшению их напряженности под влиянием диет А1с и А1м.

Таким образом, диета А1м оказывала выраженное гиполипидемическое действие, проявляющееся в значительном снижении в сыворотке крови уровня холестерина, триглицеридов, а также коэффициента атерогенности на фоне повышения содержания холестерина в ЛВП как у больных ИБС с гиперлипидемией, так и в случае нормолипидемии у больных ГБ. Противоатеросклеротическая диета А1с оказывала менее выраженное влияние на показатели липидного обмена в сыворотке крови, вместе с тем так же, как и рацион А1м, способствовала снижению напряженности иммунологических реакций у больных ИБС и ГБ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильев А. В., Ли Хва Рен, Покровская Г. Р. и др. // Вопр. питания. — 1989. — № 5. — С. 33—36.
2. Климов А. Н., Денисенко А. Д. // Успехи соврем. биол. — 1988. — Т. 106, № 2 (5). — С. 279—289.
3. Осипов С. Г. // Клин. мед. — 1989. — № 1. — С. 27—37.
4. Проценко В. А., Шпак С. И. // Успехи соврем. биол. — 1988. — Т. 106, № 2 (5). — С. 255—263.
5. Тергов В. В., Качарова А. Г., Сандян Х. С. и др. // Кардиология. — 1989. — № 8. — С. 35—38.
6. Титов В. П., Осипов С. Г., Румянцев А. Г. // Лаб. дело. — 1988. — № 9. — С. 41—46.
7. Szondy E., Horvath M., Mezey L. // Atherosclerosis. — 1983. — Vol. 49. — P. 69—77.

Поступила 26.07.91

EFFECTS OF SOY BEAN PROTEIN ISOLATES AND POLYUNSATURATED FATTY ACIDS ω₃ CONTAINED IN ANTIATHEROSCLEROTIC DIET ON SERUM LIPID SPECTRA AND IMMUNOLOGIC PATTERNS OF PATIENTS WITH ISCHEMIC HEART DISEASE AND HYPERTENSION.

M. A. Samsonov, A. V. Vasilev, A. V. Pogozheva, G. Yu. Mal'tsev, I. R. Biyasheva, L. A. Orlova, G. R. Pokrovskaya

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

Blood serum lipid spectra and immunologic spectra were studied in patients with ischemic heart disease and hypertension maintained on antiatherosclerotic diet containing either soy bean protein isolates or ichthyenic oil. The ichthyenic oil-containing diet decreased distinctly the level of cholesterol, triglycerides and the atherogenicity coefficient simultaneously with an increase of cholesterol content in high density lipoproteins in blood of 37 patients with these diseases. The diet with soy

bean protein isolates exhibited less pronounced effects on lipid metabolism patterns in blood serum as compared with the ichthyenic oil-containing diet; however, the former diet contributed to normalization of the immunologic reactions in patients with ischemic heart disease and hypertension.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1992

УДК 616.127-005.4-092:616.155.25-008.931]-07

А. В. Васильев, С. Н. Богданова, Е. А. Варсанович,
А. В. Погожева, М. А. Самсонов

ЛИПОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ ЛИЗОСОМ ТРОМБОЦИТОВ И МОНОНУКЛЕАРОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА

Институт питания РАМН, Москва

В связи с тем что смертность населения от сердечно-сосудистых заболеваний в нашей стране составляет более половины общей смертности (57%), проблема профилактики, ранней диагностики и лечения атеросклероза продолжает оставаться главной в здравоохранении [13]. Известно, что в развитии атеросклероза и ишемической болезни сердца (ИБС) существенное значение имеют различные формы гиперлипидемий (ГЛП), как приобретенные, связанные в большинстве случаев с характером питания, так и наследственно обусловленные (первичные или семейные), детерминированные генетическими дефектами рецепторного связывания липопротеидов клетками [6, 20, 24]. Очевидно, что в понимании патогенеза атеросклероза и ИБС прогресс в значительной степени связан с изучением механизмов нарушения обмена липидов и липопротеидов. Однако если имеются достаточно исчерпывающие сведения о биосинтезе и транспорте липопротеидов, то представление об особенностях их химической и enzymатической модификации в условиях рецепторопосредованного и неспецифического эндоцитоза весьма ограничено. Определенную роль в этих процессах играют тромбоциты и мононуклеары крови и, в частности, ферментные системы лизосом этих клеток [5, 12, 15, 18, 23, 26, 27, 30]. С другой стороны, обмен липопротеидов и активность лизосом клеток крови в значительной степени определяются характером питания. Особое значение при разработке новых антиатеросклеротических диет уделяется модификации их жирнокислотного состава, в частности соотношения ПНЖК/МНЖК/НЖК и ПНЖК семейства $\omega 6/\omega 3$.

В последние годы внимание исследователей в качестве антиатеросклеротического фактора при-

влекли ПНЖК семейства $\omega 3$: эйкозапентаеновая (ЭПК) и декозогексаеновая, главным источником которых является рыбий жир и жир морских животных. Данные литературы [4, 7, 14, 29] свидетельствуют о гипотриглицеридемическом, гипохолестеринемическом и антиатерогенном действии ПНЖК $\omega 3$. Вместе с тем в ряде работ положение об антиатеросклеротической функции ПНЖК $\omega 3$ не нашло подтверждения [33, 35].

В связи с этим целью настоящей работы явилась комплексная оценка эффективности антиатеросклеротической диеты, содержащей ихтиеновое масло как источник ПНЖК $\omega 3$, при лечении больных ИБС и ГЛП с использованием широкого метаболического скрининга, характеризующего состояние обмена липидов и липопротеидов на основании изучения активности лизосомальных гидролаз тромбоцитов и мононуклеаров (кислой липазы, кислой холестеролэстеразы, кислых фосфолипаз A_1 и A_2), а также определение стандартных биохимических показателей липидного обмена и иммунного спектра сыворотки крови.

Методика. Представлены результаты обследования 70 больных ИБС и семейной ГЛП IIa, IIb и IV типов. Мужчин было 50, женщин — 20. У 31 мужчины была диагностирована ИБС с перенесенным инфарктом миокарда (средний возраст $54,3 \pm 1,42$ года). У 9 больных ($53,1 \pm 2,26$ года) установлена семейная ГЛП IIa типа, у 18 ($50,7 \pm 1,50$ года) — IIb типа, у 12 ($47,7 \pm 2,57$ года) — IV типа.

Обследованные имели нормальную массу тела и в течение первой недели пребывания в клинике получали противоатеросклеротическую диету А1, содержащую 98 г белка (соотношение животного и растительного 1:1), 88 г жира (30 г составляло растительное масло) и 320 г углеводов при энергетической ценности рациона 2500 ккал. В последующие 4 нед 13 больных ИБС находились на диете А1, в которой 10 г растительного масла были заменены равным количеством ихтиенового масла (рыбьего жира), полученного из скумбрии по специальной технологии, разработанной во ВНИРО. Соотношение ПНЖК $\omega 6/\omega 3$ в рационе составляло 3,0. 18 больных ИБС и все обследованные с семейной ГЛП в течение такого же срока получали диету А1 с заменой 20 г растительного масла ихтиеновым, что позволило снизить соотношение ПНЖК $\omega 6/\omega 3$ до 1,3.

Тромбоциты и мононуклеары выделяли из крови путем последовательного центрифугирования в градиенте фиколл — верографин в нашей модификации [31, 40]. Венозную гепаринизированную кровь центрифугировали при 1000 об/мин в течение 20 мин. Отбирали плазму, из которой выделяли тромбоциты путем осаждения и последующего отмывания в 0,25 М сахарозы, содержащей 1 мМ ЭДТА. Оставшийся объем с кровью разводили в соотношении 1:1 физиологическим раствором и наслаивали на фиколл с верографинном. После центрифугирования при 1200 об/мин в течение 45 мин снимали мононуклеары в соответствии со шкалой распределения Density Markers Beads («Pharmacia», Швеция). Полученные клетки осаждали и отмывали. Выделенную суспензию тромбоцитов и мононуклеаров гомогенизировали в 0,25 М сахарозы, содержащей 1 мМ ЭДТА.

Активность кислых фосфолипаз A_1 (КФ 3.1.1.32) и A_2 (КФ 3.1.1.4) определяли радиометрическим методом [38] с ис-

Активность (в мкмоль/мин на 1 г белка) лизосомальных гидролаз в тромбоцитах и мононуклеарах больных ИБС, находившихся на диете А1 с включением различного количества ихтиенового масла ($M \pm m$)

Фермент	10 г ихтиенового масла (n=13)				20 г ихтиенового масла (n=18)			
	мононуклеары		тромбоциты		мононуклеары		тромбоциты	
	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения
Кислая липаза	1,35±0,12	2,14±0,13	0,32±0,04	0,49±0,02	1,73±0,05	2,56±0,09	0,185±0,02	0,29±0,03
Холестеролэстераза	2,64±0,31	1,94±0,21	0,65±0,06	0,41±0,14	2,51±0,13	1,95±0,06	0,51±0,03	0,44±0,02
Фосфолипаза A_1	2,33±0,32	1,53±0,33	2,13±0,17	1,28±0,21	2,45±0,06	2,05±0,27	1,89±0,13	1,14±0,07
Фосфолипаза A_2	2,64±0,23	1,41±0,27	1,94±0,13	1,33±0,26	2,53±0,27	2,33±0,03	1,91±0,14	1,24±0,22

Примечание. Звездочка — $p < 0,05$.

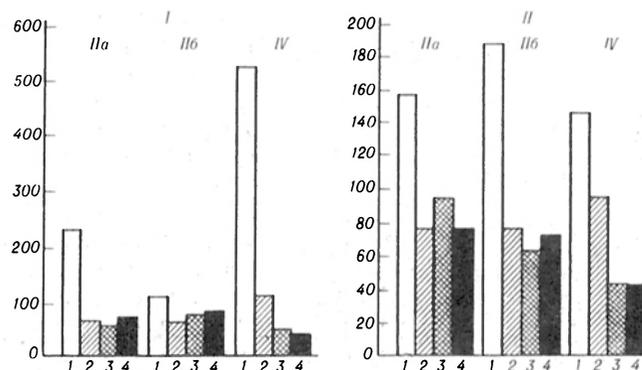
пользованием в качестве субстрата синтезированного нами 1-ацил-2-(1-¹⁴C)-олеил-глицеро-3-*sn*-фосфорилхолин [34]. Активность кислой холестероластеразы (КФ 1.1.1.13) определяли по методу [32] в модификации [37], используя в качестве субстрата 12,7 мкмоль холестерол-(1-¹⁴C)-олеата (удельная радиоактивность 56 мКи/ммоль; «Amersham», Англия), суспендированного в лецитин-дигитониновую дисперсию. Активность кислой липазы (КФ 3.1.1.3) определяли спектрофотометрически по методу [1], используя в качестве субстрата β-нафтилкаприлат («Sigma», США). В сыворотке крови определяли концентрацию общих липидов, а также холестерина (ХС) и триглицеридов (ТГ) с использованием биохимического анализатора «Спектрум» (фирма «Abbott», США). Кроме того, определяли содержание ХС в циркулирующих иммунных комплексах (ЦИК), выделенных из сыворотки по методу [28, 39].

Результаты и обсуждение. В результате терапии противоатеросклеротической диетой с различным содержанием ихтиенового масла в клинической картине заболевания отмечались положительные сдвиги. У всех больных ИБС наблюдалось снижение степени выраженности симптомов коронарной недостаточности, сопровождающиеся в 70 % случаев положительной динамикой на ЭКГ. Примерно у 40 % больных с семейной ГЛП II типа отмечалось уменьшение степени выраженности сухожильных ксантом и периорбитальных ксантелазм. Редукция массы тела у больных всех групп была практически одинаковой и составляла от 2,5 до 4 кг. Систолическое и диастолическое артериальное давление достоверно снижалось у всех обследованных, у которых оно было повышено, на 8—13 % по сравнению с исходным уровнем, что, по-видимому, было обусловлено низким содержанием натрия в применяемых рационах.

У больных ИБС наибольшее снижение уровня ХС (на 22 % по сравнению с исходным) наблюдалось при лечении диетой А1 с включением 10 г ихтиенового масла. В то время как при замене в диете 20 г растительного масла рыбьим жиром у этих больных отмечалось снижение содержания общего ХС на 14 %. У обследованных с семейной ГЛП, находившихся на диете А1 с 20 г ихтиенового масла, значительное уменьшение этого показателя было выявлено при IV типе (на 28 % по сравнению с исходным) относительно больных с IIa (на 9 %) и IIб (на 16 %) типом. Диетотерапия с включением различного количества ихтиенового масла способствовала повышению уровня ХС ЛПВП на 13—16 % у больных ИБС и на 34 и 10 % при ГЛП IIa и IIб типов соответственно. Наиболее значительные изменения наблюдались в уровне ТГ под влиянием диеты А1 с содержанием рыбьего жира 10 и 20 г: у больных ИБС соответственно на 33 и 40 %. В результате лечения диетой А1 с 20 г ихтиенового масла у больных семейной ГЛП IIa, IIб и IV типов концентрация ТГ снижалась на 47, 33 и 32 % соответственно.

Представляло интерес изучение влияния ПНЖК ω3 в составе противоатеросклеротической диеты на активность лизосомальных гидролаз, участвующих в процессе катаболизма липидов. Как видно из таблицы, наиболее выраженные изменения активности липолитических ферментов лизосом отмечались в мононуклеарах больных ИБС, находившихся на диете А1 с содержанием ихтиенового масла 10 г. Так, при включении в противоатеросклеротическую диету 10 г **рыбьего жира** активность кислой липазы в процессе лечения повы-

шалась на 58 % по сравнению с исходной, в то время как активность лизосомальных холестероластеразы, фосфолипаз А₁ и А₂ снижалась соответственно на 27, 35 и 47 %. Под влиянием диеты А1 с 20 г ихтиенового масла в мононуклеарах больных ИБС отмечалось увеличение активности кислой липазы на 48 % и снижение активности холестероластеразы, фосфолипаз А₁ и А₂ на 23, 16 и 8 % соответственно. Аналогичные тенденции в динамике активности лизосомальных гидролаз выявлялись и в тромбоцитах больных ИБС, причем активность кислой липазы, фосфолипаз А₁ и А₂ изменялась в одинаковой степени (на 40—55 % по сравнению с исходной) при использовании диеты А1 с 10 и 20 г ихтиенового масла (см. рисунок, I). Снижение активности холестероластеразы в тромбоцитах больных ИБС было обратно пропорционально содержанию в диете ПНЖК ω3 (снижение на 37 % на диете А1м-10 и на 14 % на диете А1м-20). Проведенные нами ранее исследования показали значительно меньшее снижение активности лизосомальных фосфолипаз А₁ и А₂ (соответственно на 29 и 24 %) под влиянием фоновой противоатеросклеротической диеты А1 в течение 4 нед в тромбоцитах у больных ИБС с нормальной массой тела [3]. Сравнительный анализ активности липолитических ферментов лизосом мононуклеаров у больных с различными типами ГЛП под влиянием диеты А1 с включением 20 г ихтиенового масла (см. рисунок, II) показал активацию в процессе лечения кислой липазы на 53, 86 и 45 % соответственно при ГЛП IIa, IIб и IV типов. Снижение активности лизосомальных холестероластеразы, фосфолипаз А₁ и А₂ было наиболее выражено при IV типе ГЛП (соответственно на 35, 58 и 58 % по сравнению с исходной). В тромбоцитах больных ГЛП IIб типа активность кислой липазы в процессе диетотерапии практически не изменялась, тогда как при ГЛП IIa и IV типов возрастала в 2,5 и 5 раз соответственно. Так же как и в мононуклеарах, максимальное снижение активности лизосомальных холестероластеразы, фосфолипаз А₁ и А₂ (на 57, 54 и 56 %) наблюдалось при IV типе ГЛП. Таким образом, наиболее выраженные изменения активности липолитических ферментов лизосом мононуклеаров и тромбоцитов отмечались у больных ГЛП IV типа, что, по-видимому, отражает преимущественное



Активность лизосомальных гидролаз в тромбоцитах (I) и мононуклеарах (II) больных ГЛП IIa, IIб и IV типов после курса диетотерапии.

По осям абсцисс: 1 — кислая липаза, 2 — холестероластераза, 3 — фосфолипаза А₁, 4 — фосфолипаза А₂; по осям ординат — активность ферментов (в %) от активности до лечения.

воздействие ПНЖК $\omega 3$ на обмен ТГ [36]. Изменения активности лизосомальных липолитических ферментов в мононуклеарах и тромбоцитах больных ИБС и ГЛП, наблюдаемые под влиянием противоатеросклеротической диеты, содержащей ихтиеновое масло, свидетельствует о большей чувствительности этих показателей при оценке эффективности диетотерапии по сравнению с общепринятыми биохимическими показателями, отражающими состояние липидного обмена. Эти данные подтверждают полученные нами ранее результаты исследования активности катепсинов В и С и фосфолипаз A_1 и A_2 при использовании различных противоатеросклеротических диет [2, 3]. Исследование активности этих ферментов у больных с разными заболеваниями, обусловленными нарушениями липидного обмена (ИБС, ГЛП II типа, ИБС и ожирение) при применении антиатеросклеротической гиполипидемической диеты показало большую информативность активности кислых гидролаз по сравнению со стандартными биохимическими показателями липидного обмена. Сходные результаты были получены на кроликах при экспериментальном атеросклерозе и ГЛП [17]. Особый интерес представляло параллельное изучение влияния ПНЖК $\omega 3$ в составе противоатеросклеротической диеты на иммунохимические показатели у больных с нарушенным липидным обменом. У всех больных ИБС и семейной ГЛП отмечалась повышенная концентрация в сыворотке крови иммуноглобулинов (Ig) классов А и G. У больных ИБС под влиянием диетотерапии наблюдалось снижение содержания в сыворотке крови IgA и IgG пропорционально увеличению концентрации в диете ихтиенового масла. У больных ГЛП под влиянием диеты A_1 с 20 г рыбьего жира также отмечалось снижение уровня Ig классов А, М и G, наиболее выраженное при IIa типе ГЛП. Уровень ХС в ЦИК снижался примерно в одинаковой степени у всех больных. Содержание общего белка в сыворотке крови и ЦИК практически не изменялось. Под влиянием терапии диетой A_1 с 20 г ихтиенового масла отмечалось снижение концентрации IgG в ЦИК у больных ИБС и ГЛП IIa и IV типов.

Таким образом, динамика иммунохимических показателей отражает антиатерогенную направленность противоатеросклеротической диеты с включением рыбьего жира [8].

Выраженное антиатерогенное действие диеты с включением ихтиенового масла как источника ПНЖК $\omega 3$, вероятно, связано с изменениями жирнокислотного состава структурных липидов мембран, их стабилизации, со снижением содержания арахидоновой кислоты и значительным возрастанием концентрации ЭПК в составе фосфолипидов клеточных мембран [11, 16, 25]. При лечении больных ИБС наиболее эффективным оказалось применение диеты с включением ихтиенового масла в количестве 10 г; при использовании более высоких доз (20 г) отмечалось менее выраженное гиполипидемическое действие, возможно, в силу увеличения ненасыщенности и снижения микровязкости мембран, что в свою очередь может изменить конформационные свойства апопротенинов на поверхности частиц и таким образом модифицировать взаимодействие ЛПНП с клеточными рецепторами [10, 21].

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что изменение активности лизосомальных липолитических ферментов является неотъемлемым звеном в патогенезе заболеваний, обусловленных нарушениями липидного обмена (ИБС, ГЛП). Активацию системы лизосомального липолиза можно рассматривать как компенсаторную реакцию этих ферментных систем на фоне преобладания процессов неспецифического (нерегулируемого) эндоцитоза модифицированных ЛПНП или надмолекулярных ЛПНП-содержащих комплексов, когда специфический рецепторопосредованный путь эндоцитозного захвата ЛПНП ингибируется по принципу обратной связи высокими концентрациями эфиров ХС (ЭХС) [1, 9, 19, 22]. При этом в условиях максимального субстратного насыщения может возникнуть недостаточность отдельных лизосомальных ферментов, расщепляющих ЭХС (в частности, кислые липазы), что приводит к дальнейшей аккумуляции ЭХС и ТГ в клетках крови и повышению риска атеросклероза [23, 34].

Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности исследования лизосомальных липолитических ферментов как высокочувствительных биохимических показателей атеросклеротического процесса у больных ИБС в целях ранней диагностики и оценки эффективности лечебных диет при данном заболевании.

ЛИТЕРАТУРА

1. Будычева А. Г., Семенова Е. Г., Ассиновская О. А. // Цитология. — 1986. — Т. 28, № 7. — С. 703–711.
2. Васильев А. В., Меццарькова В. А., Погожева А. В. и др. // Пат. физиол. — 1987. — № 4. — С. 71–74.
3. Васильев А. В., Шимановская И. П., Погожева А. В. и др. // Вопр. питания. — 1987. — № 6. — С. 14–17.
4. Верткин А. Л., Мартынов И. В., Бикбов Т. М. и др. // Кардиология. — 1991. — Т. 31, № 6. — С. 59–61.
5. Гапонова М. В., Шакалис Д. А., Малюткина С. К. // Тер. арх. — 1988. — Т. 60, № 9. — С. 102–106.
6. Давиденкова Е. Ф., Либерман П. С., Шафран М. Г. // Клин. мед. — 1990. — № 10. — С. 23–31.
7. Калинин О. М., Грацианский П. А., Перова И. В. и др. // Кардиология. — 1990. — Т. 30, № 7. — С. 34–38.
8. Качарова А. Г., Тергов В. В., Метельская В. Д., Перова И. В. // Там же. — 1991. — Т. 31, № 2. — С. 39–42.
9. Климов А. П., Никульчева Н. Г. Липопротеиды, дислипидемии и атеросклероз. — Л., 1984.
10. Левачев М. М. Жиры рыб в диетотерапии гиперлипидемий и гипертензии. — М., 1988.
11. Ли Хва Рен, Васильев А. В., Орехов А. П., Тутельян В. А. // Вопр. питания. — 1989. — № 3. — С. 20–22.
12. Мрочек А. Г. // Кардиология. — 1989. — Т. 29, № 9. — С. 102–107.
13. Оганов Р. Г., Перова И. В. // Там же. — 1990. — Т. 30, № 5. — С. 57–60.
14. Прохорович Е. А., Жаров Е. И., Мартынов И. И. и др. // Там же. — № 8. — С. 99–102.
15. Самсонов М. А., Васильев А. В., Погожева А. В., Шимановская И. П. // Структура и функции лизосом. — М., 1986. — С. 175–176.
16. Самсонов М. А., Левачев М. М., Погожева А. В. и др. // Вопр. питания. — 1990. — № 5. — С. 14–18.
17. Табагари С. И., Феофилактова С. П., Варсанович Е. А. и др. // Вопр. мед. химии. — 1990. — № 6. — С. 32–34.
18. Тутельян В. А., Васильев А. В. // Вести. АМН СССР. — 1987. — № 7. — С. 48–52.
19. Тутельян В. А., Васильев А. В. // Там же. — 1990. — № 2. — С. 14–21.
20. Эпидемиология и факторы риска ишемической болезни сердца / Под ред. А. Н. Климова. — Л., 1989.
21. Berlin E., Yudd J. T., Marshall M. N., Kliman P. Y. // Atherosclerosis. — 1987. — Vol. 66. — P. 215–225.
22. Brown M. S., Goldstein J. L. // Ann. Rev. Biochem. — 1983. — Vol. 52. — P. 233–261.

23. Coates P. M., Langer T., Cortner J. A. // *Atherosclerosis*.— 1986.— Vol. 62.— P. 11—20.
24. Daughesly A., Schonfeld G. // *Pharmacol. Ther.*— 1985.— Vol. 31, N 3.— P. 237—255.
25. Galli C., Moschi C., Medini L., Tremoli E. // *Wien. klin. Wschr.*— 1989.— Bd 401, N 8.— S. 267—276.
26. Hagemenas F. C., Manaugh L. C., Illingworth D. K., Sundberg E. B. // *Atherosclerosis*.— 1984.— Vol. 50.— P. 335—340.
27. Haley N. Y., Stahley F. C., de Duve // *J. Lipid Res.*— 1980.— Vol. 21.— P. 961—969.
28. Klimov A. N., Denisenko A. D., Popov A. V. et al. // *Atherosclerosis*.— 1985.— Vol. 58.— P. 1—15.
29. Mehta J., Lopez L. M., Lawson D. L. // *Amer. J. Med.*— 1988.— Vol. 84.— P. 45—52.
30. Munro J. M., Cotran R. S. // *Lab. Invest.*— 1988.— Vol. 58, N 3.— P. 249—261.
31. Pertoft H., Histerstein M., Kagedal L. // *Cell Population: Methodological Surveys* / Ed. E. Hoowiid.— Amsterdam, 1979.— Vol. 9.— P. 67—80.
32. Pittman K. C., Khao F. C., Steinberg D. // *J. biol. Chem.*— 1975.— Vol. 250.— P. 4505—4510.
33. Rich S., Miller J. F., Charous S. // *Arteriosclerosis*.— 1989.— Vol. 9, N 2.— P. 189—194.
34. Robertson A. O., Lands W. R. M. // *Biochemistry*.— 1962.— Vol. 1.— P. 8804—8810.
35. Rogers K. A., Karnovsky M. J. // *Amer. J. Path.*— 1988.— Vol. 132, N 2.— P. 382—388.
36. Schonfeld Y. // *Clin. Chem.*— 1988.— Vol. 34, N 83B.— P. 111—114.
37. Severson D., Fletcher T. // *Atherosclerosis*.— 1978.— Vol. 31.— P. 21—32.
38. Stoffel W., Trabert V. // *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*— 1969.— Bd 350.— S. 836—844.
39. Szondy E., Horvath M., Mezey Z. et al. // *Atherosclerosis*.— 1983.— Vol. 49.— P. 69—77.
40. Ymelig-Meyling F., Walmann F. A. // *J. immunol. Meth.*— Vol. 33.— 1980.— N 1.— P. 1—9.

Поступила 18.03.92

© Н. Ф. ЛЕУС, 1992

УДК 617.741-008.94:577.16]-07

Н. Ф. Леус

ВИТАМИНЫ И КОЭНЗИМЫ В ОФТАЛЬМОЛОГИИ

Одесский НИИ глазных болезней и тканевой терапии им. В. П. Филатова

Взаимосвязь функционального состояния органа зрения и витаминов отмечалась во многих исследованиях. Обычно эти исследования касались нарушений функций сетчатки и прозрачности хрусталика при ограниченном поступлении в организм человека или животного отдельных витаминов.

В последние годы особое внимание привлекают вопросы выяснения роли витаминов в процессе образования катаракты.

Несмотря на то что хрусталик не относится к числу тканей с интенсивным метаболизмом, протекающие в хрусталике взрослого человека биохимические процессы весьма напряжены и связаны в первую очередь не с размножением и ростом тканевых структур, а с обеспечением их стабильности.

В общем виде процессы, ответственные за нативность хрусталиковых компонент, могут быть представлены в следующем виде: биоэнергетические процессы (окислительно-восстановительные процессы, накапливающие энергию АТФ и других высокоэнергетических соединений); транспорт ионов и метаболитов (транспортные и барьерные функции цилиарного тела и капсулы хру-

сталика); процессы биосинтеза; активность ферментных систем защиты белков и липидов, а также регенерации восстановленной формы глутатиона.

Во всех этих процессах важную роль играет трипептид глутатион. Функции этого коэнзима в хрусталике связаны как с тиоловой группой, так и с остатком γ -глутамата.

В осуществлении важных функций глутатиона, связанных с его тиоловой группой, ведущая роль принадлежит окислительно-восстановительной системе глутатиона, позволяющей поддерживать высокий уровень восстановленной формы глутатиона за счет регенерации его окисленной дисульфидной формы с помощью НАДФН.

Этот важнейший для тканей глаза, особенно для хрусталика, процесс катализируется глутатионредуктазой — флавиновым ферментом, функция которого в значительной степени определяется метаболическим статусом рибофлавина в хрусталике. Последний зависит от целого ряда общих и местных факторов. В числе первых наиболее существенными представляются поступление рибофлавина в организм и транспортировка его в органы и ткани. Среди местных факторов в хрусталике определяющими являются система синтеза флавиномононуклеотида (ФМН) и флавидинуклеотида (ФДН).

В настоящее время ферменты синтеза флавиновых нуклеотидов в хрусталике тщательно изучаются [4].

При исследовании поступления рибофлавина в хрусталик было, в частности, показано, что этот процесс не является энергезависимым и что белки хрусталика обладают способностью связывать свободный рибофлавин [5].

По всей вероятности, рибофлавин поступает в хрусталик вследствие простой диффузии, частичное же связывание свободного рибофлавина белками, а также синтез нуклеотидов из витамина способствуют созданию метаболически эффективных концентраций коферментных форм рибофлавина в хрусталике.

Интересно отметить, что ферменты синтеза флавиновых коферментов — ФМН-синтаза и ФАД-пирофосфорилаза — выявлены в белках хрусталиковых волокон, но не обнаружены в капсуле и эпителии. Это обстоятельство является дополнительным свидетельством в пользу того, что витамин при прохождении через аквохрусталиковый барьер не подвергается метаболической модификации.

При изучении процессов расщепления флавиновых нуклеотидов нами установлено, что эпителиально-капсульные компоненты обладают выраженной гидролитической активностью в отношении ФМН и ФАД.

По всей вероятности, указанные коферменты не могут поступать в хрусталик в виде нуклеотидов, а предварительно расщепляются с освобождением рибофлавина, который, поступая в хрусталик, подвергается фосфорилированию до ФМН, а затем посредством пирофосфорилазной реакции — до ФАД.

Интересно заметить, что аналогичные процессы происходят и в кишечнике, где коферменты, как правило, расщепляются до предшественников — витаминов, всасываются в таком виде, а затем уже в эпителиальных клетках кишечника и печени

Таблица 1

Распределение глаз экспериментальных животных по степени помутнения хрусталика в зависимости от уровня ФАД-эффекта в динамике развития катаракты, индуцированной сочетанным применением аминотриазола и ССІ₁

Срок наблюдения, нед	Стадия помутнения хрусталика	ФАД-эффект				p
		нормальный		повышенный		
		количество глаз	%	количество глаз	%	
До начала эксперимента	—	28	100	30	100	—
3	0	12	43	4	13	<0,01
	I	16	57	20	67	
	II	—	—	6	20	
	III	—	—	—	—	
6	0	6	22	—	—	<0,05
	I	20	71	22	73	
	II	2	7	8	27	
	III	—	—	—	—	
9	0	2	7	—	—	<0,025
	I	14	50	6	20	
	II	8	29	10	33	
	III	4	14	8	27	
12	0	—	—	6	20	<0,01
	I	2	7	—	—	
	II	10	36	4	13	
	III	12	43	12	40	
	IV	4	14	14	47	<0,01

используются для синтеза соответствующих коферментных форм.

В настоящее время доказано, что наиболее объективным критерием обеспеченности витаминов в организме является метаболическая обеспеченность коферментами энзиматических систем, которая определяется обычно степенью активации коферментзависимого фермента при добавлении экзогенного кофермента [6].

С целью выяснения роли флавинового статуса в устойчивости экспериментальных животных к действию катарактогенных факторов нами исследу-

дована скорость развития патологических изменений в хрусталике в зависимости от состояния метаболической обеспеченности рибофлавином.

Методика. Для этого нами была исследована группа животных из 29 особей, у 14 из которых обеспеченность рибофлавином до начала эксперимента была в пределах нормы (ФАД-эффект равен 1,2), и 15 животных, у которых этот показатель превышал 1,2.

Все животные получали сочетанное воздействие аминотриазола и четыреххлористого углерода на протяжении 12 нед по разработанной нами схеме [7].

Ежедневно производилась биомикроскопия хрусталика.

Клинические наблюдения позволили установить, что первые катарактальные изменения в хрусталиках при нормальной обеспеченности рибофлавином появились через 2 нед воздействия, при недостаточной обеспеченности — спустя 1 нед, т. е. значительно раньше.

Результаты и обсуждение. Через 3 нед сочетанного воздействия аминотриазола и четыреххлористого углерода 43 % хрусталиков глаз с нормальной величиной ФАД-эффекта оставались прозрачными, в то время как среди животных с повышенным ФАД-эффектом их было лишь 13 %. В этот период начальные катарактальные изменения, соответствующие I и II стадиям помутнения хрусталика, при нормальной величине ФАД-эффекта наблюдались у 57 % глаз экспериментальных животных, в то время как у животных с повышенным ФАД-эффектом они были зарегистрированы в 87 % хрусталиков глаз (табл. 1).

Через 6 нед среди глаз животных с нормальной исходной обеспеченностью организма рибофлавином прозрачными оставались хрусталики 22 % глаз, в то время как среди животных с недостаточной исходной обеспеченностью рибофлавином прозрачных хрусталиков не было вообще, а изменения I и II стадий у животных с нормальным и повышенным ФАД-эффектом составляли соответственно 78 и 97 % (табл. 2).

Через 9 нед 7 % глаз экспериментальных животных с нормальным ФАД-эффектом оставались прозрачными, а изменения I и II стадий были обнаружены в 79 % хрусталиков глаз, III стадии — в 14 % хрусталиков глаз, в то время как изменения I и II стадий в хрусталиках глаз животных с повышенным ФАД-эффектом были обнаружены в 53 %, а изменения III и IV стадий — в 47 %.

Через 12 нед в обеих группах отсутствовали животные с прозрачными хрусталиками.

Глаза с изменениями хрусталиков I и II стадий составили 43 %, а III и IV стадий — 57 % у животных с нормальным исходным ФАД-эффектом, в то время как в хрусталиках с повышенным ФАД-эффектом изменения I стадии не наблюдались вообще, изменения II стадии составили 13 %, а III и IV стадий — 87 % (рис. 1).

Таким образом, результаты проведенного сравнительного анализа свидетельствуют о том, что исходный уровень обеспеченности организма рибофлавином является важным звеном в механизмах устойчивости к действию катарактогенных факторов и имеет существенное значение для

Таблица 2

ФАД-эффект в крови кроликов в динамике развития экспериментальной катаракты

Срок взятия крови, нед	Статистический показатель	Контроль	АТ	АТ+ССІ ₁
До начала эксперимента	n	24	18	20
	M	1,195	1,221	1,190
	t	0,046	0,049	0,041
	p	—	>0,05	>0,05
3	n	23	18	18
	M	1,1220	1,216	1,312
	t	0,059	0,030	0,039
	p	>0,05	>0,05	<0,05
6	n	22	17	18
	M	1,247	1,347	1,451
	t	0,026	0,052	0,064
	p	>0,05	>0,05	<0,01
9	n	22	15	17
	M	1,245	1,330	1,580
	t	0,035	0,041	0,058
	p	>0,05	>0,05	<0,01
12	n	21	15	17
	M	1,303	1,357	1,624
	t	0,063	0,047	0,046
	p	>0,05	>0,05	<0,001

Примечание. АТ — аминотриазол.

сроков возникновения и скорости развития катаракты. Полученные данные показывают, что при наличии метаболического дефицита витамина В₂ в организме экспериментальных животных катарактальные изменения развиваются раньше и прогрессируют быстрее по сравнению с животными с нормальной метаболической обеспеченностью рибофлавином. Метаболическая недостаточность рибофлавина снижает устойчивость животных к действию катарактогенных факторов.

Кроме этого, была изучена метаболическая активность обеспечения рибофлавином в крови 133 больных с различной скоростью прогрессирования возрастной катаракты. Анализ ФАД-эффекта показал, что величина этого показателя у больных с быстропрогрессирующей катарактой значительно выше по сравнению с соответствующим показателем как у лиц с прозрачными хрусталиками, так и у больных с медленно прогрессирующей катарактой (рис. 2).

Полученные данные свидетельствуют о наличии метаболической недостаточности флавина у больных с быстропрогрессирующей катарактой. Изучение ФАД-эффекта у больных с различной скоростью прогрессирования возрастной катаракты позволило предположить, что метаболическая обеспеченность рибофлавином может наряду с активностью глутатионредуктазы служить важным прогностическим биохимическим критерием, позволяющим с большой объективностью прогнозировать скорость развития возрастной катаракты.

По нашему мнению, увеличение ФАД-эффекта более чем до 1,371 позволяет установить диагноз быстропрогрессирующей катаракты, снижение величины ФАД-эффекта более чем до 1,263 оценивается нами как биохимический признак медленно прогрессирующей катаракты. Результаты ФАД-эффекта у больных с различными клиническими формами возрастной катаракты показывают, что метаболическая обеспеченность у больных с корковой и субкапсулярной катарактами является неадекватной и выявленные высокие показатели величины ФАД-эффекта указывают на наличие метаболического дефицита рибофлавина у этих больных. Кроме того, нарушение метаболической обеспеченности глутатионредуктазы ФАД в крови при развитии экспериментального гепатита сопровождалось дефицитом флавина по отношению к глутатионредуктазной системе хрусталика. Аналогичные результаты получены в клинико-биохимических исследованиях: повышение ФАД-эффекта глутатионредуктазы в эритроцитах коррелировало с величинами соответствующих активационных коэффициентов хрусталиков, удаленных оперативно.

Результаты наших экспериментальных и клинико-биохимических исследований дают основания предполагать, что метаболическая обеспеченность флавиновым коферментом глутатионредуктазы хрусталика в значительной степени определяет его устойчивость к действию катарактогенных факторов и, по всей вероятности, возникновение возрастной катаракты и скорость ее созревания зависят от метаболического статуса флавинов в хрусталике, так как выявлена отчетливая коррелятивная зависимость между ФАД-эффектом в эритроцитах и клиническими характеристиками

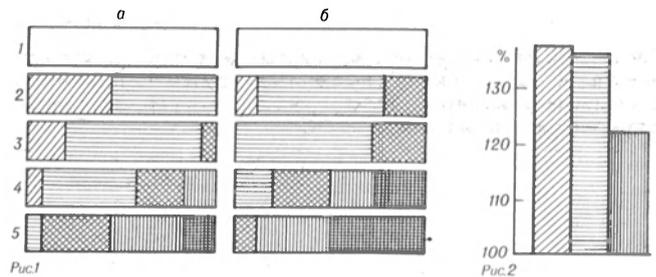


Рис. 1. Степень помутнения хрусталика экспериментальных животных с аминотриазоловой и СС₁-индуцированной катарактой в зависимости от нормального и повышенного ФАД-эффекта.

а — нормальный, б — повышенный ФАД-эффект, %. 1 — до эксперимента; 2 — 3 нед эксперимента; 3 — 6 нед, 4 — 9 нед, 5 — 12 нед. Без штриховки — без изменения хрусталика; косая штриховка — 0 стадия, горизонтальная — I стадия, двойная косая — II стадия, вертикальная — III стадия, двойная прямая — IV стадия.

Рис. 2. Относительные изменения значений ФАД-эффекта (в %) в крови больных с различными формами начальной катаракты.

Косая штриховка — кортикальная форма катаракты, горизонтальная — субкапсулярная, вертикальная — ядерная.

статуса хрусталика и скоростью развития помутнений при возрастной катаракте.

Скорость ресинтеза восстановленной формы глутатиона наряду с состоянием фермента глутатионредуктазы определяется также концентрацией и доступностью НАДФН — одного из никотинамидных коферментов.

В целом роль никотинамидных коферментов обусловлена их участием в окислительных процессах (апотомический цикл), а также в целом ряде восстановительных процессов (восстановление глутатиона, синтез жирных кислот, восстановительное аминирование, реакции детоксикации).

Наиболее существенной функцией никотинамидных коферментов в хрусталике в аспекте обеспечения стабильности его белковых и мембранных компонент является регенерация восстановленной формы глутатиона за счет НАДФН, обладающего гораздо большим сродством к глутатионредуктазе по сравнению с НАДН.

Константа Михаэлиса глутатионредуктазной реакции с использованием НАДН почти на 2 порядка выше таковой при использовании НАДФ [8].

Принимая во внимание интенсивный расход восстановленного глутатиона в хрусталике, становится очевидной чрезвычайная важность обеспечения эффективных концентраций НАДФН.

В хрусталике восстановление фосфорилированного НАД происходит в апотомическом цикле за счет окисления глюкозо-6-фосфата и 6-фосфоглюконата соответствующими ферментными системами [9].

Вполне очевидно, что нарушение этих ферментных систем может приводить к снижению восстановительного потенциала никотинамидных коферментов и глутатиона.

В ряде исследований показано, что одним из наиболее ответственных моментов в НАДФ-генерирующей системе является состояние фермента гексокиназы, активность которого в хрусталике существенно снижается при старении организма [10].

Следует учитывать, что пиридиновые нуклеотиды не только играют важную роль как кофактор в целом ряде окислительно-восстановительных ферментативных систем, но и являются регуляторами скорости и направленности метаболических процессов в тканях [11].

Понятен тот значительный интерес, который уделяется определению содержания их отдельных форм (окисленных и восстановленных) в хрусталике в норме и при нарушениях его прозрачности.

Следует отметить значительную противоречивость ранних исследований относительно содержания отдельных форм никотинамидных коферментов в тканях глаза. Использование методов ферментативного анализа [12] позволило установить истинную концентрацию этих нуклеотидов в отдельных тканях глаза.

И тем не менее в работах последних лет нет четкости относительно уровня отдельных никотинамидных нуклеотидов в окисленном и восстановленном состоянии в хрусталиках животных и человека, в частности эти данные трудно сопоставимы для отдельных участков хрусталика (коры и ядра), в особенности при различных типах катаракт. По нашему мнению, это может быть обусловлено различными условиями обработки ткани при приготовлении экстрактов, и в частности с нарушением температурного режима.

Более высокая концентрация никотинамидных коферментов отмечается в хрусталике, при этом в эпителии их концентрация превышает таковую в других тканях глаза [13].

При моделировании световой катаракты у кроликов соотношение НАДФ/НАДФН сдвигалось в сторону окисленных форм, тогда как отношение НАД/НАДН существенно не изменялось.

В опытах с индуцированием токсических катаракт (нафталин, стрептозотоцин, аминотриазол) также отмечалось некоторое уменьшение восстановительного потенциала пары НАДФ/НАДФН, при этом довольно значительно снижается общий уровень НАД при нафталиновой катаракте [14]. В механизме отмеченных сдвигов в уровне никотинамидных коферментов при действии катарактогенных факторов существенную роль может играть снижение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, наблюдаемое рядом исследователей [15, 16], а также обнаруженное нами в этих условиях снижение скорости синтеза НАД, обусловленное повреждением никотинамидмоноуклеотидаденилтрансферазы.

Особый интерес, по нашему мнению, представляют данные о концентрации пиридиннуклеотидов в хрусталике глаза человека при различных типах катаракт, когда при снижении общего уровня нуклеотидов восстановительный потенциал пары НАДФ/НАДФН повышен в среднем в 2 раза и концентрация восстановленной формы НАДФ в хрусталиках с катарактой в большинстве случаев повышена [17]. Падение концентрации восстановленного глутатиона в этих условиях невозможно объяснить нарушением восстановительного потенциала фосфорилированных пиридиннуклеотидов.

Возможно, что в механизмах снижения уровня восстановленного глутатиона при возрастной катаракте играют роль необратимое связывание глутатиона модифицированными белками хрусталика,

повышенная диффузия окисленного глутатиона с нуклеофилами, усиление γ -транспептидазных реакций [17]. Следует отметить, что в поддержании эффективной концентрации глутатиона важная роль принадлежит состоянию мультиэнзимного комплекса, осуществляющего биосинтез этого трипептида [18]. Полагают, что именно иницирующей фермент синтеза глутатиона — γ -глутамилцистеинсинтетаза, лимитирующий уровень которой с возрастом еще более снижается, является наиболее существенным фактором, ответственным за снижение уровня лентикулярного глутатиона при старении и развитии катаракты [19]. Различия в качественном составе питания могут влиять на уровень аминокислот, участвующих в синтезе глутатиона [20].

В хрусталике функционирует ряд витаминзависимых ферментов, таких, как транскеталаза и трансаминазы (соответственно тиамин- и пиридоксальзависимые). В эксперименте и клинике было показано, что при развитии катаракты отмечается снижение активности хрусталиковой транскеталазы, коррелирующее с клиническими проявлениями заболевания: нарастание помутнений хрусталика сопровождалось дальнейшим понижением активности фермента [21]. Сравнительный анализ результатов определения активности транскеталазы в хрусталике и крови больных с катарактой дает основания считать, что сдвиги в активности витаминзависимого фермента носят в значительной степени генерализованный характер. Об этом также свидетельствуют и результаты экспериментов с окситиаминном [22].

Результаты проводимых нами исследований метаболического статуса тиамина и пиридоксаля при моделировании катаракт у кроликов и развитии возрастной катаракты у человека свидетельствуют о наличии коррелятивных связей между метаболической обеспеченностью коферментными витаминами и процессом возникновения и развития помутнений в хрусталике. Нами показана взаимосвязь между величиной кофермент-эффектов в хрусталике и крови. В хрусталике обнаружена активность ферментных систем, синтезирующих ТПФ, ПАПФ, а также расщепляющих указанные коферменты. По всей вероятности, в хрусталик тиамин и пиридоксаль поступают (так же, как и рибофлавин) в неэтерифицированной форме; в хрусталике осуществляется автономный синтез коферментных форм витаминов.

Коферменты участвуют в регуляции уровня апоферментных белков посредством воздействия на реакции их ограниченного протеолиза. Снижение уровня коферментов обычно приводит к снижению содержания витаминзависимых апоферментов в печени и других органах [23].

Результаты исследований, проведенных у животных в условиях авитаминоза [24], а также значительные величины коферментактивационных коэффициентов свидетельствуют об относительной стабильности уровня апоферментных белков при гипокферментозах и возможности реактивации их функций при повышении уровня коферментов [25].

Полагают, что уровень коферментов в хрусталике является одним из существенных звеньев механизма устойчивости его компонентов при старении и действии различных катарактогенных фак-

торов [26]. Метаболическая обеспеченность хрусталика коферментами тесно связана с витаминным статусом организма, поступлением и всасыванием витаминов и их последующей транспортировкой в органы и ткани.

В патогенезе возрастной катаракты существенное значение в ряде случаев может иметь нарушение метаболического статуса витаминов и коферментов. Исследование критериев коферментной обеспеченности метаболических процессов позволит не только раскрывать существенные звенья патогенеза катаракты, но и будет способствовать рациональному поиску дифференцированных методов патогенетически ориентированной терапии и профилактики прогрессирующей возрастной катаракты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лейс И. Ф. // Офтальмол. журн.— 1980.— С. 423.
2. Лейс И. Ф. // Там же.— 1985.— С. 430.
3. Парамей О. В. // Пентозофосфатный цикл углеводов и его регуляция: Тезисы докладов.— Гродно, 1978.
4. Парамей О. В. // Симпозиум по тиамину, 2-й: Материалы.— Гродно, 1972.— С. 89.
5. Ansari N. H., Srivastava S. K. // Curr. Eye Res.— 1982.— 83.— Vol. 2, N 1.— P. 271.
6. Hockwin O., Kort I., Noll E. et al. // Albrecht v. Graefes Arch. Ophthalm.— 1985.— Bd 222.— S. 142.
7. Horiuchi S., Hirano H., Ono S. // J. Nutr. Sci. Vitaminol.— 1984.— Vol. 30.— P. 401.
8. Rathbun W. B. // Curr. Eye Res.— 1984.— Vol. 3, N 1.— P. 101.
9. Ono S., Hirano H. // Ophthalm. Res.— 1983.— Vol. 15.— P. 140.
10. Vuilleumier J. P., Keller H. E., Rettenmaier R., Hunziker F. // Int. J. Vitam. Nutr. Res.— 1983.— Vol. 53.— P. 359.
11. Cheng H.-M., Gonzalez R. G., von Saltza I. et al. // Exp. Eye Res.— 1986.— Vol. 46.— P. 947.
12. Tsubota K., Krauss J. M., Kenyon K. R. et al. // Ibid.— 1989.— Vol. 49.— P. 321.
13. Masters B. R. // Curr. Eye Res.— 1984.— Vol. 2, N 1.— P. 23.
14. Stewart A., Augusteyn R. C. // Exp. Eye Res.— 1984.— Vol. 39.— P. 307.
15. Bullard B. // Ibid.— 1965.— Vol. 4.— P. 108.
16. Giblin F. J., Reddy V. N. // Ibid.— 1980.— Vol. 31.— P. 601.
17. Jedziniak J. A., Chylack J., Cheng H.-M. et al. // Invest. Ophthalm.— 1981.— Vol. 20.— P. 314.
18. Korte I., Hockwin O., Bours J., Wegener A. // Ophthalm. Res.— 1988.— Vol. 20.— P. 174.
19. Ono S., Hirano H., Kudo K., Obara K. // Int. J. Vitam. Nutr. Res.— 1976.— Vol. 46.— P. 422.
20. Ohrloff Ch., Hockwin O. // J. Geront.— 1983.— Vol. 38.— P. 271.
21. Meister A. // Glutathione: Metabolism and Function / Eds I. M. Arias, W. B. Jakoby.— 1975.— Vol. 6.
22. Rathbun W. B. // Ophthalm. Res.— 1986.— Vol. 18.— P. 236.
23. Sethna S. S., Gander J. E., Rathbun W. B. // Curr. Eye Res.— 1984.— Vol. 3, N 7.— P. 23—25.
24. Rathbun W. B., Sethna S. S., Gale E. et al. // Exp. Eye Res.— 1977.— Vol. 24.— P. 145.
25. Kalunuma N. // Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.— 1975.— Vol. 72.— P. 83.
26. Hirano H., Hamajima S., Horiuchi S. et al. // Int. J. Vitam. Nutr. Res.— 1983.— Vol. 53.— P. 377.

Поступила 08.08.91

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1992

УДК 616.153:577.112.61-074

В. М. Фролова, А. Р. Монастырская,
А. П. Востряков, В. С. Гуткин, В. А. Горбатов,
В. И. Дейгин, В. В. Роговин

УВЕЛИЧЕНИЕ УРОВНЯ ЛЮМИНОЛЗАВИСИМОЙ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ КРОВИ МЫШЕЙ ПОД ВЛИЯНИЕМ НЕКОТОРЫХ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ

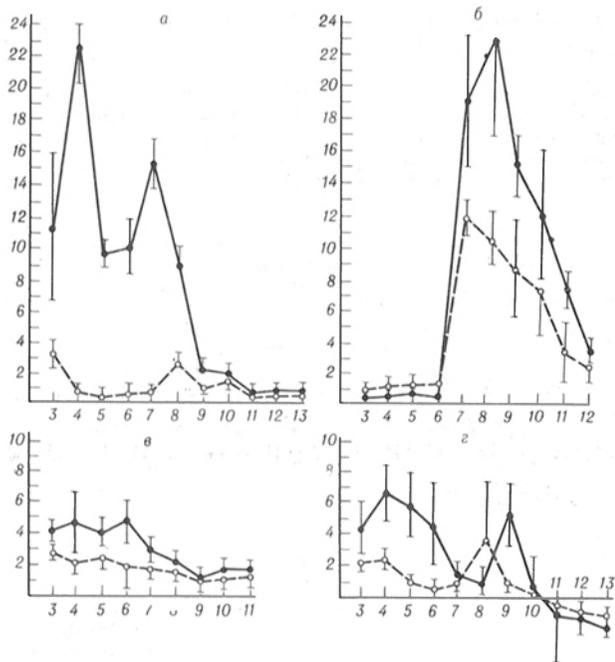
Институт химической физики РАН, Институт экспериментальной ветеринарии, Всесоюзный кардиологический научный центр РАМН, Москва

Ключевым моментом в защите организма от инфекции является способность полиморфоядерных лейкоцитов (ПМЯЛ) убивать микроорганизмы. Существенный вклад в этот процесс вносит зависящая от кислорода пероксидазная система: пероксидаза — H_2O_2 — галонд [22], локализованная в пероксисомах лейкоцитов [7, 8]. Один из путей повышения активности антимикробной пероксидазной системы — увеличение синтеза пероксидазы в созревающих нейтрофильных лейкоцитах (НЛ), принципиальная возможность чего была показана нами ранее [2, 9]. Однако такой способ воздействия на пероксисомы требует времени, необходимого для достижения лейкоцитом функциональной зрелости. Для НЛ человека этот период составляет 14,5 дня [12]. Быстрое, в течение десятков секунд повышение активности бактерицидной пероксидазной системы, вероятно, можно получить за счет активации НАДФН-оксидазной системы и связанного с этим явлением усиленного образования супероксида (O_2^-), продуктом дисмутации которого является H_2O_2 — необходимый компонент пероксидазной системы.

В настоящее время модуляторы пероксидазной антимикробной системы лейкоцитов неизвестны. Мы полагаем, что одной из групп таких соединений, возможно, являются малые пептиды — «наиболее универсальная, разнообразная и эволюционно гибкая группа регуляторных соединений» [1]. Для некоторых пептидов показано свойство усиливать фагоцитозную функцию макрофагов [11, 24], активировать супероксидгенерирующую систему макрофагов [3]. Однако влияние пептидов на антимикробную функцию НЛ мало изучено. Имеются лишь противоречивые данные по влиянию тафшина на функцию и метаболизм лейкоцитов [14, 21].

Задачей нашей работы явилось изучение действия *in vitro* некоторых синтетических пептидов на люминолзависимую хемилюминесценцию (ХЛ) цельной крови мышей при фагоцитозе.

Преимущество применения в качестве объекта исследования цельной крови при изучении ХЛ лейкоцитов было показано ранее [18, 23]. В ряде работ [13, 15, 16] было доказано, что увеличенная люминолом ХЛ цельной крови определяется активностью миелопероксидазной системы, вероятно, из-за окисления люминола гипохлоритом. Популяция активированных латексом нейтрофилов вносит преобладающий вклад в ХЛ цельной крови [18, 23]. Поэтому метод люминолзависимой ХЛ позволяет адекватно оценить степень воздей-



Действие синтетических пептидов: далагина (а), N-формильного пептида (б), L-далагина (в), ГМДП (г) на люминолзависимую ХЛ цельной крови мышей

По осям абсцисс — концентрация пептидов, 10^{-n} М; по осям ординат — изменение максимальных значений ХЛ (Δ ХЛ), мВ. Жирные линии — индуцированная ХЛ; тонкие линии — спонтанная ХЛ. Представлены средние значения 3 измерений \pm стандартное отклонение.

ствия различных модуляторов на активность именно миелопероксидазной антимикробной системы НЛ.

Методика. Объектом исследования служила цельная кровь 40 белых (беспородные самцы) мышей массой тела 18–20 г. Кровь получали после декантации животных, собирали в общую гепаринизированную емкость и использовали в опыте непосредственно после получения. Для измерения ХЛ кровь разбавляли физиологическим раствором (1:9).

Измеряли изменения ХЛ как косвенного показателя уровня активности пероксидазо-оксидазной системы лейкоцитов в покое и при фагоцитозе под влиянием следующих пептидов: далагина (тир-D-ала-гли-фен-лей-арг), L-далагина (тир-L-ала-гли-фен-лей-арг), гликопептида ГМДП (N-ацетилглюкозаминил-N-ацетилмурамил-L-ала-D-изоглутамин), N-формильного пептида (N-формил-мет-лей-фен-ОН). Концентрации пептидов в кювете уменьшались на порядок в интервале 10^{-3} – 10^{-13} М.

Пептиды растворяли в физиологическом растворе в концентрации 10^{-2} М в силиконизированной посуде с притертой пробкой и хранили при -12°C . Размораживали маточный раствор и путем последовательных разведений получали растворы нисходящих концентраций *ex tempore*. Разведения и последующие измерения проводили в полистироновых кюветах, что исключало возможность прилипания пептида к стенкам сосудов.

Максимальные значения ХЛ цельной крови определяли при спокойном состоянии лейкоцитов и после индукции фагоцитоза добавлением полистиронового латекса диаметром 0,82 мкм ($4 \cdot 10^4$ на кювету). Измерения проводили на люминиметре 1251 («LKB-Wallac», Швеция). Для усиления ХЛ использовали люминол (5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазидин; «Serva», Германия), предварительно разведенный в физиологическом растворе с добавкой триэтанолamina (8 мкмоль/мл), хранившийся при температуре -12°C . Конечная концентрация люминола в кювете 10^{-6} М.

Регистрировали интегрированный сигнал ХЛ за 10 с в обеих сериях опытов (спонтанная ХЛ и индуцированная фагоцитозом ХЛ) при добавлении в кюветы растворов пептида в концентрации от 10^{-2} М до 10^{-12} М. Измерения проводили в трипликатах образцов. Результаты измерений ХЛ анализировали по максимальным значениям интегрированного сигнала в сериях эксперимента при каждой концентрации пептидов ($\text{ХЛ}_{\text{эксп}}$) и в контрольных образцах, куда добавляли эквивалентное количество физиологического раствора без пептида

($\text{ХЛ}_{\text{контр}}$). Затем вычисляли изменения ХЛ: $\Delta\text{ХЛ} = \text{ХЛ}_{\text{эксп}} - \text{ХЛ}_{\text{контр}}$ при всех изученных концентрациях пептидов в покое и при фагоцитозе.

В качестве ингибитора активности пероксидазы использовали NaN_3 в концентрации 0,1 М.

Результаты и обсуждение. Представленные на рисунке изменения максимальных значений ХЛ (Δ ХЛ) в нефагоцитирующих и фагоцитирующих клетках демонстрируют стимулирующее влияние далагина в концентрациях от 10^{-3} до 10^{-9} М на ХЛ фагоцитирующих клеток. Наиболее эффективно действие пептида на интенсивность ХЛ фагоцитирующих клеток *in vitro* проявляется при концентрации 10^{-4} М. Отсутствие выраженного увеличения уровня люминолзависимой ХЛ цельной крови при внесении L-далагина, вероятно, объясняется легкостью деградации связи -ТИР-L-АЛА-, что приводит к моментальному разрушению препарата, который в результате этого не успевает проявить свою активность в цельной крови. ГМДП увеличивает уровень люминолзависимой ХЛ в меньшей степени, чем далагин, однако и в этих опытах наблюдали два пика активности: при концентрациях 10^{-4} и 10^{-9} М. Защитное действие ГМДП против вирусных и бактериальных инфекций [4, 6], а также противоопухолевое действие ГМДП и его аналогов [10] отчасти можно объяснить стимуляцией пероксидазной системы нейтрофильных лейкоцитов. Ранее [5] мы показали стимулирующее влияние на люминолзависимую ХЛ цельной крови мышей другого синтетического пептида — (D-ала)⁴-дерморфина. Подобно далагину и ГМДП (D-ала)⁴-дерморфин увеличивает ХЛ только фагоцитирующих лейкоцитов, т. е. эти пептиды, видимо, не являются растворимыми стимуляторами сопровождающих фагоцитоз реакций, как N-формильный пептид. В наших экспериментах N-формильный пептид увеличивал уровень люминолзависимой ХЛ нефагоцитирующих лейкоцитов. Однако его действие на фагоцитирующие клетки было более выраженным при тех же концентрациях (10^{-7} – 10^{-8} М).

Увеличенная люминолом ХЛ цельной крови в нашем опыте полностью подавлялась 0,1 М NaN_3 , что свидетельствует о зависимости процесса от активности миелопероксидазы. Это представление согласуется с результатами и выводами авторов [15, 18, 20], изучавших ХЛ крови, преникубированной с NaN_3 в системе с люминолом. Они наблюдали снижение уровня ХЛ на 75 % [20], на 93 % [18] и даже полное ее отсутствие [15]. По-видимому, вклад нечувствительной к азиду супероксидгенерирующей системы в общий уровень увеличенной люминолом ХЛ незначителен вследствие низкой концентрации фагоцитирующих клеток и большой чувствительности системы с люминолом к гипохлориту [15]. Отсутствие ХЛ в цельной крови у людей с наследственным дефицитом миелопероксидазы в системе с люминолом [15] также подтверждает зависимость этого теста от активности пероксидазной системы.

Механизм стимулирующего действия пептидов на ХЛ еще не изучен. Маловероятно усиление активности пероксидазной системы за счет изменения пептидом конформации миелопероксидазы. Можно предположить стимуляцию пептидами через специфические рецепторы на мембране клетки НАДФН-оксидазной системы и вслед-

ствие этого усиленное образование O_2 , H_2O_2 и в конце концов в результате активности миелопероксидазной системы гипохлорита — окислителя люминола. Для такого естественного пептида, как тафцин, на мембране ПМЯЛ и моноцитов, по некоторым данным [17, 18], существуют специфические рецепторы.

Таким образом, с помощью некоторых синтетических пептидов возможна активация интегрированной системы пероксидаза — H_2O_2 — галонд в нейтрофилах цельной крови *in vitro*.

Авторы благодарят Т. М. Андронову (Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина РАН) за любезно предоставленный для исследования гликопептид.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ашмарин И. П. // Пат. физиол. — 1982. — № 4. — С. 13—27.
2. Голиков Ю. В., Фролова В. М., Роговин В. В. и др. // Хим.-фарм. журн. — 1975. — № 3. — С. 13—14.
3. Иванов В. Т. // Вопр. мед. химии. — 1984. — № 3. — С. 23—31.
4. Калина Н. Г., Елкина С. И., Сергеев В. В. // Журн. микробиол. — 1991. — № 12. — С. 107—110.
5. Монастырская А. Р., Фролова В. М., Вострыков А. П. и др. // Вопр. мед. химии. — 1987. — № 3. — С. 56—58.
6. Носков Ф. С., Никитина Л. Е., Масленникова Л. К., Фридман Э. А. // Иммунология. — 1984. — № 4. — С. 53—55.
7. Роговин В. В., Муравьев Р. А., Герянина Н. Г. и др. // Изв. АН СССР. Сер. биол. — 1972. — № 1. — С. 135—141.
8. Роговин В. В., Пирузян Л. А., Муравьев Р. А. Пероксидазосомы. — М., 1977.
9. Роговин В. В., Фролова В. М. // Цитология. — 1982. — № 9. — С. 1045—1049.
10. Ростовцева Л. И., Андропова Т. М., Малькова В. П. и др. // Биоорг. химия. — 1981. — Т. 7, № 12. — С. 1843—1857.
11. Тишкина Т. Е., Горюхина О. А., Тейбер Э. Л., Фрейдлин Н. С. // Актуальные вопросы иммунологии, аллергологии и молекулярной биологии. — М., 1983. — С. 155—156.
12. Cartwright G. E., Athens J. W., Wintrobe M. M. // Blood. — 1964. — Vol. 24. — P. 780—803.
13. Cohen M. S., Shirley P. S., DeChatelet L. R. // Clin. Chem. — 1983. — Vol. 29. — P. 513—515.
14. Cooper M. R., DeChatelet L. R., Shirley P. S., Cooper M. R. // Inflammation. — 1982. — Vol. 6. — P. 103—112.
15. DeChatelet L. R., Long G. D., Shirley P. S. et al. // J. Immunol. — 1982. — Vol. 129. — P. 1589—1593.
16. DesCamps-Zatscha B., Nguyen A. T., Golab R. M., Feuillet-Fieux M. N. // Ann. Immunol. — 1982. — Vol. 133-c. — P. 349—364.
17. Gottlieb P., Stabinsky Y., Hiller Y. et al. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1983. — Vol. 419. — P. 93—106.
18. Faden N., Maciejewski N. // J. Reticuloendoth. Soc. — 1981. — Vol. 30. — P. 219—226.
19. Fridkin M., Gottlieb P. // Molec. Cell Biochem. — 1981. — Vol. 41. — P. 73—97.
20. Kharazmi A., Hoiby G., Doring G., Valerius N. H. // Infect. Immun. — 1984. — Vol. 44. — P. 587—591.
21. Najjar V. A. // Reticuloendoth. System. — 1980. — Vol. 2. — P. 45—71.
22. Rosen H., Klebanoff S. J. // J. biol. Chem. — 1977. — Vol. 252. — P. 4803—4810.
23. Selvaraj R. J., Sbarra A. J., Thomas G. B. et al. // J. Reticuloendoth. Soc. — 1982. — Vol. 31. — P. 3—16.
24. Tzeboval E., Segal S., Stabinsky J. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1978. — Vol. 75. — P. 3400—3404.

Поступила 08.01.91

INCREASE OF LUMINOL-DEPENDENT CHEMOLUMINESCENCE OF MICE BLOOD IN PRESENCE OF SOME SYNTHETICALLY PRODUCED PEPTIDES.

V. M. Frolova, A. R. Monastyrskaya, A. P. Vostryakov, V. S. Gutkin, V. A. Gorbatov, V. I. Deigin, V. V. Rogovin

Institute of Chemical Physics, Academy of Sciences of the Russian Federation, Institute of Experimental Veterinary,

Cardiology Research Center, Academy of Medical Sciences of the Russian Federation, Moscow

Synthetically produced peptides increased the luminol-dependent chemoluminescence of mice whole blood during phagocytosis. Using some peptides it is possible to cause an increase in the antimicrobial peroxidase system activity of neutrophils very rapidly (within seconds).

© М. Э. КРАКОВСКИЙ, А. Х. АШИРМЕТОВ, 1992

УДК 616.379-008.64-092.9-085.357:577.175.722]-036.8-07: [616.153.1:577.152.199.2

М. Э. Краковский, А. Х. Аширметов

СОСТОЯНИЕ МОНООКСИГЕНАЗНОЙ ФЕРМЕНТНОЙ СИСТЕМЫ ОРГАНОВ КРЫС И КРОЛИКОВ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ И ВВЕДЕНИИ ИНСУЛИНА

ЦНИЛ Ташкентского медицинского института

Микросомальная ферментная система оксигеназ смешанной функции (МОС), основным компонентом которой является цитохром P_{450} , локализована практически во всех паренхиматозных и железистых органах и осуществляет в организме широкий круг биохимических превращений, направленных на поддержание его гомеостатических констант. В настоящее время установлено, что ферменты МОС могут существенно изменять свою активность под действием разнообразных факторов среды, в том числе гормонов и лекарственных препаратов, а также при патологических состояниях организма [2]. В ряде работ обнаружено, что при диабете, сопровождающемся гормональным дисбалансом, наблюдаются изменения активности микросомальных ферментов печени [4, 12]. В то же время работ, посвященных изучению внепеченочных перестроек активности микросомальных ферментов при диабете, а также механизмов, лежащих в основе этих перестроек, практически нет, что и послужило основанием для проведения настоящего исследования.

Методика. Эксперименты проведены на 204 белых крысах-самцах смешанной популяции и 28 кроликах-самцах породы шиншилла, содержащихся в виварии на обычном лабораторном рационе. Диабет воспроизводили путем внутривенного однократного введения аллоксана в дозе 150 мг/кг массы. У всех подопытных животных определяли уровень сахара в крови через 1 день ортотолуидиновым методом. Гипогликемию создавали путем внутримышечного введения животным инсулина в течение 6 дней в дозах 10 ЕД/кг для крыс и 5 ЕД/кг для кроликов. Дозу инсулина подбирали таким образом, чтобы в течение суток уровень сахара в крови составлял 50 % от исходного. С целью уточнения роли недостаточности инсулина в механизме наблюдаемых при диабете изменений в активности монооксигеназных ферментов в отдельной серии опытов крысам через 15 сут после воспроизведения аллоксанового диабета также в течение 6 дней вводили инсулин в дозе 10 ЕД/кг. Через 14 и 21 день после воспроизведения диабета и через 6 дней после начала введения инсулина животных декапитировали под легким эфирным наркозом в холодной комнате. Быстро извлекали печень, почки, участок тощей кишки и легкие, отмывали их от крови холодной средой, состоящей из 0,15 М КСl в трис-буфере рН 7,8, измельчали ножницами и гомогенизировали в гомогенизаторе типа Поттера. Микросомальную фракцию органов выделяли методом дифференциального центрифугирования на центрифугах «Beckman LP-50» и VAC-601 при 105 000 g. В микросомах определяли содержание цитохромов P_{450} и b_5 [10], микросомального белка [8], активность N-деметилазы амидопирина [9], гидроксилазы анилина [11], p-нитрофенола [5], НАДФН-цитохром-c-редуктазы [9]. Результаты экспериментов обрабатывали методом вариационной статистики на микро-ЭВМ «Правец-16».

Активность микросомальных ферментов в органах крыс при сахарном диабете и введении инсулина

Группа	Орган	Цитохром, нмоль/мг		Активность, нмоль/мин/мг белка			
		P ₄₅₀	b ₅	N-деметилазы амидопирин	анилингидроксилазы	p-нитрофенол-гидроксилазы	НАДФН-цитохром-с-редуктазы
Контроль	Печень	0,86±0,06	0,38±0,03	8,74±0,47	0,50±0,018	0,33±0,012	99,7±3,8
	Почки	0,14±0,007	0,06±0,005	2,58±0,24	0,06±0,007	0,03±0,002	38,0±5,2
	Кишечник	0,075±0,006	0,06±0,006	1,47±0,12	0,04±0,004	0,04±0,007	33,4±3,4
	Легкие	0,06±0,003	0,03±0,003	1,28±0,2	0,07±0,006	0,07±0,009	33,1±2,3
Диабет	Печень	0,71±0,06*	0,24±0,02*	7,0±0,5*	0,61±0,24*	0,48±0,02*	95,3±5,2
	Почки	0,16±0,01	0,085±0,008*	1,53±0,15*	0,04±0,004*	0,02±0,002*	53,7±5,2*
	Кишечник	0,07±0,007	0,08±0,007	0,52±0,04*	0,017±0,001*	0,015±0,001*	45,4±5,7*
	Легкие	0,05±0,005	0,02±0,002	3,52±0,42*	0,14±0,01*	0,12±0,003*	34,2±3,8
Инсулин	Печень	0,38±0,03*	0,26±0,02*	7,1±0,4*	0,29±0,02*	0,23±0,023*	88,7±5,7
	Почки	0,13±0,01	0,06±0,005	2,7±0,25	0,03±0,003*	0,06±0,004*	22,1±3,2*
	Кишечник	0,07±0,007	0,06±0,006	1,45±0,11	0,03±0,003	0,06±0,005*	32,1±3,7
	Легкие	0,04±0,004*	0,02±0,004	1,32±0,2	0,07±0,006	0,12±0,016*	39,8±3,7

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3 звездочка — статистически значимые различия с контролем при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Как показали проведенные исследования, при диабете у крыс и кроликов наблюдаются практически однозначные сдвиги в активности монооксигеназных ферментов в печени, но не во внепеченочных органах. Так, у крыс в печени происходит незначительное снижение содержания цитохромов P₄₅₀, b₅ и активности N-деметилазы амидопирин на фоне повышения активности гидроксилаз, тогда как в легких наблюдается увеличение активности N-деметилазы амидопирин, гидроксилазы анилина и паранитрофенола. В почках увеличивается содержание цитохрома b₅ и активность НАДФН-цитохром-с-редуктаза на фоне снижения активности остальных исследованных ферментов, а в кишечнике снижается активность всех ферментов, кроме НАДФН-цитохром-с-редуктазы, которая, напротив, возрастает (табл. 1). У кроликов с аллоксановым диабетом в печени наблюдается рост содержания цитохрома P₄₅₀, активности обоих гидроксилаз на фоне снижения активности N-деметилазы амидопирин. Аналогичная картина наблюдается в кишечнике, за исключением активности p-нитрофенолгидроксилазы и редуктазы, которые практически не изменялись (табл. 2). В почках снижается активность N-деметилазы амидопирин и редуктазы, но возрастает активность гидроксилаз, а в легких существенно снижается лишь

активность N-деметилазы амидопирин и НАДФН-цитохром-с-редуктазы.

Следовательно, за исключением разнонаправленных изменений в содержании цитохрома P₄₅₀ в печени крыс и кроликов, при диабете обнаруживаются одинаково направленные сдвиги активности монооксигеназных ферментов, тогда как во внепеченочных органах эти взаимоотношения не столь однозначны. Можно думать, что определенную роль в этом феномене играет токсическое действие аллоксана в сравнительно ранние сроки исследования. Для проверки данного предположения мы провели исследования на крысах через 21 день после введения им аллоксана, т. е. в сроки, когда его токсическое влияние на ферменты монооксигеназ полностью исключается. В этом случае мы отметили практически такие же изменения в содержании цитохромов и активности маркерных ферментов в печени и внепеченочных органах, как и те, что описаны при 14-дневном сроке наблюдения (табл. 3). Представляло интерес выяснить, в какой степени обнаруженные сдвиги обусловлены дефицитом инсулина и каковы сдвиги в активности ферментов МОС при избытке этого гормона. С этой целью мы вводили инсулин крысам с экспериментальным диабетом в течение 6 дней до забоя и обнаружили, что в этом случае, так же как и при диабете, происходит снижение в печени

Таблица 2

Активность микросомальных ферментов в органах кроликов при сахарном диабете и введении инсулина

Группа	Орган	Цитохром, нмоль/мг		Активность, нмоль/мин/мг белка			
		P ₄₅₀	b ₅	N-деметилазы амидопирин	анилингидроксилазы	p-нитрофенол-гидроксилазы	НАДФН-цитохром-с-редуктазы
Контроль	Печень	0,63±0,05	0,35±0,04	9,1±0,4	0,6±0,05	0,39±0,04	52,7±1,0
	Почки	0,18±0,02	0,26±0,02	2,1±0,2	0,08±0,007	0,04±0,005	21,8±2,7
	Кишечник	0,10±0,01	0,11±0,005	1,6±0,1	0,07±0,006	0,03±0,004	20,6±2,8
	Легкие	0,08±0,006	0,03±0,005	2,5±0,21	0,29±0,01	0,13±0,01	24,5±2,9
Диабет	Печень	0,92±0,1*	0,47±0,04*	7,1±0,6*	0,78±0,07*	0,56±0,05*	66,2±6,1
	Почки	0,19±0,02	0,22±0,02	0,9±0,1*	0,15±0,01*	0,12±0,01*	8,9±0,9*
	Кишечник	0,14±0,01	0,15±0,008*	0,4±0,06*	0,18±0,02*	0,02±0,002*	15,2±1,1
	Легкие	0,07±0,007	0,03±0,005	0,7±0,07*	0,24±0,02	0,12±0,01	9,5±1,0*
Инсулин	Печень	0,47±0,05*	0,31±0,04	6,7±0,7*	0,28±0,01*	0,2±0,02*	48,7±5,3
	Почки	0,22±0,025	0,24±0,03	1,7±0,2	0,05±0,008*	0,02±0,002*	20,3±2,4
	Кишечник	0,11±0,01	0,12±0,007	1,47±0,1	0,07±0,007	0,02±0,005	22,8±2,5
	Легкие	0,05±0,007*	0,02±0,006	1,76±0,2*	0,08±0,007*	0,08±0,005*	18,2±3,2

Активность микросомальных ферментов в органах крыс при сахарном диабете, компенсированном введением инсулина

Группа	Орган	Цитохром, нмоль/мг		Активность, нмоль/мин/мг белка			
		P ₄₅₀	b ₅	N-демети- лазы амидопирина	анилин- гидрокси- лазы	p-нитрофенол- гидроксилазы	НАДФН- цитохром-с- редуктазы
Контроль	Печень	0,61±0,05	0,37±0,03	9,7±0,5	0,64±0,04	0,37±0,03	61,3±3,1
	Почки	0,17±0,02	0,05±0,02	2,2±0,2	0,08±0,009	0,04±0,006	20,9±1,9
	Кишечник	0,11±0,01	0,11±0,007	1,7±0,1	0,07±0,006	0,03±0,003	19,8±2,4
	Легкие	0,07±0,009	0,03±0,005	1,4±0,25	0,07±0,02	0,12±0,01	25,1±2,7
Диабет 21 день	Печень	0,44±0,05*	0,27±0,02	6,6±0,6*	0,91±0,09*	0,59±0,03*	69,5±4,6
	Почки	0,16±0,02	0,07±0,01	1,31±0,1*	0,04±0,002*	0,015±0,001*	37,5±2,7*
	Кишечник	0,09±0,01	0,1±0,007	0,51±0,05*	0,02±0,001*	0,01±0,0001*	33,6±2,1*
	Легкие	0,06±0,003	0,03±0,002	3,7±0,54*	0,14±0,03*	0,18±0,01*	29,4±0,9
Диабет + инсулин	Печень	0,43±0,05*	0,25±0,03	6,7±0,7*	0,62±0,04	0,38±0,04	68,9±4,7
	Почки	0,15±0,04	0,07±0,006	2,3±0,3	0,02±0,001*	0,04±0,007	23,5±2,1
	Кишечник	0,11±0,02	0,11±0,005	1,23±0,25	0,06±0,005	0,03±0,001	21,1±1,6
	Легкие	0,07±0,01	0,03±0,001	1,4±0,3	0,08±0,001	0,18±0,001*	28,6±2,1

содержания цитохрома P₄₅₀. Однако повышения активности анилин- и паранитрофенолгидроксилаз при введении инсулина не наблюдалось. Это же относится и к изменениям активности N-демети-лазы амидопирина во внепеченочных органах, а также гидроксилазы анилина в кишечнике и легких и гидроксилазы p-нитрофенола в почках и кишечнике (см. табл. 3). Введение крысам и кроликам инсулина сопровождалось практически однозначными изменениями в активности N-демети-лазы амидопирина и содержании цитохрома P₄₅₀ во всех исследованных органах крыс и кроликов, тогда как в отношении активности гидроксилаз между животными имелись определенные различия. В целом направленность реакции ферментов МОС на инсулин у крыс и кроликов в основном совпала (см. табл. 1 и 2).

Исследованные нами ферменты МОС отражают активность различных форм цитохрома P₄₅₀ и являются общепринятыми маркерами монооксигеназной системы [2]. Поскольку исследованные нами модели диаметрально противоположны по уровню сахара в крови, вполне вероятно, что динамика изменений активности ферментов МОС может быть обусловлена характером углеводного обмена. Анализ результатов исследования свидетельствует о том, что у крыс при гипо- и гиперинсулинемии однонаправленно изменяются содержание цитохромов P₄₅₀, b₅ во всех исследованных органах, а также активность N-демети-лазы амидопирина в печени, почках и кишечнике, но не в легких. Активность гидроксилаз анилина и p-нитрофенола, а также редуказы изменялась разнонаправленно, что свидетельствует о ее зависимости от уровня сахара в крови и обеспеченности организма инсулином. У кроликов обнаружена аналогичная закономерность в регуляции активности гидроксилаз, что свидетельствует об универсальности данного феномена. Поскольку активность гидроксилаза анилина и p-нитрофенола в основном обеспечивается каталитической активностью цитохрома P₄₅₀ у крыс и ЛМ3а у кроликов [3, 6], индуцируемых алкоголем, ацетоном, голоданием и рядом других эндогенных и экзогенных факторов, можно допустить, что именно эти формы цитохрома P₄₅₀ ответственны за обнаруженные нами изменения активности ферментов МОС при диабете и гиперинсулинемии. Это подтверждается и тем, что введение животным с диабетом инсу-

лина препятствовало изменениям активности гидроксилаз как в печени, так и во внепеченочных органах крыс. Полученные нами результаты относительно изменения активности монооксигеназных ферментов в печени крыс при диабете, свидетельствующие о стимуляции цитохрома P₄₅₀, согласуются с данными литературы [7]. Что касается неоднозначных изменений в активности ферментов МОС в печени и внепеченочных тканях крыс и кроликов, то это обусловлено качественными и количественными различиями в содержании в этих органах изоформ цитохрома P₄₅₀, а также характером их регуляции. Это же относится и к различиям, выявленным у крыс и кроликов при исследованных патологических состояниях. Поскольку в литературе существует лишь ограниченная информация относительно содержания форм цитохрома P₄₅₀ во внепеченочных тканях, можно допустить, что механизмы, регулирующие активность его этанолиндуцируемой формы в почках и легких, отличны от таковых в печени крыс. У кроликов, вероятно, механизмы регуляции этой формы цитохрома P₄₅₀ как в печени, так и во внепеченочных тканях во многом сходные. Снижение активности p-нитрофенолгидроксилазы в легких кроликов при введении им инсулина может быть связано как с отсутствием в них цитохрома ЛМ3а, на что указывают некоторые авторы [11], так и с другими моментами, нуждающимися в дальнейшем изучении. Однонаправленные сдвиги в активности N-демети-лазы амидопирина, обнаруженные при диабете и введении инсулина, объясняются тем, что активность этого фермента обеспечивается широким спектром изоформ цитохрома P₄₅₀, активность которых не связана с изменениями углеводного обмена. Это же относится и к активности НАДФН-цитохром-с-редуктазы, которая обусловлена состоянием биомембран, существенно изменяющимся при диабете.

Таким образом, при диабете и введении инсулина у крыс и кроликов наблюдаются неоднозначные сдвиги в активности монооксигеназных ферментов печени и внепеченочных органов, отражающие специфичность изоферментного состава этих тканей. Обнаруженные различия в регуляции активности p-нитрофенолгидроксилазы в зависимости от обеспеченности организма инсулином и содержания сахара в крови свидетельствуют о несомненной роли нарушений углеводного обмена в

изменениях активности цитохромов P₄₅₀ и LM3a в печени и внепеченочных органах, что представляет несомненный интерес в связи с широким спектром метаболизируемых данными гемопротеинами канцерогенных и мутагенных ксенобиотиков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арчаков А. И., Карузина П. И., Тверитинов В. П., Кокарева П. С. // Биохимия.— 1975.— № 1.— С. 32—39.
2. Лакин К. М., Крылов Ю. Ф. Биотрансформация лекарственных веществ.— М., 1981.
3. Coon M. J., Koop D. R. // Arch. Toxicol.— 1987.— Vol. 60 N 1.— P. 16—21.
4. Farrell G. C. // Pharmacol. Ther.— 1987.— Vol. 35.— P. 375—404.
5. Koop D. R. // Molec. Pharmacol.— 1986.— Vol. 29.— P. 399—404.
6. Lieber Ch. S. // Biochem. Soc. Trans.— 1985.— Vol. 16, N 3.— P. 23—239.
7. Longhurst P. A., La Cagnin L. B., Staats D. A., Colby H. D. // Biochem. Pharmacol.— 1986.— Vol. 35, N 10.— P. 1768—1771.
8. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem.— 1951.— Vol. 193, N 1.— P. 265—275.
9. Mazel P. // Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition.— Baltimore, 1971.— P. 546—590.
10. Omura T., Sato R. // J. biol. Chem.— 1964.— Vol. 239, N 7.— P. 2370—2378.
11. Saburin P. J., Tynes R. E., Philpo R. et al. // Drug Metab. Dispos.— 1988.— Vol. 16 — P. 557—562.
12. Skell P., Joels L. A. // Biochem. Pharmacol.— 1985.— Vol. 34, N 2.— P. 287—289.

Поступила 28.12.90

THE MONOOXYGENASE ENZYME SYSTEM IN TISSUES OF RATS AND RABBITS WITH DIABETES MELLITUS AND AFTER ITS TREATMENT WITH INSULIN

M. E. Krakovskiy, A. Kh. Ashirmetov

Central Research Laboratory, Medical Institute, Tashkent

Content of cytochromes P₄₅₀ and b₅, activities of amidopyrine-N-demethylase, alanine- and p-nitrophenol hydroxylases, NADPH-cytochrome c reductase were studied in the liver, kidney, small intestine and lung tissues of rats and rabbits in insulin-dependent hypoglycemia and alloxan diabetes. The diabetes and hypoglycemia caused dissimilar alterations in activity of alanine- and p-nitrophenol hydroxylases, thus indicating their dependence on blood sugar levels. The activity of monooxygenase enzymes studied was altered similarly in rabbit liver and other tissues, while the enzymatic activity was distinctly differentiated in rat tissues. Specific properties of cytochromes P₄₅₀ isozyme spectra appear to be responsible for these alterations detected.

© Н. А. ТЕРЕХИНА, Ю. А. ПЕТРОВИЧ, 1992

УДК 617.7-22:578.825.111-07:616.155.32-008.931

Н. А. Терехина, Ю. А. Петрович

АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ И ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ ГЛАЗА ВИРУСОМ ПРОСТОГО ГЕРПЕСА

Пермский медицинский институт, Московский медицинский стоматологический институт

Активация перекисного окисления липидов (ПОЛ), которая является одним из звеньев патогенеза кератита, вызванного вирусом простого герпеса (ВПГ), в известной мере определяется снижением активности антиоксидантных ферментов роговицы [4, 5]. Известно также, что

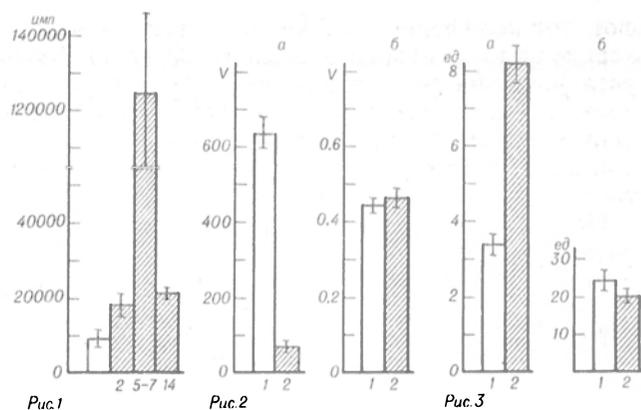


Рис. 1. ХЛ лимфоцитов (в импульсах за 10 с на 10⁷ клеток) периферической крови кроликов до (светлый столбик) и через 2,5—7 и 14 дней (заштрихованные столбики) после инфицирования глаза вирусом простого герпеса I типа.

Рис. 2. Активность ГПО в лимфоцитах периферической крови больных герпетическим кератитом.

а — в лимфоцитах, мкмоль/мин на 10⁶ клеток; б — в сыворотке крови, нмоль/мин/мл. 1 — здоровые люди; 2 — больные герпетическим кератитом (здесь и на рис. 3).

Рис. 3. Активность СОД в лимфоцитах периферической крови больных герпетическим кератитом.

а — в лимфоцитах, ед. на 10⁶ клеток; б — в сыворотке крови, ед./мл. Остальные обозначения те же, что на рис. 2.

ВПГ при вирусемии транспортируется лимфоцитами и способен в них реплицироваться [12, 13].

С целью выяснения особенностей ПОЛ лимфоцитов при ВПГ-инфекции в данной работе была изучена активность антиоксидантных ферментов глутатионпероксидазы (ГПО) и супероксиддисмутазы (СОД), а также интенсивность хемилюминесценции (ХЛ) лимфоцитов периферической крови.

Методика. Кровь получали из локтевой вены у 33 больных в возрасте 17—58 лет с острой формой герпетического кератита и у 58 здоровых доноров 18—40 лет. Больных обследовали до лечения при поступлении в глазное отделение Пермской областной больницы.

Лимфоциты выделяли из 4 мл крови и разделяли в градиенте плотности фиколла—верографина [9]. Методики спектрофотометрического анализа активности ГПО и СОД, инфицирования глаза кролика ВПГ описаны ранее [5].

Интенсивность ХЛ лимфоцитов определяли у 5 здоровых и 15 инфицированных ВПГ I типа кроликов. У животных брали по 10 мл крови из красовой вены уха через 2, 5—7 и 14 дней после заражения ВПГ. Выделив лимфоциты из крови по методу [9], подсчитывали их в камере Горяева, доводя концентрацию лимфоцитов до 7 · 10⁵ в 1 мл. В сцинтилляционные флаконы к 7 мл раствора Хенкса добавляли по 1 мл лимфоцитов и выдерживали 30 мин при 37 °С. Затем добавляли 1 мл 1 % раствора Н₂О₂ и 1 мл 25 мМ раствора FeSO₄. Сразу же регистрировали импульсы за 10 с на сцинтилляционном счетчике СБС-2 при одном фотоэлектрическом умножителе, как в предыдущей работе [5].

Цифровой материал обработан статистически с помощью критерия t Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Через 2 дня после инфицирования ВПГ у кроликов были видны точечные нарушения эпителия роговицы, перикорнеальная инъекция сосудов. Через 5—7 дней, в разгар заболевания, отмечали выраженное помутнение роговицы, частичное эрозивное поражение ее эпителия, вращение в нее сосудов. Через 14 дней патологические проявления в глазу несколько сглаживались.

Соответственно развитию патологического процесса в глазу изменилась интенсивность ХЛ лим-

фоцитов периферической крови. Через 2 дня после заражения она возрастала вдвое, через 5—7 дней увеличивалась на порядок, через 14 дней снижалась, но еще вдвое превышала контрольные величины (рис. 1). Различия на всех сроках исследования были достоверными при сопоставлении с контролем ($p < 0,001—0,01$).

Полученные результаты свидетельствуют о значительной активации ПОЛ в лимфоцитах. Повышение интенсивности ХЛ лимфолейкоцитарной взвеси обнаружено и при ожоговой травме глаза [8]. Добавление к нейтрофилам вируса Сендай или гриппа также усиливает ХЛ [14].

Активность ГПО лимфоцитов была резко снижена при разных клинических подвидах герпетического кератита (рис. 2). У 8 пациентов с герпетической язвой роговицы активность ГПО снизилась почти в 13 раз, у 14 больных метагерпетическим кератитом — в 10 раз, у 11 больных дисковидным кератитом — в 6 раз по сравнению с соответствующими показателями у здоровых лиц.

Активность СОД в лимфоцитах больных офтальмогерпесом повысилась ($p < 0,001$) в 2—2,5 раза (рис. 3), но существенных различий между разными клиническими формами герпетического кератита не было. В сыворотке крови больных герпетическим кератитом и у здоровых лиц показатели активности ГПО и СОД не различались (см. рис. 2 и 3). В этой связи следует напомнить, что ВПГ, реплицируя в лимфоцитах [12, 13], перестраивает ферментные системы клеток [3] и действует на биомембраны с переокислением их липидного компонента [4]. Это подтверждается результатами изучения ХЛ лимфоцитов как в проведенной ранее [5], так и в настоящей работе.

Вероятно, резкое повышение концентрации супероксидных радикалов вызывает индукцию СОД. По-видимому, поэтому при обострении герпетического кератита возрастает активность СОД в лимфоцитах. При ряде патологических процессов, характеризующихся активацией ПОЛ (инфаркт миокарда, термический ожог, гипероксия, отравления, вирусный гепатит), активность СОД возрастала в эритроцитах [1, 2, 6, 10, 15]. Повышение активности СОД при острых патологических процессах можно рассматривать как адаптивную реакцию, направленную на защиту клеточных структур и нормализацию ПОЛ [2]. СОД участвует при этом в поддержании стабильности мембраны и формы эритроцита [11].

Таким образом, при офтальмогерпесе в лимфоцитах периферической крови активируется ПОЛ, изменяется активность антиоксидантных ферментов. Активация ПОЛ в лимфоцитах может в известной мере обуславливаться снижением актив-

ности ГПО, что представляется важным, так как характер метаболизма лимфоцитов определяет иммунологическую реактивность организма [7].

Высокую чувствительность ХЛ и активности антиоксидантных ферментов лимфоцитов к ВПГ-инфекции можно использовать в экспериментальных исследованиях и клинических наблюдениях в целях характеристики данной инфекции, тем более что интенсивность ХЛ коррелирует с выраженностью патологического процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Журкин А. Т., Дубинина Е. Е., Гундалах А. И. // Лаб. дело.— 1986.— № 7.— С. 420—423.
2. Макаревич О. П., Голиков П. П. // Там же.— 1983.— № 6.— С. 24—27.
3. Петрович Ю. А., Терехина П. А. // Успехи соврем. биол.— 1990.— Т. 37, № 1.— С. 77—89.
4. Петрович Ю. А., Терехина П. А. // Всесоюзная конф. «Биоантиоксидант», 3-я: Тезисы докладов.— М., 1989.— Т. 2.— С. 247.
5. Петрович Ю. А., Терехина П. А., Шмагель К. В. // Бюл. exper. биол.— 1987.— № 4.— С. 405—407.
6. Ракица Д. Р. Ферментативная утилизация активных форм кислорода и липоперексиды при ишемической болезни сердца: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— М., 1986.
7. Робинсон М. В., Топоркова Л. Б., Труфакин В. А. Морфология и метаболизм лимфоцитов.— Новосибирск, 1986.
8. Травкин А. Г., Деревянко В. П. // Вестн. офтальмол.— 1986.— № 6.— С. 58—59.
9. Boyum A. // Scand. J. clin. Lab. Invest.— 1968.— Suppl. 97.— P. 77—89.
10. Crapo J., Tierney D. F. // Amer. J. Physiol.— 1974.— Vol. 226, N 6.— P. 1401—1407.
11. Kobayashi Y., Okahata S., Tanabe K. et al. // Hiroshima J. Med. Sci.— 1978.— Vol. 27, N 3.— P. 181—183.
12. Larsen H. S., Teng M. H., Horohow D. M. et al. // J. Virol.— 1984.— Vol. 50, N 1.— P. 56—59.
13. Lehtinen M. Expression and Antibody Response to the Herpes Simplex Virus Specific Major DNA-Binding Protein in Acute and Chronic Herpes Simplex Virus Infections.— Tampere, 1985.
14. Mehta S., Pasternak C. A. // Biochem. Soc. Trans.— 1985.— Vol. 13, N 4.— P. 706—707.
15. Sjoström K., Crapo J. // Bull. Europ. Physiopath. resp.— 1981.— Vol. 17, Suppl.— P. 31—41.

Поступила 18.12.90

ACTIVITY OF ANTIOXIDATIVE ENZYMES AND CHEMOLUMINESCENCE IN PERIPHERAL LYMPHOCYTES AFTER CONTAMINATION OF EYE WITH HERPES SIMPLEX VIRUS.

N. A. Terekhina, Yu. A. Petrovich

Medical Institute, Perm, Medical Stomatological Institute, Moscow.

Activation of lipid peroxidation in ophthalmoherpes may be estimated by an increase in the rate of chemoluminescence in peripheral lymphocytes within 2, 5-7 and 14 days after injection of herpes simplex virus into the rabbit retina. In the peripheral lymphocytes of patients with naturally developed herpetic keratitis the activity of glutathione peroxidase was decreased, while that of superoxide dismutase was increased 2-2.5-fold in the ophthalmoherpes as compared with the normal state.

СОДЕРЖАНИЕ

Чевари С., Андля Т., Бенко К., Штрэнгер Я. Свободнорадикальные реакции и рак	4
Бариков Э. Ф., Барабадзе Э. В., Жданюк Ю. И. Динамика и факторы регуляции интенсивности свободнорадикальных процессов при суправезикальном блоке в эксперименте	5
Таганович А. Д. Регуляторная роль сурфактанта легких в метаболизме макрофагов	7
Мальцев Г. Ю., Васильев А. В. Исследование деградации эндо- и экзогенного альбумина у нормальных и голодных крыс	10

CONTENTS

Csovári, S., Angyal, T., Benkő, K., Strenger, J. Free radical reactions and cancer	4
Barinov, E. F., Barabadze, E. V., Zhdanyuk, Yu. I. Dynamics and regulatory factors of free radical oxidation in experimental supravescical block	5
Taganovich, A. D. Regulatory function of the lung surfactant in macrophagal metabolism	7
Maltsev, G. Yu., Vasilev, A. V. Degradation of endogenous and exogenous albumins in rats under normal conditions and in starvation	10

- Дрозд Н. Н., Башков Г. В., Макаров В. А., Хейломский А. Б., Горбачева И. Н. Механизмы антикоагулянтного действия серноокислого эфира хитозана . . . 12
- Сокольников А. А., Шинкевич Т. Е., Коденцова В. М., Вржесинская О. А., Спиричев В. Б. Активность менадионредуктазы и содержание цитохромов B₅ и P-450 в печени при различной обеспеченности крыс витамином К и введении пеллетана . . . 15
- Алексеева И. А., Коденцова В. М., Вржесинская О. А., Зверева Т. Е., Хотимченко С. А., Спиричев В. Б. К оценке обеспеченности организма витаминами B₂, B₆ и РР по данным экскреции витаминов и их метаболитов при алиментарном дефиците железа и рибофлавина . . . 17
- Требухина Р. В., Красковский Г. В., Мельнов С. Б., Мотылевич Ж. В., Мельнова Н. И. Влияние окситиамина на опухолевый рост и некоторые биохимические и генетические характеристики нормальных и опухолевых клеток . . . 20
- Лелевич В. В., Панченко Л. Ф. Состояние углеводного обмена в головном мозге крыс при алкогольном абстинентном синдроме . . . 22
- Шаров А. Н., Новиков В. Е. Состояние окислительного фосфорилирования в митохондриях головного мозга при его токсическом и травматическом отеке-набухании . . . 24
- Лобов В. В., Конвай В. Д., Быховцев А. Н. Метаболизм углеводов в условиях нарушения моноаминергических регуляторных механизмов, развившегося в раннем постресусационном периоде . . . 26
- Попалова О. Л., Смирнова И. П., Турчинский В. В., Березов Т. Т. Применение ортофенилсидиамина в определении активности L-лизин- α -оксидазы и концентрации L-лизина . . . 28
- Хмельевский Ю. В., Поберезкина Н. Б., Задорина О. В., Толстых О. И., Васильченко О. А. Витамин Е и его синтетические аналоги при экспериментальной сердечно-сосудистой патологии . . . 30
- Требухина Р. В., Колтанюк Т. А., Петушок В. Г., Михальцевич Г. П., Лашак Л. К., Гриценко Э. А. Обмен витаминов B₁ и РР и их применение в онкологической практике . . . 33
- Балаболкин И. И., Гордеева Г. Ф., Гусева Е. Д., Джунелов А. Б., Калугина О. Л., Хамидова М. М. Применение витаминов при аллергических заболеваниях у детей . . . 36
- Просольная Н. И. Зависимость начальных этапов пентозофосфатного цикла от обмена витамина С при патологии соединительной ткани . . . 41
- Ивашкевич С. П., Ширанкова Т. Г., Апуховская Л. И., Омельченко Л. И. Влияние односторонней нефрэктомии на обмен витамина D у беременных крыс . . . 44
- Самсонов М. А., Васильев А. В., Погожева А. В., Покровская Г. Р., Мальцев Г. Ю., Бишшева И. Р., Орлова Л. А. Влияние изолята соевого белка и источников полиненасыщенных жирных кислот ω_3 в составе противоатеросклеротической диеты на липидный спектр сыворотки крови и иммунологические показатели у больных ишемической болезнью сердца и гипертонической болезнью . . . 47
- Васильев А. В., Богданова С. Н., Варсанович Е. А., Погожева А. В., Самсонов М. А. Липолитические ферменты лизосом тромбоцитов и мононуклеаров в патогенезе ишемической болезни сердца . . . 50
- Леус Н. Ф. Витамины и коэнзимы в офтальмологии . . . 53
- Фролова В. М., Монастырская А. Р., Вострыков А. П., [Гулкин В. С.], Горбатов В. А., Деигин В. И., Роговин В. В. Увеличение уровня люминолзависимой хемилюминесценции крови мышцей под влиянием некоторых синтетических пептидов . . . 57
- Краковский М. Э., Аширметов А. Х. Состояние монооксигеназной ферментной системы органов крыс и кроликов при сахарном диабете и введении инсулина . . . 59
- Терехина Н. А., Петрович Ю. А. Активность антиоксидантных ферментов и хемилюминесценция лимфоцитов периферической крови при инфицировании глаза вирусом простого герпеса . . . 62
- Drozhd, N. N., Bashkov, G. V., Makarov, V. A., Kheylomsky, A. B., Gorbacheva, I. N. Mechanisms of anticoagulative action of chitozan sulfate ester . . . 12
- Sokolnikov, A. A., Shinkevich, T. E., Kodentsova, V. M., Vrzhesinskaya, O. A., Spirichev, V. B. Activity of menadione reductase and content of cytochromes B₅ and P-450 in rat liver under various conditions of vitamin K consumption and pelentan administration . . . 15
- Alexeeva, I. A., Kodentsova, V. M., Vrzhesinskaya, O. A., Zvereva, T. E., Kholmichenko, S. A., Spirichev, V. B. Evaluation of vitamins B₂, B₆ and PP consumption by means of vitamin and their metabolite excretion under conditions of alimentary iron and riboflavin deficiency . . . 17
- Trebukhina, R. V., Kraskovsky, G. V., Melnov, S. B., Motylevich, Zh. V., Melnova, N. I. Effect of oxythiamine on tumoral growth and some biochemical and genetic patterns of normal and malignant cells . . . 20
- Lelevich, V. V., Panchenko, L. F. Carbohydrate metabolism in brain of rats with alcohol withdrawal syndrome . . . 22
- Sharov, A. N., Novikov, V. E. Oxidative phosphorylation in brain mitochondria in toxic and traumatic edema . . . 24
- Lobov, V. V., Konvay, V. D., Bykhovtsev, A. N. Carbohydrate metabolism in impairment of monoaminergic regulatory mechanisms developing in early postresuscitation period . . . 26
- Polapova, O. L., Smirnova, I. P., Turchinsky, V. V., Berезov, T. T. Estimation of L-lysine- α -oxidase activity and concentration of L-lysine using o-phenylene diamine . . . 28
- Khmelevsky, Yu. V., Poberezkina, N. B., Zadorina, O. V., Tolstykh, O. I., Vasilchenko, O. A. Vitamin E and its synthetic analogues in experimental cardiovascular pathology . . . 30
- Trebukhina, R. V., Koltanyuk, T. A., Petushok, V. G., Mikhaltsevich, G. N., Lashak, L. K., Grilsenko, E. A. Metabolism of vitamins B₁ and PP; their application in oncological care . . . 33
- Balabolkin, I. I., Gordeeva, G. F., Guseva, E. D., Dzhunelov, A. B., Kalugina, O. L., Khamidova, M. M. Vitamin therapy of allergic diseases in children . . . 36
- Prosolnaya, N. I. Relation of early stages of the pentose-phosphate pathway to vitamin C metabolism in impairments of connective tissue . . . 41
- Ivashkevich, S. P., Shirankova, T. G., Apukhovskaya, L. I., Omelchenko, L. I. Effect of unilateral nephrectomy on metabolism of vitamin D in pregnant rats . . . 44
- Samsonov, M. A., Vasilev, A. V., Pogozeva, A. V., Pokrovskaya, G. R., Mal'tsev, G. Yu., Bitysheva, I. R., Orlova, L. A. Effects of soybean protein isolates and polyunsaturated fatty acids ω_3 contained in antiatherosclerotic diet on serum lipid spectra and immunologic patterns of patients with ischemic heart disease and hypertension . . . 47
- Vasilyev, A. V., Bogdanova, S. N., Varsanovich, E. A., Pogozeva, A. V., Samsonov, M. A. Lipolytic enzymes of lysosomes of platelets and mononuclear cells in the pathogenesis of coronary heart disease . . . 50
- Leus, N. F. Vitamins and coenzymes in ophthalmology . . . 53
- Frolova, V. M., Monastyrskaya, A. R., Vostryakov, A. P., [Gulkin, V. S.], Gorbatov, V. A., Deigin, V. I., Rogovin, V. V. Increase of luminol-dependent chemoluminescence of mice blood in presence of some synthetically produced peptides . . . 57
- Krakovsky, M. E., Ashirmetov, A. Kh. The monooxygenase enzyme system in tissues of rats and rabbits with diabetes mellitus and after its treatment with insulin . . . 59
- Terekhina, N. A., Petrovich, Yu. A. Activity of antioxidant enzymes and chemoluminescence in peripheral lymphocytes after contamination of the eye with herpes simplex virus . . . 62