

ТОМ 39

ВЫПУСК I

ЯНВАРЬ — ФЕВРАЛЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

# ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

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

[ТРОЙЦКИЙ Г. В.] (Симферополь)  
ТУРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)  
ТЯХЕНЫЦА Л. Я. (Тарту)  
[ЯКОВЛЕВ П. П.] (Санкт-Петербург)  
ЯСАЙТИ А. (Вильнюс)



© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 612.115:577.152.344.042.51.08 (048.8)

Л. И. Сологуб, И. С. Пашковская, И. Е. Сухорская,  
Г. Л. Антомяк**АКТИВАТОРЫ ПЛАЗМИНОГЕНА И ИХ ФУНКЦИИ**

Львовское отделение Института биохимии им. А. В. Палладина АН Украины

Среди многочисленных регуляторных ферментных систем в организме человека важное место занимают активаторы плазминогена (АП) — протеиназы системы фибринолиза. Молекула плазминогена массой около 90 кДа представляет собой мономер, который состоит из 791 аминокислотного остатка и содержит около 2 % углеводов.

Считается, что основным источником плазминогена в организме являются клетки печени, однако синтез этого профермента выявлен также в других типах клеток, в том числе и клетках эмбрионов на начальных этапах их развития.

Активация плазминогена происходит при участии АП путем разрыва в полипептиде связи Arg560—Val561 (рис. 1). Образованный таким образом плазмин состоит из двух полипептидов с мол. м. 25 и 65 кДа, связанных двумя дисульфидными мостиками.

Плазминоген может существовать в Glu- и Lys-форме, причем первая отличается от второй добавочным, так называемым активаторным пептидом на N-конце цепи с мол. м. 8 кДа, который отщепляется при действии плазмина. Такое преобразование Glu-плазминогена способствует дальнейшей более быстрой его активации АП.

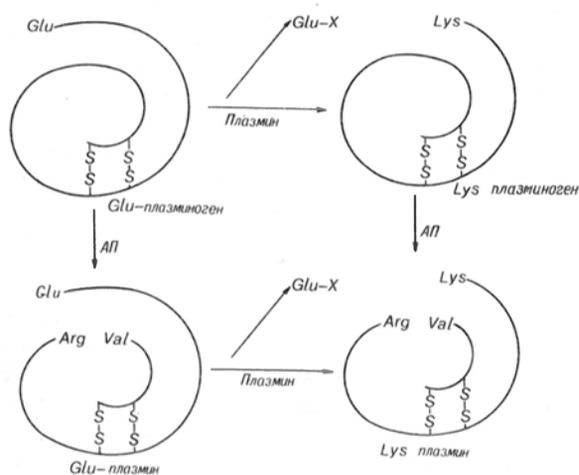


Рис. 1. Активация плазминогена.

Образование плазмина контролируется системой ингибиторов, в первую очередь  $\alpha_2$ -антиплазмином. После образования фибринового сгустка плазминоген связывается с ним и активируется АП. Последний также ассоциируется с фибрином и защищается от ингибиторов фибриновой сеткой. Образование Lys-плазминогена облегчает превращение его в Lys-плазмин, который имеет большее сродство к фибрину, нежели Glu-плазмин. Lys-плазмин слабее инактивируется  $\alpha_2$ -антиплазмином. После расщепления фибрина плазмин быстро инактивируется ингибиторами. Некоторые жирные кислоты в низких концентрациях оказывают стимулирующее действие и на процессы активации плазминогена, тогда как в более высоких концентрациях они ингибируют этот процесс [6, 75].

На мембранах плазминоген связывается со специфическими рецепторами. Показано, что сродство плазминогена, очищенного из плазмы крови быка, овцы, свиньи и крысы, к рецепторам на поверхности клеток глиомы С6 и гепатоцитов человека приблизительно одинаковое, что свидетельствует о высокой эволюционной консервативности участников, которые узнаются клеточными рецепторами [36]. У больных, склонных к тромбозам вен, выявлен особый тип плазминогена, который характеризуется пониженной фибринолитической активностью [70].

**Характеристика АП**

Различают два типа АП: урокиназный тип (уАП), присутствующий в значительных количествах в моче, и тканевый тип (тАП), который характерен для плазмы крови. И первый, и второй свойственны различным типам клеток и жидкостей организма, однако они могут встречаться совместно в одних и тех же тканях. Например, в почках на долю тАП приходится до 25 % общей активности АП, слюна содержит преимущественно уАП, в слюне и слезной жидкости выявляется только тАП [78]. Что касается распределения АП в отдельных тканях и органах, то наиболее богатыми этими ферментами считаются легкие, матка, мозг, почки. Эндокринные железы содержат их меньше, а лимфоидные клетки — очень мало [18]. иРНК для тАП выявлена во многих типах клеток животных, тогда как иРНК для уАП обнаружена только в клетках печени и яичников [101].

уАП и тАП — высокоспецифические нейтральные сериновые протеиназы с мол. м. 54 и 70 кДа соответственно. В отношении некоторых синтетических субстратов (тозил-L-аргинин метилового эфира, N,  $\alpha$ -ацетил-глицил-L-лизин этилового эфира, Val-Gly-Arg-п-нитроанилида и др.) АП проявляют амидазную и эстеразную активность, расщепляя связи, образованные кар-

боксильной группой аргинина или лизина. Оптимум рН действия уАП — 7,2, тАП — 8,2. Их активность угнетается диизопронилфторфосфатом и и-нитрофениловым эфиром гуанидинбензойной кислоты, однако известные ингибиторы сериновых протеиназ белковой природы из сои, картофеля, подчелюстной железы не влияют на их активность. уАП и тАП являются продуктами разных генов, но в первичной структуре их молекул выявлено около 40 % гомологии. Активная форма уАП состоит из двух субъединиц с мол. м. 24 и 30 кДа, соединенных дисульфидными мостиками. Меньшая А-субъединица содержит аминокислотную последовательность, аналогичную ЭФР, а также богатые цистеиновыми остатками пептидные ферменты («крингли»), которые имеются также в тАП, плазмиогене и некоторых других сериновых протеиназах (рис. 2) [5]. «Крингли» представляют собой участки, к которым присоединяется фибрин.

Активный центр уАП локализован на В-субъединице и в значительной степени гомологичен активному центру других сериновых протеиназ [19]. Двухцепочечный уАП может подвергаться дальнейшему ограниченному протеолизу с образованием активной формы с мол. м. 33 кДа, в которой А-цепь содержит только 21 аминокислотный остаток [22].

Одноцепочечный уАП считается ирреверсивной формой, которая превращается в активный димерный фермент путем расщепления связи Lys — Ile при участии плазмина. В его активации важную роль играет также связанная с Т-клетками сериновая протеиназа-1, которая свойственна только активированным при иммунной реакции Т-лимфоцитам [13]. Выявлено также участие трипсина и калликреина в активации этого профермента [44]. В нормальных и злокачественных клетках в основном выявляется неактивная форма уАП. При воспалительных повреждениях, наоборот, наблюдается секреция преимущественно его активной димерной формы [24].

Активная форма тАП является одноцепочечным полипептидом с мол. м. около 70 кДа, гликозилированным в трех местах (на Asn117, Asn184 и Asn448) [95]. В клетках некоторых опухолей имеет место частичное гликозилирование молекулы тАП (только на Asn117 и Asn448), и предпологается, что гликозилирование его на Asn184 значительно снижает фибринзависимую стимуляцию активатора [124]. Имеются сообщения, что фибрин и фибриноген не влияют на активность димерного тАП, тогда как мономерная его форма этими белками активируется [117].

При обработке плазмином в мономерном тАП разрывается связь Lys158—Ile159 и образуется фермент, состоящий из А- и В-субъединиц. Тромбин гидролизует одноцепочечную форму тАП по связи Arg156 — Phe157, однако образованный таким образом фермент не обладает каталитической активностью [67, 74]. Интересно, что изолированная А-субъединица тАП также может в некоторой степени содействовать активации плазминогена [103].

Гепарин связывается с обеими формами АП и оказывает стимулирующее действие на превращение одноцепочечных форм в двухцепочечные.

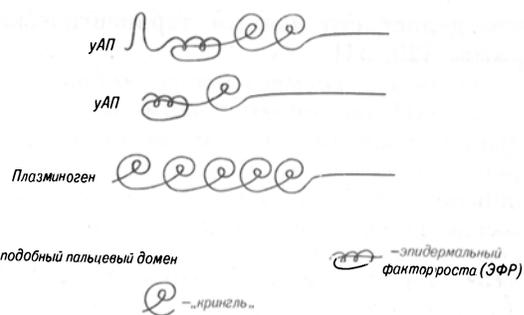


Рис. 2. Структура N-конца полипептидной цепи АП и плазминогена.

Фибрин ослабляет эффект гепарина на тАП и потенцирует влияние последнего на уАП [28].

Высказываются предположения, что АП, помимо плазминогена, гидролизуют также другие белки (фибронектин, дифтерийный токсин) и принимают участие в экспрессии злокачественного фенотипа клеток. Так, выявлено, что морфологические изменения, вызванные активатором в трансформированных вирусом саркомы Рауса фибробластах, не угнетаются ингибитором плазмина апротинином. Моноклональные антитела к каталитическому центру уАП выключают морфологические изменения этих клеток и дегградацию белков околочелюстного матрикса, связанную с трансформацией, в частности дегградацию белка с мол. м. 60 кДа [50, 97]. Известно, что уАП в присутствии апротинина интенсифицирует также пролиферацию клеток эпидермальной опухоли. Поэтому возможно, что опухолевые клетки, которые секретируют значительные количества уАП, могут сами аутокрипным путем стимулировать свой рост и увеличивать свой метастатический потенциал [52].

### Физиологические функции АП

**Фибринолиз.** Считается, что тАП, секретированный эндотелием кровеносных сосудов человека, фактически полностью ответствен за фибринолитические процессы в организме. Поэтому низкий уровень этого фермента в крови может содействовать тромбозам, а высокий — приводить к увеличению времени свертывания крови.

Нужно отметить, что тАП сам по себе вызывает только слабую активность к плазминогену, но добавление фибрина увеличивает скорость образования плазмина в несколько сотен раз. Поэтому считается, что активация плазминогена имеет место только на поверхности фибринового сгустка после образования комплекса активатора, фибрина и плазминогена [35, 65]. Комплекс АП — фибрин является менее активным в присутствии аналога лизина — транс-эксамовой кислоты, которая блокирует высокоаффинные лизинсвязывающие центры в плазминогене [2]. Такой специфический механизм лизиса фибрина, опосредованный тАП, является очень важным при лечении инфарктов миокарда, коронарных тромбозов. В противоположность другим тромболитическим агентам тАП имеет короткий период полужизни и не индуцирует продолжительное фибринолитическое состояние,

что делает его ценным терапевтическим препаратом [29, 34].

*Овуляция, сперматогенез, эмбриональное развитие.* АП принимают участие в созревании зародышевых клеток, оплодотворении и развитии эмбриона и плаценты. Выход ооцита из фолликула опосредуется плазмином, который снижает напряжение фолликулярной стенки. Он принимает участие в расщеплении протеогликанов фолликулярной жидкости и тем самым разжижает среду, где продвигается яйцеклетка. В фолликулярной жидкости количество АП регулируется лютеинизирующим и фолликулостимулирующим гормонами и увеличивается во время овуляции [9, 99, 105].

Освобождение первичных сперматозоидов с базальной пластинки семявыводящих канальцев во время сперматогенеза также осуществляется при участии АП, который образуется в клетках Сертоли [105]. АП в головке зрелого сперматозоида, активируя плазминоген, содействует миграции половой клетки [43].

Миграция и пролиферация эндотелиальных клеток эмбрионов кур в ответ на ангиогенные стимулы коррелируют с увеличением секреции АП урокиназного типа и латентной коллагеназы, которая активируется плазмином [92]. Имеются сообщения, что при нейрональной миграции также происходит секреция фибринолитической протеназы окончаниями нейритов, глией и шванновскими клетками [49]. Считается, что увеличенная активность АП в секреторном эндометрии женщин может быть одной из причин их бесплодия [57]. АП в яичниках и гранулезных клетках представлен урокиназным типом, а в интерстициальных клетках внутренней оболочки фолликул — тканевым типом [68].

*Инволюция молочной железы после лактации.* С цитобиохимических позиций данный процесс представляет собой интенсивную деградацию различных клеточных компонентов железы, в первую очередь секреторного эпителия и базальных мембран, и коррелирует с образованием ее эпителиальными клетками уАП [87]. Можно предполагать, что секреция в них уАП контролируется гормонами, которые регулируют лактацию. В клетках лактирующей железы уАП не выявлен. Другим примером инволюции железы является уменьшение размеров ткани простаты после кастрации животных. При этом также выявлена интенсификация синтеза АП в ее клетках [100].

*Процессинг прогормонов.* Считается, что АП могут принимать участие в ограниченном протеолизе прогормонов. Плазмин, например, превращает проформу лактогена плаценты в активный гормон [104]. Имеются сообщения, что они принимают участие и в активации проинсулина, поскольку продукция АП в  $\beta$ -клетках поджелудочной железы возрастает при стимуляции в них секреции этого гормона. В культурах клеток гипофиза при отсутствии плазмина секретруется прогормон — проопиомеланокортин, а АКТГ появляется только, когда в среду клеток добавляется этот фермент [32]. Латентная форма трансформирующего фактора роста (ТФР- $\beta$ ), которая представляет собой неактивный комплекс его проформы и активного фактора с белком, также может активироваться этими ферментами

[72]. Плазмин принимает участие и в процессинге другого ТФР- $\beta$ -подобного фактора — ингибирующего вещества мюллерового протока [91]. Имеются данные и об уАП-опосредованной активации латентного ТФР- $\beta$  в кондиционированной среде культуры фибробластов [63].

*Дифференцировка клеток.* Под влиянием ретиноевой кислоты, форболовых эфиров или фактора роста нервов SH — SY5Y-клетки превращаются в нейронподобные клетки. Эти индукторы дифференцировки вызывают также повышение содержания АП и иРНК АП в клетках. Поскольку индукция дифференцировки клеток коррелирует с индукцией тАП в большей степени, нежели с индукцией уАП, предполагают, что именно первый из них играет специфическую роль в морфологической дифференцировке нейроноподобных клеток [83]. Считается, что тАП принимает участие также в дифференцировке клубочков при морфогенезе нефронов [108].

Нужно заметить, что зрелые остеобласты по сравнению с их предшественниками секретируют в среду меньше АП и больше специфических ингибиторов этих ферментов (АПИ). Следовательно, дифференцировка остеобластов сопровождается снижением соотношения количеств секретированных АП и АПИ [93].

*Участие АП в патологических процессах.* Образование АП макрофагами и лейкоцитами при воспалительных процессах может быть связано с миграцией этих клеток к участкам воспаления и деградации поврежденных тканей, а также с патогенезом хронических воспалительных процессов, таких, как язвенный колит, васкулит [19]. Имеются сообщения, что при ревматическом артрите уровень АП в клетках резко возрастает и может оказывать влияние на деградацию протеогликанов хрящей [79]. В хрусталике глаза тАП играет роль при катарактогенезе и других патологических процессах [116]. В клетках щитовидной железы больных базедовой болезнью активность уАП вдвое выше, нежели в нормальных клетках [94]. В плазме крови курильщиков выявлен более высокий уровень тАП по сравнению с нормой [66]. Изменение продукции АП отмечено при некоторых патологических процессах в коже, таких, как псориаз [19]. Имеются сведения, что при буллезном дискератозе также значительно увеличивается синтез и секреция АП. Избыточная продукция АП в ткани увеличивает местную активность плазмينا, что в свою очередь является одной из причин утраты межклеточных связей, что характерно для этих заболеваний. Интересно, что при псориазе в клетках эпителия основным типом АП является тканевый, тогда как в клетках здоровых людей превалирует уАП [38].

Считается, что злокачественные клетки, в общем, содержат и секретируют увеличенные количества протеолитических ферментов, нежели соответствующие нормальные клетки. В 70-х годах было установлено, что высокая фибринолитическая активность при вирусной трансформации клеток обусловлена увеличением активации в них плазминогена, и выявлена положительная корреляция между опухоленностью и секрецией АП. При этом увеличивается главным образом секреция клетками тАП [59, 102]. В опухоле-

вых клетках активированный при участии АП плазминоген интенсивно расщепляет, кроме фибрина, также фибронектин и ламинин, которые содержатся и в базальных мембранах, и в околоклеточном матриксе, разъединяя таким образом отдельные клетки. Коллаген при этом расщепляется коллагеназами, которые секретируются клетками в латентной форме и активируются плазмином. Иммуноцитохимические исследования первичных опухолей и метастазов карциномы легких Льюиса с использованием антител к уАП показывают, что последний локализуется в основном в местах инвазивного роста опухолей и деградации нормальных тканей [110]. Антитела к активному центру уАП угнетают метастазирование клеток карциномы Нер3 человека у эмбрионов кур, однако не ингибируют рост опухолевых клеток в местах инокуляции [88]. Преинкубация клеток высокометастатической меланомы В16 мышей до их введения животным с антителами к уАП также значительно снижает интенсивность их метастазирования [39].

Структурная дезорганизация актина в клетках пренеопластических аденом толстой кишки человека может указывать на переход от ранней неинвазивной стадии роста к более поздним его стадиям и, вероятно, связана с увеличением образования АП [63]. Имеются, однако, сообщения об отсутствии высокого уровня АП в некоторых типах опухолевых клеток, которые характеризуются низкой инвазивностью [19, 82, 119]. Например, установлено, что в высокоинвазивных гепатокарциномах человека активность АП намного выше, нежели в нефромах, которые не способны к инвазивному росту [115].

### Локализация АП в клетках и их секреция

Считается, что в клетках АП существуют в основном как неактивные проферменты, а активация их происходит или на поверхности мембран клеток, или после выхода их во внеклеточную среду. Некоторая часть АП из среды связывается с рецепторами клеток [119].

В клетках проАП локализованы в секреторных везикулах и мембранной фракции, где содержится до 80 % всей связанной с клетками активности АП [1]. В мембранах они выявляются на внешней стороне и слабо с ними связаны [90].

В 3Т3-клетках активность АП заметно увеличивается при задержке роста в  $G_1$ -фазе, а факторы, которые инициируют рост, резко ее снижают. Изменение активности АП на протяжении клеточного цикла выявлены также в клетках А 529 и ЗНС. Так, в первых максимальная активность наблюдается в  $G_2$ -фазе или после перехода из S-фазы в  $G_2$ -фазу. Полагают, что эти ферменты играют определенную роль в митотических делениях и принимают участие в репликации [86].

Химостатин ингибирует секрецию АП клетками трансформированных вирусом саркомы Рауса фибробластов цыплят, а также макрофагами человека и увеличивает количество связанных с клетками АП. Это свидетельствует о включении в механизм секреции АП химостатинчувств-

ительной нейтральной эндопептидазы, которая выявлена в мембранах клеток [112]. Имеются сообщения и о стимуляции трипсином секреции АП фибробластами, что объясняется высвобождением этой протеиназой связанных с поверхностью клетки АП в среду [23].

На плазматических мембранах различных типов клеток выявлены рецепторы для уАП [25, 122]. Е. Varnathan и соавт. [7] считают, что в клетках эндотелия пупочной вены человека имеются рецепторы уАП двух типов с мол. м. 36 и 46 кДа, которые различаются наличием или отсутствием N-связанного углевода. Рецептор связывает и одноцепочечную, и двухцепочечную форму уАП, причем первая может активироваться уже в комплексе [37]. Нестимулированные тромбоциты содержат около 120 тыс. рецепторных молекул на клетку, а активированные тромбином — около 290 тыс. Связывание уАП не ингибируется фибриногеном, однако плазминоген проявляет свойства конкурентного ингибитора [120]. Ганглиозиды внешней поверхности мембран клеток могут также ингибировать связывание уАП с рецептором [77]. Согласно данным Р. Iensen и соавт. [45], связывание уАП микроворсинками мембран плаценты человека в значительной степени блокируется антителами к АПИ-2, что указывает на средство связывающих белков к указанному ингибитору. Образованный комплекс не интернализируется, а уАП сохраняет свою протеолитическую активность на поверхности мембран. Клетки хориокарциномы линии IAR человека содержат рецепторы уАП, которые связывают свободный активатор, а также его комплексы со специфическими ингибиторами. После связывания происходит интенсивное расщепление комплекса рецептор — уАП — ингибитор, тогда как интенсивность деградации не связанного с ингибитором активатора на плазматических мембранах клеток низкая [46].

В последние годы высказываются предположения о возможности существования на плазматических мембранах клеток также рецепторов для тАП [37]. Например, выявлено, что эндотелиальные клетки пупочной вены человека связывают тАП и это связывание ингибируется лизином, аминокaproиловой кислотой, фенилаланинпропиларгининхлорметилкетон [8].

Секретированный АП может взаимодействовать также с другими компонентами плазматических мембран клеток, в первую очередь с протеазонексином, а также с фибронектином и его фрагментами.

### Специфические АПИ

Описано два основных типа специфических ингибиторов АП из группы серпинов — эндотелиальный тип (АПИ-1) и плацентарный тип (АПИ-2) [11, 111]. Ингибирование ими ферментной активности осуществляется путем образования ковалентных комплексов 1:1 между ферментом и ингибитором.

АПИ-1 образуется эндотелиальными клетками гладких мышц сосудов, клетками гепатомы и фибросаркомы, гепатоцитами, гранулезными клетками, а также выявляется в плазме крови

и тромбоцитах [111]. Основная часть АПИ-1 секретируется клетками в неактивной форме, а его активация включает коформационное изменение молекулы [40]. Иммунологические свойства латентной и активной форм ингибиторов идентичны, а мол. м. их около 48 кДа [10]. Фосфатидилинозитол и фосфатидилсерин активируют латентную форму ингибитора, а  $Ca^{2+}$  исключают эту активацию [64]. Инактивация ингибитора осуществляется путем образования комплексов между АПИ-1 и АП. При этом от С-конца полипептидной цепи ингибитора отщепляется небольшой пептид с мол. м. около 4 кДа [84]. Тромбин также катализирует частичный протеолиз ингибитора с образованием неактивной его формы с молекулярной массой 42 кДа [21].

АПИ-2 с мол. м. 43 кДа очищен из плаценты и эпидермиса. Он ингибирует и уАП, и тАП и, по-видимому, не действует на другие иротеиназы [42]. Комплекс АП — АПИ-2 образуется также после отщепления от полипептида АПИ-2 фрагмента с мол. м. 4 кДа [53]. АПИ-2 накапливается в клетках преимущественно в негликозилированной форме и гликозилируется во время его секреции клетками. В плазме крови беременных женщин с нормальным течением беременности АПИ-2 выявляется в виде двух форм с мол. м. 75 и 130 кДа, которые представляют собой агрегаты молекул ингибитора [11].

В моче и в плазме крови человека и животных выявлена еще одна форма специфического ингибитора АП — АПИ-3. Он также образует ковалентные комплексы с активатором, однако роль его в организме еще недостаточно выяснена [37]. Из клеток эпидермиса 2-дневных крыс выделен еще один белковый ингибитор АП с мол. м. 60 кДа. Он ингибирует более эффективно уАП, нежели тАП [81].

Среди секретированных клетками ингибиторов протеаз, которые способны ингибировать также АП, имеется протеазонексин-1 (ПН-1) с мол. м. 43 кДа [23]. Он образует ковалентные связи с уАП и некоторыми другими сериновыми протеиназами (трипсином, тромбином, плазмином) и опосредует их поглощение клетками [55, 125]. Высказываются предположения, что ПН-1 является основным регуляторным белком активности уАП в фибробластах [23].

АПИ играют важную роль в регуляции фибринолиза в организме человека и животных. Уровень их возрастает у людей, которые страдают болезнями печени, панкреатитами, сердечно-сосудистыми заболеваниями, злокачественными перерождениями, при тяжелых травмах, беременности [60].

### Регуляция синтеза и секреции АП и АПИ

Половые стероиды, вазопрессин, кальцитонин, релаксин, пролактин, паратиреоидный, лютеинизирующий и фолликулостимулирующий гормоны, тиротропин, вазоактивный кишечный пептид увеличивают активность АП в различных типах клеток [14, 20, 69, 93]. Таким же образом действуют конканавалин А,  $\beta$ -адренергические агенты, цАМФ [54, 56—58, 85]. Следует, однако, отметить, что в некоторых типах клеток, например в гранулезных клетках яичников кур,

под влиянием лютеинизирующего гормона и форсколина (активатора адеилатциклазы), а также 3-изобутирил-1-метилксантина (ингибитора фосфодиэстеразы) наблюдается снижение активности АП [47, 114]. В остеогенических саркомных клетках крысы паратиреоидный гормон, простагландин  $E_2$ , кальцитонин могут опосредованно активировать тАП путем увеличения уровня цАМФ [3].

ЭФР стимулирует секрецию уАП и тАП в фибробластах легких эмбрионов человека, а уменьшение количества рецепторов ЭФР после обработки ими клеток А 431 эпидермальной карциномы коррелирует с увеличением активности АП (см. таблицу) [33]. Правда, в некоторых линиях нормальных и злокачественных клеток не выявлено изменений секреции АП при действии ЭФР, хотя и имеет место пролиферация клеток [61]. Нужно заметить, что ЭФР не только увеличивает секрецию АП клетками, но и индуцирует синтез их ингибиторов, в частности ПН-1 [23]. Он также регулирует в клетках линии Нер G<sub>2</sub> гепатомы экспрессию АПИ-1 [71].

В эндотелиальных клетках кровеносных сосудов эффективным стимулятором синтеза уАП и АПИ-1 является оФРФ [96, 106]. Такая одновременная индукция и активатора, и ингибитора в клетках может отображать регуляторную систему, в которой АПИ ограничивает интенсивность протеолиза. Из тканей плаценты очищен также однопочечный ангиогенический фактор с мол. м. 18,7 кДа с высоким сродством к гепарину, который стимулирует образование активаторов плазминогена и латентной коллагеназы в эндотелии сосудов [80].

Стимуляторами синтеза и секреции АП являются фактор, стимулирующий образование колоний клеток, фактор роста из тромбоцитов и интерлейкин-1 $\beta$  [15, 26, 105]. Имеются сведения, что инсулин стимулирует синтез и секрецию АПИ-1 в эндотелиальных клетках, а гиперинсулинемия у больных стенокардией может способствовать развитию инфаркта миокарда пу-

**Влияние ростстимулирующих полипептидов на секрецию АП и АПИ клетками**

Фактор роста	Тип клеток	Влияние на секрецию		
		уАП	тАП	АПИ
ЭФР	Фибробласты легких эмбрионов	+	+	+
	Клетки аденокарциномы (А 431)	+		
ТФР- $\alpha$	Фибробласты легких эмбрионов	+	+	+
оФРФ	Эндотелиальные клетки	+	+	+
ТФР- $\beta$	Фибробласты кожи	+		+
	Фибробласты легких эмбрионов	—	—	+
	Клетки аденокарциномы (А 549)	+		+
Тромбин	Клетки фибросаркомы	—		+
	Предшественники остеобластов	—		+
	Эндотелиальные клетки	+	+	+

Примечание. оФРФ — фактор роста фибробластов основного типа.

тем индукции АПИ-1 [48]. Увеличение активности АПИ-1 под влиянием инсулина выявлено также в клетках линии Нер G<sub>2</sub> гепатомы человека [4]. Что касается фактора некроза опухоли, то он увеличивает и синтез АПИ-1, и его секрецию клетками эндотелия [109, 118, 123].

ТФР-β изменяет интенсивность секреции уАП и тАП в нормальных и опухолевых клетках. В большинстве типов клеток он оказывает ингибирующее влияние на секрецию АП, однако в некоторых, например в клетках аденокарциномы легких, он стимулирует и синтез, и секрецию этих ферментов [51, 62]. При этом эффект угнетения активности АП в фибробластах под действием ТФР-β является результатом как снижения синтеза ферментов, так и увеличения секреции его ингибиторов [89, 93]. Необходимо отметить, что ТФР-β блокирует также стимулирующее влияние оФРФ на активность АП в клетках эндотелия капиллярных сосудов [106]. Интересно, что в некоторых опухолевых клетках, например в клетках глиобластомы, в которых происходит интенсивный синтез ТФР-β, активность АП относительно низкая [41].

Таким образом, можно считать, что ТФР-β принадлежит к группе важных ростовых факторов, которые модулируют активность АП в клетках и окооклеточной среде. Синтез этого фактора злокачественными клетками обуславливает аутокритическую регуляцию ими собственного протеолитического потенциала. В свою очередь АП влияют на латентную форму ТФР-β, содействуя его активации [72].

Секреция уАП в некоторых типах эмбриональных и опухолевых клеток особенно зависит от глюкокортикоидов [76]. Действие этих гормонов, по всей вероятности, не влияет на скорость синтеза ферментного белка и концентрацию его ингибиторов [108, 121]. Имеется, однако, сообщение, что в клетках семенников быка в ответ на действие глюкокортикоидов индуцируется синтез ингибитора АП плацентарного типа [16].

Тестостерон, прогестерон и лютеинизирующий гормон также значительно снижают уровень и связанных, и секретированных гранулезными клетками кур АП [113]. В гранулезных клетках яичников крыс фолликулостимулирующий гормон вызывает увеличение уровня АП, а добавление глюкокортикоидов усиливает стимулирующее влияние этого гормона.

Форболовые эфиры, которые считаются стимуляторами злокачественного роста, также значительно увеличивают в различных типах клеток синтез и секрецию АП, а также секрецию АПИ-2 [30, 98]. Это действие зависит от присутствия Ca<sup>2+</sup>-фосфолипидзависимой протеинкиназы С, указывая на важную роль последней в регуляции активности АП в клетках [17, 114]. Некоторые авторы, однако, считают, что влияние форболовых эфиров на уровень АП может осуществляться и без участия протеинкиназы С [73]. Секреция обоих типов АП в эндотелиальных клетках стимулируется также иолиаминами [31], а в макрофагоподобных клетках RAW264. 7 — генарином [27].

АП — ферменты фибринолиза — выявляются

во многих типах клеток организма человека и животных и участвуют в различных физиологических и патологических процессах: овуляции и оплодотворении яйцеклеток, имплантации бластоциста, эмбриональном развитии, регенерации и дифференцировке тканей, злокачественном росте, тромболитическом и др. Они катализируют также другие реакции, в том числе ограниченный протеолиз прогормонов.

АП синтезируются в виде предшественников, процессинг которых происходит в основном либо на мембранах клеток, либо после секреции в окооклеточном пространстве. Регуляция их активности осуществляется специфическими и неспецифическими ингибиторами и находится под контролем гормонов и других биорегуляторов. Важная роль АП в процессах фибринолиза, и широкое применение их в терапевтической практике требуют дальнейшего изучения их свойств, действия и регуляции активности.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Егоров Б. Б., Стрижаченко Н. М. Общие проблемы физико-химической биологии. — М., 1988.
2. Кудинов С. А., Гриненко Т. В., Третьяченко В. // Докл. АН УССР. — 1984. — № 4. — С. 70.
3. Allan E. H., Hamilton J. A., Medcalf R. L. et al. // Biochim. biophys. Acta. — 1986. — Vol. 888. — P. 199—207.
4. Andreassen P. A., Georg B., Lund L. R. et al. // Molec. cell. Endocr. — 1990. — Vol. 68. — P. 1—19.
5. Bachmann F. // Thrombosis and Hemostasis / Eds. M. Verstraete et al. — Leuven, 1987. — P. 227—265.
6. Baldaai M., Catalani R., Bartoli C. et al. // Boll. Soc. ital. Biol. sper. — 1989. — Vol. 65. — P. 521—528.
7. Barnathan E. S., Kuo A., Rosefeld L., Henkin J. // Circulation. — 1989. — Vol. 80. — P. 11—16.
8. Beebe D. P. // Thromb. Res. — 1987. — Vol. 46. — P. 241—254.
9. Bicsak T. A., Cajander S. B., Peng X. R. et al. // Endocrinology. — 1989. — Vol. 124. — P. 187—194.
10. Booth N. A., MacGregor I. R., Hunter N. R., Bennett B. // Europ. J. Biochem. — 1987. — Vol. 165. — P. 595—600.
11. Booth N. A., Reith A., Bennett B. // Thromb. and Haemost. — 1988. — Vol. 59. — P. 77—79.
12. Booth N. A. // Biochemist. — 1989. — Vol. 11. — P. 23.
13. Brunner G., Markus M. S., Kramer M. D. // FEBS Lett. — 1990. — Vol. 260. — P. 141—144.
14. Buckley A. R., Putnam C. W., Russel D. H. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1984. — Vol. 122. — P. 1005—1011.
15. Campbell I. K., Piccoli D. S., Butler D. M. et al. // Biochim. biophys. Acta. — 1988. — Vol. 133. — P. 183—194.
16. Coombs R. J., Jenkins N. // J. Endocr. — 1988. — Vol. 117. — P. 69—74.
17. Crutchley D. J., Smariga P. E. // Biochim. biophys. Acta. — 1986. — Vol. 886. — P. 26—32.
18. Danglot G., Vinson D., Chapeville F. // FEBS Lett. — 1986. — Vol. 194. — P. 96—100.
19. Danø K., Andreassen P. A. // Advanc. Cancer Res. — 1985. — Vol. 44. — P. 239—266.
20. Dayer J. M., Vassalli J. D., Bobbitt J. L. et al. // J. Cell Biol. — 1981. — Vol. 91. — P. 195—200.
21. de Fouw N. J., van Hinsbergh V. W. M., de Jong Y. F. et al. // Thromb. and Haemost. — 1987. — Vol. 57. — P. 176—182.
22. de Munk G. A. W., Rijken D. C. // Fibrinolysis. — 1990. — Vol. 4. — P. 1—9.
23. Eaton D. L., Baker J. B. // J. biol. Chem. — 1983. — Vol. 258. — P. 10439—10444.
24. Ellis V., Scully M. F., Kakkar V. V. // Ibid. — 1989. — Vol. 264. — P. 2185—2188.
25. Esrreicher A., Wohltwend A., Belin D. et al. // Ibid. — P. 1180—1189.
26. Evans D. B., Bunning R. A. D., Russell R. G. G. // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1990. — Vol. 166. — P. 208—216.
27. Falcone D. J. // J. cell. Physiol. — 1989. — Vol. 140. — P. 219—226.

28. *Fears R.* // *Biochem. J.*—1988.—Vol. 249.—P. 77—81.
29. *Fears R.* // *Ibid.*—1989.—Vol. 261.—P. 313—324.
30. *Genton C., Kruithof E. K. O., Schleuning W. D.* // *J. Cell Biol.*—1987.—Vol. 104.—P. 705—712.
31. *Gilboa N., Neumann P. H., Del Vecchio P. J., Gudewicz P. W.* // *Biochem. int.*—1988.—Vol. 17.—P. 585—592.
32. *Granelli-Pilperno A., Reich E.* // *J. Cell Biol.*—1983.—Vol. 97.—P. 1029—1037.
33. *Gross J. L., Krupp M. N., Rifkin D. B., Lane M. D.* // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.*—1983.—Vol. 80.—P. 2276—2280.
34. *Guerci A. D., Gerstenblith G., Brinker J. A.* et al. // *New Engl. J. Med.*—1987.—Vol. 317.—P. 1613—1618.
35. *Gurewich V.* // *Semin. Thromb. Haemost.*—1988.—Vpl. 14.—P. 110—115.
36. *Hall S. W., Braud L. L., Gonias S. L.* // *Biochem. biophys. Res. Commun.*—1989.—Vol. 164.—P. 1288—1294.
37. *Hart D. A., Rehemtulla A.* // *Comp. Biochem. Physiol.*—1988.—Vol. 90. B.—P. 691—708.
38. *Hashimoto K., Singer K., Lazarus G. S.* // *Brit. J. Derm.*—1984.—Vol. 110.—P. 293—297.
39. *Hearing V. J., Law L. W., Corti A.* et al. // *Cancer Res.*—1988.—Vol. 48.—P. 1270—1278.
40. *Hekman C. M., Laskutoff D. J.* // *J. biol. Chem.*—1985.—Vol. 260.—P. 11561911587.
41. *Helselt E., Dalen A., Unsgaard G., Vik R.* // *J. Neurooncol.*—1988.—Vol. 6.—P. 277—283.
42. *Hibino T., Izaki S., Ohkuma M.* et al. // *FEBS Lett.*—1989.—Vol. 231.—P. 202—206.
43. *Huarte J., Belin D., Bosco D.* et al. // *J. Cell Biol.*—1987.—Vol. 104.—P. 1281—1289.
44. *Ichinose A., Fujikawa K., Suyama T.* // *J. biol. Chem.*—1986.—Vol. 261.—P. 3486—3489.
45. *Jensen P. H., Nykjaer A., Andreassen P. A.* et al. // *Biochim. biophys. Acta.*—1989.—Vol. 986.—P. 135—140.
46. *Jensen P. H., Christensen E. L., Ebbesen P.* et al. // *Cell Regulat.*—1990.—Vol. 1.—P. 1043—1056.
47. *Johnson A. L., Tully J. L.* // *Biol. Reprod.*—1988.—Vol. 38.—P. 296—303.
48. *Juhan-Vague I., Alessi M. C., Joly P.* et al. // *Arteriosclerosis.*—1989.—Vol. 9.—P. 362—367.
49. *Kalderon M.* // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.*—1984.—Vol. 81.—P. 7216—7220.
50. *Keski-Oja L., Vaheri A.* // *Biochim. biophys. Acta.*—1982.—Vol. 720.—P. 141—146.
51. *Keski-Oja J., Blasi F., Lee F. E. B., Mises H. L.* // *J. Cell Biol.*—1988.—Vol. 106.—P. 451—459.
52. *Kirchheimer J. C., Wojta J., Christ G., Binder B. R.* // *FASEB J.*—1987.—Vol. 1.—P. 125—128.
53. *Kiso U., Kaudewitz H., Henschen A.* et al. // *FEBS Lett.*—1989.—Vol. 230.—P. 51—56.
54. *Klocking H., Hoffmann A.* // *Folia haemat. (Lpz.)*—1989.—Bd. 116.—S. 895—899.
55. *Knauer D. J., Cunningham D. D.* // *Trends biochem. Sci.*—1984.—Vol. 9.—P. 231—233.
56. *Knecht M.* // *Endocrinology.*—1987.—Vol. 120.—P. 2174—2179.
57. *Koh S. C. L., Wong P. C., Yuen R.* et al. // *Med. Sci. Res.*—1987.—Vol. 15.—P. 237—238.
58. *Kristensen O., Nielsen L. S., Grondahl-Hansen J.* et al. // *J. Cell Biol.*—1985.—Vol. 101.—P. 315—311.
59. *Kristensen P., Pyke C., Lund L. R.* et al. // *Histochemistry.*—1990.—Vol. 93.—P. 559—566.
60. *Kruithof E. K. O., Gudinchel A., Bachmann F.* // *Blood.*—1988.—Vol. 59.—P. 7—12.
61. *Laiho M., Saksela O., Andreassen P. A., Keski Oja J.* // *J. Cell Biol.*—1986.—Vol. 103.—P. 2403—2410.
62. *Laiho M.* // *Exp. Cell Res.*—1988.—Vol. 176.—P. 297—308.
63. *Laiho M., Keski-Oja J.* // *Cancer Res.*—1989.—Vol. 49.—P. 2533—2553.
64. *Lambers J. W. J., Cammenga M., Konig B. W.* et al. // *J. biol. Chem.*—1987.—Vol. 262.—P. 17492—17496.
65. *Laevie E., Billon M., Shalov J.* et al. // *Biochim. biophys. Acta.*—1989.—Vol. 991.—P. 62—67.
66. *Leipnitz G., Miyashita C., Heiden M.* et al. // *Haemostasis.*—1987 (1988)—Vol. 18.—P. 61—67.
67. *Lijnen H. R., van Hoef B., Collen D.* // *Europ. J. Biochem.*—1987.—Vol. 169.—P. 359—364.
68. *Liu Y. X., Cajander S. B., Ny T.* et al. // *Molec. cell Endocr.*—1987.—Vol. 54.—P. 221—229.
69. *Liu Y. X., Kasson B. G., Dahl K. B., Hsueh A. J.* // *Peptides.*—1987.—Vol. 8.—P. 29—33.
70. *Liu Y. X., Lyons R. M., McDonagh J.* // *Thromb. and Haemost.*—1988.—Vol. 59.—P. 49—53.
71. *Lucore C. L., Fugii S., Wun T. C.* et al. // *J. biol. Chem.*—1988.—Vol. 263.—P. 15845—15848.
72. *Lyons R. M., Keski-Oja J., Moses H. L.* // *J. Cell Biol.*—1988.—Vol. 106.—P. 1659—1665.
73. *Maier J. A. M., Presta M., Ragnotti G.* // *Biochem. biophys. Res. Commun.*—1989.—Vol. 160.—P. 682—691.
74. *Matsuo O., Fukao H., Izaki S.* et al. // *Cell Struct. Funct.*—1989.—Vol. 14.—P. 45—60.
75. *Mayer M., Finci Z.* // *J. clin. Chem. clin. Biochem.*—1989.—Vol. 27.—P. 885.
76. *Medcalf R. L., van den Berg E., Schleuning W. D.* // *J. Cell Biol.*—1988.—Vol. 106.—P. 996—998.
77. *Miles L. A., Dahlberg C. M., Levin E. G., Plow E. F.* // *Biochemistry.*—1989.—Vol. 28.—P. 9337—9343.
78. *Mirshahi M., Mirshahi S., Soria C.* et al. // *Biochem. biophys. Res. Commun.*—1989.—Vol. 160.—P. 1021—1025.
79. *Mochan E., Uhl J., Newton R.* // *J. Rheum.*—1986.—Vol. 13.—P. 15—19.
80. *Moscattelli D., Presta M., Rifkin D. B.* // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.*—1986.—Vol. 83.—P. 2091—2095.
81. *Nakagawa M., Fukuyama K., Epstein W.* et al. // *Chem. pharm. Bull.*—1989.—Vol. 37.—P. 1859—1863.
82. *Nedham G. K., Nicholson S., Angus B.* et al. // *Cancer Res.*—1988.—Vol. 48.—P. 6603—6607.
83. *Neuman T., Stephens R. W., Salonen E. M.* et al. // *J. Neurosci.*—1989.—Vol. 23.—P. 274—281.
84. *Nielsen L. S., Andreassen P. A., Grondahl-Hansen J.* et al. // *FEBS Lett.*—1986.—Vol. 196.—P. 269—273.
85. *Oikawa M., Hsueh A. J. W.* // *Endocrinology.*—1989.—Vol. 125.—P. 2550—2557.
86. *Orfanoudakis G., Zaoui D., Belfort J. J., Bieth J. G.* // *Biol. cell.*—1989.—Vol. 65.—P. 297—300.
87. *Ossowski L., Biegel D., Reich E.* // *Cell.*—1979.—Vol. 16.—P. 929—940.
88. *Ossowski L., Reich E.* // *Ibid.*—1983.—Vol. 35.—P. 611—619.
89. *Overall Ch. M., Wrana J. L., Sodek J.* // *J. biol. Chem.*—1989.—Vol. 264.—P. 1860—1869.
90. *Park S., Harker L. A., Marzec U. M., Levin E. G.* // *Blood.*—1989.—Vol. 73.—P. 1421—1425.
91. *Pepinsky R. B., Sinclair L. K., Chow E. P.* et al. // *J. biol. Chem.*—1988.—Vol. 263.—P. 18961—18964.
92. *Pepper M. S., Vassalli J. S., Montesano R., Orci L.* // *J. Cell Biol.*—1987.—Vol. 105.—P. 2535—2541.
93. *Pjellschijter J., Erdmann J., Schmidt W.* et al. // *Endocrinology.*—1990.—Vol. 126.—P. 703—711.
94. *Piotrowski Z., Soszka T.* // *Folia haemat. (Lpz.)*—1990.—Bd 117.—S. 37—43.
95. *Pohl G., Jorvall H., Kok P., Wallen P.* // *FEBS Lett.*—1986.—Vol. 205.—P. 92—96.
96. *Presta M., Moscattelli D., Joseph-Sulverstein J., Rifkin D. B.* // *Molec. cell. Biol.*—1986.—Vol. 6.—P. 4060—4066.
97. *Quigley J. P.* // *Cell.*—1979.—Vol. 171.—P. 131—141.
98. *Rehemtulla A., Cates J., Hart D. A.* // *Comp. Biochem. Physiol.*—1987.—Vol. 88 B.—P. 277—283.
99. *Reich R., Miskin R., Tsafirri A.* // *Endocrinology.*—1986.—Vol. 119.—P. 1588—1593.
100. *Rennie P. S., Bouffard R., Bruchovsky N., Chen H.* // *Biochem. J.*—1984.—Vol. 211.—P. 171—178.
101. *Rickles R. J., Strickland S.* // *FEBS Lett.*—1988.—Vol. 229.—P. 100—106.
102. *Rijken D. C., Collen D.* // *J. biol. Chem.*—1981.—Vol. 256.—P. 7035—7041.
103. *Rijken D. C., Groenveld E.* // *Ibid.*—1986.—Vol. 261.—P. 3098—3102.
104. *Russell J., Schneider A. B., Karzhendler J.* et al. // *Ibid.*—1979.—Vol. 254.—P. 2296—2301.
105. *Saksela O.* // *Biochim. biophys. Acta.*—1985.—Vol. 823.—P. 35—65.
106. *Saksela O., Hovi T., Vaheri A.* // *J. cell. Physiol.*—1985.—Vol. 122.—P. 125—132.
107. *Saksela O., Holthofer H.* // *Differentiation.*—1987.—Vol. 37.—P. 131—138.
108. *Saksela O., Moscattelli D., Rifkin D. B.* // *J. Cell Biol.*—1987.—Vol. 105.—P. 957—963.
109. *Schleef R. R., Bevilacqua M. P., Sawdey M.* et al. // *J. biol. Chem.*—1988.—Vol. 263.—P. 5797—5803.
110. *Skriver L., Larsson L. I., Kielberg V.* et al. // *J. Cell Biol.*—1984.—Vol. 99.—P. 752—757.

111. *Sprengers E. D., Kluft C.* // *Blood.*—1987.— Vol. 69.— P. 381—387.
112. *Stopelli M. P., Verde P., Grimaldi G.* et al. // *J. Cell Biol.*—1986.— Vol. 102.— P. 1235—1244.
113. *Tilly J. L., Johnson A. L.* // *Biol. Reprod.*—1987.— Vol. 37.— P. 1156—1164.
114. *Tilly J. L., Johnson A. L.* // *Endocrinology.*—1988.— Vol. 123.— P. 1433—1441.
115. *Torser J., Hamvas A., Rady P.* et al. // *Acta biochim. biophys. hung.*—1989.— Vol. 24.— P. 119—128.
116. *Tripalhi B. J., Tripalhi R. C., Geanon J. D.* // *Ophthalm.— Res.*—1988.— Vol. 20.— P. 160—163.
117. *Urano T., de Serrano V. S., Urano S., Castellino F.* // *Arch. Biochem.*—1989.— Vol. 270.— P. 356—362.
118. *van Hinsbergh V. W. M., Kooistra T., van den Berg E. A.* et al. // *Blood.*—1988.— Vol. 72.— P. 1467—1473.
119. *Vassalli J. D., Baccino D., Belin D.* // *J. Cell Biol.*—1985.— Vol. 100.— P. 86—92.
120. *Vaughan D. E., Mendelsohn M. E., Declerck P. J.* et al. // *J. biol. Chem.*—1989.— Vol. 264.— P. 15869—15874.
121. *Wang C., Leung A.* // *Endocrinology.*—1989.— Vol. 124.— P. 1595—1601.
122. *Wilson M. J., Dilmanson J. V., Sinha A. A., Estensen R. D.* // *Prostate.*—1990.— Vol. 16.— P. 147—161.
123. *Willwer A. J., Howard S. C., Carr L. S.* et al. // *Biochemistry.*—1989.— Vol. 28.— P. 7662—7669.
124. *Wun T. C., Reich E.* // *J. biol. Chem.*—1987.— Vol. 262.— P. 3646—3653.
125. *Yamada H., Stephens R. W., Nakagawa T.* // *J. Biochem. (Tokyo).*—1988.— Vol. 104.— P. 960—967.

Поступила 23.10.91

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 615.212.3:547.775].015.4

М. Г. Иогансен, А. С. Петров, А. М. Качурин

### СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ АМИНОПИРАЗОЛОНОВ В РЕАКЦИИ ОКИСЛЕНИЯ ПЕРЕКИСЬЮ ВОДОРОДА

Институт ядерной физики им. Б. П. Константинова АН РСФСР, Санкт-Петербург, НИИ онкологии им. Н. Н. Петрова МЗ РСФСР, Москва

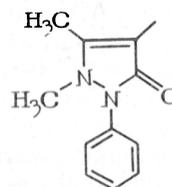
Пиразолоновые соединения применяют в медицине как жаропонижающие средства и анальгетики. К этой группе относятся антипирин, амидопирин (4-N,N-диметиламиноантипирин, АМП, пирамидон), анальгин, бутадиион. Другое производное, 4-аминоантипирин (4-ААП), используют в качестве хромогена при определении глюкозы и в иммунохимических тестах [2, 12, 21]. Известна амидопириновая проба для выявления скрытой крови [13, 15]. В настоящее время в диагностических реакциях пиразолоны применяют вместо высококанцерогенных соединений: бензидина, ортолуидина, ортодианзидина. Эти канцерогены представляют реальную опасность, их применение даже в лабораторных условиях должно строго регламентироваться [8, 17, 22, 23]. Поэтому реакции с применением пиразолоновых соединений находят широкое применение.

При пероксидазном или пероксидазоподобном (гемоглобин) окислении АМП образуется нестойкий, окрашенный в фиолетовый цвет продукт.

Такой продукт не выявляется при аналогичном окислении 4-ААП. Известно, что аминозамещенные производные пиразолонов могут окисляться с образованием окрашенных димеров типа производных рубазоновой кислоты (так называемого антипиринового красного) [19, 20].

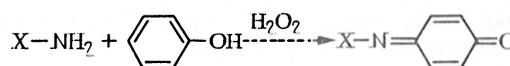


где X — группировка антипиринина с замещенным протоном в положении 4:



Метилрубазоновая и рубазоновая кислоты образуются в организме из АМП в процессе его метаболизма [25].

Хорошо известно также, что амины могут взаимодействовать с фенолами. При этом в ряде случаев получают окрашенные соединения. В частности, именно взаимодействием 4-ААП с фенолом и его производными используется в упомянутых выше диагностических тестах [2, 12, 21]:



Пероксидаза является мощным катализатором такой реакции.

4-ААП вступает в реакции с другими аминами. При этом также могут получаться окрашенные продукты [19]. Окисление различных ароматических аминов и фенолов в условиях пероксидазного катализа исследовано ранее [16], но окисление пиразолонов не рассматривалось. Казалось очевидным, что аминогруппа в положении 4 пиразолонового ядра не должна быть замещенной, а в реагирующем с 4-ААП ароматическом амине должны быть свободны пара- или орто-положения [4, 5, 19]. Однако исследования показали, что вопреки сложившемуся мнению об отсутствии реакционной способности у производных 4-ААП с замещенными протонами аминогруппы возможны реакции с аминами при их совместном окислении с образованием окрашенных соединений [6]. Так, был предложен комбинированный реактив азопирам, который применяется в настоящее время при диагностике скрытых кровотечений, определении степени гемолиза, ферментативном определении глюкозы в биологических жидкостях [7, 11, 14].

Очевидно, что важнейшим этапом указанных реакций является окисление перекисью водорода пиразолонов. Рассмотрению этого вопроса посвящена настоящая статья.

**Методика.** Оптические измерения проведены на спектрофотометре «Specord» («Carl Zeiss», Германия). Спектры ЭПР регистрировали на спектрометре X-диапазона SE-X/2544 («Radiopan», Польша), протонные спектры ЯМР (ПМР на протонах) — на спектрометре BS-467 («Tesla», Чехо-Словакия). Статическую магнитную восприимчивость растворов измеряли по [9, 10] на модифицированном спектрометре ЯМР BS-487C («Tesla»).

Концентрацию свободных радикалов амидопиррина определяли, сопоставляя двойные интегралы спектров радикала и спектров пиперидиновой спиновой метки, служившей эталоном. Концентрацию метки, в свою очередь, определяли с помощью прецизионного измерения магнитной восприимчивости [10].

Использовали пероксидазу корней хрена («Reanal», Венгрия), бычий гемоглобин (Олайнский завод биохимических препаратов, Рига). Остальные химреактивы советского производства, не хуже ч. д. а.

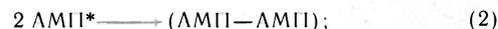
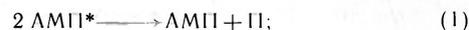
**Результаты и обсуждение.** Окисление перекисью водорода АМП протекает с образованием интермедиата, имеющего характерную фиолетовую окраску ( $\lambda_{\max} = 570$  нм), исчезающую после завершения реакции окисления (рис. 1).

Реакция резко ускоряется в присутствии пероксидазы, гемоглобина, ионов железа. Тот же интермедиат получается при заведомо одноэлектронном окислении АМП перманганатом в кислой среде.

Учитывая преимущественно одноэлектронный характер окисления органических субстратов с участием пероксидазы [16, 26], следует заключить, что фиолетовый интермедиат может представлять собой радикал АМП\*. Действительно, фиолетовая окраска коррелирует с наличием синглетного сигнала ЭПР (см. рис. 1) с g-фактором  $2,0027 \pm \pm 0,0003$ . Измерение магнитной восприимчивости раствора, в котором протекает реакция, показывает значительный вклад парамагнитной составляющей. На рис. 1 представлены кинетические кривые, полученные с помощью спектрофотометрии, измерения интенсивности ЭПР и магнитной восприимчивости раствора.

Нисходящие ветви кинетических кривых, соответствующие фазе гибели радикалов после истощения перекиси, описываются кинетическими

уравнениями второго порядка. Это говорит о том, что механизм гибели радикалов — диспропорционирование или димеризация:



где П — продукт полного окисления АМП.

Другие 4-аминопроизводные пиразолона: 4-ААП и анальгин (4-N-метил-N-сульфометиленамиоантипирин) также окисляются перекисью в присутствии пероксидазы и гемоглобина. Анальгин при окислении в слабокислом растворе pH 4,0—5,0 образует интенсивно-синий интермедиат, обладающий свойствами, аналогичными радикалу АМП\*. Его видимый спектр смещен в красную сторону относительно спектра АМП\* ( $\lambda_{\max} = 595$  нм, см. рис. 1). 4-ААП при окислении образует продукт бордового цвета ( $\lambda_{\max} = 535$  нм), медленно обесцвечивающийся (в течение суток и более). Появление окраски в этом случае не связано с накоплением свободных радикалов. По-видимому, окрашенное соединение образуется после гибели радикалов и представляет собой димер типа антипиринового красного, хорошо известного как продукт окисления 4-ААП хлорным железом [19, 20] (рис. 2).

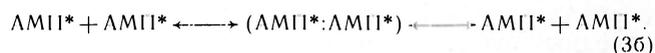
4-ААП — более сильный восстановитель, чем АМП. При окислении перекисью их смеси в присутствии пероксидазы свободные радикалы АМП\* появляются лишь после полного окисления 4-ААП, внесение 4-ААП в раствор радикалов АМП\* приводит к их мгновенному исчезновению (см. рис. 2).

Пиразолон, не имеющий 4-аминогруппы — антипирин, не вступает, по-видимому, в реакцию при аналогичных обстоятельствах. Не наблюдается изменений в оптических спектрах и спектрах ЯМР, отсутствуют следы свободных радикалов.

Мы считаем, что наличие 4-аминогруппы принципиально необходимо для участия пиразолонов в реакции окисления перекисью водорода в мягких условиях. При этом относительная стабильность радикалов амидопиррина и анальгина (по сравнению с 4-ААП) непосредственно связана с наличием 4-N-заместителей.

Для краткости и удобства в дальнейшем будем называть реакцию окисления перекисью водорода в мягких условиях с пероксидазным катализом (истинной пероксидазой или гемоглобином) реакцией пероксидазного окисления.

Спектр ЭПР радикала АМП\* (см. рис. 1) не имеет выраженного сверхтонкого расщепления. Мы считаем, что это обусловлено интенсивным химическим обменом между радикалами и молекулами АМП:



Здесь (3a) описывает миграцию радикального состояния по всему пулу АМП, а (3b) — обменное взаимодействие радикалов в паре. Исчезновение сверхтонкого расщепления в результате обменного взаимодействия подробно рассмотрено ранее [3]. Прямым указанием на обмен типа (3a) слу-

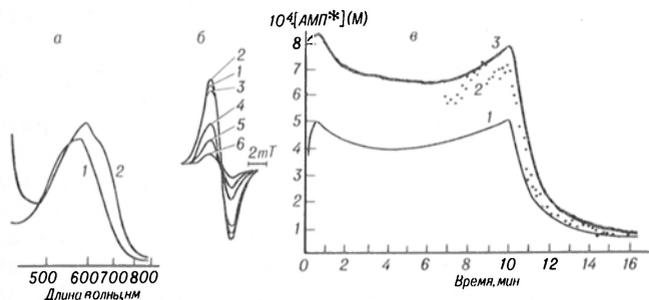


Рис. 1. Первичный продукт окисления АМП и анальгина — свободный радикал.

а — оптические спектры радикалов амидопиррина и анальгина. Спектр радикала АМП\* (1) получен в 0,05 М фосфатном буфере pH 7,0. АМП 4,33 мМ, перекись водорода 4,75 мМ, пероксидаза 0,0036 мМ, 18,5 °С. Далее описанные условия считаются стандартными, указываются лишь отличия от стандарта. Спектр радикала анальгина (2) получен в 0,05 М ацетатном буфере pH 4,5, концентрация анальгина стандартная; б — спектр ЭПР радикала АМП\*. Запись каждые 2 мин, номера соответствуют очередности записи. СВЧ 15 дБ, модуляция 1 Гс; а — кинетические кривые образования и гибели радикалов АМП\*, полученные при отслеживании оптической плотности на волне 570 нм (1) интенсивности сигнала ЭПР (2), статической магнитной восприимчивости (3).

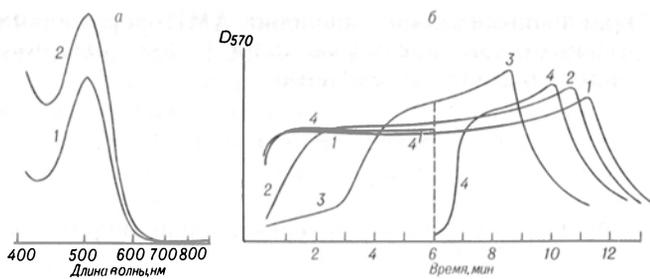


Рис. 2. Окисление 4-ААП в чистом виде и в присутствии АМП. *a* — спектры продуктов окисления 4-ААП: 1 — окисление избытком хлорного железа в подкисленной воде рН 2,0—3,0, 2 — окисление перекисью с помощью пероксидазы. Спектры сняты через 1 мин после начала реакции; *b* — влияние 4-ААП на кинетику образования АМП\*. Концентрация 4-ААП: 1 — нулевая, 2 — 0,22 мМ, 3 — 0,86 мМ, 4 — 0,22 мМ, по 4-ААП внесен по ходу реакции (момент обозначен вертикальным пунктиром).

жит спектр ПМР амидопирина в стационарной фазе реакции пероксидазного окисления (рис. 3): все группы линий АМП при этом парамагнитно уширены в одинаковой степени, в то время как линии веществ-свидетелей (вода, третбутанол) не уширяются. Этот эффект говорит не только о миграционном обмене (3а), но также о делокализации неспаренного электрона по ароматической структуре АМП\* [18].

Миграционный обмен (3а) возможен не только между молекулами и радикалами АМП, но и между АМП\* и другими органическими субстратами как пиразолонового ряда, так и ароматическими аминами: анальгином, 4-ААП, анилином, пара- и ортофенилендиаминами и т. п. Вторичные радикалы могут взаимодействовать друг с другом или с АМП\* в зависимости от их относительной активности (см. рис. 2). Миграционный обмен, по всей видимости, играет существенную роль в цветной реакции окисления индикатора азопирам (смесь АМП и солянокислого анилина), применяемого для обнаружения скрытой крови по ее пероксидазной активности [11, 14].

На рис. 1 видно, что концентрация радикалов АМП\*, по данным ЭПР и магнитной восприимчивости, на 35—50 % больше, чем по данным спектрофотометрии. Учитывая наше особое внимание и тщательность при количественных измерениях, мы склонны считать эту разницу достоверной. В таком случае она может объясняться лишь спиновой поляризацией неспаренных электронов в радикалах АМП\*. По совокупности свойств (положительный эффект поляризации, отсутствие линий эмиссии) поляризационный эффект можно объяснить обменом в радикальных парах (3б) [1].

Вопросу определения коэффициента оптической экстинкции радикала АМП\* было уделено особое внимание, поскольку от надежности определения коэффициента экстинкции зависела корректность выводов о механизмах реакций с участием АМП\*. Определение коэффициента экстинкции проводилось двумя способами: с использованием реакций восстановления радикала АМП\* до АМП двухвалентным железом и, наоборот, окисления АМП до АМП\* трехвалентным железом по следующей схеме:

В отсутствие комплексонов, рН 2,0—3,0

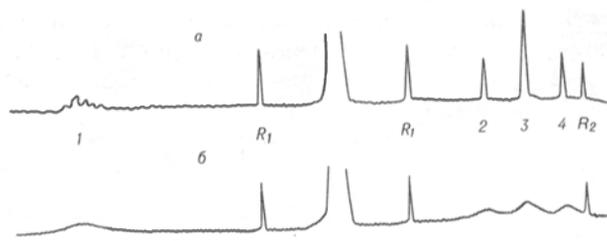


Рис. 3. Спектры ПМР амидопирина.

Растворы в тяжелой воде, внутренний эталон — 10 % третбутанол, АМП 17 мМ, фосфатный буфер и пероксидаза — стандартно. *a* — спектр снят перед добавлением перекиси; *b* — через 30 с после добавления перекиси: 1 — фенольная группа, 2 — метильная группа у азота N2, 3 — метильные группы у азота N5, 4 — метильная группа C3, R1 — ротационная линия воды (H2O), R2 — ротационная линия третбутанола.

В присутствии комплексонов (4)

Мы обнаружили, что радикал АМП\* может быть получен прямым окислением АМП ионами трехвалентного железа в подкисленной воде рН 2,0—3,0, однако непременным условием является отсутствие активных комплексообразователей, в том числе компонентов буферных смесей (даже таких простейших, как фосфат, ацетат и т. д.).

Восстановление радикала АМП\* двухвалентным железом отмечено на стадии гибели радикала. Сразу после исчерпания перекиси в пероксидазной реакции окисления АМП мы вводили аликвоту раствора соли Мора  $\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , сернокислого закисного железа  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  или желтой кровяной соли  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ . Коэффициент мольной экстинкции определяли по ступенчатому уменьшению оптической плотности на нисходящей кинетической кривой (рис. 4). Средний коэффициент экстинкции, найденный в этих опытах,  $E_{570} = 2230 \pm 100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ .

Окисление АМП до АМП\* трехвалентным железом проводили в подкисленной воде рН 2,0—3,0. В раствор АМП известной концентрации, подкисленный соляной кислотой, добавляли избыток  $\text{FeCl}_3$ . Зарегистрировав изменение оптической плотности, определяли коэффициент мольной экстинкции как предел расчетного коэффициента при бесконечном разведении раствора АМП и хлорного железа (см. рис. 4). Такой подход необходим, так как при большой концентрации амидопирин и продукты его окисления, по-видимому, образуют ком-

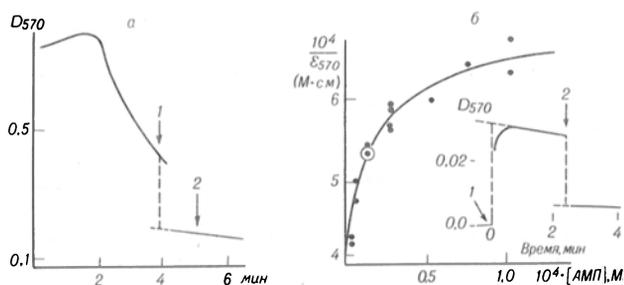


Рис. 4. Определение коэффициента мольной экстинкции  $E_{570}$  радикала АМП\*.

*a* — при восстановлении АМП\* до АМП двухвалентным железом на стадии диспропорционирования. Стрелкой 1 отмечен момент введения в оптическую кювету 0,1 М сернокислого закисного железа, стрелкой 2 — 0,1 М хлорного железа (трехвалентного); *b* — при окислении АМП до АМП\* ионами трехвалентного железа в подкисленной воде (0,02 М HCl, рН 2,0—3,0). Буферная система, перекись и фермент отсутствуют. Врезка иллюстрирует один из опытов, отмеченный кружком на экспериментальной кривой. Концентрация АМП 0,02 мМ. Стрелкой 1 отмечен момент внесения в раствор 0,1 мМ  $\text{FeCl}_3$ , стрелкой 2 — момент внесения 0,01 мМ ЭДТА.

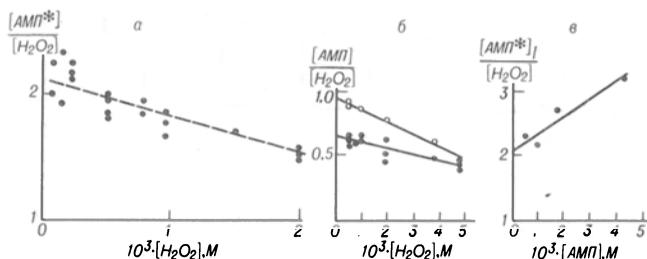


Рис. 5. Стехиометрические соотношения в реакции окисления АМПІ перекисью водорода с участием пероксидазы.

а — соотношение между перекисью и АМП\* при значительном избытке амидопирина; б — соотношение между перекисью и количеством окисленного АМП в условиях полного окисления. Незачерненные кружки — результаты, полученные для концентрации АМП, в 5 раз большей, чем стандартная; в — количество радикалов, образующихся за время полного окисления аликвоты амидопирина (обозначено как  $[AMPI^*]_1$ ). В раствор вводили по 0,475 мМ перекиси до полного прекращения реакции.

плексы с ионами  $Fe^{2+}$ , что ведет к обратному восстановлению АМП\*. Коэффициент экстинкции, определенный в этих опытах, составил  $2410 \pm \pm 120 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ .

На врезке рис. 4 показано образование радикала АМП\* под действием избытка  $Fe^{3+}$  и обратное его восстановление (до АМП) при добавлении фиксированного количества этилендиаминтетраацетата (ЭДТА), взятого с недостатком по отношению к АМП. Точное соответствие ступенчатого уменьшения оптической плотности и концентрации введенного ЭДТА (с учетом найденного ранее коэффициента экстинкции), а также отсутствие эффекта при введении  $FeCl_3$  в раствор АМП\*, содержащий комплексоны (см. рис. 4, А), подтверждают предлагаемую нами схему (4).

Для определения стехиометрии мы рассчитывали количество радикалов АМП\*, образующихся по мере расходования перекиси и АМП. С этой целью регистрировали изменения оптической плотности в полосе поглощения АМП\* (570 нм). Определив константу второго порядка для стадии гибели радикалов (после исчерпания перекиси), вычисляли скорость исчезновения радикалов как функции их концентрации. Интегрируя эту функцию от конца кинетической кривой к началу, мы получали общее количество радикалов АМП\*, образовавшихся при расходовании аликвоты  $H_2O_2$ .

Получить верные стехиометрические соотношения между АМП\* и  $H_2O_2$  можно было, лишь последовательно снижая начальную концентрацию перекиси. Это необходимо для уменьшения вклада псевдокатализного пути утилизации перекиси с выделением кислорода [16, 24]. В пределе стехиометрическое соотношение  $H_2O_2$ :АМП\* приближается к 1:2 (рис. 5).

Аналогичный прием использовали и для определения стехиометрического соотношения  $H_2O_2$ :АМП при полном окислении, но при этом разбавления перекиси оказалось недостаточно, потребовалось последовательно уменьшать концентрацию АМП, иначе соотношение АМП: $H_2O_2$  оставалось значительно меньше 1, а соотношение полного количества радикалов и общего количества окисленного АМП значительно превышало 2 (см. рис. 5). Полученные в опытах с последовательным разбавлением стехиометрические соотношения  $H_2O_2$ :АМП\* = 1:2,  $H_2O_2$ :АМП = 1:1 и АМП\*:АМП = 2:1 полностью согласуются со схемой диспропорционирования радикалов, а не со схемой димеризации.

Этим пероксидазное окисление АМП решительно отличается от окисления 4-ААП, где, судя по всему, происходит димеризация (см. рис. 2).

При пероксидажном окислении АМП, а также при окислении трехвалентным железом в подкисленной воде образование АМП\* сопровождается поглощением ионов водорода из раствора. После исчерпания перекиси, во время диспропорционирования АМП\*, наблюдается выделение ионов  $H^+$  в раствор.

В нейтральном растворе рН 6,6, как удалось установить, количество ионов водорода, потребленных из раствора на стационарной стадии реакции (плато кинетической кривой, см. рис. 1), соответствует стационарной концентрации радикалов АМП\*. По-видимому, имеет место кислотный катализ, заторможенный благодаря относительной стабильности радикалов:



В схеме (5) АМП\*Н<sup>+</sup> — стабилизированный радикал АМП\*, содержащий ион водорода, П — продукт(ы) дальнейшего окисления АМП. Предложенная схема тем более вероятна, что скорость образования и стабильность радикалов АМП\* растет с уменьшением рН.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бучаченко А. Л. // Химическая поляризация электронов и ядер.— М., 1974.— С. 217—228.
2. Вербов В. Н. // Твердофазный иммуноферментный анализ.— Л., 1986.— С. 3—27.
3. Замараев К. И., Молин Ю. Н., Салихов К. М. // Спиновый обмен. Теория и физико-химические приложения.— Новосибирск. 1977.— С. 139—178.
4. Заявка на изобретение Японии № 61—29462В // Токке кохо.— 1986.— № 6—737, яп.
5. Заявка на изобретение Японии № 61—37904В // Токке кохо.— 1988.— № 6—948, яп.
6. Иогансен М. Г. А. с. 885881 СССР // Открытия.— 1981.— № 44.
7. Иогансен М. Г. // Всесоюзный съезд онкологов, 4-й: Тезисы докладов.— Л., 1986.— С. 521.
8. Канцерогенные вещества. Справочник: Пер. с англ.— М., 1987.— С. 22; 26; 242—243.
9. Качурин А. М., Смелянский А. Я., Клопов Н. В. // Прецизионное измерение сдвига ЯМР линии с переменной шириной (Препринт ЛИЯФ АН СССР № 1465).— Л., 1988.— С. 16—27.
10. Качурин А. М., Фомичев В. Н. // Журн. экспер. и теор. физики.— 1981.— Т. 80. № 1.— С. 199—206.
11. Контроль качества предстерилизационной очистки изделий медицинского назначения с помощью реактива азопирам: Метод. рекомендации.— Л., 1988.
12. Определение глюкозы в цельной крови и сыворотке крови глюкозооксидазным методом // Инструкция по применению унифицированных клинических лабораторных методов исследования.— М., 1985.— С. 87—91.
13. Плетнева Н. Т. // Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник / Под ред. В. В. Меньшикова.— М., 1987.— С. 68.
14. Применение реактива азопирам для диагностики скрытых кровотечений и при определении степени гемолиза: Метод. указания.— Л., 1988.
15. Руководство по клиническим лабораторным исследованиям / Под ред. Л. Г. Смирновой, Е. А. Кост.— М., 1960.— С. 68.
16. Саундерс Б. К. // Неорганическая биохимия / Под ред. Г. Эйхгорн: Пер. с англ.— М., 1978.— Т. 2.— С. 434—470.

17. Тайхман Б., Шрамм Т. // Канцерогенные вещества.— 2-е изд. Пер. с нем.— Берлин. 1976.— С. 32; 62; 81.
18. Dwek R. A. // Nuclear Magnetic Resonance in Biochemistry.— Oxford, 1973.— P. 144—180.
19. Eisentraedt E. // J. org. Chem.— 1938.— Vol. 3, N 2.— P. 153—165.
20. Michaelis A. // Liebig's Ann. Chem.— 1907.— Bd 352.— S. 152—157.
21. Peter J. // Lehrbuch der klinischen Chemie.— 3 Aufl.— Basel, 1982.— S. 171—172.
22. Quidiz A., Moatti J.-P. // Preventive.— 1989.— N 26.— P. 27—34.
23. Searle Ch. E. // Chemical Carcinogens as Laboratory Hazards / Ed Ch. E. Searle.— Washington, 1984.— P. 303—324.
24. Tamura M., Yamazaki I. // J. Biochem.— 1972.— Vol. 72, N 2.— P. 311—319.
25. Volz M., Kellner H.-M. // Brit. J. clin. Pharmacol.— 1980.— Vol. 10, N 2.— P. 299—308.
26. Yamazaki I. // Advanc. Biophys.— 1971.— Vol. 2, N 1.— P. 33—76.

Поступила 20.07.90

#### FREE RADICALS OF AMINOPYRAZOLONE IN OXIDATION REACTIONS CAUSED BY HYDROGEN PEROXIDE.

M. G. Iogannsen, A. S. Petrov, A. M. Kachurin

N. N. Petrov Institute of Oncology, Ministry of Public Health of the USSR, B. P. Konstantinov Institute of Nuclear Physics, USSR, Academy of Sciences, Leningrad.

Oxidation of amidopyrine, analgin and 4-aminoantipyrin by means of  $H_2O_2$  was studied in presence of peroxidase and hemoglobin. As shown by NMR, EPR and spectrophotometry the oxidation was of single electron type accompanied by free radical formation. The radicals of amidopyrine and analgin were stable, colored, participated in chemical exchange with initial molecules and disproportionated as demonstrated by stoichiometry. Radicals of 4-aminoantipyrin were unstable and dimerized to antipyrin red. Aminopyrazolone radicals were also formed after direct oxidation by  $Fe^{3+}$  in acidified water containing no complexones. The Fe-complexes developed shifted the equilibrium towards reduction of radicals with formation of the initial molecules. Presence of 4-amino groups was responsible for oxidation of pyrazolones under mild conditions. Alkyl derivatives of 4-amino group protons stabilized the radicals and altered their subsequent transformation form dimerization to disproportionation. Proton catalysis of aminopyrazolone oxidation occurred.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.36-008.931:577.152.2711-02:615.357:577.175.535+577.175.5221-092.4

Л. Е. Панин, Г. С. Русских, Н. В. Атучина, Т. А. Третьякова

#### О КООПЕРАТИВНОМ ЭФФЕКТЕ ГИДРОКОРТИЗОНА, АДРЕНАЛИНА И ЛИПОПРОТЕИДОВ ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ МНОЖЕСТВЕННЫХ ФОРМ ГЕКСОКИНАЗЫ В ПЕЧЕНИ

Институт биохимии Сибирского отделения РАН, Новосибирск

Изучение молекулярных механизмов гормональной регуляции гексокиназы (ГК) при остром стрессе показало, что снижение активности фермента в печени и других тканях осуществляется под влиянием глюкокортикоидов и катехоламинов. Этот эффект адаптивных гормонов воспроизводится цАМФ [6]. Множественные формы ГК неодинаково реагируют на действие циклического нуклеотида: активность ГК-2 и ГК-3 снижается, а ГК-1 не изменяется [8]. Дальнейшее изучение регуляторной роли адаптивных гормонов выявило

возможность их кооперативного взаимодействия с липопротеидами высокой плотности (ЛПВП) и появление эффектов, не характерных для каждого отдельно взятого компонента. Так, кооперативный эффект адаптивных гормонов и ЛПВП проявляет себя в индукции синтеза глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ), хотя сами гормоны ингибируют активность фермента [9]. Показана также важная роль кооперативного эффекта в индукции синтеза белка в печени [5].

Продолжая ранее начатые исследования, в данной работе мы предприняли попытку выяснить влияние гидрокортизона, адреналина и ЛПВП на активность множественных форм ГК в печени. Участие ЛПВП сравнивается с аналогичным влиянием липопротеидов низкой (ЛПНП) и очень низкой (ЛПОНП) плотности.

Методика. Работа выполнена на переживающих срезах печени крыс-самок Вистар массой 180—200 г. После декапитации животных печень извлекали, промывали холодным физиологическим раствором и готовили срезы толщиной 0,3 мм, которые инкубировали в кребс-рингер-бикарбонатном буфере pH 7,4, содержащем 2% альбумина, при 37°C и постоянном покачивании в течение 2 ч. Как показали предыдущие исследования, данные условия опытов позволяют сохранить свойства интактной ткани [6]. Для реализации кооперативного эффекта в среду инкубации добавляли  $3 \cdot 10^{-6}$  М гидрокортизон,  $10^{-6}$  М адреналин и один из подклассов липопротеидов плазмы — ЛПВП, ЛПНП или ЛПОНП — в количестве 0,2 мг белка на 1 мл инкубационной среды. В специальных исследованиях осуществляли разделение ЛПВП на ЛПВП<sub>2</sub> и ЛПВП<sub>3</sub> и оценивали вклад каждого из них в кооперативный эффект. Для выявления отдельных звеньев этого механизма использовали ингибиторный анализ. Для подавления ДНК-зависимого синтеза РНК добавляли в среду инкубации  $10^{-7}$  М актиномицин D, для оценки роли клеточной мембраны в передаче эффекта в клетку использовали ингибитор кластеризации — 10 мМ метиламин. Процессы внутриклеточного перемещения подавляли вибластином в концентрации  $10^{-6}$  М. Для ингибирования лизосомальных протеиназ использовали 10 мМ хлористый аммоний или 5—7 ЕД гордокса на 1 мл инкубационной среды. Два последних ингибитора применяли для того, чтобы показать участие лизосомальных ферментов в этом механизме.

Липопротеиды получали методом изоплотностного ультрацентрифугирования в растворе КВг на центрифуге «Srgipco L-75B» (США), диализировали в течение 1 сут против 0,05 М фосфатного буфера pH 7,4, приготовленного на физиологическом растворе [11].

После окончания инкубации срезы отмывали холодным физиологическим раствором. Гомогенат готовили в 0,04 М трис-НСl-буфере pH 7,4. В надосадочной фракции (20 000 g) определяли общую активность ГК при концентрации глюкозы 1 мМ с использованием Г-6-ФДГ в качестве вспомогательного фермента [12]. Активность выражали в наномолях НАДФН в 1 мин на 1 мг белка. Разделение изоферментов ГК проводили с помощью дискэлектрофореза в полиакриламидном геле [10]. Активность изоформ выражали в процентах от общей активности и в наномолях НАДФН в 1 мин на 1 мг белка.

Достоверность результатов оценивали с помощью критерия t Стьюдента для разностных вариационных рядов, имеющих одинаковое количество вариантов.

Результаты и обсуждение. Вклад множественных форм ГК в общую активность фермента в переживающих срезах печени составлял для ГК-1 45,6%, для ГК-2 36,7%, для ГК-3 17,7%. Добавление в среду инкубации адреналина и гидрокортизона приводило к снижению общей активности ГК на 28% преимущественно за счет ингибирования ГК-2 и ГК-3 (табл. 1). При этом процентное распределение активности множественных форм составляло соответственно 54, 32 и 14. Ранее нами было показано, что ингибирующее действие адаптивных гормонов связано с повыше-

Изменение общей активности ГК и активности изоферментного спектра ГК (в нмоль/мин·мг белка) в переживающих срезах печени после инкубации их с адреналином, гидрокортизоном, инсулином и ЛПВП

Условия опыта	Общая активность ГК	Активность		
		ГК-1	ГК-2	ГК-3
Контроль	3,00±0,22	1,37±0,09 (45,6)	1,10±0,12 (36,7)	0,53±0,06 (17,7)
А+Г	2,17±0,32*	1,17±0,15* (54)	0,70±0,13* (32)	0,30±0,06* (14)
ЛПВП	3,09±0,28	1,47±0,12	1,08±0,13	0,54±0,06
А+Г+ЛПВП	4,23±0,37*	1,93±0,18* (45,6)	1,54±0,16* (36,4)	0,76±0,08* (18)
А+Г+ЛПВП+инсулин	4,89±0,55**	2,23±0,21**	1,79±0,20**	0,86±0,10**
А+Г+ЛПВП+актиномицин D	2,78±0,25**	1,37±0,15** (49,2)	0,97±0,10** (34,9)	0,44±0,05** (15,8)
А+Г+ЛПВП+винбластин	2,73±0,29**	1,36±0,14**	0,95±0,15**	0,42±0,05**
А+Г+ЛПВП+гордокс	2,78±0,29**	1,31±0,16**	1,02±0,13**	0,45±0,05**
А+Г+ЛПВП+метиламин	2,34±0,24**	—	—	—
А+Г+ЛПВП+хлористый аммоний	2,44±0,23**	—	—	—

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3: А — адреналин, Г — гидрокортизон ( $n=10$ ); одна звездочка —  $p<0,05$  по отношению к контролю и срезам, инкубированным с гормонами, две —  $p<0,05$  по отношению к кооперативному эффекту. В скобках активность изоформ, выраженная в процентах от общей активности фермента.

нием содержания цАМФ в ткани печени и снималось белковым ингибитором цАМФ-зависимой протеинкиназы [6, 7]. Полностью механизм этого явления остался невыясненным. Возможно, он связан с повышением концентрации глюкозо-1,6-дифосфата — мощного ингибитора ГК.

Анализ кооперативного эффекта адреналина, гидрокортизона и ЛПВП в отношении множественных форм ГК в печени осуществлялся нами впервые. Оказалось, что ЛПВП модулируют действие адаптивных гормонов, приводя к повышению активности ГК на 41 % по отношению к контролю и на 95 % по отношению к действию одних гормонов. Увеличение общей активности фермента осуществлялось за счет всех множественных форм равномерно, так что соотношение активностей было практически таким же, как и в контроле, — соответственно 45,6, 36,4 и 18 %. Собственно ЛПВП, добавленные в среду инкубации без гормонов, не изменяли активности множественных форм ГК (см. табл. 1).

Повышение активности множественных форм ГК связано с усилением биосинтеза ферментного белка и снимается актиномицином D. Важную роль в индукции фермента играет система внутриклеточного перемещения. Дезинтеграция ее с помощью винбластина препятствовала реализации этого эффекта.

Ранее нами на переживающих срезах печени крыс в аналогичных условиях было показано, что кооперативный эффект адаптивных гормонов и ЛПВП развивается на фоне лимитированного протеолиза отдельных гистоновых белков, таких, как H1, H2A и H2B [2]. Это обусловлено транс-

локацией лизосомальных протеиназ в ядра клеток. В данном исследовании также показана заинтересованность лизосомальных ферментов в активации хроматина. Добавление в среду инкубации гордокса — ингибитора сериновых протеиназ или хлористого аммония, изменяющего pH внутри лизосом, препятствовало индукции множественных форм ГК. В последнем случае общая активность фермента составляла  $2,44 \pm 0,23$  нмоль/мин  $\times$  мг белка.

Модулирующее действие ЛПВП по отношению к адаптивным гормонам реализуется, вероятно, уже в клетке, куда липопротеиды проникают с помощью рецепторно обусловленного эндоцитоза. Этому предшествует формирование кластера на поверхности клеточной мембраны. Применение метиламина — ингибитора транскламиназы, принимающей участие в процессах кластеризации, предотвращало повышение активности ГК. В этом случае ее активность составляла  $2,3 \pm 0,24$  нмоль/мин·мг белка. В последнее время удалось выявить и активное начало ЛПВП. Им оказался апо-A1 — основной белок ЛПВП. Он был обнаружен нами с помощью иммуоферментного метода во фракции транскрипционно-активного хроматина печени [4].

Известно, что инсулин играет роль контргормона по отношению как к глюкокортикоидам, так и к катехоламинам. Например, было показано, что инсулин препятствует повышению содержания цАМФ в печени, обусловленному действием гидрокортизона и адреналина [3]. Однако в механизме, обусловленном кооперативным эффектом, инсулин проявляет себя как синергист адаптивных

Таблица 2

Влияние адаптивных гормонов и ЛПВП<sub>1</sub> и ЛПВП<sub>2</sub> на общую активность ГК и активность изоферментного спектра (в нмоль/мин·мг белка) в переживающих срезах печени крыс

Условия опыта	Общая активность ГК	Активность		
		ГК-1	ГК-2	ГК-3
Контроль	3,28±0,42	1,80±0,04	0,98±0,02	0,50±0,04
А+Г+ЛПВП <sub>2</sub>	3,34±0,48	1,88±0,06	0,94±0,04	0,52±0,02
А+Г+ЛПВП <sub>3</sub>	3,72±0,58*	2,02±0,08*	1,12±0,04*	0,58±0,04*

Влияние адаптивных гормонов, ЛПВП и ЛПОНП на общую активность ГК и активность изоферментного спектра (в имоль/мин·мг белка) и переживающих срезах печени крыс

Условия опыта	Общая активность ГК	Активность		
		ГК-1	ГК-2	ГК-3
Контроль	3,54±0,45	1,61±0,18	1,30±0,24	0,63±0,12
ЛПОНП	3,84±0,33	1,76±0,13	1,41±0,17	0,66±0,10
А+Г+ЛПОНП	3,2±0,58	1,48±0,23	1,21±0,31	0,59±0,16
ЛПВП	4,02±0,36	1,84±0,15	1,42±0,20	0,69±0,11
А+Г+ЛПВП	3,6±0,27	1,67±0,11	1,34±0,15	0,62±0,08

гормонов (см. табл. 1). Это указывает на совершенно иную природу данного механизма, неизвестного ранее.

Из двух подклассов ЛПВП только ЛПВП<sub>3</sub> принимают участие в кооперативном эффекте, ЛПВП<sub>2</sub> не оказывают влияния на действие адаптивных гормонов (табл. 2). Эти различия говорят о высокой специфичности ЛПВП<sub>3</sub>, которая осталась неясна. Возможно, она связана с присутствием в них лецитинхолестеринацилтрансферазы, которая приводит к структурным изменениям липопротеидов, вызывающим освобождение апо-А1. Не оказывали влияния на действие адаптивных гормонов ЛПНП и ЛПОНП (табл. 3).

Таким образом, описан новый механизм индукции ГК в печени, обусловленный кооперативным взаимодействием ЛПВП<sub>3</sub> и адаптивных гормонов. Он связан с повышением активности всех множественных форм фермента. Известный механизм инсулиновой индукции изоферментов ГК приводит к повышению активности только ГК-2 [1]. В условиях кооперативного эффекта инсулин способствовал повышению активности всех множественных форм ГК в печени. Глюкокортикоиды и катехоламины ингибируют фермент. Кроме того, глюкокортикоиды рассматривают как супрессоры синтеза фермента в печени. По-видимому, кооперативный эффект ЛПВП и адаптивных гормонов является выражением процессов восстановительной регенерации, имеющей место в период после прекращения действия на организм чрезвычайного раздражителя. Он связан с усилением биосинтеза множества белков, в том числе и изоферментов ГК.

Таким образом, по нашим данным, адреналин и гидрокортизон в переживающих срезах печени крыс снижают общую активность ГК за счет ингибирования ГК<sub>2</sub> и ГК<sub>3</sub>.

Обнаружен кооперативный эффект адреналина, гидрокортизона и ЛПВП, в результате которого наблюдается повышение активности ГК, обусловленное индукцией синтеза всех множественных форм фермента. Специфическую роль в нем играют ЛПВП<sub>3</sub>, тогда как ЛПВП<sub>2</sub>, ЛПНП и ЛПОНП влияния не оказывают. Индукция ГК под влиянием ЛПВП и адаптивных гормонов подавляется ингибитором кластеризации, внутриклеточного перемещения, лизосомальных протеиназ, что указывает на сложную природу исследованного явления.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Мертвцов Н. П. Гормональная регуляция экспрессии генов.— М., 1986.
2. Панин Л. Е. // Вопр. мед. химии.— 1987.— № 5.— С. 96—102.
3. Панин Л. Е., Колосова И. Е. // Пробл. эндокринологии.— 1985.— № 3.— С. 69—73.

4. Поляков Л. М., Кузьменко А. П., Потерьева О. П. и др. // Структура и функции клеточного ядра.— М., 1990.— С. 149.
5. Панин Л. Е., Маянская Н. П. Лизосомы: роль в адаптации и восстановлении.— Новосибирск, 1987.
6. Панин Л. Е., Третьякова Т. А. // Бюл. экспер. биол.— 1978.— № 11.— С. 521—525.
7. Панин Л. Е., Третьякова Т. А. // Там же.— 1981.— № 8.— С. 37—39.
8. Панин Л. Е., Третьякова Т. А., Русских Г. С., Войцеховская Е. Э. // Вопр. мед. химии.— 1982.— № 2.— С. 26—30.
9. Панин Л. Е., Филатова Т. Г. // Пробл. эндокринологии.— 1986.— № 4.— С. 69—71.
10. Шурда Г. Г., Панин Л. Е. // Вопр. мед. химии.— 1978.— № 2.— С. 282—285.
11. Hatch F. T., Zees R. S. // Advanc. Lipid Res.— 1968.— Vol. 6.— P. 2—68.
12. Katzen H. M., Soderman D. D., Wiley C. E. // J. biol. Chem.— 1970.— Vol. 245, N 16.— P. 4081—4096.

Поступила 14.03.91

#### COOPERATIVE EFFECT OF HYDROCORTISONE, ADRENALINE AND HIGH DENSITY LIPOPROTEINS IN REGULATION OF MULTIPLE HEXOKINASE FORMS IN LIVER TISSUE.

L. E. Panin, G. S. Russkikh, N. V. Aluchina, T. A. Tretyakova

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

High density lipoproteins (HDL) were shown to modulate the effect of hydrocortisone and adrenaline on activity of hexokinase in surviving liver tissue slices. The hormones inhibited the enzymatic activity while in presence of HDL the hormones exhibited an opposite effect. The phenomenon observed was termed a "cooperative effect"; it could not be reproduced by any single components of the system studied. Mechanism of the effect involved induction of all the multiple hexokinase forms which was abolished by actinomycin D. A specific function could be ascribed only to HDL<sub>3</sub>; HDL<sub>2</sub>, low and very low density lipoproteins did not exhibit any effects. The cooperative effect of HDL and of the adaptive hormones was also inhibited in the surviving liver tissue slices by vinblastine, gordox and methylamine thus demonstrating the sophisticated nature of the mechanism.

В. Е. Рябинин, Р. И. Лифшиц

## ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ ИНСУЛИНА ПРИ ТЕРМИЧЕСКИХ И КОМБИНИРОВАННЫХ РАДИАЦИОННО-ТЕРМИЧЕСКИХ ПОРАЖЕНИЯХ И ИНСУЛИНМОДУЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ СРЕДНОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПЕПТИДОВ КРОВИ

Челябинский медицинский институт

Важным фактором регуляции метаболизма в динамике патологических изменений является уровень инсулина в организме. Некоторые заболевания, например, ожирение, инсулиннезависимый диабет, голодание, ацидоз и др., характеризуются повышенной концентрацией инсулина в плазме и нормальным или повышенным содержанием глюкозы [5]. Аналогичные данные были получены при изучении ожоговой болезни и комбинированных поражений [9, 10, 12, 13, 15], что может указывать на относительную инсулярную недостаточность, связанную с уменьшением порога чувствительности периферических тканей к инсулину с соответствующей стимуляцией В-клеток поджелудочной железы, дополнительного синтеза и выброса в кровь инсулина. Согласно другим данным [11, 14], в первые сутки после термической травмы происходит снижение, а в последующие сроки — увеличение содержания иммунореактивного инсулина (ИРИ). В некоторых исследованиях [2, 3] обнаружено снижение сокращения ИРИ у легкообожженных пациентов и отсутствие достоверных изменений у больных с термическими ожогами 20—49 % поверхности тела в период шока. В последующие периоды заболевания уровень ИРИ медленно нарастал, приближаясь к контрольному [3], или резко уменьшался у тяжелообожженных в период токсемии [2]. Отмечается, что нарушение гомеостаза глюкозы при легких ожогах связано преимущественно с увеличением резистентности к инсулину, тогда как у больных с тяжелыми ожогами важную роль играет гиперглюкагонемия. Многие исследователи считают, что резистентность к инсулину является следствием дефекта клеток-мишеней на рецепторном и пострецепторном уровнях, что приводит к толерантности к глюкозе и ослабленному ответу на действие гормона.

В настоящей работе исследуется влияние термической травмы и комбинированного радиационно-термического поражения (КРТП) на содержание инсулина в плазме крови и рассматривается инсулинмодулирующее действие средномолекулярных пептидов (СМП) крови.

Методика. Термический ожог IIIa—IIIб степени (10—12 % дезинфицированной поверхности тела) наносили белым беспородным мышам под эфирным наркозом с помощью кварцево-галогеновой лампы. Облучение животных проводили за 15—20 мин до нанесения ожога на установке ИГУР <sup>137</sup>Cs в дозе 3,4 Гр при мощности дозы 1 сГр/с. Подобное моделирование КРТП соответствует травме средней тяжести и рекомендуется для изучения особенностей метаболизма [7].

Выделение средномолекулярных компонентов плазмы крови осуществляли с помощью последовательной ультрафильтрации на мембранных фильтрах УАМ-400, УАМ-150 и УАМ-50 («Владинор»). Ультрафильтрат, сконцентрированный на мембранах УАМ-50, наносили на колонку с сепадексом G-15 (5,6×50 см). Элюцию проводили дистиллированной водой со скоростью 80—90 мл/ч при помощи перистальтического насоса, оптическую плотность элюата регистрировали на «Увикорде» (LKB, Швеция) при длине волны 206 нм с помощью одноканального самописца.

Определение содержания инсулина в плазме крови экспериментальных животных и больных с термическими ожогами проводили радиоиммунным способом с использованием наборов, выпускаемых Минским институтом биорганической химии. Содержание глюкозы в крови определяли гексокиназным методом с использованием наборов фирмы «Boehringer» (Германия). Данные всех экспериментов обрабатывали методом вариационной статистики с использованием таблиц Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Исследования показали, что нанесение экспериментальным животным термического ожога приводит к достоверному увеличению по сравнению с контролем ( $4,6 \pm 0,3$  ммоль/л) концентрации глюкозы в плазме крови ( $10,2 \pm 0,6$  ммоль/л) через сутки после травмы, некоторому снижению гипергликемии на 3-и сутки ( $7,1 \pm 0,8$  ммоль/л) и повторному повышению концентрации глюкозы через 7 дней после ожога ( $9,6 \pm 0,6$  ммоль/л).

Изучение содержания глюкозы у больных с термической травмой связано с определенными трудностями, так как проводится на фоне интенсивной терапии, включающей, как правило, инсулино-терапии совместно с инфузией растворов глюкозы. Поэтому не вызывает удивления тот факт, что как у больных с тяжелой термической травмой (индекс Франка больше 60), так и у легкообожженных в условиях комплексного лечения был обнаружен нормальный уровень глюкозы в крови ( $3,65 \pm 3,83$  ммоль/л). В то же время содержание инсу-

Таблица 1

Содержание инсулина (в мкЕД/л) у больных с термической травмой и у экспериментальных животных в различные периоды ожоговой болезни и КРТП

номер фракции	Больные с термической травмой		Экспериментальные животные			
	индекс Франка	инсулин, мкЕД/л	термический ожог		КРТП	
			сутки после воздействия	инсулин, мкЕД/л	сутки после воздействия	инсулин, мкЕД/л
1	10—20 (n=8)	$55,5 \pm 8,8$	Контроль (n=8)	$36,2 \pm 4,2$		$20,7 \pm 1,0$
2	60—100 (n=18)	$103,0 \pm 19,5$ $p < 0,02$	1-с (n=6)	$92,8 \pm 10,2$ $p < 0,001$		$24,7 \pm 0,4$ $p < 0,05$
			4-с (n=6)	$52,5 \pm 3,1$ $p < 0,01$	7-с (n=12)	$19,8 \pm 1,2$
3	100 (n=4)	$20,4 \pm 6,6$	7-с (n=6)	$52,3 \pm 10,3$	14-с (n=12)	$17,0 \pm 1,2$ $p < 0,05$

Таблица 2

Влияние внутривенного введения СМП (2—3 мкг/г) на концентрацию инсулина в плазме крови мышей

Источник СМП	Номер фракции СМП		
	2	3	4
Кровь здоровых животных	16,2±4,2	10,3±5,3	12,7±3,8
Кровь обожженных животных	5,8±2,4	18,3±2,1	9,2±4,2
		$p < 0,01$	
Кровь животных после КРТП	9,8±1,6	5,7±1,5	5,3±0,9

Примечание. Содержание инсулина в плазме крови здоровых мышей составляет  $8,6 \pm 1,7$  мкЕД/л ( $n=6$ ). Число животных в каждой группе равно 12.

лина в крови у тяжелообожженных в стадии ожоговой токсемии было почти в 2 раза выше, чем у легкообожженных, а у больных, находящихся в крайне тяжелом состоянии, содержание гормона оказалось в 2,5 раза меньше, чем у больных с легкой формой ожоговой болезни (табл. 1).

Экспериментальные исследования позволили установить, что наряду с отмечающейся в первую неделю у обожженных животных гипергликемией наблюдается существенное увеличение концентрации инсулина (см. табл. 1). После КРТП отмечается достоверное увеличение концентрации инсулина в плазме крови животных через сутки после травмы и постепенное снижение содержания гормона к 14-м суткам эксперимента.

Как известно, проявление биологического эффекта инсулина является функцией концентрации свободного гормона, свободного рецептора и сродства гормона к рецептору. Одной из причин наблюдаемой гипергликемии и гиперинсулинемии в определенные периоды ожоговой болезни и КРТП может быть нарушение инсулинрецепторного или пострецепторного взаимодействия на уровне клеток-мишеней. Изучение взаимодействия инсулина с его рецепторами в плазматических мембранах лимфоцитов при термической травме у крыс показывает уменьшение инсулинрецепторного взаимодействия через 1 сут и особенно через 3 сут после травмы [6, 8]. Сродство рецепторов к инсулину может уменьшаться вследствие кооперативных взаимодействий между субъединицами рецептора или уменьшения числа рецепторов из-за нарушения их синтеза и ускорения деградации [5].

Нарушение сродства инсулина к рецепторам может быть следствием различных причин, в том числе и результатом конкурентных отношений гормона с некоторыми химическими соединениями. Особое внимание при этом привлекают среднемолекулярные пептиды (СМП) крови, являющиеся важным фактором развития метаболических и токсических расстройств при ожоговой болезни и КРТП [1]. Внутривенное введение мышам выделенных нами наиболее активных в биологическом отношении фракций СМП из крови здоровых и обожженных животных показало, что через 20 мин после инъекции уровень ИРИ оставался в пределах нормы, за исключением фракции № 3 от обожженных животных, действие которой приводит к увеличению более чем в 2 раза содержания ИРИ (табл. 2). Отсутствие эффекта при введении большинства фракций СМП может быть следствием быстрого протеолиза, деградации и последующей элиминации пептидных компонентов, входящих в их состав. О принципиальной возможности

таких реакций свидетельствуют накопление радиоактивной метки в микросомной фракции печени уже через 2 мин после введения  $^{125}\text{I}$ -инсулина и короткий период его полуэлиминации (6—8 мин) [4]. Однако нельзя исключать и того, что постоянная и повышенная продукция СМП в посттравматический период, продемонстрированная в некоторых исследованиях [1], может превышать скорость их распада и создавать необходимые условия для реализации их действия. Проведенные нами исследования показали, что с увеличением тяжести ожога в период токсемии повышается не только уровень ИРИ, но и содержание СМП (табл. 3). Отсутствие в некоторых экспериментах повышения концентрации СМП в крови не исключает возможность латентного усиления интенсивности процессов образования СМП после травмы и последующего взаимодействия этих пептидных фракций с мембранами эритроцитов, рецепторами инсулина и др. Таким образом, реальная концентрация СМП будет складываться из свободных и связанных пептидов. Можно предположить, что любые воздействия, способствующие освобождению СМП, например, из комплекса с рецепторами, могут привести к увеличению концентрации СМП. Это предположение базируется на том, что для максимального биологического эффекта необходима занятость лишь 2 % рецепторов [5], т. е. существуют «запасные» рецепторы, способные служить в качестве депо СМП при усилении интенсивности их образования.

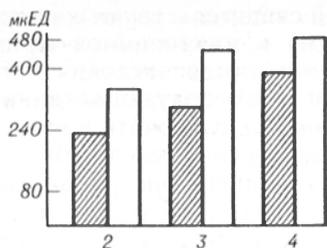
О потенциальной возможности СМП взаимодействовать с рецепторами инсулина свидетельствуют данные специальных экспериментов, когда в стандартную инкубационную среду для определения ИРИ вместо исследуемой крови были добавлены возрастающие концентрации исследуемых фракций СМП из крови обожженных животных (см. рисунок). Оказалось, что все фракции СМП примерно в равной степени обладали высоким сродством к антисыворотке инсулина. Это свидетельствует о принципиальной возможности конкурентного взаимодействия эндогенно образующихся СМП с инсулином за рецепторные участки клеточных мембран. В свою очередь увеличение концентрации инсулина в крови может привести к уменьшению числа рецепторов по принципу «отрицательной кооперативности» в связи с увеличением скорости диссоциации гормона из комплекса

Таблица 3

Уровень СМП у больных с термическими ожогами разной степени тяжести

Больные с термической травмой	Индекс Франка	Время после ожога, сут	Концентрация СМП, усл. ед. опт. пл.
И.	60	7	0,265
М.	75	7	0,210
Л.	90	7	0,470
Ив.	105	4	0,636
Ф.	105	2	0,600
П.*	120	6	1,180
III.*	120	7	1,300

Примечание. Звездочка — случаи с летальным исходом.



Влияние СМП из крови крыс с термической травмой на связывание  $^{125}\text{I}$ -инсулина с антисывороткой.

2, 3, 4 — фракция СМП. Заштрихованные столбики — 20–30 мкг/мл, незаштрихованные — 40–60 мкг/мл пептидов. Представлены средние данные 3–4 измерений.

инсулин — рецептор. Таким образом, величина инсулинорезистентности в определенные периоды ожоговой болезни и КРТП может находиться в прямой зависимости от уровня СМП в крови.

В целях коррекции этого состояния обоснованным можно считать проведение гемокарбонперфузии, способствующей элиминации СМП, и внутривенное введение глюкозы с гиперкоррекцией инсулина, снимающее конкурентное ингибирование среднмолекулярными пептидами инсулиновых рецепторов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Вальдман Б. М., Волчегорский И. А., Хишиво А. П., Пужевский А. С. // Ожоговая токсемия: Современные проблемы патогенеза и клиники. — Челябинск, 1986. — С. 6—20.
2. Голиков П. П., Бобкова А. С., Потапова С. И. // Клини. мед. — 1981. — № 3. — С. 99—103.
3. Голиков П. П., Герасимова Л. И. // Нарушения гомеостаза и их коррекция при ожоговой травме. — М., 1982. — С. 126.
4. Кусень С. И., Стойка Р. С. Молекулярные механизмы в действии полипептидных факторов роста. — М., 1985.
5. Леви Дж. Взаимодействие гормонов с рецепторами: Пер. с англ. — М., 1979.
6. Микаелян Н. П. // Вопр. мед. химии. — 1988. — № 5. — С. 96—99.
7. Моделирование комбинированных радиационно-термических поражений: (Метод. рекомендации). — Обнинск, 1980.
8. Моренкова С. А., Карелин А. А., Давлетов Э. Г. // Пат. физиол. — 1985. — № 1. — С. 26—28.
9. Сащенко В. А., Тюкина А. А. // Современные средства первой помощи и методы лечения ожоговой болезни. — М., 1986. — С. 173.
10. Шурыгин Д. Я., Мазуров В. И., Федоров Ю. П. // Воен.-мед. журн. — 1977. — № 12. — С. 36—38.
11. Chance W. T., Nelson J. L., Kim M. et al. // J. Trauma. — 1987. — Vol. 27, N 5. — P. 503—509.
12. Chomas R., Aikawa N., Burke J. F. // Surgery. — 1979. — Vol. 86, N 5. — P. 742—747.
13. Farook J., David H. N., Wolfe R. R. // J. clin. Invest. — 1986. — Vol. 78, N 3. — P. 807—814.
14. Heath D. F. // Homeostasis Injury and Shock. — Budapest, 1981. — P. 63—70.
15. Shuck J. M., Eaton P., Shuch L. W. et al. // J. Trauma. — 1977. — Vol. 17, N 9. — P. 706—713.

Поступила 09.10.91

ALTERATION OF INSULIN CONTENT IN THERMAL AND COMBINED RADIATION-THERMAL BURNS AND THE INSULIN MODULATING ACTIVITY OF BLOOD MEDIUM-WEIGHT MOLECULAR PEPTIDES

V. E. Ryabinin, R. I. Lifshits

Medical Institute, Chelyabinsk.

Experimental and clinical studies demonstrated the occurrence of insulin resistance within the initial period of burns and combined radiation-thermal impairment as well as during the burns produced toxemia. Blood medium-weight molecular peptides may be essential in the regulation of insulin content as they exhibited a high affinity for insulin antiserum and were able to cause competitive interaction with insulin for the receptor sites of cell membranes.

© В. И. ПАЛАМАРЧУК, Н. И. НИКОЛАЕНКО, 1993

УДК 615.356:577.161.2].015.4:[612.419+612.111/.112].076.9

В. И. Паламарчук, Н. И. Николаенко

#### ВЛИЯНИЕ ВИТАМИНА D НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ КРОВЕТВОРНЫХ КЛЕТОК, СОДЕРЖАНИЕ ЛИМФОЦИТОВ И ДРУГИХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА И ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У МЫШЕЙ

Институт ядерных исследований АН Украины, Институт проблем онкологии им. Р. Е. Кавецкого АН Украины, Киев

Известно, что витамин D, введенный в организм животных или образовавшийся в коже из 7-дегидрохолестерина фитохимическим или другим путем, в печени и почках претерпевает ряд последовательных превращений с образованием биологически активных метаболитов, выполняющих в организме важные специфические функции [2, 3, 8, 10, 12, 18—20]. Главный из них — гормон 1,25-дигидроксивитамин D<sub>3</sub> [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] — не только участвует в поддержании кальций-фосфорного гомеостаза в организме, но и является мощным регулятором пролиферации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток, в частности лимфоцитов, клеток моноцитарно-макрофагального ряда, продукции и секреции гормонов [4—7, 8, 15]. Он также оказывает нормализующее действие на фенотипические и функциональные особенности некоторых типов лейкозных клеток [6].

Механизм действия витамина D<sub>3</sub> в организме как гормона в основном ясен, а его рецепторы обнаружены в большинстве тканей [4, 5, 8, 12].

В то же время в условиях достаточной обеспеченности витамином D и нормокальциемии в почках синтезируется преимущественно альтернативный метаболит — 24,25-дигидроксивитамин D<sub>3</sub> [24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] [9, 15]. Его образование из 25-оксивитамина D<sub>3</sub> (25OHD<sub>3</sub>) стимулируется 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, гиперкальциемией и гиперфосфатемией [12, 13]. Роль альтернативного метаболита 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> полностью не выяснена. Этот метаболит удовлетворяет некоторым критериям гормона и обладает стимулирующей активностью в отношении образования и минерализации костной ткани [8, 9]. 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, особенно в сочетании с 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, проявляет высокую эффективность при профилактике и лечении экспериментальной патологии [9]. Обнаружение специфических рецепторов этого метаболита в некоторых тканях, в частности эмбриональных, установление особенностей изменения транскрипции генов и продукции белков под его влиянием, выявление модулирующего действия этого метаболита на рецепторное связывание 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>

Таблица 1

Изменение показателей костномозгового кроветворения у нормальных мышей линии BALB/c после введения витамина D<sub>3</sub>

Клетки костного мозга (10 <sup>9</sup> /л)	Контроль	Витамин D <sub>3</sub>
Общее количество миелокариоцитов	15,60±0,7	10,25±0,55*
Незрелые нейтрофилы	0,11±0,01	0,67±0,14*
Зрелые нейтрофилы	5,05±0,46	3,75±0,41*
Общее количество гранулоцитов	5,92±0,53	4,90±0,41
Моноциты	0,15±0,05	0,51±0,02*
Лимфоциты	4,28±0,44	3,18±0,36
Эритроидные клетки	2,48±0,56	0,76±0,11*

Примечание. Здесь и в табл. 2 звездочка — статистически достоверные различия между показателями ( $p < 0,05$ ).

[8, 9, 11] позволяют обсуждать возможный механизм действия 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> в организме.

В задачу настоящего исследования входило изучение влияния витамина D<sub>3</sub> в повышенных дозах на дифференцировку кроветворных клеток, содержание лимфоцитов и других клеток костного мозга и периферической крови у интактных мышей.

**Методика.** Исследования проведены на 28 мышах линии BALB/c и 20 гибридах BALB/c×C57Bl, полученных с экспериментальной базы Института проблем онкологии им. Р. Е. Кавецкого АН УССР. Масса тела животных 20—22 г. В работе использовали синтетический витамин D<sub>3</sub>, растворенный в масле. Этот препарат вводили перорально троекратно. Разовая доза составляла 3000 МЕ. Контрольным животным вводили только масло. Материалом для исследования служили клетки костного мозга, периферической крови и селезенки мышей. Показатели периферической крови определяли с помощью стандартных гематологических методов. При исследовании костного мозга содержание миелокариоцитов пересчитывали на объем бедренной кости. В окрашенных по Романовскому—Паппенгейму мазках подсчитывали миелограмму. Для изучения действия витамина D<sub>3</sub> на полипотентные стволовые кроветворные клетки костного мозга мышей применяли метод функционального их выявления по определению количества селезеночных колоний (КОЕ<sub>с</sub>) по известному методу [21]. Статистическую обработку полученных данных производили на ЭВМ СМ-3 с использованием соответствующих программ.

**Результаты и обсуждение.** В результате проведенных исследований было обнаружено, что содержание стволовых кроветворных клеток (КОЕ<sub>с</sub>) (на 10<sup>5</sup> введенных клеток костного мозга) у мышей линии BALB/c после введения витамина D<sub>3</sub> в указанных выше дозах составляет в контроле 23,60±2,75, а в опыте 34,70±4,73. Это свидетельствует о некотором усилении колониобразующей способности клеток костного мозга интактных мышей под влиянием повышенных доз витамина D<sub>3</sub>.

Изучение гемограмм и миелограмм показало, что введение витамина D<sub>3</sub> в таких дозах вызывает незначительную лейкопению, а также некоторое снижение общего содержания клеток костного мозга у мышей (табл. 1).

Кроме того, отмечается повышение числа незрелых нейтрофилов в костном мозге животных, получавших витамин D<sub>3</sub>. Однако общее содержание гранулоцитов как в крови (табл. 2), так и в костном мозге (см. табл. 1) практически не изменяется по сравнению с контрольными значениями.

В то же время следует отметить, что введение витамина D<sub>3</sub> вызывает существенную стиму-

ляцию моноцитопоеза, о чем свидетельствует повышение содержания моноцитов в костном мозге и периферической крови исследуемых животных (см. табл. 1 и 2). Вероятно, витамин D<sub>3</sub>, вводимый в указанных дозах, стимулирует дифференцировку моноцитов.

Изучение костномозгового кроветворения у мышей показало, что высокие дозы витамина D<sub>3</sub> вызывают уменьшение эритроидного роста костного мозга (см. табл. 1). При этом отмечается также тенденция к снижению числа лимфоцитов в костном мозге и крови исследуемых животных, что подтверждает известные данные об иммуносупрессивном действии массивных доз витамина D [7, 16, 17, 22].

Рассматривая возможный механизм действия повышенных доз витамина D<sub>3</sub> в организме интактных животных, отметим, что факт участия гормона 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> в стимуляции роста и дифференцировки полипотентных костномозговых клеток, а также в усилении процесса образования макрофагальных (но не гранулоцитарных) колоний в стимуляции как пролиферации, так и фагоцитарной активности мононуклеаров [4—6] не вызывает сомнений.

Однако из литературных данных [9, 15] известно, что при введении избыточных количеств витамина D<sub>3</sub> интактным животным, обеспеченным этим витамином, концентрация гормональной формы витамина D<sub>3</sub> — 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> — в организме не возрастает, а образуется преимущественно альтернативный метаболит — 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> и продукты его дальнейших превращений [9].

Поэтому можно допустить, что эффект усиления колониобразующей способности клеток костного мозга, а также моноцитопоеза интактных животных под влиянием избыточных количеств витамина D<sub>3</sub> обусловлен реализацией специфических функций метаболита 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, образующегося в организме. При анализе механизмов, лежащих в основе регуляторного действия 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> на процессы дифференцировки кроветворных клеток, следует принять во внимание его свойство в почках превращаться в 1,24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, который имеет сродство к рецепторам 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, только в несколько раз ниже, чем сам гормон [8, 9], а также способность 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> в высоких концентрациях стимулировать увеличение концентрации клеточных рецепторов 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, как это было показано в опытах *in vitro* в культуре фибробластов [11]. Важно заметить, что 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (диоксивит) [9] показал высокую эффективность в лечении нарушений обмена Ca и иммунитета при

Таблица 2

Изменение показателей периферической крови у мышей линии BALB/c после введения витамина D<sub>3</sub>

Клетки крови (10 <sup>9</sup> /л)	Контроль	Витамин D <sub>3</sub>
Общее количество лейкоцитов	8,42±0,41	7,74±0,79
Палочкоядерные нейтрофилы	0,58±0,08	0,33±0,03*
Сегментоядерные нейтрофилы	1,53±0,11	1,03±0,2*
Эозинофилы	0,12±0,03	0,06±0,01*
Моноциты	0,32±0,05	0,94±0,14*
Лимфоциты	5,73±0,3	5,18±0,82

заболеваниях почек в стадии хронической почечной недостаточности. Необходимо указать, что биологические эффекты метаболитов витамина D<sub>3</sub> — 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 25OHD<sub>3</sub>, 25,26(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> — в значительной степени обуславливаются их аффинностью в отношении рецептора 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> [5, 6, 8, 14]. Иммунотропной активностью обладает не только гормональная форма витамина D<sub>3</sub>, но и 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, как это было впервые показано ранее [1]. Не исключена возможность, что для оптимальной регуляции процессов пролиферации и дифференцировки полипотентных костномозговых клеток, иммунокомпетентных клеток моноцитарно-макрофагального ряда необходимо совместное действие по крайней мере двух основных дигидроксилированных метаболитов витамина D — 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> и 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Такое взаимодействие указанных метаболитов возможно на уровне клеточных рецепторов [5, 6, 9].

Таким образом, можно заключить, что влияние повышенных доз витамина D<sub>3</sub> на гемопоэз нормальных мышей проявляется в некоторой стимуляции кроветворения, в основном за счет усиления моноцитопоэза и в незначительной степени гранулоцитопоэза, а также в выраженной тенденции к угнетению лимфоцитопоэза.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бабарыкин Д. А., Смильниекс Э. Х., Валинище М. Ю., Бауман В. К. // *Вопр. мед. химии.*— 1988.— № 6.— С. 82—86.
2. Вендт В. П. // *Витамины. Химия и биохимия витамина D и его применение.*— Киев, 1971.— Вып. 6.— С. 5—22.
3. Паламарчук В. И., Вендт В. П. // *Укр. биохим. журн.*— 1969.— Т. 32, № 3.— С. 201—203.
4. Плецитый К. Д. // *Вопр. мед. химии.*— 1988.— № 5.— С. 9—14.
5. Плецитый К. Д. // *Там же.*— 1990.— № 5.— С. 2—4.
6. Плецитый К. Д. // *Там же.*— № 6.— С. 51—56.
7. Плецитый К. Д., Сухих Г. Т., Давыдов Т. В., Евсеев В. А. // *Бюл. экспер. биол.*— 1987.— № 8.— С. 203—204.
8. Сергеев И. Н. // *Вопр. мед. химии.*— 1989.— № 1.— С. 2—11.
9. Сергеев И. Н., Плецитый К. Д., Руснак Ф. И., Спиричев В. Б. // *Там же.*— 1990.— № 4.— С. 17—20.
10. Спиричев В. Б. // *Вестн. АМН СССР.*— 1986.— № 11.— С. 84—90.
11. Costa E., Hirst M. A., Feldman D. // *Endocrinology.*— 1985.— Vol. 117.— P. 2203—2210.
12. De Luca H. F. // *Monogr. Endocr.*— 1979.— Vol. 13.— P. 1—80.
13. De Luca H. F., Paaren H. E., Schnoes H. K. // *Top. Cum. chem.*— 1979.— Vol. 93.— P. 1.
14. Haussler M. R. // *Ann. Rev. Nutr.*— 1986.— Vol. 6.— P. 527—562.
15. Henry H. J., Norman A. W. // *Ann. Rev. Nutr.*— 1984.— Vol. 4.— P. 493—520.
16. Koren R., Ravid A., Rotem C. et al. // *FEBS Lett.*— 1986.— Vol. 205.— P. 113—116.
17. Lemire J. M., Adams J. S., Sakal R., Jordan S. C. // *J. clin. Invest.*— 1984.— Vol. 74.— P. 657—661.
18. Massry S. G. // *Amer. J. clin. Nutr.*— 1980.— Vol. 33.— P. 1530—1535.
19. Norman A. W., Roth J., Orci L. // *Endocr. Rev.*— 1982.— Vol. 3.— P. 331—366.
20. Somjen D., Binderman J. et al. // *Biochem. J.*— 1983.— Vol. 214.— P. 293—298.
21. Till J. E., McCulloch E. A. // *Radiat. Res.*— 1961.— Vol. 14, N 1.— P. 213—222.
22. Tsoukas C., Prowedini D. M., Manolagas S. C. // *Science.*— 1984.— Vol. 224.— P. 1438—1440.

Поступила 10.10.91

#### EFFECT OF VITAMIN D ON DIFFERENTIATION OF HEMOPOIETIC CELLS, ON CONTENT OF LYMPHOCYTES AND OTHER CELLS IN MICE BONE MARROW AND PERIPHERAL BLOOD

V. I. Palamarchuk, N. I. Nikolaenko

Institute of Nuclear Investigations, R. E. Kavetsky Institute of Oncological Problems, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Effect of vitamin D administered thrice in a dose of 3,000 IU per injection, on hemopoiesis in healthy mice was expressed as a slight moderate stimulation of hemopoiesis, mainly due to an increase in content of monocytes and only slightly of granulocytes while lymphocytopoiesis was distinctly inhibited.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.379-008.64-092.9-085:356:577.161.1

Б. А. Кудряшов, А. М. Ульянов, Ю. А. Тарасов

#### ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ВИТАМИНА А, НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕГО РАЗВИТИЕ В ОРГАНИЗМЕ ЖИВОТНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИНСУЛИНЗАВИСИМОГО ДИАБЕТА

Московский университет им. М. В. Ломоносова

В 1988 г. было опубликовано, что в нашей стране за последние 10 лет число больных сахарным диабетом увеличилось в 2 раза [1]. В настоящее время проблема диабета стала одной из острых в современной медицине.

Явление роста заболеваемости диабетом свидетельствует о возникновении определенных условий, способствующих понижению резистентности организма к факторам риска, провоцирующим диабет. В связи с этим возник вопрос о возможном значении изменения характера питания в развитии указанного явления. Известно, что при инсулинзависимом диабете в организме животных [7, 8] и людей [9] и при гиповитаминозе А у животных [3] возникает одно и то же явление — депрессия функции противосвертывающей системы. Упомянутые обстоятельства послужили основанием для экспериментального изучения влияния пищевого фактора — витамина А — на процесс возникновения инсулинзависимого диабета у животных.

Методика. Работа была проведена на 140 беспородных самцах крыс массой 250—300 г. Диабет вызывали путем внутривенного введения аллоксана (фирма «Спофа», Чехо-Словакия) в дозе 40,0 мг/кг в 0,85 % растворе NaCl. Взятие крови осуществлялось из яремной вены. Кровь стабилизировали 3,8 % раствором цитрата натрия в соотношении 9:1. Определение сахара в крови производили методом [2]. Активность естественного диабетогенного фактора устанавливали методом [6]. Уровень содержания гепарина в крови определяли по методу [11]. Для внутрижелудочного введения зондом витамина А использовали коммерческий препарат ретинола ацетат, содержащий в 1 мл масляного раствора 100 000 МЕ витамина А. В эксперименте был использован синтетический рацион [10], не содержащий витамина А. Результаты опытов подвергли статистической обработке по методу Фишера—Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Предварительные эксперименты были проведены на крысах, находившихся на естественном лабораторном рационе.

Выжившие животные (А) и сохранившие нормальный уровень сахара в крови (Б) после внутривенного введения аллоксана, содержащиеся на естественном лабораторном рационе и при введении витамина А (в %)

Условия эксперимента	Период после введения аллоксана, дни					
	7-й		14-й		21-й	
	А	Б	А	Б	А	Б
Естественный лабораторный рацион	57,2	12,5	50,0	14,3	50,0	14,3
Естественный лабораторный рацион + витамин А	100	57,1	85,8	47,7	85,8	50,0

В первом опыте (см. таблицу) 14 крысам в течение 20 дней ежедневно вводили в желудок подсолнечное масло в количестве 0,5 мл/200 г. Другой такой же группе крыс в тех же условиях вводили 0,5 мл подсолнечного масла, но с добавлением в него витамина А в дневной дозе, равной 750 МЕ. На 20-й день опыта всем животным обеих групп была сделана внутривенная инъекция аллоксана в дозе 40 мг/кг. Было установлено, что в группе крыс, не получавших дополнительной дозы витамина А к рациону, на 7, 14 и 21-й дни после инъекции аллоксана выживало 57, 50 и 50 % животных соответственно. В группе же животных, получавших дополнительно к рациону витамин А, на 7, 14 и 21-й дни после инъекции аллоксана выживало соответственно 100, 86 и 86 % животных.

В тех же условиях был проведен второй опыт, направленный на изучение степени развивающейся гипергликемии после инъекции аллоксана в зависимости от добавления к естественному рациону витамина А. Из данных таблицы видно, что у животных, находящихся на естественном лабораторном рационе с добавлением витамина А, наблюдается сохранение физиологического уровня сахара в крови 57,1, 47,7, 50,0 % соответственно на 7, 14 и 21-й дни после введения аллоксана. В тех же условиях у животных, не получавших витамин А, это явление наблюдалось только у 12,5, 14,3, 14,3 % соответственно.

Результаты опытов, представленных в таблице, свидетельствуют, что добавление к естественному лабораторному рациону витамина А в 1,7 раза повышает выживаемость животных после введения аллоксана и более чем в 3 раза устойчиво предохраняет от развития гипергликемии.

Наиболее показательный результат был получен в опыте на животных, предварительно находившихся 10 дней на синтетической диете, не содержащей витамина А. Животные были с 11-го дня опыта разделены на две равные группы, в одной из которых крысам начали ежедневно вводить желудочным зондом подсолнечное масло в количестве 0,5 мл, а в другой — то же масло, но с добавлением витамина А в суточной дозе 250 МЕ в течение 14 дней, после чего при сохранении этой процедуры всем животным был внутривенно введен аллоксан. Как видно из рис. 1, на 4-й день после инъекции аллоксана у крыс обеих групп возникла гипергликемия, которая у животных не получавших витамина А, достигла максимума к 7-му дню и устойчиво сохранялась до конца наблюдений, длившихся 28 дней. В то же

время у крыс, систематически получавших витамин А, также возникшая гипергликемия на 4-й день после инъекции аллоксана полностью исчезла к 7-му дню и нормальное содержание сахара в крови устойчиво наблюдалось до конца опыта, продолжавшегося 28 дней.

Полученные данные свидетельствуют о развитии устойчивого диабета у животных, не получавших витамин А, и полной профилактики от развития диабета у крыс, систематически получавших витамин А. Это заключение было подтверждено анализом плазмы крови подопытных животных на содержание эндогенного естественного диабетогенного фактора, который, как правило, выявляется при развитии и течении инсулинзависимого диабета [8]. Из данных рис. 2 следует, что у животных, не получавших витамин А, на 4-й день после инъекции аллоксана был обнаружен в плазме крови естественный диабетогенный фактор, активность которого сохранялась в течение 21 дня наблюдений. В то же время у крыс, получавших витамин А, активность диабетогенного фактора полностью отсутствовала в вышеуказанные сроки после введения аллоксана. Этот факт свидетельствует, что профилактическое действие витамина А защищает организм не только от токсического действия аллоксана на функцию  $\beta$ -клеток поджелудочной железы, но и от возникновения в организме естественного диабетогенного фактора, присущего инсулинзависимому диабету [8].

В последующем эксперименте было установлено, что у животных при длительном (2—8 мес) аллоксановом диабете не наблюдалось изменения степени гипергликемии крови при нахождении в течение 28 дней на синтетической диете, обогащенной витамином А. Этот эффект свидетельствует, что только профилактическое обеспечение витамином А защищает организм от действия факторов риска, провоцирующих развитие диабета.

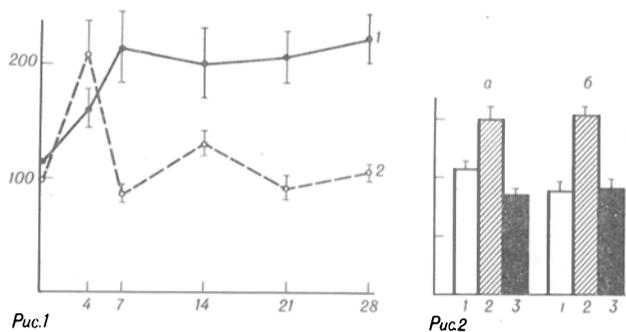


Рис. 1. Содержание сахара в крови у животных после инъекции аллоксана.

По оси абсцисс — время после введения аллоксана, сут; по оси ординат — концентрация сахара, мг%. 1 — животные с гиповитаминозом А; 2 — животные, получавшие витамин А.

Рис. 2. Степень гипергликемического ответа на активность диабетогенного фактора при внутривенном введении здоровым крысам плазмы крови подопытных животных.

По оси ординат — концентрация сахара в крови, мг%. а — кровь, взятая на 4-й день после инъекции аллоксана; б — кровь, взятая на 21-й день после инъекции аллоксана. 1 — исходное содержание сахара в крови здоровых крыс-рецидивентов; 2 — содержание сахара в крови крыс-рецидивентов после инъекции им плазмы крови, взятой у животных с гиповитаминозом А; 3 — содержание сахара в крови здоровых крыс-рецидивентов после инъекции им плазмы крови, взятой у животных, получавших витамин А.

Возникает вопрос о механизме защитного действия витамина А при развитии диабета. Известно, что гепарин является агентом, нейтрализующим токсическое действие естественного диабетогенного фактора [4, 5, 7—9]. Можно предположить, что при действии витамина А в организме происходит повышение концентрации эндогенного гепарина в крови. Однако это предположение не оправдалось при экспериментальной проверке. Полученные данные позволяют допустить, что достаточное содержание витамина А в организме повышает устойчивость  $\beta$ -клеток к токсическому действию диабетогенных факторов риска.

В итоге полученных экспериментальных данных установлено, что гиповитаминоз А обуславливает повышенную заболеваемость инсулинзависимым диабетом животных при действии аллоксана. При систематическом же профилактическом обеспечении животных витамином А диабет не возникал, несмотря на действие аллоксана в тех же дозах. Это свидетельствует, что при недостатке витамина А в организме снижается резистентность к действию токсических диабетогенных факторов риска.

Исходя из полученных данных, можно допустить, что повышение заболеваемости населения инсулинзависимым диабетом обусловлено, возможно, недостаточной обеспеченностью витамином А.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Дедов И. И. // Сов. Россия.— 1988.— 28 окт.
2. Канторович Л. С. Способ определения сахара в крови и других биологических жидкостях.— А. с. 158399. 1963 СССР.
3. Кудряшов Б. А., Базазьян Г. Г., Сытина Н. П. // Кардиология.— 1970.— № 6.— С. 88—95.
4. Кудряшов Б. А., Пытель Ю. А., Баскакова Г. М. и др. // Пат. физиол.— 1982.— № 2.— С. 67—70.
5. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А., Ульянов А. М. // Физиол. журн. СССР.— 1986.— Т. 72, № 3.— С. 373—376.
6. Кудряшов Б. А., Пытель Ю. А., Ульянов А. М., Тарасов Ю. А. // Бюл. экспер. биол.— 1986.— № 7.— С. 61—81.
7. Кудряшов Б. А., Ульянов А. М., Пытель Ю. А. и др. // Вести. МГУ. Сер. биол.— 1986.— № 1.— С. 51—54.
8. Кудряшов Б. А. // Сов. мед.— 1989.— № 7.— С. 51—54.
9. Кудряшов Б. А., Балаболкин М. И., Ульянов А. М. и др. // Вопр. мед. химии.— 1990.— № 3.— С. 79—81.
10. Ульянов А. М., Тарасов Ю. А. // Пробл. эндокринологии.— 1989.— № 6.— С. 78—81.
11. Warren R., Wysocki A. // Surgery.— 1958.— Vol. 44.— P. 435—441.

Поступила 13.03.91

#### VITAMIN A: PREVENTIVE EFFECT IN ABOLISHING THE DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL INSULIN-DEPENDENT DIABETES IN ANIMALS

B. A. Kudryashov, A. M. Ulyanov, Yu. A. Tarasov  
M. V. Lomonosov State University, Moscow.

Vitamin A deficiency contributed to higher incidence of abnormalities in experimental animals with insulin-dependent diabetes induced by alloxan. However, the similar doses of alloxan did not cause diabetes in the animals maintained on a diet containing adequate amounts of vitamin A used for prophylactic purposes for a long time. The natural diabetogenic factor specific to insulin-dependent diabetes was not found in the blood serum of these animals.

В. П. Скурыгин, В. В. Давыдов

#### СИСТЕМЫ РЕГУЛЯЦИИ УРОВНЯ $Ca^{2+}$ , ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ И ОБРАТНОЕ ПОГЛОЩЕНИЕ НЕЙРОТРАНСМИТТЕРОВ В ИЗОЛИРОВАННЫХ НЕРВНЫХ ОКОНЧАНИЯХ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС В УСЛОВИЯХ РАЗВИТИЯ ИНФАРКТА МИОКАРДА

Запорожский медицинский институт

Развитие инфаркта миокарда сопровождается рядом нарушений высшей нервной деятельности, начиная от невротических расстройств и кончая психозами [15].

В экспериментальных исследованиях показано наличие метаболических изменений в головном мозге, сопровождающих возникновение очага некроза в сердечной мышце [3, 33, 36]. Учитывая, что среди основных молекулярных механизмов, лежащих в основе ассоциативного поведения, важная роль принадлежит системам регуляции уровня  $Ca^{2+}$  и циклических нуклеотидов нервных окончаний коры головного мозга [14], нами в условиях моделирования инфаркта миокарда были исследованы ряд ферментов, принимающих участие в работе этих систем, потенциалзависимое поглощение  $Ca^{2+}$ , а также процесс обратного поглощения норадреналина, дофамина и серотонина из синаптической щели. Обратное поглощение является основным механизмом удаления нейротрансмиттеров из синаптической щели [22] и наряду с процессами, влияющими на высвобождение, определяет количество нейротрансмиттера, воздействующего на синаптические рецепторы.

В отдельной группе животных инфаркт миокарда воспроизводили после перенесенного стресса, играющего важную роль в этиологии и патогенезе данного заболевания [16].

Методика. В работе использовали самцов крыс линии Вистар массой 150—180 г. Животных разделили на следующие группы: 1-я — интактные; 2-я — крысы с инфарктом миокарда, исследования у которых проводили через 48 ч после перевязки коронарной артерии, выполненной под эфирным наркозом по методу [32]; 3-я — крысы с инфарктом миокарда, оперированные через сутки после перенесенного эмоционально-болевого стресса, воспроизведенного в виде некроза тревоги по методу [18], у которых исследования проводили через 48 ч после перевязки коронарной артерии.

Эвтаназию осуществляли путем декапитации.

Синапсосомы получали дифференциальным центрифугированием в градиенте плотности сахарозы [17]. Синаптические мембраны получали после осмотического шока синапсосом [12]. Активность аденилатциклазы синаптических мембран измеряли по образованию  $^{32}P$ -цАМФ из  $\alpha$ - $^{32}P$ -АТФ по методу [21]. Суммарную активность мембранно-связанных и растворимых фосфодиэстераз цАМФ синапсосом после их однократного замораживания в жидком азоте и размораживания измеряли, используя  $^3H$ -цАМФ, по методу [23] в модификации [1]. Суммарную активность растворимой и мембранно-связанной гуанилатциклазы в синапсосомах определяли по методу [34]. Инкубационная среда содержала 0,1 % тритона X-100. Образовавшийся цГМФ определяли радиоиммунологическим методом с помощью наборов «Cyclic GMP RIA kit» («Amersham», Англия). Число  $\beta$ -адренорецепторов синаптических мембран оценивали по связыванию  $^3H$ -дигидроалprenолола ( $^3H$ -ДНА) согласно [24] с некоторыми модификациями [10] при насыщающей concentra-

Таблица 1

Активность Mg, Ca-АТФазы и потенциалзависимое накопление  $Ca^{2+}$  в синапсосах коры головного мозга крыс при различных вариантах воспроизведения инфаркта миокарда

Показатель	Интактные животные	Инфаркт миокарда	Стресс + инфаркт
Mg, Ca-АТФаза, $\mu$ моль $P_n$ на 1 мг белка в 1 с	17±5	16,0±2	21,0±6
Потенциалзависимое поглощение $Ca^{2+}$ , $\mu$ моль на 1 мг белка в 1 с	118±55	105±57	194±110

Примечание. Число животных в группах 5—7.

ции лиганда, равной 30 нМ. Определение активности Mg, Ca-АТФазы синапсосом проводили по методу [7]. Для исследования потенциалзависимого накопления  $Ca^{2+}$  синапсосами использовали  $^{45}Ca^{2+}$  согласно [30] при калиевой деполяризации в течение 2 с. Поглощение нейротрансмиттеров синапсосами исследовали по [31], используя  $^3H$ -норадреналин,  $^3H$ -дофамин и  $^3H$ -серотонин. Для расчета сродства переносчика к норадреналину ( $K_m$ ) и максимальной скорости переноса ( $V_{max}$ ) строили график Лайнуивера—Берка. Содержание лактата в синапсосах определяли ферментативным методом с помощью наборов фирмы «Boehringer» (Германия). Белок определяли по [25] при добавлении дезоксихолата. Для построения калибровочной кривой использовали бычий сывороточный альбумин.

Статистическую обработку проводили используя критерий t Стьюдента.

Реактивы:  $\alpha$ - $^{32}P$ -АТФ,  $^3H$ -цАМФ,  $^3H$ -ДНА,  $^3H$ -норадреналин,  $^3H$ -5-гидрокситриптамиин,  $^3H$ -дофамин («Amersham», Англия),  $^{45}CaCl_2$  («Изотоп», СССР), пропранолол, АТФ, трис-НCl, цАМФ  $MgCl_2$  в экспериментах по определению аденилатциклазы и при изучении связывания  $^3H$ -ДНА («Sigma», США), АТФ, трис, серотонин, ЭДТА («Reanal», Венгрия), L-норадреналин, паргелин-НCl («Serva», США), аскорбиновая кислота («Merck», Германия), изобутилметилксантин («Calbiochem»), дофамин-НCl («Loba Chemie», Австрия), креатинкиназа, креатинфосфат («Boehringer», Германия).

Остальные реактивы производства «Реахим» (СССР) квалификации х. ч. и ч. д. а. Сахарозу дополнительно очищали перекристаллизацией из этанола. При изучении связывания  $^3H$ -ДНА и накопления Ca использовали фильтры GF/C «Whatman» (Англия), при изучении поглощения норадреналина — фильтры «Синпор» (Чехо-Словакия), d 0,40 мкм, при изучении поглощения дофамина и серотонина — фильтры «Владипор» (СССР), d 0,70 мкм.

Концентрацию ионов  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  и  $Mn^{2+}$  уточняли титрованием с ЭДТА в присутствии индикатора эриохрома черного.

Результаты и обсуждение. Установлено, что при развитии инфаркта миокарда не происходит изменений потенциалзависимого накопления  $Ca^{2+}$  синапсосами мозга крыс по сравнению с интактными животными (табл. 1).

Исследование ферментативных систем, участвующих в процессах транспорта  $Ca^{2+}$  из нервного окончания во внеклеточное пространство, показывает, что активность Mg, Ca-АТФазы на 2-е сутки после воспроизведения инфаркта миокарда также не отличается от таковой интактных животных (см. табл. 1). В то же время ранее было показано, что активность Na, K-АТФазы, создающей градиент  $Na^+$ , используемый для  $Na^+/Ca^{2+}$ -обмена, направленного на выброс  $Ca^{2+}$  из клетки [20], на 2-е сутки после инфаркта миокарда достоверно снижается на 25 % по сравнению с интактными крысами [6], что создает предпосылки для повышения концентрации  $Ca^{2+}$

внутри клетки. Повышение концентрации этого иона выше критических значений инициирует каскад реакций, ведущих к расстройствам метаболизма вплоть до гибели клетки [28].

Наряду с ионами  $Ca^{2+}$  важная роль в молекулярных основах поведения и памяти принадлежит системе циклических нуклеотидов. Моделирование инфаркта миокарда сопровождалось тенденцией к снижению содержания  $\beta$ -адренорецепторов синаптических мембран, являющихся начальным звеном аденилатциклазного комплекса. Базальная активность аденилатциклазы, а также суммарная активность фосфодиэстераз цАМФ достоверно не изменялись (табл. 2). Наблюдался рост активности гуанилатциклазы, хотя это изменение не было достоверным (см. табл. 2).

Нарушения метаболизма нервных окончаний при инфаркте миокарда отражаются и на поглощении отдельных нейротрансмиттеров. Обратное поглощение норадреналина достоверно не изменяется (табл. 3). В то же время инфаркт миокарда сопровождается резкой активацией процесса обратного поглощения дофамина и серотонина (см. табл. 3).

Совокупность отмеченных изменений в системах регуляции транспорта  $Ca^{2+}$  в нервных окончаниях коры мозга и нарушения обратного поглощения нейротрансмиттеров, тесно связанных с поведенческими реакциями [26], вносят свой вклад в развитие нарушений ВНД, отмеченных нами в экспериментах на крысах [4].

Оценивая роль перенесенного стресса в нарушении метаболизма синапсосом при инфаркте миокарда, следует отметить, что развитие инфаркта миокарда после стресса не изменяет потенциалзависимого накопления  $Ca^{2+}$  (см. табл. 1). Проведенные ранее эксперименты показали, что при данном варианте развития инфаркта миокарда наблюдается достоверная, на 30 % активация Na, K-АТФазы по сравнению с его традиционным вариантом [6], что должно способствовать усилению выброса  $Ca^{2+}$  из нейрона за счет системы  $Na^+/Ca^{2+}$ -обмена. Этому же способствует тенденция к росту активности Mg, Ca-АТФазы (см. табл. 1).

Таким образом, предшествующий стресс создает условия для усиления выхода  $Ca^{2+}$  из нервного

Таблица 2

Количество  $\beta$ -Адренорецепторов, активность аденилатциклазы синаптических мембран, гуанилатциклазы и фосфодиэстеразы в синапсосах коры головного мозга крыс при различных вариантах воспроизведения инфаркта миокарда

Показатель	Интактные животные	Инфаркт миокарда	Стресс + инфаркт
$\beta$ -Адренорецепторы, $f$ моль $^3H$ -ДНА на 1 мг белка	334±18	284±69	243±43
Аденилатциклаза, $\mu$ моль цАМФ на 1 мг белка в 1 мин	51,3±4,0	68,7±6,9	81,6±3,3*
Гуанилатциклаза, $\mu$ моль цГМФ на 1 мг белка в 1 мин	16,3±2,0	31,0±7,0	11,8±2,5
Фосфодиэстераза, $\mu$ моль цАМФ на 1 мг белка в 1 мин	232±30	245±32	155±43

Примечание. Число животных в группах 4—6. Звездочка —  $p < 0,01$  в сравнении с интактными.

Таблица 3

Поглощение нейротрансмиттеров синапсами коры головного мозга крыс при различных вариантах воспроизведения инфаркта миокарда

Нейротрансмиттер	Интактные животные	Инфаркт миокарда	Стресс+инфаркт
Норадреналин ( $V_{max}$ ), нмоль на 1 мг белка в 1 мин	7,36±1,2	7,87±2,1	7,02±1,9
Дофамин, нмоль на 1 мг белка в 1 мин	1,15±0,1	2,4±0,26**	1,16±0,27*
Серотонин, нмоль на 1 мг белка в 1 мин	0,18±0,02	0,94±0,07**	0,86±0,11**

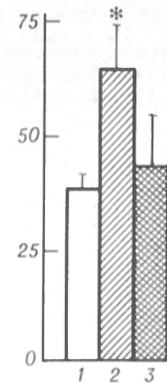
Примечание. При расчете величин  $K_m$  и  $V_{max}$  для норадреналина использовали следующие его концентрации: 0,05, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8 мкМ. Значения  $K_m$  (1,3 мкМ у интактных крыс) не показаны. Обратное поглощение серотонина исследовали при его концентрации 20 нМ, дофамина — 0,1 мкМ. Число животных в группах 4—6. Одна звездочка —  $p < 0,05$  в сравнении с инфарктом миокарда, две —  $p < 0,01$  в сравнении с интактными животными.

окончания и способствует снижению его внутриклеточной концентрации в отличие от традиционного варианта развития инфаркта миокарда.

Следует отметить, что предшествующий стресс углубляет наблюдаемые при традиционном варианте инфаркта миокарда тенденции в изменении активности аденилатциклазы. Активация данного фермента с тенденцией к снижению активности цАМФ-фосфодиэстеразы будут создавать условия для повышения уровня цАМФ в нервных окончаниях. Активность гуанилатциклазы, синтезирующей цГМФ, который по своим эффектам в ряде случаев является антагонистом цАМФ [37], снижалась, хотя и не достигала статистически достоверных различий (см. табл. 2).

Известно, что стресс приводит к снижению уровня АТФ в коре мозга [11, 19], что связано, скорее всего, с гипоксией. Показано также, что гипоксия приводит к накоплению цАМФ в нейронах головного мозга [35]. Исходя из данных работы [9] о повышении резистентности нейронов к гипоксии при увеличении в них уровня цАМФ, можно предположить, что активация аденилатциклазы в наших экспериментах будет способствовать защите нейронов от гипоксического повреждения, возможно, за счет снижения их возбудимости [13] или же иных механизмов. Принимая во внимание данные о том, что одним из основных факторов повреждения нейронов при гипоксии является ацидоз с накоплением лактата [27], мы исследовали его содержание в синапсоммах. Правомерность исследования лактата в синапсоммах, так же как и ряда показателей энергетического обмена, доказывают данные о тесной корреляции между указанными показателями в синапсоммах и ткани мозга [29].

Развитие инфаркта миокарда сопровождалось значительным подъемом содержания молочной кислоты в синапсоммах, которое на 68 % превышает показатели интактных животных (см. рисунок). Это согласуется с обнаруженным ранее увеличением утилизации пирувата в лактатдегидрогеназной реакции при инфаркте миокарда [5].



Лактат синапсомом (в нмоль/мг белка) мозга крыс при различных вариантах воспроизведения некроза миокарда ( $M \pm m$ ).

1 — интактные; 2 — инфаркт миокарда; 3 — стресс+инфаркт. Звездочка —  $p < 0,05$  в сравнении с интактными крысами.

При воспроизведении инфаркта миокарда после перенесенного стресса наблюдалась выраженная тенденция к снижению содержания лактата в синапсоммах (см. рисунок), что согласуется с высказанным предположением о защитной роли активации аденилатциклазы.

Перенесенный стресс, предшествующий инфаркту миокарда, оказывает влияние и на обратное поглощение нейротрансмиттеров. Отмечены нормализация поглощения дофамина и повышение обратного захвата серотонина (см. табл. 3).

Таким образом, наибольшие изменения исследованных показателей метаболизма синапсомом наблюдаются в остром периоде традиционного варианта развития инфаркта миокарда. Эти изменения выражаются в нарушении систем, определяющих уровень  $Ca^{2+}$ , резком повышении содержания молочной кислоты и нарушении обратного поглощения нейротрансмиттеров в отличие от развития инфаркта после перенесенного стресса.

По-видимому, отмеченная нормализация ряда показателей, характеризующих состояние пресинаптических нервных окончаний коры головного мозга, является следствием адаптации нейронов головного мозга к воздействию неблагоприятных факторов [8]. В случае развития инфаркта миокарда такими факторами наряду с другими являются эмоциональный и болевой раздражители, а также циркуляторная гипоксия мозга, связанная с возникновением сердечной недостаточности или нарушениями ритма сердца, часто осложняющими данное заболевание [2]. В этой связи следует отметить полученные нами ранее данные о более быстрой нормализации содержания АТФ в коре мозга к концу острого периода инфаркта миокарда в случае развития его после стресса в сравнении с традиционным вариантом [11]. Детальное выяснение механизмов влияния перенесенного стресса на метаболизм нервных окончаний коры головного мозга при развитии инфаркта миокарда, а также на показатели ВНД, течение и прогноз заболевания требуют проведения дальнейших исследований.

Авторы выражают глубокую признательность И. С. Филиной за техническую помощь, оказанную при выполнении данной работы.

V. P. Skurygin, V. V. Davydov

Medical Institute, Zaporozhye

The systems regulating the levels of  $Ca^{2+}$ - $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ -ATPase and potential-dependent absorption of  $Ca^{2+}$  as well as content of cyclic nucleotides,  $\beta$ -adrenoreceptors, activities of adenylate-, guanylate cyclases and phosphodiesterase were studied in the synaptosomes of rat brain cortex in evolving myocardial infarction. In addition, reverse absorption of noradrenaline, dopamine and serotonin was studied. In one of the animal groups myocardial infarction was simulated after stress. The myocardial infarction, affecting the systems of  $Ca^{2+}$  regulation, caused an increase in reverse absorption of dopamine and serotonin simultaneously with accumulation of lactate in the synaptosomes. In myocardial infarction developed after stress adenylate cyclase was activated, reverse absorption of dopamine was decreased and the content of lactate tended to decrease as compared with the infarction formed without stress effects.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 612.17.015.1:577.152.21.08

С. В. Тришкин, В. А. Кузнецов, К. Б. Винницкая

## ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ ХОЛИНАЦЕТИЛ-ТРАНСФЕРАЗЫ В ТКАНЯХ СЕРДЦА

Научный центр хирургии РАМН, Москва, Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова

Ацетил-КоА: холин-О-ацетилтрансфераза, или холинацетилтрансфераза (ХАТ; КФ 2.3.1.6) — фермент, специфически синтезирующий *in vivo* один из основных нейромедиаторов — ацетилхолин (АХ) — путем катализа обратимой реакции переноса ацетильной группы с ацетилкофермента А (АцКоА) на холин, которая в равновесии сдвинута в сторону образования АХ:



Механизмы реакции рассмотрены в [15, 20]. Возможное обратимое действие ХАТ показано в [13, 14].

ХАТ присутствует в центральной и периферической нервной системах, в органах с холинергической иннервацией (скелетные мышцы, сердце, желудок и кишечник) и в некоторых тканях, не имеющих иннервации (плацента, тромбоциты, сперма) [8, 9, 16, 17, 20]. В органах с холинергической иннервацией ХАТ сосредоточена в соответствующих нервных окончаниях. Гистохимические исследования и анализ субклеточных фракций нервной системы показывают, что ХАТ преимущественно локализована в цитоплазме, однако может легко присоединяться к мембранам, в частности к наружной поверхности мембран синапсом, вследствие разницы зарядов и находиться в растворимой и мембранно-связанной формах [6, 7, 20]. Мембранно-связанная форма ХАТ солибилизируется при ионной силе и рН среды, близких к физиологическим значениям, и в присутствии детергентов. Физико-химическими методами (электрофорез в полиакриламидном геле, жидкостная хроматография, изоэлектрофокусирование) показано существование нескольких

1. Балденков Г. П., Меньшиков М. Ю., Феоктистов И. А., Ткачук В. А. // Биохимия.— 1985.— Т. 50, № 7.— С. 1141—1150.
2. Голицына А. П., Берестов А. А., Майоров Н. И. и др. // Кардиология.— 1977.— № 8.— С. 65—70.
3. Давыдов В. В. Энергетический обмен коры больших полушарий головного мозга при ишемическом некрозе миокарда: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.— Ростов-н/Д., 1988.
4. Давыдов В. В., Железнов Л. М., Красиков С. И., Якушев В. С. // Журн. высш. нервн. деят.— 1984.— № 6.— С. 1174—1175.
5. Давыдов В. В., Скурыгин В. П., Жежа В. В. и др. // Ден. в ВИНТИ 25.02.1986 г., № 1298 — В 86.
6. Давыдов В. В., Скурыгин В. П., Якушев В. С. // Вопр. мед. химии.— 1984.— № 2.— С. 61—63.
7. Кудинов С. А. Системы транспорта Са в нервных клетках.— Киев, 1983.
8. Меерсон Ф. З., Пшенникова М. Г. Адаптация к стрессовым ситуациям и физическим нагрузкам.— М., 1988.
9. Самойлов М. О. Реакции нейронов мозга на гипоксию.— Л., 1985.
10. Скурыгин В. П., Елизарова Е. П., Куренная Г. С., Балденков Г. Н. // Вопр. мед. химии.— 1990.— № 2.— С. 45—46.
11. Ступницкий Ю. И., Давыдов В. В. // Журн. высш. нервн. деят.— 1988.— № 5.— С. 958—962.
12. Arnaiz G. R. L., Alberici M., De Robertis E. // J. Neurochem.— 1967.— Vol. 14.— P. 215—225.
13. Bradshaw C. M., Sherclan R. D., Szabadi E. // Brit. J. Pharmacol.— 1987.— Vol. 90, Suppl.— P. 70.
14. Byrne J. H. // Physiol. Rev.— 1987.— Vol. 67, N 2.— P. 329—439.
15. Cay E., Zaitsev V. P., Rudnicki S. // Rehabilitation after Myocardial Infarction.— Copenhagen, 1984.— P. 31—53.
16. Denolin H. (Ed.) Psychological Problems Before and After Myocardial Infarction.— Basel, 1982.
17. De Robertis E., Iraldi A. P., Arnaiz G. R. L., Salganicoff L. // J. Neurochem.— 1962.— Vol. 9.— P. 23—35.
18. Desiderato O., MacKinnon J. R., Hissom H. // J. comp. Physiol. Psychol.— 1974.— Vol. 87, N 2.— P. 208—214.
19. Dickman S. R., Harrison J., Grosser B. // Brain Res.— 1973.— Vol. 53, N 2.— P. 483—487.
20. DiPolo R., Beauge L. // Biochim. biophys. Acta.— 1988.— Vol. 947, N 3.— P. 549—569.
21. Grigorian G. Yu., Tkachuk V. A. // Biochem. int.— 1982.— Vol. 4, N 6.— P. 592—603.
22. Iversen L. L. // Brit. J. Pharmacol.— 1971.— Vol. 41, N 4.— P. 571—591.
23. Kincaid R. L., Manganiello V. C., Vaghan M. // J. biol. Chem.— 1981.— Vol. 256.— P. 11345—11350.
24. Lefkowitz R. J., Mullikin D., Caron M. // Ibid.— 1976.— Vol. 251, N 15.— P. 4686—4692.
25. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. // J. biol. Chem.— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
26. Moisset B., Hendley E. D., Welch B. L. // Brain Res.— 1975.— Vol. 92.— P. 157—164.
27. Myers R. E. // Advanc. Neurol.— 1979.— Vol. 26.— P. 195—211.
28. Orrenius S., McConkey D. J., Bellomo G., Nicotera P. // Trends pharm. Sci.— 1989.— Vol. 10, N 7.— P. 281—285.
29. Rafalowska U., Ericinska M., Wilson D. F. // J. Neurochem.— 1980.— Vol. 34, N 5.— P. 1160—1165.
30. Rampe D., Ferrante J., Triggle D. J. // Canad. J. Physiol. Pharmacol.— 1987.— Vol. 65, N 4.— P. 538—543.
31. Schoemaker H., Nickolson V. J., Kerbusch S., Crabbe J. C. // Brain Res.— 1982.— Vol. 235.— P. 253—264.
32. Selye H., Bajusz E., Grasso S., Mendell P. // Angiology.— 1960.— Vol. 11.— P. 398—407.
33. Sole M. J., Hussain M. N., Lixfeld W. // Circulat. Res.— 1980.— Vol. 47.— P. 166—172.
34. Steiner A. L., Ferrendelli J. A., Kipnis D. M. // J. biol. Chem.— 1972.— Vol. 247, N 4.— P. 1114—1120.
35. Steiner A. L., Ferrendelli J. A., Kipnis D. M. // Ibid.— P. 1121—1124.
36. Stone E. A., Platt J. E. // Brain Res.— 1982.— Vol. 237.— P. 405—414.
37. Stone T. W., Taylor D. A., Bloom F. E. // Science.— 1975.— Vol. 187.— P. 845—846.

Поступила 16.09.91

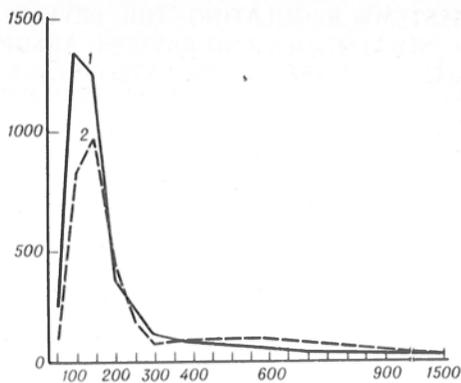


Рис. 1. Хроматограмма  $^{14}\text{C}$ -радиоактивности инкубированных проб гомогената цельного сердца на колонке с 300 мкл смолы Дауэкс  $1 \times 4$  (100—200 меш) в  $\text{Ac}^-$ -форме.

Здесь и на рис. 2 и 3: по оси абсцисс — дистиллированная вода, мл, по оси ординат — радиоактивность, имп/мин; 1 — пробы инкубированы с субстратным раствором, 2 — пробы инкубированы с субстратным раствором 2 (см. методику)

молекулярных форм ХАТ и ее агрегатов у некоторых видов животных и человека [7, 20].

Активность ХАТ может являться одним из критериев комплексной оценки уровня активности холинергической системы и использоваться для исследования взаимодействия симпатических и парасимпатических воздействий на органы и ткани, что необходимо для изучения патогенеза нарушения их функций и выработки соответствующих подходов к устранению этих нарушений. Таким образом, оценка активности ХАТ имеет большое научное и практическое значение в исследовании механизма действия фармакологических веществ и изучении механизмов реабилитации больных с нарушениями деятельности сердечно-сосудистой системы.

В настоящее время для определения активности ХАТ обычно используют радиометрические методы анализа. Подробный обзор радиоизотопных методов определения активности ХАТ дан в [5]. При измерении активности ХАТ в мышечных тканях, основанном на регистрации  $^{14}\text{C}$ -АХ, синтезированного из  $^{14}\text{C}$ -АцКоА и холина, существенные помехи может накладывать карнитинацетилтрансфераза, также способная *in vitro* неспецифически синтезировать АХ [18, 19]. Для определения

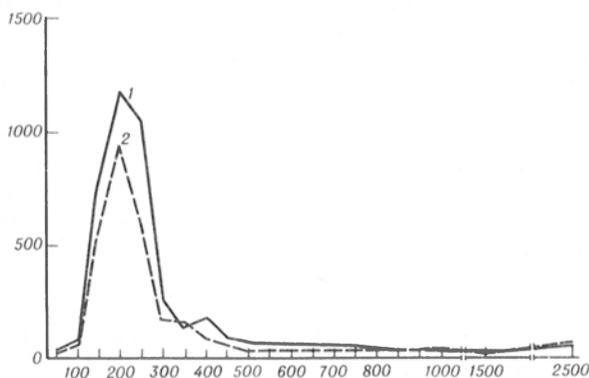


Рис. 2. Хроматограмма  $^{14}\text{C}$ -радиоактивности инкубированных проб гомогената цельного сердца на колонке с 500 мкл смолы Дауэкс  $1 \times 4$  (100—200 меш) в  $\text{Ac}^-$ -форме.

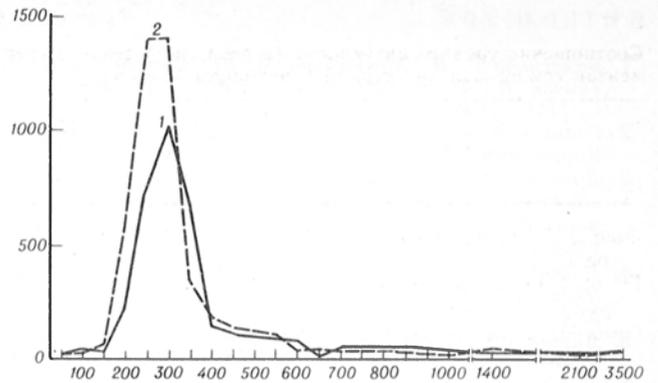


Рис. 3. Хроматограмма  $^{14}\text{C}$ -радиоактивности инкубированных проб гомогената цельного сердца на колонке с 700 мкл смолы Дауэкс  $1 \times 4$  (100—200 меш) в  $\text{Ac}^-$ -форме.

специфической активности ХАТ используют специфические ингибиторы ХАТ: сложные эфиры холина бром-, йод- и хлоруксусной кислот, (2-бензоил)-триметиламмоний, 4(1-нафтилвинил)-пиридин [9, 16—20]. Активность ХАТ оценивают по разнице радиоактивности между общим и ингибиторчувствительным синтезом.

Нами предлагается модификация [4] метода радиоизотопного анализа ХАТ, описанного в [10—12] и [5, 18, 19], основанная на замене разделения субстрата  $^{14}\text{C}$ -АцКоА и продукта ферментной реакции  $^{14}\text{C}$ -АХ (с помощью экстракции раствором тетрафенилбората натрия в органическом растворителе) на анионообменную хроматографию.

Разработку метода проводили в следующих направлениях: подбор противоионной формы смолы, определение объема смолы и объема элюирующей жидкости, определение величины фонов и специфичности реакции, определение зависимости активности ХАТ от степени разведения, определение кинетической характеристики ХАТ в желудочках и предсердии, сравнение предлагаемого метода и метода Фоннума — Тучека.

Для подбора противоионной формы Дауэкс  $1 \times 4$  100—200 меш в  $\text{Cl}^-$ -форме (700 мкл) переводили в гидроксид-, глицинат- и ацетат-формы. Проинкубированные пробы наносили на колонки и элюировали 700 мкл дистиллированной воды. Уровень радиоактивности в элюатах составил  $147 \pm 2$ ,  $1428 \pm 238$  и  $3203 \pm 16$  имп/мин соответственно. Низкий выход радиоактивности с колонок в гидроксид- и глицинат-формах, по-видимому, обусловлен щелочным гидролизом АХ и связыванием  $^{14}\text{C}$ -ацетил-анионов со смолой, а ацетатные противоионы оптимально защищают АХ от гидролиза, уступают места связывания фосфатным группам  $^{14}\text{C}$ -АцКоА и конкурентно обмениваются со свободно гидролизованными  $^{14}\text{C}$ -ацетил-анионами АцКоА. В связи с этим во всех последующих экспериментах Дауэкс  $1 \times 4$  (100—200 меш) был использован в ацетатной форме ( $\text{Ac}^-$ -форма).

Элюаты инкубированных проб фракционировали на колонках объемом 300, 500 и 700 мкл дистиллированной водой в пределах 5 объемов смолы (рис. 1—3). Оптимальными условиями для выделения продукта реакции является его элюирование 700 мкл дистиллированной воды с 500 мкл

Таблица 1

Соотношение уровней активности (в расп/мин) фонов и ферментов гомогената предсердий (инкубация 15 мин)

Активность	ВГАХ-чувствительная активность	Общая активность
Фоновая (инкубационной буферной среды)	327±24	190±44
Гомогената (в присутствии 1 М уксусной кислоты)	370±7	358±18
Гомогената (при отсутствии холин-хлорида)	2530±186	5343±381

Дауэкс 1×4 100—200 меш в Ац<sup>-</sup> форме непосредственно в сцинтилляционную жидкость. Сравнение уровней радиоактивности, обусловленных гидролизом <sup>14</sup>С-АцКоА при инкубации в буферной среде, сорбцией <sup>14</sup>С-АцКоА в закисленном гомогенате ткани (инкубация в присутствии 1 М уксусной кислоты), и ферментативной активности (табл. 1) показывает, что высокий уровень радиоактивности элюатов при инкубации гомогената сердца определяется ферментативной активностью.

Определение активности ацетилтрансферазы гомогенатов в присутствии и отсутствие холин-хлорида позволяет сделать заключение о холин-специфичности ацетилтрансферазной активности ферментов (табл. 2).

**Методика.** Для исследования активности ХАТ использовали ткани сердца самцов крыс линии Вистар массой 150—250 г.

Приготовление гомогената тканей сердца. Ткани сердца деканитированных крыс промывают 0,9 % раствором NaCl, замораживают и хранят при -20 °С. Навеску ткани растирают в ступке с охлаждением жидким азотом или гомогенизируют в стеклянном гомогенизаторе при 4 °С в среде, содержащей 200 мМ NaCl, 40 мМ натрий-фосфатный буфер рН 7,4, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,2 мМ эзерин-салицилата и 0,5 % (V/V) тритон X-100, в соотношении ткань:среда, равном 1:19. Гомогенат ткани можно хранить в замороженном состоянии при -20 °С.

Синтез бромацетилхолина. Бромацетилхолин (ВГАХ) синтезируют гетерогенной реакцией в сухом диметилформамиде твердого холин-хлорида с избытком хлорангидрида бромуксусной кислоты при 20 °С. Продукт реакции растворяется в диметилформамиде. ВГАХ кристаллизируют из раствора при 4 °С, декантируют и промывают на фильтре сухим эфиром. Выход составляет 92 %. Синтез ВГАХ контролировали по температуре плавления 124—129 °С и результатам хроматографии на бумаге в системе бутанол—этанол—уксусная кислота—вода (8:2:1:3) с окраской фосфолибденовой кислотой, хлоридом олова или реактивом Драгендорфа (R<sub>f</sub> ВГАХ 0,39—0,43; R<sub>f</sub> холин-хлорида 0,27—0,31).

Метод Фоннума — Тучека воспроизводили по [18, 19]. Активность ХАТ при экстракции по методу Фоннума—Тучека рассчитывали без учета коэффициента распределения комплекса (тетрафенилборат натрия — <sup>14</sup>С-АХ) между бутилацетатом и водной фазой.

Таблица 2

Холинспецифичность ацетилтрансферазной активности АХЭ (в расп/мин) гомогената цельного сердца (инкубация 20 мин)

Ацетилтрансферазная активность	ВГАХ-чувствительная активность	Общая активность
Фоновая активность гомогената (в присутствии 1 М уксусной кислоты)	612±49	711±57
Активность гомогената (в отсутствие холин-хлорида)	996±40	919±12
Активность гомогената (в присутствии холин-хлорида)	2122±181	3189±9

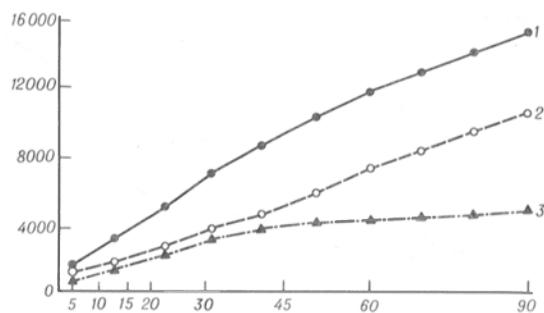


Рис. 4. Зависимость активности ХАТ предсердия от длительности инкубирования.

Здесь и на рис. 5: По оси абсцисс — время, мин, по оси ординат — радиоактивность, имп/мин; 1 — общая активность, 2 — ВГАХ-чувствительная активность, 3 — активность ХАТ.

**Модифицированный метод.** Растворы и реактивы: 1) субстратный раствор 1 (СР-1) готовится перед употреблением и имеет следующий состав: 0,5—0,625 мМ <sup>14</sup>С-АцКоА (5—7 Ки/моль, «Amersham», Великобритания), 25 мМ хлорид-холин, 400 мМ NaCl, 0,2 мМ эзерин-салицилат и 1,25 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (БСА); 2) субстратный раствор 2 (СР-2) в дополнение к компонентам СР-1 содержит 5 мкМ ВГАХ; 3) 0,5 М уксусная кислота.

Использовали наконечники для автоматических пипеток объемом на 1 мл, содержащие по 500 мкл смолы Дауэкс 1×4 (100—200 меш) в Ац<sup>-</sup> форме («Serva», Германия). Колонки со смолой готовили к работе и регенерировали последовательной промывкой 1 мл 1 н. HCl, 2 мл дистиллированной воды, 1 мл 1 н. NaOH, 2 мл дистиллированной воды, 1 мл 1 н. уксусной кислоты, 2 мл дистиллированной воды.

Для определения активности ХАТ готовят 4 пробирки на каждый исследуемый гомогенат. Первые 2 пробирки предназначены для определения общей реакции синтеза <sup>14</sup>С-АХ, вторые 2 пробирки — для оценки неспецифического фона (ВГАХ-чувствительной реакции). Инкубацию начинают, смешивая 30 мкл исследуемого гомогената и 20 мкл СР-1 или СР-2 для достижения следующих конечных концентраций компонентов инкубационной среды: 280 мМ NaCl, 24 мМ натрий-фосфатный буфер рН 7,4, 6 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,2 мМ эзерин-салицилата, 0,2—0,25 мМ <sup>14</sup>С-АцКоА, 10 мМ холин-хлорида, 0,5 мг/мл БСА и 0,3 % (V/V) тритона X-100 (пробы для ВГАХ-чувствительной реакции содержат еще 2 мкМ ВГАХ). Длительность инкубации зависит от предполагаемой активности ХАТ.

Реакцию останавливают добавлением 200 мкл 0,5 М уксусной кислоты. Подкисленные пробы для разделения <sup>14</sup>С-АцКоА и <sup>14</sup>С-АХ наносят на микроколонки с Дауэксом 1×4 (100—200 меш) в Ац<sup>-</sup> форме и элюируют 700 мкл дистиллированной водой непосредственно в сцинтилляционный флакон. Измерение радиоактивности проводят в стандартном диоксановом сцинтиллягоре на жидкостном сцинтилляционном счетчике.

**Результаты и обсуждение.** Анализ зависимости активности ХАТ от длительности инкубирования гомогенатов тканей сердца (рис. 4, 5)

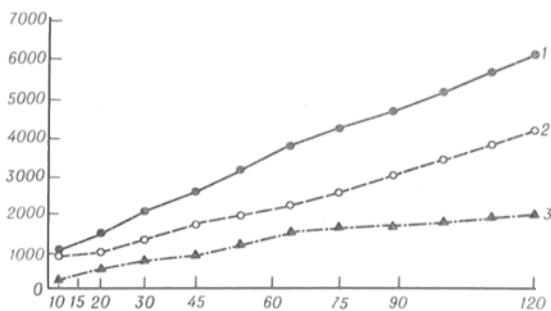


Рис. 5. Зависимость активности ХАТ желудочков сердца от длительности инкубирования.

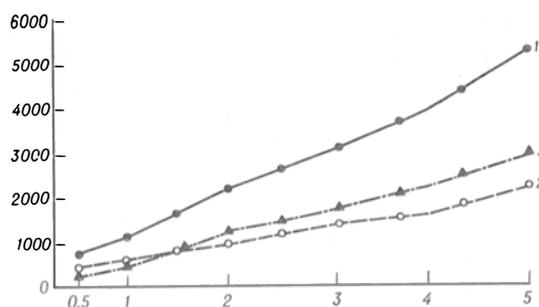


Рис. 6. Зависимость активности ХАТ предсердия от концентрации гомогената.

По оси абсцисс — концентрация гомогената, %. Остальные обозначения те же, что на рис. 5 и 6.

позволяет рекомендовать время инкубации для предсердий 20 мин, для желудочков сердца 40 мин. Зависимость определяемой активности ХАТ от концентрации гомогената имеет прямолинейный характер:  $r=0,9975$  (рис. 6).

При сравнении предлагаемого метода и метода Фоннума — Тучека активность ХАТ гомогената цельного сердца составила соответственно  $101,6$  пКат/г ткани (коэффициент вариации —  $KV=7,7\%$  при  $n=20$ ) и  $19,9$  пКат/г ткани ( $KV=7,8\%$  при  $n=20$ ). Таким образом, предлагаемый метод чувствительнее метода Фоннума — Тучека в 5 раз при одинаковой воспроизводимости, кроме того, метод Фоннума — Тучека по сравнению с предлагаемым методом отличается многостадийностью, необходимостью использования центрифуги и работы с органическими растворителями, необходимостью использования труднодоступного тетрафенилбората натрия.

Предложенный нами метод апробирован в экспериментах на крысах в условиях различных режимов гипербарической оксигенации (ГБО), при моделировании инфаркта миокарда и умеренного иммобилизационного стресса.

Оценку терапевтического воздействия ГБО производили до и после однократного сеанса ГБО, а также курса (7 сеансов) ГБО при 2 ата в течение 40 мин. Изучено также терминальное воздействие ГБО при давлении 6 ата в течение 30 мин. Установлено, что терминальное воздействие ГБО увеличивает активность ХАТ в левых желудочках с  $16,3 \pm 2,2$  пКат/г ткани у интактных крыс до  $26,7 \pm 0,8$  пКат/г ткани, тогда как терапевтическое воздействие однократного сеанса ГБО или курса сеансов не вызывает достоверных изменений:  $19,6 \pm 1,2$  и  $19,7 \pm 1,4$  пКат/г ткани соответственно. Установлена корреляция между активностью ХАТ и уровнем цАМФ ( $r=0,885$ ). Активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) осталась без достоверных изменений [1]. Полученные результаты коррелируют с изменениями функционального состояния сердца при воздействии ГБО.

При моделировании инфаркта миокарда по Селье через сутки после перевязки левой коронарной артерии наблюдали в правом предсердии снижение активности ХАТ с  $181 \pm 4$  пКат/г ткани у интактных крыс до  $137 \pm 3$  пКат/г ткани у подопытных крыс, активности АХЭ с  $45,2 \pm 2,1$  до  $14,0 \pm 2,8$  нКат/г ткани. Ранее было показано, что уровень эндогенного АХ уменьшается со  $162 \pm 22,0$  нг/г ткани интактных крыс до  $34,3 \pm 11,0$  нг/г ткани у крыс с инфарктом левого желудочка [3]. Повышение холинореактивности пейсмейкера, которое выражалось в снижении в 3 раза пороговой концентрации АХ, вызывает достоверное уменьшение частоты сокращений правого предсердия на 11% [2]. Таким образом, наши данные по активности ХАТ и АХЭ согласуются с ранее полученными результатами.

При предварительной адаптации к длительному непрерывному умеренному иммобилизационному стрессу (крысы находились в клетках-пеналах) в правом предсердии активность ХАТ устойчиво снижается на фоне первоначального

Таблица 3

Активность холинергической системы правого предсердия крыс при адаптации к длительному непрерывному умеренному иммобилизационному стрессу

Показатель	Интактные животные <sup>(1)</sup>	Продолжительность адаптации		
		1 сут (2)	5 сут (3)	15 сут (4)
Активность ХАТ, пКат/г ткани	$370 \pm 5$	$320 \pm 3$	$301 \pm 2$	$312 \pm 5$
	$p_{1,2} < 0,001$	$p_{1,2} < 0,001$	$p_{1,3} < 0,001$	$p_{1,4} < 0,001$
	$p_{1,3} < 0,001$	$p_{2,3} < 0,001$	$p_{2,3} < 0,001$	
	$p_{1,4} < 0,001$			
Активность АХЭ, пКат/г ткани	$63,2 \pm 3,2$	$82,9 \pm 6,2$	$73,2 \pm 4,6$	$55,8 \pm 4,6$
	$p_{1,2} < 0,02$	$p_{1,2} < 0,02$	$p_{3,4} < 0,05$	$p_{2,4} < 0,01$
		$p_{2,4} < 0,01$		$p_{3,4} < 0,05$
Активность БХЭ, пКат/г ткани	$47,6 \pm 2,7$	$56,3 \pm 2,5$	$46,4 \pm 3,3$	$38,4 \pm 2,5$
	$p_{1,2} < 0,05$	$p_{1,2} < 0,05$	$p_{2,3} < 0,05$	$p_{1,4} < 0,05$
	$p_{1,4} < 0,05$	$p_{2,3} < 0,05$		$p_{2,4} < 0,001$
		$p_{2,4} < 0,001$		
Плотность мускариновых холинорецепторов, нмоль/мг белка	$1,23 \pm 0,02$	$0,90 \pm 0,03$	$1,38 \pm 0,03$	$1,47 \pm 0,02$
	$p_{1,2} < 0,001$	$p_{1,2} < 0,001$	$p_{1,3} < 0,01$	$p_{1,4} < 0,001$
	$p_{1,3} < 0,01$	$p_{2,3} < 0,001$	$p_{2,3} < 0,001$	$p_{2,4} < 0,001$
	$p_{1,4} < 0,001$	$p_{2,4} < 0,001$		

увеличения активности АХЭ и БХЭ и интернализации мускариновых холинорецепторов (табл. 3).

Анализ экспериментальных данных позволяет заключить, что предложенный метод определения активности ХАТ позволяет регистрировать с высокой чувствительностью изменения функционального состояния ХАТ сердца и функционирование холинергической системы в целом в различных патофизиологических ситуациях, определяемых функциональным состоянием отдельных молекулярных компонентов холинергической системы. Для адекватной оценки деятельности холинергической системы необходим комплексный подход к изучению механизма ее функционирования, в том числе и исследование активности ХАТ.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Колосков Ю. В., Тришкин С. В., Винницкая К. Б. и др. // Новое в практике и теории гипербарической оксигенации.— М., 1989.— С. 163.
2. Пшенникова М. Г., Шимкович М. В., Винницкая К. Б. // Бюл. экспер. биол.— 1988.— № 7.— С. 5—7.
3. Пшенникова М. Г., Большакова Т. Д., Винницкая К. Б. и др. // Нарушение механизмов регуляции и их коррекция.— Кишинев, 1989.— С. 990.
4. Тришкин С. В., Винницкая К. Б., Кузнецов В. А., Пономарев С. Ю. А. с. 1555671 СССР // Открытия.— 1990.— № 13.— С. 196—197.
5. Тучек С. Синтез ацетилхолина в нейронах.— М., 1981.
6. Badamchian M., Carroll P. T. // J. Neurosci.— 1985.— Vol. 5, N 8.— P. 1955—1964.
7. Benishin C. G., Carroll P. T. // Biochem. Pharmacol.— 1981.— Vol. 30, N 17.— P. 2483—2484.
8. Bruce G., Wainer B. H., Hersh L. B. // J. Neurochem.— 1985.— Vol. 45, N 2.— P. 611—620.
9. Duckles S. P. // J. Pharmacol. exp. Ther.— 1982.— Vol. 223, N 3.— P. 716—720.
10. Fonnum F. // Biochem. J.— 1969.— Vol. 113.— P. 291—298.
11. Fonnum F. // Ibid.— Vol. 115.— P. 465—472.
12. Fonnum F. // J. Neurochem.— 1975.— Vol. 24.— P. 407—409.
13. Hsu L. L., Chao L. P. // J. Neurosci. Res.— 1982.— Vol. 7, N 2.— P. 155—162.
14. Kato T. // J. Neurochem.— 1984.— Vol. 42, N 4.— P. 903—910.
15. Mautner H. G. // Mol. Basis Nerve Activ.— Berlin, 1985.— P. 697—708.
16. Rowell P. P., Sastry B. V. // J. Pharmacol. exp. Ther.— 1981.— Vol. 216, N 2.— P. 232—238.
17. Sastry B. V. R., Janson V. E., Chaturvedi A. K. // Ibid.— P. 378—384.
18. Slavikova J., Tucek S. // Pflüger's Arch.— 1982.— Bd 392.— S. 225—229.
19. Tucek S. // J. Physiol. (Lond.).— 1982.— Vol. 322.— P. 53—69.
20. Tucek S. // Handbook of Neurochemistry.— New York, 1983.— Vol. 4.— P. 219—249.

Поступила 19.09.91

#### ESTIMATION OF ACETYLCHOLINE TRANSFERASE IN CARDIAC TISSUE.

S. V. Trishkin, V. A. Kuznetsov, K. B. Vinnitskaya

Research Centre of Surgery, Academy of Medical Sciences of the Russian Federation, I. M. Sechenov Medical Academy, Moscow.

A procedure is described for the radioisotope assay of acetylcholine transferase activity (EC 2.3.1.6), which involved specific synthesis of acetylcholine *in vivo*. Bromine acetylcholine was used as an inhibitor of the enzyme;  $^{14}\text{C}$ -AcCoA was used as a substrate and product of the enzymatic reaction.  $^{14}\text{C}$ -acetylcholine was separated from the substrate by means of anion exchange chromatography. The procedure described was 5 times more sensitive than the methods developed by F. Fonnum (1975) and S. Tucek (1983) being

similarly reproducible. The assay was tested in experiments with rats under various conditions of hyperbaric oxygenation, in simulation of myocardial infarction as well as in moderate immobilization stress. The findings suggest that estimation of the acetylcholine transferase activity may be involved in complex evaluation of the cholinergic system state in tissues, which is essential for the study of pathogenesis of their dysfunctions and development of respective approaches to eliminate these impairments.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.127-005.4-092.9-07:616.127-1008.931:577.152.34

Р. Г. Карапетян, С. С. Оганесян, Т. Н. Акопян, Е. Г. Джанполадян

#### АКТИВНОСТЬ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ И ИХ ИНГИБИТОРОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ МИОКАРДА

НИИ кардиологии Минздрава Республики Армения, Институт молекулярной биологии Республики Армения, Ереван

Сведения о роли индивидуальных лизосомальных и цитоплазматических эндопептидаз в развитии патологических процессов, в частности ишемии миокарда, противоречивы. Так, с одной стороны, лизосомальным ферментам отводится деструктивная роль: они вызывают некроз клеток [12]. С другой стороны, имеются данные об активировании лизосомальных ферментов, в частности катепсина D, и участии их в период рубцевания инфарктированных участков [3].

Имеются также данные об изменении активности некоторых эндогенных ингибиторов протеаз миокарда в условиях патологии [6, 9, 10].

Ранее было показано, что  $\beta$ -блокатор пропранолол может влиять на протеолитическую систему миокарда крыс при экспериментальном сужении аорты [7]. Нами было также показано, что антагонисты кальция верапамил и нифедипин способны ингибировать активность частично очищенной Са-активируемой нейтральной протеазы *in vitro* [1].

В литературе отсутствуют данные о влиянии кардиоактивных препаратов на активность эндогенных ингибиторов эндопептидаз миокарда.

В настоящей работе изучали протеолитическую активность миокарда крыс с экспериментальной ишемией миокарда (ЭИМ) в острой фазе (60 мин) и на 5-й день после перевязки коронарной артерии, а также изменение активности эндогенных ингибиторов протеаз миокарда в условиях данной патологии и влияние  $\beta$ -блокатора пропранолола и антагониста кальция верапамила на эти процессы.

Методика. В опытах было использовано 60 белых беспородных крыс-самцов массой 180—200 г. Ишемию миокарда вызывали перевязкой левой нисходящей коронарной артерии. Животные были разделены на 4 группы: 1-я — контрольные, 2-я — оперированные, 3-я — оперированные, получавшие пропранолол (1 мг/кг массы), 4-я — оперированные, получавшие верапамил (200 мкг/кг массы). В острой фазе ишемии в качестве контроля использовали также ложнооперированных животных.

Животных, находящихся под легким эфирным наркозом, декапитировали, извлекали сердце и тщательно отмывали от остатков крови физиологическим раствором. Миокард левого желудочка измельчали и гомогенизировали в гомогенизаторе типа Поттера и 0,025 М трис-HCl-

буфере рН 7,7, содержащем 2 мМ ЭДТА, 0,1 М КСl и 2 мМ дитиотрийэтол (ДТТ) в отношении 1:3 (вес/объем). Гомогенат центрифугировали при 10 000 г в течение 15 мин и полученный супернатант центрифугировали при 100 000 г в течение 60 мин. Супернатант, обозначенный как экстракт миокарда, использовали для измерения неседиментируемой протеолитической активности. Всю процедуру получения экстракта проводили при 4 °С.

Протеолитическую активность экстракта определяли по методу [2]; в качестве субстрата использовали гемоглобин, модифицированный пиридоксаль-5'-фосфатом. Пробы объемом 0,6 мл, содержащие 100 мкг белкового субстрата, инкубировали при 37 °С в течение 1–2 ч, реакцию останавливали добавлением 0,15 мл 30 % ТХУ. После центрифугирования рН супернатанта доводили до 5,5 1 М цитратом Na и измеряли флуоресценцию при 410 нм (возбуждение 330 нм) на флюоресцентре «Fagand». Для определения активности разных классов протеиназ реакционная смесь содержала 0,05 М цитратный буфер рН 3,2, 0,05 М ацетатный буфер, 1 мМ ДТТ рН 5,5, 0,05 М трис-НСl рН 7,5, 1 мМ ДТТ, 1 мМ свободный Са.

Измерение активности эндогенных ингибиторов протеаз, содержащихся в экстракте миокарда, проводили в следующих средах: 0,05 М трис-НСl рН 7,6, 0,2 мкг химотрипсина, 0,05 М трис-НСl рН 7,6, 0,2–0,4 мкг папаина, предварительно активированного 10 мМ СаCl<sub>2</sub>, и 1 мМ ДТТ в течение 10 мин. Затем в реакционную смесь добавляли аликвоты экстракта миокарда, содержащие 10–100 мкг белка, преинкубировали 10 мин при комнатной температуре и реакцию начинали добавлением 500 мг денатурированного гемоглобина и 100 мг гемоглобина, модифицированного пиридоксаль-5'-фосфатом (во избежание конкурентного ингибирования).

Концентрацию белка определяли по методу Лоури [8].

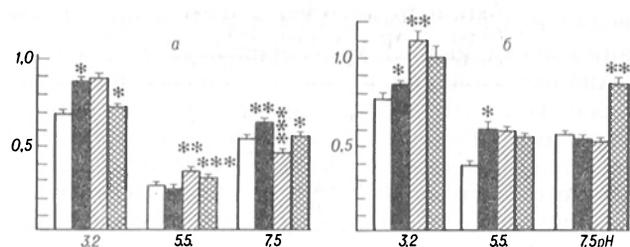
В работе использовали химотрипсин фирмы «Sigma» (США), папаин фирмы «Merck» (Германия). Остальные реактивы — отечественного производства марки х.ч. и о.с.ч.

Результаты и их обсуждение. Ранее нами было установлено, что экстракт миокарда крыс содержит кислые (оптимум рН 3,0–3,5), тиолзависимые (рН 5,0–6,0) и Са-зависимые, активные в присутствии ДТТ (рН 7,2–7,8) протеазы [1]. Известно, что основным ферментом, активным в области рН 3,0–4,0, является катепсин D, при рН 5,0–6,0 — лизосомальные тиоловые протеазы — катепсины В, Н, L, которые способны разрушать миофибриллярные белки [5, 6]. В нейтральной среде важная роль отводится Са-активируемой нейтральной протеазе, которая также принимает участие в метаболизме мышечных белков, особенно в условиях патологии, когда увеличивается внутриклеточная концентрация Са<sup>2+</sup> [4, 10, 11].

В предварительных опытах было проверено действие пропранолола и верапамила на пептидазную активность миокарда *in vivo* у нормальных животных. Результаты показали отсутствие разницы в протеолитической активности тканевого экстракта (через 3 ч после введения) при всех значениях рН между контрольными животными и животными, которым вводили препараты.

На рисунке приведены значения протеолитической активности миокарда крыс при разных значениях рН среды инкубации в разные сроки после перевязки коронарной артерии и влияние на эту активность указанных препаратов. Данные по протеолитической активности миокарда в группе ложнооперированных животных показали недостоверное увеличение ее по сравнению с контролем только при рН 3,2, поэтому на рисунке не приводятся результаты по ложнооперированной группе и сравнение ведется с интактными животными.

Из рисунка видно, что в острый период ЭИМ



Изменение протеолитической активности миокарда крыс в разные сроки коронароокклюзии.

По оси абсцисс — рН среды инкубации; по оси ординат — протеолитическая активность, усл. ед. а — острая фаза ишемии (n=5); б — 5-й день после перевязки коронарной артерии (n=4).

Светлые столбики — контрольные животные, темные — оперированные, столбики со штриховкой в клетку — оперированные, получавшие верапамил, столбики с косой штриховкой — оперированные, получавшие пропранолол. Одна звездочка — p<0,05, две — p<0,02, три — p<0,001.

происходит увеличение протеолитической активности (на 30 %) при рН 3,2 (p<0,05) и при рН 7,5 (p<0,02) и не изменяется при рН 5,5. Введение оперированным животным пропранолола не изменяло активность кислых протеиназ, увеличивало активность с 0,25±0,02 до 0,35±0,01 усл. ед. (p<0,02) при рН 5,5 и ингибировало с 0,64±0,03 до 0,46±0,01 усл. ед. (p<0,001) при рН 7,5. В группе животных, которым вводили верапамил, наблюдалось снижение протеолитической активности при всех значениях рН, кроме рН 5,5, по сравнению с оперированными животными.

Протеолитическая активность экстракта миокарда на 5-й день коронароокклюзии отличается от таковой в острой фазе ишемии. Так, при рН 3,2 наблюдается незначительное увеличение эндопептидазной активности у оперированных животных (на 10 %; p<0,05) и заметное увеличение ее у животных, которым вводили пропранолол (на 30 %; p<0,01) и верапамил (на 20 %; результат недостоверен). Выявлено заметное повышение активности пептидаз с оптимумом рН 5,5 у оперированных животных по сравнению с контрольными (с 0,40±0,04 до 0,61±0,04 усл. ед.; p<0,05), которая не изменялась под действием пропранолола и незначительно уменьшалась под действием верапамила. Активность Са-активируемых протеаз миокарда оперированных животных и животных, которым вводили пропранолол, существенно не отличалась от активности этих протеаз у контрольных животных. Только верапамил вызывал почти 35 % увеличение Са-зависимой протеазной активности по сравнению с контролем (p<0,02).

Так как ранее нами было показано, что верапамил ингибирует Са-активируемую нейтральную протеазу *in vitro* [1] и ингибирует эту же активность в острый период ЭИМ, то увеличение активности на 5-й день перевязки коронарной артерии после введения верапамила, вероятно, может свидетельствовать об усилении синтеза данного фермента, что подтверждается повышением активности ингибиторов цистеиновых протеаз под действием верапамила.

При изучении активности эндогенных ингибиторов миокарда нормальных, оперированных и леченых животных использовали модельные системы: сериновые протеазы — трипсин, химотрип-

Активность эндогенных ингибиторов протеаз миокарда крыс в разные сроки после коронароокклюзии (в мкг белка экстракта миокарда в условиях опыта, вызывающего 50 % ингибирование протеаз в модельной системе, см. раздел «Методика»;  $n=4$ )

Группа животных	60 мин		5-й день	
	химотрипсин	папаин	химотрипсин	папаин
1-я — контрольные	55,0±5,0	20,2±2,0	64,8±1,9	23,0±1,5
2-я — оперированные	68,3±10,2	12,2±2,9*	53,0±3,3**	12,3±3,3*
3-я — оперированные + пропранолол	52,5±4,5	17,2±3,8	64,0±2,4*	14,7±2,9
4-я — оперированные + верапамил	53,5±7,5	14,0±4,0	50,2±8,0	9,7±2,0

Примечание. Одна звездочка —  $p<0,05$ , две —  $p<0,02$ . Результаты 2-й группы сравнивали с контролем, результаты 3-й и 4-й групп — со 2-й.

син, цистеиновую протеазу — папаин и металлопротеазу — термолизин.

Установлено, что экстракт миокарда не содержит ингибиторов термолизина и содержит относительно малое (по сравнению с другими тканями) количество ингибиторов трипсина. Поэтому дальнейшие эксперименты были проведены с химотрипсином и папаином.

В таблице представлены результаты ингибирования химотрипсина и папаина экстрактом миокарда в разные сроки коронароокклюзии.

Видно, что активность эндогенных ингибиторов химотрипсина в острый период ишемии понижается у оперированных животных на 36 % ( $p>0,05$ ) и повышается до контрольных значений у животных, получавших как пропранолол, так и верапамил. Активность ингибиторов папаина, гомологичные участки которого имеются в лизосомальных тиоловых протеазах — катепсинах В, Н, L, а также в Са-активируемой нейтральной протеазе — кальпаине, повышается на 40 % у оперированных животных по сравнению с контрольными ( $p<0,05$ ). У животных, получавших пропранолол и верапамил, наблюдается некоторое уменьшение ингибиторной активности по сравнению с оперированными на 40 и 20 % соответственно ( $p>0,05$ ).

Разница в активности ингибиторов наблюдалась также между группами животных на 5-е сутки после перевязки коронарной артерии. У оперированных животных активность ингибиторов сериновых протеаз увеличивалась на 20 % ( $p<0,02$ ), не изменяясь и при введении верапамил, в то время как пропранолол снижал активность ингибиторов до контрольных значений.

В группе оперированных животных увеличивалась на 50 % ( $p<0,05$ ) активность ингибиторов цистеиновых протеиназ, которая имела тенденцию к уменьшению после введения пропранолола. Верапамил еще в большей степени увеличивал ингибиторную активность (на 20 %;  $p<0,5$ ), по сравнению с оперированными животными.

Анализируя результаты, можно сделать следующий вывод: острая фаза ишемии миокарда сопровождается увеличением активности кислых и Са-активируемых нейтральных протеаз, а также уменьшением активности ингибиторов сериновых протеаз и увеличением активности ингибиторов тиоловых протеаз. В фазе рубцевания инфарктированных участков миокарда активируются лизосомальные тиолзависимые протеазы и значительно увеличивается активность ингибиторов сериновых и цистеиновых эндонептидаз. Кардиопрепараты

способны селективно влиять на активность как эндонептидаз, так и на их ингибиторы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Карапетян Р. Г. и др. // *Вопр. мед. химии.*— 1990.— № 3.— С. 54—57.
2. Akopyan T. N. et al. // *Neurochem. Res.*— 1978.— Vol. 3.— P. 89—99.
3. Bolli R. // *Cardiovasc. Res. Cent. Bull.*— 1982.— Vol. 21, N 1.— P. 1—33.
4. Dayton W., Schollmeyer J. V. // *J. molec. cell. Cardiol.*— 1980.— Vol. 12.— P. 533—551.
5. Jones T. L. et al. // *Amer. J. Physiol.*— 1983.— Vol. 245, N 2.— P. H. 294—H. 299.
6. Katuma N. et al. // *Muscular Dystrophy Biomedical Aspects.*— Tokyo, 1983.— P. 18—23.
7. Kwiatkowska-Patzer B., Zalewska T. // *Basic Res. Cardiol.*— 1987.— Vol. 82, N 1.— P. 18—23.
8. Lowry O. H. et al. // *J. biol. Chem.*— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
9. Tolnai S. // *Canad. J. Cardiol.*— 1986.— Vol. 2, N 1.— P. 42—47.
10. Tolnai S. // *Life Sci.*— 1987.— Vol. 41, N 9.— P. 1117—1122.
11. Tojo-Oka T. et al. // *J. molec. cell. Cardiol.*— 1979.— Vol. 11.— P. 769—788.
12. Wildenthal K. // *Ibid.*— Vol. 10, N 7.— P. 595—603.

Поступила 23.06.91

#### ACTIVITY OF PROTEOLYTIC ENZYMES AND THEIR INHIBITORS IN EXPERIMENTAL MYOCARDIAL ISCHEMIA

R. G. Karapetyan, S. S. Oganessian, T. N. Akopyan, E. G. Dzhanpoladyan

Research Institute of Cardiology, Ministry of Health of the Armenian Republic, Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the Armenian Republic, Yerevan.

Proteolytic activity and activity of endogenous inhibitors of endopeptidases (using chymotrypsin and papain) were studied in the myocardium of rats with experimental ischemia during an acute phase (60 min) and within 5 days after ligation of the left descending coronary artery; effects of the  $\beta$ -adrenoblocking agent propranolol and the calcium antagonist verapamil on these activities was also studied. During the acute phase of ischemia, the activity of acid proteases was increased by 30 %, that of  $Ca^{2+}$ -activated neutral proteases by 15—20 %. At the same time, the activity of serine proteases inhibitors was decreased while the activity of thiol protease inhibitors was increased. Within 5 days of coronary artery occlusion, Lysosomal thiol-dependent endopeptidases were activated in the myocardium; a considerably higher activity of the inhibitors of serine- and cysteine-containing endopeptidases was detected. The cardioactive drugs propranolol and verapamil affected selectively both endopeptidase activity and their inhibitors.

*В. С. Гуревич, О. М. Моисеева, И. А. Михайлова,  
А. Ю. Рой*

## АКТИВНОСТЬ ТРАНСПОРТНЫХ АТФаз И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА КЛЕТОК КРОВИ У БОЛЬНЫХ ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ

НИИ кардиологии Минздрава РСФСР, Санкт-Петербург

Нарушение транспорта ионов через клеточную мембрану при эссенциальной гипертензии рассматривается как следствие генерализованного генетически обусловленного мембранного дефекта [6] или как результат воздействия убаинноподобного ингибитора Na, К-АТФазы [16]. В качестве основной экспериментальной модели для изучения нарушений ионного гомеостаза при гипертонической болезни используют плазматические мембраны клеток крови, так как они являются легкодоступным материалом и позволяют проследить влияние биохимических изменений на функциональные свойства клеток. Показана взаимосвязь нарушений обмена натрия и кальция при первичной артериальной гипертензии с деформируемостью и осмотической стойкостью эритроцитов [19], агрегацией тромбоцитов [13]. Однако эти исследования проводились без анализа клинических аспектов заболевания, без учета возрастной неоднородности популяции эритроцитов, без параллельного изучения изменений ионного обмена в различных типах клеток в условиях одного эксперимента. Поэтому особый интерес представляет изучение в эритроцитах и тромбоцитах активности транспортных АТФаз, являющихся интегральными белками, зависящими от состояния мембран в целом, в проекции на функциональные свойства клеток.

**Методика.** Обследовано 100 мужчин. Среди них 20 человек в возрасте от 16 до 29 лет (средний возраст  $20,5 \pm 1,6$  года) с пограничной артериальной гипертензией, 20 человек в возрасте от 17 до 38 лет (средний возраст  $24,6 \pm 1,5$  года) с гипертонической болезнью I стадии и 30 человек в возрасте от 17 до 53 лет (средний возраст  $39,3 \pm 3,0$  года) с гипертонической болезнью II стадии. Классификация гипертонической болезни производилась в соответствии с критериями ВОЗ. Диагноз гипертонической болезни верифицирован после исключения симпатоматической артериальной гипертензии. Контрольную группу составили 30 практически здоровых лиц в возрасте от 16 до 55 лет (средний возраст  $24,3 \pm 1,3$  года) с артериальным давлением менее 140/90 мм рт. ст. без наследственной предрасположенности к заболеванию. В исследование не включались больные с сопутствующими заболеваниями и гиперлипидемией. За 2 нед до предполагаемого обследования отменяли гипотензивную терапию. Параллельные исследования эритроцитов и тромбоцитов выполнены у 40 обследованных больных во всех представленных группах.

Цитратную венозную кровь центрифугировали (160 г, 10 мин) для получения богатой тромбоцитами плазмы, которую повторно центрифугировали (1800 г, 20 мин). Осажденные тромбоциты ресуспендировали в буфере, содержащем 30 мМ KCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ оксалат натрия, 20 мМ трис-HCl pH 7,0 в 1/5 первоначального объема плазмы. Клетки разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора (20 кГц, 10 с). Полученный гомогенат центрифугировали (1600 г, 5 мин). Мембранную фракцию тромбоцитов (концентрация белка около 1 мг/мл) получали на агарозном геле сефароза CL 6B [2] и использовали для определения активности АТФаз.

Фракции молодых и старых эритроцитов получали путем дифференциального центрифугирования в собственной плазме по методу [17]. Оценку чистоты разделения осуществляли

путем подсчета ретикулоцитов и определения среднего объема эритроцитов каждой фракции с помощью счетчика крови «Nucel» (Франция). Третье отмывание в изотоничной среде (0,145 М NaCl в 20 мМ трис-HCl-буфере pH 7,6 при 4 °С) фракции молодых и старых эритроцитов, а также нефракционированные эритроциты использовали для получения теней [3]. Активность Na, К-АТФазы определяли по приросту неорганического фосфата ( $\Phi_{\text{н}}$ ), отщипнувшегося в оптимальных условиях от АТФ путем инкубации мембранной фракции тромбоцитов или теней эритроцитов в среде, содержащей 100 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 3 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2,5 мМ АТФ, 50 мМ трис-HCl pH 7,1 без добавления и в присутствии 0,2 мМ убаина. Инкубационная среда для определения активности Na, Са-АТФазы тромбоцитов содержала 100 мМ KCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2,5 мМ АТФ, 20 мМ трис-HCl pH 7,5 в присутствии 0,1 мМ СаCl<sub>2</sub> или 1 мМ ЭГТА. Инкубацию проводили в течение 30 мин при 44 °С для теней эритроцитов или при 37 °С для мембранной фракции тромбоцитов. Реакцию останавливали добавлением 15 % раствора трихлоруксусной кислоты.  $\Phi_{\text{н}}$  определяли нефелометрически [12]. Активность АТФазы выражали в микромолях  $\Phi_{\text{н}}$  за 1 ч на 1 мг белка, определяемого по методу [15].

Агрегацию эритроцитов определяли, как описано ранее [1] и выражали в процентах неагрегированных эритроцитов. Деформируемость эритроцитов оценивали с помощью пробы на усаховку при центрифугировании обработанных (принятые за 100 %) и необработанных глутаральдегидом эритроцитов [5]. Внутриклеточную концентрацию натрия в эритроцитах определяли с помощью атомно-абсорбционного спектрофотометра ААС-3 («Carl Zeiss», Германия) после 6-кратного отмывания клеток в изотоничном буфере (108 мМ MgCl<sub>2</sub> в 10 мМ трис-HCl pH 7,4) и осаждения мембранной фракции при центрифугировании (20 000 г, 20 мин) [18].

Бедную тромбоцитами плазму использовали для определения тромбоцитарного фактора IV по методу [7], адаптированному к прибору для коагуляционных исследований («Biometieux», Франция). Прижизненную агрегацию тромбоцитов определяли по известному методу [10], адаптированному для подсчета клеток с помощью счетчика крови «Nucel» (Франция).

Математическую обработку результатов проводили с помощью непараметрических методов статистики: критерия Вилькоксона—Манна—Уитни, точного метода Фишера, рангового коэффициента корреляции Спирмена.

**Результаты и обсуждение.** По мере становления гипертонической болезни происходит ухудшение реологических свойств крови за счет снижения деформации, повышения агрегации эритроцитов и активации тромбоцитов (табл. 1 и 2). Уже на стадии пограничной артериальной гипертензии происходит достоверное повышение содержания тромбоцитарного фактора IV в плазме крови с дальнейшим его увеличением при гипертонической болезни I и особенно II стадии, что свидетельствует, по-видимому, о повышении функциональной активности тромбоцитов при стабилизации повышенного артериального давления. У больных гипертонической болезнью II стадии отмечали появление в крови спонтанных агрегатов тромбоцитов. Изменение деформационных свойств эритроцитов при эссенциальной гипертензии связано с нарушением ионного гомеостаза, что подтверждается наличием положительной корреляционной зависимости между активностью Na, К-АТФазы теней эритроцитов и их деформируемостью при гипертонической болезни II стадии ( $r=0,823$ ;  $p<0,01$ ;  $n=12$ ). В настоящей работе показано, что по мере развития гипертонической болезни происходит увеличение концентрации натрия в эритроцитах. Одним из механизмов повышения содержания внутриклеточного натрия при первичной артериальной гипертензии является дефект активного выхода натрия из клетки, опосредованный убаинчувствительной Na, К-АТФазой [9]. Выявлена отрицательная корреляционная связь между активностью Na, К-АТФазы

Реологические показатели крови и активность Na, К-АТФазы субпопуляций эритроцитов при пограничной артериальной гипертензии (ПАГ) и гипертонической болезни (ГБ)

Группы обследованных	Среднее артериальное давление, мм рт. ст.	Агрегация эритроцитов, %	Коэффициент деформации эритроцитов	Концентрация натрия в эритроцитах, ммоль/л	Активность Na, К-АТФазы, мкмоль $\Phi_n$ на 1 мг белка за 1 ч		
					фракция молодых эритроцитов	фракция старых эритроцитов	общий пул эритроцитов
1. Контроль (n=30)	88±2,2	35,5±2,0	0,595±0,013	7,81±0,2	0,754±0,014	0,359±0,015	0,456±0,007
2. ПАГ (n=20)	100±1,4	32,5±2,3	0,597±0,016	7,07±0,41	0,753±0,016	0,437±0,023	0,549±0,021
$p_{1-2}$	<0,01	>0,05	>0,05	<0,05	>0,05	<0,05	<0,05
3. ГБ I стадии (n=20)	105±1,4	26,2±2,3	0,647±0,017	8,65±0,65	0,693±0,031	0,378±0,018	0,515±0,024
$p_{1-3}$	<0,01	<0,05	<0,01	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
$p_{2-3}$	<0,05	<0,05	<0,01	=0,05	<0,05	>0,05	>0,05
4. ГБ II стадии (n=30)	117±2,4	19,0±1,3	0,744±0,022	9,68±0,29	0,577±0,019	0,322±0,019	0,439±0,016
$p_{1-4}$	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	>0,05	>0,05
$p_{3-4}$	<0,01	<0,01	<0,01	0,05	<0,01	<0,01	<0,01

и содержанием натрия в эритроцитах ( $r = -0,641$ ;  $p < 0,01$ ;  $n = 20$ ).

Имея наибольшую из клеток крови продолжительность жизни, популяция эритроцитов характеризуется возрастной, а следовательно, и функциональной неоднородностью. Известно, что старение эритроцитов сопровождается снижением ферментативной активности всех путей метаболизма, что приводит к кумуляции натрия и кальция в клетке [8]. Нами изучены изменения активности Na, К-АТФазы эритроцитов с учетом процесса их естественного старения у больных с различными стадиями гипертонической болезни. Было выявлено, что при пограничной артериальной гипертензии и частично при гипертонической болезни I стадии происходит повышение активности Na, К-АТФазы за счет фракции старых эритроцитов, что, вероятно, является компенсаторным механизмом, направленным на снижение содержания внутриклеточного натрия. В отличие от эритроцитов в тромбоцитах, являющихся более чувствительными и короткоживущими клетками, отмечается тенденция к снижению активности Na, К-АТФазы на этих стадиях заболевания. Гипертоническая болезнь II стадии характеризуется снижением активности Na, К-АТФазы во фракции молодых эритроцитов и в тромбоцитах, что, вероятно, обусловлено влиянием гуморальных и гормональных факторов на костномозговую продукцию клонов клеток с уменьшенной активностью АТФазы [18].

Повышенная функциональная активность тромбоцитов больных гипертонической болезнью может быть связана с нарушением гомеостаза также

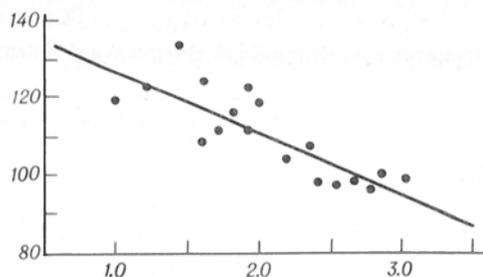
и двухвалентных катионов. Нами обнаружено снижение активности Mg, Са-АТФазы на 23 % уже у лиц с пограничной гипертензией (см. табл. 2). При гипертонической болезни II стадии это снижение составляет 42 % от уровня контроля, что подтверждается описанной в литературе обратной зависимостью между уровнем Mg, Са-АТФазы кровяных пластинок и их функциональной активностью [4]. Снижение активности кальциевого насоса может быть связано с системной альтерацией клеточных мембран при эссенциальной гипертензии [6], а также с нарушением взаимоотношения ферментного белка с пулом кальмодулина в клетке [11] и циклическими нуклеотидами [14].

Известно, что содержание кальция в цитозоле тромбоцитов повышается под влиянием переменного гидростатического давления [13]. При изучении изменения активности Mg, Са-АТФазы мембранной фракции тромбоцитов в зависимости от артериального давления выявлена отрицательная корреляция между активностью кальциевого насоса и средним артериальным давлением у больных гипертонической болезнью ( $r = -0,71$ ;  $p < 0,01$ ;  $n = 18$ ) (см. рисунок). Аналогичная зависимость прослеживается при сопоставлении активности Na, К-АТФазы тромбоцитов и среднего артериального давления ( $r = -0,68$ ;  $p < 0,01$ ;  $n = 17$ ). Однако высокая степень отрицательной корреляционной зависимости активности Na, К-АТФазы эритроцитов от артериального давления была выявлена только при гипертонической болезни I стадии и пограничной артериальной гипертензии ( $r = -0,535$ ;  $p < 0,01$ ;  $n = 25$ ).

Таблица 2

Показатели функциональной активности тромбоцитов и активностей Mg, Са- и Na, К-АТФазы в мембранной фракции тромбоцитов при пограничной артериальной гипертензии и гипертонической болезни

Группы обследованных	Тромбоцитарный фактор 4, с	Спонтанные агрегаты тромбоцитов, %	Активность Na, К-АТФазы мкмоль $\Phi_n$ на 1 мг белка за 1 ч	Активность, Са-АТФазы, мкмоль $\Phi_n$ на 1 мг белка за 1 ч
1. Контроль (n=17)	0,94±0,24	0	0,58±0,05	2,73±0,15
2. Пограничная артериальная гипертензия (n=6)	3,96±1,46	0	0,50±0,06	2,1±0,24
$p_{1-2}$	<0,05		>0,05	<0,05
3. Гипертоническая болезнь I стадии (n=6)	6,0±1,8	0	0,47±0,04	2,08±0,2
$p_{1-3}$	<0,01		>0,05	<0,025
4. Гипертоническая болезнь II стадии (n=11)	8,9±1,14	16,3±2,7	0,31±0,05	1,6±0,11
$p_{1-4}$	<0,01		<0,01	<0,01



Корреляция между активностью Mg, Ca-АТФазы (в мкмоль Ф<sub>i</sub> на 1 мг белка за 1 ч) — по оси абсцисс и средним артериальным давлением (в мм рт. ст.) — по оси ординат.

Таким образом, комплексное изучение эритроцитов и тромбоцитов в условиях одного исследования позволяет выявить наряду с общими и специфические черты в изменении функциональных свойств клеток по мере развития гипертонической болезни.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ликинази И. Я. Эритроцит и внутреннее тромбопластинообразование. — Л., 1977. — С. 51—54.
2. Гуревич В. С., Схоль-Энгбертс А. Д., Попов Ю. Г. // Биохимия. — 1990. — № 5. — С. 808—813.
3. Казенков А. М., Маслова М. Н., Шалабодов А. Д. // Там же. — 1984. — № 7. — С. 1089—1095.
4. Михайлова И. А., Шевченко Н. Н., Шимлинг В., Гуревич В. С. // Кардиология. — 1987. — № 3. — С. 113.
5. Моисеев С. И. // Там же. — 1988. — № 11. — С. 67—71.
6. Постков Ю. В., Орлов С. П. Первичная гипертония как патология клеточных мембран. — М., 1987.
7. B'Brien J. R., Etherinton M., Jamieson S., Lawford P. // Lancet. — 1974. — Vol. 2. — P. 656—657.
8. Bernstein R. E. // Advances in Haematology. — 1987. — P. 132—133.
9. Blaustein M. P. // Hypertension. — 1984. — Vol. 6, N 4. — P. 445—453.
10. Bowry S. R. // Thrombos. Haemostas. — 1985. — Vol. 53, N 3. — P. 381—385.
11. Cantaro S., Calo L., Vianello A. et al. // Regul. Pept. — 1985. — Vol. 4. — P. 144—147.
12. Eible H., Lands W. E. M. // Analyt. Biochem. — 1969. — Vol. 30. — P. 51—57.
13. Erne P., Bolli P., Burgisser E., Buhler F. R. // New Engl. J. Med. — 1984. — Vol. 310. — P. 1084—1088.
14. Le Quan Sang K. G., Montenay-Garestier T., Devynck M. A. // Nouv. Rev. franc. Hemat. — 1985. — Vol. 27. — P. 279—283.
15. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
16. Mac Gregor G. A. // Hypertension. — 1985. — Vol. 7, N 4. — P. 628—637.
17. Murphy J. R. // J. Lab. clin. Med. — 1973. — Vol. 82. — P. 334—341.
18. Ringel R. E., Hamlyn J. M., Hamilton B. P. et al. // Hypertension. — 1987. — Vol. 91, N 5. — P. 437—443.
19. Tsuda K., Minatogawa J., Furuya S. et al. // Jap. Circulat. J. — 1986. — Vol. 50, N 11. — P. 1158—1164.

Поступила 05.08.91

#### ACTIVITY OF TRANSPORT ATPASES AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF BLOOD CELLS IN PATIENTS WITH HYPERTENSIVE DISEASE

V. S. Gurevich, O. M. Moiseeva, I. A. Mikhailova, A. Yu. Roy  
Research Institute of Cardiology, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg

Complex examination of 30 apparently healthy volunteers, 70 patients with Stages I-II hypertension and transient arterial hypertension was carried out. Impairment of blood rheologic properties and distinct decrease in the platelet activity of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>- and Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>-ATPases were detected in development of hypertensive disease. In transient arterial hypertension

the activity of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase was increased in the erythrocyte membranes due to the fraction of old erythrocytes, while in Stage II hypertensive disease the enzymatic activity was decreased mainly in the fraction of young erythrocytes.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.36-008.939.15-02:[615.917:547.262]-092.9

М. И. Селевич, Б. И. Горенштейн,  
Ю. М. Островский

#### ЛИПИДНЫЕ ФРАКЦИИ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ ЭТАНОЛА И ЭТАНОЛАМИНА

Институт биохимии АН Беларуси, Гродно

В механизмах алкогольной зависимости, расшифровке токсического действия этанола значительное место отводится нарушениям в обмене липидов и перестройкам липидной композиции биомембран [24]. Поэтому поиск эффективных средств защиты от неблагоприятного влияния алкоголя на организм не исключает активного вмешательства в соответствующие процессы агентов, стабилизирующих липидный обмен в желаемом направлении. Этаноламин (ЭА), по теперешним представлениям, заслуживает особого внимания как непосредственный компонент фосфолипидов и как соединение, структурно сходное с этанолом. Уже известно, что ЭА *in vitro* тормозит активность алкогольдегидрогеназы [7], а *in vivo* проявляет аналогичное действие и в отношении альдегиддегидрогеназы [9]. ЭА — естественный метаболит, обладающий очень малой токсичностью, он способен уменьшать проявление алкогольной интоксикации у крыс [17], снижает продолжительность наркотического сна у них, вызываемого введением алкоголя (4 г/кг внутривенно) [1].

В данное время нет ясных представлений о путях метаболизма ЭА. Известно лишь, что он активно фосфорилируется в организме животных, служит предшественником холина [16], проходя реакции последовательного метилирования, способен превращаться в ацетат с последующим включением в синтезе жирных кислот, холестерина и сфингозина [4, 19]. Недавно показано [12], что свободный ЭА используется мембранами в синтезе фосфатидилэтанолamina путем прямой замены любого связанного с другими фосфолипидами основания. Показано, что индуцированное ЭА увеличение уровня фосфатидилэтанолamina в гепатоцитах печени крыс сопровождается повышением скорости N-метилирования фосфатидилэтанолamina [10], т. е. наблюдается авторегулирующая синтеза фосфатидилхолина субстратом. Введение животным (крысы) ЭА в дозе 100 мг/кг сопровождается повышением его содержания в печени к 1-му часу, а также фосфэтаноламина в этой ткани [7]. Установлено, что введение мышам ЭА (5 мг) вызывает значительное увеличение активности этаноламинкиназы и холинкиназы в печени [21]. Показано также, что при острой алкогольной интоксикации угнетается в печени киназа ЭА [22].

Методика. В опытах использовали крыс-самцов массой 160—180 г, содержащихся на обычном рационе вивария.

Содержание общих липидов, холестерина, фосфолипидов (в мг%), фракций фосфолипидов (в %) печени крыс при введении этанола и ЭА

Исследуемый показатель	Контроль	Этанол	ЭА	ЭА+этанол
Общие липиды	7389±466	8964±481*	6707±569	8721±385*
Холестерин	362±24	386±14	400±26	295±23**
Общие фосфолипиды	2845±94	2937±97	2787±90	2924±87*
Лизофосфатидилхолин	7,2±0,4	10,6±0,5*	6,7±0,5	8,3±0,6**
Сфингомиелин	12,9±1,0	14,0±0,6	12,1±0,7	12,3±0,8
Фосфатидилхолин	38,5±1,2	32,5±1,5*	40,4±3,3	38,4±1,0**
Фосфатидилэтанолламин	23,7±1,7	28,8±0,6*	25,6±1,5	29,1±0,8**
Кардиолипин	11,5±0,4	13,3±0,6*	12,2±0,7	11,5±0,6**

Примечание. Здесь и в табл. 2: одна звездочка — достоверные изменения по отношению к контрольной группе, две — отношение группы ЭА + этанол к этанолу.

В эксперименте животные были разделены на 4 группы по 8 крыс в каждой: 1-я — контрольная (изотонический раствор NaCl внутрибрюшинно (в/б) и внутривенно (в/ж), 2-я — 25 % раствор этанола в/ж в дозе 1 г/кг массы, 3-я — ЭА в/б (100 мг/кг), 4-я — ЭА в/б (100 мг/кг)+25 % раствор алкоголя в/ж в указанной выше дозе. Все препараты вводили на 1 ч. На этот же срок всем группам крыс делали подкожные инъекции 2-<sup>14</sup>C-ацетата в дозе 20 мкКи на 100 г массы животного. За 16 ч до декапитации крыс лишали пищи, оставляя доступ к воде. Получение липидного экстракта и его очистку проводили по методу Фолча [13]. Количество общих липидов, холестерина определяли по общепринятым методикам, описанным в литературе [8]. Содержание фосфолипидов определяли по фосфору [20], а соотношение фосфолипидных фракций вычисляли в процентах фосфора фосфолипидов каждой фракции к сумме липидного фосфора, принятого за 100 %.

Нейтральные липиды разделяли в тонком слое силикагеля в системе растворителей гексан—диэтиловый эфир—уксусная кислота (73:25:2), фосфолипидные фракции — используя систему хлороформ—метанол—вода (65:25:4) [8]. Удельную радиоактивность липидов (общие липиды, холестерин, ди-, триацилглицерин, эфиры холестерина, общие фосфолипиды) и фракций фосфолипидов определяли в жидкостном сцинтилляционном спектрометре «Magk-II» фирмы «Nuclear Chicago» и выражали в импульсах на 1 мг за 1 мин и импульсах на 1 г-атом Р·10<sup>3</sup> за 1 мин соответственно. Для определения включения метки из 2-<sup>14</sup>C-ацетата в гидрофильную и гидрофобную части липидов проводили их жесткий гидролиз [5].

**Результаты и обсуждение.** Введение этанола сопровождается повышением в печени концентрации общих липидов, относительного содержания лизофосфатидилхолина, фосфатидилэтанолламина и кардиолипина при одновременном снижении уровня фосфатидилхолина (табл. 1).

Снижение относительного содержания фосфатидилхолина могло произойти в результате усиления его деацелирования, поскольку известно, что однократное введение алкоголя значительно увеличи-

вает активность фосфолипазы А [14]. Как следствие в печени в этих условиях возрастает и количество лизофосфатидилхолина. Вычисление коэффициента корреляции между содержанием фосфатидилхолина и лизофосфатидилхолина еще раз указывает на правомерность наших рассуждений. Действительно, если в контрольной группе крыс отсутствует какая-либо взаимосвязь ( $r = -0,108$ ;  $p > 0,5$ ) между указанными показателями, то при нагрузке этанолом она стала достаточно выраженной и отрицательной ( $r = -0,845$ ;  $p < 0,01$ ).

Нагрузка относительно невысокой дозой алкоголя приводит к уменьшению включения метки из 2-<sup>14</sup>C-ацетата в эфиры холестерина, общие фосфолипиды и их фракции (лизофосфатидилхолин, сфингомиелин, фосфатидилэтанолламин и кардиолипин) (табл. 2). При этом установлено, что снижение удельной радиоактивности фосфатидилэтанолламина больше касается жирнокислотного фрагмента (опыт —  $124 \pm 13$  имп/г-атом Р·10<sup>3</sup> за 1 мин, контроль —  $233 \pm 21$  имп/г-атом Р·10<sup>3</sup> за 1 мин;  $p < 0,01$ ), чем входящей в него гидрофильной части, радиоактивность которой не изменялась. Снижение включения метки из 2-<sup>14</sup>C-ацетата в фосфатидилэтанолламин и его гидрофобный компонент свидетельствует о том, что этанол ингибирует синтез жирных кислот, что вполне согласуется с известными данными о снижении активности ацетил-КоА-синтетазы (основного источника, поставляющего ацетил-КоА для биосинтеза жирных кислот) при остром введении алкоголя [3]. Не исключена возможность и разведения метки немеченым ацетатом, образующимся из этанола. Следовательно, увеличение относитель-

Таблица 2

Удельная радиоактивность липидов (в имп/мг за 1 мин), фракций фосфолипидов (имп/г-атом Р·10<sup>3</sup> за 1 мин) печени крыс при введении этанола и ЭА

Исследуемый показатель	Контроль	Этанол	ЭА	ЭА+этанол
Общие липиды	587±59	734±84	419±24*	728±65
Холестерин	484±86	394±38	495±58	235±35**
Диацилглицерин	57±11	43±4	52±11	59±9*
Триацилглицерин	970±115	765±65	866±53	741±78
Эфиры холестерина	97±13	53±5*	107±15	69±8
Общие фосфолипиды	440±22	286±10*	337±18*	295±22*
Лизофосфатидилхолин	186±22	67±11*	167±11	120±12**
Сфингомиелин	125±21	65±7*	133±17	163±27**
Фосфатидилхолин	389±46	356±26	281±26*	379±24
Фосфатидилэтанолламин	340±44	160±10*	198±25*	234±14**
Кардиолипин	57±5	26±4*	59±6	34±10*

го содержания фосфатидилэтаноламина при одновременном снижении удельной радиоактивности этой фракции подтверждает, что это повышение связано с угнетением этанолом его катаболизма. Косвенным доказательством этого могут служить литературные данные об ингибировании небольшими дозами алкоголя активности фосфолипазы С [15] и данные, полученные в нашей лаборатории, об увеличении количества указанного выше фосфолипида при острой алкогольной интоксикации [3].

В аналогичной экспериментальной ситуации (см. табл. 2) не выявлено существенных различий по удельной радиоактивности фосфатидилхолина печени между изучаемыми группами крыс, что указывает на нормальное течение реакций синтеза данного липида. Это подтвердилось результатами других авторов [18], указывающими, что при остром введении этанола не обнаружено изменений в скорости метилирования при синтезе фосфатидилхолина из фосфатидилэтаноламина, а также не выявлено значимых сдвигов в активности холинкиназы при биосинтезе его по цитидиновому пути [23]. В связи с этим (кроме приведенного выше допущения) снижение относительного уровня фосфатидилхолина при неизменной его удельной радиоактивности может происходить, по-видимому, вследствие активации этанолом процессов распада данного фосфолипида.

Снижение включения метки из  $2\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетата в сфингомиелин и кардиолипин происходит из-за понижения удельной радиоактивности их гидрофильного фрагмента (соответственно опыт —  $8630 \pm 594$  имп/г-атом  $\text{P} \cdot 10^3$  за 1 мин, контроль —  $13\,970 \pm 1796$  имп/г-атом  $\text{P} \cdot 10^3$  за 1 мин; опыт —  $2777 \pm 127$  имп/г-атом  $\text{P} \cdot 10^3$  за 1 мин; контроль —  $3493 \pm 187$  имп/г-атом  $\text{P} \cdot 10^3$  за 1 мин;  $p < 0,01$ ). Приемимая во внимание, что острая алкогольная интоксикация, как правило, сопровождается угнетением цикла трикарбоновых кислот и реакций глюконеогенеза [11], вполне понятным становится снижение удельной радиоактивности гидрофильной части указанных фракций фосфолипидов, тем более что включение меченого предшественника сопряжено с этими метаболическими потоками.

После введения этаноламина не выявлено существенных различий в уровне липидных фракций (см. табл. 1). В этих условиях происходит снижение удельной радиоактивности общих липидов, фосфолипидов, фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина (см. табл. 2). Причем установлено, что понижение включения  $2\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетата в фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин происходит как в жирные кислоты (соответственно опыт —  $140 \pm 15$  имп/г-атом  $\text{P} \cdot 10^3$  за 1 мин, контроль —  $189 \pm 18$  имп/г-атом  $\text{P} \cdot 10^3$  за 1 мин;  $p < 0,05$ ; опыт —  $148 \pm 11$  имп/г-атом  $\text{P} \cdot 10^3$  за 1 мин, контроль —  $200 \pm 21$  имп/г-атом  $\text{P} \cdot 10^3$  за 1 мин;  $p < 0,01$ ), так и в их гидрофильные фрагменты (соответственно опыт —  $1272 \pm 71$  имп/г-атом  $\text{P} \cdot 10^3$  за 1 мин, контроль —  $1542 \pm 119$  имп/г-атом  $\text{P} \cdot 10^3$  за 1 мин;  $p < 0,05$ , опыт —  $1654 \pm 73$  имп/г-атом  $\text{P} \cdot 10^3$  за 1 мин, контроль —  $1972 \pm 95$  имп/г-атом  $\text{P} \cdot 10^3$  за 1 мин;  $p < 0,05$ ).

Для правильной трактовки полученных результатов следует отметить, что ЭА является весьма реакционноспособным соединением и подвергается в организме многочисленным превращениям. Так,

некоторые авторы [7] допускают, что окисление спиртовой группы ЭА может привести к синтезу глицина. Взаимопревращения глицина и серина хорошо известны [6]. Серин в свою очередь является непосредственным предшественником в биосинтезе серинфосфатидов; декарбоксилирование последних может приводить к образованию этаноламинфосфолипидов. Судьба аминогруппы ЭА представляется несколько более сложной. Деаминация первичных алифатических аминов моноаминоксидазами тканей животных известно [2]. Прямых данных для ЭА на этот счет нет. По ряду косвенных показателей (возрастание уровня мочевины в крови или глутамина в мозгу после введения ЭА [7]) можно предположить, что введенный ЭА стал дополнительным источником аммиака. Полагают, что при осуществлении окислительного деаминации ЭА образуется скорее всего гликолевый альдегид, при восстановительном деаминации — этанол. Действительно, возрастание в 1,5—2 раза содержания эндогенного этанола в печени в проведенном исследовании (введение животным этаноламина в дозе 100 мг/кг массы) подтверждает высказанное предположение. Этим данным можно дать и другое объяснение: ЭА тормозит активность алкогольдегидрогеназы [7] и как следствие в ткани печени накапливается эндогенно образующийся этанол. Имеются результаты, указывающие [22] на обратные отношения этаноламинкиназы с дополнительно вводимым этанолом. Если допустить, что ЭА в животном организме может превращаться в ацетат [19], то в нашей экспериментальной ситуации (нагрузка ЭА) снижение удельной радиоактивности фосфатидилэтаноламина могло произойти в связи с большим разведением метки немеченым ацетатом, образующимся при катаболизме ЭА или из эндогенно накапливающегося этанола. Учитывая, что синтез фосфатидилхолина опосредован через фосфатидилэтаноламин [10], соответственно снижается включение метки из  $2\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетата и в него.

Совместное введение ЭА и алкоголя приводит (по отношению к группе, получавшей только этанол) к снижению в печени содержания холестерина, лизофосфатидилхолина, кардиолипина и повышению относительного уровня фосфатидилхолина (см. табл. 1). Причем установлено, что между лизофосфатидилхолином и фосфатидилхолином после нагрузки этанолом была обратная взаимосвязь ( $r = -0,845$ ;  $p < 0,01$ ), она же осталась еще более достоверной и после совместного введения ЭА и этанола ( $r = -0,874$ ;  $p < 0,001$ ). Однако если в первом случае инъекция этанола по сравнению с контролем сопровождалась снижением количества фосфатидилхолина при одновременном увеличении содержания лизофосфатидилхолина, то во втором введение ЭА и этанола по отношению к группе, получавшей только алкоголь, приводит, наоборот, к увеличению концентрации фосфатидилхолина и понижению концентрации лизофосфатидилхолина (см. табл. 1), т. е. в данном случае речь может идти об ЭА как агенте, который выступает в роли активатора соответствующих ацилтрансфераз.

В идентичных условиях снижена удельная радиоактивность холестерина печени, увеличена — лизофосфатидилхолина, сфингомиелина и фосфа-

тидилэтанолamina (см. табл. 2). Причем снижение количества холестерина с одновременным понижением включения в него 2-<sup>14</sup>С-ацетата говорит о том, что ЭА выступает в роли фактора, тормозящего синтез указанной липидной фракции.

К заслуживающим внимания эффектам ЭА в его комбинации с этанолом на метаболизм липидов печени следует отнести, видимо, то обстоятельство, что совместное введение указанных препаратов, как правило, приводит к нормализации большинства липидных показателей (как по содержанию, так и по их удельной радиоактивности) по отношению к контрольной группе.

Исследование включения ацетата в фосфатидилэтанолamin показало, что повышение его удельной радиоактивности происходит за счет усиленного внедрения метки из 2-<sup>14</sup>С-ацетата как в гидрофобную часть (ЭА+этанол —  $238 \pm \pm 8$  имп/г-атом  $P \cdot 10^3$  за 1 мин, этанол —  $154 \pm \pm 25$  имп/г-атом  $P \cdot 10^3$  за 1 мин;  $p < 0,01$ ), так и в гидрофильный фрагмент (ЭА+этанол —  $1711 \pm 93$  имп/г-атом  $P \cdot 10^3$  за 1 мин, этанол —  $1434 \pm 89$  имп/г-атом  $P \cdot 10^3$  за 1 мин;  $p < 0,05$ ). Отмеченные ранее результаты исследований нашей лаборатории [7] и данные других авторов [9] об ингибировании ЭА активности алкоголь- и альдегиддегидрогеназы печени позволяют предположить, что накапливающийся в этих условиях этанол скорее всего способствует активации соответствующих этапов метаболизма фосфатидилэтанолamina (гидрофобная и гидрофильная части) из 2-<sup>14</sup>С-ацетата.

Введенный в организм животных ЭА в относительно невысокой, явно нетоксической дозе, не только сам активно метаболизируется (фосфоэтанолamin, глицин), но и существенно влияет на содержание отдельных липидов и их фосфолипидных фракций, а также на включение в их состав (жирные кислоты, гидрофильная часть) меченого предшественника. Совместная нагрузка ЭА и этанолом несколько изменила у сравниваемых групп крыс метаболизм липидов, но при этом наиболее интересным следует считать исчезновение ранее имевшихся различий (полученных при введении только этанола). В свете изложенных данных целесообразным является более детальное изучение возможности применения ЭА или его производных не только как противоалкогольных препаратов, но как метаболита, нормализующего обмен липидов при алкогольной интоксикации.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Авагимян Э. А., Дурухян С. А., Гюльбазян Т. А., Камалян Р. Г. // Биол. журн. Армении.— 1987.— Т. 40, № 10.— С. 815—819.
2. Буданцев А. Ю. Моноаминоэргические системы мозга.— М., 1976.
3. Буко В. У., Селевич М. И., Горенштейн Б. И., Островский Ю. М. // Фармакол. и токсикол.— 1984.— № 6.— С. 67—70.
4. Камалян Р. Г., Язычян А. С., Бабина Э. Я., Авагимян Э. А. // Биол. журн. Армении.— 1975.— Т. 28, № 3.— С. 85—89.
5. Кейтс М. Техника липидологии.— М., 1975.
6. Ленинджер А. Биохимия.— М., 1976.
7. Метаболические предпосылки и последствия потребления алкоголя / Островский Ю. М., Сатановская В. И., Островский С. Ю. и др.— Минск, 1988.
8. Методы биохимических исследований / Под ред. М. И. Прохоровой.— Л., 1982.

9. Садовник М. Н., Сатановская В. И. Биохимия алкоголизма.— Минск, 1980.
10. Akesson B. // FEBS Lett.— 1978.— Vol. 92, N 2.— P. 177—180.
11. Badawy A. // Brit. J. Alcohol. Alcohol.— 1977.— Vol. 12, N 1.— P. 30—42.
12. Corazzi L., Porcellati G., Freysz L. et al. // J. Neurochem.— 1986.— Vol. 46, N 1.— P. 202—207.
13. Folch J. B., Lees M., Stanley G. H. // J. biol. Chem.— 1957.— Vol. 226.— P. 497—499.
14. Hoek J. B., Thomas A. P., Rubin R., Rubin E. // Ibid.— 1987.— Vol. 262, N 2.— P. 682—691.
15. Hudspith M., Littleton J. M. // Brit. J. Pharmacol.— 1985.— Vol. 84, Suppl.— P. 130.
16. Kewitz H., Pleul O. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1976.— Vol. 73, N 7.— P. 2181—2185.
17. Krsiak M., Borgesova M., Fernandez S. // Activ. nerv. super.— 1971.— Vol. 13, N 3.— P. 197—198.
18. Roberti R., Binaglia L., Michal G. et al. // Biochem. Pharmacol.— 1974.— Vol. 23, N 23.— P. 3289—3298.
19. Sprinson D. B., Weliky J. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1969.— Vol. 36, N 5.— P. 866—870.
20. Svanborg A., Svennerholm L. // Acta med. scand.— 1961.— Vol. 169.— P. 43—49.
21. Upreti R. K. // Canad. J. Biochem.— 1979.— Vol. 57, N 7.— P. 981—989.
22. Upreti R. K., Chanka R. // Toxicology.— 1978.— Vol. 11, N 4.— P. 297—301.
23. Upreti R. K., Shanker R. // Ibid.— N 3.— P. 297—302.
24. Wood W. G., Schroeder F. // Life Sci.— 1988.— Vol. 43, N 6.— P. 467—475.

Поступила 10.10.91

#### LIPID FRACTIONS OF RAT LIVER TISSUE AFTER ADMINISTRATION OF ETHANOL AND ETHANOLAMINE.

M. I. Selevich, B. I. Gorenshstein, Yu. M. Ostrovsky

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

After a single intragastric administration of 25 % ethanol in a dose of 1 g/kg of body mass content of total lipids, lysophosphatidyl choline, phosphatidyl ethanolamine and cardiolipin was increased while phosphatidyl choline was decreased in the rat liver tissue. At the same time, there was a decrease in the rate of 2-<sup>14</sup>C-acetate incorporation into esters of cholesterol, total phospholipids, lysophosphatidyl choline, sphingomyelin, phosphatidyl ethanolamine and cardiolipin. Administration of ethanolamine simultaneously with ethanol contributed to normalization of the lipid spectrum, impaired by the single ethanol inoculation.

© Ю. П. ТАРАН, Л. Н. ШИШКИНА, 1993

УДК 616-008.939.15-39-02:615.273.31-07

Ю. П. Таран, Л. Н. Шишкина

#### ВЛИЯНИЕ 6-МЕТИЛУРАЦИЛА НА НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ СИСТЕМЫ РЕГУЛЯЦИИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ОРГАНИЗМЕ

Институт химической физики им. Н. Н. Семенова РАН, Москва

В настоящее время установлено, что стационарность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в норме обеспечивается функционированием физико-химической системы регуляции окислительных реакций в липидах [24], параметрами которой, в частности, являются уровень антиокислительной активности (АОА) липидов, их состав и способность к окислению. Эта система играет существенную роль в защите мембран от повреждающих факторов и в значительной степени реализует действие биологически активных веществ, в том числе и антиоксидантов [6]. В связи

с этим изучение динамики изменений параметров физико-химической системы при воздействии каким-либо препаратом или лекарственным веществом позволяет оценить роль этих соединений в регуляции ПОЛ в организме.

Как известно, при развитии целого ряда патологических состояний в организме возникают закономерные изменения уровня ПОЛ, для коррекции которых применяют антиоксиданты. В зависимости от дозы и способов применения они проявляют широкий спектр биологического и (или) терапевтического действия. В частности, показано, что антиоксиданты стимулируют процессы клеточной пролиферации [2], биосинтеза белка [1], оказывают противовоспалительное действие [27].

Установлено наличие антиоксидантных свойств и у целого ряда лекарственных веществ [7, 12, 25, 28]. Показано, что широко применяемый в медицинской практике 6-метилурацил (6-МУ) способен снижать интенсивность ПОЛ в модельных системах [14, 16, 18], в опытах *in vivo* [17, 18], а также влиять на активность некоторых ферментов антиоксидантной защиты при развитии патологических состояний [15]. В этих работах обычно применяли многократное, часто местное введение препарата в относительно больших дозах и на фоне ярко выраженных патологических сдвигов. Большое разнообразие биологических и терапевтических свойств 6-МУ, а именно влияние на биосинтез белка и нуклеиновых кислот [19], положительный эффект на течение ожоговой травмы [23], противовоспалительное [9], а при определенных дозах и радиозащитное [10], действие позволяют предположить, что одним из путей реализации этих эффектов является способность 6-МУ оказывать существенное воздействие на систему регуляции ПОЛ в организме.

В связи с изложенным целью настоящей работы заключалась в изучении динамики изменений параметров физико-химической системы регуляции ПОЛ (АОА, состав, окисленность липидов), а также активности супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы в тканях интактных животных при однократном введении 6-МУ.

**Методика.** Работа проведена на 120 мышках-самках линии BALB, 120 мышках-самках линии SHK массой 18–22 г и 12 белых беспородных крысах-самках массой 200–220 г в весенне-летний период. Подопытным животным однократно внутривенно вводили 0,5 % водный раствор 6-МУ в дозе 50 мг/кг. Через 1, 4, 24 и 72 ч по 15 мышей декапитировали. В качестве биологического контроля для оценки воздействия препарата использовали равную по количеству группу интактных животных, декапитированных одновременно с подопытными. Для исследования использовали печень, селезенку и кровь, из которой по общепринятой методике получали эритроцитарную взвесь. Ткань печени и селезенки гомогенизировали на холоду в гомогенизаторе Поттера. Из гомогенатов и эритроцитов выделяли липиды по методу Фолча в модификации Кейтса [11]. Часть липидов использовали для определения их АОА на метилолеатной модели при температуре окисления 37 °С [4]. Анализ состава фосфолипидов проводили методом одномерной тонкослойной хроматографии на силикагеле Н («Sigma», США) [29]. Индекс окисленности липидов печени рассчитывали по их УФ-спектрам в гептане по соотношению оптических плотностей при длине волны 232 и 206 нм [26].

Крысам препарат вводили в той же дозе. Животных забивали под эфирным наркозом через 1, 24 и 72 ч. Определение продуктов, взаимодействующих с 2-тиобарбитуровой кислотой [20], активности СОД [22] и каталазы [13] проводили в ткани печени и сыворотке крови крыс.

Результаты экспериментов обрабатывали методами математической статистики с вычислением средних величин с ука-

занием среднеквадратичных отклонений среднего арифметического. Сравнения по группам проводили с помощью критерия *t* Стьюдента. Различия считали достоверными, если уровень значимости не превышал 0,05.

**Результаты и обсуждение.** По исходному уровню АОА липидов органы мышей линии BALB располагались в следующем ряду: печень > эритроциты > селезенка, а у мышей линии SHK — печень > эритроциты = селезенка. При этом АОА липидов всех исследованных органов у мышей линии BALB была ниже, чем у соответствующих органов мышей линии SHK. Например, АОА липидов печени у первых составляла  $1270 \pm 320$  ч·мл/г, а у вторых — соответственно  $2340 \pm 600$  ч·мл/г.

Поскольку липиды являются одними из наиболее лабильных компонентов клеток, то исследовали динамику изменений АОА липидов изученных органов и тканей в виде разности этих величин у животных обеих линий после однократного введения 6-МУ и соответствующих групп интактных мышей (рис. 1). Измерение величин АОА липидов эритроцитов осуществлялось в одной повторности ввиду малого содержания в них липидов. Видно, что препарат в исследованной дозе влияет на уровень АОА липидов печени, селезенки и эритроцитов. Динамика изменений этого показателя различна в зависимости от органа и линии мышей и характеризуется фазностью и разным масштабом отличий от контроля. Наиболее существенные изменения АОА после введения 6-МУ наблюдались в липидах печени мышей линии SHK,

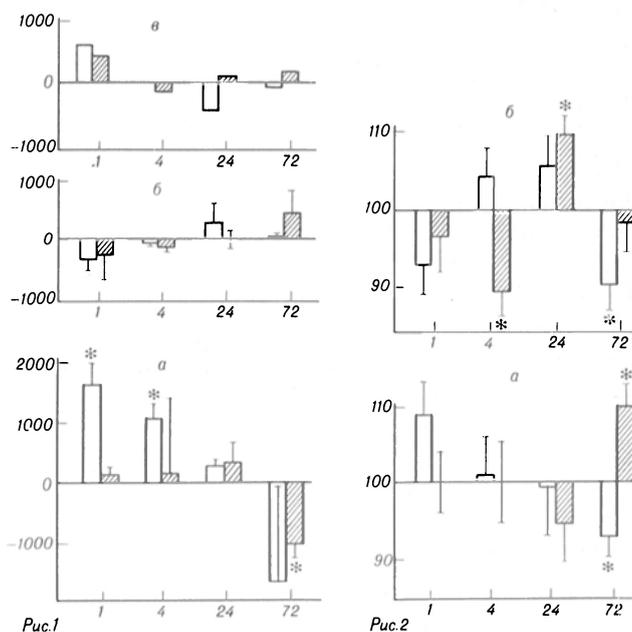


Рис. 1. Динамика изменений уровня АОА липидов печени (а), селезенки (б) и эритроцитов (в) мышей линий SHK (1) и BALB (2) после введения 6-МУ в дозе 50 мг/кг.

По оси абсцисс — время после введения препарата, ч; по оси ординат — разность величин АОА липидов тканей подопытных и интактных животных, ч·мл/г. Здесь и на рис. 2 звездочка —  $p < 0,05$  относительно интактных животных.

Рис. 2. Динамика изменений соотношений ФХ/ФЭ (1) и ЛОФЛ/ТОФЛ (2) в печени (а) и эритроцитах (б) мышей линии SHK после введения 6-МУ в дозе 50 мг/кг.

По оси абсцисс — время после введения препарата, ч; по оси ординат — значения показателей относительно соответствующих величин в тканях интактных мышей, %.

Динамика изменений состава фосфолипидов ФЛ гомогената печени мышей линии SHK после однократного внутрибрюшинного введения 6-МУ в дозе 50 мг/кг

Время, ч	Группа животных	Сумма ФЛ	ЛФХ	СМ	ФХ	ФИ+ФС	ФЭ	КЛ+ФК
1	Опыт	29,4±0,7	2,0±0,1	3,2±0,4	53,0±0,7	12,0±0,1*	26,0±0,6*	3,7±0,3
	Контроль	31,9±1,2	3,6±0,5		54,5±0,9	9,6±0,7	29,1±0,6	3,1±0,2
4	Опыт	38,8±1,2	2,3±0,1	3,0±0,1*	55,2±0,7	9,4±1,0	28,0±1,1	3,2±0,2
	Контроль	41,1±0,7	2,4±0,2	3,9±0,2	53,0±0,9	10,3±0,8	27,2±0,6	3,1±0,1
24	Опыт	36,7±1,3	2,3±0,1	3,0±0,2*	54,3±1,3	10,4±0,4*	26,3±1,5	3,4±0,2
	Контроль	39,4±0,7	2,3±0,1	4,1±0,1	52,2±0,4	13,0±0,5	25,2±0,4	3,6±0,1
72	Опыт	39,7±0,5*	2,0±0,1	3,5±0,4	50,7±0,4*	12,8±0,4*	27,6±0,6	3,4±0,1
	Контроль	30,8±1,3	1,9±0,1	3,6±0,2	52,9±0,5	11,2±0,3	26,7±0,3	3,7±0,2

Примечание. Здесь и в табл. 2: сумма ФЛ выражена в процентах от общей фракции липидов, количество индивидуальных ФЛ — в процентах от суммы ФЛ; звездочка —  $p < 0,05$ .

динамика которых сходна с изменениями этого параметра при введении в организм животных антиоксидантов в относительно больших дозах [4]. Таким образом, эффективность воздействия 6-МУ на АОА липидов органов мышей зависит от исходного уровня этого показателя.

Измерение индекса окисленности липидов печени мышей обеих линий показало, что исследуемый препарат не оказывал достоверного влияния на этот параметр по сравнению с контролем во все сроки наблюдений. Однако у подопытных животных наблюдалась тенденция к увеличению гетерогенности индекса окисленности, особенно у мышей линии BALB (данные не приводятся).

Поскольку изменения уровня АОА липидов печени и эритроцитов более выражены у мышей линии SHK, то влияние 6-МУ на состав фосфолипидов изучали у этих животных (табл. 1 и 2). Видно, что препарат оказывал воздействие как на состав, так и на общее содержание фосфолипидов в печени и эритроцитах. Изменения содержания фосфолипидов в составе общих липидов носили фазный характер, имели сходную динамику и были больше выражены в эритроцитах. Снижение количества фосфолипидов при многократном введении 6-МУ обнаружено в печени крыс, что совпадает с результатами других авторов [8].

В то же время влияние препарата на относительное содержание отдельных фракций фосфолипидов в печени и эритроцитах неодинаково. Так, в печени наибольшее влияние 6-МУ оказывал на сфингомиелин (СМ) и общую фракцию фосфатидинозита (ФИ) и фосфатидилсерина (ФС), тогда как в эритроцитах достоверные изменения наблюдались во всех фракциях фосфолипидов, за исключением относительного содержания СМ и

фосфатидилхолина (ФХ). Особенно следует отметить 3—5-кратное снижение содержания общей фракции кардиолипина (КЛ) и фосфатидной кислоты (ФК) и, наоборот, более чем двукратное увеличение доли ФИ+ФС. Изменения состава фосфолипидов эритроцитов могут играть существенную роль в регуляции метаболизма. Так, например, показано, что ФС является липидом-эффектором Na, К-АТФазы [5], а ФИ и его производные участвуют в регуляции аденилатциклазы, протеинкиназы С и внутриклеточного обмена кальция [21]. Уменьшение содержания лизофосфатидилхолина (ЛФХ) в эритроцитах, вероятно, связано с ингибированием фосфолипазы А<sub>2</sub>.

Важными показателями состава фосфолипидов являются соотношения ФХ/фосфатидилэтаноллин (ФЭ) и сумм более легкоокисляемых и более трудноокисляемых фосфолипидов (ЛОФЛ/ТОФЛ) [3, 24]. Результаты влияния 6-МУ на динамику этих показателей представлены на рис. 2. Видно, что препарат вызывал фазные изменения соотношений ЛОФЛ/ТОФЛ и ФХ/ФЭ, динамика которых в печени и эритроцитах различна. В печени соотношение ФХ/ФЭ в 1-й час выше, а к 3-м суткам ниже соответствующих значений в контрольной группе, что подобно изменениям уровня АОА липидов печени в те же сроки после введения 6-МУ (см. рис. 1). В эритроцитах динамика изменений соотношений ФХ/ФЭ и ЛОФЛ/ТОФЛ сходна, исключая лишь срок 4 ч.

Результаты влияния 6-МУ на активность СОД, каталазы и содержание ТБК-активных продуктов (ТБК-ап) в печени и сыворотке крови по сравнению с соответствующими значениями у контрольных животных представлены в табл. 3. Видно,

Таблица 2

Динамика изменений состава фосфолипидов эритроцитов мышей линии SHK после однократного внутрибрюшинного введения 6-МУ в дозе 50 мг/кг

Время, ч	Группа животных	Сумма ФЛ	ЛФХ	СМ	ФХ	ФИ+ФС	ФЭ	КЛ+ФК
1	Опыт	30,9±1,2*	2,4±0,1*	10,8±1,2	50,4±1,0	4,5±0,2*	30,0±0,7*	2,1±0,2*
	Контроль	40,8±1,3	2,9±0,2	10,3±1,2	49,2±1,1	3,4±0,1	27,2±0,5	7,0±0,4
4	Опыт	51,9±1,7*	4,0±0,2	10,4±0,4	49,0±1,0	6,0±0,4	26,1±0,4	4,5±0,2*
	Контроль	75,5±2,0	3,6±0,3	9,6±0,4	47,3±0,8	6,6±0,2	26,3±0,4	6,6±0,4
24	Опыт	25,7±0,6*	3,6±0,2*	9,9±0,7	49,8±0,2	9,9±0,6*	25,8±0,5*	1,0±0,2*
	Контроль	28,6±0,5	4,1±0,1	10,6±0,6	50,5±1,2	3,5±0,2	27,5±0,6	3,8±0,2
72	Опыт	44,4±1,9*	3,7±0,1*	10,4±0,3	50,0±0,6	7,0±0,2*	27,4±0,3*	1,5±0,4*
	Контроль	37,0±1,5	4,2±0,1	10,5±0,2	48,8±0,3	3,5±0,5	24,1±0,7	8,9±0,5

Динамика изменений активности СОД, каталазы и содержания ТБК-ап в печени и сыворотке крови беспородных белых крыс после однократного внутривнутрибрюшинного введения 6-МУ в дозе 50 мг/кг

Время, ч	СОД		Каталаза		ТБК-ап	
	печень	сыворотка	печень	сыворотка	печень	сыворотка
1	60±30	83±26	125±40	167±26*	91±8	90±9
24	127±10	88±38	—	—	133±15	149±14*
72	180±47	121±33	210±46*	149±25	86±10	73±5*

Примечание. Результаты представлены в процентах от контроля, звездочка —  $p < 0,05$ .

что в сыворотке активность СОД меняется мало, а в печени возрастает (особенно через 3 сут после введения препарата). Активность каталазы повышалась как в печени, так и в сыворотке крови. Следует отметить, что через 3 сут снижались уровень ТБК-ап, что, по-видимому, связано с возрастанием активности ферментов антиоксидантной защиты. Повышение активности СОД в сыворотке крови и раневой грануляционной ткани крыс обнаружено и при местном многократном применении 6-МУ [18]. Можно предположить, что активация ферментов антиоксидантной защиты при введении препарата должна наблюдаться и у мышей.

Таким образом, показано, что 6-МУ при однократном внутривнутрибрюшинном введении его животным, безусловно, оказывает воздействие на параметры физико-химической системы регуляции ПОЛ, при этом динамика изменений всех показателей носит фазный характер и зависит от времени после введения препарата.

Степень изменений уровня АОА липидов зависит от его исходной величины и больше выражена в печени, тогда как более значительные изменения состава фосфолипидов 6-МУ вызывал в эритроцитах.

Совокупность экспериментальных данных указывает на то, что биологическая и терапевтическая эффективность 6-МУ связана в том числе и с его способностью воздействовать на параметры физико-химической системы регуляции ПОЛ в органах. Стадийность и выраженность этих изменений обуславливают необходимость выбора оптимальных временных интервалов введения и доз 6-МУ для нормализации показателей ПОЛ, изменений в ходе развития патологического процесса.

Авторы выражают благодарность научному сотруднику лаборатории экспериментальной хирургии Кемеровского медицинского института И. М. Устьянцевой за помощь в экспериментах на крысах.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Алесенко А. В., Соколова И. С., Кукушкина Г. В. и др. // Докл. АН СССР.— 1980.— Т. 251, № 6.— С. 1472—1475.
- Алесенко А. В., Пальмина Н. П. // Биантиоксиданты в регуляции метаболизма в норме и патологии.— М., 1982.— С. 84—100.
- Аристархова С. А., Архипова Г. В., Бурлакова Е. Б. и др. // Докл. АН СССР.— 1976.— Т. 228, № 1.— С. 215—218.
- Биантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте / Бурлакова Е. Б., Алесенко А. В., Молочкина Е. М. и др.— М., 1975.
- Болдырев А. А., Твердислов В. А. Молекулярная организация и механизм функционирования — насоса.— М., 1978.
- Бурлакова Е. Б., Шишкина Л. Н. // Проблемы природной и модифицированной радиочувствительности.— М., 1983.— С. 29—43.
- Геселкин Ю. О., Бабенкова И. В., Комаров О. С. и др. // Антиоксидантные системы организма при экспериментальной и клинической патологии.— Свердловск, 1987.— С. 9—27.
- Горбунов В. В. // Гродненский мед. ин-т: Науч. сессия, 8-я: Материалы.— Минск, 1971.— С. 90—91.
- Горбунов С. М., Ананьев Е. В., Зобов В. В. и др. // Фармакол. и токсикол.— 1985.— Т. 48, № 6.— С. 44—47.
- Грех И. Ф. // Конференция по применению пиримидиновых производных в онкологии и других областях медицины: Материалы.— Л., 1963.— С. 25—27.
- Кейтс М. Техника липидологии.— М., 1975.— С. 74.
- Комаров П. Г., Биленко М. В., Шведова А. А. и др. // Вопр. мед. химии.— 1985.— Т. 31, вып. 2.— С. 40—45.
- Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г. и др. // Лаб. дело.— 1988.— № 1.— С. 16—19.
- Кузнецов И. Г., Суслова С. К., Расулов М. М. и др. // Вопр. мед. химии.— 1987.— Т. 33, вып. 3.— С. 77—81.
- Кулиев В. Г. Применение метилурацила и димедазола при некоторых формах патологии крови химической этиологии: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— Баку, 1970.
- Мышкин В. А., Лазарева Д. П., Алехин Е. К. и др. // Перспективы биоорганической химии в создании новых лекарственных препаратов.— Рига, 1982.— С. 214.
- Русакон В. И., Лукаш Н. А., Можаров И. Н. и др. // Фармакологическая регуляция регенераторных процессов в эксперименте и клинике.— Йошкар-Ола, 1981.— С. 208.
- Силаева С. А., Гуляева Н. В., Хацернава Б. Я. и др. // Бюл. exper. биол.— 1990.— Т. 109, № 2.— С. 180—182.
- Силаева С. А., Хацернава Б. Я., Голценко В. А. и др. // Вопр. мед. химии.— 1990.— Т. 36, № 1.— С. 82—84.
- Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г. // Современные методы в биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича.— М., 1977.— С. 66.
- Хухо Ф. Нейрохимия: Основы и принципы.— М., 1990.— С. 42—43.
- Чевари С., Чаба И., Секей Й. // Лаб. дело.— 1985.— № 11.— С. 678—680.
- Черенький И. К. // Лекарственная регуляция воспалительного процесса / Под ред. Н. В. Лазарева.— Л., 1958.— С. 153—160.
- Burlakova E. B., Archipova G. V., Djalyabova M. I. et. al. Biophysical and Biochemical Information Transfer in Recognition.— New York, 1979.— P. 583—594.
- Hiller K. O., Hoid P. L., Willson P. L. // Chem.—Biol. Interact.— 1983.— Vol. 47.— P. 293—305.
- Klein R. A. // Biochim. biophys Acta.— 1970.— Vol. 210.— P. 486—489.
- Marinkovic D., Zuyderholt F. M. J. // Free Rad. Res. Commun.— 1988.— Vol. 4, N 4.— P. 237—242.
- Miachi Y., Yoshioka A., Imamura S., Niwa Y. // J. invest. Derm.— 1986.— Vol. 86, N 4.— P. 449—453.
- Shipsky V. P., Barclay M. // Meth. Enzymol.— 1969.— Vol. 14.— P. 530—598.

Поступила 20.07.90

#### EFFECT OF 6-METHYLURACIL ON SOME PARAMETERS OF THE SYSTEM REGULATING LIPID PEROXIDATION.

Yu. P. Taran, L. N. Shishkina

N. N. Semenov Institute of Chemical Physics, Academy of Sciences of the Russian Federation, Moscow.

Single intraperitoneal administration of 6-methyluracil in a dose of 50 mg/kg was shown to affect some patterns of the physico-chemical system regulating lipid peroxidation in

mice liver tissue and erythrocytes: antioxidative activity of lipids (AOA), composition of phospholipids; the drug altered also activities of superoxide dismutase and catalase in liver tissue and blood serum of rats. These alterations observed had phase expressed dynamics and their rate was dissimilar in various tissues and depended on the interval after drug administration. 6-Methyluracil exhibited the highest effect on the rate of AOA in liver tissue and on phospholipid composition in erythrocytes. The biological activity of the drug appears related to its effects on the system regulating lipid peroxidation.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.36-002-092.9-085.272.4-036.8-07:616.36-008.6

А. И. Божков, Ю. М. Краснопольский,  
М. К. Асадова, С. М. Могилянская,  
В. Л. Длубовская, Р. Ф. Мензелев

## ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ ЛИПИДОВ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ПЕЧЕНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ГЕПАТИТЕ

НИИ биологии Харьковского университета, Харьковское предприятие по производству бактериальных препаратов

Функциональные изменения многих органов как в пределах физиологической нормы, так и переходящих в патологическое состояние часто сопровождаются изменением в метаболизме липидов [12, 15, 16]. Фосфолипидные препараты могут восстанавливать липидный состав мембран эндоплазматической сети печени при гепатите [9], а препарат эссенциале нормализует липидный обмен при СС1<sub>4</sub>-гепатите, в частности уменьшает накопление триглицеридов в печени [4]. Липостабил, применяемый для лечения патологических состояний печени, не оказывал репарирующего действия на мембраны при гепатите [6]. Не всегда проявляется положительный эффект эссенциале на липидный обмен [2], а синтез нуклеиновых кислот в кардиомиоцитах этот препарат угнетал [7].

Такое различное действие одних и тех же препаратов на липидный обмен в клетке может быть связано с действием экзогенных липидов не только на структуру мембран, но и на многие звенья клеточного метаболизма. В задачи настоящей работы входило исследование влияния экзогенных липидов на содержание липидов в микросомальных мембранах и сыворотке крови, функциональную активность микросом и образование коллагена в печени при гепатите.

**Методика.** Эксперименты проводили на 70 самцах крыс линии Вистар 3—4-месячного возраста. Индукцию гепатита осуществляли с использованием локальной гипертермии печени [11]. Животным с экспериментальным гепатитом каждые 12 ч в течение 8 сут вводили суммарные фосфолипиды из эритроцитов лошади, ганглиозид GM<sub>3</sub> из эритроцитов лошади и фосфолипиды из спинного мозга (ФСМ) крупного рогатого скота, состоящие из 63 % фосфатидилэтаноламина, 18 % фосфатидилхолина, 9 % фосфатидилсерина, 4,5 % сфингомиелина и 5 % минорных компонентов фосфолипидной природы в дозах 2 мг на 100 г массы тела. Через 12 ч после последнего введения препаратов животных умерщвляли под эфирным наркозом. Собирали кровь и получали сыворотку, из которой экстрагировали липиды [8].

Печень перфузировали и гомогенизировали в 0,25 М сахарозе. Постмитохондриальную фракцию центрифугировали 60 мин при 105 000 g на центрифуге УЦПЗ-31. Супернатант использовали как фракцию цитозоля. Из фракции микросом и цитозоля экстрагировали липиды [8], количество которых определяли по [5].

Для определения активности глюкозо-6-фосфатазы в микросомах их суспендировали в 0,25 М сахарозе, к 0,1 мл суспензии прибавляли 0,1 мл раствора глюкозо-6-фосфата и 0,8 мл К-цитратного буфера. Пробу инкубировали при 37 °С 30 мин. Неорганический фосфор определяли по Фиске — Суббароу. Результаты выражали в микромолях неорганического фосфора на 1 мг белка микросом.

Об антитоксической функции печени судили по продолжительности гексеналового сна. Гексенал вводили внутривенно из расчета 100 мг на 1 кг массы животного в виде 2 % раствора. Время наркотического сна выражали в минутах и рассчитывали угнетение антитоксической функции печени в процентах по отношению к контролю. Результаты обрабатывали статистически [10].

**Результаты и их обсуждение.** Экспериментальный гепатит, индуцируемый локальной гипертермией печени [11], сопровождается небольшим увеличением содержания липидов микросом, главным образом за счет увеличения содержания фосфолипидов и холестерина (рис. 1).

Внутрибрюшинное введение фосфолипидов из эритроцитов лошади и ФСМ крупного рогатого скота в дозах 2 мг/100 г на 10-й день после индукции гепатита приводит к уменьшению содержания липидов микросом печени по сравнению с экспериментальными животными, не получавшими препараты, и интактными. Введение экспериментальным животным ганглиозид GM<sub>3</sub> из эритроцитов лошади не оказывало влияния на этот показатель (рис. 2).

Липосомы могут длительно циркулировать в кровяном русле и не захватываться гепатоцитами [11]. Определение содержания общих липидов в сыворотке крови через 12 ч после введения препаратов показало, что фосфолипиды эритроцитов лошади не влияли на содержание липидов в сыворотке; при введении ганглиозид GM<sub>3</sub> содержание липидов незначительно уменьшалось и достоверно увеличивалось при введении ФСМ.

Таким образом, введение экзогенных липидов, увеличивающих содержание липидов в сыворотке, приводило к уменьшению содержания липидов в

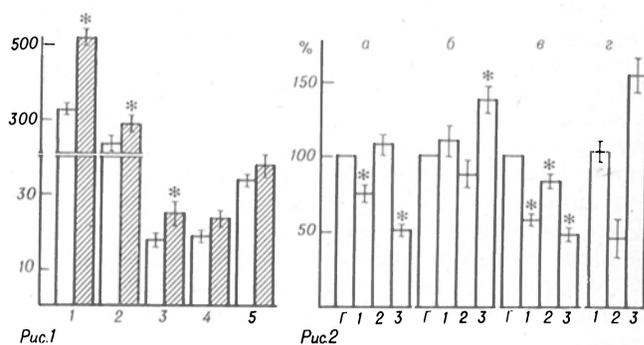


Рис. 1. Содержание (в мкг/мг белка) общих липидов (1), фосфолипидов (2), холестерина (3), незэтерифицированных жирных кислот (4) и триглицеридов (5) в микросомах интактной печени (светлые столбики) и при экспериментальном гепатите (заштрихованные столбики).

Здесь и на других рисунках звездочкой обозначены статистически достоверные различия между контролем и опытом при  $p < 0,05$ .

Рис. 2. Влияние фосфолипидов (в %) из эритроцитов лошади (1), ганглиозид GM<sub>3</sub> из эритроцитов лошади (2) и ФСМ крупного рогатого скота (3) на содержание липидов в микросомах (а), сыворотке крови (б), активность глюкозо-6-фосфатазы в микросомах (в) и антитоксическую функцию печени (г) на фоне гепатита (Г).

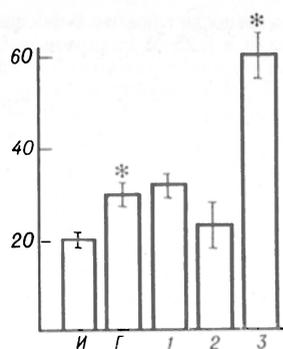


Рис. 3. Содержание оксипролина (в мкг на 100 г ткани) в интактной печени (И), при гепатите (Г) и влияние на этот показатель фосфолипидов из эритроцитов лошади (1), ганглиозида  $GM_3$  из эритроцитов лошади (2) и ФСМ крупного рогатого скота (3).

микросомах. Уменьшение содержания липидов в микросомах печени может приводить к структурно-функциональным изменениям биомембран. Одной из характеристик структурно-функционального состояния мембран эндоплазматического ретикулума является активность мембранно-связанных ферментов, и в частности глюкозо-6-фосфатазы [3]. Внутривенное введение фосфолипидов эритроцитов и ФСМ вызывало падение активности глюкозо-6-фосфатазы на 44 и 53 % соответственно, в то время как ганглиозид  $GM_3$  подавлял активность только на 23 % по сравнению с контролем (см. рис. 2). Падение активности этого фермента коррелировало с угнетением антитоксической функции печени, которая снижалась на 100 и 150 % в случае фосфолипидов из эритроцитов и спинного мозга и лишь на 48 % при введении  $GM_3$  (см. рис. 2). Учитывая, что антитоксическая функция печени определяется уровнем активности микросомальных монооксигеназ, можно полагать, что экзогенные липиды приводят к падению активности таких ферментов, как глюкозо-6-фосфатаза и система монооксигеназа.

В ряде патологических процессов имеет место нарушение метаболизма соединительной ткани, в частности коллагена [14]. При гепатите часть клеток повреждается, что сопровождается ростом соединительной ткани. Определение количества коллагена по содержанию оксипролина в печени при гепатите показало, что оно увеличивается по сравнению с контрольным уровнем (рис. 3). Рост соединительной ткани в патологически измененном органе является компенсаторно-приспособительной реакцией, направленной на восстановление функциональной активности измененной ткани [13].

Внутривенное введение эритроцитарных фосфолипидов и ганглиозида  $GM_3$  животным с экспериментальным гепатитом не оказывало влияния на содержание коллагена в печени, в то время как введение ФСМ сопровождалось двукратным увеличением количества коллагена в этом органе (см. рис. 3). Необходимо отметить, что именно ФСМ в наибольшей степени нарушали липидный обмен в печени с гепатитом — они подавляли и функциональную активность микросомальных мембран, что, очевидно, отражает усиление деструктивных изменений гепатоцитов

при гепатите и увеличение количества коллагена в печени как компенсаторно-приспособительной реакции.

Таким образом, введение животным с экспериментальным гепатитом экзогенных липидов сопровождалось угнетением функциональной активности печени, выражающемся в уменьшении содержания липидов в микросомах, угнетении антитоксической функции печени и увеличении количества коллагена в этом органе. Степень угнетения функциональной активности клеток печени при гепатите определяется составом препаратов, в наибольшей степени это характерно для ФСМ. Эти результаты могут указывать на важную регуляторную роль экзогенных липидов в метаболизме клеток печени. Необходимо отметить, что выбранная нами система показателей, включающая такие показатели, как липидный обмен, функциональное состояние мембран эндоплазматического ретикулума и морфогенетические функции, в частности обмен коллагена, позволяет получить ответ не только о действии ксенобиотиков на функциональное состояние печени, но и дать характеристику степени этого действия.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. А. с. 1411804 СССР. Способ моделирования гепатита / Божков А. И., Шахбазов В. Г., Гонкалов В. Г. и др. // Открытия.— 1988.— № 27.
2. Болданова Н. Б., Мигулина В. Л., Шатинина С. З., Добрынина О. В. // Вопр. мед. химии.— 1986.— № 3.— С. 65—67.
3. Бурлакова Е. Б. // Липиды, биосинтез, превращение и функции.— М., 1979.— С. 16—27.
4. Венгеровский А. И., Чугалин В. С., Паульс О. В., Саратиков А. С. // Бюл. экспер. биол.— 1987.— № 4.— С. 430—432.
5. Грибанов Г. А., Сергеев С. А. // Вопр. мед. химии.— 1975.— № 6.— С. 652—655.
6. Добрынина О. В., Мигулина В. Л., Шатинина С. З., Болданова Н. Б. // Бюл. экспер. биол.— 1987.— № 9.— С. 301—303.
7. Карагезян К. Г., Енгибарян А. А., Варосян М. А. // Там же.— 1989.— № 11.— С. 548—549.
8. Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов.— М., 1975.
9. Халилов Э. М., Горховская Т. И., Фортинская Е. С. и др. // Бюл. экспер. биол.— 1989.— № 4.— С. 451—452.
10. Урбах В. Ю. Биометрические методы.— М., 1964.
11. Allen T. M., Williamson P., Schlegel R. A. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1991.— Vol. 85, N 21.— P. 8067—8071.
12. Canuto R. L., Biocca M. E., Muzio G., Dianzani M. U. // Cell Biochem. Funct.— 1989.— Vol. 7, N 1.— P. 11—13.
13. Chojkier M., Lyche K. D., Filip M. // Hepatology.— 1988.— Vol. 8, N 4.— P. 808—814.
14. Clement B., Peyrol S., Campion J. P. et al. // Marker Proteins Inflammation.— Berlin, 1986.— Vol. 3.— P. 433—442.
15. Zimmermann T., Schulze A., Dargel R. // Advances on Lipoprotein and Atherosclerosis Research Diagnosis and Treatment.— Berlin, 1985.— Vol. 1.— P. 169—171.
16. Wood R., Upreti G. C., de Antueno R. J. // Lipids.— 1986.— Vol. 21, N 4.— P. 292—300.

Поступила 27.10.91

#### EFFECT OF EXOGENOUS LIPIDS ON FUNCTIONAL ACTIVITY OF LIVER TISSUE IN EXPERIMENTAL HEPATITIS.

A. I. Bozhkov, Yu. M. Krasnopolsky, M. K. Asadova, S. M. Mogilyanskaya, V. L. Dlubovskaya, R. F. Menzeleev

Research Institute of Biology, State University, Factory of Bacterial Preparations, Kharkov.

Content of lipids in blood serum and membranes of liver tissue endoplasmic reticulum, functional activity of microsomes, antitoxic activity of liver tissue as well as collagen production in rat liver tissue were studied in experimental

hepatitis after administration of exogenous lipids (equine erythrocyte phospholipids and ganglioside GM<sub>3</sub>, bovine spinal cord phospholipids). All the preparations studied inhibited the functional activity of the liver cells which was expressed as a decrease of the lipids content in the microsomes, inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and impairment of the liver tissue antioxidant functions. Distinct inhibition of these reactions caused an increase of the collagen content in the liver tissue.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 612.112.91.015.348.014.46:615.366.381-008.939.6

А. В. Полевщиков, П. Г. Назаров, Л. К. Берестовая

## ВЛИЯНИЕ С-РЕАКТИВНОГО БЕЛКА НА СИНТЕЗ РНК И БЕЛКА В НЕЙТРОФИЛАХ

НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург

Взаимодействие С-реактивного белка (СРБ) и нейтрофилов (Нф) составляет один из важнейших элементов неспецифических защитных реакций [6]. Формы и значение этого взаимодействия изменяются на различных этапах воспаления: в начале процесса СРБ действует как опсонин [6, 9], хемоаттрактант [10] и активатор нейтрофилов и макрофагов [11], а в конце процесса — как ингибитор активности этих и других клеток [5, 7, 12]. Основой для смены направления эффекта СРБ на Нф являются наличие в молекуле СРБ пептидных фрагментов с иммуномодулирующими свойствами, смена лизосомальных ферментов Нф, обеспечивающих протеолиз СРБ [11, 12], и рецепторов для СРБ на этих клетках [6]. Указанные изменения не могут не сопровождаться изменениями в уровне синтеза РНК и белка в Нф [1, 3, 4], о чем мы предварительно сообщили ранее [2]. Целью данного исследования является оценка влияния СРБ на основные синтетические процессы — синтез РНК и белка — в Нф периферической крови человека.

Методика. Нф выделяли из свежей гепаринизированной донорской крови путем центрифугирования на двойном градиенте фиколл-верографина ( $d=1,110$  и  $1,077$  г/см<sup>3</sup>). На 2 мл охлажденного до 4 °С более плотного градиента наслаивали равный объем менее плотного, а затем 4—6 мл разбавленной (1:1) забуференным фосфатами физиологическим раствором рН 7,2 (ЗФР) донорской крови. После центрифугирования в течение 1 ч при 500 g при комнатной температуре верхнюю интерфазу составляли мононуклеары, а нижнюю — полиморфноядерные клетки, которые отмывали ЗФР и освобождали от примеси эритроцитов лизисом 0,832 и 0,084 % раствором NH<sub>4</sub>Cl и NaHCO<sub>3</sub> соответственно в отсутствие ионов Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup>. Полученные клетки, 95 % среди которых составляли Нф, переводили в полную культуральную среду. При изучении синтеза РНК ее составляли на основе среды RPMI-1640 («Flow») с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) («Amimed»), 1 % 100-кратного концентрата заменимых аминокислот («Flow»), гентамицина в концентрации 80 мкг/мл и <sup>3</sup>Н-уридина (<sup>3</sup>Н-ур) (Научно-производственное объединение «Изотоп») в концентрации 37 кБк/мл. При исследовании синтеза белка среду составляли на основе раствора Эрла (Московское предприятие по производству бактериальных препаратов) с 10 % ЭТС, гентамицином и мечеными по тритию аминокислотами — 1-глицином и 1-лейцином (<sup>3</sup>Н-АК) того же производства в концентрации по 55 кБк/мл. 2·10<sup>5</sup> ресуспендированных в среде Нф переносили в объеме 0,2 мл в 96-луночные плоскодонные планшеты («Linbro») и инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе («Flow») при 37 °С во влажной атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub> в течение 2 ч. Продление инкубации до 12—16 ч не влияло на

характер полученных закономерностей. В качестве стимуляторов использовали фитогемагглютинин (ФГА)-II («Difco», 12,5 мкг/мл), конканавалин А — КонА («Pharmacia», 10 мкг/мл), СРБ, а в качестве контроля — ЗФР.

СРБ выделяли из асцитической жидкости больных опухолями яичников путем ионообменной хроматографии. Чистоту выделения контролировали путем электрофореза в ПААГ при редуцирующих условиях. Выделенный белок хранили при —18 °С в трис-цитратном буфере рН 6,2; концентрация белка при этом составляла около 1 мг/мл. В работе использовали СРБ в сывороточной пентамерной форме (пСРБ) и разрушенный до мономеров СРБ (мСРБ). Для получения мСРБ из пСРБ последний подвергали воздействию низких значений рН (рН 2,0) в течение 1 мин с дальнейшим восстановлением реакции среды до нейтральной. При этом происходит необратимое разрушение пСРБ до мСРБ [10].

После культивирования клетки переносили на бумажные фильтры («Filtrak FN-12») с помощью 12-канального харвестера, отмывали дистиллированной водой, 5 % трихлоруксусной кислотой и абсолютным этанолом, а высушенные фильтры помещали в вials «Wheaton» и просчитывали на сцинтилляционном счетчике «Rackbeta» («LKB — Pharmacia») в течение 1 мин. Результаты выражали средним числом импульсов в 1 мин ± ошибка среднего. Достоверность различий оценивали с помощью критерия *t* Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Внесение пСРБ в культуры Нф вызывало дозозависимый прирост включения <sup>3</sup>Н-ур клетками (табл. 1). Самый высокий синтез РНК наблюдали при концентрации пСРБ 1—10 мкг/мл, что в 2—20 раз превышает нормальный уровень СРБ в сыворотке и соответствует его концентрации при воспалении. При концентрации пСРБ 0,1 мкг/мл, которая совпадает с ее нормальными сывороточными показателями, различия в уровне включения <sup>3</sup>Н-ур достоверно не отличаются от контроля ( $p > 0,05$ ).

мСРБ также вызывал усиление включения <sup>3</sup>Н-ур Нф, причем уже низкие значения мСРБ (0,1 мкг/мл) вызывали достоверное усиление включения <sup>3</sup>Н-ур, которое достигало максимума при концентрации 10 мкг/мл и стремительно снижалось при более высоких концентрациях мСРБ (см. табл. 1). Более высокая эффективность мСРБ может быть связана с тем, что, распадаясь на субъединицы, СРБ сохраняет способность стимулировать Нф, а увеличение числа действующих молекул (в 5 раз по сравнению с пСРБ)

Таблица 1

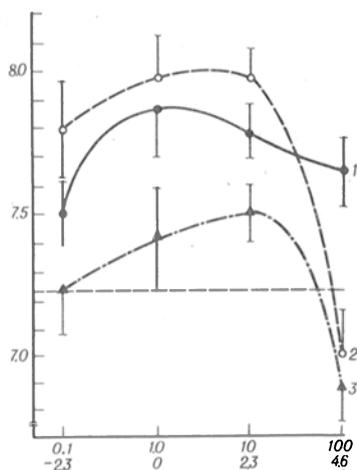
Включение <sup>3</sup>Н-ур Нф (в имп/мин) под влиянием пСРБ, мСРБ и других активаторов

Препарат и его концентрация, мкг/мл	Число наблюдений	$\bar{x} \pm S$	Пределы колебаний	$\bar{x}_{оп}/\bar{x}_{конт}$
Контроль (ЗФР)	72	1399 ± 121	131—4346	—
КонА, 10	56	2217 ± 155***	544—5343	1,58
ФГА-II, 12,5	34	2034 ± 146**	683—4017	1,45
пСРБ:				
0,1	27	1823 ± 246	189—3895	1,30
1	27	2656 ± 470***	353—9373	1,90
10	27	2451 ± 334***	330—6208	1,75
100	41	2139 ± 298**	345—7416	1,53
мСРБ:				
0,1	6	2415 ± 5497*	1057—3846	1,73
1	6	2883 ± 500***	1515—4196	2,06
10	6	2953 ± 345***	1534—3961	2,11
100	17	1136 ± 224	225—3052	0,81

Примечание. Достоверность различий оценивали по отношению к контролю; звездочка —  $p < 0,05$ , две —  $p < 0,01$ , три —  $p < 0,001$ . Здесь и в табл. 2 оп. — опыт, конт. — контроль.

Включение  $^3\text{H}$ -АК Нф (в имп/мин) под влиянием пСРБ и других активаторов

Препарат и его концентрация, мкг/мл	Число наблюдений	$\bar{x} \pm S$	Пределы колебаний	$\frac{\bar{x}_{\text{оп}}}{\bar{x}_{\text{конт}}}$
Контроль (ЗФР)	24	1091 $\pm$ 185	263—3570	—
КонА, 10	24	1345 $\pm$ 171	456—2970	1,23
ФГА-II, 12,5	24	1037 $\pm$ 150	242—2337	0,95
пСРБ:				
0,1	12	735 $\pm$ 128	183—1368	0,67
1	12	875 $\pm$ 140	310—1854	0,80
10	12	1400 $\pm$ 265	399—3230	1,28
100	12	1476 $\pm$ 241	428—2850	1,35



Сравнение включения  $^3\text{H}$ -ур в Нф под влиянием пСРБ, мСРБ и при их совместном действии.

По оси абсцисс — концентрация белка: верхние цифры — в мкг/мл, нижние —  $\ln$  этих величин; по оси ординат —  $\ln$  среднего включения  $^3\text{H}$ -ур. 1 — пСРБ; 2 — мСРБ; 3 — 100 мкг/мл мСРБ + переменные концентрации пСРБ. Уровень включения  $^3\text{H}$ -ур контрольными клетками показан пунктиром.

ответственно за повышение чувствительности клеток.

Наличие в очаге воспаления одновременно двух форм СРБ (пСРБ и мСРБ) выдвигает необходимость рассмотрения вопроса о характере их совместного действия на Нф. Как видно на рисунке, результатом такого действия на Нф было угнетение включения  $^3\text{H}$ -ур. При использовании высоких концентраций пСРБ и мСРБ (по 100 мкг/мл) включение  $^3\text{H}$ -ур снижалось на 54 % по сравнению с контролем, но при избытке мСРБ (100 мкг/мл) Нф повторяли закономерности для мСРБ, несмотря на присутствие различных количеств пСРБ. Различия между контролем и точками кривой 3 недостоверны при  $p > 0,05$ . Полученные результаты соответствуют данным других авторов [5, 7, 12] о наличии у СРБ супрессивного потенциала и показывают, что механизмом переключения на супрессию может служить увеличение числа молекул СРБ, особенно за счет распада до мономеров.

пСРБ, как и КонА и ФГА, практически не влиял на включение  $^3\text{H}$ -АК в нейтрофилы (табл. 2) (все различия с контролем недостоверны;  $p > 0,05$ ).

Ранее показано, что усиление синтеза РНК является одним из показателей активации Нф [8], величина которой возрастает под действием КонА в 2—5 раз, что совпадает с нашими данными. Влияние СРБ как в пентамерной, так и в мономерной форме сопоставимо с влиянием этого лектина и может даже превосходить его. В то же время эффект ФГА на Нф уступает эффекту СРБ и КонА, что, вероятно, связано с различной лигандной специфичностью этих молекул. Результаты работы свидетельствуют о стимулирующем влиянии пСРБ на функциональную активность Нф. Кроме показанного [10] стимулирующего влияния СРБ на кислородный метаболизм, мы можем констатировать аналогичный стимулирующий эффект и в отношении другого существенного показателя активации клеток — синтеза РНК. Сопоставление двух форм СРБ показывает, что мСРБ обладает более вы-

раженным эффектом в отношении Нф по сравнению с пСРБ (как в наших исследованиях по синтезу РНК, так и в работе [10] по кислородному метаболизму).

Результаты работы свидетельствуют о существенной регуляторной роли внеклеточного распада СРБ на мономеры под действием кислотной среды воспалительного очага. Момеры сохраняют способность усиливать синтез РНК в Нф, присущую пСРБ. Их эффект проявляется при более низкой концентрации белка, что, вероятно, связано с 5-кратным увеличением числа молекул. Вместе с тем совместное действие обеих форм белка тормозит активацию Нф и может быть одним из звеньев эволюции воспалительной реакции. Не исключено, что это угнетение связано с конкуренцией обеих форм СРБ за мембранный рецептор. При последующем эндоцитозе в фагосомах наблюдается протеолиз СРБ под действием лизосомальных ферментов, результатом которого является выделение Нф иммуоактивных низкомолекулярных пептидов [11, 12]. Что касается белкового синтеза, то его уровень не коррелирует с активационными изменениями, оцененными по синтезу РНК, что не противоречит литературным данным [1, 3, 4].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Маянский А. Н., Маянский Д. Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге.— Новосибирск, 1989.
2. Полевщиков А. В., Назаров П. Г. // Актуальные проблемы ветеринарии.— Л., 1991.— С. 75—76.
3. Саркисов Д. С., Пальцын А. А., Колкер И. И. и др. // Арх. пат.— 1986.— № 12.— С. 6—13.
4. Учанишвили Э. К. // Бюл. exper. биол.— 1987.— № 2.— С. 202—205.
5. Buchta R., Gennaro R., Pontel M. et al. // FEBS Lett.— 1988.— Vol. 237, N 1—2.— P. 173—178.
6. Edwards K. M., Gewurz H., Lint T. F., Mold C. // J. Immunol.— 1982.— Vol. 128, N 6.— P. 2493—2496.
7. Filep J. G., Herman H., Kelemen E., Foldes-Filep E. // Thrombos. Res.— 1991.— Vol. 61, N 4.— P. 411—423.
8. Granelli-Piperno A., Vassali J., Reich E. // J. exp. Med.— 1979.— Vol. 149, N 1.— P. 284—289.
9. Kushner I. // Ann. N. Y. Acad. Sci.— 1982.— Vol. 389.— P. 38—48.
10. Potempa L. A., Zeller J. M., Fiedel B. A. et al. // Inflammation.— 1988.— Vol. 12, N 4.— P. 391—405.
11. Robey F. A., Chura K., Futak S. et al. // J. biol. Chem.— 1987.— Vol. 262, N 15.— P. 7053—7057.
12. Shephard E. G., Anderson R., Rosen C. et al. // J. Immunol.— 1990.— Vol. 145, N 5.— P. 1469—1477.

Поступила 31.10.91

EFFECT OF C-REACTIVE PROTEIN ON RNA AND PROTEIN SYNTHESIS IN NEUTROPHILS.

Institute of Experimental Medicine, Academy of Medical Sciences of the Russian Federation, St. Petersburg.

Effects of blood serum pentameric and monomeric C-reactive proteins (pCRP and mCRP, respectively) on human peripheral blood neutrophils were studied. Isolated neutrophils were incubated for 2 hrs in the medium containing  $^3\text{H}$ -RNA or protein synthesis precursors. Both pCRP and mCRP stimulated the RNA synthesis in neutrophils. Effect of mCRP was more prominent than that of pCRP. Simultaneous addition of these CRP forms abolished their stimulating capacities. CRP had no significant action on the protein synthesis in neutrophils.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 582.282:581.19:577.152.1

Е. В. Лукашева, В. С. Веса, Т. Т. Березов

## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ L-ЛИЗИН- $\alpha$ -ОКСИДАЗЫ ИЗ ПОВЕРХНОСТНО И ГЛУБИННО ВЫРАЩЕННОЙ TRICHODERMA SP.

Российский университет дружбы народов, Москва, Институт прикладной энзимологии, Вильнюс

На кафедре биохимии Российского университета дружбы народов в течение ряда лет изучается фермент L-лизин- $\alpha$ -оксидаза (ЛО) [5], который высокоспецифичен по отношению к L-лизину [1, 6]. Известно, что способ культивирования микроорганизмов — продуцентов биологически активных соединений — влияет как на количественное содержание, так и на качественный состав конечных продуктов. До последнего времени фермент выделяли из культуральной жидкости гриба *Trichoderma sp.*, выращенного поверхностным способом. В связи с необходимостью крупномасштабного производства фермента возникла необходимость выращивания культуры гриба глубинным способом, и был разработан соответствующий метод [2]. В задачи настоящей работы входило определение возможных изменений субстратной специфичности ЛО, а также сравнение спектральных характеристик, молекулярной массы, изоэлектрической точки препаратов ЛО из *Trichoderma sp.*, выращенной глубинным и поверхностным способами.

**Методика.** В работе использовали о-дианизидин фирмы «Sigma» (США), ДЭАЭ-целлюлозу фирмы «Reanal» (Венгрия), ДЭАЭ-солозу, любезно предоставленную Институтом прикладной энзимологии (Вильнюс), набор стандартных белков для определения молекулярной массы и изоэлектрической точки фирмы «Pharmacia» (Швеция). Для приготовления буферных растворов использовали соли марки ч. д. а.

Активность ЛО определяли по приросту концентрации перекиси водорода в реакционной смеси. Стандартные опытные пробы содержали 0,19 мМ о-дианизидин в 100 мМ натрий-фосфатном буфере рН 7,4, 1 мМ L-лизин, 10 мкМ пероксидазу из хрена, ЛО.

За единицу ферментативной активности принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль перекиси водорода за 1 мин. Ферментативную активность определяли на спектрофотометре при 460 нм. Концентрацию белка определяли по методу Лоури, используя в качестве стандарта яичный альбумин («Fluka»). Операции по очистке ЛО проводили при 0–5 °С.

**Получение ЛО из *Trichoderma sp.*, выращенной поверхностным способом.** Культура гриба *Trichoderma sp.* была выращена в 7 колбах на пшеничных отрубях поверхностным способом [4]. В каждую колбу добавляли по 100 мл воды.

## Очистка ЛО из поверхностно выращенной *Trichoderma sp.* на ДЭАЭ-целлюлозе в объеме

№ фракции	NaCl, М	Объем, мл	Ферментативная активность, %	Количество фермента, Е
1	0	210	0,5	11,5
2	0,2	500	5,2	
3	0,3	1180	33,0 Раствор № 1	661,0
4	0,4	535	3,1 Раствор № 2	67,0
5	0,5	230	0,4	
6	0,6	510	0,6 Раствор № 3	20,5

Примечание. За 100 % принята суммарная исходная ферментативная активность.

Экстракцию осуществляли на качалке в течение 1 ч. Экстракт отделяли фильтрованием через 2 слоя марли и центрифугировали. Объем экстракта 810 мл. Концентрация белка 2 мг/мл. Удельная активность 1,33 Е/мг, рН раствора 6,2. ЛО осаждали из раствора сульфатом аммония при 70 % насыщении. При 35 % насыщении сульфата аммония осадок балластных белков не образовывался (в отличие от данных работы [1]). Осадок растворяли в 70 мл воды и диализовали сначала против воды в течение ночи, а затем против 20 мМ натрий-фосфатного буфера рН 7,4 (два раза по 2 л).

**Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе.** Отдиализованный раствор смешали со 100 мл густой суспензии ДЭАЭ-целлюлозы, уравновешенной тем же буфером. Элюировали белки в объеме буфером с возрастающими концентрациями NaCl. Объединяли фракции, элюированные 0,2 и 0,3 М NaCl, концентрировали (раствор № 1) на ячейке для ультрафильтрации фирмы «Amicon» (США) с фильтром YM 10. Диализовали раствор ЛО против 20 мМ натрий-фосфатного буфера рН 7,4. Фермент, элюированный 0,4 М NaCl (раствор № 2), а также 0,5 и 0,6 М NaCl (раствор № 3) осаждали  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  при 70 % насыщения, центрифугировали, растворяли в воде и диализовали против 20 мМ натрий-фосфатного буфера.

**Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-солозе.** Диализованные против буфера растворы. № 1–3 хроматографировали на колонке с ДЭАЭ-солозой (3,8×4 см), уравновешенной тем же буфером. Белки элюировали возрастающими концентрациями NaCl в буфере при скорости элюирования 40 мл/ч. Фракции концентрировали и диализовали против 20 мМ трис-НСI-буфера рН 7,4.

**Ионообменная хроматография методом HPLC (High Performance Liquid Chromatography).** HPLC проводили на полупрепаративных колонках (Protein Pak DEAE 5PW 21,5·150 мм Waters фирмы «Millipore») в 20 мМ трис-НСI-буфере рН 7,4. Фермент элюировали линейным градиентом концентрации NaCl от 0 до 0,7 М при скорости 2 мл/мин.

**Получение ЛО из *Trichoderma sp.*, выращенной глубинным способом.** Культура гриба *Trichoderma sp.* была выращена в 20 л ферментере на пшеничных отрубях по методу [4]. Балластные белки удаляли осаждением 25 % раствором сульфата аммония с последующим центрифугированием на центрифуге «Beckman G-25» при 810 об/мин в течение 30 мин.

Таблица 2

## Хроматография различных образцов ЛО из поверхностно выращенной *Trichoderma sp.* (см. табл. 1) на ДЭАЭ-солозе

Раствор	NaCl, М	Ферментативная активность, Е	Удельная активность, Е/мг
№ 1	0	0	0
	0,2	0	0
	0,3	405	19,3
	0,4	142	12,2
№ 2	0	0	
	0,3	0	
	0,4	37,8	
	0,6	0,5	
№ 3	0,3	0	
	0,4	16,5	
	0,6	22,6	

Таблица 3

Хроматография на ДЭАЭ-солозе ЛО из выращенной в ферментере *Trichoderma sp.*

№ фракции	NaCl, М	Количество фермента, Е	Удельная активность, Е/мг
1	0,2	1592	173
2	0,3	7873	98*
3	0,4	0	

Примечание. Звездочка — после лиофилизации удельная активность препарата составляла 60 Е/мг.

Хроматографию надосадочной жидкости проводили на бутилсилохроме С-80 (содержание бутиловых радикалов 80 мкмоль/г, размер частиц 0,1 мм). Колонку (5×70 см), содержащую 250 мл сорбента, уравнивали 0,02 М натрий-фосфатным буфером рН 6,0. Скорость нанесения и промывки фермента 25% раствором сульфата аммония составляла 200 мл/ч, скорость элюирования — 20 мл/ч. Активные фракции объединяли и концентрировали до 19 мл. Полученный раствор с концентрацией белка 5,8 мг/мл и удельной активностью 65 Е/мг диализовали против 20 мМ натрий-фосфатного буфера рН 7,4.

**Хроматография на ДЭАЭ-солозе.** Наносили раствор фермента на колонку, заполненную ДЭАЭ-солозой (3,8×4 см), и элюировали ЛО возрастающими концентрациями NaCl. Лизиноксидазной активностью обладали фракции, элюированные 0,2 и 0,3 М NaCl.

Ионообменную хроматографию методом HPLC проводили в тех же условиях, что и в случае поверхностно выращенной *Trichoderma sp.*

**Определение молекулярной массы препаратов ЛО.** Для сравнения молекулярной массы использовали гомогенные препараты ЛО и набор стандартных калибровочных белков. Электрофорез образцов осуществляли на приборе для быстрого разделения белков фирмы «Pharmacia».

Определение изоэлектрической точки препаратов ЛО осуществляли с использованием тех же препаратов ЛО, что и для определения молекулярной массы, и на том же приборе. Изоэлектрофокусирование проводили на пластине полиакриламидного геля с градиентом рН 3,0—9,0 фирмы «Pharmacia» (НОК 07536). Окрасивание образцов проводили красителем Кумасси.

Спектры оптического поглощения препаратов ЛО снимали на спектрофотометре «Perkin-Elmer 550S».

**Результаты и обсуждение. Сравнение субстратной специфичности препаратов ЛО.** В литературе имеются данные о том, что изменения условий культивирования гриба *Trichoderma sp.* влияют на субстратную специфичность продуцируемой им ЛО [3]. Для оценки изменения субстратной специфичности был использован суб-

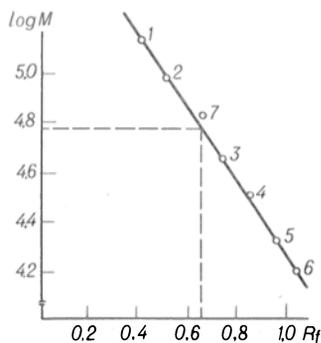


Рис. 1. Определение молекулярной массы субъединиц различных препаратов ЛО по данным электрофореза.

1 — фосфорилаза, мол. м 94 000, пробег 36,5 мм,  $R_f$  0,50; 2 — бычий сывороточный альбумин, 67 000, 48 мм, 0,65; 3 — овальбумин, 43 000, 54 мм, 0,74; 4 — карбоангидраза, 30 000, 62 мм, 0,85; 5 — соевый ингибитор, 20 100, 69 мм, 0,94; 6 —  $\alpha$ -лактоглобулин, 14 400, 73 мм; 7 — ЛО, 57 500, 47 мм, 0,6 соответственно.  $R_f$  — относительный электрофоретический пробег.

Таблица 4

Сравнение соотношения ферментативной активности по отношению к L-лизину и L-фенилаланину различных образцов ЛО

Препарат ЛО	$(A_{\text{Фен}}/A_{\text{Лиз}}) \times 100 \%$
Поверхностное выращивание: препарат № 1	2,0
Глубинное выращивание: препарат № 2	2,0
» № 3	4,5

Примечание. Препараты № 1 и 3 элюированы с ДЭАЭ-солозы 0,3 М NaCl, препарат № 2 — 0,2 М NaCl.

страт с незаряженным боковым радикалом — L-фенилаланин.

При очистке ЛО из поверхностно выращенной *Trichoderma sp.* было обнаружено, что активные фракции элюируются ДЭАЭ-целлюлозы при различных значениях ионной силы от 0,2 до 0,6 М (табл. 1). Тот факт, что при последующей хроматографии на ДЭАЭ-солозе раствора № 1 не наблюдается элюции активных фракций 0,6 М NaCl, а при хроматографии раствора № 3 — фракций, элюируемых 0,3 М NaCl (табл. 2), давал возможность предположить, что эти фракции обладают различными свойствами, в частности различной субстратной специфичностью. Для сравнения были использованы фракции, элюируемые с ДЭАЭ-солозы 0,3 и 0,6 М NaCl. Оказалось, что они практически не отличаются по активности в отношении L-фенилаланина. Соотношение активности по отношению к L-фенилаланину и L-лизину в этих фракциях составляет 2,7 и 2,2% соответственно. В связи с тем что основной пик активности элюируется при 0,3 М NaCl, именно эти фракции были использованы для дальнейшей очистки методом HPLC.

При хроматографии ЛО из глубинно выращенной *Trichoderma sp.* на ДЭАЭ-солозе были объединены активные фракции, элюируемые 0,2 и 0,3 М NaCl соответственно, которые затем были дополнительно очищены методом HPLC. Было проведено сравнение субстратной специфичности гомогенных препаратов ферментов после HPLC (табл. 3). Препараты № 1 и 2 не отличаются по соотношению активностей  $A_{\text{Фен}}/A_{\text{Лиз}}$ .

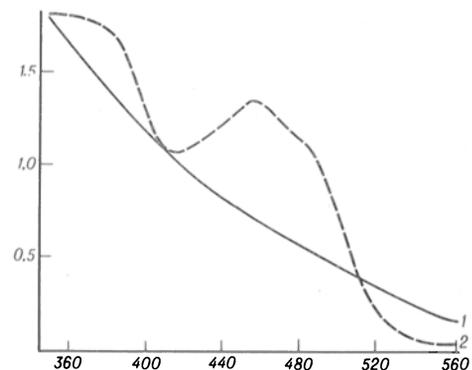


Рис. 2. Спектры оптического поглощения растворов ЛО в 20 мМ натрий-фосфатном буфере рН 7,4.

Здесь и на рис. 3: по оси абсцисс — длина волны, нм; по оси ординат — оптическая плотность. 1 — препарат № 1 (поверхностное выращивание); 2 — препарат № 3 (глубинное выращивание).

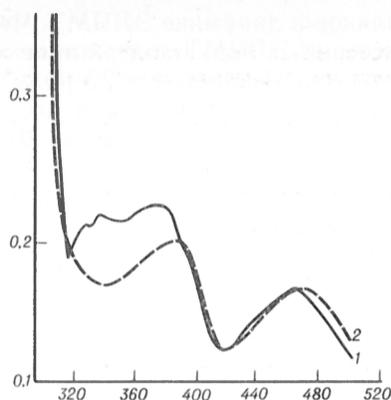


Рис. 3. Спектры оптического поглощения растворов ЛО (препарат № 3).

1 — в 20 мМ трис-НСI-буфере рН 8,0, содержащем 0,5 М NaCl; 2 — тот же раствор после диализа против 20 мМ натрий-фосфатного буфера.

Препарат № 3 (глубинное выращивание) обладает более высокой активностью по отношению к L-фенилаланину (4,5 %) (табл. 4). Измерение ферментативной активности препарата № 3 по отношению к аминокислотам, которые следуют за фенилаланином в ряду гидрофобности: L-лейцину и L-изолейцину, показало, что препарат № 3 на них не действует.

**Сравнение молекулярной массы.** При проведении электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия использованные препараты характеризуются одинаковой длиной пробега. Вычисленные молекулярной массы дает величину 57 кДа (рис. 1). Таким образом, образцы ЛО из глубинно и поверхностно выращенной *Trichoderma* sp. не отличаются по молекулярной массе. Препарат из поверхностно выращенного гриба содержал также небольшие минорные полосы с молекулярной массой 140 и 114 кДа, которые видны при сильной перегрузке дорожек, и, вероятно, соответствуют недиссоциировавшему димеру нативной ЛО.

**Сравнение изоэлектрической точки препаратов ЛО.** При нанесении препаратов ЛО в различных положениях картина расположения полос значительно изменяется. При расположении аппликатора ближе к аноду во всех образцах наблюдается только одна полоса с рI 4,25. Нанесение образцов в наиболее близком к катоду положении приводит к появлению дополнительной полосы в области рI 6,55 в препарате № 3.

**Сравнение спектров оптического поглощения.** Спектр ЛО из поверхностно выращенной *Trichoderma* sp. не имеет пиков поглощения, характерных для окисленной формы кофактора ФАД (рис. 2). Препарат ЛО из глубинно выращенной *Trichoderma* sp. имеет пик поглощения при 465 нм и большое плечо при 385 нм. Таким образом, можно предположить, что кофактор в различных препаратах ЛО находится в различных состояниях окисления. Различие в спектрах оптического поглощения выражается и во внешнем виде препаратов ферментов. Лиофилизированные препараты различаются по цвету: при глубинном культивировании — светло-желтый цвет, при поверхностном — желто-коричневый.

Спектры ЛО сильно зависят от условий.

В 20 мМ трис-НСI-буфере при высокой концентрации NaCl глубинно выращенная ЛО имеет два максимума оптического поглощения: при 465 и 385 нм. Диализ раствора фермента против 20 мМ натрий-фосфатного буфера рН 7,4 в течение ночи при 0—4 °С приводит к изменению спектра. При этом пик при 385 нм сглаживается и смещается в область 375 нм; появляется плечо при 326 нм (рис. 3). При проведении всей процедуры очистки в 20 мМ натрий-фосфатном буфере рН 7,4 пик при 385 нм сглаживается в большей степени и наблюдается в виде плеча.

Таким образом, нами получены гомогенные препараты ЛО: № 1 из поверхностно выращенной *Trichoderma* sp., № 2 и 3 — из глубинно выращенного гриба, элюируемые с ДЭАЭ-солозы 0,2 и 0,3 М NaCl соответственно. Эти препараты мало различаются по субстратной специфичности. Препараты № 1 и 3 характеризуются одинаковой молекулярной массой субъединиц (57 кДа). При изоэлектрофокусировании все три препарата дают основную полосу с рI 4,25.

Спектры оптического поглощения препаратов ЛО зависят от условий их измерения. Наблюдаются существенные различия в спектрах препаратов № 1 и 3. ЛО из поверхностно выращенной культуры и препарат № 3 из глубинно выращенной культуры (основной пик активности) не различаются по молекулярной массе, изоэлектрической точке, мало различаются по субстратной специфичности. Основные различия проявляются в спектрах оптического поглощения.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Лукашева Е. В., Березов Т. Т. // Приклад. биохим.— 1988.— Т. 24, № 4.— С. 459—465.
2. Смирнова И. П. А. с. 1520844 СССР.
3. Смирнова И. П. // Вопр. мед. химии.— 1988.— № 2.— С. 129—131.
4. Смирнова И. П., Хадыев С. Х. // Микробиология.— 1984.— Т. 53, № 1.— С. 163—164.
5. Хадыев С. Х., Лукашева Е. В., Смирнова И. П., Березов Т. Т. // Вопр. мед. химии.— 1985.— № 5.— С. 130—134.
6. Berezov T. T., Lukasheva E. V. // Biochem. int.— 1988.— Vol. 17, N 3.— P. 529—534.

Поступила 17.07.91

#### PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF L-LYSINE- $\alpha$ -OXIDASE FROM SURFACE AND FERMENTER GROWN *TRICHODERMA* SP

E. V. Lukasheva, V. S. Vesa, T. T. Berezov

Chair of Biochemistry, P. Lumumba Peoples' Friendship University, Moscow, Institute of Applied Enzymology, Vilnius.

Homogeneous preparations of L-lysine- $\alpha$ -oxidase were obtained from *Trichoderma* sp cultivated by using a surface technique and a fermenter set. The homogeneous enzyme preparations were similar in molecular mass, isoelectric point and substrate specificity. There was the single difference in the absorbance spectra, which may occur due to the presence of cofactor FAD in various oxidation states. The findings suggest that cultivation of *Trichoderma* sp in the fermenter set did not alter properties of L-lysine- $\alpha$ -oxidase produced.

*В. П. Пархомец, Н. Г. Чопик, О. В. Копьев,  
И. Г. Васильева*

## ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ПЛАЗМЫ КРОВИ В ДИНАМИКЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЛЕГКОЙ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ

Киевский НИИ нейрохирургии

Одним из основных первичных последствий черепно-мозговой травмы является изменение энергетического метаболизма мозга и всего организма вследствие нарушения функционирования механизмов саморегуляции [1, 7, 8]. Переход клеток нервной ткани на менее эффективный способ утилизации глюкозы приводит к развитию дефицита АТФ [5, 6], кроме того, в начальные сроки травматической болезни важное значение имеют стрессорные компоненты, неизбежно сопровождающие травму и приводящие к повышенному потреблению энергетических ресурсов. Со стороны организма в таких условиях формируется комплекс адаптационных изменений (повышение содержания гормонов — катехоламинов и кортикостерона — в крови), направленных на увеличение в плазме крови энергоемких соединений [11].

Известно, что многие патологические состояния приводят к специфическому изменению содержания жирных кислот в плазме крови, что может являться прогностическим и диагностическим критерием течения заболевания [3, 10, 12]. В литературе имеются данные о существенных изменениях в липидном составе сыворотки крови, затрагивающих уровень содержания свободного холестерина и его эфиров, триглицеридов и фосфолипидов [2]. Однако в литературе не имеется данных о содержании и составе жирных кислот в крови в посттравматическом периоде.

Данное сообщение посвящено изучению содержания жирных кислот в плазме крови кроликов в динамике экспериментальной легкой черепно-мозговой травмы (ЭЛЧМТ).

**Методика.** В эксперименте использовали кроликов-самцов породы серый великан массой 2,5—3 кг, содержавшихся на стандартном рационе вивария. ЭЛЧМТ наносили дружинным ударником конструкции Лукьянова по методике, описанной ранее [7]. Через 15 мин, 2 ч, 1, 3, 7 и 14 сут у животных брали 1 мл плазмы крови, добавляли 40 мкг внутреннего стандарта (бегеновая кислота С 22:0), проводили экстракцию и метилирование по методу, описанному в работе [9]. Газохроматографическое определение метиловых эфиров жирных кислот осуществляли на хроматографе «Сhrom-5» с плазменно-ионизационным детектором. Неподвижная фаза — 1% SE-30 на хромосорбе DMCS. Температура испарителя и детектора 260 °С, температура колонки задавалась программой 160—220 °С с приращением 4 °С и 220—260 °С с приращением 5 °С и 20 мин 260 °С.

Идентификацию жирных кислот осуществляли путем сравнения рассчитанных значений их эквивалентных длин цепей с величинами эквивалентных длин цепей реперных соединений, а также по отношению площадей пиков жирных кислот к площади пика внутреннего стандарта.

Статистический анализ проводили с использованием критерия *t* Стьюдента.

**Результаты и обсуждение.** В таблице представлены данные по исследованию состава и содержания жирных кислот в плазме

крови кроликов в динамике ЭЛЧМТ. Через 15 мин после нанесения ЭЛЧМТ содержание миристиловой кислоты увеличивается в 22 раза по сравнению с контрольным значением и достигает максимального значения через сутки (в 39 раз превышает контроль), минимального — через 7 сут (в 5,7 раза превышает контроль), а через 14 сут превышает контроль в 16 раз.

Содержание миристиновой кислоты в плазме крови кроликов через 15 мин после нанесения ЭЛЧМТ увеличивается в 4 раза, а через 2 ч снижается (в 3 раза ниже контрольного значения). После этого мы зарегистрировали увеличение содержания миристиновой кислоты, которая своего максимального значения достигает через 14 сут (в 7 раз превышает контрольное значение).

Содержание пентадекановой кислоты в плазме крови кроликов через 15 мин после нанесения ЭЛЧМТ увеличивается в 5 раз, после чего мы зарегистрировали резкое снижение содержания этой кислоты (достигающего минимального значения через сутки), которое длится до 14 сут (в 1,5 раза ниже контроля).

Содержание пальмитиновой кислоты в плазме крови кроликов через 15 мин после нанесения ЭЛЧМТ увеличивается в 5 раз, после чего мы установили снижение содержания этой кислоты через 2 ч (в 6,6 раза ниже контроля). Через 7 сут после нанесения ЭЛЧМТ содержание пальмитиновой кислоты в плазме крови кроликов увеличивается в 2,9 раза по сравнению с контролем и остается на этом уровне через 14 сут.

Содержание пальмитиновой кислоты в плазме крови кроликов через 15 мин после нанесения ЭЛЧМТ увеличивается в 12,5 раза, а через 2 ч снижается и в 2 раза превышает контрольное значение, оставаясь на этом уровне и через 2 нед после нанесения ЭЛЧМТ.

Содержание гептадекановой и маргариновой кислот в плазме крови кроликов через 15 мин после нанесения ЭЛЧМТ имеет тенденцию к увеличению, а в дальнейшем существенно не изменяется.

Содержание олеиновой, линолевой и стеариновой кислот плазмы крови кроликов через 15 мин после нанесения ЭЛЧМТ увеличивается в 3 раза, через 2 ч достигает контрольного значения, через сутки повторно увеличивается, достигая максимального значения через 7 сут (в 5,5 раза превышает контроль), и через 14 сут в 4 раза превышает контрольный уровень.

Содержание нонадекановой кислоты в плазме крови кроликов через 15 мин после нанесения ЭЛЧМТ существенно не изменяется, через 2 ч снижается и держится на этом уровне до 7-х суток после нанесения травмы, через 14 сут содержание этой кислоты достигает контрольного значения.

Содержание арахидоновой кислоты в плазме крови кроликов через 15 мин после нанесения ЭЛЧМТ увеличивается (в 6,4 раза превышает контрольное значение) и в дальнейшем незначительно снижается (через сутки после нанесения ЭЛЧМТ в 3,6 раза превышает контроль), но и через 2 нед содержание этой кислоты превышает контрольное значение в 4,6 раза.

Таким образом, через 15 мин после нанесения ЭЛЧМТ установлено увеличение содержания ин-

Жирная кислота	Контроль	Время после нанесения ЭЛЧМТ					
		15 мин	2 ч	1 сут	3 сут	7 сут	14 сут
Миристиловая	0,07±0,02	1,58±0,28*	1,18±0,44	2,85±0,664*	0,86±0,07*	0,41±0,10*	1,16±0,27*
Миристиновая	0,24±0,05	1,03±0,13*	0,08±0,01*	1,60±0,368*	1,19±0,21*	1,03±0,37	1,92±0,08*
Пентадекапояевая	1,43±0,04	5,11±0,98*	0,78±0,00*	0,19±0,030	1,09±0,07*	1,20±0,29	0,92±0,23
Пальмитолеяевая	0,65±0,16	3,38±0,90*	0,10±0,00*	0,59±0,175	0,53±0,11	1,93±0,06*	1,64±0,46
Пальмитиновая	20,92±3,18	260,82±76,20*	41,99±7,74*	48,89±14,189	57,55±9,82*	67,20±10,21*	57,34±6,82*
Гептадекапояевая } Маргариновая	1,77±0,79	4,45±1,03	1,12±0,22	2,14±0,579	2,28±0,38	4,71±1,48	3,41±0,60
Олеиновая } Линолеиновая } Стеариновая	30,20±3,57	102,92±7,87*	34,05±5,13	104,14±25,275	143,25±38,46*	165,26±36,81*	121,89±18,32*
Нонадекапояевая	13,96±2,92	15,54±0,45	5,84±1,49*	5,7±0,574*	6,19±1,34	6,66±0,68	12,36±2,65
Арахидиновая	2,19±0,68	14,00±0,08*	9,86±0,77*	7,85±1,169*	10,34±2,23*	12,48±1,16*	10,12±2,01*

Примечание. Звездочка — значения, достоверно отличающиеся от контроля (p<0,01).

дивидуальных жирных кислот в плазме крови кроликов, однако следует отметить непропорциональность увеличения содержания индивидуальных жирных кислот; основной удельный вес приходится на пальмитиновую и комплекс С 18 кислот (олеиновая, линолеяевая и стеариновая). Этот факт, по нашему мнению, можно объяснить изменением регуляции катаболизма разных классов липидов с преимущественным липолизом фосфатидилхолинов, фосфатидилэтаноламинов и нейтральных липидов. Кроме этого, не исключена вероятность активации синтеза пальмитиновой кислоты de novo [4].

Нами охарактеризована динамика изменений суммарного содержания жирных кислот в плазме крови кроликов после нанесения ЭЛЧМТ. Через 15 мин после травмы суммарное содержание жирных кислот (С 14 — С 20:4) значительно (в 5,5 раза) превышает контрольное значение, что может быть обусловлено стрессорной реакцией. Однако уже через 2 ч это значение практически равно контрольному и в первые сутки лишь незначительно превышает контрольное значение. Через 3 сут мы установили вторичное повышение суммарного содержания жирных кислот в плазме крови, которое достигает максимального значения через 7 сут (в 3,5 раза превышает контрольное значение). Вторичное увеличение содержания жирных кислот в плазме крови, по нашему мнению, является одной из компенсаторно-приспособительных реакций, направленных на преодоление устойчивого энергетического дефицита в ткани мозга (синтез АТФ снижается на 95 %) [6]. Таким образом, повышенное содержание жирных кислот в плазме крови может служить диагностическим критерием для определения энергетического дефицита в посттравматическом периоде.

Повышение суммарного содержания жирных кислот в динамике травматической болезни хорошо коррелирует с уровнем содержания кортикостерона в плазме крови кроликов, что подтверждает наше предположение об адаптационной природе этих изменений. Увеличение содержания липидов в плазме крови в течение длительного времени может быть причиной изменения липидного состава мембран сосудов, одним из следствий чего может стать формирование сосудистой патологии в отдаленном посттравматическом периоде.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Васильева И. Г., Копьев О. В., Минченко А. Г. // Бюл. экспер. биол.— 1991.— № 1.— С. 25—28.
2. Гельфанд В. Б., Маламуд М. Д., Истратов В. Г. Закры-

- тая черепно-мозговая травма.— Кишинев, 1986.— С. 163—166.
3. Кулагин Ю. И., Левачев М. М., Сюрин А. А., Лукинович В. Л. // Вопр. мед. химии.— 1989.— № 3.— С. 129—132.
4. Ньюсхолм Э., Старт К. Регуляция метаболизма.— М., 1977.
5. Пархомец В. П., Васильев А. П., Ручко М. В. // Журн. невропатол. и психиатр.— 1989.— № 5.— С. 34—37.
6. Промислов М. Ш. Обмен веществ в мозге и его регуляция при черепно-мозговой травме.— М., 1984.
7. Ромоданов А. П., Копьев О. В. // Вести. АМН СССР.— 1984.— № 12.— С. 19—25.
8. Ромоданов А. П., Тушевский В. Ф., Копьев О. В. // Вопр. нейрохир.— 1987.— № 1.— С. 16—24.
9. Синяк К. М., Оргель М. Я., Крук В. И. // Лаб. дело.— 1976.— № 1.— С. 37—41.
10. Терновой В. Я., Яковлев В. М. // Вопр. мед. химии.— 1989.— № 5.— С. 58—61.
11. Харкевич Н. Г., Протас Р. Н. // Вопр. нейрохир.— 1980.— № 3.— С. 27—31.
12. Tilvis R. S., Erkinjuntti T., Sulkava R., Miettinen T. A. // Metabolism.— 1987.— Vol. 65.— P. 237—245.

Поступила 23.07.91

#### ALTERATIONS IN CONTENT OF BLOOD PLASMA FATTY ACIDS IN DYNAMICS OF EXPERIMENTAL MILD CRANIOCEREBRAL INJURY.

V. P. Parkhomets, N. G. Chopik, O. V. Kopyev, I. G. Vasilyeva  
Research Institute of Neurosurgery, Kiev.

Content of fatty acids was studied in the blood plasma of rabbits in dynamics of experimental mild craniocerebral injury using gas-liquid chromatography. The content of all the fatty acids studied was markedly increased within the initial periods; then it was decreased down to control values within 2 hrs with the subsequent repeated increase. All these alterations appear to be compensatory body's reactions to the trauma.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.89-008.441.13-07:[616.153.1:577.15]-074

А. Е. Тейтельбаум, П. С. Пронько,  
В. И. Сатановская, Ю. М. Островский

#### ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ СЫВОРОТОЧНЫХ ФЕРМЕНТОВ У БОЛЬНЫХ АЛКОГОЛИЗМОМ

Институт биохимии АН Беларуси, Гродно

Диагностика алкоголизма, особенно на его ранних стадиях, когда часть больных склонны скрывать злоупотребление алкоголем, все еще остается актуальной проблемой [7, 16]. За последние 10—

15 лет для диагностики этого заболевания было предложено немало лабораторных методов, включая измерение активности некоторых сывороточных ферментов [15, 16]. Хотя их чувствительность и специфичность в диагностике алкоголизма весьма различны, такого рода исследования играют значительную роль в повседневной клинической практике [5, 6, 15, 16].

К наиболее изученным и, по некоторым данным, весьма удобным для ранней диагностики алкоголизма ферментам можно отнести определение активности  $\gamma$ -глутамилтрансферазы (ГГТ), особенно в сочетании с АЛТ и АСТ [6, 14–16]. Изменения активности всех трех ферментов, однако, обладают относительной специфичностью [7, 15, 16], поэтому перспективным представилось изучение активности одного из них — ГГТ и алкоголь- и альдегиддегидрогеназы (АДГ и АльДГ), непосредственно участвующих в метаболизме этанола.

Если активность АльДГ эритроцитов у здоровых лиц и больных алкоголизмом изучалась многими исследователями, то данные об определении активности фермента в плазме крови остаются противоречивыми [3, 6, 8], возможно, вследствие различий в использованных субстратах, их концентрации и методах определения. Сведения об активности АДГ и АльДГ в сыворотке крови больных алкоголизмом ограничены единичными публикациями [5, 6, 12]. Представлялось интересным исследовать и устойчивость данных показателей при функциональной нагрузочной пробе с введением испытуемым небольшой дозы алкоголя.

**Методика.** Обследовано 103 мужчины в возрасте от 23 до 58 лет. Преобладающую возрастную группу составили лица от 31 года до 58 лет — 76 %. Среди обследованных было 5 больных алкоголизмом I стадии, 43 больных — II стадии и 6 больных — III стадии. Группы больных с I, II и III стадиями достоверно отличались по длительности злоупотребления алкоголем ( $5,0 \pm 1,4$ ,  $13,0 \pm 1,0$  и  $28,0 \pm 1,2$  года соответственно;  $p < 0,05$ — $0,001$ ), давности заболевания ( $1,8 \pm 0,4$ ,  $6,2 \pm 0,5$  и  $17,2 \pm 1,8$  года;  $p < 0,05$ — $0,001$ ) и возрасту ( $30,6 \pm 3,5$ ,  $39,2 \pm 1,2$  и  $49,7 \pm 4,3$  года;  $p < 0,05$ — $0,001$ ).

У всех исследуемых больных не ранее чем через 24 ч после поступления в наркологический стационар утром натощак до и через 1 ч после приема алкоголя в дозе  $0,4$  г/кг массы из локтевой вены брали 5 мл крови для определения в сыворотке активности АДГ [17], АльДГ [3] и ГГТ (методика фирмы «Лахема»). Активность АльДГ сыворотки ( $0,2$  мл) определяли спектрофотометрически в  $0,1$  М глициновом буфере рН 10,0 с ацетальдегидом ( $28$  мМ) в качестве субстрата в присутствии NAD ( $1,2$  мМ) по скорости его восстановления в общем объеме  $3$  мл [3]. Скорость неэнзиматической реакции контролировали в аналогичных пробах, не содержащих сыворотку крови. Изменение оптической плотности при  $340$  им измеряли на регистрирующем спектрофотометре «Spesord M-40» (Германия). Активность фермента выражали в микромолях NADH, образованного за  $1$  мин на  $1$  л сыворотки. Повторное исследование активности ферментов проводили через  $10$  дней пребывания в стационаре на фоне дезинтоксикационной терапии. Кроме вышеназванных, определяли общепринятые в клинике биохимические и гематологические показатели.

Оценку выраженности алкогольного абстинентного синдрома (ААС) проводили с помощью клинической шкалы, предусматривающей 4-балльную оценку каждого из 18 симптомов [1].

Контрольная группа соответствовала опытной по полу и возрасту (от 17 до 53 лет) и состояла из 49 здоровых доноров. Исследование ферментативной активности проводили однократно.

Оценивали диагностическую чувствительность, специфичность и эффективность показателей [18]. Математическую обработку результатов проводили на ЭВМ «Мера — Казмак СМ 4».

**Результаты и обсуждение.** При первом обследовании больных активностью АДГ и ГГТ была повышена и соответствовала тяжести заболевания (см. таблицу). Внутри группы больных алкоголизмом достоверные различия в активности данных ферментов отмечаются между больными с I и III стадиями, а по активности АДГ — и между больными II и III стадиями. Ранее нами продемонстрирована достоверная корреляция между степенью повышения активности АДГ у больных алкоголизмом и количеством потребляемого алкоголя, а также длительностью заболевания [5]; сходные взаимосвязи найдены другими исследователями и для ГГТ [16]. В данной работе для больных с III стадией обнаружена корреляция между активностью ГГТ и выраженностью отдельных проявлений ААС, в частности частотой сердечных сокращений ( $r=0,91$ ;  $p < 0,01$ ). Для больных с I стадией выявлены достоверные корреляции между активностью данного фермента и минимальным артериальным давлением ( $r=0,78$ ;  $p < 0,05$ ) и бессонницей ( $r=0,94$ ;  $p < 0,01$ ), а для II стадии — уровнем толерантности к алкоголю ( $r=0,62$ ;  $p < 0,01$ ).

Прием алкоголя не приводит к достоверным изменениям активности АДГ и ГГТ, но увеличивает индивидуальные колебания.

Для больных всех сравниваемых групп характерны положительные корреляции между уровнями активности данных ферментов до и после нагрузки этанолом (АДГ:  $r=0,99$ ,  $p < 0,001$ ,  $r=0,37$ ,  $p < 0,05$  и  $r=0,86$ ,  $p < 0,01$  для больных с I, II и III стадиями соответственно; ГГТ:  $r=0,86$ ,  $p < 0,05$ ,  $r=0,38$ ,  $p < 0,05$  и  $r=0,99$ ,  $p < 0,001$  для больных с I, II и III стадиями соответственно).

По литературным данным, прием большой дозы алкоголя ( $60$  г в день) в течение нескольких дней не изменил активность ГГТ сыворотки крови здоровых добровольцев [10].

Активность АльДГ в группах больных достоверно ниже, чем в контрольной группе (см. таблицу). Введение алкоголя существенно не изменяет активность данного фермента (см. таблицу), но после нагрузки этанолом обнаруживается корреляционная связь между уровнем активности фермента и количеством лимфоцитов, особенно выраженная у больных с III стадией алкоголизма ( $r=0,93$ ;  $p < 0,01$ ). Количество лимфоцитов отражает выраженность неспецифических адаптационных реакций организма [2]. Возможно, что активность АльДГ-фермента, участвующего в метаболизме биогенных альдегидов и нейромедиаторов [4], также может отражать степень дисбаланса гомеостаза, выраженность стрессорных реакций организма.

Отсутствие изменений активности сывороточной АДГ и АльДГ после введения этанола (см. таблицу) является фактором, свидетельствующим в пользу возможности использования данных тестов для диагностики хронического алкоголизма, так как нечувствительность к острой алкогольной интоксикации является одним из критериев отбора потенциальных биологических маркеров алкоголизма [13].

При повторном исследовании активности ферментов на 10-й день дезинтоксикационной терапии наблюдаются изменения активности АДГ и ГГТ в сторону нормализации. Активность АДГ

**Активность АДГ, ГГТ и АльДГ сыворотки крови больных алкоголизмом до и после нагрузки этанолом и через 10 дней лечения**

Стадия алкоголизма	АДГ, мкмоль/л·мин			ГГТ, ед.			АльДГ, мкмоль/л·мин		
	до нагрузки этанолом	после нагрузки этанолом	через 10 дней лечения	до нагрузки этанолом	после нагрузки этанолом	через 10 дней лечения	до нагрузки этанолом	после нагрузки этанолом	через 10 дней лечения
Норма (контроль) (n=49)	0,45±0,08	—	—	26,33±2,67	—	—	11,27±0,62	—	—
I (n=5)	0,79±0,14*	0,91±0,34	0,41±0,18	34,67±1,2**	33,5±6,5	36,0±6,3	3,74±0,93***	5,59±0,97	4,35±1,45***
II (n=43)	2,20±0,51 <sup>†</sup>	1,83±0,45**	0,48±0,13	70,8±18,3*	64,8±22,3**	31,33±6,56	5,97±0,47 <sup>†</sup>	5,27±0,55	4,66±0,59***
III (n=6)	4,68±1,32 <sup>†</sup>	4,76±1,45 <sup>†</sup>	3,33±0,79 <sup>††</sup>	108,25±30,44	73,33±13,8 <sup>†</sup>	74,83±25,9	4,43±1,21***	7,54±2,8	3,28±0,76***

Примечание. Одна, две и три звездочки —  $p < 0,05$ ,  $0,01$  и  $0,001$  соответственно между здоровыми (контроль) и больными алкоголизмом, один и два плюса —  $p < 0,05$  и  $0,01$  соответственно между больными с I стадией и больными со II и III стадиями.

остается повышенной лишь в группе больных с III стадией алкоголизма. Такая быстрая динамика у больных с I и II стадиями может свидетельствовать об отсутствии выраженных органических поражений печени, поскольку активность АДГ в сочетании с ГГТ отражает глубину повреждения печени [12]. Для больных с III стадией заболевания существенных изменений в активности данных ферментов не наблюдается.

Что касается АльДГ, то и после 10-дневного лечения активность фермента во всех группах по-прежнему ниже, чем в контроле. Учитывая условия определения, можно полагать, что сывороточная активность АльДГ представлена формами фермента с высокой  $K_m$ , источником которых могут быть как печень, так и эритроциты. Поэтому найденное нами снижение активности, вероятнее всего, отражает процессы, происходящие в этих тканях, где активность данного фермента у больных алкоголизмом снижена и нормализуется в период от 2 нед (эритроциты) до нескольких месяцев (печень) [9, 11].

Использование снижения активности АльДГ позволяет с высокой чувствительностью (92,3 %) диагностировать алкоголизм и его ранние проявления на I стадии заболевания (90,2 %) при специфичности 84,2 % (дискриминационный порог — ДП равен 8,57 мкмоль/л·мин). Таким образом, диагностическая эффективность АльДГ составила 176 %. Чувствительность, специфичность и эффективность АДГ равны 74,5, 86,2 и 160,7 % (ДП = 0,96 мкмоль/л·мин), а ГГТ — 44,4, 90 и 134,4 % соответственно (ДП = 38,2 ед.).

Следовательно, наибольшей чувствительностью и эффективностью обладает АльДГ, затем следуют АДГ и ГГТ, по этим критериям диагностическая ценность первых двух ферментов выше, чем у большого числа лабораторных показателей, оцененных аналогичным образом при обследовании больных алкоголизмом [7].

Совместное использование АДГ, АльДГ и ГГТ позволяет диагностировать алкоголизм в 98,1 % случаев при специфичности 78,9 % и эффективности 177 %.

Таким образом, хотя данные тесты не обладают абсолютной специфичностью, их чувствительность высока, а активность коррелирует с потреблением алкоголя, стадией заболевания и рядом других клинических характеристик алкоголизма, поэтому они могут дать дополнительную объективную информацию. В частности, повышенное активности АДГ и ГГТ у больных алкоголизмом при поступлении в стационар, быстрое сни-

жение активности в процессе лечения у больных с I и II стадиями и отсутствие динамики при III стадии заболевания позволяют использовать эти тесты для диагностики алкоголизма и его стадий, оценки состояния больных и эффективности лечения в совокупности с другими лабораторными и клиническими данными.

Использование комбинации трех тестов, в которой учитывается снижение активности АльДГ и повышение активности АДГ и ГГТ сыворотки крови, приводит к повышению чувствительности и эффективности диагностики алкоголизма по сравнению с каждым ферментом в отдельности.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Бокый И. В., Лапин И. П. Алкогольный абстинентный синдром.— Л., 1976.
2. Гаркави Л. Х., Квакина Е. Б., Уколова М. А. Адаптационные реакции и резистентность организма.— Ростов-н/Д., 1979.
3. Методы ранней диагностики алкоголизма и контроля устойчивости ремиссии в условиях Якутии (клинические и биохимические): Метод. рекомендации / Тазлова Р. С., Алексеев В. Г., Кершенгольц Б. М. и др.— Якутск, 1988.
4. Островский Ю. М., Сатановская В. И., Садовник М. Н. Биологический компонент в генезисе алкоголизма.— Минск, 1986.
5. Пронько П. С., Королева Е. Г. // Здравоохран. Белоруссии.— 1988.— № 5.— С. 32—35.
6. Чернобровкина Т. В., Кершенгольц Б. М., Алексеева В. Г. и др. // Лаб. дело.— 1986.— № 9.— С. 523—525.
7. Яковченко В. Я., Шилов В. П., Косинова Н. Р. и др. // Вопр. наркол.— 1989.— № 1.— С. 12—15.
8. Helander A., Toltmar O. // Biochem. Pharmacol.— 1987.— Vol. 36, N 7.— P. 1077—1082.
9. Jenkins W. J., Cakebrea K., Palmer K. R. // Lancet.— 1982.— 8310.— P. 1975.
10. Karkkainen P., Jokelainen K., Roine R. et al. // Drug Alcohol Depend.— 1990.— Vol. 25.— P. 35—38.
11. Lin C.-C., Potter J. J., Mezey E. // Alcoholism: Clin. exp. Res.— 1984.— Vol. 8, N 6.— P. 539—541.
12. Maier-Tackmann D., Agarwal D. P., Goedde H. W. // Alcohol a. Alcoholism.— 1984.— Vol. 19, N 1.— P. 7—12.
13. Nalpas B., Poupon R. E., Vassault A. et al. // Biomedical and Social Aspects of Alcohol and Alcoholism / Eds K. Kuriyama, A. Takada, H. Ishii.— Amsterdam, 1988.— P. 517—519.
14. Rosalski S. D., Ran D. // Clin. chim. Acta.— 1972.— Vol. 39.— P. 41—47.
15. Ryback R. S. // Advanc. Alcohol Subst. Abuse.— 1986.— N 2.— P. 191—207.
16. Salaspuro M. // Enzyme.— 1987.— Vol. 37.— P. 87—107.
17. Skurskij L., Kovar S., Stachova M. // Analyt. Biochem.— 1979.— Vol. 99.— P. 65—71.
18. Stamm D., Hansert E., Feuerlein W. // J. clin. Chem. clin. Biochem.— 1984.— Vol. 22.— P. 79—96.

Поступила 16.09.91

DIAGNOSTIC EFFICIENCY OF DETERMINING THE ACTIVITY OF SOME SERUM ENZYMES OF PATIENTS WITH ALCOHOLISM.

Activities of alcohol, aldehyde dehydrogenases (ADH, AIDH, respectively) and  $\gamma$ -glutamyl transferase (GGT) were estimated in blood serum of patients with Stages I-III alcoholism (54 men) on admission to the hospital, within 1 hr after ethanol testing (in a dose of 0.4 g/kg of body mass) and during the treatment course. Distinct activation of ADH and GGT and decrease in activity of AIDH were found in the patients as compared with healthy volunteers. Alcohol test did not alter noticeably the enzymatic activity studied. The activity of ADH and GGT was normalized in patients with Stages I-II alcoholism during the treatment course. AIDH exhibited the highest diagnostic efficacy, whose sensitivity and specificity were 92 % and 84 %, respectively; those for ADH 74 % and 86 % and for GGT 44 % and 90 %, respectively. Simultaneous estimation of the activity of the three enzymes improved the sensitivity and efficacy of diagnostic technique and enabled the test to be used as an additional criterion in the diagnosis of alcoholism and in the evaluation of the patients' state and therapeutical efficacy.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.33/.34-07:1616.33-008.831:577.152.191.042.2

И. А. Переслегина, Ж. В. Антипина, Н. Б. Плетнева,  
И. Р. Мочалова, Е. А. Жукова, Л. А. Беленцова

### СУПЕРОКСИДУСТРАНЯЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ЖЕЛУДОЧНОГО СОКА ПРИ ГАСТРОДУОДЕ- НАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

НИИ педиатрии, Нижний Новгород

Основным патогенетическим звеном при развитии заболеваний желудка и двенадцатиперстной кишки признается несоответствие между агрессивными свойствами желудочного содержимого и резистентностью слизистой оболочки органов гастродуоденальной зоны. Одним из факторов, определяющих состояние резистентности слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки, является перекисное окисление липидов (ПОЛ) [8]. Значение ПОЛ в синтезе простагландинов [11, 20], его регулирующее влияние на свойства и функции клеточных мембран [2, 4], а также на скорость размножения клеток [3], определяющей регенерационную способность ткани, свидетельствуют об участии перекисных процессов как в презептальной (слизееобразование), так и в эпителиальной (гидрофобность апикальных мембран эпителиоцитов, быстрая обновляемость клеток) защите. При гастродуоденальных заболеваниях в слизистой оболочке желудка и двенадцатиперстной кишки происходит накопление перекисных продуктов и нарушение эндогенной антиоксидантной защиты [13, 14, 16, 21]. Однако активность перекисных процессов в слизистой оболочке контролируется, по-видимому, не только внутриклеточными механизмами, но и антиоксидантной системой желудочного сока, о чем свидетельствует возможность защиты слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки при внутрижелудочном введении антиоксидантов. Хороший эффект получен при использовании дибунола [9], супероксиддисмутазы [6], супероксиддисмутазы в сочетании с каталазой [24]. Поскольку экзогенные анти-

оксиданты по-разному вмешиваются в метаболические процессы организма в зависимости от состояния собственных антиоксидантных систем [7], при использовании антиоксидантов в процессе лечения гастродуоденальных заболеваний необходимо учитывать состояние антиоксидантных свойств желудочного сока. Однако, за исключением единичных работ [10, 15, 25], эти свойства желудочного сока практически не исследованы.

Целью настоящей работы явилось изучение супероксидустранивающей активности (СУА) желудочного сока больных хроническим гастродуоденитом и язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки и путей ее регуляции.

**Методика.** Исследованы базальная и стимулированная порции желудочного сока 87 детей 7—15 лет с хроническим гастродуоденитом и язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки в фазу обострения и ремиссии заболеваний, а также желудочный сок 10 здоровых детей. Длительность заболевания составила 1,5—7 лет. Больные находились на традиционном лечении, включающем диету, седативные средства, антациды, спазмолитики, препараты холинергического ряда. 16 человек с язвенной болезнью, кроме традиционного лечения, получали антацидный бифилакт (по 150 мл 3 раза в день в течение 3—4 нед), представляющий собой продукт лечебного питания, разработанный в Нижегородском НИИ педиатрии Минздрава РСФСР [17].

Желудочный сок получали методом зондирования по Н. Л. Лепорскому. СУА оценивали по степени ингибирования восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) в присутствии НАДН и фенозинметасульфата (ФМС) [19, 23]. Состав реакционной смеси: 1,2 мл 0,15 М фосфатного буфера pH 7,8, 0,1 мл 0,160 мМ ФМС, 0,3 мл 0,610 мМ НСТ, 0,2 мл 1 мМ НАДН, 0,3 мл желудочного сока. При добавлении желудочного сока pH реакционной смеси существенно не изменялся. Реакцию начинали добавлением НАДН и останавливали через 1 мин добавлением 1 мл ледяной уксусной кислоты. Интенсивность окраски измеряли при длине волны 540 нм. Активность выражали в условных единицах на 1 мл [12].

В желудочном соке методом атомно-абсорбционной спектrophотометрии с регистрацией на С-115М1 определяли содержание (в микромолях на 1 л) меди и железа. Методом титрования определяли концентрацию (в микромолях) восстановленного и окисленного глутатиона [18].

У 15 больных параллельно с определением СУА желудочного сока проведено морфометрическое исследование биоптатов двенадцатиперстной кишки.

Результаты обработаны методом вариационной статистики по Стьюденту с использованием корреляционного анализа.

**Результаты и обсуждение.** Гастродуоденальная патология характеризуется снижением по сравнению с нормой СУА желудочного сока, особенно стимулированной порции (табл. 1). Наибольшая степень снижения имеет место в фазу ремиссии и составляет 24 % ( $p > 0,05$ ) в базальной порции и 42 % ( $p < 0,05$ ) в стимулированной. В фазу обострения СУА базальной порции увеличивается до уровня здоровых детей, а в стиму-

Таблица 1  
СУА желудочного сока при гастродуоденальной патологии

Группа обследованных	СУА, ед/мл·мин	
	базальной порции	стимулированной порции
Здоровые (n=10)	6,63±0,86	10,28±1,27
Обострение (n=87)	6,68±0,43	7,53±0,27
Ремиссия (n=70)	5,05±0,21	6,04±0,32*

Примечание. Здесь и в табл. 3 звездочка — различия со здоровыми детьми достоверны ( $p < 0,05$ ).

Влияние ряда факторов на СУА желудочного сока

Условия определения СУА	Конечная концентрация добавленного компонента, мкМ	СУА, ед/мл·мин
Исходный желудочный сок рН 1,5		3,75±0,02
+глутатион восстановленный	6	4,83±0,03*
	20	20,85±0,05*
+CuSO <sub>4</sub>	1,9	38,45±0,02*
	15	333,30±0,04*
+Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	0,75	3,53±0,12
	1,88	3,70±0,07
	3,70	4,52±0,77
	11,2	3,22±0,21
+FeSO <sub>4</sub>	1,88	1,80±0,02*
	15	0
+лимонная кислота	1,35	12,60±0,02*
+альмагель А	До рН 5,0	2,10±0,01*
	7,0	1,84±0,34*

Примечание. Звездочка —  $p < 0,05$  в сравнении с исходным желудочным соком; число наблюдений 32.

лированной порции она остается ниже этого уровня на 27 % ( $p > 0,05$ ).

Степень снижения СУА зависит от функционального состояния желудка и наиболее выражена при низком кислотообразовании. Так, у больных с высокой кислотообразующей функцией средние значения СУА стимулированной порции желудочного сока в фазу обострения составили  $7,61 \pm 0,31$  ед/мл·мин ( $n=55$ ), с сохранной функцией —  $4,33 \pm 0,29$  ед/мл·мин ( $n=12$ ) и с низкой кислотообразующей функцией —  $1,82 \pm 0,43$  ед/мл·мин ( $n=20$ ). Установлено, что между СУА и кислотностью желудочного сока существует прямая корреляционная связь ( $r = +0,63$ ;  $p < 0,05$ ).

Изменения СУА желудочного сока также зависели от характера течения гастродуоденальных заболеваний. При неблагоприятном течении, характеризующимся частыми рецидивами, наличием осложнений, величина СУА стимулированной порции в фазу обострения составила  $6,03 \pm 0,80$  ед/мл·мин, что на 41 % ниже, чем у здоровых детей ( $p < 0,05$ ), в то время как при благоприятном течении значения СУА, равные  $9,13 \pm 1,50$  ед/мл·мин, от показателей здоровых детей практически не отличались. Оказалось, что для неблагоприятного течения гастродуоденальных заболеваний характерны не только низкие, но и чрезмерно высокие значения СУА, составившие в стимулированной порции  $14,42 \pm 0,52$  ед/мл·мин, что на 40 % ( $p < 0,05$ ) выше, чем в норме. Такие значения СУА зарегистрированы у 16 % больных с высокой кислотностью (9 человек из 55) при длительности заболевания, не превышающей 5 лет.

Исследование взаимосвязи между антиоксидантными свойствами желудочного сока и морфологической характеристикой слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки показало наличие прямой корреляции между СУА желудочного сока и количеством плазматических клеток собственной пластинки ворсин, участвующих в иммунных механизмах защиты слизистой оболочки ( $r = +0,59$ ;  $p < 0,05$ ), а также количеством бокаловидных клеток эпителия ворсин, участвующих в продукции слизи ( $r = +0,78$ ;  $p < 0,05$ ). Таким образом, СУА желудочного сока оказывает регулирующее влияние на состояние резистентности слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки, поэтому ее восстановление должно быть одним из принципов лечения гастродуоденальной патологии.

Неблагоприятные последствия повышения СУА желудочного сока могут быть объяснены на основе механизма устранения супероксидных радикалов. Ранее нами было установлено, что СУА желудочного сока имеет неферментативный характер и является интегративным результатом действия ионов  $H^+$ , ионов меди, восстановленного глутатиона, увеличивающих СУА, а также ионов двухвалентного железа, снижающих ее [15]. Введение в реакционную смесь таких хелаторов, как гистидин и органические кислоты, вызывает повышение СУА желудочного сока, добавление антацидов уменьшает ее (табл. 2).

Известно, что дисмутация  $O_2$  в организме не является уникальным свойством только фермента. Выявленный нами механизм СУА желудочного сока соответствует данным литературы, касающим-

ся способности ионов  $H^+$ , ионов меди и восстановленного глутатиона подавлять образование  $O_2^-$  [22, 26]. Супероксидные радикалы могут использоваться в реакции Габера — Вайса, катализируемой ионами  $Fe^{3+}$  [1]. Однако, как оказалось, в желудочном соке ионы  $Fe^{3+}$  не влияют на СУА, а добавление ионов  $Fe^{2+}$  подавляет ее.

Неферментативное устранение  $O_2^-$  в отличие от реакции, протекающей с участием фермента, ведет к образованию гидроксильных радикалов [1, 22, 26], оказывающих токсическое действие на мембранные структуры. С этой позиции увеличение СУА желудочного сока можно рассматривать как увеличение его агрессивности. Определенным подтверждением этого является отрицательная взаимосвязь СУА с известным защитным компонентом желудочного сока — лизоцимом ( $r = -0,48$ ;  $p < 0,01$ ). Однако участие СУА желудочного сока в процессах слизиобразования и иммунных механизмах защиты слизистой оболочки позволяет ставить задачу поддержания этого параметра на необходимом и достаточном уровне.

Учитывая роль ионов  $H^+$  в механизме устранения  $O_2^-$ , низкие значения СУА у больных с низкой кислотностью желудочного сока очевидны. Гораздо более удивительным явился факт снижения этого показателя у больных с высокой кислотностью. В данной группе больных СУА желудочного сока снижена у 51 % в базальной порции и у 62 % в стимулированной, составляя соответственно  $3,06 \pm 0,20$  и  $4,69 \pm 0,28$  ед/мл·мин, что на 54 % ниже нормы ( $p < 0,05$ ).

Исследование количества микроэлементов и восстановленного глутатиона в желудочном соке показало (табл. 3), что при обострении гастродуоденальных заболеваний концентрация меди снижена в базальной порции желудочного сока на 27 % ( $p < 0,05$ ), в стимулированной на 41 % ( $p < 0,05$ ). Содержание восстановленного глутатиона уменьшено на 23 % в базальной порции ( $p > 0,05$ ) и на 17 % в стимулированной ( $p < 0,05$ ). Отмечена тенденция к снижению содержания железа; его концентрация снижена на 12 % ( $p < 0,05$ ). Между величиной СУА желудочного

Концентрация (в мкМ) микроэлементов и глутатиона в желудочном соке при обострении язвенной болезни двенадцатиперстной кишки

Группа	Fe стимулированный желудочный сок	Cu		Глутатион	
		базальный	стимулированный	базальный	стимулированный
Здоровые	5,760±0,003 (n=5)	1,200±0,001 (n=5)	1,460±0,002 (n=8)	90,1±7,3 (n=15)	91,3±2,5 (n=15)
Больные	5,040±0,002* (n=13)	0,880±0,001* (n=8)	0,860±0,001* (n=10)	69,2±8,6 (n=20)	75,4±4,0* (n=24)

сока и содержанием меди выявлена прямая корреляционная связь ( $r=+0,79$  в базальной порции;  $p<0,05$ ;  $r=+0,91$  в стимулированной порции;  $p<0,05$ ). С содержанием железа связь отрицательная ( $r=-0,38$  в базальной порции;  $p<0,05$ ;  $r=-0,33$  в стимулированной порции;  $p<0,05$ ). Полученные данные позволяют сделать предположение о том, что при высокой кислотности желудочного сока причиной низкой СУА может служить дефицит ионов меди и восстановленного глутатиона.

Для коррекции выявленных нами нарушений использован кисломолочный продукт, который, кроме антацидного эффекта, обладает, как оказалось, СУА, сравнимой с активностью желудочного сока и равной  $19,80\pm 2,52$  ед/мл·мин. Ранее показано [5], что включение антацидного бифилакта в курс лечения в 3 раза снижает число рецидивов хронического гастродуоденита и язвенной болезни двенадцатиперстной кишки. Одной из причин эффективного лечения с использованием данного продукта является нормализующий эффект на СУА желудочного сока. Величина этого параметра, составлявшая до лечения  $6,15\pm 1,38$  ед/мл·мин в основной группе и  $6,35\pm 0,35$  ед/мл·мин в контрольной, после лечения антацидным бифилактом увеличилась до  $10,47\pm 1,31$  ед/мл·мин, а при традиционном лечении сохранилась на исходном уровне.

## ЛИТЕРАТУРА

- Афанасьев И. Б. // Свободные радикалы и биостабилизаторы.— София, 1987.— С. 12.
- Бурлакова Е. Б. Свободнорадикальное окисление липидов в норме и патологии.— М., 1976.— С. 18—19.
- Бурлакова Е. Б. // Физико-химические основы авторегуляции в клетках.— М., 1978.— С. 15—20.
- Владимиров Ю. А. // Биофизика.— 1987.— № 5.— С. 830—844.
- Дорофейчук В. Г., Волков А. И., Карасева Г. Н., Зими-на В. С. // Вопр. питания.— 1983.— № 6.— С. 30—33.
- Зверихановский Ф. А., Симонян М. А., Дегтяр В. В. // Физиол. журн.— 1988.— № 1.— С. 81—86.
- Ибрагимов У. К., Иноятова Ф. Х., Юнусова Д. Ф. // Био-антиоксидант.— М., 1989.— Т. 1.— С. 61.
- Ивашкин В. Т. Метаболическая организация функций желудка.— Л., 1981.
- Корман Д. Б. // Биоантиокислители в регуляции метабо-лизма в норме и патологии.— М., 1982.— С. 213—222.
- Коробейник Ф. Г. // Лаб. дело.— 1968.— № 11.— С. 692—693.
- Ланкин В. З. // Укр. биохим. журн.— 1984.— № 3.— С. 317—331.
- Макаревич О. П., Голиков П. П. // Лаб. дело.— 1983.— № 6.— С. 24—27.
- Пасечников В. Д., Мосин В. И. // Клин. мед.— 1988.— № 5.— С. 75—81.
- Пасечников В. Д., Мосин В. И., Вирганский А. О. // Тер. арх.— 1988.— № 2.— С. 30—33.
- Переслегина И. А. // Укр. биохим. журн.— 1990.— № 2.— С. 53—58.
- Пославский М. В. Применение антиоксидантов и гелий-неонового лазера для местного лечения хронических гастродуоденальных язв: Дис... канд. мед. наук.— М., 1984.
- Способ приготовления кисломолочного продукта. А. с. 1091380 СССР / Дорофейчук В. Г., Волков А. И., Карасева Г. Н., Зимица В. С.
- Удинцев Г. Н., Бланк В. Б., Кравец Д. А., Тимесков И. С. // Пособие по клинико-лабораторным методам исследова-ний.— Л., 1986.— С. 68—70.
- Чевапи С., Чаба И., Секей И. // Лаб. дело.— 1985.— № 11.— С. 678—681.
- Hale William B., Turner B., Laclton J. // Amer. J. Phy- siol. Gastrointest. Liver Physiol.— 1987.— Vol. 16, N 5.— P. 627—630.
- Hoppenkamps R., Thies E., Younes M., Siegers P. // Klin. Wschr.— 1984.— Bd 62, N 4.— S. 183—186.
- Huber K. P., Sridhar R., Griffith E. H. et al. // Biochim. biophys. Acta.— 1987.— Vol. 915, N 2.— P. 267—276.
- Nakkar Poonam, Das Ballabh, Viswanathan N. // Indian J. Biochem. Biophys.— 1984.— Vol. 21, N 2.— P. 130—132.
- Pascu O., Dejica D. // Rev. roum. Med. interne.— 1987.— Vol. 25, N 2.— P. 81—84.
- Sobala G. M., Schoran C. I., Sanderson M. et al. // Gastro- enterology.— 1989.— Vol. 97, N 2.— P. 357—363.
- Wejers H., Sies H. // Europ. J. Biochem.— 1983.— Vol. 137, N 1—2.— P. 29—36.

Поступила 12.05.91

## THE SUPEROXIDE ANION-OBVIATING ACTIVITY OF GASTRIC JUICE IN GASTRODUODENAL DISEASES.

I. A. Pereslegina, Zh. V. Antipina, N. B. Pletneva, I. R. Mochalova, E. A. Zhukova, L. A. Belentsova

Institute of Pediatrics, RSFSR Ministry of Health, Nizhni Novgorod.

A decrease in the superoxide anion-obviating activity of gastric juice was detected in patients with chronic gastro- duodenitis and duodenal ulcerous disease, whose rate depended on the disease stage, functional state of the stomach and nature of the disease course. Deficiency in  $H^+$ ,  $Cu^{2+}$  and a decrease of glutathione content in gastric juice were found to be responsible for the phenomenon observed. The superoxide anion-obviating activity of gastric juice exhibited the regulatory effect on resistance of the duodenal mucosal membrane, which is prerequisite to restoration of the pattern studied during medi- cinal treatment. Antacid biphilact produced from sour milk was used for the treatment of the disease.

Е. Ю. Волков

## СОДЕРЖАНИЕ НЕКОТОРЫХ УГЛЕВОДНЫХ КОМПОНЕНТОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И МОЧЕ БОЛЬНЫХ В ОТДАЛЕННЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ ВАГОТОМИИ ПРИ ЯЗВЕННОЙ БОЛЕЗНИ ЖЕЛУДКА И ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ

Ярославский медицинский институт

В патогенезе язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки важное значение имеет нарушение равновесия между агрессивными факторами желудочного секрета и защитной функцией слизистой оболочки желудка [1, 3, 7].

Применяемая при лечении язвенной болезни двенадцатиперстной кишки ваготомия снижает кислотопродукцию желудка [2, 8]. Однако влияние ваготомии на защитный барьер гастродуоденальной зоны в литературе освещено недостаточно и противоречиво [3, 10].

Основную защитную роль слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки выполняет слизь покровного эпителия, которая образует на внутренней поверхности желудка сплошной слой, тесно связанный с секретирующими клетками. Находящиеся в слизи углеводсодержащие биополимеры, особенно фукогликопротеины, способны связывать соляную кислоту, образуют антипептической активностью и образуют вязкие пленки, что защищает гастродуоденальную систему от переваривания [5].

Целью нашей работы явилось изучение некоторых защитных факторов слизистой оболочки желудка в отдаленные сроки после различных видов ваготомии.

**Методика.** Для характеристики углеводсодержащих биополимеров исследовали кровь, что позволяло судить о состоянии общего обмена гликопротеинов, и мочу, гликопептиды которой представляют собой всосавшиеся в кровь и выделенные почками продукты распада гликопротеинов желудочно-кишечной слизи. Об общем содержании этих биополимеров судили по концентрации гексоз, связанных с белком. Содержание фукогликопротеинов оценивали по концентрации фукозы, а сиалогликопротеинов — по результатам определения сиаловых кислот. Методы определения указаны нами ранее [4]. Измерения оптической плотности производили на спектрофотометре фирмы «Karl Zeiss» (Германия). Полученные данные обрабатывали методами вариационной статистики. Достоверность различий полученных количественных результатов определяли по таблице Стьюдента.

**Результаты и их обсуждение.** Обследовано 64 пациента (мужчин 60, женщин 4), которым ранее (в сроки от 1 года до 14 лет) были проведены различные виды ваготомии по поводу осложненных пилородуоденальных язв. Возраст пациентов на момент обследования был от 24 до 53 лет. Контрольная группа (норма) состояла из 15 здоровых лиц. Двусторонняя стволовая ваготомия с дренирующими желудок операциями была выполнена 30 больным, селективная проксимальная ваготомия (СПВ) — 18 пациентам, комбинированная (передняя селективная проксимальная, задняя стволовая) ваготомия с дренирова-

нием желудка — 16 больным. Обследуемые считали себя здоровыми, особых жалоб не предъявляли. Каких-либо грубых отклонений в клинико-биохимических анализах крови и мочи выявлено не было. При фиброскопическом обследовании рецидива язвы не установлено. Таким образом, отдаленные исходы оперативного лечения язвенной болезни двенадцатиперстной кишки у обследованных пациентов вне зависимости от вида ваготомии можно считать отличными и хорошими.

По нашим данным, содержание гексоз в сыворотке крови и в моче снижено (вне зависимости от вида ваготомии) лишь на 5—7% (см. таблицу). Концентрация фукозы снижалась в сыворотке крови после стволовой ваготомии только на 9%, после комбинированной — на 17%, а после СПВ — на 23%. В моче снижение концентрации фукозы менее выражено (3—6%), а разность между различными вариантами ваготомии статистически недостоверна. Содержание сиаловых кислот как показателя активности воспалительного процесса уменьшалось в крови соответственно на 9, 14 и 20%, причем разность этого показателя между рассматриваемыми группами статистически достоверна ( $p < 0,05$ ). В моче содержание сиаловых кислот снижалось на 7—12% (разность статистически достоверна только между стволовой и селективной проксимальной ваготомией).

Таким образом, после ваготомии происходит снижение как общих, так и специфических для язвенной болезни факторов защиты слизистой желудка и двенадцатиперстной кишки. Однако рецидива язвы не наблюдается вследствие значительного снижения продукции соляной кислоты и пепсина, что обеспечивает надежную защиту слизистой оболочки гастродуоденальной зоны от переваривания.

Различные виды ваготомии по-разному влияют на слизистый барьер желудка и двенадцатиперстной кишки. Наибольшее угнетение защитной функции наблюдается после СПВ, а меньше всего концентрация углеводсодержащих биополимеров снижается после стволовой ваготомии. Комбинированная ваготомия занимает промежуточное положение.

Известно, что рецидив язвенной болезни после СПВ наблюдается в 2—3 раза чаще, чем после стволовой ваготомии [6, 9]. Проведенные нами исследования позволяют объяснить этот факт тем, что после СПВ защитный барьер слизистой обо-

**Концентрация (в ммоль/л) гексоз, связанных с белком, фукозы и сиаловых кислот у больных, перенесших различные виды ваготомии**

Углеводные компоненты	Норма	Вид ваготомии		
		стволовая	комбинированная	селективная/проксимальная
Гексозы	601,02±3,04	574,22±7,42*	562,33±10,24*	559,28±3,24*
	882,86±4,77	842,21±9,36*	835,36±9,78*	833,83±4,21*
Фукоза	86,69±1,12	78,12±8,34*	71,86±6,92*	66,49±8,11**
	303,80±2,48	296,50±7,42	290,38±11,46*	284,10±2,13*
Сиаловые кислоты	209,99±1,96	186,58±8,24*	181,58±9,27*	177,54±6,41**
	288,47±2,03	268,71±9,12*	261,48±7,72**	259,67±5,44**

**Примечание.** Статистическая достоверность различий по сравнению с нормой: одна звездочка —  $p < 0,05$ , две —  $p < 0,01$ . Над чертой — кровь, под чертой — моча.

лочки желудка и двенадцатиперстной кишки нарушается, по-видимому, в большей мере, чем после стволовой ваготомии, что и может привести к более частому рецидиву заболевания.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Василенко В. Х., Гребенев А. Л., Шептулин А. А. Язвенная болезнь.— М., 1987.
2. Кузин М. И., Поголов П. М., Кузин П. М. // Хирургия.— 1982.— № 12.— С. 7—14.
3. Муравьева Л. А., Волков Е. Ю. // Там же.— 1988.— № 2.— С. 58—61.
4. Муравьева Л. А., Волков Е. Ю. // Вопр. мед. химии.— 1989.— № 6.— С. 20—23.
5. Рабинович П. Д. Анализ значения переваривающей силы желудочного сока и некоторых защитных механизмов гастродуоденальной системы в развитии язвенной болезни: Дис. ... д-ра мед. наук.— Чита, 1967.
6. Andrup E. // Brit. J. Surg.— 1981.— Vol. 68, N 10.— P. 679—681.
7. Dubarry J. J., Dubarry B., Brunet R. // Bordeaux Med.— 1977.— Vol. 10.— N 29.— P. 2067—2073.
8. Herschlag A., Argov S. // Curr. Surg.— 1983.— Vol. 40, N 1.— P. 4—12.
9. Junginger Th., Pichlmair H. // Therapiewoche.— 1980.— Bd 30, N 11.— S. 1836—1842.
10. Johnston D., Wilhinson A. // Brit. J. Surg.— 1970.— Vol. 57, N 2.— P. 289—295.

Поступила 09.07.90

#### CONTENT OF SOME CARBOHYDRATE COMPONENTS IN THE SERUM AND URINE OF PATIENTS WITH GASTRODUODENAL ULCERS WITHIN LATE PERIODS AFTER VAGOTOMY.

E. Yu. Volkov

Medical Institute, Yaroslavl

Estimation of protein-bound hexoses, fucose and sialic acids in the blood and urine of 64 patients with gastroduodenal ulcers within later periods after various types of gastric vagotomy showed that the denervation inhibited the protective barrier of gastric and duodenal mucosal membrane. Protective functions of gastroduodenal mucosal membrane were most distinctly inhibited after selective proximal vagotomy which may be responsible for higher amounts of recurrences of ulcerous disease after this type of vagotomy than other types of denervation.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.441-008.64-092.9-07: [616.438+616.419]-008.939.633

Ю. А. Козлов, Н. М. Шевцова, Р. И. Плешко, О. В. Курлов, А. Н. Байков, В. В. Новицкий

#### СОСТОЯНИЕ СИНТЕЗА НУКЛЕОПРОТЕИНОВ В ОРГАНАХ ГЕМОПОЭЗА У МЫШЕЙ С ПЕРВИЧНЫМ ГИПОТИРЕОЗОМ

Томский медицинский институт МЗ РФ

О влиянии тиреоидных гормонов на синтез нуклеопротеинов хорошо известно. Объектами для такого рода исследований обычно являются печень, скелетные мышцы, сердце, мозг [1, 12]. Гораздо реже можно встретить сведения о влиянии тиреоидных гормонов на синтез нуклеопротеинов в других органах и тканях, в частности в гемопозитических. Вместе с тем клетки системы крови проявляют чувствительность как к недостатку гормонов щитовидной железы, так и к их избытку, хотя до сих пор неясно, какие органы гемопоэза наиболее чувствительны к этим гормонам. Большинство исследователей, занимаясь дисфунк-

циями щитовидной железы, ставят своей задачей изучение либо системы эритрона [9, 11], либо иммунной системы [8, 13], либо системы свертывания и функции тромбоцитов [4, 10]. Не вполне ясно также, чем нарушения гемопоэза, свойственные гипотиреозу, отличаются от нарушений, обнаруживаемых при других эндокринопатиях, например при сахарном диабете. Последнее обстоятельство представляется важным, так как позволяет судить о закономерностях становления гормональной регуляции гемопоэза в филогенезе млекопитающих и человека. Предполагается, что поскольку тиреоидные гормоны в филогенетическом отношении более молодые, чем инсулин, то и нарушения гемопоэза, развивающиеся при гипотиреозе или сахарном диабете, также будут характеризоваться своими системными филогенетическими особенностями [6].

Задачей данной работы являлось сравнительное изучение влияния недостатка тиреоидных гормонов на синтез нуклеопротеинов в различных органах гемопоэза с целью идентификации органа, в котором синтез нуклеопротеинов зависит от этих гормонов в максимальной степени. Для решения поставленной задачи была выбрана модель первичного гипотиреоза, вызываемого у мышей одним из антитиреоидных препаратов — перхлоратом калия, который связывает свободный йод и таким образом препятствует синтезу йодированных производных тирозина. Эта модель гипотиреоза часто используется в опытах на крысах [14].

Методика. Опыты были проведены на 125 мышак-самцах линии BALB/c (питомник «Рассвет», Томск) с начальной массой 16—17 г. Животные были разделены на 3 группы: 1-я — интактные мыши (контроль); 2-я — мыши с гипотиреозом, получавшие в течение 1 мес для питья 1% раствор  $KClO_4$  (опытная группа); 3-я — мыши с гипотиреозом, получавшие в конце опыта перед забоем на фоне  $KClO_4$  трийодтиронин ( $T_3$ ) («Берлин-Хеми», Германия) подкожно в течение 3 дней в стандартной лечебной дозе (50 мкг/кг в сутки; вторая контрольная группа). Вторая контрольная группа была предусмотрена для исключения возможного токсического воздействия  $KClO_4$  на систему крови.

Тяжесть гипотиреоза контролировали по содержанию тироксина и  $T_3$  в сыворотке крови. Гормоны определяли радиоиммунологическим методом при помощи наборов Всесоюзного объединения «Изотоп» (Москва, производитель — ИБОХ АН Беларуси, Минск). Радиоактивность проб измеряли на одноканальном  $\gamma$ -спектрометре «Роботрон-20050» (Германия). Концентрация тироксина в сыворотке крови подошпанных мышей через 1 мес от начала опыта снижалась в среднем в 13,5 раза в мае — июне (до 7,9 нмоль/л при норме 106,3 нмоль/л;  $p < 0,001$ ) и в 6,3 раза в декабре — январе (до 31,1 нмоль/л при норме 195,2 нмоль/л;  $p < 0,001$ ). Концентрация  $T_3$  в сыворотке гипотиреоидных мышей при этом же снижалась, но менее значительно: в 1,7 раза зимой ( $p < 0,01$ ) и в 2,7 раза весной ( $p < 0,001$ ).

О состоянии синтеза нуклеопротеинов судили по включению в клетки меченых предшественников синтеза ДНК, РНК и белка: либо метил- $^3H$ -тимидина (молекулярная активность 900 ТБк/моль), либо 5- $^3H$ -уридина (молекулярная активность 960 ТБк/моль), либо 1- $^{14}C$ -глицина (молекулярная активность 2,1 ТБк/моль). Все меченые соединения были получены из Всесоюзного объединения «Изотоп» (Ленинградское МРО). Использовали модификацию микрометода [3]. Меченые предшественники вводили внутривенно в 0,2 мл физиологического раствора за 1 ч до забоя животных. Меченые тимидин и уридин вводили в дозе 160 МБк/кг, меченый глицин — в дозе 40 МБк/кг. Мышей декапитировали при легком эфирном наркозе. Собранную кровь использовали для получения сыворотки, в которой определяли содержание тиреоидных гормонов. У всех животных брали для исследования тимус, селезенку, илсоцекаль-

Синтез нуклеопротеинов в органах гемопоэза у мышей с гипотиреозом до и после лечения их трийодтиронином ( $\bar{X} \pm m$ )

Орган	Контроль	Гипотиреоз	$p_1$	Гипотиреоз + $T_3$	$p_2$
<i>Синтез ДНК (включение <math>^3H</math>-тимидина, расп/мин/<math>10^6</math> клеток)</i>					
Костный мозг	2031 ± 102	1341 ± 131	<0,001	2364 ± 243*	<0,01
Селезенка	1902 ± 222	2222 ± 310	>0,05	4175 ± 355	<0,001
Тимус	308 ± 19	344 ± 33	>0,05	446 ± 34	<0,05
Лимфоузлы	861 ± 67	825 ± 78	>0,05	913 ± 52*	>0,05
<i>Синтез РНК (включение <math>^3H</math>-уридина, расп/мин/<math>10^6</math> клеток)</i>					
Костный мозг	1073 ± 62	835 ± 44	<0,01	937 ± 88*	>0,05
Селезенка	1010 ± 55	1257 ± 126	>0,05	1055 ± 130*	>0,05
Тимус	280 ± 35	293 ± 13	>0,05	408 ± 43	<0,05
Лимфоузлы	554 ± 43	495 ± 38	>0,05	436 ± 39*	>0,05
<i>Синтез белка (включение <math>^{14}C</math>-глицина, расп/мин/<math>10^6</math> клеток)</i>					
Костный мозг	103 ± 7	69 ± 11	<0,05	185 ± 13	<0,001
Селезенка	119 ± 12	74 ± 7	<0,001	348 ± 24	<0,001
Тимус	47 ± 4	40 ± 4	>0,05	70 ± 5	<0,001
Лимфоузлы	74 ± 6	72 ± 9	>0,05	117 ± 9	<0,01

Примечание.  $p_1$  — вероятность ошибки при сравнении данных опытной группы с контрольной,  $p_2$  — то же при сравнении данных опытных групп между собой, звездочка — отсутствие достоверных различий с контрольной группой. Число животных в каждой группе 10—15.

ные (брыжечные) лимфоузлы и бедренную кость, из которой раствором Хенкса вымывали костный мозг, который использовали для анализа. Методика подготовки проб кровяных клеток для радиометрии описана нами ранее [7]. Радиоактивность подготовленных проб измеряли на отечественном  $\beta$ -анализаторе «Бета-2» с эффективностью регистрации 50 % для  $^3H$  и 90 % для  $^{14}C$ . Конечный результат выражался в распадах в 1 мин на  $10^6$  ядерных клеток.

Параллельно с основными исследованиями характеризовали массу, весовые индексы и клеточный состав указанных органов у контрольных и подопытных животных, а также клеточный состав костного мозга (в миллионах миелокариоцитов на диафиз бедра). Полученные данные обрабатывали методом вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента.

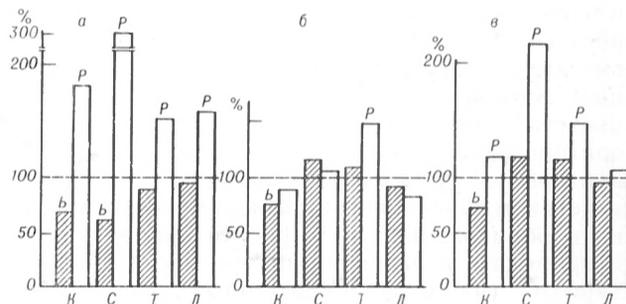
Результаты и обсуждение. Результаты исследований представлены в таблице и на рисунке. Как видно из полученных данных, синтез нуклеопротеинов у гипотиреоидных мышей наиболее выражен угнетался в костном мозге. Введение  $T_3$  подопытным мышам на 76 % стимулировало у них включение  $^3H$ -тимидина ( $p < 0,01$ ) и на 270 % ( $p < 0,001$ )  $^{14}C$ -глицина в клетки костного мозга по сравнению с группой гипотиреоидных животных. Включение  $^3H$ -уридина в РНК миелокариоцитов также стимулировалось и к окончанию лечения уже достоверно не отличалось от контрольных значений. При этом, однако, стимуляция включения  $^3H$ -уридина в клетки костного мозга подопытных животных была менее выражена, чем включение  $^3H$ -тимидина и  $^{14}C$ -глицина.

При гипотиреозе достоверно угнетался также синтез белка в селезенке. В тимусе же и лимфоузлах подопытных животных каких-либо нарушений синтеза общих нуклеопротеинов обнаружено не было. Клетки селезенки и тимуса гипотиреоидных мышей проявляли значительную чувствительность к стимулирующему влиянию экзогенного  $T_3$ , который активировал в селезенке синтез ДНК и белка (на 88 и 370 % соответственно;  $p < 0,001$ ), а в тимусе — синтез ДНК, РНК и белка (соответственно на 30, 39 %;  $p < 0,05$  и 75 %;  $p < 0,001$ ). Отсутствие стимулирующего влияния  $T_3$  на синтез РНК, оцени-

ваемый по включению  $^3H$ -уридина, в селезенке и лимфоузлах может объясняться тем обстоятельством, что у грызунов (в частности, у крыс) ряд клеточных популяций имеет очень низкую активность уридинкиназы, в то время как в других клетках активность этого фермента нормальная. Так, например, у крыс по этой причине  $^3H$ -уридин хорошо включается в Т-лимфоциты, составляющие абсолютное большинство клеток тимуса, и очень плохо — в В-лимфоциты, основная масса которых находится в селезенке и лимфоузлах [15]. Возможно, что нечто подобное имеет место и у мышей.

Минимальной чувствительностью к действию  $T_3$  у гипотиреоидных мышей обладали клетки лимфоузлов, в которых этот гормон стимулировал лишь синтез белка (в 1,6 раза по сравнению с гипотиреоидными животными;  $p < 0,001$ ).

У гипотиреоидных мышей через 1 мес после начала опыта отмечалась достоверная гипоплазия костного мозга и селезенки. Клеточность костного мозга всегда была достоверно ниже, чем в



Уровень синтеза общих нуклеопротеинов у мышей с гипотиреозом до и после введения им  $T_3$  (50 мкг/кг/сут, 3 дня, подкожно).

а — белок; б — РНК; в — ДНК. По оси абсцисс — исследованные органы: К — костный мозг, С — селезенка, Т — тимус, Л — лимфоузлы; опытные группы животных: заштрихованные столбики — гипотиреоз, светлые столбики — гипотиреоз +  $T_3$ ; по осям ординат — интенсивность включения меченых предвестников в состав нуклеопротеинов, % от контрольного уровня, принятого за 100 %. б — достоверное снижение показателя по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ); р — достоверное увеличение уровня включения по сравнению с группой гипотиреоидных мышей ( $p < 0,05$ ). Число животных в группах 10—15.

контроле, достигая наиболее низких значений в весенне-летние месяцы (в среднем 15,5 млн клеток/диафиз при норме 23 млн клеток/диафиз;  $p < 0,001$ , что на 33 % было ниже контрольного уровня). Общая клеточность селезенки при этом также была на 32 % ниже контрольной ( $p < 0,001$ ), а ее масса и средний весовой индекс — соответственно меньше на 26 и 20 % ( $p < 0,001$  и  $< 0,01$ ). Однако эти же показатели для тимуса и илеоцекального комплекса лимфоузлов достоверно не отличались от контрольных значений в 3 независимых сериях опытов, выполненных в разное время года. Введение  $T_3$  в течение 3 дней гипотиреоидным мышам достоверно увеличивало клеточность костного мозга (в среднем на 22 %) и селезенки (на 20 %), но не всегда полностью нормализовало ее через 3 сут лечения.  $T_3$  практически не влиял на клеточность и массу тимуса и лимфоузлов. Таким образом, в наших исследованиях мы не смогли обнаружить признаки какого-либо необратимого токсического воздействия  $KClO_4$  на органы гемопоэза: практически все нарушения, найденные нами у гипотиреоидных мышей, исчезали полностью или в значительной мере уже в результате 3-дневного лечения их  $T_3$  на фоне продолжающегося действия антитиреоидного препарата.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что разные органы гемопоэза в неодинаковой степени зависят от тиреоидных гормонов. Наиболее чувствительны к недостатку гормонов цитовидной железы костный мозг и селезенка, имеющие у грызунов много общего в цитологическом составе [2]. На клетках тимуса и брыжеечных лимфоузлов недостаток этих гормонов сказывается менее значительно. Оценивая в комплексе изменения клеточности различных органов гемопоэза у гипотиреоидных мышей и выраженность нарушений в них синтеза нуклеопротеинов, можно расположить все изученные нами органы гемопоэза в следующей последовательности (по степени зависимости их от тиреоидных гормонов в сторону уменьшения этой зависимости): костный мозг > селезенка > тимус > лимфоузлы.

В связи с полученными данными можно с достаточной долей вероятности утверждать, что наиболее зависимые от тиреоидных гормонов ростки (росток) кроветворения локализованы именно в костном мозге и селезенке. В то же время нельзя исключить, что повышенная чувствительность костного мозга и селезенки к тиреоидным гормонам является не прямой, а хотя бы отчасти опосредуемой, в частности, влиянием эритропоэтина на костномозговой и лиенальный эритропоэз. Усиление основного обмена под действием тиреоидных гормонов может стимулировать образования этого регулятора эритропоэза и приводить к развитию полицитемии. При гипотиреозе (на фоне пониженных окислительных процессов) образование эритропоэтина снижается, что может способствовать угнетению эритропоэза и развитию анемии [9, 16]. Остается неясным, являются ли сами тиреоидные гормоны непосредственными регуляторами кроветворения (в частности, эритропоэза) или же все их эффекты опосредованы.

Характер гематологических нарушений, в том числе изменения клеточности и интенсивности синтеза ДНК, выявленные при гипотиреозе в настоящем исследовании, существенно отличаются от ранее найденных нами изменений у мышей с аллоксановым диабетом [5, 6], у которых критическим органом гемопоэза является тимус, в то время как клетки костного мозга и селезенки в целом не изменяют своей пролиферативной активности. Можно предполагать, что эти различия отражают общие закономерности становления гормональной регуляции гемопоэза в филогенезе млекопитающих и человека.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Верецагина Г. В., Трапкова А. А. // Успехи соврем. биол.— 1984.— Т. 97, № 3.— С. 447—457.
2. Гольдберг Д. И., Гольдберг Е. Д., Шубин Н. Г. Гематология животных.— Томск, 1973.
3. Детлаф Т. А., Бродский В. Я., Гаузе Г. Г. // Методы биологии развития.— М., 1974.— С. 451—453.
4. Киричук В. Ф. // Пробл. эндокринологии.— 1968.— № 1.— С. 96—101.
5. Козлов Ю. А., Тимофеева Е. Е., Зингер М. Г. // Бюл. exper. биол.— 1986.— № 4.— С. 407—409.
6. Козлов Ю. А., Лаврова В. С. // Успехи соврем. биол.— 1988.— Т. 105, № 3.— С. 505—520.
7. Козлов Ю. А., Пleshko P. И., Шевцова Н. М. // Медико-биологические аспекты нейро-гуморальной регуляции.— Томск, 1990.— Вып. 1.— С. 62—63.
8. Корнева Е. А., Шхинек Э. К. Гормоны и иммунная система.— Л., 1988.
9. Лунина Н. В. // Пат. физиол.— 1973.— № 1.— С. 61—63.
10. Мрочек А. Г., Алюшина Т. А. // Там же.— 1990.— № 5.— С. 56—59.
11. Петрищев Н. И. // Радиобиология.— 1965.— Т. 5, № 2.— С. 211—212.
12. Самойлов П. М. // Вопр. мед. химии.— 1965.— № 4.— С. 3—17.
13. Степаненко С. И. // Врач. дело.— 1973.— № 3.— С. 92—94.
14. Туракулов Я. Х., Салахова Н. С., Ташиходжаева Т. И. и др. // Бюл. exper. биол.— 1978.— № 12.— С. 653—655.
15. Howard J. C., Hunt S. V., Gowans J. L. // J. exp. Med.— 1972.— Vol. 135, N 2.— P. 200—219.
16. Morshakova E. F., Tarasov V. N., Suslova M. N. et al. // Constituent Congress International Society for Pathophysiology: Abstracts.— Moscow, Kuopio, 1991.— P. 130.

Поступила 14.11.91

#### THE STATE OF NUCLEOPROTEIN SYNTHESIS IN HEMOPIETIC TISSUES OF MICE WITH PRIMARY HYPOTHYROIDISM.

Yu. A. Kozlov, N. M. Shevtsova, R. I. Pleshko, O. V. Kurlov, A. N. Baykov, V. V. Novitsky

Medical Institute, Tomsk

A rate of incorporation of  $^3H$ -thymidine,  $^3H$ -uridine and  $^{14}C$ -glycine into the nucleoproteins of bone marrow, spleen, thymus and ileocecal lymph nodes was studied in BALB/c mice with hypothyroidism developed after administration of 1 %  $KClO_4$  within a month. Distinct hypoplasia of bone marrow and spleen was found in the experimental animals; the synthesis of nucleoproteins was most impaired in bone marrow. The dependence of hemopoietic tissues on thyroid hormones was decreased as follows: bone marrow > spleen > thymus > lymph node. After subcutaneous administration of triiodothyronine ( $T_3$ ) in a dose of 50 mg/kg daily within 3 days of synthesis of nucleoproteins was considerably stimulated and the amount of cells was increased in bone marrow and spleen. Less distinct stimulating effect of  $T_3$  was observed in the thymus and lymph nodes of these animals.