

ТОМ 39

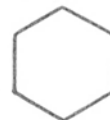
ВЫПУСК 3

МАЙ — ИЮНЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

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

ПАСХИНА Т. С. (Москва)
ТУРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)
ТЯХЕПЫЛД Л. Я. (Тарту)
ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)



© В. И. ЗАКРЕВСКИЙ, 1993

УДК 612.398.145.3.08(048.8)

В. И. Закревский

 β_2 -ГЛИКОПРОТЕИН I ПЛАЗМЫ КРОВИ, СТРУКТУРА И БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ

Волгоградский медицинский институт

β_2 -Гликопротеин I, он же аполипопротеин H, он же липидсвязывающий ингибитор коагуляции, он же белковый кофактор антикардиолипиновых антител — такое количество терминов свидетельствует о многообразии и значимости функций этого небольшого, но весьма своеобразного белка плазмы крови. Несмотря на то что он был выделен и описан 30 лет назад, исследователи и сегодня продолжают обнаруживать новые свойства и функции этого белка.

Достаточно высокая концентрация в крови (0,15—0,3 г/л) и некоторые физико-химические особенности позволили Н. Schultze и соавт. [26] в 1961 г. выделить β_2 -гликопротеин I (β_2 -ГП I) в гомогенном состоянии, используя классические приемы препаративной биохимии. Своим успехом авторы прежде всего были обязаны способности β_2 -ГП I оставаться в растворе при обработке сыворотки крови риванолом, 5 % трихлоруксусной или 0,6 М перхлорной кислотами. Осаждение балластных белков 0,2 М перхлорной кислотой, выщелачивание сульфатом аммония в диапазоне 1,4—1,8 М концентрации и последующий зональный электрофорез на поливинилхлориде привели к получению препарата β_2 -ГП I с 98 % степенью чистоты. Аналитическим ультрацентрифугированием была определена константа седиментации препарата $S_{20}^{\circ, w} = 2,9$. Белок оказался гликопротеидом, содержащим 18 % углеводов, из которых 6,7 % составляли гексозы (галактоза, манноза), 5,8 % — N-ацетилгексозамин, 4,4 % — ацетилнейраминовая кислота и 0,2 % — фукоза.

Возможность выделения значительного количества гомогенного белка достаточно простыми приемами позволили Н. Haupt и К. Heide [6] в 1966 г. получить β_2 -ГП I в кристаллическом состоянии. В дальнейшем способы очистки β_2 -ГП I совершенствовались по мере развития техники препаративной биохимии. В настоящее время используют аффинную, гель-фильтрационную и ионообменную хроматографию [12].

Наличие углеводного компонента придает особые свойства этому белку. Будучи мономерным низкомолекулярным (мол. м. 54 кД) белком, β_2 -ГП I при гель-хроматографии на сефадексе G-200 элюируется в широком диапазоне между альбумином (мол. м. 69 кД) и иммуноглобулином (мол. м. 150 кД) [21]. При электрофорезе в полиакриламидном геле (ПААГ) он дает несколько субфракций, идентичных иммунохимически по

содержанию сиаловых кислот и триптическим пептидным картам [4]. Выявленная микрогетерогенность определяется природой олигосахаридных цепей, что нашло подтверждение в тонких иммуноэлектрофоретических исследованиях [23].

Полностью первичная структура β_2 -ГП I была изучена J. Lozier и соавт. [11] в 1984 г. Белок имеет одну полипептидную цепь, содержащую 326 остатков аминокислот, и весьма своеобразен по составу. Он очень богат пролином (31 остаток или каждая 10-я аминокислота), а высокое содержание цистеина (22 молекулы) и глицина (23 остатка) служит косвенным подтверждением существования значительных участков β -структур. Аминокислотный состав молекулы β_2 -ГП I приведен в таблице.

Молекулярная масса, рассчитанная из аминокислотного состава немодифицированной цепи, составляет 36 281 Д. Это значительно меньше той, которая была определена авторами [11] ПААГ-додецилсульфат-электрофорезом в присутствии 2-меркаптоэтанола (54 200 Д), а также меньше величины (40 000—48 000 Д), полученной в седиментационных анализах.

Указанные различия связаны с наличием углеводного компонента. Молекула β_2 -ГП I содержит 5 олигосахаридных цепочек, связанных через галактозаминные остатки с аспарагином в 143, 164, 169, 174 и 234 положениях полипептидной цепи (см. рисунок). Исследователи предполагают, что олигосахаридные цепи делятся на 2 типа (комплексные и богатые маннозой), а каждый тип, вероятно, имеет микрогетерогенность по структуре. Если принять молекулярную массу каждого олигосахарида за 2500 Д, то в целом масса β_2 -ГП I находится в пределах 48 000—50 000 Д, что, в общем, соответствует экспериментальным данным.

Интересной особенностью данного белка является высокое содержание пролина (8,3 %) и цистеина (6,2 %), тогда как в большинстве белков последние обычно встречаются с частотой 5 и 2 % соответственно.

Исследователи обнаружили наличие связанных между собой пар цис—про через регулярные интервалы — в положениях 4—5, 65—66, 123—124, 186—187, что привело к предположению о возможной внутренней гомологии. Компьютерный анализ последовательностей с использованием базы данных «Atlas of Protein Sequence and Structure» (Protein Sequence Database) подтвердил высокую степень гомологии участков полипептидной цепи длиной 60 аминокислотных остатков. Это свидетельствует о том, что β_2 -ГП I построен из 5 последовательно связанных гомологичных сегментов, в которых консервативные последовательности цис—про—три встречаются с высоким постоянством. Косвенным подтверждением внутренней гомологии являются участки, связанные дисульфидными мостиками: цис 4—47; 32—

Аминокислотный состав молекулы β_2 -ГП I [11]

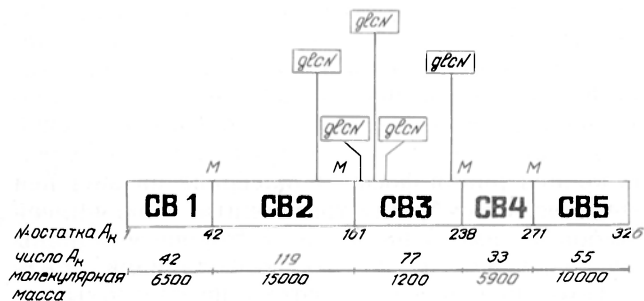
Аминокислота	Число молекул
Аспарагиновая	14
Аспарагин	15
Треонин	27
Серин	19
Глутаминовая	20
Глутамин	4
Пролин	31
Глицин	23
Аланин	17
Цистеин	22
Валин	18
Метионин	4
Изолейцин	13
Лейцин	17
Тирозин	14
Фенилаланин	18
Лизин	30
Гистидин	5
Аргинин	10
Триптофан	5
Число аминокислот	326
Общая мол. м., D	36 281

60; 91—118; 155—181; 186—229; 281—288. Структурная модель молекулы β_2 -ГП I, предложенная J. Lozier и соавт. [11], представлена на рисунке.

Авторы высказывают предположение, что β_2 -ГП I представляет собой продукт гена, который в эволюции сформировался повторными дубликациями гена, кодирующего 60-аминокислотные сегменты белка.

Особенности аминокислотного состава β_2 -ГП I определяют особенности вторичной структуры. Исследования спектров циркулярного дихроизма показали, что белок состоит главным образом из β -структур и аморфных участков с незначительным количеством α -спиралей [10]. β_2 -ГП I представляет собой амфифильный белок, сродство которого к поверхности воздух—вода при нейтральном значении pH сравнимо с глобулярными белками и очень незначительно изменяется при сдвиге pH как в кислую, так и в щелочную зону. Указанные особенности β_2 -ГП I, а также неспособность его к самосборке в комплексы значительно отличают β_2 -ГП I (аполипопротеин H) от других аполипопротеинов [10]. Это накладывает отпечаток и на поведение его в крови.

В плазме человеческой крови основное количество β_2 -ГП I (более 60 %) находится в свободном от липопротеидов состоянии, E. Polz и G. Kostner [16] центрифугированием в градиенте плотности обнаружили в осадке



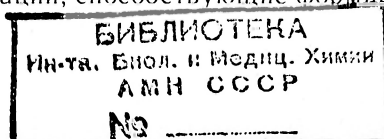
Структурная модель β_2 -ГП I (по J. Lozier и соавт. [11]).

CB — фрагменты, полученные обработкой CNBr; M — метионин.

($D > 1,21$ г/мл) до 70 % всего β_2 -ГП I плазмы крови человека. Количество β_2 -ГП I, связанного с липопротеидами, в значительной степени зависит от уровня триглицеридов в крови, хотя при этом β_2 -ГП I встречается во всех классах липопротеидов. При исследовании плазмы крови голодных испытуемых содержание β_2 -ГП I в липопротеидах было следующим: в хиломикронах — 0 %, в липопротеидах очень низкой плотности (ЛПОНП) — 8—9 %, в липопротеидах низкой плотности (ЛПНП) — 1,3—1,9 %, в липопротеидах высокой плотности (ЛПВП) — 16—18 %. Очень близкие величины получены этими же авторами для плазмы крови крыс [19]. Если уровень β_2 -ГП I в липопротеидах практически постоянный, то после приема жирной пищи одновременно с возрастанием содержания триглицеридов в крови увеличивается и количество β_2 -ГП I, связанного с хиломикронами (с 0 до 8—9 %). Корреляция между содержанием триглицеридов и β_2 -ГП I в хиломикронах свидетельствует о возможном взаимодействии между ними.

Используя в качестве модели хиломикрона интралипид (искусственная эмульсия, состоящая главным образом из триглицеридов), E. Polz и G. Kostner [17] выявили высокую степень специфического связывания β_2 -ГП I нормальной сыворотки с триглицеридами. Константа диссоциации комплекса β_2 -ГП I — интралипид составляла примерно 10^{-8} моль/л. Взаимодействие белка с интралипидом происходит очень быстро, и насыщение наступает в течение 5 мин (37 °C) при концентрации триглицеридов 10 г/л. Сравнение этих результатов с аналогичными для других известных аполипопротеинов показало более высокое сродство к триглицеридам β_2 -ГП I. Авторы пришли к выводу о важной роли этого белка в метаболизме триглицеридов. Действительно, Y. Nakaya и соавт. [13] обнаружили активирующее действие β_2 -ГП I на липопротеинлипазу (ЛПЛ) человеческой постгепариновой плазмы. ЛПЛ ответственна за гидролиз триглицеридов в хиломикронах и ЛПОНП, в результате которого хиломикроны превращаются в ремнантные частицы, а ЛПОНП — в ЛПНП. Действие ЛПЛ регулируется присутствующими аполипопротеинами. Апо С-II активирует фермент, а апо С-III ингибирует его. Апо Н (β_2 -ГП I) сам по себе слабо активирует ЛПЛ, но в 1,5 раза увеличивает стимулирующее действие апо С-II. Комплекс апо Н — апо С-II менее подвержен ингибирующему действию апо С-III. Полученные результаты позволили авторам прийти к выводу, что апо Н модулирует энзиматическую активность ЛПЛ в метаболизме триглицеридов в плазме крови. Относительные пропорции апо Н, апо С-II и апо С-III в богатых триглицеридами липопротеидных частицах определяют заданную скорость гидролиза триглицеридов [3, 18, 27]. Возможно, уровень содержания апо Н и его взаимодействие с хиломикронами и ЛПОНП играют важную роль в развитии гиперлипидемий.

Особенности структуры и свойств гликопротеида апо Н, описанные выше, резко отличают этот белок от других аполипопротеинов. Последние способны к самосборке в комплексы, в присутствии липидов происходят значительные изменения их конформации, способствующие формированию ли-



попротеидной частицы. Апо Н такими свойствами не обладает, его взаимодействие с другими апо-липопротеинами сходно с интегральным встраиванием периферических мембран белков. Очевидно, апо Н может ассоциироваться с плазменными липопротеинами, главным образом за счет белок-белковых, а не белок-липидных взаимодействий [10].

Наряду с триглицеридами β_2 -ГП I способен ассоциироваться и с фосфолипидами. I. Schousboe [21] в 1979 г. обратил внимание на способность кислых фосфолипидов связываться с β_2 -ГП I и тем самым снижать его агглютинирующую активность в отношении митохондрий. В дальнейшем H. Wigtm [28] в модельных опытах на мультимеллярных липосомах определил характеристики связывания β_2 -ГП I с различными фосфолипидами. Оказалось, что белок практически не взаимодействовал с нейтральными фосфолипидами (фосфатидилхолином, фосфатидилэтаноламином и сфингомиелином), но прочно связывался с кислыми. Причем константа связывания фосфатидилсерина была на порядок выше связывания фосфатидилинозита. Способность к связыванию зависела от ряда параметров: молярности буфера, наличия моно- и двухвалентных катионов или ЭДТА. Значительное влияние оказывали другие белки. Так, присутствие бычьего сывороточного альбумина в концентрации 30 г/л снижало процент связавшегося β_2 -ГП I до 20 % от первоначального.

Способность β_2 -ГП I к ассоциации с отрицательно заряженными субстанциями была обнаружена в отношении не только кислых фосфолипидов, но и ДНК [8], митохондрий [21], гепарина [19], желчных кислот, синтетических анионных детергентов [3, 24] и тромбоцитов [22, 24]. Связывание β_2 -ГП I с указанными субстанциями осуществляется двумя различными механизмами [24]. Первый механизм — это гидрофильное взаимодействие отрицательно заряженных групп фосфолипидов мембран с белком через остатки гистидина. Этот механизм имеет место при агглютинации митохондрий β_2 -ГП I. Доказательством является ингибирование агглютинации митохондрий модификацией гистидиновых остатков β_2 -ГП I или добавлением липосом, содержащих кислые фосфолипиды. I. Schousboe [24] обнаружил дозозависимый эффект липосом, содержащих фосфатидную кислоту. При этом оказалось, что β_2 -ГП I связывается только с липосомами, содержащими высокие концентрации кислых фосфолипидов (более 60 мол. %). В свою очередь способность β_2 -ГП I взаимодействовать с липосомами теряется при модификации нескольких гистидиновых остатков в молекуле белка. Очевидно, для прочного связывания необходимы эпитопы мембран, содержащие высокие концентрации кислых фосфолипидов и области белка, богатые гистидином.

Однако блокирование гистидина в β_2 -ГП I не предотвращает полностью агглютинацию митохондрий. В этом процессе участвует и другой механизм — гидрофобное взаимодействие белка со стероидами, особенно не содержащими 7-ОН-группу. Этот механизм является ведущим при связывании β_2 -ГП I с дезоксихолатом, холатом

(несколько хуже за счет 7-ОН) и в определенной степени с тромбоцитами.

Взаимодействие β_2 -ГП I с тромбоцитами более сложно и определяется многими факторами. Тромбоциты — единственные из форменных элементов крови, которые специфически связываются с гликопротеином. I. Schousboe [22] обнаружил, что максимальное насыщение наступает в течение 45 мин и составляет $6 \cdot 10^5$ молекул β_2 -ГП I на 1 тромбоцит. Константа диссоциации комплекса равна 559 нМ и снижается до 334 нМ в присутствии Ca^{2+} ; присутствие других сывороточных белков не оказывает заметного влияния. Связывание β_2 -ГП I коррелирует с ингибированием аденилатциклазной активности и агрегации тромбоцитов. Это ингибирование вызвано накоплением цГМФ, индуцированным β_2 -ГП I [15]. Механизм агрегации очень сложный и зависит от многих факторов, поэтому эффект β_2 -ГП I в различных условиях неоднозначен.

J. Nimprf и соавт. [15] установили, что β_2 -ГП I полностью ингибирует освобождение серотонина во время АДФ-индуцируемой активации тромбоцитов. Ингибирование коррелирует с подавлением второй волны АДФ-индуцируемой агрегации. Этот эффект β_2 -ГП I не был дозозависимым и не проявлялся при концентрации белка выше 0,1—0,15 мг/мл. На индукцию агрегации тромбоцитов коллагеном или тромбином β_2 -ГП I влияния не оказывает. Низкие дозы АДФ индуцируют экспозицию рецепторов фибриногена, которыми являются комплексы мембранного гликопротеина IIb и IIIa с ионами Ca^{2+} [2]. β_2 -ГП I не влияет на этот процесс, основное действие его, видимо, связано с ингибированием аденилатциклазы, активность которой регулируется более высокими уровнями индукторов и опосредуется через другие рецепторы. J. Nimprf и соавт. [15] обнаружили строгую корреляцию ингибирования АДФ-индуцируемой агрегации с увеличением содержания цГМФ. Этот эффект β_2 -ГП I встречается и при индукции агрегации коллагеном. Если предположить, что взаимодействие β_2 -ГП I с тромбоцитами стимулирует накопление цГМФ, то следствием этого может быть ингибирование аденилатциклазы, снижение концентрации цАМФ и простагландинов ПГЕ₁ и ПГІ₂. Конечным результатом всех событий является ингибирование агрегации и секреции тромбоцитов.

Наряду с агрегацией стимулированные тромбоциты способны активировать плазменные факторы каскада свертывания крови. На их поверхности происходит активация фактора X и протромбина, ведущую роль в этом процессе играют кислые фосфолипиды, в частности фосфатидилсерин. J. Rosing и соавт. [20] показали, что функция фосфолипидов в активации протромбина заключается в снижении величины «кажущейся» K_m протромбина до значения ниже его физиологической концентрации, но для этого требуется определенная концентрация фосфатидилсерина на внешней поверхности мембраны тромбоцита. Покоящиеся тромбоциты имеют на внешней стороне мембраны значительно меньше кислых фосфолипидов, нежели стимулированные, и поэтому не способны активировать факторы свертывания.

Ингибирующий эффект β_2 -ГП I не связан с прямым взаимодействием с компонентами протромби-

назного комплекса (Ха, Ва и Са²⁺). Опыты на покоящихся, стимулированных и лизированных тромбоцитах, а также на липосомах с различным содержанием фосфатидилсерина однозначно показали корреляцию между связыванием β_2 -ГП I фосфатидилсеринем мембран и ингибированием протромбиназной активности [14]. Максимальная активация протромбина происходит при 20 мол. % фосфатидилсерина, резко увеличиваясь в диапазоне от 10 до 15 мол. %. β_2 -ГП I проявляет максимальный ингибирующий эффект при 20 мол. % концентрации фосфолипида. При содержании фосфатидилсерина на внешней поверхности мембраны менее 10 мол. % ингибирование было незначительным. J. Nimri и соавт. [14] предполагают, что β_2 -ГП I играет регулируемую роль в процессе свертывания, предотвращая латентную коагуляцию ингибированием прокоагулянтной липидной поверхности разрушенных клеток крови.

Другой механизм регулирующего действия β_2 -ГП I по типу обратной связи ингибирует протромбиназную активность стимулированных тромбоцитов для предотвращения персистирующей активности в течение длительного времени. Аналогичное действие β_2 -ГП I оказывает и на активацию контактной фазовой системы внутрисосудистого пути свертывания крови. Ингибирование носит характер конкуренции β_2 -ГП I с факторами свертывания XII (Хагемана), прекалликреином и высокомолекулярным кининогеном за связывание с отрицательно заряженной поверхностью [25].

Совершенно иной аспект участия β_2 -ГП I в поддержании гомеостаза обнаружен в последние годы. Он связан с иммунным ответом организма на отрицательно заряженные гаптены (кислые фосфолипиды, фрагменты ДНК и компоненты клеточной стенки бактерий). Антитела к этим гаптенам часто дают перекрестные реакции и полностью не охарактеризованы до настоящего времени. Антитела к фосфолипидам в очень небольших количествах встречаются постоянно в нормальной сыворотке человека [1]. Однако уровень таких антител, часто называемых антикардиолипиновыми, резко возрастает при аутоиммунных и некоторых неопластических заболеваниях. В 30 % случаев наличие таких антител сопровождается артериальными и венозными тромбозами, тромбоцитопенией и повторными абортами [1]. Особенно много исследований посвящено таким антителам при аутоиммунных заболеваниях, в частности системной красной волчанке [7, 9]. Это тяжелое заболевание характеризуется образованием трех групп аутоантител: анти-ДНК антитела, волчаночный (lupus) антикоагулянт и антикардиолипиновые антитела. При детальном изучении обнаружено, что, несмотря на имеющиеся различия, они дают перекрестные реакции и не обладают высокой специфичностью [7]. Все они способны взаимодействовать с поверхностями, содержащими фосфолипиды. Однако при высокой степени очистки антикардиолипиновые антитела не способны связываться с липосомами, содержащими кардиолипин или фосфатидилсерин [5]. Такое взаимодействие происходит лишь в присутствии плазмы. M. Galli и соавт. [5] получили этот компонент, обозначенный ими как АСА-кофактор, в чистом виде. Его активность не нарушалась нагреванием (10 мин, 90 °С), но ингибировалась обработкой

трипсином. АСА-кофактор не связывался с липосомами, содержащими только нейтральные фосфолипиды, но реагировал с кислыми (фосфатидная кислота, кардиолипин, фосфатидилсерин и фосфатидинозитол). Детальное изучение кофактора позволило авторам идентифицировать его как β_2 -ГП I.

Подтверждением роли β_2 -ГП I в связывании фосфолипидов антителами служит сообщение H. McNeil и соавт. [12]. Разрабатывая твердофазную иммуоферментную систему определения антикардиолипиновых антител, они обнаружили, что высокоочищенные антитела не связываются ни с кардиолипиновым антигеном на планшете, ни с фосфолипидом аффинной колонки, если в систему не была добавлена нормальная сыворотка или плазма. Аффинная хроматография антител на колонке с кардиолипином или фосфатидилсеринем показала, что с колонкой связываются 2 белка — иммуноглобулин и β_2 -ГП I. Причем если из сыворотки удаляли β_2 -ГП I, то антикардиолипиновые антитела не связывались с колонкой, в то время как β_2 -ГП I адсорбировался и в отсутствие антител. Эти находки показывают, что присутствие β_2 -ГП I является абсолютно необходимым условием для взаимодействия комплекса антитело — фосфолипид. Антифосфолипидные иммуноглобулины узнают β_2 -ГП I, связанный с фосфолипидом, но не с гепарином, демонстрируя тем самым, что для взаимодействия с антителами нужны и гаптен (фосфолипиды), и белок (β_2 -ГП I). Таким образом, β_2 -ГП I, связываясь с фосфолипидами или ДНК, формирует полный антиген, к которому направлены все три группы антител при системной красной волчанке и других заболеваниях. Формирующиеся антитела узнают и захватывают специфический криптоэпитоп, содержащий антигенные детерминанты фосфолипида (ДНК) и β_2 -гликопротеида. Аналогичный механизм стимуляции продукции антител путем формирования полноценного антигена, состоящего из β_2 -ГП I и анионных макромолекул патогенных микроорганизмов (липополисахарид, тейхоевые кислоты, ДНК и др.), имеет место при ряде инфекционных заболеваний.

Удаление β_2 -ГП I из плазмы крови за счет формирования таких комплексов нарушает нормальное участие этого гликопротеина в процессах свертывания и агрегации тромбоцитов. Этим можно объяснить развитие тромботических диатезов у больных с аутоиммунными заболеваниями.

Таким образом, обладая уникальной структурой и способностью взаимодействовать с разнообразными компонентами и системами организма, β_2 -ГП I играет важную роль в гомеостазе организма. Он контролирует уровень триглицеридов в крови, участвуя в их транспорте и превращениях в составе хиломикрон и ЛПОНП, а также регулируя активность ЛПЛ.

Отклонение в содержании или функционировании этого белка вызывает гиперлипидемию.

β_2 -ГП I играет важную, до конца еще не выясненную роль в гомеостазе, изменение его физиологической концентрации в плазме крови может вызвать нарушение процессов свертывания крови и агрегации тромбоцитов. При нормальном содержании β_2 -ГП I предотвращает спонтанную коагуляцию и снижает способность к агрегации тром-

боцитов, блокируя активную фосфолипидную поверхность. Этим самым он повышает порог чувствительности системы свертывания к различным индукторам.

Наконец, работы последних лет выявили очень важную роль β_2 -ГП I в формировании иммунного ответа организма на отрицательно заряженные неполные антигены. Возможно, дальнейшие исследования позволят установить роль β_2 -гликопротеина крови в патогенезе аутоиммунных инфекционных и других заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Atving C. R.* // Chem. Phys. Lipid.— 1986.— Vol. 40, N 2—4.— P. 303—314.
2. *Biochemistry of Platelets.*— New York, 1986.
3. *Burstein M., Legman P.* // Proteides of the Biological Fluids.— 1978.— P. 407—411.
4. *Finlauson J. S., Mushinsky, J. F.* // Biochim. biophys. Acta.— 1967.— Vol. 147, N 3.— P. 413—420.
5. *Galli M., Comfurius P., Maassen C.* et al. // Lancet.— 1990.— Vol. 335, N 8705.— P. 1544—1547.
6. *Haupt H., Heide K.* // Clin. chim. Acta.— 1966.— Vol. 14, N 3.— P. 418—421.
7. *Janoff A. S., Rauch J.* // Chem. Phys. Lipid.— 1986.— Vol. 40, N 2—4.— P. 315—332.
8. *Kroll J., Larse J. K., Loft H.* et al. // Biochim. biophys. Acta.— 1976.— Vol. 434, N 2.— P. 490—501.
9. *Laraki R., Bletry O., Piette J. C.* et al. // Sang Thromb. Vais.— 1991.— Vol. 3, N 6.— P. 363—369.
10. *Lee N. S., Brewer H. B., Osborne J. C.* // J. biol. Chem.— 1983.— Vol. 258, N 8.— P. 4765—4770.
11. *Lozier J., Takahashi N., Putnam F. W.* // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1984.— Vol. 81, N 12.— P. 3640—3644.
12. *McNeil H. P., Simpson R. J., Chesterman C. N.* et al. // Ibid.— 1990.— Vol. 87, N 11.— P. 4120—4124.
13. *Nakaya Y., Schaefer E. J., Brewer H. B.* // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1980.— Vol. 95, N 3.— P. 1168—1172.
14. *Nimpf J., Bevers E. M., Bomans P. H. H.* et al. // Biochim. biophys. Acta.— 1986.— Vol. 884, N 1.— P. 142—149.
15. *Nimpf J., Wurn H., Kostner G. M.* // Atherosclerosis.— 1987.— Vol. 63, N 2.— P. 109—114.
16. *Polz E., Kostner G. M.* // FEBS Lett.— 1979.— Vol. 102, N 1.— P. 183—186.
17. *Polz E., Kostner G. M.* // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1979.— Vol. 90, N 4.— P. 1305—1312.
18. *Polz E., Kostner G. M., Holasek A.* // Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.— 1979.— Bd 360.— S. 1061.
19. *Polz E., Wurn H., Kostner G. M.* // Int. J. Biochem.— 1980.— Vol. 11, N 3/4.— P. 265—270.
20. *Rosing J., Tans G., Govers-Riemsdag J. W. R.* et al. // J. biol. Chem.— 1980.— Vol. 255, N 1.— P. 274—283.
21. *Schousboe I.* // Biochim. biophys. Acta.— 1979.— Vol. 579, N 2.— P. 396—408.
22. *Schousboe I.* // Thromb. Res.— 1980.— Vol. 19, N 1/2.— P. 225—237.
23. *Schousboe I.* // J. biochem. biophys. Meth.— 1982.— Vol. 6, N 2.— P. 105—114.
24. *Schousboe I.* // Int. J. Biochem.— 1983.— Vol. 15, N 12.— P. 1393—1401.
25. *Schousboe I.* // Blood.— 1985.— Vol. 66, N 5.— P. 1086—1091.
26. *Schultze H. E., Heide K., Haupt H.* // Naturwissenschaften.— 1961.— Bd 48, N 23.— S. 719.
27. *Wurm H., Beubler E., Polz E.* et al. // Metabolism.— 1982.— Vol. 31, N 5.— P. 484—486.
28. *Wurm H.* // Int. J. Biochem.— 1984.— Vol. 16, N 5.— P. 511—515.

Поступила 13.01.92

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616-008.939.15-092.9-07

*А. Д. Денисенко, А. Г. Виноградов,
Ю. И. Пивоварова, А. С. Кузнецов, А. Н. Климов,*

ВЛИЯНИЕ БЛОКАДЫ РЕТИКУЛОЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ НА МЕТАБОЛИЗМ ЛИПОПРОТЕИНОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ У КРОЛИКА

Институт экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург

Катаболизм основной массы плазменных липопротеинов (ЛП) происходит при участии специфических рецепторов. Все клетки тканей организма содержат В, Е-рецепторы, посредством которых и осуществляется элиминация из кровотока большей части ЛП низкой плотности (ЛПНП). Захват ЛПНП клетками — высокоаффинный процесс, характерной чертой которого является регуляция активности рецепторов внутриклеточным холестерином по принципу обратной связи [5].

Однако рецепторный путь не единственный механизм элиминации ЛП из плазмы. В настоящее время большое значение придается сквенджер-механизму утилизации ЛП. Установлено, что сквенджер-рецепторы присутствуют лишь на клетках ретикулоэндотелиальной системы (РЭС) — эндо-

телиальных клетках, купферовских клетках, макрофагах — и связывают и утилизируют преимущественно видоизмененные или модифицированные ЛП [2]. Считается, что нерегулируемый захват моноцитами-макрофагами модифицированных ЛП является центральным звеном формирования пенных клеток в атеросклеротических поражениях сосудов. Макрофаги моноцитарного происхождения, нагруженные липидами, — наиболее ранний признак атеросклеротического поражения.

Поскольку клетки РЭС — главный компонент в удалении модифицированных ЛП, то можно предположить, что ее подавление (блокада) может вызвать изменение в содержании и свойствах ЛП крови. Исходя из этого, целью настоящей работы явилось исследование влияния блокады РЭС на скорость элиминации введенных нативных и модифицированных ЛП, а также характера взаимодействия ЛПНП, выделенных из крови животных после блокады РЭС с двумя типами клеток — макрофагами, имеющими сквенджер-рецепторы, и фибробластами, у которых такие рецепторы отсутствуют, а захват ЛП осуществляется преимущественно, В, Е-рецепторами.

Методика. Блокаду РЭС осуществляли внутривенной инъекцией кроликам-самцам массой тела 2,5—3 кг 10 % эмульсии этилового эфира олеиновой кислоты [11] в физиологическом растворе, содержащем 0,7 % твин-20, из расчета 1 мл эфира на 1 кг массы тела животного.

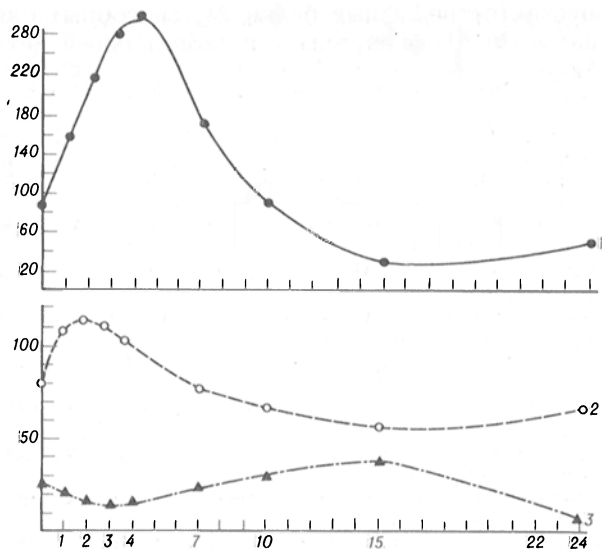


Рис. 1. Влияние блокады РЭС кроликов на содержание (в мг/мл) липидов в плазме (каждая точка — среднее из 3 экспериментов).

По осям абсцисс — дни. 1 — ХС; 2 — ТГ; 3 — ХС ЛПВП.

Для изучения скорости элиминации ЛПНП из кровотока контрольным животным и животным с блокадой РЭС (через 24 ч после введения этилолеата) внутривенно вводили нативные и модифицированные (ацетилированные) ^{125}I -ЛПНП с удельной активностью $2,5 \cdot 10^4$ имп/мин/мг белка из расчета 500 мг белка ЛП на животное. Иодирование ЛП осуществляли монойодхлоридным методом [7], ацетилирование ЛПНП проводили с помощью уксусного ангидрида [12].

Эксперименты по изучению взаимодействия ЛП с фибробластами проводились А. Д. Денисенко совместно с доктором М. Soma в отделе медицины Бейлорского медицинского колледжа (Хьюстон, США).

Характер взаимодействия ЛПНП с клетками исследовали на культуре двух типов клеток — фибробластов и макрофагов. В культуре фибробластов кожи кролика определяли величины специфического связывания, захвата и деградации по методу [3] для нативных ЛПНП и ЛПНП, выделенных от кроликов с блокадой РЭС. Об интенсивности взаимодействия ЛПНП с макрофагами судили по включению в эфиры холестерина (ХС) клеток ^{14}C -олеиновой кислоты [4]. С этой целью нестимулированные перитонеальные макрофаги мыши преинкубировали 24 ч в CO_2 -инкубаторе в среде Игла, содержащей антибиотики и безлипопротеидную сыворотку ($d > 1,21$) из расчета 5 мг белка на 1 мл среды. Затем культуру макрофагов инкубировали 6 ч в такой же среде, содержащей $0,1 \text{ мМ } ^{14}\text{C}$ -олеиновой кислоты в комплексе с альбумином (удельная радиоактивность 20×10^3 имп/мин/нмоль) и ЛПНП от кроликов с блокадой РЭС или контрольных животных в концентрации 50 мкг белка ЛП на 1 мл среды. После окончания инкубации клеточный монослой отмывали трижды фосфатным буфером и из клеток экстрагировали липиды смесью гексан — изопропанол в соотношении 3:2 (2 раза по 1 мл) и заливали 1 мл $0,2 \text{ M NaOH}$ на ночь. В щелочном гидролизате определяли белок клеток по методу [8]. Липидный же экстракт высушивали в токе азота и затем разделяли с помощью тонкослойной хроматографии на силикагеле («Silufol») в системе петролейный эфир — диэтиловый эфир — ледяная уксусная кислота (90:10:1). Пятно, соответствующее эфирам ХС, элюировали и подсчитывали радиоактивность.

Специфическое связывание, захват и деградация ЛПНП (в мкг белка ЛПНП на 1 мг клеточного белка), выделенных от нормальных кроликов и кроликов с блокадой РЭС, фибробластами кожи кроликов

Кролики	Белок ЛПНП в среде инкубации, мкг/мл	Связывание	Захват	Деградация
Нормальные	8	$1,32 \pm 0,01$	$21,42 \pm 0,83$	$80,73 \pm 1,99$
	15	$2,15 \pm 0,16$	$30,99 \pm 0,71$	$119,08 \pm 2,01$
После блокады РЭС	8	$0,11 \pm 0,01$	$12,09 \pm 0,30$	$61,26 \pm 2,52$
	15	$2,62 \pm 0,24$	$14,08 \pm 0,57$	$106,42 \pm 4,97$

Примечание. ЛПНП плазмы выделены через 24 ч после блокады РЭС. Средние данные из 3 опытов.

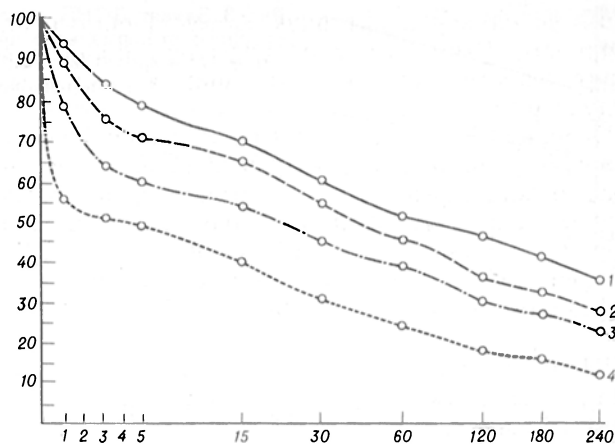


Рис. 2. Скорость элиминации нативных и модифицированных ^{125}I -ЛПНП из кровяного русла нормальных кроликов и кроликов с блокадой РЭС этилолеатом.

По оси абсцисс — минуты; по оси ординат — %. 1 — нативные ЛПНП кроликов с блокадой РЭС; 2 — то же нормальных кроликов; 3 — ацетилированные ЛПНП кроликов с блокадой РЭС; 4 — то же нормальных кроликов.

ЛПНП выделяли препаративным ультрацентрифугированием в градиенте плотности NaBr [6]. Концентрацию ХС и триглицеридов (ТГ) определяли на автоанализаторе АА-II («Technikon»).

Результаты и обсуждение. Как видно из рис. 1, внутривенное введение кроликам этилолеата вызывает значительное повышение уровня ХС и ТГ в плазме крови животных. При этом максимальное увеличение концентрации ТГ наблюдалось уже на 2-е сутки, а ХС — на 4-е. В целом гиперлипидемия (ГЛП) сохранялась в течение 7—10 дней. Обращает на себя внимание тот факт, что динамика изменения уровня ХС ЛП высокой плотности (ХС ЛПВП) в крови была реципрокна динамике изменения уровня общего ХС и ТГ крови.

Хотя точная причина ГЛП при введении этилолеата не установлена, предполагается, что этилолеат, активно захватываясь клетками РЭС, приводит к временной потере функциональной активности этих клеток, и, таким образом, нарастание уровня липидов плазмы расценивается как результат снижения катаболизма ЛП с участием РЭС [10].

Ранее в нашей лаборатории было показано [1], что блокада РЭС, вызванная внутривенным введением коллоидального угля, приводит к снижению синтеза ТГ, ХС и фосфолипидов печеночной тканью и, следовательно, при этом увеличенные уровни липидов крови не может быть объяснено повышением их образования и секреции печенью.

Поэтому была предпринята попытка изучить влияние блокады РЭС на скорость элиминации

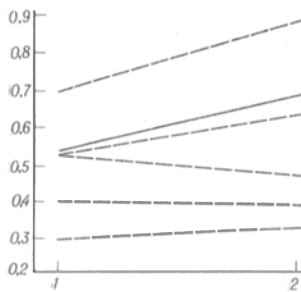


Рис. 3. Захват ЛПНП, изолированных от нормальных кроликов (1) и кроликов с блокадой РЭС (2), макрофагами (по данным включения олеиновой кислоты в эфиры холестерина клеток).

По оси ординат — нмоль ^{14}C -олеиновой кислоты на 1 мг белка/ч. Штриховая линия — данные каждого эксперимента; сплошная линия — средний результат.

ЛП из кровотока. В связи с тем что в последние годы клеткам макрофагальной системы отводится особая роль в катаболизме видоизмененных или так называемых «модифицированных» ЛП, была сопоставлена скорость элиминации нативных и модифицированных (ацетилированных) ЛП из крови как интактных животных, так и у кроликов с блокадой РЭС этилолеатом. Оказалось (рис. 2), что выведение из крови как нативных, так и ацетилированных ЛПНП, меченных ^{125}I , значительно снижено у животных с блокадой РЭС. Однако в обеих группах животных ацетилированные ЛП удалялись из крови значительно быстрее, чем нативные. Полученные данные свидетельствуют, что блокада РЭС в наших условиях тормозит катаболизм нативных и модифицированных ЛП примерно в одинаковой степени. Эти данные оказались неожиданными, поскольку хорошо известно, что ацетилированные ЛП захватываются макрофагами значительно активнее, чем нативные, что наблюдалось и в наших экспериментах. Следовательно, можно было ожидать, что блокада РЭС приведет в первую очередь к замедлению элиминации из крови ацетилированных ЛП. В таблице представлены результаты по изучению взаимодействия ЛПНП с фибробластами. Было найдено, что специфическое связывание, захват и деградация ЛПНП, выделенных от кроликов с блокадой РЭС, значительно ниже, чем соответствующие величины для ЛПНП контрольных животных. В то же время захват ЛП 4 из 6 кроликов с блокадой РЭС перитонеальными макрофагами мыши (рис. 3) был более активным, чем захват нативных ЛПНП кроликов. Следовательно, можно предположить, что блокада РЭС приводит к таким изменениям в ЛПНП, которые, с одной стороны, снижают их способность взаимодействовать с фибробластами, а с другой стороны, стимулируют захват их макрофагами.

ГЛП, наблюдаемая у кроликов при блокаде РЭС, может объясняться снижением скорости катаболизма ЛПНП при участии апо В,Е-рецепторов и замедлением (угнетением) удаления ЛП (главным образом модифицированных) клетками РЭС. Блокада РЭС этилолеатом [9—11] сопровождается угнетением неспецифического рецепторнезависимого пути катаболизма ЛПНП (низкоаффинного адсорбционного эндоцитоза), пути, который не исследовали в данной работе, но эффект которого следует учитывать в общем балансе метаболизма липопротеинов. Снижение способности ЛПНП после блокады РЭС взаимодействовать с фибробластами связано, вероятно, с изменением их химического состава либо с секрецией клетками РЭС после введения этилолеата каких-то

веществ (острофазные белки?), способных связываться с ЛП и нарушать их нормальный метаболизм.

ЛИТЕРАТУРА

1. Денисенко А. Д. // Пат. физиол.— 1978.— № 1.— С. 45—49.
2. Brown M. S., Basu S. K., Falk J. R. et al. // J. Supramolec. Struct.— 1980.— Vol. 13.— P. 67—81.
3. Brown M. S., Goldstein J. L. // Cell.— 1976.— Vol. 9.— P. 663—674.
4. Brown M. S., Goldstein J. L., Krieger M. et al. // J. Cell Biol.— 1979.— Vol. 82.— P. 597—613.
5. Goldstein J. L., Blown M. S. // Med. Clin. N. Amer.— 1982.— Vol. 66.— P. 335—362.
6. Havel R. J., Eder H. A., Bragdon J. H. // J. clin. Invest.— 1955.— Vol. 34.— P. 1345—1353.
7. Helmkamp R. W., Contreras M. A., Issa M. J. // Int. J. appl. Radiat.— 1967.— Vol. 18.— P. 747—757.
8. Markwell M. A. K., Haas S. M., Bieber L. L., Tolbert N. E. // Analyt. Biochem.— 1978.— Vol. 87.— P. 206—210.
9. Packard C. J., Slater H. R., Shepherd J. // Biochim. biophys. Acta.— 1982.— Vol. 712.— P. 412—419.
10. Shepherd J., Packard C. J. // Meth. Enzymol.— 1986.— Vol. 129.— P. 566—590.
11. Slater H. R., Packard C. J., Shepherd J. // J. biol. Chem.— 1982.— Vol. 257.— P. 307—310.
12. Valente A. J., Walton K. W. // Biochim. biophys. Acta.— 1984.— Vol. 792.— P. 16—24.

Поступила 15.08.90

IMPACT OF RETICULOENDOTHELIAL BLOCKADE ON LOW DENSITY LIPOPROTEIN METABOLISM IN RABBITS

A. D. Denisenko, A. G. Vinogradov, Yu. I. Pivovarova, A. S. Kuznetsov, A. N. Klimov

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

Intravenous ethyl oleate-induced blockade of the reticuloendothelial apparatus (REA) in rabbits was found to reduce the elimination rate of both native and ^{125}I -modified (acetylated) low lipoproteins. Lower lipoprotein catabolism is likely to result in hyperlipidemia observed in REA blockade. At the same time the latter was shown to induce the changes in low lipoproteins, which diminished their capacity to interact with fibroblasts, on the one hand, and to stimulate their macrophage uptake.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.155.922-008.61-07:616.153.961-02:615.31:577.112.61-092.9

Г. Х. Божко, П. В. Волошин, Т. П. Бойко, Л. С. Костюковская

ДЕЙСТВИЕ ПРОТАМИНА НА ХОЛЕСТЕРИН, ТРИГЛИЦЕРИДЫ И БЕЛКИ СЫВОРОТКИ КРОВИ В ДИНАМИКЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИИ

НИИ неврологии и психиатрии им. В. П. Протопопова, Харьков

Ранее предположили, что щелочные белки, в том числе протамины, могут препятствовать развитию атеросклероза [7]. Исследование щелочных белков сыворотки крови способствует ранней диагностике атерогенных нарушений при сосудистых заболеваниях [1]. Предполагается, что протамины предупреждают модификацию белков, входящих в состав липопротеинов. Они могут стабилизировать структуру липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), взаимодействуя с амфипатической спиралью апо В. В итоге можно ожидать подавления протаминами нерепеторного

захвата холестерина клетками, уменьшения холестерина и предупреждения процессов атерогенеза [3, 4].

В настоящей работе поставили задачу исследовать концентрацию белков, холестерина и триглицеридов сыворотки крови и в составе липопротеинов при введении протамина на фоне гиперхолестеринемии различной продолжительности.

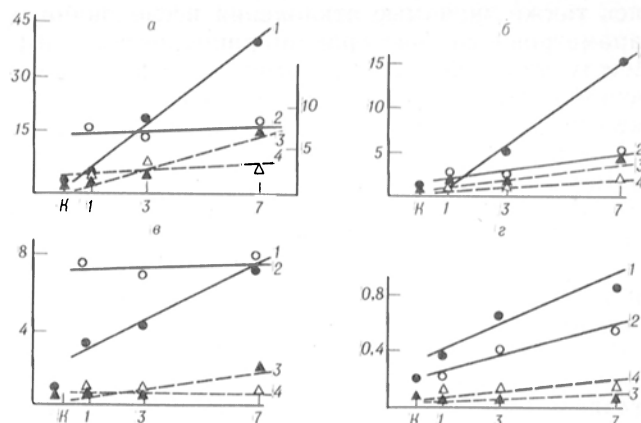
Методика. Подопытными животными служили 50 беспородных кроликов-самцов массой 3—4 кг. Животные 1-й группы получали дважды перекристаллизованный из этанола холестерин в составе рациона ежедневно (кроме воскресенья) в течение 1 мес по 0,5 г/кг массы тела. Кроликам 2-й группы, помимо холестерина, вводили 10 мг/кг 1% раствора протамина внутривбрюшинно (протамина сульфат, полученный из семенников рыб, Хабаровский химико-фармацевтический завод). Животные 3-й группы получали холестерин в течение 3 мес. 4-ю группу составили животные, содержащиеся на атерогенном рационе 3 мес, которым вводили за 1 мес до окончания опытов протамин. Кролики 5-й группы отличались от 3-й тем, что они получали холестерин 7 мес. Животные 6-й группы также получали холестерин 7 мес и, помимо этого, протамин в аналогичной предыдущим постановкам экспериментов дозе за 1 мес до завершения опытов.

В каждый из периодов гиперхолестеринемии использовали собственную контрольную группу, состоящую из 5—6 кроликов. Часть из них получали внутривбрюшинные инъекции физиологического раствора вместо протамина. Подопытные и контрольные животные в течение всего времени экспериментов находились в условиях лабораторного вивария и получали одинаковый в качественном и количественном отношении рацион (овощи, сено, хлеб).

Кровь, собранную утром перед кормлением из краевой вены уха под местной анестезией, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин при 4 °С. Липопротеины фракционировали препаративным ультрацентрифугированием в ступенчатом градиенте концентрации солевых растворов по методу [18], используя ультрацентрифугу УЦП-50, ротор РПУ-45 при 18 °С. Хиломикроны удаляли флотацией в растворе с плотностью 1,0055 г/мл. Холестерин экстрагировали смесью хлороформ — метанол (2:1), триглицериды — изопропанолом и определяли методом [13]. Концентрация белка определяли модифицированным методом Лоури [19].

Статистический анализ полученных результатов проводили по методу Финнера — Стьюдента [14]. Различия между сравниваемыми группами считали статистически значимыми, если вероятность его случайного происхождения не превышала 5% ($p < 0,05$). При значении p в области 0,1—0,05 делали вывод о наличии тенденции к изменению.

Результаты и обсуждение. Как видно на рисунке, в сыворотке крови животных, получавших холестерин, его концентрация равномерно увеличивалась по сравнению с начальным уровнем в течение всего времени исследования. Зависимость изменения концентрации холестерина от времени была практически линейной. Данные литературы свидетельствуют, что у кроликов после однократной нагрузки холестерином его концентрация в сыворотке крови в течение суток возрастает почти линейно. Только после 24 ч кривая, описывающая изменение концентрации холестерина как функцию времени, отклоняется от линейной зависимости в сторону насыщения [15]. С этими данными вполне согласуются результаты, полученные с использованием меченого холестерина. Удельная радиоактивность холестерина сыворотки крови линейно увеличивается в интервале 0—24 ч [17]. Таким образом, линейное возрастание концентрации холестерина сыворотки крови в условиях длительного его скармливания животным может представлять собой результирующую тенденцию ежесуточного его прироста. В течение 3 мес содержания кроликов на атерогенном рационе на фоне резко возрастающей ги-



Изменения концентрации холестерина и триглицеридов сыворотки крови и в составе фракций липопротеинов (в ммоль/л) в динамике гиперхолестеринемии и при введении протамина. По осям абсцисс — длительность исследования, мес, К — контроль; по осям ординат — концентрация холестерина (сплошная линия) и триглицеридов (прерывистая линия), ммоль/л. А — концентрация триглицеридов указана справа. а — сыворотка крови; б — ЛПОНП; в — ЛПНП; г — ЛПВП; 1 и 3 — гиперхолестеринемия; 2 и 4 — гиперхолестеринемия + введение протамина.

перхолестеринемии наблюдается равновесие между концентрацией холестерина в сыворотке крови и печени, о чем свидетельствует одинаковая величина отношения холестерин печени / холестерин крови в динамике гиперхолестеринемии [2].

В начальной стадии экспериментальной гиперхолестеринемии (до 28-х суток) отмечалась сложная временная зависимость изменений концентрации суммарного холестерина крови и холестерина в составе липопротеинов, которая может быть охарактеризована в общем виде как колебательный процесс [5, 16]. При еженедельном или, еще лучше, более частом определении концентрации холестерина удается обнаружить периоды относительного понижения его концентрации. Только в дальнейшем наблюдается существенное уменьшение амплитуды и удлинение периода колебаний. Затухание колебательного процесса рассматривается авторами как свидетельство адаптации организма к патологическому состоянию. Это представление укладывается в рамки концепции о защитной роли феномена адаптационной стабилизации структур [12].

Результаты исследования основных фракций липопротеинов сыворотки крови, включая субпопуляции липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), в ранний период гиперхолестеринемии указывают на то, что специфические адаптационные механизмы выражаются в активировании в это время прямого и обратного транспорта холестерина. Наблюдается увеличение триглицеридобогатых и апо В-содержащих частиц липопротеинов, однако концентрация ЛПВП также значительно возрастает [4, 11]. Особенности субфракционных превращений ЛПВП свидетельствуют о стимуляции акцептирования холестерина с донорных структур и переносе его в печень [11]. Начальный период гиперхолестеринемии характеризуется также активированием общих неспецифических механизмов адаптации, о чем свидетельствует снижение центральных и увеличение периферических ресурсов катехоламинов [6].

Ежедневное введение протамина интактным кроликам в течение 30 сут не вызывало изменений концентрации общих белков, холестерина и триглицеридов сыворотки крови. Не наблюда-

лись также значимые отклонения исследованных параметров в составе фракций липопротеинов [6]. Между тем действие протамина на фоне 1-месячной гиперхолестеринемии приводило к резкому увеличению концентрации холестерина крови — в 2,73 раза. Через 3 мес по сравнению с предыдущим периодом исследования происходило дальнейшее увеличение уровня холестерина. Протамин в этих условиях препятствовал повышению уровня холестерина, о чем свидетельствует отсутствие прироста его концентрации по сравнению с предыдущим периодом исследования.

В условиях 7-месячной гиперхолестеринемии концентрация холестерина сыворотки крови была чрезвычайно высокой (в 19 раз выше, чем в контроле). Действие протамина на фоне длительной гиперхолестеринемии вызывало значительное ее уменьшение — в 2,34 раза, т. е. оказывало действие, противоположное таковому при 1-месячной гиперхолестеринемии. Уровень холестерина в этой постановке экспериментов был выше, чем в контроле, однако практически не отличался от значений, наблюдавшихся в другие исследованные периоды гиперхолестеринемии в опытах с протамином. Таким образом, зависимость изменения концентрации холестерина сыворотки крови при действии протамина на фоне гиперхолестеринемии графически выглядит как прямая, параллельная горизонтальной оси координат. На основании полученных данных можно заключить, что введение протамина на фоне длительного холестериноза сопровождается выравниванием концентрации холестерина крови по отношению к изменениям, характеризующим изолированную гиперхолестеринемию, стабилизацией ее во времени, но на более высоком уровне, чем у интактных животных.

На рисунке представлены также результаты определения триглицеридов сыворотки крови в динамике длительной гиперхолестеринемии. Видно, что возрастание содержания этих соединений подобно изменению концентрации холестерина. Отличие заключается лишь в меньшем наклоне относительно оси абсцисс прямой, описывающей зависимость изменения концентрации от времени. Влияние протамина на изменение содержания триглицеридов также весьма сходно с его действием на холестерин крови. Относительно уровня, характеризующего гиперхолестеринемию, через

1 мес экспериментов наблюдается двукратное увеличение концентрации триглицеридов, выравнивание их концентрации к 3 мес и снижению в 2,2 раза через 7 мес гиперхолестеринемии. Экспериментальные точки, характеризующие концентрацию триглицеридов, хорошо укладываются на горизонтальную прямую. Концентрация триглицеридов при этом остается выше, чем в контроле.

Таким образом, определение концентрации триглицеридов и холестерина сыворотки крови при действии протамина на фоне длительной гиперхолестеринемии показывает, что его эффекты противоположны на ранних и поздних стадиях гиперхолестеринемии. Вначале наблюдается дополнительное увеличение их содержания по отношению к уровню, характеризующему гиперхолестеринемию, через 7 мес — отчетливый гипохолестеринемический и гипотриглицеридемический эффекты. Принимая во внимание собственные результаты и данные литературы [6, 12], можно предположить, что такая динамика отражает развитие адаптации к избыточному поступлению холестерина в организм.

Известно, что в кровяном русле холестерин и триглицериды присутствуют не в свободном виде, а транспортируются в связанном состоянии преимущественно в составе липопротеинов. Анализ результатов, представленных на рисунке, дает основание полагать, что особенности изменений концентрации холестерина сыворотки крови при гиперхолестеринемии и действия протамина на этом фоне в значительной степени обусловлены изменением его содержания в ЛПНП и липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП). Понижение уровня триглицеридов, которое наблюдается при действии протамина в условиях гиперхолестеринемии также, вполне вероятно, определяется уменьшением их концентрации в составе атерогенных фракций липопротеинов. ЛПВП характеризуются низким содержанием триглицеридов. Их концентрация в составе этих частиц не изменялась в динамике гиперхолестеринемии и при действии протамина. В отдельных постановках экспериментов наблюдались незначительные колебания триглицеридов в пределах 0,06—0,10 ммоль/л. Концентрация холестерина в составе ЛПВП не отличалась от контроля при 1-месячной гиперхолестеринемии, увеличивалась через 3 мес

Влияние протамина на изменение концентрации белков (в мг/мл) в динамике гиперхолестеринемии (n=6±7)

Условия опытов	Контроль	Время исследования, мес		
		1	3	7
Сыворотка крови				
Гиперхолестеринемия	65,4±3,1	86,8±3,3*	55,2±2,0*	71,6±5,9
Гиперхолестеринемия+протамин	65,9±2,9	83,4±2,3*	58,5±1,1*	67,9±2,9
ЛПВП				
Гиперхолестеринемия	1,20±0,2	5,1±0,1*	0,28±0,02*	1,31±0,1
Гиперхолестеринемия+протамин	1,26±0,2	6,1±0,4*	0,21±0,02*	2,64±0,3*
ЛПНП				
Гиперхолестеринемия	0,97±0,2	1,0±0,1	0,72±0,1	7,6±0,2*
Гиперхолестеринемия+протамин	1,12±0,1	2,2±0,4*	1,56±0,1*	5,9±0,1*
ЛПОНП				
Гиперхолестеринемия	0,15±0,03	0,43±0,04*	0,15±0,01	0,91±0,2*
Гиперхолестеринемия+протамин	0,21±0,05	1,16±0,03*	0,22±0,01	0,37±0,04

Примечание. Звездочка — изменение статистически значимо по сравнению с контролем.

и оставалась выше начального уровня через 7 мес, однако не изменялась в это время по сравнению с предыдущим периодом исследования (см. рисунок). Действие протамина на холестерин ЛПВП существенно отличалось от его влияния на изменения в составе апо В-содержащих фракций липопротеинов. В каждый из исследованных промежутков времени в динамике гиперхолестеринемии концентрация холестерина ЛПВП была выше значения, характеризующего уровень гиперхолестеринемии. Необходимо отметить в связи с этим, что увеличение уровня холестерина ЛПВП обычно считается ангиатерогенным фактором [8].

Обращает на себя внимание наиболее сильное действие протамина относительно других фракций липопротеинов через 7 мес экспериментов на содержание холестерина и триглицеридов в составе ЛПОНП, которое в 2,5—2,6 раза понижалось по сравнению с уровнем, характеризующим гиперхолестеринемией. Концентрация белков в их составе при этом также уменьшалась (см. таблицу). Можно предположить, что этот факт следует рассматривать как аргумент в пользу ангиатерогенного действия протамина, поскольку одним из ранних эффектов, связанных с избытком холестерина в пище, является стимуляция синтеза в печени и повышение секреции в кровь апо В состава ЛПОНП [9].

Данные об изменении концентрации белков представлены в таблице. Полученные результаты свидетельствуют, что в ранний период гиперхолестеринемии наблюдалось повышение по сравнению с контролем уровня суммарных белков сыворотки крови. Через 3 мес их концентрация уменьшалась. Это согласуется с данными предыдущей работы, из которых также следует, что минимальный уровень белков сыворотки крови наблюдался при более длительной гиперхолестеринемии — через 4—5 мес [10]. К 7 мес гиперхолестеринемии количество белков сыворотки крови восстанавливалось до контрольных значений. В динамике гиперхолестеринемии протамин не оказывал влияния на изменение концентрации суммарных белков сыворотки крови. В отличие от этого изолированная гиперхолестеринемия и действие протамина на этом фоне на ранних и поздних ее стадиях характеризовались отчетливыми особенностями изменений концентрации белковых компонентов в составе всех исследованных фракций липопротеинов. Динамика белков при действии протамина по сравнению с уровнем, характеризующим гиперхолестеринемию, сильно отличалась от изменений более переменных структурных элементов липопротеинов. Колебания белков не сопровождалась соответствующими пропорциональными изменениями холестерина и триглицеридов. По-видимому, это отражает значительное обогащение липопротеинов холестерином и триглицеридами в расчете на единицу белка. На основании этих данных можно заключить, что линейное возрастание липидных компонентов липопротеинов в динамике гиперхолестеринемии и выравнивание их концентрации при введении протамина преимущественно обусловлены изменением состава частиц липопротеинов, но не их количества.

Сравнение концентрации холестерина и белков в составе ЛПВП и апо В-содержащих фракций

при действии протамина на фоне 7-месячной гиперхолестеринемии показывает, что направленность изменений была противоположной в ранние и поздние ее периоды. Можно, следовательно, предположить, что протамин, способен противодействовать развитию двух типов дислипидопротеинемий — гипербета- и гипоальфапротеинемии, обе из которых рассматриваются как независимые факторы риска атеросклероза и ишемической болезни сердца [6, 8].

Совокупность полученных в работе результатов и данные литературы, их подтверждающие, позволяют предположить, что протамин и подобные ему по структуре щелочные белки могут обладать ангиатерогенными свойствами. Это может служить основанием для испытания их в качестве профилактических и лечебных средств при сосудистых заболеваниях атерогенной природы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Божко Г. Х., Волошин П. В., Кулабухов В. М., Костюковская Л. С. // Журн. exper. и клин. мед.— 1988.— Т. 28, № 5.— С. 466—471.
2. Божко Г. Х., Волошин П. В., Чурсина В. С. // Вопр. мед. химии.— 1988.— № 5.— С. 39—43.
3. Божко Г. Х., Волошин П. В., Бойко Т. П., Костюковская Л. С. // Докл. АН УССР.— Сер. Б.— 1990.— № 5.— С. 61—63.
4. Божко Г. Х., Волошин П. В., Бойко Т. П., Костюковская Л. С. // Бюл. exper. биол.— 1990.— № 7.— С. 40—42.
5. Божко Г. Х., Костюковская Л. С., Кулабухов В. М., Волошин П. В. // Укр. биохим. журн.— 1990.— Т. 62, № 5.— С. 25—29.
6. Божко Г. Х., Бойко Т. П., Волошин П. В., Костюковская Л. С. // Докл. АН УССР. Сер. Б.— 1991.— № 2.— С. 125—132.
7. Волошин П. В., Костюковская Л. С., Божко Г. Х., Кулабухов В. М. // Неврология и психиатрия.— 1991.— № 20.— С. 3—6.
8. Климов А. П. // Превентивная кардиология.— М., 1987.— С. 239—315.
9. Косых В. А., Подрез Е. А., Новиков Д. К. // Атеросклероз человека.— М., 1989.— С. 71—90.
10. Кулабухов В. М., Волошин П. В., Костюковская Л. С., Божко Г. Х. // Укр. биохим. журн.— 1987.— Т. 59, № 2.— С. 27—33.
11. Кулабухов В. М., Божко Г. Х., Волошин П. В. // Биохимия.— 1986.— Т. 56, № 10.— С. 1886—1893.
12. Меерсон Ф. З. // Успехи физиол. наук.— 1991.— Т. 22, № 2.— С. 52—89.
13. Меньшиков В. В. Лабораторные методы исследования в клинике.— М., 1987.
14. Фишер А. А. Статистические методы для исследований: Пер. с англ.— М., 1958.
15. Фрольская В. В., Богацкая Л. П., Новикова С. П. // Вопр. мед. химии.— 1989.— № 6.— С. 23—27.
16. Чиркова Э. П. // Колебательные процессы в биологических и химических системах.— Пуццино на Оке, 1971.— Т. 2.— С. 232—237.
17. Чурсина В. С., Волошин П. В., Божко Г. Х. // Докл. АН УССР. Сер. Б.— 1990.— № 9.— С. 75—91.
18. Lindgren F. T., Jensen I. S., Hach F. T. // Blood Lipids and Lipoproteins Quantitation, Composition and Metabolism / Ed. G. J. Nelson.— New York, 1972.— P. 181—193.
19. Miller G. L. // Analyt. Chem.— 1959.— Vol. 31, N 5.— P. 964—966.

Поступила 24.09.91

EFFECT OF PROTAMINE ON CONTENT OF BLOOD SERUM CHOLESTEROL, TRIGLYCERIDES AND PROTEINS IN DYNAMICS OF EXPERIMENTAL HYPERCHOLESTEROLEMIA.

G. Kh. Bozhko, P. V. Voloshin, T. P. Boyko, L. S. Kostyukovskaya
V. P. Protopopov Institute of Neurology and Psychiatry, Kharkov.

Content of total proteins, cholesterol, and triglycerides was studied in the blood serum and lipoprotein fractions of rabbits after administration of protamine within 1, 3 and 7 months of hypercholesterolemia development. The protamine effect was accompanied by "equalization" of cholesterol and triglyceride concentrations, as compared with their alteration in hypercholesterolemia, by stabilization of their content in various periods of the disease, but at the higher level than that of intact animals. The phenomenon observed occurred mainly in lipid components of LDL and VLDL subfractions. Analysis of alterations in the content of cholesterol and proteins in HDL and apo B-containing fractions showed that administration of protamine during long-term hypercholesterolemia led to development of antiatherogenic symptoms. Proatherogenic alterations in lipoprotein composition, developed during hypercholesterolemia, appear to be inhibited by protamine.

© Г. А. ГРИБАНОВ, Н. В. ЛУЦКАЯ, 1993

УДК 616.153.915-07

Г. А. Грибанов, Н. В. Луцкая

ОБ ОСОБЕННОСТЯХ АУТОЛИТИЧЕСКИХ ПЕРЕСТРОЕК ЛИПИДОВ ПЛАЗМЫ, СЫВОРОТКИ И СГУСТКА КРОВИ

Тверской университет

Ранее нами было установлено, что в процессе образования сгустка крови без форменных элементов в него переходит часть липидов плазмы, но по содержанию липидов и их отдельных фракций он существенно отличается от плазмы и сыворотки значительным количеством свободных жирных кислот и фосфолипидов [3]. В многочисленных исследованиях указывается на важное значение липидного компонента в процессах гемостаза [1, 6, 8, 10, 11]. Существует мнение, что наряду с различными биологическими явлениями свертывание крови и фибринолиз имеют в своей основе универсальный биологический механизм — аутолитический распад химических компонентов [7]. Однако исследований характера превращений липидов в аутолизирующихся компонентах свертывающей системы крови до сих пор практически не проводилось. Вместе с тем сравнительный анализ метаболических взаимоотношений липидного компонента в процессе аутолиза в плазме, сыворотке и особенно в сгустке крови может иметь не только теоретическое, но и важное прикладное значение.

В связи с этим целью настоящего исследования явилось сравнительное изучение микрохроматографическими методами качественного состава и количества основных липидных компонентов сгустка, сыворотки и плазмы крови и его изменений в динамике аутолитического процесса.

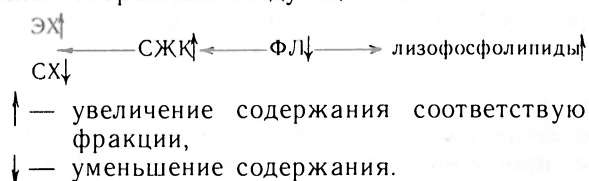
Методика. Материалом служили плазма, сыворотка и сгусток без форменных элементов, полученные из венозной

донорской крови, хранившейся в холодильнике в течение 3—7 сут, как было описано ранее [3]. Для развития аутолитических процессов плазму и сыворотку помещали в пробирки, а сгусток, предварительно взвешенный — в насыщенную водяными парами чашку Петри и инкубировали в асептических условиях в термостате при 37 °С. Показатели липидного обмена оценивали сразу после получения образцов (0 ч), через 4 и 24 ч инкубации в термостате [5]. Экстракцию и очистку общей липидной фракции, ее количественное определение, изучение качественного состава и количества отдельных липидных фракций сыворотки, плазмы и сгустка без форменных элементов крови («белый сгусток») проводили с применением микротонкослойной хроматографии по методам, описанным ранее [4].

Рассчитывали абсолютное количество общих липидов (ОЛ) и относительное содержание основных липидных фракций: фосфолипидов (ФЛ), свободного холестерина (СХ), свободных (неэстерифицированных) жирных кислот (СЖК), триглицеридов (ТГ), эфиров холестерина (ЭХ). Данные обрабатывали методом вариационной статистики.

Результаты и обсуждение. Результаты сравнительного изучения аутолитических перестроек липидов плазмы, сыворотки и сгустка без форменных элементов крови представлены в табл. 1—3. Как видно из табл. 1, суммарное количество липидов плазмы, полученной из донорской крови, в ходе аутолиза снижается, причем особенно интенсивно в ранние сроки — со скоростью 57,1 мг %/ч, и в последующие 20 ч — 6,7 мг %/ч. Характер и скорость изменений отдельных классов липидов различны. Значительным изменениям подвергаются ФЛ и СЖК, при этом относительное содержание ФЛ снижается в первые 4 ч с наибольшей скоростью — 8,2 %/ч, одновременно происходит рост количества СЖК со скоростью 10,7 %/ч. К 24-му часу инкубации наблюдается увеличение доли ЭХ, связанное по всей вероятности, с активацией реакций эстерификации СХ, концентрация которого в ходе инкубации заметно снижается. Фракция ТГ проявляет относительную стабильность.

Отмеченные метаболические изменения могут быть отображены следующей схемой:



Липидный компонент сыворотки, как видно из табл. 2, также подвергается значительным изменениям. Как и в плазме, общая липолитическая активность возрастает наиболее интенсивно в ранние сроки аутолиза — со скоростью 28,7 мг %/ч, в дальнейшем снижение количества ОЛ продолжается, но с меньшей интенсивностью — 6,6 мг %/ч. Характер изменений ФЛ и СЖК сходен с таковым для плазмы крови: в первые 4 ч уровень ФЛ снижается со скоростью 7,2 %/ч,

Таблица 1

Аутолитические изменения ОЛ плазмы донорской крови (n=8)

Время аутолиза, ч	Количество ОЛ, мг%	Фракции ОЛ, % от суммы				
		ФЛ	СХ	СЖК	ТГ	ЭХ
0	640,25±41,46	28,9±2,97	15,7±1,55	15,03±1,41	22,35±2,5	18,02±1,94
4	411,87±33,4*	19,4±1,58*	14,38±1,13	21,46±1,24*	24,11±2,57	20,65±3,00
% изменений	64,3	67,1	91,6	142,8	107,9	114,6
24	277,13±44,3*	21,41±1,84*	12,24±1,55	22,59±3,21*	18,5±2,51	25,26±2,26*
% изменений	43,3	74,1	77,9	150,3	82,8	140,2

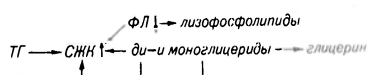
Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3 звездочка — $p < 0,05$.

Аутолитические изменения ОЛ сыворотки донорской крови (n=8)

Время аутолиза, ч	Количество ОЛ, мг%	Фракции ОЛ, % от суммы				
		ФЛ	СХ	СЖК	ТГ	ЭХ
0	501,3±24,1	27,14±1,86	14,33±1,82	16,19±1,71	22,72±1,96	19,62±1,53
4	386,5±39,9*	19,33±1,76*	14,22±1,63	22,7±1,82*	24,75±2,93	19,0±2,59
% изменений	77,1	71,2	99,2	140,2	108,9	96,8
24	253,8±31,63*	18,02±1,1*	15,02±1,79	29,83±2,19*	14,87±1,26*	22,26±2,92
% изменений	50,6	66,4	104,8	184,2	65,4	113,5

в более поздние сроки — 1,7 %/ч; содержание СЖК в ранние часы возрастает на 10 %/ч, в поздние — на 2,2 %/ч. Кроме того, к 24-му часу инкубации отмечается значительное снижение количества ТГ; концентрация же холестерина и его эфиров практически не изменяется.

Описанные взаимоотношения липидов можно представить схемой:



липидов плазмы и сыворотки в ходе аутолиза показывает, что суммарное количество их снижается на всем рассматриваемом отрезке времени, причем особенно значительно в первые часы инкубации, что, вероятно, свидетельствует о высокой липолитической активности именно в ранние сроки аутолиза. При этом в плазме она оказывается более выраженной, чем в сыворотке, полученной из аналогичных образцов донорской крови. В сгустке же содержание ОЛ практически не изменяется. Наиболее быстро во всех изученных объектах снижается доля ФЛ с параллельным накоплением СЖК; содержание ТГ колеблется; фракция холестерина достаточно стабильна.

Сопоставляя данные результаты с полученными ранее [5, 9], нужно отметить некоторые расхождения в интенсивности изменений содержания ОЛ в сыворотке крови, полученной от доноров непосредственно перед экспериментом, по сравнению с донорской кровью, хранившейся в течение некоторого времени в холодильнике. В первом случае содержание липидов в процессе аутолиза не подвергалось значительным изменениям, тогда как инкубация *in vitro* плазмы и сыворотки, полученных из хранившейся при низких температурах донорской крови, сопровождается прогрессирующим снижением содержания ОЛ и их отдельных фракций, что может быть связано с активированием липолитической активности плазмы и сыворотки крови в процессе хранения.

В табл. 3 представлены данные о характере аутолитических изменений липидов «белого сгустка» крови доноров.

Из табл. 3 видно, что липидный компонент сгустка проявляет большую стабильность, чем в плазме и сыворотке. Количество суммарных липидов в ходе аутолиза практически не изменяется, лишь незначительно возрастая в ранние сроки. Основным изменениям подвержены фракции ФЛ и СЖК: отмечается снижение доли ФЛ в первые 4 ч с максимальной скоростью — 5,6 %/ч и повышение концентрации СЖК со скоростью 7,3 %/ч в ранние и 2,1 %/ч — поздние сроки инкубации. Содержание фракций СХ, ЭХ и ТГ колеблется в зависимости от фазы.

Сравнительный анализ изменений содержания

Отмеченные изменения могут быть объяснены существующими между отдельными классами липидов сложными метаболическими взаимоотношениями, осуществляющимися преимущественно при участии трансацилазных и гидролазных механизмов [2]. Общий пул липолитической активности в плазме, сыворотке и сгустке в ходе аутолиза складывается из гидролитических активностей в отношении ФЛ, ЭХ, ТГ и, возможно, ди- и моноглицеридов, которые нивелируются трансацилазными реакциями. Образующиеся при этом СЖК могут использоваться для образования ТГ в ранние сроки аутолиза во всех трех изученных объектах и ЭХ на более поздних этапах аутолиза в сыворотке и плазме. Поэтому при определении липолитической активности в обычных условиях и в динамике аутолитических и других процессов целесообразно не ограничиваться выявлением лишь общей активности, но определять степень гидролиза отдельных ацилсодержащих фракций, учитывая при этом и возможность трансферазных взаимодействий.

Представленные данные свидетельствуют о том, что липидный компонент плазмы, сыворотки и сгустка крови без форменных элементов в динамике аутолиза *in vitro* изменяется неоднотипно. Специфические особенности аутолитических превращений липидов в этих объектах определяются как различиями в составе и активности ферментных систем, осуществляющих биodeградацию и

Таблица 3

Аутолитические изменения ОЛ сгустка донорской крови (n=7-8)

Время аутолиза, ч	Количество ОЛ, мг%	Фракции ОЛ, % от суммы				
		ФЛ	СХ	СЖК	ТГ	ЭХ
0	126,43±11,3	29,24±2,38	13,27±1,24	19,36±3,22	19,11±1,79	19,02±1,93
4	164,93±31,76	22,68±3,93	15,07±2,9	25,01±4,42	22,8±3,86	14,44±2,86
% изменений	130,5	77,6	113,6	129,2	119,3	75,9
24	115,55±16,52	20,9±1,89*	11,3±1,13	33,1±3,25*	16,52±2,74	18,18±2,23
% изменений	91,4	71,5	85,2	170,9	86,4	95,6

биотрансформацию липидного компонента, так и существующими изменениями в характере метаболических взаимоотношений липидов в них.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ганелина И. Е., Кривская В. Ю. и др. // Система свертывания крови.— М., 1966.— С. 23—26.
2. Грибанов Г. А. // Успехи соврем. биол.— 1979.— Т. 87, № 1.— С. 16—32.
3. Грибанов Г. А., Горшкова М. А. // Вопр. мед. химии.— 1986.— № 6.— С. 105—109.
4. Грибанов Г. А., Сергеев С. А. // Там же.— 1975.— № 6.— С. 652—655.
5. Грибанов Г. А., Сергеев С. А. // Лаб. дело.— 1987.— № 3.— С. 207—210.
6. Зубаиров Д. М. Биохимия свертывания крови.— М., 1978.
7. Лушников Е. Ф., Шапиро Н. А. Луголиз.— М., 1978.
8. Проблемы и гипотезы в учении о свертывании крови / Под ред. О. К. Гаврилова.— М., 1981.
9. Сергеев С. А., Грибанов Г. А. // Вопр. мед. химии.— 1980.— № 2.— С. 260—263.
10. Davie E. W., Fukikawa K. // Ann. Rev. Biochem.— 1975.— Vol. 44.— P. 799—829.
11. Suttie J. W., Jackson C. R. // Physiol. Rev.— 1977.— Vol. 57.— P. 71—108.

Поступила 14.01.92

SPECIFICITY OF AUTOLYTIC LIPID REARRANGEMENTS OF BLOOD PLASMA, SERUM AND CLOT.

G. A. Gribanov, N. V. Lutskaya

State University, Tver.

Quantitative composition and amount of main lipid fractions were studied by means of microthin-layer chromatography in blood clot free of cell elements, in blood serum and plasma obtained from volunteers as well as their alterations were estimated in dynamics of autolysis. Dissimilar alterations were detected in total lipids and their individual fractions in the preparations studied. Under conditions of incubation the lipid component was found to be highly labile in blood plasma and serum, where total content of lipids was distinctly decreased, while the lipids content was not considerably altered in blood clot. Content of phospholipids was most distinctly decreased with simultaneous accumulation of free fatty acids in all the preparations studied. The most considerable transformations were observed within early steps of autolysis. Dissimilar composition and activity of the enzymatic systems involved in biodegradation and biotransformation of lipid components as well as specific metabolic relations between lipids may be responsible for these differences in the type and rate of autolytic transformations of lipid components in blood plasma, serum and clot.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 615.31:547.466.623].015.4:612.015.32].07

Л. В. Жукова, И. В. Овчинников, Ю. И. Калиш

РОЛЬ ЛИПИДОВ В МЕХАНИЗМЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ОТВЕТА НА ИНТРАЕЮНАЛЬНОЕ ВВЕДЕНИЕ ГИПЕРТОНИЧЕСКОГО РАСТВОРА ГЛЮКОЗЫ

Ташкентский Научный центр хирургии

Патогенез демпинг-синдрома чрезвычайно сложен и связан с многочисленными факторами: ускоренным опорожнением культи желудка, поступлением недостаточно обработанной пищи в начальный отдел тонкой кишки, уменьшением секреторной функции желудка. В результате в организме развиваются сложные нейрогуморальные сдвиги, которые характеризуются активацией симпатико-адреналовой и кининовой систем, функцио-

нальными изменениями надпочечников, образованием гипотензивных полипептидов [7, 9, 12, 13].

Несмотря на проведение исследования, метаболические механизмы развития демпинг-реакции до конца не выяснены. В частности, не установлена роль липидов в патогенетической цепочке формирования демпинг-реакции, хотя известно, что, помимо пищи с богатым содержанием легкоусвояемых углеводов, жирная пища в ряде случаев может провоцировать демпинг-криз [1, 8].

Эти сведения указывали на важность изучения роли липидов в формировании демпинг-реакции, в связи с чем в крови экспериментальных животных до и на пике спровоцированной демпинг-реакции определяли уровень неэтерифицированных жирных кислот (НЭЖК) триглицеридов и фосфолипидов.

Методика. Демпинг-реакцию вызывали у собак путем интраеюнального введения 150 мл 50 % раствора глюкозы при 36—37 °С через эндоскоп в начальный отдел тонкой кишки. После премедикации (1 мл 2 % раствора промедола на 1 кг массы животного) катетеризировали бедренную вену и производили забор крови. Обследование проводили до и на пике демпинг-реакции.

Проведенные нами ранее исследования [2, 3] биологически активных веществ при спровоцированной демпинг-реакции у экспериментальных животных показали наличие характерных особенностей их уровней у разных животных. По изменениям уровня серотонина, а также показателей гемодинамики животных разделили на 3 группы: 1-я группа (6 животных) — контрольная (содержание серотонина на пике спровоцированной реакции увеличилось не более чем в 1,5 раза; артериальное давление не изменялось); 2-я (12) — с симпатикотоническим типом реакции (содержание серотонина увеличилось в 1,5—2 раза; артериальное давление повышалось); 3-я (8) — с ваготоническим типом реакции (содержание серотонина на пике спровоцированной реакции снижалось; артериальное давление падало). Содержание глюкозы крови и фосфолипидов в сыворотке крови определяли по [5], триглицеридов — колориметрическим методом [10], НЭЖК — по [11], иммунореактивного инсулина в сыворотке крови — с применением наборов рю-ИНС-ПГ-125¹.

Результаты и обсуждение. Исходный уровень глюкозы у животных 3 групп достоверно не отличался ($p > 0,05$). Введение высокоосмотического раствора глюкозы у контрольных животных вызвало повышение уровня глюкозы на 35,1 % ($p < 0,02$) (см. таблицу). Гипергликемический коэффициент равнялся 1,35. У собак с симпатикотоническим типом реакции уровень глюкозы увеличился на 20,3 % ($p < 0,01$), а гипергликемический коэффициент был ниже контрольного и равнялся 1,20. При ваготоническом типе демпинг-реакции уровень глюкозы повысился на 65,8 % ($p < 0,01$), гипергликемический коэффициент был высоким 1,65, что свидетельствовало о повышенном вегетативном возбуждении у животных с ваготоническим типом реакции.

Исходный уровень липидных фракций крови у животных 3 групп был одинаков, за исключением более низкой концентрации НЭЖК у животных 3-й группы ($p < 0,01$).

На пике провокационной пробы определялись существенные сдвиги в концентрациях отдельных липидных фракций. У животных с симпатикотоническим типом реакции содержание НЭЖК достоверно увеличилось на 14,8 % ($p < 0,02$), триглицеридов снизилось на 17,5 % ($p < 0,01$), а фосфолипидов оставалось без изменения, что, вероятно, связано с адренергической стимуляцией липолиза [6]. Повышение уровня инсулина в этой груп-

Содержание субстратов в крови при разных типах спровоцированной демпинг-реакции

Исследуемые субстраты	Контрольная группа	Симпатотонический тип демпинг-реакции	Ваготонический тип реакции
Глюкоза, ммоль/л	1. 5,44±0,55 2. 7,35±0,77 <i>p</i> <0,02	1. 4,78±0,18 2. 5,75±0,25 <i>p</i> <0,01	1. 5,49±0,46 2. 9,1±1,01 <i>p</i> <0,01
НЭЖК, мкмоль/л	1. 179,3±17,2 2. 192,1±13,4 <i>p</i> >0,05	1. 178,2±7,1 2. 204,7±7,6 <i>p</i> <0,02	1. 108,6±2,8 2. 90,5±3,6 <i>p</i> <0,01
Триглицериды, ммоль/л	1. 1,14±0,05 2. 1,12±0,03 <i>p</i> >0,05	1. 1,14±0,03 2. 0,94±0,02 <i>p</i> <0,001	1. 1,04±0,09 2. 1,29±0,09 <i>p</i> <0,05
Фосфолипиды, ммоль/л	1. 2,54±0,14 2. 2,69±0,12 <i>p</i> >0,05	1. 2,16±0,07 2. 1,99±0,09 <i>p</i> >0,05	1. 1,93±0,09 2. 2,21±0,11 <i>p</i> >0,05

Примечание. 1 — до введения гипертонического раствора глюкозы, 2 — после введения. *p* — достоверность отличия между 1 и 2.

пе животных с 115±10 до 163±11 ммоль/л (*p*<0,01) способствовало достаточно эффективной утилизации глюкозы тканями и уменьшению ее концентрации в крови. Активность липолиза в связи с этим нормализовалась.

При ваготоническом типе реакции на пике спровоцированной демпинг-реакции достоверно увеличилась концентрация триглицеридов на 24 % (*p*<0,05) и снижалась концентрация НЭЖК на 16,3 % (*p*<0,01). В условиях отсутствия адренергической стимуляции у этой группы животных (низкий уровень адреналина и цАМФ) глюкоземия, видимо, способствовала ресинтезу нейтрального жира, поскольку глюкоза служит основным исходным субстратом в биосинтезе липидов [4].

В соответствии с полученными данными можно представить следующую последовательность событий. У животных с симпатико-тоническим типом демпинг-реакции в результате повышенной активности энтерохромоаффинной ткани начального отдела тонкой кишки [1] происходит значительный выброс серотонина в кровотоки и как следствие катехоламинов, гистамина и цАМФ [2]. Активация аденيلاتциклазной системы усиливает липолиз, что обуславливает возросший уровень жирных кислот в крови. Наряду с гиперинсулием этот фактор способствует нормализации глюкозы в крови; наступает компенсация.

При ваготоническом типе криза концентрация биологически активных веществ и инсулина низкая, и в этих условиях гипергликемия способствует ресинтезу нейтрального жира в печени. В результате чего снижается уровень гипергликемии.

Таким образом, липиды участвуют в формировании разных типов спровоцированной демпинг-реакции у экспериментальных животных. Видимо, по аналогичным механизмам формируется тот или иной тип демпинг-реакции и у больных с постгастрорезекционным демпинг-синдромом, что следует иметь в виду при назначении этиопатогенетического лечения этого осложнения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вилявин Г. Д., Бердов Б. Я. Болезни оперированного желудка.— М., 1975.
2. Герасимов Н. М., Калиш Ю. И., Жукова Л. В., Макаров К. И. // Пат. физиол.— 1983.— № 2.— С. 39—42.
3. Жукова Л. В. // Мед. журн. Узбекистана.— 1989.— № 11.— С. 60—62.
4. Кендыш И. Н. Регуляция углеводного обмена.— М., 1985.

5. Колб В. Г., Камышников В. С. Справочник по клинической биохимии.— Минск, 1982.
6. Резникова М. Б. // Кардиология.— 1981.— № 7.— С. 112—120.
7. Рычагов Г. П., Кадыров Д. М., Ачилова А. Б. и др. // Вестн. хир.— 1987.— № 2.— С. 25—31.
8. Самсонов М. А., Лоранская Т. И., Нестерова А. П. Постгастрорезекционные синдромы (патогенез, клиника, лечение).— М., 1984.
9. Ткаченко Е. И., Леценко Н. М., Свердлина Н. Т. // Клин. мед.— 1984.— № 5.— С. 60—63.
10. Amenta S. // Lipid. Res.— 1964.— Vol. 5.— P. 270.
11. Duncombe W. C. // Biochem. Res.— 1963.— Vol. 88, N 1. P. 7.
12. Eysselein V. E., Singer M. Y. // Schweiz. med. Wschr.— 1986.— Bd 116, N 1.— S. 19—26.
13. Pedersen J. H., Beck H., Shokouh-Amiri M., Fischer A. // Scand. J. Gastroent.— 1986.— Vol. 21, N 4.— P. 479—482.

Поступила 08.07.91

ROLE OF LIPIDS IN METABOLIC RESPONSE TO INTRAJEJUNAL ADMINISTRATION OF HYPERTONIC GLUCOSE SOLUTION

L. V. Zhukova, I. V. Ovchinnikov, Yu. I. Kalish

Research Centre, Tashkent.

Importance of impairments in lipid metabolism for development of dumping reactions was studied in experimental animals. Alterations in content of free fatty acids, triglycerides and phospholipids before and at the peak of the provoked dumping reaction depended on the type of the dumping reaction. Lipid metabolites were involved in development of the provoked dumping reaction.

© М. Б. ПЕТРОВА, 1993

УДК 616.5-018-008.939.15-02:615.849.191-07

М. Б. Петрова

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ ЛИПИДНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЛАЗЕРНОГО ОБЛУЧЕНИЯ НА РЕГЕНЕРИРУЮЩИЕ ТКАНИ КОЖИ

Тверской медицинский институт

Механизм лазерного воздействия опосредуется на уровне биологических мембран [1—3, 15], необходимым компонентом которых являются фосфолипиды (ФЛ). Особенности физико-химических свойств этих соединений определяют их участие во всех важных функциях клетки: пролиферативной, энергетической, транспортной, рецепторной [9, 11, 13, 14]. В литературе отсутствуют данные об изменении содержания отдельных фракций ФЛ

Таблица 1

Абсолютное содержание ФЛ (в мг на 100 г ткани) в регенерирующей ткани на различных этапах заживления

Длительность заживления, дни	Контроль	Облучение лазером
7	500,45±17,36	240,68±19,73*
14	317,40±24,47	185,08±18,51
21	271,41±15,32	531,76±18,18*

Примечание. Здесь и в табл. 2 звездочка --- различия статистически достоверны.

в условиях лазерного воздействия на посттравматическую регенерацию. Задача настоящей исследования состояла в определении содержания отдельных фракций ФЛ в регенерирующих тканях в ходе заживления ран кожи при воздействии гелий-неонового лазера.

Методика. Эксперименты выполнены на 72 белых крысах. Животные I серии служили контролем, крысы II серии получали лазеротерапию (ЛГ-75, плотность мощности 5 мВт/см², экспозиция 5 мин). Животных обеих серий выводили из эксперимента с соблюдением правил эвтаназии. У ряда животных была инфицированная рана в межлопаточной области. Фосфолипидный состав регенерирующих тканей определяли в динамике раневого процесса через 7, 14 и 21 день способом тонкослойной горизонтальной хроматографии в стеклянных камерах [6]. С этой целью использовали стандартные навески ткани, тщательно очищенные от струпа, гноя и жировой клетчатки. Экстракцию липидов производили по методу Фолча [12]. Экстракты упаривали в токе азота, растворяли в смеси хлороформ — метанол, наносили на стеклянную пластинку с адсорбентом. Хроматографию производили в системе хлороформ — метанол — 7 н. аммиак (13:7:1) в течение 50 мин. Хроматограммы проявляли в парах хромовой смеси. Количественную оценку осуществляли денситометрически, расчеты производили в процентах и абсолютных цифрах.

Результаты и обсуждение. Тонкослойная хроматография позволила выявить следующие фракции ФЛ в регенерирующих тканях у животных сравниваемых серий: лизофосфатидилинозиты (ЛФИ), сфингомиелины (СФМ), фосфатидилхолестины (ФХ), фосфатидилинозитиды (ФИ) и фосфатидилэтаноламы (ФЭА). Спектр фракций в ходе репарации не изменялся, но отличался количественным составом у контрольных животных и крыс, подвергавшихся облучению.

Через 7 дней после операции у животных контрольной серии содержание ФЛ составило 500,45 мг на 100 г ткани (табл. 1). Преобладаю-

Таблица 2

Содержание ФЛ (в %) в регенерирующей ткани на различных этапах заживления

Длительность заживления, дни	ФЛ	Контроль	Облучение лазером
7	ЛФИ	12,71±5,39	2,76±0,81
	СФМ	29,43±3,77	15,82±2,23*
	ФХ	31,53±2,07	39,92±2,93*
	ФИ	9,30±1,96	12,64±4,92
	ФЭА	17,02±7,31	28,81±1,72
14	ЛФИ	10,48±3,32	7,67±2,72
	СФМ	34,91±1,07	34,32±4,72
	ФХ	28,29±2,44	39,27±0,93
	ФИ	10,33±1,83	6,52±2,39
	ФЭА	15,97±3,78	12,20±1,46
21	ЛФИ	16,21±2,73	6,89±0,76*
	СФМ	18,76±2,81	46,63±5,12*
	ФХ	28,37±3,47	20,03±3,28
	ФИ	15,68±2,35	12,67±1,73
	ФЭА	15,21±3,11	10,20±2,81

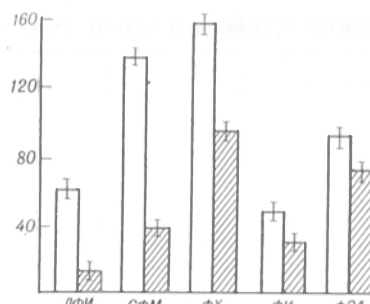


Рис.1

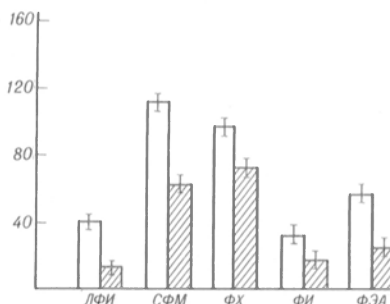


Рис.2

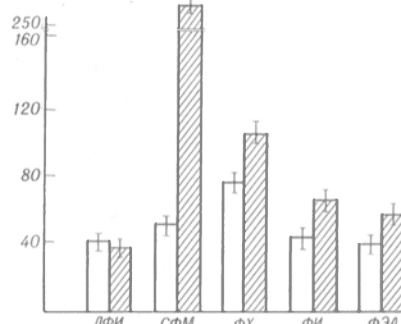


Рис.3

Рис. 1. Абсолютное содержание ФЛ (в мг на 100 г ткани) в регенерирующей ткани через 7 дней после операции.

Здесь и на рис. 2 и 3 светлые столбики — контроль, заштрихованные — облучение лазером.

Рис. 2. Абсолютное содержание ФЛ (в мг на 100 г ткани) в регенерирующей ткани через 14 дней после операции.

Рис. 3. Абсолютное содержание фосфолипидов (в мг на 100 г ткани) в регенерирующей ткани через 21 день после операции.

щей фракцией в абсолютных величинах и процентах являлась ФХ. Далее в порядке убывания были представлены СФМ, ФЭА и ЛФИ. Количественно минимальной фракцией была ФИ (табл. 2).

У животных, получавших лазеротерапию, в тот же срок содержание ФЛ было почти в 2 раза меньше и составило 240,68 мг на 100 г ткани. Полученные нами результаты согласуются с данными работы [7], в которой отмечено снижение содержания ФЛ и холестерина в плазме крови крыс при воздействии лазером на эпигастральную область. Изменилось и соотношение фракций. Содержание всех фракций в абсолютных величинах у данной группы животных можно оценить однозначно: происходит уменьшение их уровня по сравнению с контролем. Очевидно, это согласуется со снижением общего содержания ФЛ. Особенно выраженным изменениям подверглось содержание лизоформ, которое уменьшилось почти в 10 раз. Известно [4], что лизоформы — это наиболее лабильные компоненты мембран, реагирующие на различные физические воздействия.

Одновременно существенные изменения отмече-

ны со стороны СФМ (38,07 мг против 147,28 мг в контроле, различия достоверны). Наши результаты согласуются с опубликованными ранее данными [5] о том, что в тканях, где происходит интенсивное деление клеток, уровень СФМ уменьшается. Изменения содержания ФХ были не столь значительными и недостоверными, так как они являются основными структурными компонентами мембран и резкое изменение их уровня свидетельствует о процессах деструкции [10]. Аналогичная динамика отмечена и для ФЭА и ФИ (рис. 1). Оценивая процентное соотношение различных групп ФЛ, можно выявить следующие изменения в ответ на лазерное излучение: доля таких фракций, как ФХ, ФИ и ФЭА, увеличивалась, а ЛФИ и СФМ достоверно снижалась (см. табл. 2).

Течение восстановительного процесса у животных контрольной серии сопровождалось снижением содержания ФЛ в грануляциях. Через 14 дней уровень ФЛ составил 317,40 мг против 500,45 мг в предыдущий срок. Это снижение отразилось на абсолютном содержании всех фракций и проявилось в их количественном уменьшении. Смена фаз процесса заживления изменила и процентное соотношение различных форм ФЛ. Однако наблюдаемые изменения не носили резкого характера. Наиболее существенные различия касались СФМ, процент которых увеличивался, и эта фракция стала преобладающей. Также увеличилось и процентное содержание ФИ; доля остальных фракций уменьшилась.

У животных II серии, находившихся под воздействием гелий-неонового лазера, в тот же срок (через 14 дней) абсолютное содержание фосфолипидов продолжало снижаться и составило 185,08 мг, что значительно ниже, чем в контроле. Сравнивая аналогичные показатели с контрольной серией, следует отметить, что наиболее значимым колебаниям подверглись фракции ЛФИ, СФМ, ФИ и ФЭА, количество которых снизилось почти в 2 раза. Содержание ФХ уменьшилось с 89,79 до 72,68 мг (рис. 2).

Проводя сравнение фракционного спектра ФЛ с предыдущим сроком этой же серии, мы отмечали рост абсолютного содержания ЛФИ и СФМ и уменьшение содержания ФХ, ФИ и ФЭА, причем наиболее значительным колебаниям подверглись ФИ, показатели которых уменьшились с 32,78 до 12,06 мг.

При анализе процентного соотношения фракций ФЛ нами отмечено, что по сравнению с контролем доля СФИ приблизительно одинакова и в обеих сериях данная фракция преобладает. Процентное содержание ЛФИ, ФИ и ФЭА несколько ниже контрольных цифр, а доля ФХ увеличилась с 28,3 до 38 %.

На завершающем этапе заживления (через 21 день от начала эксперимента) абсолютное содержание ФЛ в новообразованной ткани у контрольных животных характеризовалось самой минимальной величиной по сравнению с ранними фазами регенерации — 271,41 мг. Но на этом фоне тенденцию к снижению содержания сохраняли лишь СФМ, ФХ и ФЭА. Напротив, уровень ЛФИ и ФИ увеличивался, а содержание последней фракции почти достигало показателей, полученных нами через 7 дней от начала заживления. Доля ФХ и ФЭА, несмотря на уменьшение абсолютных

цифр, сохранялась на уровне предыдущего срока, а доля ЛФИ и ФИ увеличилась. Единственной фракцией ФЛ, процент которой уменьшился почти в 2 раза, была СФМ.

Пролонгированное лазерное излучение (срок наблюдений 21 день после нанесения травмы) приводило к резкому скачку абсолютного содержания ФЛ и составило 531,76 мг. Это увеличение уровня ФЛ было достигнуто за счет очень резкого (почти в 5 раз) роста уровня СФМ, а также ФХ, ФИ и ФЭА. Однако содержание ЛФИ несколько снижено по сравнению с контролем (рис. 3). Сравнение же содержания групп ФЛ с предыдущим сроком той же серии выявило увеличение показателей всех фракций.

В процентном отношении по сравнению с контролем возрастала только доля СФМ, остальные фракции характеризовались снижением, несмотря на увеличение абсолютных цифр.

Таким образом, наши исследования показали, что течение восстановительного процесса в инфицированных ранах кожи у животных контрольной серии сопровождается снижением уровня ФЛ в регенерирующих структурах. У животных, заживление ран которых осуществлялось в условиях лазерного воздействия, содержание ФЛ было значительно ниже, чем в контроле, но их уровень также уменьшался. Однако в отличие от контроля это снижение продолжалось только на двух первых этапах репаративного процесса. Завершающая стадия заживления характеризовалась резким увеличением содержания ФЛ и особенно СФМ. Приведенные данные дают основание утверждать, что в процессе регенерации между стадиями заживления и уровнем ФЛ существует определенная взаимосвязь. Высокие показатели уровня ФЛ сопровождаются глубокими морфологическими перестройками, завершением клеточного размножения и формирования зрелой соединительной ткани на месте бывшего дефекта [8]. Динамика содержания СФМ может быть использована для определения этапности восстановительного процесса и эффективности лазеротерапии.

Учитывая эти данные, можно сделать заключение о том, что эффект лазерного воздействия достигается уже на начальных этапах заживления. Полученные результаты дают основание рекомендовать новую методику проведения лазеротерапии, а именно для достижения стимулирующего эффекта осуществлять воздействие только на ранних стадиях регенерации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Девятков Н. Д., Зубкова С. М., Лапрун И. Б., Макеева Н. С. // Успехи соврем. биол.— 1987.— Т. 103, № 1.— С. 31—43.
2. Зубкова С. М., Соколова З. А., Попов В. И., Лапрун И. Б. // Вопр. курортол.— 1983.— № 6.— С. 25—29.
3. Кару Т. Й. // Докл. АН СССР.— 1986.— Т. 291, № 5.— С. 1245—1249.
4. Кейтс М. Техника липидологии.— М., 1975.
5. Крейс Е. М. Липиды клеточных мембран. Эволюция липидов мозга: адаптационная функция липидов.— Л., 1981.
6. Мацуль В. М., Каргаполов А. В. // Вопр. мед. химии.— 1990.— № 1.— С. 80—82.
7. Павлюст Л. П. // Проблемы патологии в эксперименте и клинике.— Львов, 1987.— С. 142—143.
8. Хомулло Г. В. // Репаративная регенерация тканей и гормоны.— М., 1987.— С. 5—12.
9. Швец В. И., Степанов А. Е., Крылова В. П., Гулак П. В. Миоинозит и фосфоинозитиды.— М., 1987.

10. Ansell G. B., Hawthorn S. N. Phospholipids. Metabolism and Function.— Amsterdam, 1964.
11. Choquette D., Halcim G., Filetep A. G. et al. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1984.— Vol. 125, N 3.— P. 908—915.
12. Folch J., Lees M., Stanley G. H. S. // J. biol. Chem.— 1957.— Vol. 226, N 1.— P. 497—509.
13. Macara J. G. // Amer. J. Physiol.— 1985.— Vol. 248, N 1.— P. 3—11.
14. Rossi F., Bianca V. D., Grzeskowiak M. et al. // FEBS Lett.— 1985.— Vol. 181, N 2.— P. 252—258.
15. Song P. S. // The Blue Light Syndrom / Ed. H. Senger.— Berlin, 1980.— P. 157.

Поступила 21.11.91

TIME COURSE OF CHANGES IN LIPID PARAMETERS AFTER LASER IRRADIATION OF REGENERATIVE SKIN TISSUES.

M. B. Petrova

Medical Institute, Tver

Content of individual phospholipids was studied in regenerative tissues after laser irradiation. The fraction of sphingomyelins was shown to be most markedly altered. Measurement of sphingomyelins in the regenerative skin tissues may be used to evaluate laser irradiation efficiency.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.611-002.2-06:616.61-008.6-07:616.153.915-39

Ф. А. Тугушева, А. И. Куликова, И. М. Зубина

ОСОБЕННОСТИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ КРОВИ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТОМ В СТАДИИ НАРУШЕНИЯ ФУНКЦИИ ПОЧЕК НА ФОНЕ НЕФРОТИЧЕСКОГО СИНДРОМА

I медицинский институт им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург

В настоящее время принято считать мембрано-деструктивные процессы одним из ведущих звеньев в патогенезе хронического гломерулонефрита (ХГН). В свою очередь косвенным фактором реализации мембранолитических процессов в почечной ткани может быть стимуляция свободнорадикального окисления липидов в мембранах с одновременной активацией эндогенных фосфолипаз и несоответствием функциональной активности антиоксидантной системы (АОС) [5]. Усугубляющим фактором является наличие у больных глубоких нарушений липидного обмена [9].

Целью настоящего исследования явилось изучение состояния систем перекисного окисления липидов (ПОЛ) и антиоксидантной защиты у больных ХГН в стадии нарушения функции почек в зависимости от степени выраженности азотемии и наличия у больных нефротического синдрома (НС) — наиболее тяжелой клинической формы гломерулонефрита.

Методика. Объектом исследования служила свежеспущенная кровь здоровых и больных людей. Все показатели определяли отдельно в плазме и эритроцитарной взвеси.

Исследована кровь 68 доноров и 52 больных ХГН в IА—IIIБ стадии хронической почечной недостаточности (ХПН) по классификации С. И. Рябова и Б. Б. Бондаренко [12].

Об интенсивности ПОЛ судили по уровню диеновых конъюгатов (ДК), малонового диальдегида (МДА) и гидроперекисей липидов (ГПЛ), которые определяли с помощью

стандартных методик [1, 2, 10]. Антиоксидантный потенциал оценивали по содержанию токоферолоподобных веществ (ТФ), общих и небелковых сульфгидрильных групп, а также по общей пероксидазной активности (ОПА) [8]. ТФ определяли спектрофотометрически, взяв за основу стандартную методику [11] и несколько модифицировав ее применительно к плазме и эритроцитарной взвеси. Содержание сульфгидрильных групп (SH-групп) определяли методом [15]. Проводили также определение общих липидов фосфориво-ванилиновым методом с помощью стандартных наборов фирмы «Хемапол» (Чехо-Словакия). Все полученные данные обрабатывали согласно правилам вариационной статистики для малого числа наблюдений в выборке.

Результаты и обсуждение. Данные клинико-морфологического и лабораторного обследования больных (32 мужчины и 20 женщин, средний возраст $39,0 \pm 2,0$ года) представлены в табл. 1 и 2.

Результаты исследований состояния системы ПОЛ и антиоксидантной защиты представлены в табл. 3—5.

Как видно из данных табл. 3 и 4, ХГН с нарушением функции почек характеризуется выраженным дисбалансом систем ПОЛ и антиоксидантной защиты как в плазме крови, так и в эритроцитах. Об этом свидетельствует двукратное накопление в плазме ДК, сочетающееся со снижением до 62 % от нормальных значений уровня общих SH-групп. Вместе с тем отмечается увеличение на 142 % от нормы уровня ТФ и наблюдается гиперлипидемия. В эритроцитах происходит накопление конечного метаболита ПОЛ — МДА (139 % от нормы), что сопровождается снижением уровня небелковых SH-групп до 69 % и общих липидных компонентов до 75 %, а также снижением ОПА крови до 72 % от нормальных значений.

С целью обобщения полученных разнородных данных, отражающих как систему ПОЛ, так и систему антиоксидантной защиты, мы считаем необходимым выведение интегрального показателя, наиболее полно характеризующего баланс обеих систем. Нами предлагается вычисление антиоксидантных коэффициентов (АОК) отдельно для плазмы и эритроцитов в виде дроби, где числитель представлен суммой величин факторов антиоксидантной защиты, а знаменатель — уровнем продуктов ПОЛ:

$$АОК_{пл} = \frac{ТФ + \text{общие SH-группы}}{ДК + МДА};$$

$$АОК_{эр} = \frac{ТФ + \text{общие SH-группы} + \text{небелковые SH-группы}}{МДА}$$

Таблица 1

Данные клинико-морфологического обследования больных ХГН в стадии ХПН

Морфологическая форма ХГН	Всего больных	Стадии ХПН			Из них с НС
		I	II	III	
Мезангиально-пролиферативный гломерулонефрит	14	9	4	1	6
Мембранозно-пролиферативный гломерулонефрит	10	5	4	1	7
Мембранозный гломерулонефрит	4	3	—	1	3
Фокально-сегментарный гломерулосклероз	4	1	3	—	3
ХГН без прижизненной верификации морфологической формы	20	3	13	4	7
Итого	52	21	24	7	26

Данные клинико-лабораторного обследования больных

Показатель	ХПН I стадии	ХПН II стадии	ХПН III стадии
Креатинин плазмы крови, ммоль/л	0,150±0,014 (17)	0,480±0,049 (20)	0,950±0,082 (7)
Мочевина плазмы крови, ммоль/л	9,54±0,91 (17)	19,26±1,52 (20)	26,28±2,74 (6)
Скорость клубочковой фильтрации, мл/мин	72,34±7,68 (16)	19,11±2,44 (19)	4,77±0,58 (6)

Примечание. Здесь и в табл. 3–5 в скобках — число больных.

Так как все величины имеют разную размерность, их значения выражаются в процентах по отношению к нормальным, принятым за 100. Как видно из данных табл. 3 и 4, АОК плазмы крови больных ХГН достоверно не отличается от АОК плазмы крови доноров. В то же время АОК эритроцитов больных составляет всего 77 % от нормального значения ($p < 0,002$).

Представленные данные свидетельствуют также о том, что степень выраженности азотемии практически не оказывает влияния на характер нарушений в системе ПОЛ — АОС. Однако, хотя достоверных различий между группами больных с разной степенью ХПН нет, наблюдается тенденция к накоплению в эритроцитах МДА и истощению в них липидных компонентов.

В связи с тем что НС является одним из наиболее тяжелых проявлений ХГН, мы отдельно обследовали больных с азотемией в сочетании с НС и без него.

Как следует из данных табл. 5, НС, будучи критерием активности протекания основного заболевания, характеризуется также и более выраженными сдвигами в системе ПОЛ. Так, в плазме наблюдаются более высокий уровень ДК и более значительное снижение содержания общих SH-групп (55 %; $p < 0,001$), а в эритроцитах обнаружено более значительное накопление МДА (155 % от нормы), сопровождающееся истощением небелковых SH-групп и липидов до 63 и 77 % соответственно, а также существенное падение ОПА.

При более благоприятном течении ХПН (т. е. без НС) тенденция изменений показателей системы ПОЛ — АОС в плазме такая же, однако сте-

пень ее выраженности ниже, чем при НС. При этом величины показателей в эритроцитах практически не отличаются от нормальных.

Большую степень выраженности липопероксидации при ХГН, сопровождающейся НС, подтверждают и величины АОК. Так, АОК плазмы и эритроцитов крови больных ХГН в I—III стадиях ХПН без НС практически не отличаются от нормальных. В то же время значения АОК плазмы и эритроцитов в группе больных с НС снижены до 63 и 69 % соответственно и достоверно отличаются в обоих случаях от АОК больных, течение ХГН у которых не сопровождается НС.

Присоединение к ХГН почечной недостаточности усугубляет имеющиеся у больных нарушения липидного обмена [9]. Прямое повреждающее воздействие липидов на нефрон [7] в сочетании с нарушением антиоксидантного статуса способствует мембранолитическим процессам и приводит к деструкции нефрона. Косвенным подтверждением тому служат данные, полученные на эритроцитах, мембрану которых можно рассматривать как модель плазматической мембраны. Так, разные группы исследователей обнаружили накопление в них МДА, истощение витамина Е [16] и сульфгидрильных групп [3], значительные изменения фосфолипидного спектра [4] и нарушения энергетического метаболизма, что может быть причиной сокращения длительности их жизни [14]. Таким образом, активация ПОЛ в мембранах приводит к их структурно-функциональной нестабильности.

Более грубые нарушения липидного обмена при НС сочетаются с более значительными нару-

Таблица 3

Показатели ПОЛ и антиоксидантной защиты в плазме и цельной крови больных ХГН в I—III стадиях ХПН

Исследуемый показатель	1. Доноры	2. Больные ХГН в I—III стадиях ХПН (суммарно)	В том числе			p_{1-2}	p_{3-5}
			3. ХПН I стадии	4. ХПН II стадии	5. ХПН III стадии		
Плазма:							
ДК, АЕ ₂₃₂ /мл	1,91±0,13 (68)	3,81±0,35 (49)	4,10±0,65 (18)	3,74±0,54 (21)	3,41±0,52 (7)	<0,001	
МДА, нмоль/мл	3,29±0,27 (61)	3,48±0,26 (50)	3,23±0,42 (19)	3,84±0,46 (21)	3,32±0,37 (7)		
ТФ, мкмоль/мл	0,249±0,013 (42)	0,333±0,019 (52)	0,284±0,020 (21)	0,360±0,033 (24)	0,401±0,051 (6)	<0,001	<0,05
общие SH-группы, мкмоль/мл	0,798±0,045 (26)	0,495±0,026 (38)	0,480±0,030 (15)	0,470±0,050 (15)	0,510±0,049 (5)	<0,001	
липиды, г/л	4,75±0,21 (68)	8,70±0,67 (43)	9,00±0,75 (19)	8,60±1,33 (21)	8,42±1,21 (7)	<0,001	
АОК	1,070±0,052 (59)	0,901±0,113 (50)	0,719±0,125 (15)	1,108±0,220 (15)	0,841±0,068 (5)		
Кровь:							
ОПА, мкмоль/мин/л/г гемоглобина	2,09±0,12 (21)	1,50±0,15 (27)	1,68±0,22 (12)	1,43±0,25 (10)	1,40±0,23 (3)	<0,01	

Показатели ПОЛ и антиоксидантной защиты в эритроцитах крови больных ХГН в I—III стадии ХПН

Исследуемый показатель	1. Доноры	2. Больные ХГН в I—III стадии ХПН (суммарно)	В том числе			p ₁₋₂
			ХПН I стадии	ХПН II стадии	ХПН III стадии	
ГПЛ, мкмоль/мл	0,434±0,022 (10)	0,432±0,032 (23)	0,390±0,026 (9)	0,400±0,035 (10)	0,398±0,053 (2)	
МДА, нмоль/мл	14,64±1,20 (42)	20,31±1,89 (48)	17,98±1,86 (18)	18,92±2,42 (21)	23,28±4,54 (6)	<0,02
ТФ, мкмоль/мл	1,794±0,173 (37)	1,727±0,116 (50)	1,731±0,140 (19)	1,825±0,171 (24)	1,303±0,138 (6)	
Общие SH-группы, мкмоль/мл	2,37±0,16 (27)	2,48±0,17 (38)	2,89±0,32 (15)	2,23±0,16 (15)	2,32±0,45 (5)	
Небелковые SH-группы, мкмоль/мл	0,285±0,030 (27)	0,198±0,013 (38)	0,182±0,010 (18)	0,190±0,026 (14)	0,200±0,022 (5)	<0,01
Липиды, г/л	0,840±0,055 (47)	0,632±0,031 (40)	0,960±0,280 (18)	0,630±0,050 (21)	0,580±0,048 (6)	<0,002
АОК	2,956±0,143 (51)	2,268±0,124 (31)	2,284±0,201 (11)	2,372±0,185 (14)	1,952±0,336 (5)	<0,002

шениями антиоксидантного статуса. Нами показано, что течение ХГН в I—III стадии ХПН, сопровождающееся НС, отличается более выраженное накопление гидроперекисей липидов в плазме и более тяжелые нарушения тиолового звена АОС плазмы крови и значительные изменения в эритроцитах (накопление МДА, истощение небелковых SH-групп и общих липидов). В отсутствие НС сдвиги в плазме более умеренные, а эритроциты практически интактны. Однако в отличие от других авторов [3] нами не найдена динамика исследуемых показателей по мере прогрессирования ХПН. С другой стороны, мы не обнаружили зависимости показателей ПОЛ и антиоксидантной защиты от морфологической формы ХГН, что яв-

ляется дополнительным доказательством неспецифичности НС в силу однонаправленности нарушений липидного обмена при НС различного генеза [13].

Полученные нами данные о несоответствии реакций ПОЛ и антиоксидантного потенциала в плазме и эритроцитах у больных ХГН подводят к необходимости более смелого внедрения в лечебную практику препаратов антиоксидантного и антифосфолипазного действия. Возможно, что наибольший лечебный эффект наступит при сочетании со средствами, корригирующими уровень липидов в крови, особенно липопротеидов низкой плотности, так как именно они наиболее чувствительны к перекисидации в отличие от липопротеидов

Таблица 5

Влияние НС на показатели ПОЛ и антиоксидантной защиты крови больных ХГН в I—III стадии ХПН

Исследуемый показатель	1. Доноры	Больные ХГН в I—III стадии ХПН		p ₁₋₂	p ₁₋₃	p ₂₋₃
		2. С НС	3. Без НС			
Плазма:						
ДК, АЕ ₂₃₂ /мл	1,91±0,13 (68)	4,28±0,50 (25)	3,46±0,42 (26)	<0,001	<0,001	
МДА, нмоль/мл	3,29±0,27 (61)	3,25±0,39 (25)	3,61±0,32 (26)			
ТФ, мкмоль/мл	0,249±0,013 (42)	0,338±0,034 (26)	0,327±0,026 (26)	<0,01	<0,01	
общие SH-группы, мкмоль/мл	0,798±0,045 (26)	0,437±0,026 (23)	0,557±0,041 (18)	<0,001	<0,001	<0,02
липиды, г/л	4,75±0,21 (68)	11,25±1,11 (26)	6,98±0,51 (26)	<0,001	<0,001	<0,001
АОК	1,070±0,052 (59)	0,674±0,080 (19)	1,175±0,208 (16)	<0,001		<0,05
Эритроциты:						
ГПЛ, мкмоль/мл	0,434±0,022 (10)	0,444±0,045 (15)	0,395±0,037 (9)			
МДА, нмоль/мл	14,64±1,20 (42)	22,62±3,33 (25)	17,24±1,30 (26)	<0,01		
ТФ, мкмоль/мл	1,79±0,17 (37)	1,67±0,12 (25)	1,78±0,10 (25)			
общие SH-группы, мкмоль/мл	2,37±0,16 (27)	2,33±0,21 (23)	2,77±0,26 (17)			
небелковые SH-группы, мкмоль/мл	0,285±0,030 (27)	0,180±0,015 (22)	0,213±0,020 (17)	<0,01		
липиды, г/л	0,840±0,055 (47)	0,648±0,052 (25)	0,626±0,030 (26)	<0,05	<0,05	
АОК	2,956±0,143 (51)	2,065±0,163 (17)	2,553±0,168 (14)	<0,002		<0,05
Кровь:						
ОПА, мкмоль/мл/г гемоглобина	2,09±0,12 (21)	1,44±0,13 (16)	1,50±0,25 (14)	<0,001	<0,05	

высокой плотности, которые, напротив, обладают антиоксидантными свойствами [6]. С учетом того, что последние переносят до 50 % основного липидрастворимого антиоксиданта — токоферола, антиоксидантная терапия ХГН становится более обоснованной [6].

В заключение можно констатировать, что в плазме крови и эритроцитах больных ХПН в стадии ХПН отмечается усиление липидной пероксидации, сочетающееся со снижением факторов антиоксидантной защиты. При этом наиболее выраженные сдвиги в системе ПОЛ обнаружены у больных с НС, тогда как степень азотемии самостоятельной роли не играет. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности подключения антиоксидантной терапии к традиционным схемам лечения ХГН, особенно при наличии НС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гаврилов В. Б., Мишкорудная М. И. // Лаб. дело.— 1983.— № 3.— С. 33—36.
2. Гаврилов В. Б., Гаврилова А. Р., Мажуль Л. М. // Вопр. мед. химии.— 1987.— № 1.— С. 118—122.
3. Гринштейн Ю. И., Андрианова Г. П. // Тер. арх.— 1988.— № 6.— С. 54—56.
4. Гринштейн Ю. И., Терещенко В. П., Терещенко Ю. А., Романова В. Я. // Там же.— 1990.— № 6.— С. 84—88.
5. Жмуров В. А., Крылов В. И., Иванов Е. Е. и др. // Урол. и нефрол.— 1983.— № 1.— С. 56—60.
6. Климов А. Н., Кожемякин Л. А., Плесков В. М., Андреева Л. М. // Бюл. exper. биол.— 1987.— № 5.— С. 550—552.
7. Колмакова Е. В. // Урол. и нефрол.— 1991.— № 1.— С. 16—19.
8. Попов Т., Нейковска Л. // Гиг. и сан.— 1971.— № 10.— С. 89—91.
9. Пыриг Л. А., Мельман Н. Я., Петрунь Н. М., Никулина Г. Г. // Тер. арх.— 1984.— № 7.— С. 28—31.
10. Романова Л. А., Стальная И. Д. // Современные методы в биохимии.— М., 1977.— С. 64—66.
11. Рудакова-Жилина Н. К., Матюхова Н. П. // Лаб. дело.— 1982.— № 1.— С. 19—22.
12. Рябов С. И., Бондаренко Б. Б. // Клин. мед.— 1975.— № 10.— С. 100—105.
13. Шишкин А. П., Шулуток Б. И., Будай О. П., Колмакова Е. В. // Там же.— 1990.— № 6.— С. 58—61.
14. Эггер В., Блейбер Р., Шмидт Г. и др. // Вопр. охр. мат.— 1981.— № 4.— С. 32—35.
15. Sedlak J., Lindsay R. H. // *Analyt. Biochem.*— 1968.— Vol. 25, N 1.— 3.— P. 192—205.
16. Taccone-Gallucci M., Giardini P., Lubrano R. et al. // *Clin. Nephrol.*— 1987.— Vol. 27, N 5.— P. 238—241.

Поступила 13.10.91

LIPID PEROXIDATION IN BLOOD OF PATIENTS WITH CHRONIC GLOMERULONEPHRITIS AT THE STAGE OF RENAL DYSFUNCTION IN THE PRESENCE OF THE NEPHROTIC SYNDROME.

F. A. Tugusheva, A. I. Kulikova, I. M. Zubina, I. P. Pavlov
1st Medical Institute St. Petersburg.

An increase in the rate of lipid peroxidation and exhaustion of protective antioxidative factors were detected in blood of patients with chronic glomerulonephritis in renal failure. The severity of renal failure did not affect noticeably the alteration of the patterns studied, while the most serious impairments were found in patients with the nephrotic syndrome. The value of antioxidation coefficient whose calculation is given in the paper may be used as an integral pattern evaluating impartially the ratio between pro- and antioxidation factors. The drugs with antioxidative properties should be involved in routine courses of glomerulonephritis treatment especially in the nephrotic syndrome.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 615.832.9.015.2:615.31:[547.95:547.943].015.4:616-018-008.939.15-39].076.9

С. П. Львова, Т. Ф. Горбунова, Е. М. Абаева

ВЛИЯНИЕ ГИПОТЕРМИИ И ДАЛАРГИНА НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В ТКАНЯХ КРЫС

Дагестанский университет, Махачкала

Известно, что процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) оказывают существенное влияние на химический состав биологических мембран, их ультраструктурную организацию, проницаемость, активность мембранных ферментов, рецепцию гормонов и прочие функциональные характеристики [2—4, 8].

Интенсивность ПОЛ чрезвычайно быстро меняется при действии различных факторов среды, из которых одним из наиболее изменчивых и универсальных является температура.

В данной работе исследовали интенсивность спонтанного ПОЛ в тканях белых крыс в динамике развития гипотермии. В ряде экспериментов изучали влияние на ПОЛ синтетического гексапептида даларгина (аналога лей-энкефалина), к числу биологических эффектов которого относится и антистрессорный эффект [7, 11, 14].

Методика. В работе использовали 3—5-месячных белых крыс массой 200—230 г. Исследовали состояние умеренной (30—28 °С) и глубокой (20 °С) гипотермии. Животных охлаждали в холодной (7—10 °С) воде до 30 °С за 15—20 мин, до 20 °С за 45—60 мин. По достижении нужной ректальной температуры часть животных деканитировали сразу же (кратковременная гипотермия), у части состояние гипотермии поддерживали 1 и 3 ч.

Об интенсивности ПОЛ судили по количеству малонового диальдегида (МДА) [4] в неинкубируемых пробах гомогенатов тканей и инкубируемых 30 мин в трис-НСI-буфере рН 7.4 при 37 °С.

Влияние даларгина на интенсивность ПОЛ исследовали при его внутрибрюшинном введении в концентрации 100 мкг/кг [11] за 30 мин до начала охлаждения животных (опыты *in vivo*) и при добавлении даларгина к среде инкубации в концентрации 12,5 мкг/100 мл буфера (опыты *in vitro*).

Результаты и обсуждение. Установлено (табл. 1), что охлаждение крыс (в течение 15 мин) до температуры тела 30 °С не приводит к повышению содержания МДА в неинкубируемых пробах тканей. В большинстве исследованных тканей содержание МДА не меняется, а в икроножной мышце понижается в 2 раза.

Между тем известно, что начальные этапы охлаждения эндотермного организма сопровождаются развитием как неспецифических стрессорных изменений, так и специфических терморегуляторных, которые действуют в одном направлении — в сторону активации надпочечников и симпатической нервной системы [6]. Это приводит к быстрому усилению выработки катехоламинов, продукты аутоокисления которых индуцируют свободнорадикальные процессы.

Отсутствие накопления МДА в неинкубируемых пробах (которые в значительной мере отражают динамику интенсивности ПОЛ *in vivo*) тканей охлажденных до 30 °С крыс, по-видимому, прежде всего связано с недостатком времени для проявления такого воздействия. Действительно, поскольку состояние умеренной (30 °С) гипотермии

Содержание МДА (в нмоль/г) в гомогенатах тканей крыс в норме и на разных этапах гипотермии ($n=6-7$)

Условия опыта	Исходный уровень МДА				
	мозг	печень	миокард	икроножная мышца	трапецевидная мышца
Контроль	26±1,9	21±1,2	28±1,6	28±1,6	27±1,2
Гипотермия 30 °С:					
кратковременная	29,3±2,0	26±1,4	24±2,0	14±0,8*	23±1,1
1 ч	35±3,5	25±2,5	44±3,4*	55±3,8*	41±3,7*
3 ч	74±3,9*	86±3,7*	70±3,9*	74±3,8*	67±3,2*
Гипотермия 20 °С:					
кратковременная	56±5,6*	55±4,6*	40±3,2	39±2,1*	46±0,4*
3 ч	32±2,2	35±3,2*	19±0,4*	29±0,8	19±0,8*

Продолжение

Условия опыта	Прирост МДА за 30 мин инкубации гомогенатов в трис-НСI-буфере при 37 °С				
	мозг	печень	миокард	икроножная мышца	трапецевидная мышца
Контроль	381±5,7	235±2,3	73±2,8	100±6,6	102±3,9
Гипотермия 30 °С:					
кратковременная	447±6,6*	344±7,2*	156±6,8*	131±7,8*	127±1,1*
1 ч	263±1,2*	154±18*	141±8,9*	132±10*	92±4,9
3 ч	437±3,8*	252±18	120±8,2*	133±7,2*	106±5,9
Гипотермия 20 °С:					
кратковременная	373±5,9	265±14	101±3,5*	135±4,3*	99±5,4
3 ч	241±7,2*	70±2,8*	89±3,7*	18±0,6*	29±1*

Примечание. Звездочка — достоверные ($p<0,05$) изменения по сравнению с контролем.

достигалось весьма быстро, в организме, видимо, не успели достаточно развиться процессы образования свободных радикалов кислорода и их повреждающий эффект на мембранные липиды с синтезом конечного продукта ПОЛ.

Вместе с тем инкубация в течение 30 мин гомогенатов тканей крыс, охлажденных до 30 °С; выявила достоверное усиление их способности к образованию МДА по сравнению с контролем. При этом максимальное усиление ПОЛ наблюдалось в миокарде (в 2,5 раза), минимальное — в мозгу (в 1,2 раза).

Таким образом, результаты экспериментов позволяют заключить, что умеренная гипотермия запускает процесс ПОЛ, результаты чего не выявляются в условиях *in vivo*, но хорошо прослеживаются в опытах *in vitro*.

При пролонгировании умеренной гипотермии в течение 1 ч интенсивность ПОЛ в мышечных тканях превышает контрольный уровень. Так, в миокарде и трапецевидной мышце количество МДА в неинкубируемых пробах возрастало в 1,5 раза, а в икроножной мышце — в 2 раза (табл. 2). В то же время в мозгу и печени интенсивность ПОЛ в этих условиях не увеличивается: в неинкубируемых пробах она не меняется, а в инкубируемых снижается по сравнению как с кратковременной гипотермией (очень заметно),

так и с контролем. Возможно, наблюдаемый эффект обусловлен активацией антиокислительной системы, в частности ростом концентрации токоферола (прежде всего в печени), что отмечено при действии ряда стрессоров [5] на этапе неспецифического адаптационного синдрома.

Тканевые особенности в динамике ПОЛ, выявленные при пролонгировании гипотермии 30 °С в течение 1 ч, видимо, связаны с различиями в функциональном состоянии антиокислительной системы, особенностями липидного состава мембран, уровнем окислительных процессов и др.

При длительном воздействии стрессора достаточно большой силы, перекрывающей адаптационные возможности организма, развивается стадия истощения защитных сил организма и развиваются патологические процессы.

В наших экспериментах такое состояние, судя по динамике накопления МДА, наступает при пролонгировании умеренной гипотермии в течение 3 ч. При этом наблюдается увеличение исходного уровня МДА во всех исследованных тканях в 1,5–4 раза. Одновременно усиливается (за исключением трапецевидной мышцы) способность инкубируемых проб тканей к индукции ПОЛ.

Усиление ПОЛ в этих условиях, видимо, является следствием снижения антиокислительной активности тканей, усиления генерации свобод-

Таблица 2

Влияние даларгина на содержание МДА (в нмоль/г) в гомогенатах тканей крыс при глубокой (20 °С) гипотермии ($n=6-7$)

Условия опыта	Исходный уровень МДА				Прирост МДА за 30 мин инкубации гомогенатов в трис-НСI-буфере при 37 °С			
	мозг	печень	миокард	икроножная мышца	мозг	печень	миокард	икроножная мышца
Гипотермия 20 °С	56±5,6	55±4,6	40±3,2	39±2,1	373±5,9	265±14	101±3,5	135±4,3
Гипотермия 20 °С+даларгин внутривенно	37±3,5*	35±3,1*	30±0,7*	36±7,2	436±14*	109±4,8*	113±4,8	130±7,2
Гипотермия 20 °С+даларгин в буфере	37±4,3*	28±1,1*	33±1,3	31±0,8*	357±7,6	134±2,4*	17±2,3*	65±5,1*

Примечание. Звездочка — достоверные ($p<0,05$) изменения по сравнению с гипотермией 20 °С без даларгина.

ных радикалов кислорода, накопления продуктов метаболизма катехоламинов и глюкокортикоидов, индуцирующих ПОЛ. Развитие этих процессов во времени, видимо, связано со стрессорным действием умеренной гипотермии.

Охлаждение крыс до 20 °С приводит к возникновению у них состояния «холодового наркоза», характеризующегося значительным понижением метаболизма, в том числе окислительных процессов, снижением выработки и рецепции гормонов, понижением координирующего действия нервной системы [13].

Исходный уровень МДА в тканях крыс, охлажденных до 20 °С, увеличивается. Наиболее это выражено в мозгу и печени (повышение в 1,1—2,6 раза), наименее — в икроножной мышце (на 40 %). Способность к ПОЛ в инкубируемых пробах при этом повышается только в миокарде и икроножной мышце и не меняется в других тканях.

Можно думать, что увеличение содержания МДА в неинкубируемых пробах тканей крыс, охлажденных до 20 °С (процесс охлаждения длился около 1 ч), в значительной мере является результатом усиления ПОЛ на начальных этапах охлаждения, запускающих механизм образования свободных радикалов.

При пролонгировании глубокой гипотермии в течение 3 ч интенсивность ПОЛ как в неинкубируемых, так и в инкубируемых пробах исследованных тканей понижается по сравнению с кратковременной гипотермией 20 °С.

При этом в большинстве тканей количество МДА устанавливается либо на уровне контроля, либо на более низком уровне.

Снижение интенсивности ПОЛ при пролонгировании глубокой гипотермии, возможно, отчасти происходит из-за «выгорания» легкоокисляемых фракций липидов на начальных этапах гипотермии и обогащения мембран фракциями, более устойчивыми к окислению. Следствием этого является уменьшение скорости зарождения радикалов в липидах и возвращения ПОЛ к норме.

Изучение влияния даларгина на интенсивность ПОЛ в тканях гипотермических животных показало (см. табл. 2), что как при внутрибрюшинном введении, так и при добавлении пептида в среду инкубации он оказывает ингибирующее действие.

При внутрибрюшинном введении даларгина с последующим охлаждением крыс до 20 °С наблюдалось достоверное понижение исходного уровня содержания МДА в мозгу, печени и миокарде соответственно на 34, 36 и 24 %. В скелетной мышце при этом уровень МДА не менялся, возможно, вследствие существенного понижения кровообращения и недостаточного поступления в мышцу даларгина. В инкубируемых пробах тканей гипотермических животных ингибирующий эффект даларгина на ПОЛ при его внутрибрюшинном введении проявлялся только в печени, причем весьма заметно — в 2,4 раза.

Биологические эффекты даларгина реализуются через его связывание с δ - и μ -опиоидными рецепторами, о чем свидетельствуют низкие дозы использования препарата и блокировка эффектов специфическим антагонистом опиоидов — налаксоном [1, 11, 14].

Среди биологических эффектов даларгина, важных для понимания его ингибирующего действия

на ПОЛ в условиях *in vivo*, следует отметить его антистрессорный эффект [7, 11]. Так, опиоидные пептиды и их синтетические аналоги угнетают секрецию и периферические эффекты катехоламинов. Кроме того, в структурах мозга они влияют на ГАМК-ергическую систему, что способствует ограничению стрессорной реакции на стадии тревоги и формированию резистентности к действию стрессора [11]. Интересно отметить, что у даларгина стресс-протекторные свойства более выражены, чем у других опиоидных пептидов и их аналогов [11]. Авторы связывают это с наличием в молекуле даларгина аргинина, который обладает антирадикальным и антиоксидантным свойством и подавляет ПОЛ [9].

Понижение интенсивности ПОЛ в тканях гипотермических крыс при внутрибрюшинном введении даларгина отчасти может быть связано и с его аитигипоксическим действием [14]. Возможный механизм протекторного действия опиоидных пептидов при гипоксии, видимо, связан с их способностью снижать кислородные потребности тканей [14] и с улучшением микрогемодикуляции [12]. Учитывая, что гипоксические явления, активирующие ПОЛ, достаточно выражены на начальных этапах охлаждения ненаркотизированных эндотермных организмов [13], понижение гипоксии с введением даларгина может способствовать подавлению процесса ПОЛ.

В условиях *in vivo* ингибирующий эффект даларгина в отношении ПОЛ в разных тканях проявляется в разной мере: он наиболее выражен в печени и не проявляется в скелетной мышце (см. табл. 2). Среди прочих причин это может быть связано с неодинаковым поступлением даларгина в ткани (в связи с разной скоростью кровотока, прохождением через гематоэнцефалический барьер и др.).

Для суждения о том, может ли даларгин оказывать прямое влияние на процесс ПОЛ или его действие опосредовано через гормональную, нервную, кровеносную системы, мы исследовали его влияние на скорость ПОЛ в опытах *in vitro*.

Показано (см. табл. 2), что при добавлении даларгина непосредственно к трис-НСI-буферу (в котором происходят гомогенизация и последующая инкубация тканей) интенсивность синтеза в них МДА существенно понижается. Уже на стадии гомогенизации тканей, несмотря на кратковременность этого процесса (5—6 мин), наблюдается подавление синтеза МДА. В значительно большей мере это ингибирование выявляется при 30-минутном инкубировании гомогената тканей в буфере с даларгином. При этом интенсивность синтеза МДА в гомогенатах печени и скелетных мышцах понижается (по сравнению с гипотермией без добавления даларгина) примерно в 2 раза, в миокарде — в 6 раз, и только в мозгу небольшая тенденция к снижению ПОЛ является статистически недостоверной.

Следовательно, даларгин может оказывать не только опосредованный через гормональную, нервную системы и регуляцию циркуляции крови через орган ингибирующее действие на ПОЛ, но и прямое воздействие на этот процесс.

По-видимому, взаимодействуя с биологическими мембранами, даларгин изменяет их физико-химические свойства, придавая им большую устой-

чивость к ПОЛ, и предохраняет их от действия фосфолипаз А₂. Ингибирующий эффект даларгина в отношении ПОЛ, видимо, в существенной мере связан с наличием в его составе аргинина и тирозина, обладающих антиоксидантными свойствами [9—11].

ЛИТЕРАТУРА

1. Александрович А. Г., Жданова Т. Ф., Тимошин С. С., Учакина Р. В. // Бюл. exper. биол.—1989.— № 7.— С. 209—211.
2. Аристархова С. А., Архипова Г. В., Бурлакова Е. Б. и др. // Докл. АН СССР.—1976.— Т. 288, № 4.— С. 215—218.
3. Барбой В. А. // Физиол. журн.—1989.— Т. 35, № 5.— С. 85—87.
4. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.— М., 1972.
5. Голиков П. П., Давыдов Б. В., Матвеев С. Б. // Вопр. мед. химии.—1987.— № 7.— С. 47—50.
6. Гурин В. Н. // Успехи физиол. наук.—1989.— Т. 20, № 2.— С. 3—25.
7. Золов Г. К., Слепушкин В. Д., Аргинтаев Е. С. и др. // Бюл. exper. биол.—1989.— № 10.— С. 468—470.
8. Иванов В. В., Стенникова М. П., Перебоева Л. А. // Укр. биохим. журн.—1987.— Т. 59, № 2.— С. 69—72.
9. Милюткина Н. П., Ананян А. А., Шугалей В. С. // Бюл. exper. биол.—1990.— № 9.— С. 263—265.
10. Никушкин Е. В. // Нейрохимия.—1989.— № 1.— С. 124—145.
11. Хайсман Е. Б., Арефолов В. А., Маликова А. А. // Бюл. exper. биол.—1988.— № 3.— С. 302—305.
12. Хучаева В. К. // Там же.— С. 300—302.
13. Эмирбеков Э. З., Львова С. П. Механизмы биохимических изменений при низких температурах тела.— Ростов н/Д, 1985.
14. Яснецов В. В. // Бюл. exper. биол.—1988.— № 8.— С. 174—177.

Поступила 10.10.91

INFLUENCE OF HYPOTHERMIA AND DALARGIN ON LIPID PEROXIDATION IN RAT TISSUES.

S. P. Lvova, T. F. Gorbunova, E. M. Abaeva

Dagestan University, Makhachkala.

The rate of lipid peroxidation was studied in rat brain, liver, skeletal muscles and myocardial tissues in dynamics of hypothermia. Cooling of the animals down to 30° induced lipid peroxidation, which was markedly expressed within 3-hour continuation of the treatment. Profound hypothermia (20°) increased levels of malonic dialdehyde in the tissues studied by 30-160%, while prolongation of the impairment up to 3 hrs resulted in normalization of the lipid peroxidation parameters studied. The artificial hexapeptide dalargin, similar to leu-enkephalin, inhibited the rate of lipid peroxidation in profound hypothermia both *in vivo* and *in vitro*.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 617-001.17-092.9-07:616.155.34-02:615.272.6:547.963.11-07

В. В. Саломатин, А. Г. Лютов, С. А. Еникеева, Л. Ф. Чарная, А. В. Зурочка, И. И. Долгушин

ВЛИЯНИЕ α_1 -КИСЛОГО ГЛИКОПРОТЕИНА НА ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ НЕЙТРОФИЛОВ И ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ

Челябинский медицинский институт, НПО «Иммунопрепарат», Уфа

α_1 -Кислый гликопротеин (КГ) является одним из основных белков острой фазы, его синтез в печени многократно возрастает при остром воспа-

лении, опухолях и термических травмах [6, 8, 10]. Введение белка в 1-е сутки после ожоговой травмы приводит к уменьшению летальности животных и сокращению сроков заживления ожоговых ран [4]. Это действие белка может быть связано с его способностью подавлять индуцированную агрегацию тромбоцитов [5] и улучшать деформируемость эритроцитов [9], что может ограничивать развитие в ожоговой ране явлений микротромбоза и вторичного некроза.

Однако биохимические механизмы терапевтического действия КГ остаются неясными. В опытах *in vitro* было продемонстрировано, что КГ подавляет генерацию супероксидных анионов активированными нейтрофилами [7]. Это свойство белка может быть важным в реализации его терапевтического действия, так как оно может ограничить усиление перекисного окисления липидов (ПОЛ), которому в патогенезе ожоговой болезни отводится важная роль. Проверке этого предположения и посвящено настоящее исследование.

Методика. Опыты проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 190—230 г и мышьях-самцах линии СВА массой 19—22 г. Ожог IIIB степени (12—13% поверхности тела) наносили на эпилированную поверхность спинки животных под эфирным наркозом облучением на установке для дозированного ожога с кварцево-галогенными лампами.

Использовали иммунохимически чистый КГ, который выделяли из балластного осадка α - и β -глобулинов, получаемого в процессе производства альбумина из плазмы донорской крови. Стадии отделения и очистки белка включали гель-фильтрацию на сефадексе G-25, сорбцию на ДЭАЭ-целлюлозе и хроматографию на КМ-целлюлозе, как описано ранее [3]. Чистоту препарата проверяли иммуноэлектрофорезом в 1% агаре с применением моноспецифической сыворотки, КГ вводили крысам внутривенно в дозе 75 мг/кг, мышам — внутрибрюшинно в дозе 125 мг/кг дважды, сразу и через 14 ч после ожога. Контрольным животным в те же сроки и в том же объеме (0,5 мл) вводили физиологический раствор.

Спонтанную и индуцированную хемилюминесценцию мышинных нейтрофилов определяли ранее описанным методом [2]. Нейтрофилы получали посредством промывания брюшной полости раствором Нерес («Sigma», США) через 6 ч после введения 3,0 мл 1,2% раствора казеина и спустя 24 ч после ожога. Индуцированную хемилюминесценцию нейтрофилов вызывали добавлением к их взвеси (10^6 клеток в 2 мл раствора Нерес с 50 мкг люминола) латекса с диаметром частиц 1,7 мкм. Уровень хемилюминесценции подсчитывали на сцинтилляционном счетчике «Бета-1».

Интенсивность ПОЛ оценивали по относительному приросту в липидных экстрактах плазмы, печени и кожи у крыс диеновых когюгатов гидроперекисей (первичные продукты ПОЛ) и кетодиснов с сопряженными триенами (вторичные продукты ПОЛ). Экстракцию липидов проводили смесью гептан — изопропанол и в результате измерения оптической плотности гептановой и изопропанольной фаз рассчитывали относительное содержание первичных ($E_{232/220}$) и вторичных ($E_{278/220}$) продуктов ПОЛ [1].

Результаты и обсуждение. Опыты на крысах показали, что введение им КГ вызывает ограничение усиленного образования продуктов ПОЛ, вызываемого ожоговой травмой. При этом в большей степени это наблюдение проявилось при исследовании гептановой фазы липидных экстрактов. Так, из результатов, представленных в табл. 1, видно, что содержание первичных продуктов ПОЛ в плазме через 18 ч после ожога увеличено в 5,5 раза, тогда как при введении КГ этот показатель не претерпевает достоверных изменений в сравнении с интактными

Влияние КГ на содержание продуктов ПОЛ в гептановой фазе липидных экстрактов плазмы, печени и кожи у крыс при термической травме

Группа животных	Время после ожога	Число опытов	E _{232/220}			E _{278/220}		
			плазма	кожа	печень	плазма	кожа	печень
Интактная		8	0,61±0,03	0,59±0,03	0,56±0,02	0,28±0,02	0,29±0,03	0,23±0,01
Контрольная (ожог без введения КГ)	18 ч	6	3,44±0,58*	0,72±0,04*	0,52±0,02	0,83±0,12*	0,36±0,08	0,28±0,03
	3 сут	6	0,56±0,05	0,77±0,03*	0,56±0,04	0,26±0,04	0,15±0,01	0,20±0,03
	7 сут	6	0,67±0,08	0,98±0,02*	0,70±0,03	0,21±0,05	0,16±0,01	0,28±0,03
Опытная (ожог с введением КГ)	21 сут	6	0,42±0,08	0,81±0,03*	0,61±0,05	0,72±0,09*	0,13±0,03	0,37±0,04*
	18 ч	6	0,53±0,09*	0,74±0,03	0,46±0,03	0,93±0,26	0,15±0,04*	0,31±0,05
	3 сут	6	0,63±0,03	0,88±0,05	0,70±0,04	0,27±0,04	0,15±0,02	0,15±0,01
	7 сут	6	0,84±0,07	0,96±0,03	0,77±0,03	0,21±0,06	0,16±0,01	0,19±0,02*
	21 сут	6	0,50±0,06	0,83±0,05	0,38±0,04*	0,37±0,05*	0,10±0,02	0,23±0,04*

Примечание. Звездочкой отмечены результаты, достоверно отличающиеся ($p \leq 0,05$) в контрольной группе от интактной, а в опытной группе от контрольной.

животными. Аналогичные изменения в отношении вторичных продуктов ПОЛ наблюдаются в коже через 18 ч после ожога и в печени на 7-е и 21-е сутки наблюдения.

Результаты опытов, представленные в табл. 2, показывают, что введение КГ мышам вызывает резкое угнетение индуцированной хемилюминесценции нейтрофилов как у интактных животных, так и у подвергнутых термической травме.

Следует отметить, что испытанные в этих экспериментах дозы КГ не превышают уровень его эндогенного синтеза при остром воспалении как у мышей, так и у крыс. Так, подкожное введение скипидара крысам вызывает 15-кратное увеличение синтеза белка в печени, достигающее 22 мг на 100 г массы [10]. Поэтому можно полагать, что выявленные нами свойства КГ в условиях его применения при ожоговой травме являются отражением его естественной физиологической активности. Само проявление этой активности обусловлено, по-видимому, восполнением дефицита белка в организме в условиях массивного остро развивающегося воспалительного процесса. Известно, что увеличение концентрации КГ в сыворотке крови в ответ на ожоговую травму происходит лишь начиная со 2-х суток у крыс [11] и 3—4-х суток у человека [8].

Полученные результаты дают возможность высказать предположение о том, что регуляторная активность КГ по отношению к нейтрофилам является, возможно, его главной функцией в процессе острого воспаления. Известно, что нейтрофилы на ранних стадиях воспалительного процесса составляют основную массу клеточных элементов. Резкое усиление их окислительной активности, связанное с разрушением ткани, подвергшейся в результате ожога коагуляционному некрозу, сопровождается секрецией во внеклеточное пространство супероксидных анионов. Процесс этот сопровождается хемилюминесценцией нейтрофилов и ведет к наращению деструктивных реакций в очаге воспаления ввиду окисления различных субстратов, в том числе и липидов, продукты пероксидации которых в повышенных количествах обнаруживаются в плазме и тканях.

Такое развитие событий становится возможным не только ввиду функциональной недостаточности антиокислительных систем, но и по причине дефицита КГ как естественного ограничителя избыточной активации нейтрофилов. Подтверждением этому является выявленная нами способность КГ подавлять индуцированную хемилюминесценцию нейтрофилов в условиях применения белка *in vivo* и уменьшать образование при ожогах продуктов ПОЛ.

Такое развитие событий становится возможным не только ввиду функциональной недостаточности антиокислительных систем, но и по причине дефицита КГ как естественного ограничителя избыточной активации нейтрофилов. Подтверждением этому является выявленная нами способность КГ подавлять индуцированную хемилюминесценцию нейтрофилов в условиях применения белка *in vivo* и уменьшать образование при ожогах продуктов ПОЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Волчегорский И. А., Налимов А. Г., Яровинский Б. Г., Лифшиц Р. И. // *Вопр. мед. химии.*— 1989.— № 1.— С. 127—131.
2. Зурочка А. В., Долгушин И. И., Власов А. В., Рябинин В. Е. // *Лаб. дело.*— 1989.— № 3.— С. 32—36.
3. Люттов А. Г., Алешкин В. А., Еникеева С. А. и др. // *Гематол. и трансфузиол.*— 1987.— № 5.— С. 58—61.
4. Саломатин В. В., Соболевская Т. М., Курилова Т. В., Лифшиц Р. И. // *Пат. физиол.*— 1989.— № 6.— С. 37—40.
5. Andersen P., Eika S. // *Scand. J. Haemat.*— 1980.— Vol. 24.— P. 365—370.
6. Chu C.-T., Lai T.Y.-Y., Pokala H. P. // *J. nat. Cancer Inst.*— 1982.— Vol. 68.— P. 75—79.
7. Costello M. J., Gewurs H., Siegel J. N. // *Clin. exp. Immunol.*— 1984.— Vol. 55.— P. 465—472.
8. Faymonville M. E., Micheels J., Bodson D. et al. // *Burns.*— 1987.— Vol. 102.— P. 26—33.
9. Pat. 4362718 USA. Agent for curing peripheral circulation insufficiency / Maeda H., Nishi K. // *Biol. Abstr.*— 1982.— Vol. 70.— N 76207.
10. Schreiber G. // *Plasma Proteins: Structure, Function and Genetic Control* / Ed. F. W. Putnam.— London, 1987.— P. 294—363.
11. Sevaljevic L., Petrovic-Matic S., Bogoevic D. et al. // *Circulat. Shock.*— 1989.— Vol. 28.— P. 293—307.

Поступила 19.09.91

Таблица 2

Влияние КГ на уровень спонтанной и индуцированной хемилюминесценции нейтрофилов мышей в норме и при термических ожогах

Группа животных	Спонтанная хемилюминесценция, имп/мин	Индекс индуцированной хемилюминесценции по отношению к спонтанной
Норма	1397±166	624±57,9
Норма с введением КГ	1230±73	91±22,1
Ожог	997±25	600±110,0
Ожог с введением КГ	1080±29	47±14,2

Примечание. Число животных в каждой группе равно 10.

EFFECT OF ACID α_1 -GLYCOPROTEIN ON CHEMOLUMINESCENCE OF NEUTROPHILS AND LIPID PEROXIDATION IN EXPERIMENTAL THERMAL INJURY

V. V. Salomatin, A. G. Lyutov, S. A. Enikeeva, L. F. Charnaya, A. V. Zurochka, I. I. Dolgushin

Medical Institute, Chelyabinsk, Immunopreparat Research Production Association, Ufa.

Induced chemoluminescence of neutrophils was distinctly inhibited both in intact mice and the animals with thermal injury after administration of acid α_1 -glycoprotein. At the same time, the glycoprotein decreased the rate of thermal burn-induced activation of lipid peroxidation in rat blood, skin and liver tissue. Antioxidative and therapeutic effects of acid α_1 -glycoprotein in burns appear to be related to regulation of neutrophil activity.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616-005.1-037.111-085-036.8-07

В. В. Русаков, В. Т. Долгих, О. В. Корпачева

МЕМБРАНОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ КАРНОЗИНА В ПОСТРЕАНИМАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ ПОСЛЕ ОСТРОЙ СМЕРТЕЛЬНОЙ КРОВОПОТЕРИ

Омский медицинский институт

В раннем восстановительном периоде после острой смертельной кровопотери наблюдается выраженная гиперферментемия [4, 6], которая свидетельствует о генерализованной мембранодеструкции [8]. Существует несколько причинных факторов, вызывающих повреждение мембран и соответственно нарушение их барьерной функции: гипоксия, приводящая к снижению уровня макроэргов, накоплению Ca^{2+} в клетках и активации мембранных фосфолипаз; свободные радикалы, образующиеся вследствие чрезмерной активации процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ); механическое (осмотическое) растяжение мембран и адсорбция на липидном слое чужеродных белков (полиэлектролитов) [2].

В данной работе предпринята попытка предотвратить или уменьшить разрушение мембранных фосфолипидов с помощью дипептида карнозина (β -аланил-L-гистидина), являющегося природным антиоксидантом.

Методика. Исследования проведены на 96 беспородных крысах-самцах, наркотизированных нембуталом (25 мг/кг). Острым кровопусканием из сонной артерии вызывали 4- и 6-минутную клиническую смерть. Оживление осуществляли центрипетальным нагнетанием вынушенной крови и

искусственной вентиляцией легких. Карнозин (предоставлен Е. С. Севериным и А. А. Болдыревым) в дозе 25 мг/кг вводили внутриаартериально одновременно с возмещением кровопотери. Ткань миокарда для биохимических исследований забирали через 1,5 ч (период наиболее выраженных функционально-метаболических нарушений в миокарде) металлическими щипцами, охлажденными в жидком азоте. В те же сроки исследовали сыворотку крови. В миокарде методами [3] определяли содержание АТФ, АДФ, АМФ с использованием наборов «Test-Combination» («Boehringer Mannheim»), креатинфосфата, лактата, пирувата, гликогена, неорганического фосфата. В липидном экстракте определяли содержание продуктов ПОЛ — дисновых конъюгатов [9] и малонового диальдегида [10]. В постмитохондриальной фракции миокарда определяли активность супероксиддисмутазы (СОД) и белок по Лоури. В сыворотке крови исследовали содержание лактата и активность аспартатамино-трансферазы (АСТ) и малатдегидрогеназы (МДГ) методами [3]. Результаты обработаны с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Через 1,5 ч после оживления в сыворотке крови отмечали увеличение активности МДГ и АСТ, более выраженное при клинической смерти до 6 мин, когда ферментативная активность достигала соответственно 449 и 138 % по сравнению с контролем (табл. 1), свидетельствуя о мембранодеструкции [8]. Введение карнозина интактным животным само по себе не оказывало влияния на активность ферментов, но достоверно снижало уровень гиперферментемии после 6-минутной клинической смерти, что свидетельствует об уменьшении повреждений биомембран. Чтобы раскрыть механизм мембранопротекторного эффекта дипептида, нами изучено влияние этого препарата на энергетический обмен и процессы ПОЛ в миокарде в постреанимационном периоде.

Как видно из табл. 2, к 1,5 ч постреанимационного периода вследствие перенесенной клинической смерти и реперфузионных повреждений отмечали снижение содержания в сердечной мышце макроэргов (АТФ и креатинфосфата) и увеличение содержания АДФ, АМФ и неорганического фосфора, приводившее к уменьшению на 31,3—43,2 % энергетического потенциала. После клинической смерти до 6 мин отмечено нарушение биоэнергетики миокарда после оживления: содержание АТФ составляло 48,8 %, а креатинфосфата — 31,0 % от контрольных величин. При этом значительно возросло количество неорганического фосфора (164,3 % от контрольных значений) и увеличился в 10 раз потенциал фосфорилирования. Усиленно расходовался резервный источник энергии гликоген. Его содержание в миокарде оказалось сниженным после 4- и 6-минутной смерти соответственно на 32,4 и 42,6 %. Как известно, гликогенолиз ускоряется

Таблица 1

Влияние карнозина на содержание лактата и активность ферментов сыворотки крови в раннем постреанимационном периоде

Серия опытов	МДГ		Лактат, ммоль/л
	АСТ		
	мкмоль/(л·мин)		
Контроль	76±12,7	144±3,6	0,85±0,033
Контроль + карнозин	88±6,5	144±5,6	0,87±0,081
Реанимация (4 мин)	300±16,1 ⁺	156±5,8	1,28±0,087 ⁺
Реанимация (4 мин) + карнозин	291±7,3 ⁺	156±1,9 ⁺	1,11±0,153
Реанимация (6 мин)	344±17,2 ⁺	199±1,6 ^{++*}	2,14±0,160 ^{++*}
Реанимация (6 мин) + карнозин	288±11,0 ⁺	151±3,4 [*]	1,44±0,119 ^{++*}

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3 плюсами отмечены достоверные различия с контролем, звездочками — между группами животных с 4- и 6-минутной клинической смертью, точками — между оживленными и лечеными карнозином.

Влияние карнозина на энергетический обмен в сердце оживленных крыс

Показатель	Серия опытов					
	Контроль	контроль+ +карнозин	реанимация (4 мин)	реанимация (4 мин)+ +карнозин	реанимация (6 мин)	реанимация (6 мин)+ +карнозин
Креатинфосфат, ммоль/кг	6,70±0,41	6,36±0,19	2,79±0,18 ⁺	4,01±0,12 ⁺	2,08±0,14 ^{+,*}	2,33±0,18 ⁺
АТФ, ммоль/кг	2,19±0,102	2,03±0,161	1,74±0,166 ⁺	1,81±0,140 ⁺	1,07±0,172 ^{+,*}	1,35±0,279 ⁺
АДФ, ммоль/кг	0,48±0,026	0,54±0,086	1,19±0,143 ⁺	1,33±0,086 ⁺	1,39±0,109 ⁺	1,50±0,107 ⁺
АМФ, ммоль/кг	0,15±0,009	0,17±0,020	1,00±0,132 ⁺	0,80±0,053 ⁺	1,14±0,113 ⁺	0,91±0,081 ⁺
Энергетический потенциал, усл. ед.	0,86±0,025	0,84±0,051	0,59±0,046 ⁺	0,63±0,044 ⁺	0,49±0,042 ⁺	0,56±0,038 ⁺
Неорганический фосфор, ммоль/кг	7,31±0,52	7,79±0,81	9,05±0,67 ⁺	9,18±0,78	12,01±0,38 ^{+,*}	11,71±0,62 ⁺
Потенциал фосфорилирования усл. ед.	1,60±0,132	2,09±0,433	6,21±0,577 ⁺	6,72±0,479 ⁺	15,57±0,241 ^{+,*}	12,96±0,238 ^{+,*}
Ликоген, ммоль/кг	37,1±2,75	38,5±3,49	25,1±2,14 ⁺	34,4±0,87	21,3±1,12 ⁺	34,3±1,62
Лактат, ммоль/кг	2,26±0,14	2,20±0,20	6,11±0,15 ⁺	3,67±0,26 ^{+,*}	7,91±0,39 ^{+,*}	2,92±0,17 ^{+,*}
Пируват, ммоль/кг	0,78±0,09	0,85±0,08	1,54±0,18 ⁺	1,12±0,10 ^{+,*}	2,08±0,22 ⁺	1,21±0,15 ^{+,*}

вследствие распада АТФ и креатинфосфата, так как такие продукты их катаболизма, как АМФ и неорганический фосфат, прямо стимулируют активность фосфорилазы-*b*. Продукты деградации макроэргов активируют и гликолитический фермент фосфофруктокиназу. Отражением этого явилось увеличение в 2 раза содержания пирувата в миокарде оживленных крыс и в 2,7 раза — лактата, превращение в который пирувата способствует получению НАД из НАДН·Н, накапливающихся в ходе анаэробного гликолиза. В сыворотке крови также отмечали рост концентрации лактата (см. табл. 1), причем все эти изменения достоверно увеличивались после 6-минутной клинической смерти, что отражает очень высокую интенсивность гликолиза и значительное снижение активности локализованных в мембранах ферментов цикла Кребса [11].

Введение карнозина не оказывало значительного влияния на образование макроэргических фосфорных соединений. Из табл. 2 видно, что лишь содержание креатинфосфата после 4-минутной клинической смерти было достоверно выше, чем у нелеченых животных. В остальных случаях отмечали лишь тенденцию к нормализации содержания макроэргов и продуктов их катаболизма. Вместе с тем у крыс, получавших при возмещении кровопотери карнозин, существенно снижалось содержание лактата и пирувата в миокарде и сыворотке крови, что отражало, по видимому, более эффективную работу ферментов цикла Кребса.

К 1,5 ч постреанимационного периода в миокарде отмечали снижение на 22—27% активности СОД — фермента, осуществляющего ан-

тирадикальную защиту клетки, и увеличение продуктов ПОЛ — диеновых конъюгатов и малонового диальдегида (табл. 3). Увеличение интенсивности процессов ПОЛ в данном случае, как и снижение содержания макроэргических фосфатов, могло вносить существенный вклад в усиление мембранодеструкции и нарушение функций мембранолокализованных липидзависимых ферментов. Введение карнозина, обладающего выраженным антиоксидантным свойством [13], сохраняло активность СОД на контрольных цифрах и уменьшало накопление токсических продуктов ПОЛ, что свидетельствовало об угнетении перекисления мембранных фосфолипидов. Антиокислительную активность карнозина связывают либо с его непосредственным взаимодействием с продуктами ПОЛ [12], либо с реакциями с супероксидными и гидроксильными радикалами [7], либо со способностью связывать ионы двухвалентного железа, катализирующие процессы ПОЛ на стадии инициации и ветвления цепей [5].

В ряде случаев мы наблюдали более значительный лечебный эффект дипептида при увеличении продолжительности клинической смерти до 6 мин, т. е. при более выраженном повреждении биомембран, что согласуется с данными литературы [1].

Таким образом, карнозин оказывает выраженное мембранопротективное действие, что проявляется в уменьшении гиперферментемии в раннем постреанимационном периоде. Данный эффект опосредуется ограничением интенсивности процессов ПОЛ с угнетением образования либо нейтрализацией токсических продуктов этого процесса, которые вызывают деструкцию билипид-

Таблица 3

Влияние карнозина на процессы ПОЛ в сердечной мышце крыс

Серия опытов	СОД, ед/(мин·мг)	ДК, ммоль/кг	МДА, ммоль/кг
Контроль	4,6±0,22	11,4±2,47	5,0±0,86
Контроль + карнозин	5,2±0,54	15,8±2,15	6,4±0,45
Реанимация (4 мин)	3,6±0,16 ⁺	78,4±10,30 ⁺	12,7±1,72 ⁺
Реанимация (4 мин) + карнозин	4,9±0,33 ⁺	42,7±4,20 ^{+,*}	6,5±1,32 ⁺
Реанимация (6 мин)	3,4±0,16 ⁺	81,4±13,23 ⁺	14,2±0,53 ⁺
Реанимация (6 мин) + карнозин	4,7±0,31 ⁺	26,5±5,09 ^{+,*}	6,9±1,32 ⁺

Примечание. ДК — диеновые конъюгаты.

ного слоя мембран и снижают активность мембранолокализированных липидзависимых ферментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Болдырев А. А. // Биохимия.— 1986.— Т. 51, № 12.— С. 1930—1943.
2. Владимиров Ю. А. // Пат. физиол.— 1989.— № 4.— С. 7—19.
3. Долгих В. Т. // Там же.— 1984.— № 1.— С. 45—50.
4. Долгих В. Т., Кочетов А. М., Еремеев С. И., Мальков П. Г. // Анест. и реаниматол.— 1988.— № 1.— С. 24—29.
5. Ли Хо Ик, Владимиров Ю. А., Деев А. И. // Биофизика.— 1990.— Т. 35, № 1.— С. 82—85.
6. Миннебаев М. М., Бахтиозин В. Ф., Мусин М. С., Попова Л. Г. // Анест. и реаниматол.— 1985.— № 4.— С. 42—45.
7. Павлов А. Р., Ревина А. А., Дупин А. М. и др. // Бюл. экспер. биол.— 1990.— № 10.— С. 391—393.
8. Сонина С. И., Друкина М. А. // Пат. физиол.— 1973.— № 4.— С. 17—21.
9. Стальная И. Д. // Современные методы в биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича.— М., 1977.— С. 63—64.
10. Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г. // Там же.— С. 66—68.
11. Achs M. J., Garjinkel D., Opie L. H. // Amer. J. Physiol.— 1982.— Vol. 243.— P. 389—399.
12. Boldyrev A. A., Dupin A. M., Bunin A. Ya. et al. // Biochem. int.— 1987.— Vol. 15, N 6.— P. 1105—1113.
13. Hartman Ph. E., Hartman Z., Ault K. T. // Photochem. a. Photobiol.— 1990.— Vol. 51, N 1.— P. 59—66.

Поступила 28.07.91

MEMBRANE PROTECTIVE EFFECT OF CARNOSINE DURING THE POSTRESUSCITATION PERIOD FOLLOWING ACUTE FATAL BLOOD LOSS

V. V. Rusakov, V. T. Dolgikh, O. V. Korpacheva

Medical Institute, Omsk

Activation of serum enzymes in male rats was detected during the postresuscitation period after 4-6-min clinical death as a result of membrane destruction. Increase in the rate of lipid peroxidation and impairments of energy metabolism in the myocardium were responsible for destruction of cardiomyocyte biomembranes. Administration of carnosine (25 mg/kg body weight) simultaneously with compensation for blood loss obviated the membrane bilipid layer destruction and contributed to the development of the optimal conditions for membrane-bound enzymes.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.155.194.74-092-07

С. Э. Бармина, В. В. Новицкий, Е. Д. Гольдберг

РОЛЬ ПРОЦЕССОВ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ В ПАТОГЕНЕЗЕ ПАРАНЕОПЛАСТИЧЕСКОЙ АНЕМИИ

Институт фармакологии Томского научного центра РАМН

К числу наиболее частых паранеопластических синдромов относится анемия, в той или иной степени выраженности сопровождающая развитие многих опухолей у человека и экспериментальных животных [4, 7, 9]. Патогенез раковой анемии, несмотря на значительное число работ, посвященных этой проблеме, нельзя считать окончательно установленным. Исходя из свободнорадикальной теории о взаимоотношениях опухоли и организма-хозяина [2, 3, 7, 8], мы полагаем, что важное значение в понимании механизмов нарушения эритропоэза и повышенной гибели зрелых клеток красной крови при опухо-

левом росте [5] могут иметь результаты изучения процессов липопероксидации в эритроцитах периферической крови. Целью настоящего исследования явилось изучение состояния процессов липопероксидации в эритроцитах периферической крови у крыс в процессе развития лимфосаркомы Плисса.

Методика. Эксперименты выполнены на 62 белых неинbredных крысах-самках массой 150—200 г, 50 из которых перевивали лимфосаркому Плисса. Перевивку производили стерильно-гомогенной 25 % взвесью клеток опухоли в среде 199, вводимой в область бедра в количестве 0,2 мл. О состоянии процессов липопероксидации в эритроцитах периферической крови судили по содержанию вторичных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) — шиффовых оснований и концентрации SH-групп на 6, 12, 14, 17, 19, 20, 24 и 26-й дни после перевивки опухоли.

Содержание шиффовых оснований определяли по методу Плацера в модификации В. Б. Гаврилова и М. И. Мишколудной [1] в гомогенате эритроцитов по специфической флуоресценции гептановых растворов липидов на флуоресцентном спектрофотометре ($\lambda_{\text{возб.}}=360$ нм, $\lambda_{\text{эмис.}}=415$ нм) и выражали в относительных единицах флуоресценции на 1 мг общих липидов (ОЕ/мг). SH-группы крови определяли феррицианидным методом [6]. Оптическую плотность измеряли на микроскопе «Люмам-42» с фотометрической насадкой ФМЭЛ-1 при длине волны монохроматического света 590 нм. На основании полученных данных рассчитывали концентрацию изучаемого субстрата на единицу клеточной поверхности, строили эритрограммы и определяли средние значения показателей на каждую контрольную точку эксперимента. В эти же сроки контролировали концентрацию гемоглобина, количество эритроцитов и содержание ретикулоцитов в периферической крови. Достоверность различий сравниваемых показателей устанавливали с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Анализ изученных количественных показателей красной крови позволил выявить снижение концентрации гемоглобина уже к 12-му дню после перевивки опухоли до $125,6 \pm 4,3$ г/л (фон $142,0 \pm 0,4$ г/л; $p < 0,01$). В последующие сроки наблюдения уровень гемоглобина еще более снижался, достигая минимальных значений ($73,6—64$ г/л) к 24—26-му дню эксперимента. Количество эритроцитов оказалось резко сниженным к 19-му дню развития опухоли — до $3,9 \pm 0,1$ Т/л (фон — $6,3 \pm 0,6$ Т/л; $p < 0,001$) и оставалось на близком к этому уровне вплоть до окончания периода наблюдения. Анемия носила выраженный регенераторный характер, о чем свидетельствовало неуклонно возрастающее с 19-го дня развития опухоли содержание ретикулоцитов. К последнему (26-му) дню эксперимента количество их было максимальным ($184,4 \pm 12,4^0/_{00}$) и более чем в 3 раза превышало исходные значения. Появлению лабораторно регистрируемых признаков анемии и периоду пальпаторного обнаружения опухолевого узла (7—8-й день эксперимента) предшествовало статистически значимое снижение концентрации шиффовых оснований в гомогенате эритроцитов, определявшееся уже на 6-й день после трансплантации опухолевых клеток, до $0,128 \pm 0,002$ Е/мг (фон $0,218 \pm 0,02$ Е/мг; $p < 0,001$). Начиная с 12-го дня развития опухоли содержание вторичных продуктов ПОЛ неуклонно возрастало и достигало максимума к 19-му дню — $0,805 \pm 0,05$ Е/мг — 367,6 % от фонового уровня ($p < 0,001$). В последующие сроки эксперимента концентрация шиффовых оснований постепенно снижалась, оставаясь тем не менее достовер-

Содержание шиффовых оснований и концентрация сульфгидрильных групп в эритроцитах периферической крови у крыс в процессе развития лимфосаркомы Плисса ($X \pm m$)

День после перевивки опухоли	Шиффовы основания, ОЕ/мг	Сульфгидрильные группы, усл. ед.		p
		опыт	контроль	
Фон	0,218 ± 0,004	—	—	—
6-й	0,128 ± 0,002 <i>p</i> < 0,001	0,2276 ± 0,0015	0,2430 ± 0,0017	< 0,01
12-й	0,288 ± 0,02 <i>p</i> < 0,01	0,2071 ± 0,0012	0,2149 ± 0,0016	< 0,01
17-й	0,335 ± 0,03 <i>p</i> < 0,01	0,1521 ± 0,0013	0,1931 ± 0,0017	< 0,001
19-й	0,805 ± 0,05 <i>p</i> < 0,001	0,1695 ± 0,0010	0,1967 ± 0,0011	< 0,001
22-й	0,520 ± 0,008 <i>p</i> < 0,001	0,2441 ± 0,0015	0,2765 ± 0,0014	< 0,001
24-й	0,484 ± 0,05 <i>p</i> < 0,001	0,1638 ± 0,0010	0,2049 ± 0,0016	< 0,001
26-й	0,261 ± 0,02 <i>p</i> < 0,05	0,2197 ± 0,0014	0,3032 ± 0,0018	< 0,001

Примечание. Для шиффовых оснований приведены значения достоверности относительно предыдущего срока перевивки опухоли.

но выше фоновых значений вплоть до последнего (26-го дня) наблюдения (см. таблицу).

Средняя концентрация сульфгидрильных групп в эритроцитах периферической крови оказалась достоверно сниженной уже на 6-й день после перевивки опухоли до 0,2276 ± 0,0015 усл. ед. при 0,2430 ± 0,0017 усл. ед. в контроле (*p* < 0,01) и оставалась достоверно ниже соответствующих контрольных значений вплоть до окончания периода наблюдения (см. таблицу).

Анализ структуры популяции эритроцитов по содержанию в них изучаемого субстрата в динамике развития опухоли выявил увеличение числа клеток с низким уровнем тиоловых соединений при одновременном снижении доли эритроцитов с высоким содержанием SH-групп. Так, например, на 6-й день после перевивки опухоли количество эритроцитов с минимально низким (0,170—0,194 усл. ед.) содержанием тиоловых групп достигало 11,6 % (в контроле 2 %), а число клеток с минимальной их концентрацией (0,290—0,319 усл. ед.), напротив, оказалось значительно ниже соответствующих значений в контроле (6 %) и составляло лишь 0,4 %. К окончанию периода наблюдения (26-й день) суммарное число эритроцитов с минимально низкой (0,140—0,168 усл. ед.) и низкой (0,170—0,194 усл. ед.) концентрацией SH-групп составляло 16 % при полном отсутствии их в контроле. Количество клеток с высоким (0,320—0,344 усл. ед.) и максимально высоким (0,350—0,377 усл. ед.) содержанием тиоловых соединений в контроле составило в этот период исследования соответственно 19,2 и 4,8 %, тогда как у животных с опухолью они полностью отсутствовали.

Таким образом, выявленные в динамике проведенных исследований изменения со стороны показателей, как прямо (содержание шиффовых соединений), так и косвенно (концентрация SH-групп), характеризующих уровень реакций ПОЛ в циркулирующих эритроцитах у животных с перивитой лимфосаркомой Плисса, свидетельствуют об интенсификации свободнорадикальных реакций в организме при опухолевом росте. Это в свою очередь дает основание утверждать, что одной из причин повышенного гемолиза эритроцитов при

паранеопластической анемии является усиление процессов ПОЛ.

Установленный факт снижения концентрации SH-групп и нарушения структуры популяции эритроцитов по данному показателю до появления лабораторно регистрируемых признаков малокровия может служить важным признаком возникновения нарушений в эритроцитарных мембранах, способствующих ускоренной гибели клеток и обусловленных, по всей видимости, активацией процессов свободнорадикального окисления, индуцированных развивающейся опухолью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гаврилов В. Б., Мишкорудная М. И. // Лаб. дело.— 1983.— № 3.— С. 33—35.
2. Ланкин В. З., Поляков В. М., Гуревич С. М. // Липиды: Структура, биосинтез, превращения и функции.— М., 1977.— С. 93—103.
3. Лю Б. Н. // Пат. физиол.— 1987.— № 1.— С. 86—90.
4. Терещенко И. П., Кашулина А. П., Александрова Л. М. // Вопр. онкол.— 1983.— Т. 29. № 11.— С. 14—18.
5. Чернова Е. П., Новицкий В. В. // Конференция патофизиологов Урала: Тезисы.— Челябинск, 1991.— С. 70—71.
6. Chevremont M., Frederik L. // Arch. Biol.— 1943.— Vol. 54.— P. 589—593.
7. Clark M., Shohet S. // Clin. Haemat.— 1985.— Vol. 14, N 1.— P. 223—258.
8. Drozd M., Coierek T., Jendryczko A. et al. // Rev. roum. Biochim.— 1987.— Vol. 24, N 1.— P. 3—5.
9. Wiemen J., Zucker S., Wilkie D. et al. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1986.— Vol. 140, N 1.— P. 365—371.

Поступила 13.04.91

ROLE OF LIPID PEROXIDATION IN PATHOGENESIS OF PARANEOPLASTIC ANEMIA.

S. E. Barmina, V. V. Novitsky, E. D. Goldberg

Institute of Pharmacology, Research Centre of the Academy of Medical Sciences of the Russian Federation, Tomsk.

Growth of Pliss lymphosarcoma inoculated into rats was accompanied by development of anemia, whereas content of Shiff bases was increased and concentration of SH-groups was decreased in erythrocytes of peripheric blood. Alterations in content of lipid peroxidation products, especially the decrease of SH-groups, were detected before manifestations of the anemia indications registered under laboratory conditions. This suggests the importance of lipid peroxidation in elevated rate of erythrocyte hemolysis during tumor growth.

М. Ш. Промыслов, М. Л. Демчук

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ОТДЕЛЬНЫХ ФРАКЦИЙ МОЗГОВОЙ ТКАНИ

Институт нейрохирургии им. Н. Н. Бурденко РАМН, Москва

Как было нами ранее показано в эксперименте на кроликах, при черепно-мозговой травме в мозгу животных нарастает количество перекисных соединений липидов. Параллельно с этим процессом мы наблюдали резкое подавление одной из важнейших защитных реакций этого органа — его общей антиоксидантной активности (АОА) [3].

Общая АОА — это сложная система, которая состоит из комплекса составляющих, играющих важную роль в жизнедеятельности мозга, так как она регулирует обменные реакции мозга, воздействуя опосредованно, через перекисные соединения липидов на процессы мембранной проницаемости и активность ферментов, локализованных на мембранах клеточных структур.

В данной работе мы исследовали вклад, вносимый белками и липидами мозга в суммарную АОА в норме и при черепно-мозговой травме в эксперименте.

Методика. Объектом исследования явились кролики-самцы породы шиншилла массой 2,5—3 кг. Черепно-мозговую травму средней степени тяжести наносили стандартным методом [4]. Животных забивали воздушной эмболией. Извлечение мозга и все последующие операции с ним проводили на холоду. Ткань мозга гомогенизировали в фосфатно-солевом буфере рН 7,4 при соотношении ткань мозга — буфер 1:4. К 0,5 мл гомогената добавляли 2,7 мл дистиллированной воды, 8 мл метанола и 4 мл хлороформа. Смесь перемешивали на магнитной мешалке в течение 3 мин, добавляли еще 4 мл хлороформа и продолжали перемешивание еще 1 мин. Реакционную смесь в делительной воронке ставили в холодильник на 1 ч до полного расслоения фаз [5]. После разделения каждую фазу упаривали на роторном испарителе до объема 2,5 мл.

В полученных образцах определяли АОА на разработанной нами модели, где субстратом окисления служила линолевая кислота [2]. Отличие от описанной в работе методики состоит лишь в том, что вместо 100 мкл брали 200 мкл исследуемого раствора.

Концентрацию ТБК-активных продуктов определяли методом [7], белка — методом Лоури [6]. Результаты опытов обрабатывали статистически с использованием метода Стьюдента [1].

Результаты и обсуждение. Как следует из полученных данных, липидная фракция на дан-

ной модельной системе не проявляет АОА, а общая величина ТБК-активных продуктов, образовавшихся при инкубации линолевой кислоты с добавкой липидной фракции, равна сумме концентраций ТБК-активных продуктов, образовавшихся в самой модельной системе и в отдельно взятой липидной фракции (см. таблицу). В то же время удельная АОА водно-белковой фазы даже несколько превышает удельную АОА всего гомогената. Этот факт позволяет думать о том, что основная АОА мозга сосредоточена в водно-белковой фазе, причем то, что АОА всего гомогената меньше АОА водно-белковой фазы, можно, вероятно, объяснить тем, что в единице объема водно-белковой фракции количество белка несколько ниже, чем в единице объема гомогената. Следует также отметить, что при инкубации смеси такой же аликвоты водно-белковой фазы с липидной фракцией, используемой в данном случае в качестве модельной системы, происходит 50 % ингибирование образования ТБК-активных продуктов. Кроме того, АОА водно-белковой фазы претерпевает синфазные изменения с АОА всего гомогената после травмы и регулируется активацией ЦНС травмированных животных. При этом АОА липидной фракции так и остается нулевой.

Необходимо также отметить, что 80 % АОА водно-белковой фазы приходится на ее водорастворимую часть. Мы убедились в том, что в липидную фракцию гомогената мозга переходит весь содержащийся в мозгу α -токоферол, при этом можно было ожидать, что АОА его скажется при определении АОА липидной фракции. Однако, как это было показано выше, эта фракция не проявляет антиоксидантных свойств, что, вероятно, может быть следствием того, что концентрация антиоксидантов, в частности и α -токоферола, недостаточно велика для проявления существенных антиоксидантных свойств на используемой нами модели. В подтверждение такого предположения можно привести следующие данные: при добавлении к гомогенату мозга такого количества α -токоферола, которое содержится в мозгу (1,5 мкг на 100 мг сырой ткани), его общая АОА по отношению к линоленовой кислоте не претерпевает изменений. При исследовании собственной АОА α -токоферола на предложенной модельной системе оказалось, что количество α -токоферола, равное концентрации его в мозгу, не проявляет никакого антиоксидантного эффекта и только при увеличении его в 3 раза и более наблюдается нарастание АОА, пропорциональное количеству добавленного в пробу α -токоферола.

АОА водно-белковой и липидной фракций мозга

АОА	Норма	Травма	Травма+фенамин
Общая АОА гомогената, %/мкг белка	22,78±0,49 (n=5)	11,10±1,32 (n=5) <0,001	22,06±0,98 (n=5)
p_1			>0,05
p_2			
АОА водно-белковой фракции, %/мкг белка	22,76±1,78 (n=5)	19,26±1,32 (n=5)	33,36±1,49 (n=5)
p_1		<0,001	
p_2			>0,05
АОА липидной фракции	0	0	0
α -Токоферол, мкг/100 мг сырой ткани	1,52±0,04 (n=10)	0,26±0,06 (n=5) <0,001	0,30±0,07 (n=5)
p_1			<0,001
p_2			

Примечание. В скобках — число опытов. p_1 — достоверность различий между группами «норма» и «травма», p_2 — достоверность различий между группами «норма» и «травма+фенамин».

Таким образом, на основании полученных данных можно высказать предположение о том, что основными компонентами, обеспечивающими АОА мозга, являются водорастворимые вещества (амины, аминокислоты, ферменты, белки, аскорбиновая кислота и др.), в то время как α -токоферол и липиды мозга не играют сколько-нибудь существенной роли в этой важной защитной системе мозга.

ЛИТЕРАТУРА

1. Асатиани В. С. // Новые методы биохимической фотометрии. — Тбилиси, 1965. — С. 495—510.
2. Промыслов М. Ш., Демчук М. Л. // Вопр. мед. химии. — 1990. — Т. 36, № 4. — С. 90—92.
3. Промыслов М. Ш., Левченко Л. И., Демчук М. Л. // Нейрохимия. — 1990. — № 1. — С. 103—105.
4. Промыслов М. Ш., Тигранян Р. А. // Вестн. АМН СССР. — 1971, Т. 17, № 11. — С. 28—34.
5. Dillard C. L., Tappol A. L. // Canad. J. Biochem. — 1954. — Vol. 7, N 8. — P. 911.
6. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
7. Okhawa H., Ohishi N., Jagi K. // Analyt. Biochem. — 1979. — Vol. 95. — P. 351—358.

Поступила 19.03.91

ANTIOXIDATIVE ACTIVITY OF INDIVIDUAL FRACTIONS OF BRAIN TISSUE.

M. Sh. Promyslov, M. L. Demchuk

N. N. Burdenko Institute of Neurosurgery, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow.

The overall antioxidative activity was studied in the rabbit brain homogenate, water-soluble protein and lipid fractions. The antioxidative activity of water-soluble protein fraction made a major contribution to the total activity, while the antioxidative activity estimated by the procedure used was not detected in the lipid fraction. Antioxidant activity both in the brain homogenate and water-soluble protein fraction was similarly altered during craniocerebral trauma and after stimulation of the central nervous system in the injured animals.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 615.214.24.015.4.076.9

П. И. Лукиенко, Л. Ф. Легонькова, М. И. Бушма, А. Ю. Шока, И. В. Зверинский, Л. Б. Заводник

ВЛИЯНИЕ МЕТОТРЕКСАТА НА ФЕНОБАРБИТАЛОВУЮ ИНДУКЦИЮ МОНООКСИГЕНАЗ И УДФ-ГЛЮКУРОНОЗИЛТРАНСФЕРАЗЫ ПЕЧЕНИ КРЫС

Институт биохимии АН Беларуси, Гродно

Одним из адаптационных механизмов защиты организма от токсического действия ксенобиотиков является индуцибельность ферментных систем, участвующих в их метаболизме. Среди этих систем наиболее важными являются цитохром Р-450-зависимые монооксигеназы и УДФ-глюкуронозилтрансфераза, локализованные в эндоплазматическом ретикулеуме печени.

Основной механизм индукции ферментов связан с системой синтеза ферментного белка [8]. Поскольку одним из естественных факторов, участвующих в биосинтезе белка, является фолиевая кислота [4], нами предприняты исследования по

выяснению ее роли в функции этих ксенобиотик-метаболизирующих систем [1—3].

Целью настоящей работы является изучение индуцибельности монооксигеназной и УДФ-глюкуронозилтрансферазной систем печени крыс при фолатной недостаточности.

Методика. Опыты проведены на 82 беспородных крысах-самцах массой 120—140 г. Индукцию ферментов вызывали введением фенобарбитала натрия (60 мг/кг подкожно в течение 14 дней), фолатную недостаточность — обработкой животных метотрексатом (0,25 мг/кг подкожно в течение 14 дней). Через 24 ч после последней инъекции веществ животных декапитировали и в микросомальной фракции печени определяли содержание цитохромов Р-450, b₅, активность амидопирин- и этилморфин-N-деметилаз, анилин-p-гидроксилазы и УДФ-глюкуронозилтрансферазы по методам, описанным нами ранее [1]. Содержание белка в микросомах определяли по методу [7], скорость его синтеза — по включению ¹⁴С-лейцина (50 мкКи/100 г внутривентриально за 7 мин до декапитации). Активность глюкуроконъюгации в условиях целого организма оценивали по уровню выделяемых с мочой глюкуроконъюгатов (связанная глюкуроновая кислота) [11].

Результаты и обсуждение. При введении метотрексата уровень микросомального белка печени, содержание в микросомах цитохромов Р-450, b₅, активность амидопирин-N-деметилазы, этилморфин-N-деметилазы, анилин-p-гидроксилазы, УДФ-глюкуронозилтрансферазы и выделение с мочой связанной глюкуроновой кислоты по сравнению с интактными животными уменьшались на 21, 60, 39, 33, 53, 21, 41 и 28 % соответственно. У этих животных снижалась скорость включения ¹⁴С-лейцина в общую фракцию белка микросом на 45 %. После введения фенобарбитала содержание белка, активность указанных ферментов и экскреция глюкуроноидов увеличились соответственно на 28, 187, 63, 163, 162, 100, 95 и 60 % (см. таблицу).

Индукционное действие фенобарбитала у крыс, обработанных метотрексатом, значительно тормозилось: уровень микросомного белка, содержание цитохрома b₅, активность анилин-p-гидроксилазы, УДФ-глюкуронозилтрансферазы и скорость экскреции связанной глюкуроновой кислоты у этих крыс оставались на уровне интактных животных, а содержание цитохрома Р-450 было даже снижено на 33 %. Отмечалось лишь незначительное повышение (на 17 и 27 %) активности амидопирин- и этилморфин-N-деметилаз.

Блокирование метотрексатом фенобарбиталовой индукции монооксигеназной и глюкуроконъюгирующей систем свидетельствует об участии фолиевой кислоты в этом процессе.

Основной механизм индукции цитохрома Р-450 заключается в увеличении содержания РНК и синтеза белка *de novo*, что сопровождается увеличением уровня апопротеина фермента, а также разрастанием мембран эндоплазматического ретикулума [8], о чем свидетельствуют и наши данные об увеличении микросомного белка. Увеличение уровня РНК под влиянием фенобарбитала происходит преимущественно за счет снижения ее катаболизма [9]. Среди факторов, обеспечивающих стабильность индуцированной РНК, основным является увеличение метилирования ее метионином [10]. Наряду с повышением синтеза апопротеина при введении фенобарбитала увеличивается образование и простетической части цитохрома — гема — за счет усиления конденса-

Активность монооксигеназ и глюкуронозилтрансферазы печени крыс, содержание и скорость синтеза микросомального белка при раздельном и комбинированном введении фенобарбитала и метотрексата в течение 14 дней

Исследуемый показатель	Контроль	Метотрексат, 0,25 мг/кг	Фенобарбитал, 60 мг/кг	Фенобарбитал+ +метотрексат
Содержание микросомного белка, мг/г печени	5,34±0,22	4,22±0,37	6,83±0,52*	4,58±0,39
Включение ¹⁴ C-лейцина, имп./мин	1315±93	717±126	—	—
Цитохром P-450, нмоль/мг	0,65±0,08	0,26±0,03*	1,87±0,31*	0,44±0,10***
Цитохром b ₅ , нмоль/мг	0,55±0,07	0,33±0,02*	0,90±0,14*	0,46±0,05***
Амидопирин-N-деметилаза, нмоль/мин/мг	7,44±0,22	4,97±0,37*	19,52±0,39*	8,71±0,31***
Этилморфин-N-деметилаза, нмоль/мин/мг	7,48±0,20	3,55±0,21*	19,73±0,56*	9,55±0,38***
Анилин-p-гидроксилаза, нмоль/мин/мг	0,54±0,02	0,43±0,01	1,08±0,03*	0,62±0,02
УДФ-глюкуронозилтрансфераза, нмоль/мин/мг	12,26±1,26	7,23±1,33*	23,86±1,91*	13,94±2,54***
Глюкуроиновая кислота, мг/порцию:				
общая	1,51±0,10	1,01±0,19*	2,47±0,19*	1,73±0,15***
связанная	1,09±0,09	0,78±0,11*	1,74±0,15*	1,37±0,11***

Примечание. Одна звездочка — $p < 0,05$ по сравнению с контролем, две — по сравнению с получавшими фенобарбитал крысами. При комбинированном введении использовались те же дозы препаратов, что и при раздельном.

ции глицина и сукцинил КоА в 5-аминолевулинат [5]. Увеличивается также содержание в микросомах фосфатидилхолина, обуславливающего снижение микровязкости мембран, а следовательно, улучшающего электронтранспортную функцию оксидоредуктаз и взаимодействие цитохрома P-450 с субстратами.

Рассматривая представленные механизмы фенобарбиталовой индукции цитохрома P-450 (увеличение синтеза и стабильности нуклеотидов и белка, образования 5-аминолевуленовой кислоты и мембранного фосфатидилхолина) в связи с коферментной функцией фолиевой кислоты [4], можно предположить, что эти механизмы прямо или косвенно обусловлены фолатзависимыми процессами метаболизма. Об этом свидетельствуют также данные о снижении уровня фолатов в крови и развитии фолатдефицитных анемий у больных эпилепсией, длительно получавших фенобарбитал [6].

ЛИТЕРАТУРА

1. Бушма М. И., Легонькова Л. Ф., Лукиенко П. И. // Вопр. мед. химии.— 1987.— Т. 33, № 4.— С. 93—95.
2. Легонькова Л. Ф., Лукиенко П. И., Бушма М. И. // Фармакол. и токсикология.— 1989.— № 5.— С. 47—50.
3. Лукиенко П. И., Бушма М. И., Легонькова Л. Ф., Абакумов Г. З. // Там же.— 1985.— № 6.— С. 53—55.
4. Степанова Е. Н. // Витамины / Под ред. М. И. Смирнова.— М., 1974.— С. 308—320.
5. Baron J., Tephly T. R. // Arch. Biochem.— 1970.— Vol. 139.— P. 410—420.
6. Clark F. // J. hum. Nutr.— 1976.— Vol. 30.— P. 333—337.
7. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. C., Randall R. J. // J. biol. Chem.— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
8. Okey Allan B. // Pharmacol. and Ther.— 1990.— Vol. 45, N 2.— P. 241—298.
9. Seifert J., Vacha J. // Chem. Biol. Interact.— 1970.— Vol. 2.— P. 297—303.
10. Smith S. J., Leobard T. B., Duceman B. W., Vesell E. S. // Biochem. Pharmacol.— 1977.— Vol. 26.— P. 955—961.
11. Yuki A., Fishman W. H. // Biochim. biophys. Acta.— 1963.— Vol. 69.— P. 567—578.

Поступила 31.10.91

EFFECT OF METHOTREXATE ON THE PHENOBARBITAL-PRODUCED INDUCTION OF MONOOXYGENASES AND UDP-GLUCURONOSYLTRANSFERASE ACTIVITY IN RAT LIVER TISSUE.

P. I. Lukienko, L. F. Legonkova, M. I. Bushma, A. Yu. Shoka, I. V. Zverinsky, L. B. Zavodnik

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

Methotrexate (N^{10} -methyl-4-amino-4-deoxyfolic acid), administered to rats subcutaneously at a dose of 0.25 mg/kg within 14 days, was found to decrease content of microsomal protein in liver tissue and content of cytochromes P-450 and b₅ as well as the drug decreased activity of amidopyrine- and ethylmorphine-N-demethylases, aniline-p-hydroxylase, UDP-glucuronosyltransferase and urinary excretion of glucuronides by 21 %, 60 %, 39 %, 33 %, 53 %, 21 %, 41 % and 28 %, respectively. Phenobarbital, administered subcutaneously at a dose of 60 mg/kg within 14 days, elevated the parameters by 28 %, 187 %, 63 %, 163 %, 162 %, 100 %, 95 % and 60 %, respectively. The effect of phenobarbital in combination with methotrexate was decreased by 77 %, 49 %, 55 %, 52 %, 43 %, 42 % and 22 %, respectively.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 615.277.3.015.4.07

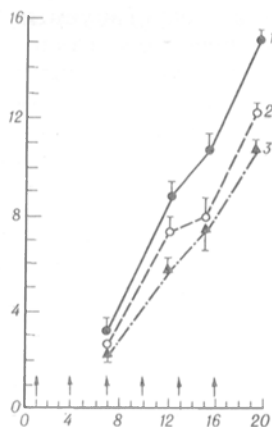
С. Я. Проскуряков, Е. О. Федоровская,
Н. И. Рябченко, А. М. Поверенный

ВЛИЯНИЕ УНИТИОЛА НА ПРОТИВООПУХОЛЕВУЮ И АНТИМЕТАСТАТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ N-МЕТИЛФОРМАМИДА

НИИ медицинской радиологии РАМН, Обнинск

Открытие феномена индукции более дифференцированного или «менее злокачественного» фенотипа у культивируемых клеток ряда линий полярными растворителями возобновило интерес к ним как к противоопухолевым агентам. Наиболее эффективным среди них оказался N-метилформамид (МФ), что обусловило начало его широких клинических испытаний [5]. В ряде работ [6, 11] противоопухолевая и дифференцирующая активность МФ связывается со снижением содержания тиолов, в основном глутатиона, которое сопровождается образованием метаболитов МФ в клетках. Для оценки роли тиоловых групп в механизме действия МФ *in vivo* мы изучили влияние фармакопейного препарата унитиола, имеющего в структуре две SH-группы, на противоопухолевую и антиметастатическую активность МФ.

Методика. В работе использовали отечественный препарат унитиол и МФ («Koch-Light»). Соединения растворяли в 0,9 % NaCl и вводили внутривенно мышам-опухолесителям, МФ — в дозе 300 мг/кг, унитиол — 5 мг/кг. При совместном использовании эти агенты инъекционно вводили одновременно. Опухоль — карциному легких Льюиса (КЛЛ) — перевивали внутримышечно в заднюю лапу мышесамок (18—20 г) линии С57В1/6. Введение препаратов начинали на следующие сутки после перевивки опухоли и продол-



Влияние МФ и унитиола на рост карциномы КЛЛ.

По оси абсцисс — время после прививки опухоли, сут; по оси ординат — диаметр опухоли, мм.
1 — контроль; 2 — МФ (300 мг/кг 6-кратно) + унитиол (5 мг/кг 6-кратно); 3 — МФ (300 мг/кг 6-кратно). Стрелками указаны сроки введения препаратов. Влияние одного унитиола на рост опухоли не показано, так как эти данные практически совпадают с контролем.

жали введение через 2 дня на 3-й до 19-х суток. Размер опухоли и число метастазов в легких определяли по ранее описанной методике [2]. Данные представлены в виде $M \pm m$, где M — среднее, а m — среднее квадратичное отклонение среднего.

Результаты исследования. Как видно на рисунке, рост опухоли у мышей, обработанных МФ, замедлялся по сравнению с контролем начиная с 7-х суток после перевивки и существенно отставал от него на протяжении всех сроков наблюдения. Введение МФ совместно с унитиолом также вызывало замедление роста опухоли по сравнению с контролем, однако ее размеры в течение всего периода наблюдения превышали размеры опухоли, обработанной одним МФ.

Размеры опухолей на 19-е сутки наблюдения представлены в таблице, при этом диаметр опухоли у животных, обработанных одним МФ, был в 1,4 раза меньше, чем у контрольных животных ($p < 0,05$), а у животных, обработанных сочетанием МФ + унитиол, был в 1,2 раза больше, чем у обработанных только МФ ($p < 0,05$).

В таблице также представлены данные о числе спонтанных метастазов, развившихся у подопытных и контрольных животных на 19-е сутки после прививки опухоли. После 6-кратного введения МФ число метастазов в легких у животных-опухоленосителей составляло в среднем 6,5 на 1 мышью и было в 5 раз меньше, чем у контрольных животных ($p < 0,05$). При обработке животных двумя препаратами вместе число метастазов в легких у них также достоверно уменьшалось (примерно в 2 раза) до 14 метастазов на животное, но оставалось при этом в 2,5 раза больше, чем у животных, обработанных только МФ. Введение одного унитиола мышам-опухоленосителям не вызывало изменений в скорости роста КЛЛ и ее метастазирования.

Размер КЛЛ и число спонтанных метастазов в легких у мышей-опухоленосителей на 19-е сутки ее развития и после 6-кратной инъекции МФ (300 мг/кг) и унитиола (5 мг/кг)

Воздействие	Размер опухоли, мм	Число метастазов в легких
Контроль	$14,7 \pm 0,3$ (29)	31 ± 5 (29)
МФ	$10,7 \pm 0,5$ (19)	$6,5 \pm 1,5$ (19)
Унитиол	$14,2 \pm 0,2$ (11)	32 ± 4 (11)
МФ + унитиол	$12,2 \pm 0,3$ (11)	14 ± 2 (11)

Примечание. Представлены средние арифметические величины и среднее квадратичные ошибки средних; в скобках — число животных.

Полученные данные указывают на то, что обработка животных-опухоленосителей КЛЛ полярным растворителем МФ вызывает замедление роста опухоли и ингибирует ее метастазирование в легкие. Подобную противоопухолевую активность МФ проявлял и на ряде других опухолей мышей: гепатокарциноме, фибросаркоме, карциноме молочной железы [8], асцитной опухоли Эрлиха, гепатоме 22А, тимоме EL-4 [3]. Чувствительность к МФ широкого спектра опухолей различного происхождения и локализации и отсутствие реакции на него у кроветворной ткани [10] привлекают серьезное внимание к механизмам его биологической активности. Наиболее важными здесь остаются два вопроса: о связи дифференцирующей и противоопухолевой (антиметастатической) активности МФ и о конкретных биохимических механизмах его действия.

Исследования, проведенные *in vitro*, убедительно показывают, что индукция МФ у опухолевых клеток «менее злокачественного» фенотипа сопровождается снижением в этих клетках основного детоксицирующего эндогенного агента — глутатиона, а компенсация этого снижения добавлением экзогенного тиола практически полностью ингибирует дифференцирующую и противоопухолевую активность МФ [6, 11]. В качестве экзогенного тиола в опытах *in vivo* был выбран фармакопейный препарат унитиол, способный защищать пул эндогенных тиолов [9]. Известно также, что унитиол может стимулировать метастазирование опухоли КЛЛ через механизм ингибирования киназ [1]. Однако в наших опытах, как видно из таблицы, унитиол не модифицировал метастатическую активность КЛЛ, очевидно, из-за более (в 6 раз) низкой, чем в работе [1], использованной дозы. Тем не менее даже при этой дозе унитиол существенно изменял терапевтическую активность МФ. Из таблицы видно, что применение МФ совместно с унитиолом ингибировало рост опухоли на 17 % слабее, чем один МФ, а число метастазов в легких у животных, обработанных двумя препаратами вместе, было на 77 % выше, чем у обработанных одним МФ.

Полученные нами данные позволяют считать, что инактивация SH-групп может играть существенную роль в противоопухолевой и антиметастатической активности МФ *in vivo*. Учитывая, что эффективные концентрации МФ в организме значительно ниже, чем в опытах *in vitro* [12], можно предположить, что в механизм действия МФ включаются не все тиоловые группы, а специфические, относящиеся, в частности, к SH-группам поверхности клеток [4, 7].

ЛИТЕРАТУРА

1. Векслер И. Г., Рябуха В. П., Чубинская С. Г., Шварц Г. Я. // Бюл. exper. биол. — 1987. — № 7. — С. 79—81.
2. Олейникова О. М., Федоровская Е. О. // Индукторы интерферона в радиологии и онкологии. — Обнинск, 1989. — С. 28—35.
3. Сморицанова О. А., Проскуряков С. Я., Деденков А. П., Рябченко Н. И. // Вопр. онкол. — 1989. — № 8. — С. 967—970.
4. Annad S., Mulberg A., Aljian J., Vistica D. T. // Biochem. Pharmacol. — 1986. — Vol. 35, N 10. — P. 1697—1701.
5. Cheson B. D., Jaspersse D. M., Chun H. G., Friedman M. A. // Cancer Treat. Rev. — 1986. — Vol. 13, N 3. — P. 129—146.

6. *Cordeiro R. F., Savarese T. M.* // *Cancer Res.*— 1986.— Vol. 46, N 3.— P. 1297—1305.
7. *Grasetti D. R.* // *Cancer Lett.*— 1986.— Vol. 31, N 2.— P. 187—195.
8. *Iwakawa M., Tofilon P. J., Hunter N. et al.* // *Clin. exp. Metastas.*— 1987.— Vol. 5, N 4.— P. 289—300.
9. *Jaesche H., Wendel A.* // *Biochem. Pharmacol.*— 1985.— Vol. 34, N 7.— P. 1029—1033.
10. *Langdon S. P., Hickman J. A., Gescher A. et al.* // *Europ. Cancer clin. Oncol.*— 1985.— Vol. 21, N 6.— P. 745—752.
11. *Lazenby C. M., Gescher A., Dale L. L.* // *Biochem. Pharmacol.*— 1987.— Vol. 36, N 17.— P. 2869—2870.
12. *Pearson P. G., Gescher A., Harpur E. S.* // *Biochem. Pharmacol.*— 1987.— Vol. 36, N 3.— P. 381—384.

Поступила 29.07.91

EFFECT OF UNITHIOL ON ANTITUMOR AND ANTIMETASTATIC PROPERTIES OF N-METHYL FORMAMIDE.

S. Ya. Proskuryakov, E. O. Fedorovskaya, N. I. Ryabchenko, A. M. Poverenny

Institute of Medical Radiology, Academy of Medical Sciences of the Russian Federation, Obninsk.

Antitumor and antimetastatic properties of N-methyl formamide — an agent related to differentiation of tumoral cells and unithiol, official detoxicating drug containing SH-groups were studied in C57Bl/6 mice inoculated with Lewis's lung carcinoma. The drugs were administered intraperitoneally into animals at days 1, 4, 7, 13 and 16 after carcinoma inoculation and their effects were evaluated at day 19. Single administration of unithiol, 5 mg/kg body weight, did not affect tumor growth and metastase spreading. At the same time, N-methyl formamide (single administration of 300 mg/kg body weight) inhibited tumor growth and decreased 5-fold an amount of spontaneous metastases in lungs. However, the antitumor and antimetastatic activities of N-methyl formamide were decreased after simultaneous administration with unithiol. Importance of SH-groups in therapeutic effects of N-methyl formamide is discussed.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.5-006.81.04-06:616.428]-07

П. Е. Цанев, Е. А. Козлов, Л. С. Бассалык, С. М. Паршикова

МЕТАЛЛОЗАВИСИМАЯ КОЛЛАГЕНОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ В ПЕРВИЧНЫХ ОЧАГАХ И МЕТАСТАТИЧЕСКИ ПОРАЖЕННЫХ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛАХ МЕЛАНОМ

Онкологический научный центр РАМН, Институт биологической и медицинской химии РАМН, Москва

Метастазирование является критическим моментом даже после радикального хирургического удаления опухоли, значительно ухудшающим прогноз заболевания. Поэтому одной из наиболее актуальных в теоретическом и практическом отношении проблем онкологии является изучение механизмов инвазии и метастазирования опухолевых клеток.

В процессах инвазии и метастазирования активное участие принимают металлозависимые протеиназы [4, 7]. Известно также, что метастатические опухолевые клетки, передвигаясь от первичного очага, должны преодолеть различные тканевые барьеры, включая базальную мембрану кровеносных и лимфатических сосудов. Методом электронной микроскопии установлено наличие локальных расщеплений эндотелиальной базальной мембраны в зонах контакта с цитоплазматическими мембранами опухолевых клеток [12]. Это дает основание полагать, что лизосомаль-

ные, мембранно-связанные или секретируемые опухолевыми клетками протеолитические металлозависимые ферменты могут быть эффективными медиаторами в процессе их инвазии. Пенетрация метастатических клеток через базальную мембрану является сложным процессом, включающим ряд последовательных этапов: прикрепление клеток к мембране, последующие расщепление базальной мембраны и миграция неопластических клеток [11].

Основным структурным белком базальной мембраны является коллаген типа IV, который химически и иммунологически отличается от коллагенов типов I и III стромы [9]. Неколлагеновый скелет эндотелиальной мембраны состоит в основном из двух белков — ламинина и фибронектина [11]. Метастатические опухолевые клетки имеют на своей цитоплазматической мембране рецепторы с высоким сродством к ламинину. При связывании неопластических клеток с ламинином индуцируется синтез коллагеназ, которые специфически деградируют коллаген типа IV [6]. Установлено, что опухолевые клетки продуцируют также металлопротеиназы, рассекающие полипептидные цепи коллагенов типов I, III и V в неактивных формах [8]. Активация проколлагеназ может происходить как внутри-, так и внеклеточно. Установлено, что проколлагеназа типа IV интрацеллюлярно активируется метаболитами арахидоновой кислоты, а в экстрацеллюлярных условиях — активатором плазминогена и плазмином [11]. Показано, что ингибция этих активаторов предотвращает инвазивность неопластических клеток [11]. Метастатический потенциал опухолевых клеток коррелирует с их коллагенолитической активностью [3, 9]. В опухолях с высоким метастатическим потенциалом снижено содержание тканевых ингибиторов металлопротеиназ, что приводит к экспрессии коллагенолитической активности неопластических клеток [11].

Высказано предположение, что поверхностно-мембранная локализация металлопротеиназ является оптимальной для их ферментативного действия [13]. Конформационное соответствие между поверхностью метастатических клеток и базальной мембраной, вероятно, облегчает процесс деградации коллагена локальным действием коллагеназ и ограничением доступа протеазных ингибиторов.

Целью настоящей работы явилось исследование металлозависимой коллагенолитической активности отдельно в первичной меланоме, образцах здоровой кожи вокруг опухоли, доброкачественных пигментных новообразованиях, метастатически пораженных и непораженных лимфатических узлах.

Методика. Обследовано 53 больных меланомой кожи (38 женщин и 15 мужчин) в возрасте от 30 до 70 лет. Клинический диагноз был подтвержден данными морфологического исследования после хирургического удаления опухоли и метастазов в регионарных лимфатических узлах. У большинства обследованных больных первичная опухоль имела III и IV степень инвазии по Кларку.

Все обследованные пациенты были разделены на две группы. Первую группу составили 25 больных с выявленным первичным очагом меланомы, вторую — 28 больных в стадии диссеминации опухоли в регионарные лимфатические узлы.

В качестве контроля металлозависимую коллагенолитическую активность определяли в образцах доброкачественных

Коллагенолитическая активность (в % от эндогенного субстрата, гидролизованного за время инкубации) в исследованных образцах неопластической и здоровой ткани

Ткань	n	Коллагенолитическая активность	
		металлоза- висямая	металлонеза- висямая
Первичные очаги меланом	25	4,50±0,70 ¹ $p_{1-3} < 0,001$	5,05±1,30 ² $p_{2-4} < 0,05$
Невусы	4	0,23±0,14 ³ $p_{3-5} < 0,001$	2,3±0,78 ⁴ $p_{2-6} < 0,02$
Кожа, окружающая опухоль	6	1,23±0,46 ⁵ $p_{5-1} < 0,001$	1,83±0,46 ⁶ $p_{4-2} < 0,05$
Лимфатические узлы, пораженные метастазами	28	6,80±0,90 ⁷ $p_{7-9} < 0,001$	6,10±0,72 ⁸ $p_{6-10} < 0,001$
Непораженные лимфатические узлы	5	1,54±0,80 ⁹ $p_{9-7} < 0,001$	0,73±0,24 ¹⁰ $p_{10-8} < 0,001$

пигментных невусов, здоровой кожи вокруг опухоли и непораженных метастатическими клетками лимфатических узлов.

Материал до использования хранили при -70 °С.

Принцип определения коллагенолитической активности состоит в том, что после гомогенизации опухолевой ткани коллагеназа остается прочно сорбированной на нерастворимой фракции коллагена и при инкубации атакует коллагенные фибриллы, в результате чего наступает солиubilизация [10]. Количество солиubilизированного коллагена оценивали по содержанию гидроксипролина в растворимой фракции [2].

Исследуемые ткани измельчали на холоду последовательно в гомогенизаторе «Vir-Tis-45» и стеклянном гомогенизаторе и промывали 0,02 М СаСl₂. Полученные гомогенаты центрифугировали 20 мин при 6000 g. Осадки промывали 0,01 М СаСl₂, содержащим 0,25 % тритон X-100. Промытые детергентом осадки суспендировали в 10-кратном объеме 0,05 М трис-НСl-буфера рН 7,5 при 4 °С, содержащего 0,01 М СаСl₂, 0,020 мг/мл азид натрия и 0,4 мг/мл гарамицина. Для определения металлозависимой коллагенолитической активности аликвоты гомогената объемом 0,5 мл инкубировали 18 ч при 37 °С, а для определения металлонезависимой коллагенолитической активности к пробам добавляли ЭДТА в конечной концентрации 0,05 М. В обоих случаях использовали 6 параллельных проб. После окончания инкубации пробы центрифугировали 10 мин при 10 800 g. Надосадочные жидкости собирали, добавляли к ним концентрированную НСl до конечной концентрации 6 n. и гидролизывали 18 ч при 110 °С. Осадки растворяли в 0,5 мл 0,2 М NaOH, а потом гидролизывали аналогичным образом. Гидролизаты выпаривали досуха. В сухих остатках определяли содержание гидроксипролина колориметрической реакцией с п-диметиламинобензальдегидом [1]. Количество солиubilизированного коллагена выражали в процентах от его общего содержания в гомогенате.

Результаты и обсуждение. Результаты определения коллагенолитической активности в тканевых образцах представлены в таблице. Наиболее высокая металлозависимая коллагенолитическая активность была выявлена в метастатически пораженных лимфатических узлах и составила 6,8±0,9 %. Она достоверно превышала таковую в неизмененных лимфатических узлах ($p < 0,001$). Обнаружено также значительное увеличение металлозависимой коллагенолитической активности в первичных очагах меланом по сравнению с прилежащей к опухоли здоровой кожей и доброкачественными пигментными новообразованиями ($p < 0,001$).

В коже основными типами коллагена являются коллагены типов I и III, которые образуют смешанные фибриллы, в центре которых находится коллаген типа I, окруженный коллагеном типа III [5]. В строме лимфатических узлов содержится коллаген типа IV базальных мембран лимфатических сосудов [8, 9]. Перечисленные типы коллагена, вероятно, чувствительны к действию не

только коллагеназ, но и других металлопротеиназ [10]. По этой причине можно полагать, что использованный метод определяет общую коллагенолитическую активность, а не только коллагеназную.

В присутствии ЭДТА в первичной опухоли коллагенолитическая активность составляла 5,05±1,3 %, а в метастатически пораженных лимфатических узлах — даже 6,1±0,72 %, что достоверно превышало металлонезависимую коллагенолитическую активность в нормальных тканях. Расщепление коллагена в присутствии хелатных соединений осуществляется эндопептидазами серинового и цистеинового класса [3, 7]. В то же время, согласно данным литературы, их активность в опухолевых клетках коррелирует с метастатическим потенциалом и инвазивной способностью [12]. Таким образом, высокая металлонезависимая коллагенолитическая активность в первичных очагах меланом и метастатически пораженных лимфатических узлах, вероятно, обусловлена уровнем сериновых и цистеиновых лизосомальных протеаз в неопластических клетках.

Наши исследования показали, что металлозависимая и металлонезависимая коллагенолитические системы имеют почти одинаковую активность в опухолевых образцах. Биохимические механизмы инвазии и метастазирования являются сложным процессом, в котором эти ферментные системы не только действуют согласованно, но и взаимно усиливают свою активность в процессе расщепления базальных мембран сосудов и экстрацеллюлярного матрикса. Подтверждением этому являются сообщения, согласно которым основной фермент металлонезависимой коллагенолитической системы — катепсин В — активирует латентную коллагеназу типа 4 и, таким образом, экспрессирует активность металлозависимой коллагенолитической системы в неопластических клеточных линиях [4].

ЛИТЕРАТУРА

1. Замаева Т. В. // Современные методы в биохимии.— М., 1977.— С. 262.
2. Burleigh M., Barrett A. J., Lazarus G. S. // Biochem. J.— 1974.— Vol. 137.— P. 387—398.
3. Chubinskaya S. G., Kavetzkii R. E. // J. Tumor Marker Oncol.— 1990.— Vol. 5.— P. 264.
4. Eeckhout Y., Vaes G. // Biochem. J.— 1977.— Vol. 166.— P. 21—31.
5. Fleischmajer R., Mac Donald E. D., Perlsh J. S. et al. // J. Struct. Biol.— 1990.— Vol. 105.— P. 1—9.
6. Kanemoto T., Reich R., Royce L. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1990.— Vol. 87.— P. 2279—2283.
7. Kirschke H., Kembhavi A., Bohley P., Barrett A. // Biochem. J.— 1982.— Vol. 201.— P. 367—372.
8. Liotta L. A., Abe S. W., Robey P. G., Martin G. R. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1990.— Vol. 32.— P. 2268—2272.
9. Liotta L. A., Tryggvason K., Garbisa S. et al. // Nature.— 1980.— Vol. 284.— P. 67—68.
10. Pelletier J.-P., Pelletier J. M., Howell D. S. et al. // Arthr. a. Rheum.— 1983.— Vol. 26.— P. 63—68.
11. Reich R., Stralford B., Klein K. et al. // Ciba Fond. Symp.— 1988.— N 141.— P. 193—210.
12. Sloane B. F., Rozhin J., Johnson K. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1986.— Vol. 83.— P. 2483—2487.
13. Zucker S., Moll U. M., Lysik R. M. et al. // Int. J. Cancer.— 1990.— Vol. 145.— P. 1137—1142.

Поступила 19.07.91

METAL-DEPENDENT COLLAGENOLYTIC ACTIVITY IN PRIMARY FOCI AND METASTATIC LYMPH NODES IN MELANOMA

P. E. Tsanev, E. A. Kozlov, L. S. Bassalyk, S. M. Parshikova

Cancer Research Centre, Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the Russian Federation, Moscow.

Collagenolytic activity was estimated in primary focuses of melanoma, in preparations of normal skin surrounding the tumor, in benign pigmentary neoplasms (nevus) as well as in normal and metastatic lymph nodes. Both metal-dependent and -independent collagenolytic activity was significantly increased in tumoral tissues as compared with that of healthy tissues. At the same time, the collagenolytic activity was considerably lower in benign pigmentary neoplasms than that of melanoma primary focuses. Importance of the collagenolytic enzymes in the processes of melanoma invasion and metastatic spreading is discussed.

© В. А. ЕГОРОВА, М. Н. БЛИНОВ, 1993

УДК 616.155.392-07:616.153.96

В. А. Егорова, М. Н. Блинов

ДНК-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПРИ ГЕМОБЛАСТОЗАХ

НИИ гематологии и переливания крови, Санкт-Петербург

Известно, что в сыворотке крови человека присутствуют белки, обладающие специфической способностью связываться с ДНК. К настоящему времени с помощью аффинной хроматографии и радиолигандного метода показано, что в сыворотке крови имеется несколько типов ДНК-связывающих белков, различающихся по молекулярной массе и заряду. Если ДНК-связывающим белкам ядер отводится роль регуляторов генной экспрессии, то о природе и биологических функциях ДНК-связывающих белков сыворотки крови до сих пор практически ничего неизвестно.

В ряде работ [4, 6] было показано наличие в сыворотке крови небольших количеств ДНК, которая, с одной стороны, попадает в сыворотку из распадающихся клеток, а с другой — секретуруется в плазму из лимфоцитов. Высказываются предположения, что секретуемая в окружающую среду лимфоцитами (а, возможно, и другими клетками) ДНК принимает участие в передаче информации между клетками, и в частности между иммунокомпетентными клетками. Возможно, также, что ДНК-связывающие белки сыворотки крови, комплексуясь с ДНК сыворотки, могут участвовать в регуляции активности последней.

При малигнизации изменяется как содержание ДНК, так и активность ДНК-связывающих белков в сыворотке крови больных неоплазиями [9, 10]. Согласно данным одних авторов [8], у таких больных уровень ДНК-связывающих белков снижен, другие [11], напротив, обнаружили его повышение. При этом характер изменений не зависел ни от размеров или локализации опухоли, ни от гистологического типа ее.

Ранее нами и другими исследователями [1, 2, 11] было показано заметное повышение уровня ДНК в плазме крови больных лейкозами. Одновременно мы выявили, что при гемобластозах

и миелодисплазии имеет место снижение так называемой специфической активности ДНК-связывающих белков, т. е. их способности предотвращать деградацию ДНК блеомицином [7]. Этот феномен, наблюдаемый и при опухолевых заболеваниях, свидетельствует о качественных и (или) количественных изменениях спектра сывороточных белков, способных связываться с ДНК, при неоплазиях, в том числе и лейкозах.

В настоящей работе предпринята попытка дать более детальную характеристику ДНК-связывающих белков сыворотки крови здоровых лиц и выявить возможные изменения их спектра у больных гематологическими заболеваниями.

Методика. Исследование проведено на сыворотках здоровых людей (20 человек), больных хроническим миелолейкозом (20 человек), острым лейкозом (21 человек) и больных рефрактерной анемией с увеличением бластов (РАУБ) (10 человек).

Для выделения ДНК-связывающих белков из сыворотки крови использовали комбинацию ионообменной и аффинной хроматографии. На первом этапе для удаления сывороточных иммуноглобулинов и других основных белков, которые могут неспецифически связываться с ДНК и ухудшать тем самым результаты аффинной хроматографии, образцы сыворотки крови (0,7 мл) наносили на колонку с QAE-сефадексом А-50 (размером 5×1 см), уравновешенную 0,01М К-фосфатным буфером рН 6,8. Колонку затем промывали этим же буфером при скорости 2 мл/мин до полного удаления несвязавшихся белков. Затем связавшиеся с ионообменником белки (в том числе и ДНК-связывающие) элюировали 0,01М К-фосфатным буфером, содержащим 0,05 М NaCl. К элюату добавляли ингибитор протеаз фенолметилсульфофлуорид и проводили диализ в течение ночи против 0,01М К-фосфатного буфера рН 6,8 с 1 мМ ЭДТА при 0°C. Диализат наносили на колонку с ДНК-целлюлозой (3×1 см), приготовленной по методу [10]. Для удаления несвязавшегося белка колонку промывали 0,05М NaCl на 0,01М К-фосфатном буфере. ДНК-связывающие белки элюировали 0,6М NaCl на том же буфере. Элюат, содержащий ДНК-связывающие белки (1—2 мл), концентрировали центрифугированием в пробирках «Центрикон S10» фирмы «Аминко» до объема 0,15—0,2 мл и определяли содержание белка по Лоури [9].

Электрофоретическое разделение белков проводили в градиенте полиакриламидного геля (4—20 %) в пластинах размером 8×8×0,2 см в нативных и денатурирующих (додецилсульфат натрия — ДСН, β-меркаптоэтанол) условиях. В качестве маркерных белков использовали белковые стандарты фирмы «Серва». По окончании электрофореза часть геля окрашивали кумасси R-250 для выявления белковых полос, а с другой переносили электрофоретически белки на нитроцеллюлозную мембрану «Миллипор». После переноса мембраны оставляли в растворе Денхарда на ночь, а затем гибридовали с ³H-ДНК.

³H-ДНК выделяли из клеток быстропролиферирующей эритромиелоидной линии K-562 после инкубации последних в течение 20 ч в среде, содержащей ³H-тимидин (40 мБк/мл). Полученная фенол-хлороформ-детергентным методом ДНК имела удельную радиоактивность 49 000 имп на мкг ДНК в 1 мин.

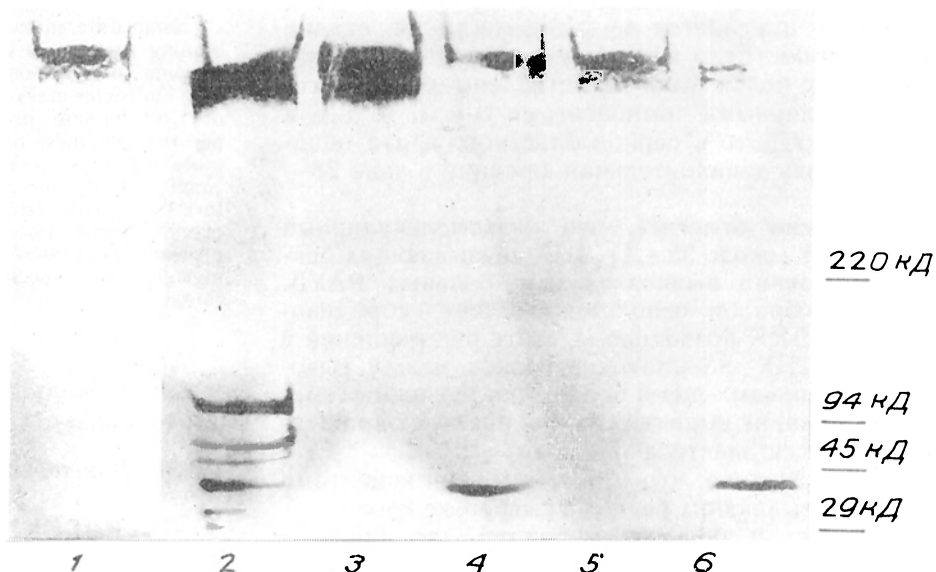
После инкубации с ³H-ДНК мембраны высушивали, импрегнировали ППО и экспонировали в течение 3—4 нед с рентгеновской пленкой при —40°C.

Результаты и обсуждение. Как показали наши исследования, использование на первой ступени выделения ДНК-связывающих белков сыворотки крови ионообменной хроматографии на QAE-сефадексе приводит к удалению из сыворотки большей части иммуноглобулинов, что обеспечивает в дальнейшем лучшие условия для аффинной хроматографии на ДНК-целлюлозе.

Изолированная аффинной хроматографией фракция ДНК-связывающих белков сыворотки составила, по нашим данным 2—3 % от общего количества сывороточных белков, что весьма близ-

Блот-гибридизация H^3 -ДНК с ДНК-связывающими белками сыворотки крови.

1 — здоровый человек; 2 — больной острым промиелоцитарным лейкозом; 3 — больной острым миелобластным лейкозом; 4 — больной рефрактерной анемией с увеличением бластов; 5 — больной хроническим миелолейкозом в хронической фазе; 6 — больной бластным кризом хронического миелолейкоза.



ко к результатам, полученным другими исследователями, по данным которых, на долю ДНК-связывающих белков в сыворотке крови приходится 1,5—2 % [4]. Нам не удалось обнаружить различий в количестве ДНК-связывающих белков сыворотки крови здоровых лиц и больных гематологическими заболеваниями.

Электрофоретический анализ ДНК-связывающих белков в нативных условиях выявил высокую гетерогенность этой группы протеинов. На окрашенных кумасси гелях обнаруживалось около 20 фракций, основная масса (5 фракций) которых была представлена белками с довольно высокой мол. м.—700—200 кД, а часть минорных компонентов локализовалась в зонах, соответствующих низкомолекулярным белкам,—100—20 кД. Денситометрия гелей не выявила скольнибудь значимых различий количественных или качественных между спектром ДНК-связывающих белков сывороток крови здоровых лиц и больных лейкозами.

Электрофорез после обработки белков ДСН и β -меркаптоэтанолом практически не изменял распределения белков по фракциям, что свидетельствует о преимущественном мономерном строении ДНК-связывающих белков, изолируемых на колонке с ДНК-целлюлозой.

Полученные нами результаты отличались от данных, представленных в работе [12]. Согласно данным этих авторов, ДНК-связывающие белки являются менее гетерогенными (2 мажорных белка с мол. м. 126 и 94 кД) и, кроме того, выявляются различия в их спектре между здоровыми людьми и больными опухолевыми заболеваниями.

С целью повышения специфичности идентификации ДНК-связывающих белков мы провели их детекцию после блоттинга с помощью H^3 -ДНК с последующей флюорографией (см. рисунок).

Результаты этих исследований показали, что на флюорограммах после блот-гибридизации выявляемые фракции ДНК-связывающих белков были представлены двумя мажорными компонентами с высокой мол. м.—530—760 и 350—430 кД, а в некоторых случаях в качестве минорных компонентов присутствовали белки с мол. м. 153 и 205 кД. Ни в одном случае мы не выявили на флюорограммах белков с мол. м. ниже 150 кД.

У больных острым миелобластным и лимфобластным лейкозом на флюорограммах обнаруживались только две полосы, соответствующие белкам с мол. м. 430 и 716 кД или 350 и 530 кД и не выявлялись белки с мол. м. от 150 до 200 кД. Однако, учитывая относительную трудность точного определения молекулярной массы высокомолекулярных белков, особенно после флюорографии, мы не можем с уверенностью говорить о различных спектрах ДНК-связывающих белков сыворотки крови между здоровыми людьми и больными лейкозами, тем более что минорные компоненты с мол. м. 150—200 кД в сыворотке крови здоровых людей выявлялись непостоянно и нельзя полностью исключить, что они являются продуктом деградации более высокомолекулярных фракций, хотя для предупреждения протеолиза в ходе выделения белков использовался такой весьма мощный ингибитор протеаз, как фенилметилсульфофлюорид.

Если при миелобластном и лимфобластном остром лейкозе спектр ДНК-связывающих белков сыворотки крови был близок к таковому в норме, то заметные различия были выявлены у больных острым промиелоцитарным лейкозом, где на флюорограммах, помимо двух мажорных компонентов в зоне 470—760 кД, присутствующих у всех обследованных лиц (здоровые и больные), были обнаружены 5 четких фракций в зоне 28—100 кД. В настоящее время трудно дать исчерпывающее объяснение этому факту, однако можно предположить следующее. В ряде работ [6, 10] показано, что по крайней мере часть ДНК-связывающих белков имеет отношение к белкам системы комплемента. Поскольку острый промиелоцитарный лейкоз сопровождается глубокими нарушениями системы свертывания крови, определенное участие в регуляции которой принадлежит и белкам комплемента [3, 5], выявленное нами появление в сыворотке крови больных острым промиелоцитарным лейкозом фракции ДНК-связывающих белков в зоне 28—100 кД может быть связано именно с данной группой протеинов, тем более что по своей молекулярной массе, судя по данным [10], они как раз и локализуются в этой зоне.

Фракционный состав ДНК-связывающих белков сыворотки крови у больных хроническим миело-

лейкозом изменяется в зависимости от стадии заболевания. Если в хронической фазе ДНК-связывающие белки были представлены двумя высокомолекулярными компонентами с мол. м. 716 и 530—430 кД, то в период бластного криза обнаруживалась дополнительная фракция в зоне 28—45 кД.

Интересно отметить, что низкомолекулярный компонент (около 35 кД) ДНК-связывающих белков постоянно выявлялся и у больных РАУБ.

Таким образом, использование блот-гибридизации с H^3 -ДНК позволило выявить ряд различий в спектре ДНК-связывающих белков между сывороткой здоровых лиц и больных отдельными гемобластозами, не выявляемых при анализе окрашенных кумасси электрофореграмм.

Было показано, что мажорными компонентами ДНК-связывающих белков в сыворотке крови здоровых лиц и больных являются две фракции высокомолекулярных протеинов. В норме, при остром миелобластном и лимфобластном лейкозе и хронической фазе хронического миелолейкоза ДНК-связывающие белки с мол. м. менее 150 кД не выявлялись. Однако при бластном кризе хронического миелолейкоза и у больных РАУБ обнаружена дополнительная фракция ДНК-связывающих белков с мол. м. около 30—40 кД.

Поскольку происхождение и функциональная роль большинства ДНК-связывающих белков сыворотки крови до сих пор не выяснены, мы вынуждены пока только констатировать этот факт и не можем дать его объяснение. Что касается расширения спектра ДНК-связывающих белков сыворотки крови при остром промиелоцитарном лейкозе за счет средне- и низкомолекулярных протеинов, то не исключено, что их происхождение связано каким-то образом с изменениями системы комплемента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Егорова В. П., Блинов М. Н., Абдулкадыров К. М. // Лаб. дело.— 1988.— № 6.— С. 38—40.
2. Козак В. В., Негрей Г. З., Шляховенко В. А. и др. // Гематол. и трансфузиол.— 1987.— № 11.— С. 32—34.
3. Кузник Б. И., Васильев Н. В., Цыбиков Н. Н. // Иммуногенез, гемостаз и неспецифическая резистентность организма.— М., 1989.— С. 126—151.
4. Подгородниченко В. К. // Вопр. мед. химии.— 1982.— № 5.— С. 63—67.
5. Blanco V. R., Isaac B. M., Linares M. J. et al. // Rev. cuba Hemat. Immunol. Hemother.— Vol. 4, N 3.— P. 78—86.
6. Brehm S. P., Hoch S. O., Hoch J. A. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1975.— Vol. 63, N 1.— P. 24—31.
7. Galvan L. // Cancer Res.— 1982.— Vol. 42, N 5.— P. 1555—1561.
8. Galvan L., Evans J. E., Comis R. L. et al. // Ibid.— P. 1562—1566.
9. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem.— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
10. Parsons R. G., Hoch A. J. // Europ. J. Biochem.— 1976.— Vol. 71.— P. 1—8.
11. Shalmon A. L., Shapiro B., Servi P. et al. // Europ. J. Cancer.— 1982.— Vol. 17, N 5.— P. 533—538.
12. Sylvia P. // Europ. J. Biochem.— 1975.— Vol. 63, N 1.— P. 24—30.

Поступила 05.11.90

DNA-BINDING PROTEINS OF BLOOD SERUM IN HEMOBLASTOSES.

V. A. Egorova, M. N. Blinov

Institute of Hematology and Blood Transfusion, St. Petersburg.

Some differences were detected in the spectrum of DNA-binding proteins in blood serum of healthy volunteers and of patients with various forms of hemoblastoses. Two fractions of high molecular mass proteins were found to be main components of DNA-binding proteins in blood serum of both healthy persons and these patients. The DNA-binding proteins with a molecular mass less than 150 kDa were not detected under conditions of normal state, in myeloblast and lymphoblast forms of acute leukemia and in chronic phase of chronic myeloleukemia. However, additional fraction of DNA-binding proteins about 30-40 kDa was found in blast crisis of chronic myeloleukemia and in refractory anemia with increase of blast forms.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.36-002-092.9-07:[616.438+616.411]-008.9.396.332

Ц. М. Шерешевская, А. И. Божков, Н. В. Ходорова

ГЕНЕТИЧЕСКИ ОБУСЛОВЛЕННЫЕ ВРЕМЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В ТИМУСЕ И СЕЛЕЗЕНКЕ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ГЕПАТИТЕ

Харьковский университет

Исследование индивидуальных особенностей течения патологических процессов и чувствительности к действию ксенобиотиков представляет интерес как для оптимизации процессов лечения, так и для изучения механизмов индивидуальной чувствительности. Для решения этих вопросов могут быть использованы инбредные и гибридные организмы. На линейных крысах и мышах обнаружены генетически обусловленные различия в метаболизме ксенобиотиков [10, 11], а гибридные обладают повышенной устойчивостью к ряду стрессовых факторов [2, 7]. Вместе с тем влияние генотипа на динамику патологических процессов исследовано недостаточно.

Одной из наиболее общих реакций организма на разнообразные повреждения ткани является реакция воспаления. При повреждении ткани возникают видоизмененные белки, чужеродные для организма, формирующие основу для включения в процесс иммунологических реакций [6]. Осуществление иммунного надзора при воспалении невозможно без пролиферации и дифференцировки клеток-предшественников, которые осуществляются прежде всего в селезенке, тимусе и костном мозге [3]. Можно полагать, что различия в устойчивости линейных и гибридных организмов к повреждающим агентам, которые приводят к воспалению, связаны с генетической детерминированностью процесса формирования клеток иммунной системы.

В задачу настоящей работы входило исследование динамики изменения содержания нуклеиновых кислот и активности ДНКаз в клетках селезенки и тимуса линейных и гибридных крыс при экспериментальном гепатите.

Методика. Эксперименты проводились на инбредных линиях крыс Вистар, Август и их гибридах (самки Вистар и самцы Август) первого поколения 3-месячного возраста. Гепатит индуцировали локальной гипертермией печени (45 °С, 10 мин) [1]. Экспериментальные и контрольные группы крыс умерщвляли под эфирным наркозом через 1, 2 и 3 ч после индукции гепатита. Из селезенки и тимуса выделяли ядра по известному методу с применением тритона X-100 [12].

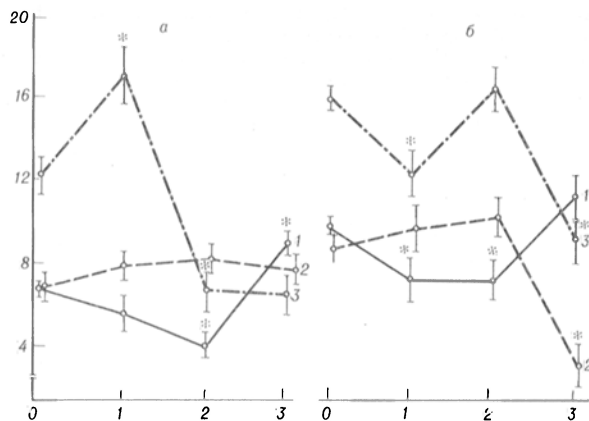


Рис. 1. Влияние локальной гипертермии печени на содержание ДНК (а) и РНК (б) в клетках селезенки крыс линии Вистар (1), Август (2) и их гибрида (3).

Здесь и на рис. 2: по оси абсцисс — время, ч; по оси ординат — содержание нуклеиновых кислот, мг на 1 г сырой ткани. Здесь и на рис. 2—4 звездочка — достоверная разница между опытным и контрольным вариантом ($p < 0,05$).

После трехкратной отмывки ядер от кислоторастворимого материала 5% хлорной кислотой РНК гидролизовали 0,3 н. раствором КОН в течение 18 ч при 37 °С, после чего экстрагировали ДНК кислотным гидролизом [9]. Количество ДНК и РНК определяли двухволновым методом на спектрофотометре СФ-46 [5]. Активность ДНКазы I и ДНКазы II определяли по методу [8]. Все эксперименты повторяли от 5 до 12 раз и полученные результаты обрабатывали статистически [4].

Результаты и обсуждение. В тимусе и селезенке постоянно образуется большое количество иммунокомпетентных клеток (лимфоцитов, макрофагов, нейтрофилов), поступающих в кровоток, большая часть из которых разрушается в этих органах [3]. Изменение количества нуклеиновых кислот и активности нуклеаз в тимусе и селезенке будет отражать интенсивность лимфопоэза.

В течение 8 ч после индукции гепатита наблюдаются в разной степени выраженные ритмические изменения содержания ДНК и РНК, характер этих временных изменений различен у исследуемых линейных и гибридных крыс (рис. 1, 2).

Так, через 1 ч от начала эксперимента количество ДНК в селезенке крыс линии Вистар и

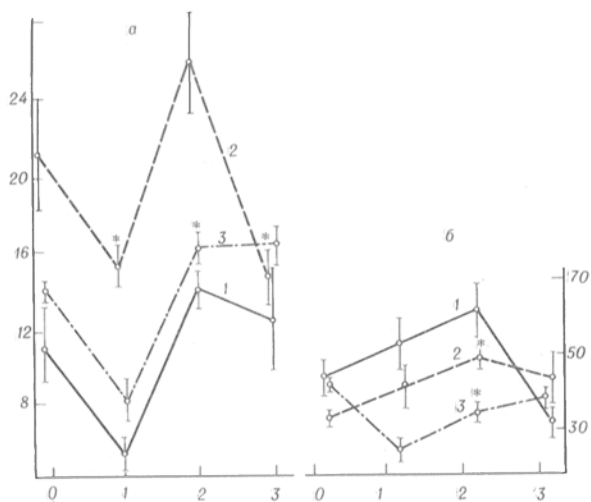


Рис. 2. Влияние локальной гипертермии на содержание РНК (а) и ДНК (б) в клетках тимуса крыс линии Вистар (1), Август (2) и их гибрида (3).

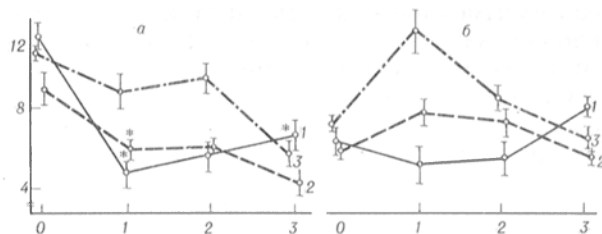


Рис. 3. Влияние локальной гипертермии печени на относительную активность ДНКазы I (а) и ДНКазы II (б) в клетках селезенки крыс линии Вистар (1), Август (2) и их гибридов (3).

Здесь и на рис. 4: по оси абсцисс — время, ч; по оси ординат — активность нуклеаз, усл. ед. на 1 мг сырой ткани.

Август уменьшалось по сравнению с исходным уровнем (контроль) и в дальнейшем до 3 ч оставалось на этом уровне. Небольшие изменения наблюдались и в содержании РНК в этом органе у линейных крыс. В селезенке гибридных крыс количество ДНК в первые 2 ч не изменялось по сравнению с контролем, а к 3 ч резко уменьшилось. Если у крыс линии Вистар и Август количество РНК в селезенке не изменялось через 1 и 2 ч по сравнению с контролем, то у гибридов содержание РНК в этом органе увеличивалось через 1 ч и затем уменьшалось. Различный временной характер изменения содержания нуклеиновых кислот у гибридных животных по сравнению с линейными приводил к превосходству гибридов по содержанию ДНК и РНК в селезенке в первые 2 ч после индукции гепатита (см. рис. 1).

Еще более выраженные временные различия в содержании нуклеиновых кислот у линейных и гибридных крыс выявлялись в тимусе после индукции гепатита. Результаты этих исследований представлены на рис. 2. Анализируя полученные результаты, необходимо отметить значительное превосходство гибридов по количеству ДНК и РНК в тимусе интактных животных по сравнению с родительскими линиями. Содержание ДНК и РНК в тимусе крыс линии Вистар и Август в первые 2 ч после индукции гепатита изменялось незначительно по сравнению с контролем. Через 3 ч от начала эксперимента количество ДНК и РНК в тимусе крыс линии Вистар увеличивалось, а у крыс линии Август уменьшалось содержание ДНК и оставалось неизменным содержание РНК. Хорошо выраженные ритмические изменения содержания ДНК и РНК наблюдались в это время в тимусе гибридных крыс (см. рис. 2).

Известно, что процесс созревания предшествен-

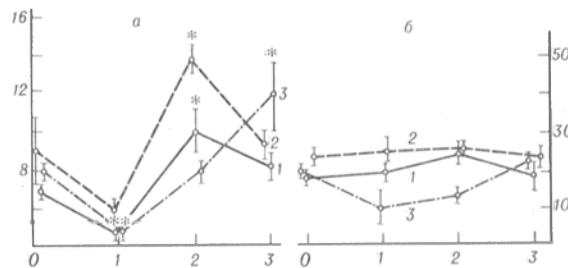


Рис. 4. Влияние локальной гипертермии печени на относительную активность ДНКазы I (а) и ДНКазы II (б) в клетках тимуса крыс линии Вистар (1), Август (2) и их гибридов (3).

ников иммунокомпетентных клеток в эмбриональном и взрослом организме генетически или фенотипически детерминирован [3]. Результаты, полученные в настоящих экспериментах, указывают на генетическую детерминированность лимфопоэза, реализация которого осуществляется в различных временных режимах.

Большое количество иммунокомпетентных клеток постоянно подвергается распаду в тимусе и селезенке, что сопровождается гидролизом нуклеиновых кислот, и прежде всего ДНК, с участием ДНКазы I и ДНКазы II, в связи с чем представлялось целесообразным исследовать активность этих ферментов. Определение относительной активности ДНКазы I в селезенке после индукции гепатита показало, что в течение 3 ч обнаруживается хорошо выраженный временной ритм изменения активности этого фермента у всех трех исследуемых генетических форм. Наибольшая активность ДНКазы I наблюдалась у гибридов, которая уравнивалась с линейными животными к 3 ч после начала эксперимента (рис. 3). Различный временной характер изменения относительной активности для линейных и гибридных крыс наблюдался и у ДНКазы II. Так, если в первые 2 ч этот показатель не изменялся у линейных крыс, то у гибридов он достоверно снижался по сравнению с исходным уровнем и с линейными животными (см. рис. 3).

Хорошо выраженные временные изменения наблюдались в активности ДНКазы I в тимусе линейных и гибридных крыс (рис. 4). Активность ДНКазы II в тимусе крыс при гепатите не изменялась во времени, за исключением гибридов, у которых активность этого фермента снижалась через 1—2 ч и была ниже по сравнению как с контролем, так и с родительскими линиями. Необходимо отметить, что самая низкая активность ДНКазы I и ДНКазы II в тимусе гибридов совпадала с наибольшим содержанием ДНК у них в это же время.

Таким образом, индивидуальная чувствительность организма к действию стрессовых факторов может определяться особенностями временного характера формирования иммунного надзора организма. Можно полагать, что генетическая детерминация и сводится к контролю процесса лимфопоэза во времени, который в конечном счете и определяет устойчивость линейных и гибридных животных к стрессовым факторам среды.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. с. 1411804 СССР, МКИ 09 В 23/28. Способ моделирования гепатита / Божков А. И., Шахбазов В. Г., Гонкалов В. Г. и др. // Открытия.— 1988.— № 27.
2. Григорьева Н. Н., Васильева Е. И., Шахбазов В. Г. // Вестн. Харьк. ун-та.— 1988.— № 313'88.— С. 48—50.
3. Лозовой В. П., Шергин С. М. Структурно-функциональная организация иммунной системы.— Новосибирск, 1981.
4. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика.— Минск, 1973.— С. 80—100.
5. Спирин А. С. // Биохимия.— 1958.— Т. 23, № 4.— С. 656—662.
6. Тринус Д. П., Клебанов Б. М., Сейфулла Р. Д. Фармакологическая реакция воспаления.— Киев, 1987.
7. Чепель Л. М., Акоста А. Ф. // Вестн. Харьк. ун-та.— 1988.— № 313'88.— С. 50—52.
8. Shanor B. C. Нуклеазы.— М., 1968.
9. Blobel G., Potter V. R. // Biochim. biophys. Acta.— 1968.— Vol. 166, N 1.— P. 48—57.

10. Hoyt D. G., Lazo J. S. // J. Pharmacol. exp. Ther.— 1988.— Vol. 246, N 2.— P. 765—771.
11. Mansour H., Levacher M., Azoulay-Dupuis E. et al. // J. appl. Physiol.— 1988.— Vol. 64, N 4.— P. 1376—1381.
12. Wagner L., Drews J. // Europ. J. Cancer.— 1970.— Vol. 6.— P. 465—476.

Поступила 10.10.91

GENETIC DETERMINATION OF TIME-DEPENDENT ALTERATIONS IN CONTENT OF NUCLEIC ACIDS IN THE THYMUS AND SPLEEN OF RATS WITH HEPATITIS.

Ts. M. Shereshevskaya, A. I. Bozhkov, N. V. Khodorova

State University, Kharkov.

Content of nucleic acids as well as activity of DNAases I and II were studied in spleen and thymus cells of linear and hybrid rats with hepatitis. Rhythmic alterations in content of DNA and RNA as well as in the activity of DNAases were detected in spleen and thymus cells within 3 hrs after hepatitis induction. These time-dependent alterations of the patterns studied were dissimilar in linear and hybrid strains of rats. Genetic determination of immune responses appears to be involved in regulation of time-dependent properties of lymphopoiesis, which was responsible, finally, for dissimilar resistance of linear and hybrid rats to stress factors and for development of pathological states.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.72-002.77-039-07:616.153.1

Т. Г. Данилова, Л. В. Платонова, Т. С. Пасхина

СОСТОЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРОТЕАЗНО-ИНГИБИТОРНОЙ СИСТЕМЫ КРОВИ И СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ

Ярославский медицинский институт, Институт биологической и медицинской химии РАМН, Москва

В настоящее время не вполне ясно, чем обусловлены нарушение адаптации, дефекты неспецифических факторов защиты организма в процессах инициации и развития тканевого повреждения при ревматоидном артрите. Это может быть результатом аномалий формирования нейтрофильных гранулоцитов, в частности их первичных и вторичных гранул [2, 3]. Катионные белки, в том числе эластаза как составляющий элемент первичных и вторичных гранул, рассматриваются в качестве «молекулярного барьера», с одной стороны, и как повреждающий агент — с другой [2]. Эластаза гранулоцитов гидролизует коллагены всех типов; она ответственна за деградацию хрящевого и костного матрикса, деструкцию окружающих тканей, что способствует хронизации воспалительного процесса [1, 3, 6, 8, 9, 12, 13]. Активность протеолитических ферментов регулируется уровнем специфических белков — ингибиторов протеиназ [6, 7]. Среди ингибиторов наиболее значимыми являются кислотолабильные (α -1-ингибитор протеиназ) и полифункциональные кислотостабильные ингибиторы (производные интер- α -ингибитора трипсина) протеиназ гранулоцитов [6, 8]. Вышеуказанные ингибиторы играют важную роль в ограничении тканевого повреждения протеазами лейкоцитов, освобождающимися при воспалении. Предполагается, что протекторный эффект α -1-ингибитора протеиназ и интер- α -трипсин-ингибитора обусловлен предупреждением

Изменение показателей протеазно-ингибиторной системы крови и синовиальной жидкости у больных ревматоидным артритом

Группа обследованных	Компоненты протеазно-ингибиторной системы			Белок, мг/мл
	эластазоподобная активность, нмоль/мл	АТА, ИЕ/мл	КСИ-АТА, ИЕ/мл	
1. Здоровые (n=12)	101,91±3,80	24,46±1,10	1,45±0,14	
2. Больные ревматоидным артритом (n=26)	132,64±4,39	38,59±1,66	3,79±0,19	
3. Больные ревматоидным артритом (синовиальная жидкость) (n=11)	166,77±3,92	18,06±1,27	1,02±0,21	58,44±5,19
p_{1-2}	<0,05	<0,05	<0,05	
p_{1-3}	<0,05	<0,05	<0,05	
p_{2-3}	<0,05	<0,05	<0,05	

тотальной дегрануляции и разрушения клеток, а также предохранением глюконовой кислоты от деполимеризации активированными фагоцитами [10, 14]. При ревматоидном воспалении не существует адекватной реакции взаимодействия протеолитической системы лизосом и их ингибиторов [7].

Данные относительно уровня эластазы, α -1-ингибитора протеиназ и интер- α -трипсин-ингибитора крови и синовиальной жидкости при ревматоидном артрите немногочисленны и противоречивы. По данным одних авторов [7, 14, 16], выявлено повышение уровня эластазы и названных ингибиторов в активную фазу ревматоидного артрита, что позволяет рассматривать ингибиторы как белки острой фазы воспаления; по данным других [11], изменений содержания ингибиторов не зафиксировано.

Цель работы — исследование состояния протеазно-ингибиторной системы крови и синовиальной жидкости (эластазы, α -1-ингибитора протеиназ, кислотостабильных ингибиторов) у больных ревматоидным артритом в активную фазу заболевания и оценка информативности изучаемых показателей для определения эффекта фармакотерапии.

Методика. Обследовано 26 больных ревматоидным артритом (6 мужчин и 20 женщин в возрасте от 25 до 64 лет). Диагноз был поставлен согласно диагностическим критериям Американской ревматологической ассоциации. Группу сравнения составили 12 здоровых человек примерно того же возраста. По давности заболевания больные распределялись следующим образом: до 2 лет — 6, от 3 до 10 лет — 14, более 10 лет — 6 пациентов. Активность ревматоидного артрита I степени была диагностирована у 4, II степени — у 20, III степени — у 2 больных. Рентгенологически у 12 че-

ловек констатирован I—II, у 14 — III—IV стадия болезни. Серопозитивный ревматоидный артрит определен у 15, серонегативный — у 6 пациентов. У большинства больных [20] течение заболевания было расценено как медленно прогрессирующее. Ревматоидный артрит по типу полиартрита отмечен у 22, с системными проявлениями — у 4 человек. У 11 из обследованных больных исследована синовиальная жидкость.

Кровь для исследования брали натощак из локтевой вены, синовиальную жидкость — из коленного сустава. Плазму крови и синовиальную жидкость хранили при температуре -18°C . В работе использовали нитрофениловый эфир N-бутилокси-карбонил-L-аланина (БАНЭ), этиловый эфир N-бензоил-L-аргинина фирмы «Реанал» (Венгрия), трипсин фирмы «Снофа» (Чехо-Словакия).

Эластазоподобную активность измеряли методом [18]. К 0,05 мл плазмы крови или синовиальной жидкости добавляли 2,85 мл 0,05 М Na-фосфатного буфера pH 6,5 и 0,1 мл 10^{-2} М БАНЭ. Изменение оптической плотности определяли спектрофотометрически при 347,5 нм, 25°C в течение 15 мин. Активность эластазоподобных протеиназ выражали в наномолях гидролизованного БАНЭ за 1 мин на 1 мл биологической жидкости или 1 мг белка.

Антитриптическую активность (АТА) или активность α -1-ингибитора протеиназ плазмы крови и синовиальной жидкости определяли методом [5]. АТА выражали в условных ингибиторных единицах (ИЕ), принимая за 1 ИЕ такое количество биологической жидкости, которое тормозит активность 1 Е трипсина, отнесенных к 1 мл исследуемой жидкости или к 1 мг белка.

Кислотостабильную АТА (КСИ-АТА) плазмы крови определяли методом [4]. КСИ-АТА выражали в ингибиторных единицах, отнесенных к 1 мл плазмы крови. КСИ-АТА синовиальной жидкости определяли следующим образом: к 1 мл синовиальной жидкости, разведенной в 20 раз физиологическим раствором, добавляли 0,2 мл 0,5 М ацетатного буфера pH 3,85 и инкубировали 30 мин при 80°C , затем нейтрализовали добавлением 0,2 мл 0,5 н. NaOH, добавляли 0,5 мл 0,05 М трис-HCl-буфера pH 8,0 и далее определение проводили, как описано в методике [4].

Белок в синовиальной жидкости определяли методом [15].

При статистической обработке материала использован метод сравнения средних арифметических двух выборок с применением критерия Стьюдента.

Таблица 2

Состояние протеазно-ингибиторной системы крови больных ревматоидным артритом при лечении различными лекарственными препаратами

Лекарственный препарат	Показатели протеазно-ингибиторной системы		
	эластазоподобная активность, нмоль/мл	АТА, ИЕ/мл	КСИ-АТА, ИЕ/мл
1. Салазопиридазин в сочетании с ортофеном, лечение с положительным эффектом (n=13):			
до лечения	135,79±7,33	39,69±1,46	3,87±0,17
после лечения	104,16±5,20	32,08±1,82	3,09±0,24
p_1	<0,05	<0,05	<0,05
2. Ортофен, лечение с положительным эффектом (n=7):			
до лечения	130,51±8,32	41,14±5,02	4,30±0,47
после лечения	114,26±7,47	31,49±2,62	2,93±0,29
p_2	>0,05	>0,05	>0,05
3. Ортофен, лечение без эффекта (n=6):			
до лечения	128,3±7,83	33,22±3,31	3,00±0,46
после лечения	134,65±6,67	38,15±5,35	3,99±0,65
p_3	>0,05	>0,05	>0,05

Результаты и обсуждение. При ревматоидном артрите по сравнению с нормой в плазме крови выявлено достоверное увеличение эластазоподобной активности, активности α -1-ингибитора протеиназ, кислотостабильных ингибиторов (табл. 1). В синовиальной жидкости зафиксировано увеличение эластазоподобной активности и снижение АТА и КСИ-АТА ($p < 0,05$). Уровень эластазоподобной активности в синовиальной жидкости выше, чем в плазме крови ($p < 0,05$), что можно объяснить поступлением протеолитических ферментов из лейкоцитов локально в очаге воспаления. Резкое снижение изучаемых ингибиторов в синовиальной жидкости, вероятно, связано с затруднением проникновения их из плазмы крови (где они находятся в большом количестве, компенсаторно, как белки острофазового ответа) в полость сустава, особенно на границе паннус — грящ. Все это создает благоприятные условия для деструкции тканей протеазами гранулоцитов. Данные о содержании белка в синовиальной жидкости представлены в табл. 1.

Имеют место достоверное увеличение активности эластазы крови ($106,92 \pm 5,36$ и $137,32 \pm 4,43$ нмоль/мл; $p < 0,05$), тенденция к увеличению активности α -1-ингибитора протеиназ крови ($35,15 \pm 3,72$ и $39,21 \pm 1,87$, $p > 0,05$) по мере повышения степени активности воспалительного процесса при I и II, III (объединенных в одну группу) степени активности соответственно. При анализе кислотостабильных ингибиторов крови уровень их не зависел от степени активности заболевания ($3,88 \pm 0,52$ и $3,77 \pm 0,22$ ИЕ/мл; $p > 0,05$). Иммунологическая характеристика заболевания не оказывает значимого влияния на изучаемые показатели ($p > 0,05$): активность эластазы $133,53 \pm 6,41$ и $131,21 \pm 5,84$ нмоль/мл, АТА $38,82 \pm 1,80$ и $38,22 \pm 3,50$ ИЕ/мл, КСИ-АТА $3,77 \pm 0,27$ и $3,81 \pm 0,28$ ИЕ/мл — при серопозитивном и серонегативном вариантах ревматоидного артрита соответственно.

Значимых различий не зафиксировано также при анализе влияния на исследуемые показатели на разных рентгенологических стадиях заболевания: активность эластазы $137,47 \pm 7,52$ и $128,50 \pm 5,26$ нмоль/мл, АТА $39,70 \pm 3,16$ и $37,63 \pm 1,70$ ИЕ/мл, КСИ-АТА $3,54 \pm 0,21$ и $4,00 \pm 0,31$ ИЕ/мл — при I—II и III—IV рентгенологических стадиях соответственно ($p > 0,05$).

Вышеуказанные компоненты протеазно-ингибиторной системы крови были исследованы в динамике (через 4 нед) под влиянием лечения ортофеном (75 мг в сутки) у 13 больных и ортофеном в той же дозе в сочетании с базисной терапией салазопиридазином 2 г в сутки у 13 больных. Обе группы пациентов были однородны. У 13 больных ревматоидным артритом под влиянием фармакотерапии салазопиридазином в сочетании с ортофеном отмечали четкий положительный клинический эффект, что согласуется с данными литературы [17]. Это сопровождалось достоверным уменьшением эластазоподобной активности, АТА и кислотостабильных ингибиторов крови ($p < 0,05$; табл. 2). У 7 больных ревматоидным артритом в результате лечения ортофеном, несмотря на положительную клиническую динамику, отмечается лишь тенденция к нормализации

изучаемых показателей протеазно-ингибиторной системы крови.

Эффект считали положительным при исчезновении или значительном уменьшении боли и утренней скованности, уменьшении припухлости и числа воспаленных суставов, снижении суставного индекса, функционального теста Ли, уменьшении окружности проксимальных межфаланговых суставов и увеличении силы сжатия кисти.

У 6 больных ревматоидным артритом после лечения только ортофеном не отмечено существенной динамики в клинических проявлениях и достоверного изменения изучаемых показателей не выявлено.

Эффективность комбинации салазопиридазина и ортофена обусловлена, очевидно, антибактериальным и противовоспалительным действием салазопиридазина, способностью его легко проникать через гистогематические барьеры и дополнительным воздействием ортофена на усиление хемотаксиса при отрицательном влиянии на адгезивную способность нейтрофильных лейкоцитов [3].

Таким образом, в активную фазу ревматоидного артрита нарушается ферментативно-ингибиторный баланс в организме, что проявляется увеличением активности эластазы и (компенсаторно) ингибиторов крови. Наиболее выраженные изменения отмечаются локально в синовиальной жидкости, где более высокий уровень эластазы сопровождается значительным дефицитом ингибиторного потенциала. У больных ревматоидным артритом с четким положительным клиническим эффектом при проведении базисной терапии салазопиридазином в сочетании с ортофеном отмечается положительная динамика изучаемых показателей протеазно-ингибиторной системы крови, что позволяет считать их достаточно информативными для оценки фармакотерапии и рекомендовать к применению в лечебной практике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агабабова Э. Р. // Клини. мед.— 1991.— № 7.— С. 117—121.
2. Мазинг Ю. А. // Вопр. мед. химии.— 1990.— № 6.— С. 8—10.
3. Малиновская Е. И. // Ревматология.— 1988.— № 2.— С. 63—68.
4. Нартикова В. Ф., Оглоблина О. Г., Якубовская Р. И. и др. // Современные методы в биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича.— М., 1977.— С. 192—204.
5. Нартикова В. Ф., Пасхина Т. С. // Биохимия.— 1970.— Т. 35.— С. 187—195.
6. Платонова Л. В. Сериновые протеиназы гранулоцитов человека; ингибирование кислотостабильными производными интерингибитора трипсина: Дис. ... канд. биол. наук.— М., 1984.
7. Руденко В. Г. Протеолитические ферменты и их ингибиторы при артритах: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.— М., 1988.
8. Руденко В. Г., Руденко Ю. В. // Ревматология.— 1990.— № 4.— С. 42—50.
9. Фишер А. А., Ионов А. Ю., Шубич М. Г. // Там же.— С. 22—29.
10. Шпак С. И., Проценко В. А., Харченко В. З. и др. Ингибиторы ферментов протеолиза — протекторы системы тканевых базофилов // Рукопись деп. в Крым. мед. ин-те 10P92 Деп.— Симферополь, 1990.
11. Crowe W. G., Hug G., Chuck G. et al. // Arthr. a. Rheum.— 1982.— Vol. 25, N 8.— P. 1010—1012.
12. Dessureault M., Carlette S. // Triangle.— 1989.— Vol. 28, N 1—2.— P. 5—14.
13. Fehr K., Baici A., Velvart M. et al. // Bull. Schweiz. Akad. med. Wiss.— 1979.— Bd 75, N 4—6.— S. 317—327.

14. *Hutadilok N., Ghost P., Brooks P. M.* // *Ann. rheum. Dis.*— 1988.— Vol. 47, N 5.— P. 377—385.
15. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* // *J. biol. Chem.*— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
16. *Schnebli H. P., Virca E. D.* // *European Congress of Rheumatology, 10-th: Abstracts.*— Moscow, 1983.— N 154.— P. 64.
17. *Treves R., Morvan C., Bitande P. et al.* // *Rev. Rhum.*— 1988.— Vol. 55, N 9.— P. 641—646.
18. *Vesser L., Blout E. R.* // *Biochim. biophys. Acta.*— 1972.— Vol. 268.— P. 257—260.

Поступила 25.12.91

SOME PARAMETERS OF THE PROTEASE-INHIBITORY SYSTEM IN BLOOD AND SYNOVIAL FLUID IN RHEUMATOID ARTHRITIS.

T. G. Danilova, L. V. Platonova, T. S. Pashkina

Medical Institute Yaroslavl, Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the Russian Federation, Moscow.

Elastase-like activity, α_1 -inhibitor of proteinases and acid stable antitryptic activity were studied in blood of 26 patients and in synovial fluid of 11 patients with rheumatoid arthritis during acute stage of the disease and after treatment with salase pyridasine and orthophene. The higher values of the elastase-like activity were detected in synovial fluid as compared with that of blood. In blood of these patients, hyperproduction of α_1 -inhibitor of proteinases and acid stable inhibitors was observed, while deficiency of these substances occurred in synovial fluid. Distinct decrease in the patterns of the blood protease-inhibitory system studied simultaneously with clear positive clinical effect were observed after treatment with salase pyridasine together with orthophene; estimation of these patterns may be used in the evaluation of the therapy.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.831-008.94-092.9]-02:547.262]-07

А. М. Балашов, О. Б. Петриченко, Т. Н. Алябьева, Л. Ф. Панченко

ОПИАТНАЯ РЕЦЕПЦИЯ В ГОЛОВНОМ МОЗГУ КРЫС: ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ АЛКОГОЛЯ И РЕАФЕРОНА

Институт медико-биологических проблем наркологии ГНЦ наркологии, Москва

С открытием в первой половине 70-х годов опиатных рецепторов (ОР) и их эндогенных лигандов [14, 16, 18] в научной литературе стали появляться предположения о возможной патогенетической роли опиоидной системы (ОС) в развитии наркологических заболеваний; при этом значительное внимание уделялось изучению алкоголизма [13, 20]. Вскоре эти взгляды стали получать экспериментальное подтверждение, и к настоящему времени накоплено значительное количество фактов, свидетельствующих о влиянии алкоголя на опиоидергические процессы [8, 19]. Постулируется, что этанол через изменение фазового состояния плазматических мембран способен нарушать как выброс эндогенных опиоидных пептидов, так и их рецепцию в клетках-мишенях [2, 15]. С патогенетической точки зрения особую значимость имеют события, протекающие в пределах центральной нервной системы. Поэтому в настоящей работе объектом исследования были выбрана ткань головного мозга.

С другой стороны, в последнее время интенсивно изучается нейротропная активность целого ряда лимфокинов, в том числе α -интерферона

(ИФ) [9, 17]. Получены данные, свидетельствующие как о способности этого иммунного полипептида модифицировать действие аддитивных веществ, так и о возможности его непосредственного взаимодействия с ОР мозга [1, 11]. Это послужило основанием для предположения о том, что эндогенный ИФ может играть в организме роль соединения, предотвращающего развитие зависимости от опиоидных пептидов в физиологических условиях [12] и, следовательно, введенный экзогенно, может быть средством терапии при наркоманиях, например при алкоголизме. Если указанное предположение верно, то необходимым условием его реализации должен явиться факт нормализации ИФ состояния системы (или систем), функции которых нарушаются при введении алкоголя. Поскольку полагают, что воздействие алкоголя на ОС представляет собой ключевое звено развития алкоголизма [2, 19], с учетом вышеизложенного представляется необходимым исследовать влияние ИФ на ОС алкоголизованных крыс; в настоящей работе в качестве критерия оценки состояния ОС использовали связывающие характеристики ОР.

Методика. Эксперименты выполнены на самцах белых лабораторных беспородных крыс с начальной массой 80—120 г.

Для моделирования хронической алкогольной интоксикации животным предоставляли 15 % раствор алкоголя в качестве единственного источника жидкости без ограничений в потреблении корма. Общая продолжительность алкоголизации составила 14 мес. Животных за 1,5 мес до забоя разделили на 2 группы. 1-я группа ежедневно получала внутривенные инъекции 10^4 МЕ ИФ, 2-я — эквивалентные количества физиологического раствора, служившего растворителем для препарата. Последнее введение препарата проводили за 1 ч до забоя животных. Крыс каждой группы исследовали как в состоянии алкогольной интоксикации (1 ч после отмены алкоголя), так и через 24 ч после отмены алкоголя.

Связывающую активность ОР определяли в суммарном препарате мембран клеток головного мозга с помощью равновесного радиорецепторного анализа при этом последовательность методических приемов соответствовала описанной ранее методике [3]. Математическую обработку результатов проводили, учитывая гетерогенность популяции ОР и взаимное влияние различных их типов на величину выявляемых параметров [4, 5]. Статистический анализ данных осуществляли по Стьюденту. Концентрацию белка в препаратах мембран определяли по Лоури с предварительной обработкой проб дезоксихололом натрия.

В работе использовали следующие реактивы: меченные по тритию налоксон (52 Ки/ммоль) и D-ала²-энкефалин (5-D-лей) (ДАДЛ, 36 Ки/ммоль) производства фирмы «Amersham» (Англия), немеченый ДАДЛ фирмы «Serwa» Германия; неспецифический ингибитор протеаз бацитрацин — «холодный» налоксон и трис — фирмы «Sigma» (США). Препарат рекомбинантного ИФ реаферон производства НИО «Биопрепарат». Остальные реактивы были отечественного производства с квалификацией х. ч. и о. ч.

Результаты и обсуждение. В табл. 1 приведены результаты определения связывающих характеристик ОР головного мозга крыс после длительной алкоголизации. В качестве лиганда рецепторов использован ^3H -ДАДЛ, предпочтительно реагирующий с δ -рецепторами [3]. Поскольку в использованных условиях лиганд связывался с двумя типами рецепторов, высокоаффинное взаимодействие отражает δ -связывание, тогда как низкоаффинный компонент описывает связывание с μ -рецепторами. Представленные данные свидетельствуют о неизменности параметров комплексообразования ^3H -ДАДЛ с δ -рецепторами во всех исследованных случаях, что подтверж-

Таблица 2

Параметры комплексообразования ³H-налоксона с ОР

Группа животных	K _d , пМ	B _{макс} , фмоль/мг
Контроль:		
— реаферон	1,76±0,23	252±52
+ реаферон	1,68±0,14	312±32
Алкоголь:		
интоксикация:		
— реаферон	1,32±0,21	205±19
+ реаферон	1,87±0,16	338±18
отмена:		
— реаферон	2,93±0,36*	268±62
+ реаферон	1,39±0,10°	248±9

дает полученные прежде результаты [8]. В то же время хроническая алкогольная интоксикация сопровождалась изменением сродства низкоаффинных связывающих участков, выраженность которого была несколько большей при отмене этанола; необходимо отметить, что увеличение величины равновесной константы диссоциации наблюдалось на фоне постоянного содержания μ -рецепторов в тканях мозга. Влияние алкоголизации на рецепцию μ -селективного лиганда налоксона имело сходный характер, хотя достоверное снижение сродства было отмечено лишь при отмене алкоголя (табл. 2).

У животных, получавших ИФ и забитых в состоянии алкогольной интоксикации, не было выявлено изменений параметров рецепции для обоих используемых лигандов по сравнению с соответствующими группами «плацебо» (обозначены в таблицах как «—реаферон»). Реаферон не влиял также на исследованные характеристики у контрольных крыс. В то же время наблюдалась полная нормализация сродства μ -рецепторов у животных, забитых через сутки после отмены этанола, о чем свидетельствуют данные радиорецепторного анализа для обоих исследованных лигандов.

Полученные результаты об изменениях связывающих параметров ОР под действием этанола в принципиальном плане достаточно хорошо согласуются с данными литературы [19]. Однако необходимо отметить, что в этом вопросе существуют значительные противоречия, в основном имеющие отношение к описанию реакций со стороны различных типов связывающих участков, что, вероятно, связано с плохой изученностью более общей проблемы гетерогенности рецепто-

ров. Конкретные причины получения разнородных результатов, по-видимому, обусловлены различиями в методах, применяемых в разных лабораториях в наркологических экспериментах. Вместе с тем в литературе практически отсутствуют работы, авторы которых не описывали бы изменений со стороны ОР после нагрузок этанолом. Обсуждаемые данные подтверждают предположение о вовлеченности ОР в механизмы развития фармакологических эффектов этилового алкоголя.

Факт нормализации ИФ сродства μ -ОР у алкоголизованных крыс требует объяснения по крайней мере в двух направлениях. Во-первых, эффект регистрируется лишь при отмене этанола, когда алкоголь в значительных концентрациях уже отсутствует в крови. Во-вторых, требует ответа вопрос о возможных механизмах нормализующего рецепцию действия ИФ.

Известно, что в основе многочисленных биохимических, в том числе нейрохимических эффектов, вызываемых этиловым спиртом лежит его способность к неспецифическому взаимодействию с биологическими мембранами [15]. Этанол, растворяясь в липидном матриксе мембран, повышает их текучесть и тем самым способствует увеличению количества степеней свободы мембранно-связанных белковых макромолекулярных комплексов. Следствием этого, вероятно, является снижение конформационной стабильности указанных молекул, сопровождающееся, в частности, нарушением сродства рецепторов. Хроническое потребление алкоголя приводит к компенсаторным модификациям химического состава мембран с соответствующими изменениями функционального состояния ассоциированных с ними белков [10]. Исходя из этого, можно полагать, что полученные результаты свидетельствуют о стабилизирующем действии ИФ в отношении конформации ОР, причем препарат эффективен только при купировании нарушений, вызванных вышеуказанными адаптивными перестройками мембран. Вероятно, фиксация ИФ пространственной конфигурации ОР в присутствии молекул этилового спирта является недостаточной для преодоления его мембранотропного действия.

Согласно современным представлениям о рецепции, собственно взаимодействие лиганда со связывающим участком приводит к стабилизации последнего в определенном конформационном состоянии. В соответствии с этим для объяснения

Таблица 1

Параметры комплексообразования ³H-ДАЛЛ с ОР

Группа животных	Высокоаффинные участки		Низкоаффинные участки	
	K _d , пМ	B _{макс} , фмоль/кг	K _d , пМ	B _{макс} , фмоль/кг
Контроль:				
— реаферон	0,93±0,29	78±17	15,2±1,2	204±22
+ реаферон	0,63±0,05	92±11	12,2±0,7	288±14
Алкоголь:				
интоксикация:				
— реаферон	0,91±0,07	89±6	25,8±1,3*	287±27
+ реаферон	0,80±0,08	70±12	25,2±2,5**	337±45
отмена:				
— реаферон	0,61±0,09	80±13	34,3±5,5*	293±42
+ реаферон	0,74±0,02	96±14	14,2±1,5°	291±16

Примечание. Представлены результаты 5 независимых экспериментов по каждой группе. Здесь и в табл. 2: одна звездочка — результаты с вероятностью не менее 0,95 отличаются от группы «контроль — реаферон», две звездочки — от группы «контроль + реаферон»; кружок — от соответствующей группы, не получавшей реаферона.

полученных результатов естественным выглядит предположение о возможности непосредственного связывания с ОР. На эти свойства иммунного полипептида указывают также данные литературы, так в экспериментах *in vivo* было продемонстрировано, что ИФ при центральном введении оказывает β -эндорфиноподобное действие [9]. С другой стороны, прямое определение характера взаимодействия ИФ с ОР в биохимической тест-системе позволяет сделать вывод об антагонизме интерферона и морфина, при этом препарат обладал выраженной предпочтительностью по отношению к δ -рецепторам [1]. Таким образом, ответ на вопрос о механизмах нормализующего рецепцию действия ИФ представляется дискуссионным.

В самом деле, если полипептид взаимодействует с ОР как агонист, то в силу известного механизма саморегуляции рецепторных систем [7] при его хроническом введении должна иметь место десенситизация связывающих участков, чего не наблюдается в эксперименте. Если же он действует по антагонистическому механизму, то с учетом селективности связывания становится вообще необъяснимой последующая реакция только μ , но не δ -рецепторов. Следовательно, известные из литературы классические способы связывания веществ с активным центром ОР не способны с достаточной достоверностью объяснить полученные экспериментальные данные. Объяснение может быть найдено, исходя из возможности нетривиального способа влияния ИФ на рецепторы, а именно их аллостерической регуляции [6]. В этом случае в вышеприведенных рассуждениях о конформационной стабилизации ОР за счет связывания ИФ необходимо учитывать, что взаимодействие осуществляется в локусе, отличном от связывающего лиганда центра. Таким образом, полученные результаты могут свидетельствовать в пользу предположения о существовании механизма аллостерической регуляции ОР, более того, этот механизм представляется функционально значимым для обеспечения работы ОС и может быть использован для создания средств терапии наркоманий.

- H. Yoshida, Y. Hagiwara, S. Ebashi.— New York, 1982.— Vol. 1.— P. 67—76.
 14. Hughes J. // Brain Res.— 1975.— Vol. 88.— P. 295—308.
 15. Littleton J. M. // Brit. J. Alcohol. Alcoholism.— 1979.— Vol. 14.— P. 23—26.
 16. Pert C. B., Snyder S. H. // Science.— 1973.— Vol. 179.— P. 1011—1014.
 17. Reyes-Vazquez C., Weisbrodt N., Dafny N. // Life Sci.— 1984.— Vol. 35.— P. 1015—1021.
 18. Terenius L. // Acta pharmacol. (Kbh.).— 1973.— Vol. 32.— P. 313—316.
 19. Trachtenberg M. C., Blum K. // Amer. J. Drug Alcohol. Abuse.— 1987.— Vol. 13.— P. 365—372.
 20. Van Ree J. M., de Wied D. // Neurotoxicology / Eds K. Blum, L. Manzo.— New York, 1985.— P. 135—162.

Поступила 15.07.91

OPIATE RECEPTION IN THE RAT BRAIN: EFFECT OF CHRONIC CONSUMPTION OF ALCOHOL AND REAFERON.

A. M. Balashov, O. B. Petrichenko, T. N. Alyabyeva, L. F. Panchenko

Institute of Biomedical Problems in Addiction, State Centre of Addiction, Moscow.

Binding properties of opiate receptors were studied in brain tissue of alcoholized rats after administration of the interferon-derived drug reaferon using equilibrium radioreceptor assay. Chronic alcohol intoxication was accompanied by a decrease in affinity of opiate μ -receptors for ligands in the animals with alcohol intoxication and ethanol withdrawal. Alterations in parameters of δ -reception and in content of μ -receptors were not found. Daily administration of reaferon at a dose of 10^4 U within 1.5 month did not affect these impairments, observed in rats, studied in intoxication. However, the drug reduced completely the alcohol effect on receptors during the withdrawal period. Possible normalizing effects of reaferon on the state of opiate receptors are discussed.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.155.392-07:616.155.32-02:615.357

В. П. Иванова, Е. И. Сорочинская, Т. К. Ложкина

ВЛИЯНИЕ НОВЫХ СИНТЕТИЧЕСКИХ ФРАГМЕНТОВ ТИМУСНЫХ ГОРМОНОВ НА ПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ ОТВЕТ ЛИМФОЦИТОВ

Санкт-Петербургский университет, Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург

Наряду с признанными регуляторами иммунного ответа функцию иммунорегуляторов могут выполнять соединения, которые представляют собой фрагменты белков и пептидов, выполняющих иные функции в организме [1, 6]. Принципиальная возможность существования в организме таких иммуноактивных пептидных фрагментов создаст предпосылки для поиска новых иммуномодулирующих пептидов в аминокислотных последовательностях белков с разнородными физиологическими функциями. Проведенный нами ранее [2] сравнительный компьютерный анализ белков позволил выявить пептидные фрагменты протяженностью от 4 до 5 аминокислотных остатков, встречающихся одновременно как в первичных структурах иммунологически активных соединений, так и в последовательностях других белков животного и растительного происхождения. Нами были отобраны и синтезированы пептиды Glu — Lys — Phe — Asp — Lys (соответствующий фрагментам 41—45 миоглобина человека и 134—138 β -лактоглобулина коровы), Phe — Asp — Lys — Ala (соответствующий фрагменту 136—139 β -лак-

ЛИТЕРАТУРА

1. Алябьева Т. Н., Балашов А. М., Панченко Л. Ф. // Нейрохимия.— 1988.— Т. 7.— С. 73—77.
2. Анохина И. П., Балашов А. М., Коган Б. М., Панченко Л. Ф. // Вопр. наркол.— 1989.— № 3.— С. 3—11.
3. Балашов А. М., Брусов О. С., Балакирева Н. П., Панченко Л. Ф. // Биохимия.— 1981.— Т. 46, № 6.— С. 1067—1072.
4. Варфоломеев С. Д., Зайцев С. В., Мевх А. Т. // Итоги науки и техники. Биоорганическая химия.— 1985.— Т. 3.
5. Дегтярь В. Г., Милосердов Ю. В. // Вопр. мед. химии.— 1987.— № 3.— С. 121—126.
6. Панченко Л. Ф., Алябьева Т. Н., Петриченко О. Б. и др. // Бюл. eksper. биол.— 1988.— № 9.— С. 307—309.
7. Панченко Л. Ф., Балашов А. М. // Вестн. АМН СССР.— 1986.— № 8.— С. 18—22.
8. Anokhina I. P., Brusov O. S., Nechaev N. V. et al. // Alcohol Alcoholism.— 1983.— Vol. 18.— P. 21—26.
9. Blalock J. E., Smith E. M. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1981.— Vol. 101.— P. 472—478.
10. Chin J. H., Goldstein D. B. // Molec. Pharmacol.— 1981.— Vol. 19.— P. 425—431.
11. Dafny N. // Neuropharmacology.— 1983.— Vol. 22.— P. 647—651.
12. Dafny N. // Progr. Neuro-Psycho-Pharmacol. Biol. Psychiat.— 1984.— Vol. 8.— P. 351—357.
13. Herz A., Holtt V. // Advanc. Pharmacol. Ther. / Eds.

Включение ^3H -тимидина (в имп/мин) культурами лимфоцитов человека при стимуляции ФГА в присутствии различных доз исследованных пептидов

Пептид	Контроль	Концентрация пептида, мкг/мл			
		0,01	0,1	1	10
Glu—Lys—Phe—Asp—Lys	1926,5±335,3 (7)	2656,3±552,9	3692,9±532,4*	1412,9±329,7	1346,7±413,3
Phe—Asp—Lys—Ala	2195,8±447,1 (8)	3439,4±574,0	4021,7±699,3*	3595,6±630,4	2892,8±542,1
Thr—Leu—Pro—Thr	3411,3±488,9 (10)	2294,4±467,0	1716,2±372,3*	1851,8±309,1*	1901,5±258,4*
Lys—Glu—Val—Val—Glu	1752,7±151,9 (9)	2646,9±558,3	2728,6±755,2	3238,3±1203,1	3809,5±844,1*

Примечание. В скобках — число парных наблюдений; звездочка — $p < 0,05$ (по критерию Стьюдента).

тоглобулина) и Thr—Leu—Pro—Thr (соответствующий фрагмент 190—193 легумина гороха и γ -глиадина пшеницы, а также 239—242 В-гордеина ячменя), являющиеся одновременно составными частями соответственно β -4-тимозина (позиции 10—14) и β -7- и β -10-тимозинов (позиции 12—15 и 27—30). Полученные нами пептиды стимулируют Е-розеткообразующую способность Т-лимфоцитов человека [2]. Учитывая литературные данные [10, 11], согласно которым Е-рецепторы включаются в регуляцию пролиферативных процессов Т-клеток, можно предположить, что синтетические пептиды, влияющие на индукцию Е-рецепторов, могут влиять и на пролиферацию Т-лимфоцитов. Для проверки высказанного предположения мы исследовали действие вышеперечисленных пептидов на реакцию бласттрансформации лимфоцитов, стимулированных неспецифическим Т-клеточным митогеном — фитогемагглютинином (ФГА).

Методика. Пептиды получали методами классического пептидного синтеза в растворе с использованием принципа минимальных защит. Индивидуальность всех синтезированных соединений подтверждали методами тонкослойной хроматографии, высоковольтного электрофореза, а также данными аминокислотного и элементного анализов.

В краткосрочных культурах лимфоцитов периферической крови больных с бронхолегочными заболеваниями изучали митогенную активность пептидов методом бласттрансформации лимфоцитов на ФГА [3]. Клетки в концентрации $5 \cdot 10^5$ кл/мл культивировали в круглодонных полистироловых планшетах (завод «Медполимер», Санкт-Петербург) в объеме 0,2 мл в течение 48 ч при 37 °С, 5 % CO_2 в среде RPMI/1640 с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 100 мкг/мл гентамицина и 2 мМ L-глутамин. Пептиды вносили в культуральную среду в концентрации от 0,01 до 10 мкг/мл одновременно с митогеном (30 мкг/мл). Контролем служили лимфоциты, обработанные ФГА в отсутствие пептида. За 4 ч до окончания инкубации в лунки вносили ^3H -тимидин (1 мКи/0,2 мл). Количество включенного в лимфоциты ^3H -тимидина измеряли на жидкостно-сцинтилляционном счетчике «Rack-beta» (ЛКВ, Швеция) с регистрацией конечных результатов в импульсах в минуту на пробу. Статистическую обработку экспериментального материала проводили с помощью критерия t Стьюдента [4].

Результаты и обсуждение. Результаты исследования пролиферативного ответа лимфоцитов человека на стимуляцию ФГА в присутствии различных концентраций пептидов Glu—Lys—Phe—Asp—Lys, Phe—Asp—Lys—Ala и Thr—Leu—Pro—Thr представлены в таблице. Из полученных данных видно, что синтетические пептиды характеризуются разнонаправленным влиянием на бластогенез лимфоцитов. Так, тетрапептид Thr—Leu—Pro—Thr при всех исследованных концентрациях подавляет включение ^3H -тимидина культурами лимфоцитов человека. В концентрациях от 0,1 до 10 мкг/мл тетрапептид Thr—Leu—Pro—Thr достоверно ($p < 0,05$) угнетает стимулированную ФГА пролиферацию

лимфоцитов соответственно на 50—44 %. Тетрапептид Phe—Asp—Lys—Ala, напротив, стимулирует пролиферацию лимфоцитов, индуцируемую ФГА, во всем интервале исследованных концентраций, однако только в концентрации 0,1 мкг/мл различия между опытом и контролем были достоверными ($p < 0,05$). При этом пептид увеличивает включение ^3H -тимидина лимфоцитами на 83 % по сравнению с клетками, культивируемыми только с ФГА. Пентапептид Glu—Lys—Phe—Asp—Lys в концентрации 0,1 мкг/мл достоверно ($p < 0,05$) усиливает митогениндуцированную пролиферацию лимфоцитов на 92 %, однако с повышением концентрации пентапептида в культуральной среде наблюдается ингибирование включения ^3H -тимидина лимфоцитами. Интересно отметить, что исследованные синтетические пептиды достоверно изменяют митогенный ответ лимфоцитов в дозах более низких, чем известный иммуностимулятор пентапептид, представляющий собой фрагмент 20—24 тимозина — α -1 (Lys—Glu—Val—Val—Glu). Как видно из данных, приведенных в таблице, только пентапептид Lys—Glu—Val—Val—Glu вызывает зависимый от дозы эффект стимуляции пролиферативного ответа Т-клеток. При инкубации лимфоцитов с пептидами Thr—Leu—Pro—Thr, Phe—Asp—Lys—Ala и Glu—Lys—Phe—Asp—Lys не наблюдается четкой зависимости эффекта стимуляции или угнетения пролиферации от дозы препаратов.

Полученные нами данные дополняют результаты других исследователей по изучению митогенной активности синтетических тимозинов и их фрагментов. Установлено, что С-концевой фрагмент 14—28 α -1-тимозина, включающий в свою последовательность использованный нами в качестве положительного контроля пентапептид Lys—Glu—Val—Val—Glu, в дозе 100 мкг/мл увеличивает включение ^3H -тимидина лимфоцитами больных уремией после стимуляции ФГА [7]. Точно также синтетический дезацетилованный β -7-тимозин, фрагментами которого являются пептиды Thr—Leu—Pro—Thr и Phe—Asp—Lys—Ala, в концентрации 10 мкг/мл восстанавливает до практически нормальных значений сниженный индуцированный ФГА бластогенез Т-лимфоцитов больного с клеточно-опосредованным иммунодефицитом [8].

Известно, что для нормального осуществления процесса пролиферации определяющим фактором является индукция как ростового фактора интерлейкина-2 (ИЛ-2), так и рецепторов к этому медиатору [5]. Обнаруженные нами эффекты стимуляции или угнетения пролиферативной активности лимфоцитов, инкубируемых одновременно с Т-клеточным митогеном и синтетическими пеп-

тидами, могут быть связаны либо с влиянием пептидов на продукцию ИЛ-2 одной из популяций Т-хелперов, либо с воздействием препаратов на экспрессию Т-хелперами рецепторов для ИЛ-2, что в конечном счете может определять тот или иной пролиферативный ответ лимфоцитов на ФГА. Первое предположение косвенно подтверждается исследованиями [9] о влиянии тимопентина (фрагмента Arg — Lys — Asp — Val — Тург тимического гормона типопозетина II) *in vitro* на ФГА-индуцированную индукцию ИЛ-2 культурой периферических лимфоцитов человека. Нельзя исключить варианты, когда пептидные фрагменты могут влиять в равной степени как на синтез ИЛ-2, так и на экспрессию рецепторов для этого медиатора или же регулировать эти процессы разнонаправленно и с разной силой.

Таким образом, исследованные пептиды, представляющие собой фрагменты не только эндогенных иммуноактивных полипептидов, но одновременно и других эндо- и экзогенных белков с отличными от первых функциями, оказывают выраженное действие на митогениндуцированный пролиферативный ответ Т-лимфоцитов человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Галактионов С. Г., Цейтин В. М., Леонова В. И. и др. // Биоорг. химия.— 1984.— Т. 10, № 1.— С. 5—16.
2. Иванова В. П., Сорочинская Е. И., Ложкина Т. К., Анохина В. В. // Укр. биохим. журн.— 1988.— Т. 60, № 5.— С. 3—9.
3. Киселева Е. П., Цвейбах А. С., Гольдман Е. И. и др. // Иммунология.— 1985.— № 1.— С. 76—78.
4. Урбах В. Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях.— М., 1975.
5. Чередеев А. Н., Ковальчук Л. В. Клеточные и молекулярные аспекты иммунных процессов.— М., 1989.
6. Яковский О. Ю. // Журн. эволюц. биохим. физиол.— 1985.— Т. 21, № 1.— С. 62—69.
7. Abiko T., Sekino H., Higuchi H. // Chem. pharm. Bull.— 1980.— Vol. 28, N 11.— P. 3411—3415.
8. Abiko T., Sekino H. // Ibid.— 1988.— Vol. 36, N 2.— P. 700—707.
9. Duchateau J., Servais G., Cooman R. et al. // Surv. Immunol. Res.— 1985.— Vol. 4, Suppl. 1.— P. 116—124.
10. Meuer S. C., Hussey R. E., Fabbri M. et al. // Cell.— 1984.— Vol. 36, N 4.— P. 897—906.
11. Palacios P., Martinez-Maza O. // J. Immunol.— 1982.— Vol. 129, N 6.— P. 2479—2485.

Поступила 28.11.91

EFFECT OF NEW ARTIFICIAL FRAGMENTS OF THYMIC HORMONES ON PROLIFERATIVE RESPONSE OF LYMPHOCYTES.

V. P. Ivanova, E. I. Sorochinskaya, T. K. Lozhkina

State University, I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Academy of Sciences of the Russian Federation, St. Petersburg.

Influence of three new artificial fragments of β -thymosines Phe-Asp-Lys-Ala, Glu-Lys-Phe-Asp-Lys and Thr-Leu-Pro-Thr on phytohemagglutinin-induced proliferative response of human lymphocytes was studied. These peptides studied either stimulated or inhibited incorporation of ^3H -thymidine in cell cultures of human lymphocytes. Possible mechanisms of these effects of the peptides on lymphocyte proliferation are discussed.

© И. Б. Бардамова, С. А. Афанасьев, 1993

УДК 615.217.24.015.4:612.171.07

И. Б. Бардамова, С. А. Афанасьев

РОЛЬ ЦАМФ И ЦГМФ В РЕАЛИЗАЦИИ ИНОТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ ВЕРАПАМИЛА НА СЕРДЕЧНУЮ МЫШЦУ

НИИ кардиологии Томского научного центра РАМН

В настоящее время общепризнанным является тот факт, что сократимость сердечной мышцы регулируется всей системой вторичных посредников, включающей ионы Ca^{2+} , циклонуклеотиды, метаболиты фосфо-инозитидного обмена. Причем если роль и значение Ca^{2+} и циклического АМФ (цАМФ) изучены достаточно детально, то функции и физиологическая роль других посредников еще неясны.

Для выяснения механизмов регуляции клеточного метаболизма и сократительной активности сердечной мышцы многие авторы изучают процесс одиночного сокращения — расслабления сердца, используя либо ^{31}P -ЯМР-анализ, либо быстрое замораживание сердца синхронно с фазами сердечного цикла. В ряде работ были показаны изменения содержания макроэргических фосфатов и некоторых промежуточных метаболитов [14, 17], активности ряда ферментов [9, 13], а также цАМФ [8, 18] в процессе сокращения — расслабления сердца. В работе [18] авторы предположили Са-зависимый характер осцилляций цАМФ, что вполне логично, учитывая, во-первых, показанную ранее возможность Са-зависимой регуляции ферментов метаболизма цАМФ [11, 16] и, во-вторых, наличие осцилляций ионизированного кальция в течение одиночного сердечного цикла [4].

Мы предположили, что при воздействиях, влияющих на уровень Ca^{2+} в сердечной мышце, осцилляции циклонуклеотидов должны изменяться, что в свою очередь приведет к вторичным изменениям в гомеостазе кальция в клетке и отразится на сократительной функции сердца. Учитывая широкое применение в экспериментальной и клинической кардиологии препаратов класса антагонистов кальция, мы выбрали верапамил как хорошо охарактеризованный с точки зрения электрофизиологии, фармакологии, биохимии и других подходов препарат [10, 12]. Целью нашей работы было изучение одновременных изменений динамики цАМФ и цГМФ в течение сердечного цикла изолированного сердца морской свинки при действии верапамила.

Методика. Опыты были проведены на изолированных сердцах морских свинок обоего пола массой 250—350 г, перфузируемых физиологическим раствором Кребса — Хензельта и сокращающихся в изотоническом режиме при температуре $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ и частоте стимуляции 2 Гц. Детали выделения и перфузии сердца описаны ранее [1]. Были проведены 4 серии опытов. Свинки I серии служили контролем; в ней сердца перфузировали в течение 35 мин физиологическим раствором. Во II серии оценивали действие изопроterenолола в концентрации 15 нМ; препарат вводили в перфузионный раствор после 15 мин адаптации сердец на 2—3 мин до развития инотропного эффекта. Сердца III серии после адаптации перфузировали в течение 5 мин с пропранололом в концентрации 1 мкМ, после чего добавляли в раствор изопроterenол (30 нМ) на 2—3 мин. В IV серии использовали верапамил в концентрации 15 нМ в течение 15 мин с последующим кратковременным добавлением 15 нМ изопроterenолола. По окончании воздействия сердца быстро заморажи-

вали в определенной точке сердечного цикла с помощью специального устройства, изготовленного по описанию [13]. Замораживание проводили в 5 точках сердечного цикла с интервалом между ними 100 мс; 1-я точка располагалась непосредственно перед началом цикла, 2-я соответствовала по времени максимуму скорости развития сокращения, 3-я — пику изотонического сокращения, 4-я и 5-я характеризовали процесс расслабления. Для каждой точки одной серии было проведено 7–15 опытов. Сердца хранили и обрабатывали, не допуская размораживания ткани. В миокарде определяли содержание циклических нуклеотидов радиоиммунным методом, используя ^{125}I -цАМФ (цГМФ) («Сметарол», Чехо-Словакия). В работе использовали изопроterenол фирмы «Sigma» (США), верапамил фирмы «Orion» (препарат «Финотин», Франция), пропранолол (препарат «Обзидан», Германия).

Результаты и обсуждение. Для оценки инотропного состояния изолированного сердца в ходе эксперимента мы регистрировали амплитуду сокращения (АС) и ее первую производную (максимальные скорости сокращения — МСС и расслабления — МСР). Введение изопроterenола сопровождалось развитием положительной инотропной реакции с характерными для его действия изменениями параметров сократимости: МСР увеличивалась в большей степени, чем МСС, и еще более, чем АС (в среднем прирост составил 230, 150 и 60 % соответственно; $n=43$, $p<0,001$). При перфузии изолированных сердец с пропранололом или верапамилем снижение сократительной активности было более выражено в присутствии антагониста кальция. Так, АС снижалась на 16 % при действии пропранолола ($n=65$, $p<0,01$) и на 62 % при действии верапамила ($n=43$, $p<0,01$), МСС — на 25 и 67 %, МСР — на 37 и 72 % соответственно ($p<0,01$). Однако если при действии пропранолола добавление в перфузионный раствор изопроterenола в высокой концентрации (30 нМ) не сопровождалось развитием положительной инотропии, то введение изопроterenола (15 нМ) на фоне антагониста кальция восстанавливало АС практически до исходного уровня (91 % от фонового значения; различия недостоверны), а МСС и МСР превышали исходные значения на 28 и 33 % соответственно ($p<0,01$). Таким образом, в соответствии с данными других авторов пропранолол в микромолярных концентрациях способен эффективно блокировать β -адренорецепторы, тогда как отрицательное инотропное действие верапамила может быть устранено за счет действия агентов, увеличивающих внутриклеточную концентрацию цАМФ [15].

Результаты определения содержания цАМФ и цГМФ в миокарде морских свинок приведены на рис. 1 и 2. В контрольной серии мы не обнаружили значительных изменений в уровнях циклонуклеотидов в течение сердечного цикла (см. рис. 1, а и 2, а). При действии изопроterenола (15 нМ) содержание цАМФ в миокарде увеличивалось примерно в 2,5 раза, цГМФ — в 2 раза ($p<0,01$). Кроме того, β -агонист вызывал появление значительных колебаний концентраций цГМФ в течение одиночного кардиоцикла (см. рис. 2, б). Так, содержание цГМФ во 2-й точке, соответствующей по времени максимуму скорости развития сокращения, значительно превышало его уровень в 4-й точке в фазу расслабления ($p<0,05$). Концентрация цАМФ в течение сердечного цикла при действии изопроterenола менялась незначительно (см. рис. 1, б).

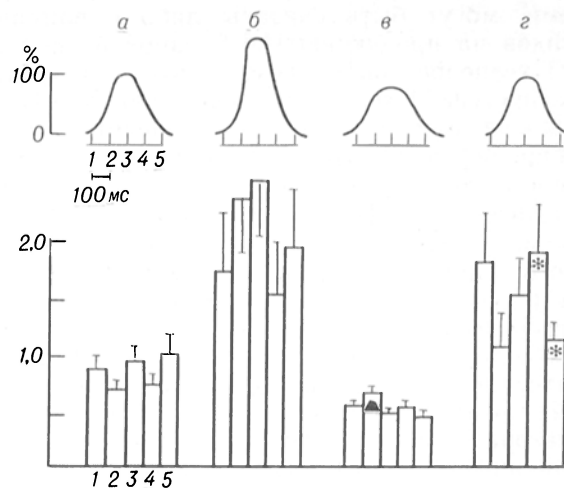


Рис. 1

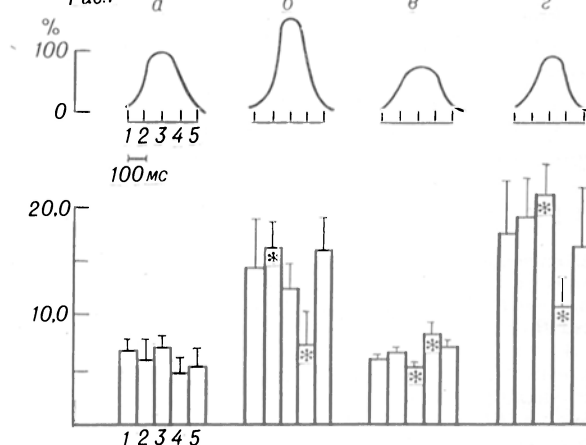


Рис. 2

Рис. 1. Содержание цАМФ в 5 точках сердечного цикла.

а — контроль; б — действие 15 нМ изопроterenола на фоне 1 мкМ пропранолола; в — действие 30 нМ изопроterenола на фоне 1 мкМ пропранолола; г — совместное действие 15 нМ изопроterenола и 15 нМ верапамила. По оси ординат: внутрь — 1–5 — точки сердечного цикла, в которых проводили быстрое замораживание сердца после воздействия (амплитуда сокращения, %); внизу — соответствующие им концентрации цАМФ, нмоль/г сырой массы. Звездочка — достоверные различия в уровне цАМФ ($p<0,05$); треугольник — точка, уровень цАМФ в которой значительно больше, чем в 1, 3 и 5-й точках данной серии.

Рис. 2. Динамика содержания цГМФ в 5 точках сердечного цикла.

Обозначения те же, что на рис. 1.

Ранее колебания содержания цАМФ в ходе сердечного цикла были показаны в сердце собаки [8] и крысы [18] в контроле и при активации β -адренорецепторов. По мнению [8], эти осцилляции обусловлены ритмической активностью симпатических нервов, выброс медиаторов из терминалей которых приводит к синхронной активации аденилатциклазы (АЦ). Нами показано, что при действии пропранолола в концентрации 1 мкМ, которая, судя по данным сократительной функции, эффективно блокировала β -адренорецепторы, содержание цАМФ было примерно в 1,5 раза ниже контрольного ($p<0,01$), тогда как концентрация цГМФ не отличалась от контрольной. В то же время сравнение содержания циклонуклеотидов в отдельных точках в этой серии показало, что в течение кардиоцикла происходили небольшие по амплитуде, но достоверные изменения содержания цАМФ и цГМФ (см. рис. 1, в и 2, в). При этом уровень цАМФ был максимальным во 2-й точке (максимум скорости сокращения) и зна-

чительно отличался от такового в 1, 3 и 5-й точках ($p < 0,05$), а концентрация цГМФ была наибольшей в период расслабления (4—5-я точка), значительно превышая таковую в 3-й точке ($p < 0,05$). Значит, возникновение осцилляций цАМФ в миокарде морской свинки не определяется активностью симпатических нервов, хотя, возможно, этот механизм участвует в поддержании концентрации цАМФ в сердце на определенном уровне. Таким образом, в условиях блокады β -адренорецепторов, когда реализуется преимущественно Са-зависимая регуляция метаболизма, осцилляции сохранялись и, вероятно, в основе их возникновения лежат Са-опосредуемые механизмы синтеза и распада циклонуклеотидов.

Мы использовали верапамил в концентрации, которая, судя по данным литературы, действует исключительно на медленный входящий кальциевый ток, не влияя при этом на другие стороны метаболизма клетки [10, 12]. Последующее добавление β -агониста восстанавливало сократимость практически до исходного уровня. При этом содержание цАМФ было выше контрольного на 70 %, но почти на 50 % ниже такового в серии с одним изоиротеренолом ($p < 0,05$). Ранее на изолированном перфузируемом сердце крысы было показано, что на фоне верапамила (0,1 мкМ) добавление изопротеренола в концентрациях, восстанавливающих сократимость сердца до исходного уровня, также привело к увеличению содержания цАМФ в миокарде, в то время как сам верапамил не изменял концентрацию цАМФ [15].

Содержание цГМФ в серии с антагонистом кальция было повышено в среднем на 170 % по отношению к контролю ($p < 0,01$) и на 35 % по сравнению с сердцами, перфузируемыми одним изопротеренолом ($p < 0,05$). Подобное увеличение содержания цГМФ может быть обусловлено снижением Са-зависимой активности фосфодиэстеразы (ФДЭ-1) в результате уменьшения уровня Ca^{2+} в клетках при действии верапамила.

Из рис. 1, б, г и 2, б, г видно, что динамика цАМФ в течение сердечного цикла в присутствии верапамила существенно отличалась от таковой при действии одного β -агониста, а профили осцилляций цГМФ в этих сериях были схожи. Это позволило предположить, что Ca^{2+} , входящий по медленным каналам сарколеммы, не участвует в регуляции β -зависимой динамики цГМФ в ходе кардиоцикла, тогда как его вклад в регуляцию изменений цАМФ весьма значителен. Возможно, это обусловлено тем, что АЦ, локализованная в сарколемме, более чувствительна к снижению содержания кальция именно в присарколеммальном слое миоплазмы, которое могло происходить при действии верапамила. Значительное снижение цАМФ во 2-й точке (см. рис. 1, г) соответствует примерно по времени фазе плато потенциала действия, в течение которого Ca^{2+} входит в клетку через сарколемму, а в присутствии верапамила этот вход блокирован. Таким образом, несмотря на то что отрицательное инотропное действие верапамила может быть полностью устранено при повышении внутриклеточного уровня цАМФ, динамика содержания циклонуклеотида при этом значительным образом изменяется.

При сравнении серий с β -агонистом и β -агонистом на фоне верапамила видно, что в первом

случае происходило преимущественное увеличение содержания цАМФ, тогда как во втором наблюдался более выраженный прирост содержания цГМФ. Хотя в настоящее время физиологическая роль цГМФ окончательно неясна, с нашей точки зрения, цГМФ, видимо, можно рассматривать как модулятор действия цАМФ. Это предположение основывается на известных фактах. Так, установлено, что *in vitro* цГМФ способен изменять активность фосфодиэстераз (ФДЭ-II и ФДЭ-III), гидролизующих цАМФ [6]. На сканированных волокнах миокарда было показано, что при действии метахолина увеличение уровня цГМФ сопровождалось дефосфорилированием TnI и как следствие повышением чувствительности волокон к Ca^{2+} [5]. Следует отметить, что это действие цГМФ реализовалось лишь при условии исходно фосфорилированного TnI за счет цАМФ-зависимых протеинкиназ. Причем состояние фосфорилирования — дефосфорилирования может, очевидно, динамично меняться при изменениях уровня циклонуклеотидов [19]. Кроме того, обнаружено, что выделенные миофиламенты желудочков сердца морской свинки содержат исключительно цАМФ-фосфодиэстеразную активность, не ингибируемую цГМФ, но не содержат ни ФДЭ-I, ни ФДЭ-II [7], т. е. чувствительность тропонинового комплекса к кальцию может регулироваться соотношением циклонуклеотидов в области миофибрилл.

В опытах на везикулах сарколеммы сердца морской свинки цГМФ-зависимая протеинкиназа в присутствии цГМФ фосфорилировала белок, который, по мнению авторов, является регуляторной субъединицей цАМФ-зависимой протеинкиназы, ассоциированной с сарколеммой [3]. Показано также, что до 90 % цАМФ-зависимых протеинкиназ миокарда морской свинки принадлежат ко II типу и являются мембранно-связанными. Если подобное фосфорилирование реализуется *in vivo*, то возможна цГМФ-зависимая регуляция процессов, активируемых цАМФ.

Таким образом, цГМФ может, вероятно, регулировать цАМФ-зависимые и косвенным образом Са-зависимые процессы. В то же время, учитывая соотношение концентраций цГМФ и цАМФ в миокарде (и соответственно протеинкиназ, ими активируемых), вероятно, можно говорить лишь о модулирующем влиянии цГМФ в сердце, которое реализуется на фоне повышенного содержания цАМФ и роль которого возрастает при увеличении уровня цГМФ. Поэтому, несмотря на то что соотношение цАМФ/цГМФ снижается в присутствии как пропранолола, так и верапамила, модулирующее действие цГМФ может проявляться, вероятно, только во втором случае, когда концентрация цАМФ была повышена на 70 % по отношению к контролю, прирост же цГМФ составил 170 %.

Изменения соотношения цАМФ/цГМФ происходят и в течение сердечного цикла и, очевидно, являются важным фактором в формировании инотропного ответа сердечной мышцы при различных воздействиях. Учитывая также возможность существования внутриклеточных локальных компартментов циклонуклеотидов в миокарде [2], можно говорить об определенном образом организованной в пространстве и во времени регуля-

ции клеточных функций. Иначе говоря, Са-опосредуемые осцилляции циклонуклеотидов, вероятно, могут участвовать в изменении гомеостаза Са²⁺ и, следовательно, сократимости сердца.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лангев Б. И., Афанасьев С. А., Прокопьева В. Д., Ларионов Н. П. // Физиол. журн.— 1987.— № 4.— С. 22—26.
2. Aass H., Scomedal T., Osnes J.-B. // J. molec. cell. Cardiol.— 1988.— Vol. 20.— P. 847—860.
3. Cuppoletti J., Thakkar J., Sperelakis N., Wahler G. // Membr. Biochem.— 1989.— Vol. 7.— P. 135—142.
4. Endoh M., Blinks J. R. // Circulat. Res.— 1988.— Vol. 62.— P. 247—265.
5. Horowitz R., Winegrad S. // J. molec. cell. Cardiol.— 1983.— Vol. 15.— P. 277—280.
6. Kithas P. H., Artman M., Thoompson W. J., Strada S. J. // Circulat. Res.— 1988.— Vol. 62.— P. 782—789.
7. Klockow M., Jonas R. // Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.— 1989.— Vol. 339, Suppl.— P. 53.
8. Krause E.-G., Bartel S., Freier W. et al. // Biomed. biochim. Acta.— 1986.— Vol. 45, N 1/2.— P. 205—210.
9. Krause E.-G., Bartel S., Beyerdorfer I. et al. // Molec. cell. Biochem.— 1989.— Vol. 89, N 2.— P. 181—186.
10. Nayler W. G. Calcium Antagonists.— London; New York, 1988.
11. Panchenko M. P., Tkachuk U. A. // FEBS Lett.— 1984.— Vol. 174, N 1.— P. 50—54.
12. Singh B. N., Hecht H. S., Nademanee K., Chew C. Y. C. // Progr. cardiovasc. Dis.— 1982.— Vol. 25, N 2.— P. 103—132.
13. Thompson C. I., Rubio R., Berne R. M. // Amer. J. Physiol.— 1980.— Vol. 238.— P. H389—H398.
14. Toyoo-Oka T., Nagayama K., Umeda M. et al. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1986.— Vol. 135, N 3.— P. 808—815.
15. Uittone L., Cingolani H. E., Mattiazzi R. A. // J. molec. cell. Cardiol.— 1985.— Vol. 17.— P. 255—268.
16. Weishaar R. E., Burrows S. D., Kobylarz D. C. et al. // Biochem. Pharmacol.— 1986.— Vol. 35, N 5.— P. 787—800.
17. Wikman-Coffelt J., Sievers J., Coffelt R. J., Parmley W. W. // Amer. J. Physiol.— 1983.— Vol. 245.— P. H354—H362.
18. Wikman-Coffelt J., Sievers J., Coffelt R. J., Parmley W. W. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1983.— Vol. 111, N 2.— P. 450—455.
19. Winegrad S. // Circulat. Res.— 1984.— Vol. 55, N 5.— P. 565—574.

Поступила 15.04.91

ROLE OF cAMP AND cGMP IN REALIZATION OF THE INOTROPIC EFFECTS OF VERAPAMIL IN THE HEART MUSCLE.

I. B. Bardamova, S. A. Afanashev

Institute of Cardiology, Research Centre, Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk.

The effect of verapamil on dynamics of cAMP and cGMP was studied during the single heart cycle using the isolated perfused guinea pig heart activated by isoproterenol. The changes of cyclic nucleotides were Ca²⁺-dependent; verapamil altered the cAMP and, to a lesser extent, the cGMP dynamics in the myocardium apparently by means of shifts in homeostasis of Ca²⁺ in cardiomyocytes. Importance of cyclic nucleotides and their interaction in realization of the inotropic effect of verapamil are discussed.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 615.356:577.164.111.015.4.07

А. А. Сокольников, В. М. Коденцова, В. А. Исаева

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА БИОХИМИЧЕСКИХ КРИТЕРИЕВ ОБЕСПЕЧЕННОСТИ ОРГАНИЗМА ТИАМИНОМ

Институт питания РАМН, Москва

В качестве параметров, отражающих обеспеченность организма тиаминном, используют экскрецию этого витамина с мочой, а также активность тиаминдифосфатзависимого фермента эритроцитов транскетолазы [4]. Установлена корреляция между концентрацией тиаминдифосфата (ТДФ) и активностью транскетолазы в гемолизатах эритроцитов, между степенью активации этого фермента экзогенно добавленным ТДФ (ТДФ-эффект) и молярным содержанием кофермента в транскетолазе [7]. Таким образом, величина ТДФ-эффекта отражает насыщенность транскетолазы коферментом *in vivo* и может служить функциональным тестом на обеспеченность организма тиаминном [4, 8].

Существует несколько способов определения активности транскетолазы [3—6, 8]. В витаминологических исследованиях активность этого фермента обычно оценивают по количеству образующегося продукта транскетолазной реакции — седогептулозо-7-фосфата (С-7-Ф), содержание которого может быть определено разными колориметрическими методами [3—5].

Многолетний опыт использования в практике нашей лаборатории при проведении индивидуальных и массовых обследований витаминной обеспеченности различных групп людей орцинового метода выявил некоторые трудности. В частности, при низкой активности транскетолазы не наблюдается линейности накопления С-7-Ф во времени, в ряде случаев величина ТДФ-эффекта оказывается ниже 1. Эти трудности могли быть обусловлены несколькими обстоятельствами: частичным расщеплением образующегося в транскетолазной реакции С-7-Ф за счет его превращения трансальдолазой, всегда присутствующей в гемолизате, а также низкой чувствительностью колориметрической реакции с орцином.

В последние годы появились методы определения активности транскетолазы с предварительной инактивацией трансальдолазы путем 5-минутного прогревания при 55 °С, не влияющего на активность транскетолазы [10, 11]. В связи с этим задачей данной работы явилось сравнение двух вариантов измерения активности транскетолазы (традиционного и с предварительной инактивацией трансальдолазы) с использованием различных способов определения С-7-Ф.

Определение активности транскетолазы и ТДФ-эффекта трудоемко; для массовых исследований более удобен и значительно чаще используется метод определения экскреции тиаминна с мочой. В зарубежных исследованиях для этих целей обычно пользуются величиной суточной экскреции, в отечественной наряду с суточной определяют часовую. Обоснованность использования последней величины нуждается в под-

Зависимость удельной активности транскетолазы (в мкмоль/ч на 1 мл эритроцитов) от условий определения ($n=3$)

№ пробы	Вариант II с предварительной инактивацией трансальдолазы				Вариант I без инактивации трансальдолазы	
	с цистеином		с орцином		с орцином	
	активность	ТДФ-эффект	активность	ТДФ-эффект	активность	ТДФ-эффект
1	42,6±2,2	1,10	45,2±0,5	1,05	15,4±1,8	1,14
2	29,9±1,5	1,16	29,2±1,6	1,03	8,4±0,6	1,20
3	29,1±1,7	1,03	26,5±2,7	1,14	10,8±0,5	1,08
4	36,4±2,1	1,22	31,5±2,8	1,44	11,9±0,8	1,30
5	32,5±1,0	1,11	27,0±3,2	1,07	11,6±0,5	1,11
6	40,6±0,3	1,15	—	—	12,3±1,0	1,13
7	37,0±0,4	1,19	—	—	12,1±0,7	1,11
8	41,4±0,5	1,19	—	—	13,3±0,3	1,13
9	31,6±0,5	1,17	—	—	10,5±0,5	1,09
10	34,4±0,6	1,25	—	—	8,2±0,4	1,25
11	35,8±1,7	1,23	—	—	10,6±0,3	1,11
12	40,3±2,0	1,13	—	—	11,1±0,1	1,12

Погрешность $\leq 5\%$

5—12%

5—12%

тверждении. Поэтому другой задачей явилось исследование корреляционной связи между часовой экскрецией тиамин с мочой и величиной ТДФ-эффекта.

Особо следует оговорить, что если для взрослых нормы часовой экскреции, соответствующие адекватной обеспеченности тиамин, определены, то для детей такие данные отсутствуют. Вместе с тем очевидно, что использование для оценки обеспеченности детей тиамин «взрослых» норм экскреции неверно. Поэтому с целью установления этой величины в данной работе была исследована взаимосвязь между ТДФ-эффектом и часовой экскрецией тиамин для детей 9—13 лет.

Методика. Эритроциты из гепаринизированной венозной крови 22 здоровых детей 9—13 лет и 23 здоровых взрослых людей обоего пола получали по общепринятой методике.

Активность транскетолазы и величину ТДФ-эффекта определяли в двух вариантах. Вариант I с использованием гемолизатов (1:19) в среде, содержащей 60 мМ ацетат-вероналовый буфер pH 7,6, и определением С-7-Ф с орцином подробно описан ранее [4, 6]. Вариант II с использованием гемолизатов эритроцитов (1:1) [11, 12] состоит в следующем. В 3 пробирки наливали по 0,2 мл гемолизата и 0,25 мл 20 мМ НЕРЕС pH 7,6, 1,2 мМ MgCl₂ (можно трис-НСI [12]). В контрольную и опытные пробы добавляли по 0,05 мл воды, в третью пробирку — 0,05 мл 1 мМ ТДФ и преинкубировали 30 мин при 37 °С, затем для инактивации трансальдолазы, содержащейся в гемолизате и использующей в качестве субстрата С-7-Ф, инкубировали 5 мин при 55 °С. После охлаждения в контрольную пробу добавляли 0,8 мл 10% трихлоруксусной кислоты (ТХУ), затем во все 3 пробы добавляли по 0,1 мл 36 мМ рибозо-5-фосфата и инкубировали при 37 °С. Через 30 мин транскетолазную реакцию останавливали добавлением 0,8 мл 10% ТХУ и центрифугировали 10 мин при 1500 г.

Количество С-7-Ф определяли по цветной реакции с цистеином в присутствии серной кислоты [3]. Для этого к 0,5 мл супернатанта, помещенного в баню со льдом, добавляли 2,5 мл разбавленной серной кислоты (6 объемов концентрированной кислоты и 1 объем воды), инкубировали 3 мин в кипящей водяной бане, после охлаждения добавляли по 0,05 мл 3% раствора солянокислого цистеина. Пробу выдерживали при 80 °С в течение 30 мин и измеряли оптическую плотность при 510 и 540 нм. При расчете использовали разницу величин оптической плотности при этих двух длинах волн.

Количество тиамин в утренней порции мочи, собранной за 1 ч патоцка, определяли тиохромным методом с использованием внутреннего стандарта тиамин [4, 9]. Интенсивность флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре «Регин Elmer MPF-43А» при длине волны возбуждающего света 365 нм, флуоресценции — 435 нм.

Коэффициент ранговой корреляции рассчитывали по методу Спирмена [1]. Для $n=22-23$ о существовании корреляции можно говорить, если абсолютная величина коэффициента превышает 0,323 ($p \leq 0,05$) или 0,462 ($p \leq 0,01$).

Результаты и обсуждение. На первом этапе работы было проведено сравнение методов определения С-7-Ф с орцином и цистеином. Как следует из рис. 1, орциновый метод в 3,2 раза менее чувствителен по сравнению с цистеиновым. Погрешность составляет 5—10%, в то время как у метода с цистеином эта величина не превышает 5%. Таким образом, для определения активности трансальдолазы по накоплению С-7-Ф предпочтительнее пользоваться цистеиновым методом.

Вторым этапом работы был подбор оптимальных условий для транскетолазной реакции. Как видно на рис. 2, при измерении транскетолазной реакции без предварительной инактивации трансальдолазы (см. рис. 2, вариант 1, кривая 1) накопление С-7-Ф было линейным лишь в течение 45 мин даже при высоком (1:19) разведении гемолизата. При этом удельная активность транскетолазы, определяемая по накоплению

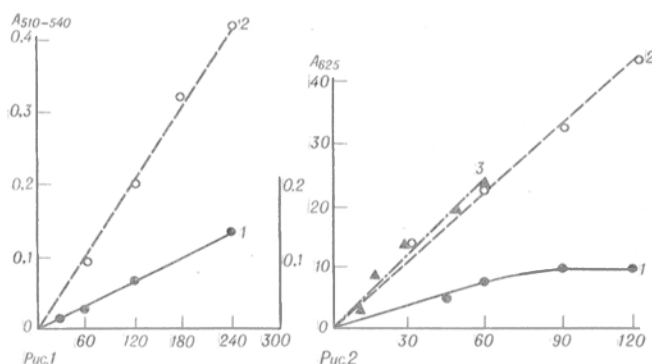


Рис. 1. Сравнение колориметрических методов определения С-7-Ф.

По оси абсцисс — содержание С-7-Ф, мкмоль/проба; по оси ординат — разница оптической плотности при 510 и 540 нм для метода с цистеином (кривая 2), оптическая плотность при 625 нм для метода с орцином (кривая 1).

Рис. 2. Зависимость активности транскетолазы от времени инкубации.

По оси абсцисс — время инкубации, мин; по оси ординат — активность транскетолазы, мкмоль С-7-Ф на 1 мл эритроцитов.

1 — без предварительной инактивации трансальдолазы, метод с орцином, разведение гемолизата 1:19; 2, 3 — с предварительной инактивацией трансальдолазы, метод с цистеином; 2 — разведение гемолизата 1:19; 3 — разведение гемолизата 1:1.

С-7-Ф без предварительной инактивации трансальдозы, была в 3 раза ниже, чем при ее определении после инактивации (см. рис. 2, кривая 2). По-видимому, это обусловлено постепенным по мере накопления С-7-Ф увеличением активности трансальдозы, расщепляющей образующийся С-7-Ф. Линейность накопления С-7-Ф в ходе транскетолазной реакции во времени после предварительной инактивации трансальдозы (вариант II) наблюдалась в течение 2 ч и не зависела от разведения гемолизата в диапазоне от 1:19 до 1:1 (см. рис. 2, кривые 2 и 3).

Дальнейшие исследования показали, что во всех случаях при определении активности транскетолазы без инактивации трансальдозы в течение 45 мин, когда наблюдается линейный характер накопления продукта реакции во времени, удельная активность в 3—4 раза ниже, чем в случае с предварительной инактивацией трансальдозы (см. таблицу). При этом величина активности не зависит от используемого колориметрического метода определения С-7-Ф.

Поскольку активность трансальдозы не зависит от ТДФ [2], несмотря на неполное выявление активности транскетолазы при использовании варианта I величины ТДФ-эффекта хорошо совпадают между собой при всех способах определения активности транскетолазы. Вместе с тем было отмечено, что иногда при измерении активности транскетолазы по варианту I с ордином значение ТДФ-эффекта находится в пределах 0,87—0,95, т. е. составляет менее 1. По-видимому, это объясняется измерением очень низких величин оптической плотности — в диапазоне 0,050—0,150 (см. рис. 1) и вследствие этого большей погрешностью (до 12 %). В то же время при определении активности транскетолазы по варианту II не наблюдается величин ТДФ-эффекта менее 1.

Как известно, активность транскетолазы зависит от обеспеченности тиаминем. Принято считать, что нормальной обеспеченности организма человека тиаминем соответствуют величины активности в пределах 15—30 мкмоль/ч на 1 мл эритроцитов [3, 6]. Исходя из данных таблицы, эти величины, по-видимому, требуют пересмотра.

Для выявления зависимости между величиной ТДФ-эффекта и экскрецией тиаминем с мочой был использован следующий подход [7]: близкие по значению величины ТДФ-эффекта объединяли в группы и рассчитывали соответствующие им величины экскреции (рис. 3). Расчет коэффициента корреляции по Спирмену обнаружил высокое соответствие между этими параметрами в случае как взрослых людей ($r = -0,529$), так и детей ($r = -0,332$). Для взрослых величина ТДФ-эффекта $\leq 1,15$ соответствует выделению более 15 мкг тиаминем за 1 ч натошак, что совпадает с величинами, принятыми в литературе для нормальной обеспеченности организма этим витамином. У детей 9—13 лет часовая экскреция тиаминем, соответствующая адекватной обеспеченности организма этим витамином (ТДФ-эффект $\leq 1,15$), составляет 11—12 мкг/ч. Эти различия еще раз доказывают необходимость установления возрастных норм экскреции тиаминем с мочой и недопустимость использования для оценки обеспеченности этим витамином детей

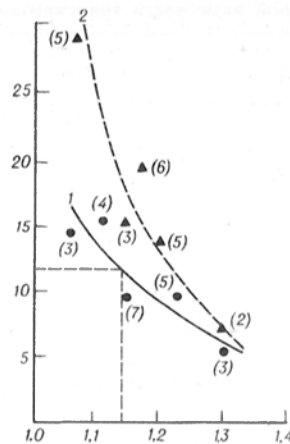


Рис. 3. Зависимость между величиной ТДФ-эффекта и часовой экскрецией тиаминем с мочой.

По оси абсцисс — величина ТДФ-эффекта; по оси ординат — часовая экскреция тиаминем с мочой, мкг.
1 — данные для детей 9—13 лет; 2 — данные для взрослых. В скобках — число обследованных.

величин экскреции, принятых в качестве нормы для взрослых людей.

Таким образом, для выявления недостаточности тиаминем может быть использована как величина ТДФ-эффекта, так и часовая экскреция тиаминем с мочой. Учитывая определенные трудности при определении активности транскетолазы по варианту I, предпочтение, по-видимому, следует отдать методу с предварительной инактивацией трансальдозы и колориметрическому методу определения С-7-Ф с цистеином.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. — Л., 1973.
2. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. — М., 1966.
3. Коцегов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. — М., 1980.
4. Мартинчик А. Н., Ларина Т. И., Исаева В. А. // Теоретические и клинические науки о питании. — М., 1987. — С. 87—98.
5. Островский Ю. М. // Биохимия. — 1963. — Т. 26. — С. 41—47.
6. Спирчев В. Б., Блажевич Н. В., Исаева В. А. и др. // Вопр. питания. — 1973. — № 6. — С. 6—11.
7. Bates C. J. // Amer. J. clin. Nutr. — 1987. — Vol. 46. — P. 122—123.
8. Brin M. E., Danon D. J. // J. Sci. industr. Res. — 1970. — Vol. 28. — P. 38—43.
9. Leveille G. A. // Amer. J. clin. Nutr. — 1972. — Vol. 25. — P. 273—274.
10. Takeuchi T., Jung E. H., Nishino K., Itokawa Y. // Int. J. Vitam. Nutr. Res. — 1990. — Vol. 60, N 2. — P. 112—120.
11. Takeuchi T., Nishino K., Itokawa Y. // Clin. Chem. — 1984. — Vol. 30. — P. 658—661.
12. Tate J., Kaczmarek J., Nixon P. F. // Clin. chim. Acta. — 1984. — Vol. 137, N 1. — P. 81—86.

Поступила 15.12.91

BIOCHEMICAL CRITERIA FOR EVALUATION OF THIAMINE CONSUMPTION.

A. A. Sokolnikov, V. M. Kodentsova, V. A. Isaeva

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

Activity of transketolase in erythrocyte hemolysates, estimated by means of measurement of sedoheptulose-7-phosphate content without preinactivation of transaldolase, proved to be 3-4-fold lower as compared with the values

observed after preinactivation of transaldolase. The values of thiamine diphosphate (TDP) effect did not depend on conditions of the transketolase reaction, as well as on the colorimetric procedure used for determination of sedoheptulose-7-phosphate. A high inverse correlation was found between the value of TDP effect and an excretion of thiamine with urine in adult patients and in children of 9-13 years old. Normal excretion of thiamine with urine constituted 11-12 $\mu\text{g}/\text{h}$ in the children of this age as judged from the TDP effect-thiamine excretion in children of this age.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.314.17-002-02:577.152.321]-085

*А. И. Воложин, С. И. Виноградова, И. А. Денисова,
Т. П. Журавлева*

СОДЕРЖАНИЕ ЛИЗОЦИМА В БИОЛОГИЧЕСКИХ СУБСТРАТАХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ВОСПРОИЗВЕДЕНИИ И ЛЕЧЕНИИ ПАРОДОНТИТА

Московский медицинский стоматологический институт
им. Н. А. Семашко

Лизоцим (мурамидаза), являясь одним из ферментов лизосомальных структур клеток, относится к факторам, определяющим физиологическую устойчивость организма, и считается основным компонентом неспецифической защиты, связанной с функцией моноцитарно-макрофагальной системы, филогенетически более старой, чем лимфоцитарно-плазмоцитарная система, ответственная за специфический иммунитет [36, 49]. Фермент содержится у человека и животных во многих биологических жидкостях и тканях, синтезируясь в основном в клетках, способных к фагоцитозу, — гранулоцитах и макрофагах [25, 27, 37, 48].

Исследования роли лизоцима в механизме сохранения гомеостаза подтверждают полифункциональный характер его действия [14]. Важное биологическое свойство фермента, установленное еще в работах А. Fleming, — это бактериологическое и бактериостатическое влияние на некоторые микроорганизмы. Наиболее чувствительны к лизоциму грамположительные бактерии [7, 8, 17, 19, 20, 44], у которых мурамидаза, катализируя гидролиз гликозаминогликанов с разрывом $\beta(1\text{---}4)$ -гликозидных связей между остатками N-ацетилмурамовой кислоты и N-ацетилглюкозаминном, растворяет клеточную оболочку и вызывает распад всей бактериальной клетки. Грамотрицательные бактерии более устойчивы к лизоциму, ввиду того что пептидогликаны их клеточной оболочки находятся под слоем липопротеидов и липополисахаридов [9, 20, 45, 46]. Вместе с тем установлено бактериостатическое влияние мурамидазы на грамотрицательные микроорганизмы [9, 16, 31]. В ряде работ [16, 31, 33, 42—44, 47] доказана способность лизоцима лизировать некоторые штаммы патогенных микробов: кокки, бациллы, вирусы, грибы рода *Candida*.

Однако биологическая роль мурамидазы не исчерпывается только антимикробным влиянием, которое составляет лишь частное проявление ее общих свойств. Исследования последних лет убедительно подтверждают значение лизоцима как модулятора реакций иммунитета. Фермент

оказывает стимулирующее влияние на розеткообразование T-, B-лимфоцитов, усиливает адгезивные свойства иммунокомпетентных клеток [15, 29, 30], активирует систему комплемента как по классическому, так и по альтернативному пути [15], обладает гистамин- и серотонинпектической способностью [14]. Существует предположение о влиянии лизоцима на различные стадии фагоцитоза, хемотаксиса, опсонизацию и деградацию антигенного материала [1, 2]. Большой интерес представляют исследования, свидетельствующие о специфическом влиянии мурамидазы на полисахаридные комплексы клеточной мембраны макрофагов, проявляющиеся увеличением поверхности клетки за счет стимуляции лизоцимом синтеза новых структур и активации метаболических процессов [38, 39, 41]. Активность лизоцима значительно возрастает при совместном действии мурамидазы и других гидролитических ферментов, факторов иммунитета и неспецифической резистентности [30, 40].

Уникальное сочетание ферментных, антибактериальных и иммуномодулирующих свойств лизоцима послужило обоснованием его широкого применения в медицине. Первые попытки использования экзогенного лизоцима в терапевтических целях предприняли З. В. Ермольева и И. С. Буяновская в 1930 г. [17, 22, 24]. В настоящее время лизоцим применяют в терапевтических и профилактических целях в чистом виде и в комбинации с антибиотиками и ферментами в педиатрии для лечения различных форм пневмонии [26, 29], хронического бронхита [36], в хирургической практике с целью стимуляции репаративных процессов [12, 31], при ожоговой травме [28]. Успешно проводится лечение лизоцимом ряда заболеваний ЛОР-органов [10, 35]. Показано применение фермента в терапии кишечных инфекций различной этиологии [23].

Лизоцим играет особо важную роль в процессах, происходящих в полости рта [32], в которой его концентрация значительно выше, чем в сыноворотке крови. Основным источником фермента в ротовой жидкости являются эпителиальные клетки слюнных протоков, в меньшей степени — мигрирующие полиморфноядерные лейкоциты (ПЯЛ) и бактерии ротовой полости [3]. В значительной мере благодаря лизоциму сохраняется равновесие между бактериальным симбиозом и тканями полости рта, которое в большинстве случаев нарушается при развитии тех или иных патологических состояний. В связи с этим объяснимо широкое использование экзогенного лизоцима для лечения пульпита, периодонтита, пародонтита и некоторых заболеваний слизистой оболочки рта. Однако следует учитывать, что при воспалении свойства различных препаратов могут изменяться в силу нарушения микроциркуляции, скопления гноя, развития ацидоза, изменения функции фагоцитирующих клеток и т. д. Поэтому можно предположить, что более эффективно использование лизоцима при непосредственном его введении в ткани с помощью какого-либо физического фактора, например высокочастотного ультразвука, обладающего широким спектром биологического действия и обеспечивающего более глубокое проникновение лекарства в ткани [34].

В качестве объекта для обоснования и изучения возможностей введения лизоцима в воспаленные ткани с помощью ультразвука мы взяли воспаленные околозубных тканей — пародонтит, одно из наиболее распространенных заболеваний человека, исходом которого является рассасывание костной ткани альвеолы с последующей потерей зубов, что неизменно приводит к функциональной несостоятельности зубочелюстной системы. В настоящей работе были поставлены следующие задачи: изучить влияние ультразвука на кристаллический яичный лизоцим; оценить в эксперименте изменения неспецифической защиты при развитии пародонтита по содержанию лизоцима в сыворотке крови и десне; изучить влияние ультразвука на проникновение экзогенного лизоцима в околозубные ткани в условиях нормы и при воспалении; обосновать на кроликах и крысах возможность применения фонофореза лизоцима для лечения пародонтита.

Методика. Стандартный раствор препарата (яичный кристаллический лизоцим) в концентрации 8 мкг/мл подвергали воздействию ультразвуком. Опыты проводили в стеклянной посуде, помещая излучатель в исследуемый раствор. Использовали аппарат УЗТ-5 с частотой ультразвука 880 кГц при непрерывном и импульсном режиме генерации. Режим работы ультразвукового генератора выбирали с учетом рекомендаций по его применению в медицине [34], и в частности в стоматологии [18]. Интенсивность ультразвукового воздействия на стандартный раствор лизоцима увеличивали от 0,05 до 0,6 Вт/см². Продолжительность озвучивания при каждой интенсивности составляла 3, 5, 10 мин.

Исследования на кроликах и крысах проводили в три этапа. На I этапе эксперимент включал две серии опытов: I серия — опыты на 14 кроликах калифорнийской породы массой 2,5—3 кг (12 подопытных животных, 2 контрольных), II серия — на 25 беспородных белых крысах массой 180—200 г (20 подопытных животных, 5 контрольных). У подопытных животных воспроизводили пародонтит лигатурным методом в собственной модификации [13], у контрольных лигатура не накладывалась.

До начала исследования, а затем на 3, 7, 14, 21-е сутки эксперимента из краевой вены уха кроликов брали кровь и определяли концентрацию лизоцима в сыворотке [21]. У крыс в те же сроки опыта после забоя токсическими дозами эфира забирали участок десны в области нижних резцов для определения лизоцима [21].

На II этапе эксперимент также состоял из двух серий опытов: I серия — опыты на 8 кроликах калифорнийской породы массой 2,5—3 кг, II серия — на 100 беспородных белых крысах массой 180—200 г (50 подопытных и 50 контрольных животных). На этом этапе изучали влияние ультразвука на проникновение лизоцима в здоровую и воспаленную десну. У крыс опытной группы пародонтит воспроизводили лигатурным методом [13]. Изучали содержание лизоцима в сыворотке крови кроликов и десне крысы до воздействия ультразвуком, непосредственно после процедуры и спустя 1, 3, 6, 24 ч. Принимая во внимание тот факт, что сам ультразвук без лизоцима может повлиять на содержание фермента в тканях как в условиях нормы, так и при воспалении, каждая серия животных была разделена на две равные группы: в I-й у кроликов и крыс проводили однократно фонофорез лизоцима, во 2-й — только воздействие ультразвуком. Озвучивание слизистой оболочки десны в области нижних резцов выполняли по следующей методике: на аппликатор серийного прибора УЗТ-5 наносили вазелиновое масло, ультразвуковой излучатель фиксировали на десне и осуществляли процедуру в импульсном режиме (импульс — 4 мс генерации) при интенсивности озвучивания 0,2 Вт/см² и продолжительности 5 мин. Ультрафонофорез лизоцима выполняли по той же методике озвучивания, используя в качестве проводящей среды 1% мазь препарата (лаолин, вазелин в соотношении 1:9, 100 мг лизоцима). Применяли препарат отечественного производства — яичный лизоцим, выпускаемый производственным объединением «Мосмедпрепараты» им. Л. Я. Карпова.

На III этапе исследований также в двух сериях опытов (18 кроликов и 85 крыс) изучали уровень лизоцима в десне и сыворотке крови при курсовом введении лизоцима в воспаленные пародонтальные ткани методом ультрафонофореза. Животных обеих серий разделили на две группы: опытную и контрольную; в опытной в воспаленную десну вводили лизоцим, в контрольной этот метод не применяли. Материал (сыворотка и ткань десны) для исследования у всех животных забирали после 3, 7, 14 процедур. Кроме того, в десне 55 крыс в течение 30 сут после последнего сеанса фонофореза изучали изменение уровня лизоцима.

На всех этапах исследования лизоцим сыворотки крови и тканей десны определяли количественно методом диффузии в агар [21], учитывая как суммарную концентрацию эндогенного и введенного лизоцима, так и исходный уровень эндогенного лизоцима. Результаты обрабатывали методом вариационной статистики.

Результаты и обсуждение. Результаты опытов по влиянию ультразвука на стандартный раствор лизоцима показали отсутствие разрушающего действия этого фактора на препарат.

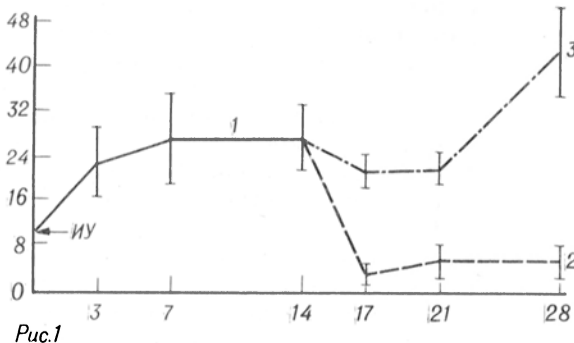


Рис. 1

Рис. 1. Динамика изменения концентрации лизоцима в слизистой оболочке десны нижней челюсти крыс при моделировании пародонтита и его лечении лизоцимом.

По оси абсцисс — время, сут; по оси ординат — содержание лизоцима, мг/г ткани. 1 — до снятия лигатуры; 2 — после снятия лигатуры без применения лизоцима; 3 — с применением лизоцима. ИУ — исходный уровень.

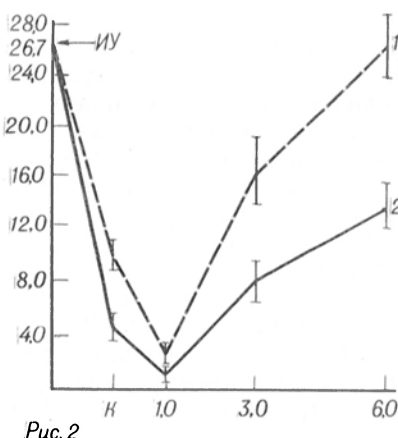


Рис. 2

Рис. 2. Динамика изменения концентрации лизоцима в воспаленных тканях десны крыс после однократного озвучивания и ультрафонофореза.

По оси абсцисс — время, ч; по оси ординат — содержание лизоцима, мг/г ткани. 1 — ультрафонофорез; 2 — озвучивание; 3 — непосредственно после озвучивания. ИУ — исходный уровень.

Во всех пробах после озвучивания сохранялась исходная концентрация раствора лизоцима — 8 мкг/мл.

В первые сутки после наложения лигатуры как у кроликов, так и у крыс развивалась острая воспалительная реакция, сопровождающаяся отеком, гиперемией, инфильтрацией тканей десны. К 21-м суткам эксперимента вследствие прогрессирующей воспалительной деструкции подлежащих тканей периодонта и костной ткани межзубных перегородок появились пародонтальные карманы, гноетечение, подвижность резцов. Формирующийся комплекс клинико-рентгенологических изменений пародонта животных при воспалении в значительной мере соответствовал основным проявлениям заболевания у человека. Наряду с этим по мере увеличения срока фиксации лигатуры и выраженности клинических проявлений воспалительного процесса в пародонте достоверно увеличивалось содержание лизоцима в сыворотке крови кроликов. Если исходный уровень лизоцима сыворотки составлял $5,8 \pm 0,5$ мкг/мл, то уже к 3-м суткам опыта он возрастал до $7,2 \pm 1,3$ мкг/мл, к 7-м суткам — до $8,2 \pm 0,4$ мкг/мл, а к 21-м суткам имело место почти двукратное повышение концентрации эндогенного лизоцима ($10,9 \pm 0,3$ мкг/мл). Подобная тенденция прослеживалась и в тканях десны крыс. Однако исходный уровень лизоцима в здоровой десне значительно превосходил таковой в других органах и тканях крыс и был равен $8,8 \pm 1,9$ мг/г. Полученные данные совпадают с результатами других авторов [43]. При экспериментальном пародонтите регистрировали трехкратное увеличение исследуемого показателя ($p < 0,05$; рис. 1). Причем такое значительное нарастание концентрации лизоцима в мягких тканях десны определялось уже на 3-и сутки опыта и сохранялось на данном уровне весь период наблюдения, достигая к 21-м суткам эксперимента $25,6 \pm 4,4$ мг/г.

Установленные особенности изменения уровня лизоцима в сыворотке и десне при воспроизведении пародонтита обусловлены, по-видимому, одним из проявлений воспалительной реакции, а именно миграцией лейкоцитов, являющихся источником фермента [11], в зону повреждения. Развитие пародонтита у кроликов характеризовалось системной лейкоцитарной реакцией, при которой число лейкоцитов в сыворотке крови по мере прогрессирования воспаления увеличивалось с $10,6 \pm 1,0 \cdot 10^9$ /л до $13,5 \pm 1,7 \cdot 10^9$ /л. Уровень сывороточного лизоцима и количество лейкоцитов крови имели сходную динамику, что указывает на прямую зависимость числа лейкоцитов и количества лизоцима в сыворотке. Однако одной лишь количественной динамики лейкоцитов еще недостаточно для объяснения колебаний концентрации фермента в крови. Велика роль в этом, вероятно, повышения проницаемости клеточных мембран и активности лизосомальных гидролаз ПЯЛ при воспалении [12]. Почти трехкратное увеличение концентрации лизоцима в тканях десны крыс при пародонтите также вызвано лейкоцитарной инфильтрацией зоны повреждения, так как ПЯЛ первыми реагируют на хемотаксический стимул бактериальной и комплементарной природы непосредственно вслед за

повреждением ткани хозяина, густо инфильтрируя десну, особенно в области эпителиального прикрепления [5, 6]. Клеточный состав мигрирующих лейкоцитов остается постоянным (99 % ПЯЛ и 1 % лимфоцитов). Вместе с тем представленные выше результаты экспериментального исследования не совпадают с данными некоторых авторов, описавших снижение содержания лизоцима в десне больных при воспалении [43]. Можно предположить, что такое несовпадение обусловлено различием исходного состояния структур воспалительного инфильтрата в условиях эксперимента в клинике. Экспериментальный пародонтит — это в основном острый воспалительный процесс, пародонтит у людей — хроническое воспаление со свойственными для него изменениями клеточного состава воспалительного инфильтрата: преобладанием лимфоцитов, содержащих незначительное количество лизоцима, нарушением функциональной активности ПЯЛ, снижением их миграционной и фагоцитарной функций [41].

Однократное озвучивание и ультрафонофорез лизоцима здоровой слизистой оболочки десны крыс вызывали почти двукратное снижение концентрации фермента в околозубных тканях. Причем максимальное падение этого показателя наблюдалось спустя 1 ч после воздействия, достигая при озвучивании $3,4 \pm 0,49$ мг/г и при ультрафонофорезе $2,7 \pm 0,37$ мг/г. В последующем, через 3, 6, 24 ч, концентрация лизоцима увеличивалась, приближаясь к исходным значениям. Таким образом, в ходе эксперимента выявлен идентичный характер изменения концентрации лизоцима в десне как «озвученных» животных, так и животных, которым лизоцим вводили методом фонофореза. Причиной подобных колебаний показателя мог быть общий фактор воздействия, а именно ультразвук. Влиянием ультразвука на ПЯЛ — основной источник лизоцима в тканях — можно объяснить падение уровня фермента в десне спустя 1 ч после действия ультразвука, хотя механизм этого влияния по результатам настоящего исследования определить трудно. Низкий уровень лизоцима в десне крыс после фонофореза лизоцима указывает, что здоровая слизистая оболочка десны либо мало проницаема для препарата, либо фермент, проникая через эпителиальный слой слизистой оболочки, не накапливается в зоне введения, а элиминирует в кровоток. В целях решения данной задачи были поставлены опыты на кроликах, у которых после однократного озвучивания и фонофореза здоровой десны в области нижних резцов определяли уровень лизоцима в сыворотке крови. Соответственно полученным данным только после фонофореза лизоцима имело место трехкратное увеличение концентрации фермента. Спустя сутки после процедуры уровень лизоцима все еще был выше исходного почти вдвое, что можно объяснить изменением активности эндогенного лизоцима, так как экзогенный лизоцим к этому сроку выводится из организма. Однократное же озвучивание здоровой десны кроликов не сопровождалось достоверным увеличением содержания лизоцима в сыворотке. Уровень фермента сохранялся в пределах исходных значений во все сроки наблюдения. Таким образом, экзогенный лизо-

цим, вводимый в здоровую слизистую оболочку десны экспериментальных животных с помощью ультразвука, проникает через эпителиальный слой слизистой оболочки, но не накапливается в зоне введения.

Однократное озвучивание и ультрафонофорез лизоцима воспаленных пародонтальных тканей крыс также сопровождалось резким падением концентрации фермента в десне спустя 1 ч после процедуры (рис. 2). Представленные данные подтверждают наше предположение о связи отмеченного явления с ультразвуковым воздействием. Вместе с тем характерно, что после ультрафонофореза лизоцима уровень фермента в десне был в 2 раза выше, чем после озвучивания. Вероятно, данный факт можно объяснить не только проникновением препарата через воспаленную слизистую оболочку десны, но и накоплением его в ней, что соответствует представлениям о барьерной функции очага воспаления. Снятие лигатуры в контрольной группе животных и последующий ультрафонофорез лизоцима в опытной вызвали купирование воспаления в пародонте. Однако полное исчезновение признаков воспаления наблюдалось лишь у животных, которым вводили лизоцим в течение 14 дней. У «нелеченых» кроликов к данному периоду рентгенологически еще определяли расширение периодонтальной щели, остеопороз вершин межзубных перегородок. Обнаруженный факт свидетельствует, вероятно, о том, что при условии проникновения и накопления в тканях пародонта лизоцима, он может оказывать мощное защитное действие, тормозя процесс остеокластической резорбции его минерализованных структур [5]. Показательна динамика содержания лизоцима в биологических субстратах «леченых» и «нелеченых» животных. Снятие лигатуры сопровождалось резким падением уровня лизоцима в десне крыс, в то время как снятие лигатуры и последующее введение лизоцима с помощью ультразвука способствовали сохранению концентрации фермента на высоких цифрах (см. рис. 1). Подобная закономерность прослеживалась и у кроликов: фонофорез лизоцима обеспечивал сохранение высокого уровня мурамидазы в сыворотке, достигая максимальных значений ($22,4 \pm 6,2$ мкг/мл) к последней процедуре. Снятие лигатуры способствовало медленному снижению изучаемого показателя: с $10,9 \pm 0,3$ до $6,2 \pm 1,3$ мкг/мл к 14-м суткам наблюдения.

Низкий уровень лизоцима в воспаленных тканях пародонта и сыворотке крови «нелеченых» животных можно объяснить рядом причин: купированием воспалительного процесса и уменьшением нейтрофильной инфильтрации, появлением в зоне повреждения в период регенерации молодых, с низким содержанием лизоцима клеток, увеличением потребности регенерируемых тканей в лизоциме в связи с его участием в регуляции проницаемости внутриклеточных мембран и протеогликанов соединительной ткани [4]. Высокий уровень лизоцима в биологических субстратах животных при выполнении физиопроцедуры обусловлен, по-видимому, как проникновением экзогенного лизоцима, так и накоплением эндогенного фермента, индуктором активности которого может быть

лизоцим, вводимый при помощи ультрафонофореза [14]. Вместе с тем нельзя исключить влияние самого ультразвука, который в используемом нами режиме озвучивания местно активизирует лимфообращение, ускоряет репаративные процессы, обладает фибролитическим и спазмолитическим свойствами [18, 34].

После курса фонофореза лизоцима у крыс в первые 6 сут наблюдения имело место постепенное снижение уровня фермента в десне с $21,8 \pm 1,4$ до $10,7 \pm 1,5$ мг/г, что, вероятно, обусловлено разрушением и выведением экзогенного лизоцима из организма животных. Вновь возникшее умеренное нарастание концентрации лизоцима к 9—12-м суткам опыта до $15,1 \pm 2,1$ мг/г, по-видимому, связано с активностью экзогенного лизоцима. Однако установить причину повышения уровня энзима по количественному определению его в тканях десны трудно. К 12—15-м суткам опыта концентрация лизоцима в десне достигла значений, которые регистрировали у здоровых животных ($7,8 \pm 1,2$ мг/г), и сохранялась на данном уровне весь период наблюдения (до 30-х суток).

Проведенное исследование позволяет сделать следующие выводы: экспериментальное воспаление в пародонте животных сопровождается увеличением концентрации лизоцима в биологических субстратах (ткань десны, сыворотка крови) кроликов и крыс; ультразвук частотой 880 кГц в непрерывном и импульсном режиме генерации при интенсивности воздействия от 0,05 до 0,6 Вт/см² и продолжительности озвучивания до 10 мин не оказывает разрушающего действия на яичный лизоцим; лизоцим, вводимый с помощью ультразвука в здоровую ткань десны кроликов и крыс, проникает через эпителиальный слой слизистой оболочки, но не накапливается в ней; лизоцим, вводимый с помощью ультразвука в воспаленные околозубные ткани, проникает и накапливается в тканях десны; лечение экспериментального пародонтита методом ультрафонофореза лизоцима способствует купированию воспаления и восстановлению структуры пародонтальных тканей в более короткие сроки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аникина Т. П., Голосова Т. В., Кохановская Т. М. // Антибиотики.— 1966.— № 5.— С. 450.
2. Аникина Т. П., Голосова Т. В. // Там же.— 1967.— № 9.— С. 815—819.
3. Барабаш Р. Д., Левицкий А. П. // Вопр. мед. химии.— 1978.— № 3.— С. 291—310.
4. Барабаш Р. Д. и др. // Пат. физиол.— 1979.— № 5.— С. 20—25.
5. Барабаш Р. Д. Энзимологические механизмы в патогенезе воспалительно-дистрофического поражения пародонта: Дис. ... д-ра мед. наук.— Одесса, 1982.
6. Барабаш Р. Д., Бондаренко В. С., Ткаченко Е. К. // Бюл. eksper. биол.— 1983.— № 1.— С. 70—72.
7. Бухарин О. В. // Химиотерапия инфекций и лекарственная устойчивость патогенных микроорганизмов.— М., 1973.— С. 17—18.
8. Бухарин О. В., Усвятцов Б. Я., Матияш И. П. и др. // Антибиотики.— 1976.— № 9.— С. 805—808.
9. Бухарин О. В., Васильев Н. В., Усвятцов Б. Я. Лизоцим микроорганизмов.— Томск, 1985.
10. Быков В. Л., Голобородько О. П., Ус И. А. // Вестн. оторинолар.— 1983.— № 1.— С. 26—29.
11. Васильев Н. В., Михайлова Т. Н., Васильева О. П. // Антибиотики.— 1975.— № 4.— С. 315—317.

12. Власов Л. Г., Толстых П. И., Игнатюк Т. Е., Раззаков О. Н. // Антибиотики и химиотер.— 1988.— № 11.— С. 848—850.
13. Воложин А. И., Виноградова С. И. // Пат. физиол.— 1990.— № 6.— С. 49—51.
14. Добротина Н. А., Ежова Г. Т., Казацкая Ж. А., Костромина И. Ф. // Иммуноглобулины и другие препараты крови.— Горький, 1986.— С. 215—217.
15. Добротина Н. А., Казацкая Ж. А., Емельянова Г. Ю. // Вопр. мед. химии.— 1987.— № 4.— С. 66—69.
16. Дьяченко Ю. В., Гукевич Е. К., Барабаш Р. Д., Левицкий А. П. // Журн. микробиол.— 1971.— № 1.— С. 143—144.
17. Ермольева З. Ф., Фурер Н. М., Равич Б. В. и др. // Антибиотики.— 1963.— № 1.— С. 39—45.
18. Ефанов О. И. Нарушения микроциркуляции при пародонтозе и физические методы их лечения: Дис. ... д-ра мед. наук.— М., 1983.
19. Жуковская Н. А. // Эпидемиология и профилактика инфекционных болезней.— М., 1962.— С. 207—213.
20. Каграмонова К. А. Изучение особенностей взаимодействия лизоцима с грамположительными и грамотрицательными микроорганизмами: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— М., 1966.
21. Каграмонова К. А., Ермольева З. В. // Антибиотики.— 1966.— № 10.— С. 917—919.
22. Кольман А. Э. // Там же.— 1967.— № 8.— С. 741—750.
23. Корвякова Е. Р. Патогенетическое обоснование применения лизоцима в комплексной терапии острой дизентерии: Дис. ... канд. мед. наук.— Рязань, 1980.
24. Либман Б. Г., Каграмонова К. А., Ермольева З. В. // Сов. мед.— 1971.— № 11.— С. 34—40.
25. Лохвицкий С. В., Абсеев М. Е., Щепеткина Л. В. // Вестн. хир.— 1989.— Т. 142, № 5.— С. 29—30.
26. Малеева Н. П. Применение лизоцима и нуклината натрия в комплексной терапии различных форм пневмонии у детей: Дис. ... канд. мед. наук.— Оренбург, 1981.
27. Морозов В. И., Прияткин С. А., Назаров И. Б. // Физиол. журн.— СССР.— 1989.— Т. 75, № 3.— С. 334.
28. Мурашова Н. С. // Антибиотики.— 1975.— № 4.— С. 369—373.
29. Олейник И. И., Пономарева А. Г., Царев В. Н. и др. // Иммунология.— 1982.— № 3.— С. 78—81.
30. Прокopenko Л. Г., Сипливая Л. Е., Чалый Г. А. // Антибиотики и химиотер.— 1990.— № 2.— С. 37—40.
31. Раззакова О. Н., Арутюнян Б. Н., Толстых П. И. и др. // Журн. эксперим. и клин. мед.— 1988.— Т. 28, № 1.— С. 80—86.
32. Ребреева Л. Н. // Стоматология.— 1944.— № 4.— С. 12—16.
33. Сафонова Т. Б., Соболев В. Р., Афанасьева Т. И. и др. // Антибиотики.— 1981.— № 4.— С. 264—268.
34. Улащик В. С. Физико-фармакологические методы лечения и профилактики.— Минск, 1979.
35. Ушаков И. С., Сентова Г. Ж., Бектасов С. К. // Здравоохр. Казахстана.— 1987.— № 1.— С. 45—46.
36. Чарлыев Г. Клиническое значение лизоцима и лактоферрина у больных хроническим бронхитом: Дис. ... канд. мед. наук.— М., 1986.
37. Чахова О. В., Горюнова А. Г. // Антибиотики.— 1965.— № 6.— С. 507—511.
38. Шехтер А. Б., Берченко Г. Н., Николаев Н. В. // Арх. пат.— 1984.— Вып. 2.— С. 20—29.
39. Щербакова Э. Г., Соболева Э. Л., Растунова Г. А. // Антибиотики.— 1983.— № 1.— С. 36—40.
40. Щербакова Э. Г., Растунова Г. А. // Там же.— 1984.— № 11.— С. 840—844.
41. Щербакова Э. Г. и др. // Арх. анат.— 1988.— Вып. 1.— С. 68—73.
42. Baggiolini M. // Enzyme.— 1972.— Vol. 13.— P. 132—160.
43. Burnett G. W., Gouge S., Toy A. E. // J. Periodont.— 1959.— Vol. 30.— P. 148.
44. Glick A. D., Rankhand J. M., Cole R. M. // Infect. and Immun.— 1972.— Vol. 6.— P. 403—413.
45. Hansen N. E. // Der. Naemat.— 1974.— Vol. 7.— P. 1—87.
46. Hayashi H., Araki Y., Ito E. // J. Bact.— 1973.— Vol. 11.— P. 592—598.
47. Kataya T. // Mycopath. Mycol. Appl.— 1970.— Vol. 42.— P. 197—207.
48. Ohta H., Osserman E. F. // Tohoku J. exp. Med.— 1972.— Vol. 107.— P. 229—240.
49. Osserman E. F. // New Engl. J. Med.— 1975.— Vol. 292.— P. 424—425.

LYSOZYME CONTENT IN ANIMAL TISSUES IN SIMULATION AND TREATMENT OF PARODONTITIS.

A. I. Volozhin, S. I. Vinogradova, I. A. Denisova, T. P. Zhuravleva

Medical Stomatological School, Moscow.

Inflammation developed after sewing of silk ligature into the rat and rabbit gingiva (parodontitis) was accompanied by increase in lysozyme content in gingiva tissue and in blood serum. Exogenous egg lysozyme, administered into normal animal gingiva tissue by means of ultrasound treatment (880 kHz, impulse regimen, 0.2 w/cm²), penetrated through the epithelial mucosal membrane layer, but did not accumulate in the membrane. However, lysozyme administered into the inflammation-injured gingiva tissue by ultrasound was accumulated in the tissue and arrested the inflammation and restored the impaired parodontium within shorter periods.

© Л. И. ГРАЧЕВА, К. С. ДЕСЯТНИЧЕНКО, 1993

УДК 616.72-001.5-092.9-07:616.153.963.1

Л. И. Грачева, К. С. Десятниченко

О СВЯЗИ ИЗМЕНЕНИЙ В СОСТАВЕ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ СУСТАВНОГО ХРЯЩА И СЫВОРОТКИ КРОВИ ПРИ ВНУТРИСУСТАВНЫХ ПЕРЕЛОМАХ У ЩЕНКОВ

Научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия», Курган

Возможность лабораторного контроля за течением репаративного процесса в зоне перелома, продолжительностью и интенсивностью катаболической и анаболической фаз не вызывает сомнения. В частности, при внутрисуставных переломах длительность первой из этих фаз возрастает по сравнению с другими видами повреждений, что находит свое подтверждение в изменении концентраций биохимических компонентов сыворотки крови [1]. Однако неясно, насколько адекватно изменение этих показателей отражает характер процессов непосредственно в месте повреждения опорно-двигательного аппарата. Так, источником поступления в кровь, например, гликозаминогликанов (ГАГ) — одного из главных химических компонентов хряща, ответственных за формирование вязкоупругих свойств хрящевой ткани [2, 10, 11], может быть не только область перелома, но и соединительная ткань паренхиматозных органов.

В связи с этим задачами нашего исследования явились изучение компонентов ГАГ в хрящевой ткани, сыворотке крови и корреляция между одноименными показателями в хряще и сыворотке крови, а также выявление связи количественных изменений этих компонентов с качественными изменениями структуры ГАГ хряща.

Методика. Щенкам в возрасте от 4 до 9 мес (18 животных) под тиопенталовым наркозом после создания чрезмыщелкового перелома плечевой кости [3] с последующим закрытием чрезкостным остеосинтезом по Г. А. Илизарову производили иммобилизацию поврежденного сустава либо сохраняли подвижность в суставе. Кровь для исследования брали из вены натошак до операции и через 1, 7, 14, 21 и 28 дней после нее. Эвтаназию животных осуществляли внутривенным введением летальной дозы 10% новокаина. Суставной хрящ при помощи скальпеля срезали с диафизов костей, образующих локтевой сустав: локтевой и плечевой. Высушенные при 110 °С до постоянной массы образцы хрящевой ткани измельчали, получая частицы около 1 мм³, и определяли в них и в сыворотке крови щенков концентрации гексуро-

новых (ГУК) [7] и силовых (СК) кислот [13], гексозаминов [8], гексоз [9]. Для определения сульфатной серы образец хряща предварительно подвергали влажному озолению в колбах Кьельдаля (20—30 мл) смесью 57 % хлорной кислоты ($d=1,50$) с уксусным ангидридом в соотношении 1:1. По завершении озоления в течение 1 ч на песочной бане содержимое колб разбавляли бидистиллированной водой до 10 мл. Затем к 4 мл озоленного хряща добавляли 50 мг хлористого бария и 50 мг полиэтиленгликоля (мол. м. 40 000) и через 15 мин нефелометрировали против раствора сравнения при 420 нм на спектрофотометре. В качестве стандартного раствора использовали 0,1 ммоль/л раствора сульфата аммония.

Для препаративного выделения ГАГ высушенные образцы суставного хряща подвергали папаиновому протеолизу (10 мг фермента в 10 мл дистиллированной воды и 10 мл 0,05 моль/л ацетатного буфера pH 6,25 на 100 мг хряща, гидролиз в течение 6—7 сут при 63 °C), гидролизат фильтровали через бумажный фильтр, переносили в центрифужные пробирки и добавляли раствор уксуснокислого натрия [80 мг на 100 мл 96 % (об/об) этанола] из расчета 3 мл ацетата на 1 мл надосадочной жидкости, пробу перемешивали и оставляли на 1 ч при 4 °C для полного осаждения ГАГ, после чего осадок отделяли центрифугированием при 3000 об/мин в течение 30 мин и далее поступали в соответствии с методикой [4]. Осадки ГАГ растворяли в 3 мл 0,02 М трис-НСН-буфере pH 7,5 и наносили на колонку 60×1,5 см (комплект оборудования для хроматографии низкого и среднего давления фирмы ЛКВ, Швеция), заполненную «Тауорепл» HW-40 (fine) (Япония). Колонку элюировали 0,02 М трис-НСН-буфером pH 7,5 и собирали фракции ГАГ на основании денситометрии элюата при 206 нм. Во фракциях определяли ГУК, гексозамины и сульфаты теми же методами, что и в сыворотке крови. Полученные по каждому из компонентов концентрации суммировали и вычисляли процентное отношение каждого от суммы концентраций всех фракций пробы. Аналогичные исследования сыворотки крови и суставного хряща проводили в группе интактных щенков (5 животных) того же возраста и массы тела. Математическая обработка данных осуществлялась на ЭВМ СМ-4 с помощью программ, разработанных в Курганском научном центре «Восстановительная травматология и ортопедия».

Результаты и обсуждение. При анализе данных (рис. 1) обнаружено, что существенные различия в концентрации исследованных компонентов сыворотки крови имеют место в течение всего периода наблюдений, причем наибольшие различия между группами с иммобилизацией сустава и без таковой — в 1-е сутки после операции: концентрация ГУК в 1,5 раза выше нормы у щенков с иммобилизованным суставом ($7,00 \pm 0,04$ ммоль/л, норма $4,67 \pm 0,26$ ммоль/л; $p < 0,05$), тогда как у щенков с мобильным суставом это различие недостоверно, а концентрация

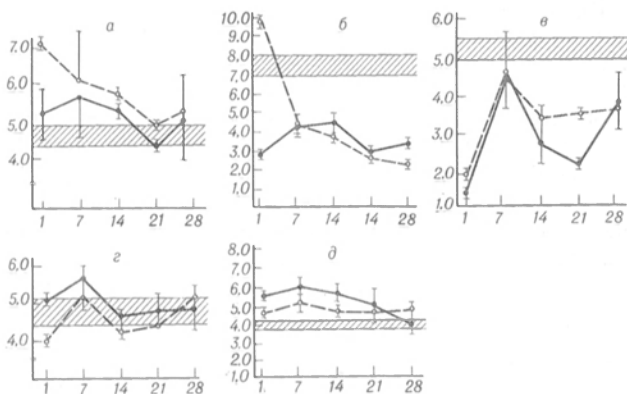


Рис. 1. Динамика измерения концентраций основных компонентов ГАГ сыворотки крови собак в процессе заживления чрезмыщелкового перелома плечевой кости.

По оси абсцисс — сутки после операции; по оси ординат — концентрация, ммоль/л. а — ГУК; б — гексозамины; в — сульфаты; г — СК; д — гексозы. Сплошная линия — группа животных с подвижным суставом, пунктирная — с иммобилизованным; косая штриховка — норма.

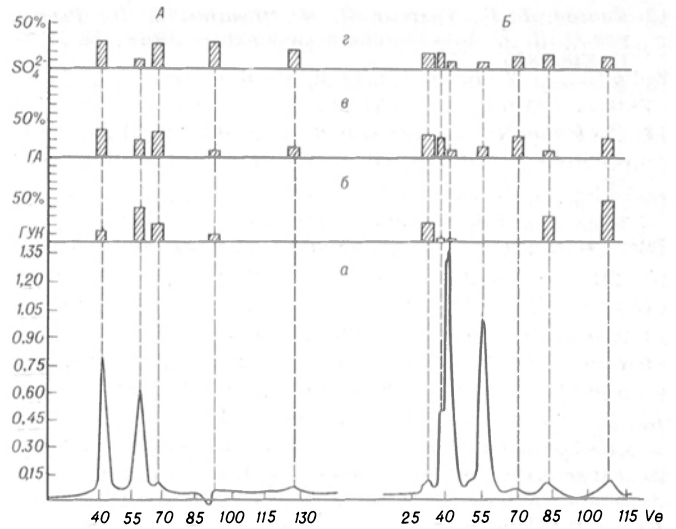


Рис. 2. Фракционный и химический состав ГАГ суставного хряща здоровых собак (А) и при переломе (Б).

а — хроматографический профиль; содержание ГУК (б), гексозаминов (в), сульфатов (г), % от общего количества во фракциях.

ГУК составила $5,22 \pm 0,62$ ммоль/л. Концентрация гексозаминов в 1-е сутки после операции у животных с иммобилизованным суставом втрое превышала значение этого показателя у щенков, у которых локомоция в локтевом суставе была сохранена. В то же время, несмотря на то что имела место тенденция к повышению уровня показателей ГАГ в сыворотке крови, количество сульфатированных ГАГ через сутки после операции снижалось для обеих групп в среднем в 4 раза по сравнению с нормой. Нужно отметить, что во все сроки наблюдения уровень сульфатов в сыворотке крови оставался ниже нормы, хотя к 28-му дню после операции отмечалась тенденция к нормализации этого показателя, что вполне согласуется с утверждением о том, что в первую очередь изменения условий функционирования сустава и других факторов, влияющих на деструктивные процессы в суставном хряще, затрагивают агрегаты протеогликанов, концентрированный раствор которых (около 100 мг/мл) и образует хрящевой матрикс [5].

Эти результаты согласуются с данными, полученными для суставного хряща: в группе собак с иммобилизованным суставом имеет место корреляции на достоверном уровне между концентрацией в сыворотке крови и хряще для ГУК ($r_s = -0,70$), гексозаминов ($r_s = +0,70$) и сульфатов ($r_s = -0,87$). В группе щенков, у которых движения в суставе не ограничивали, коэффициент корреляции по Спирмену для ГУК имел то же значение, что и для группы с иммобилизованным суставом, а для гексозаминов и сульфатов был несколько ниже (для гексозаминов $r_s = +0,50$, $p < 0,05$, для сульфатов $r_s = -0,50$, $p < 0,05$). В обеих группах коэффициент корреляции для гексоз и СК был равен $-0,50$ ($p < 0,05$).

При этом снижение в 5—6 раз по сравнению с нормой общего количества протеогликанов (по концентрации ГУК) в суставном хряще обеих групп щенков во все сроки наблюдения было связано с нарушением структуры этих протеинполисахаридов, играющих ведущую роль в формировании механических свойств хрящевой ткани. Хро-

матографические профили цетавлоновых осадков ГАГ хрящей локтевого сустава оперированной конечности щенков при лечении перелома с фиксацией отломков и сустава в течение 28 сут имели более сложную конфигурацию (рис. 2, Б) по сравнению с интактным хрящом (рис. 2, А): количество пиков увеличивалось с 5 до 7. Хотя фракция с наибольшей оптической плотностью — 206 нм — выходила в экспериментальной и контрольной сериях в одном и том же элюиционном объеме (V_e , 40 и 32 мл), качественное определение основных компонентов ГАГ — ГУК, гексозаминов, сульфатов — обнаружило снижение их содержания в этой фракции по сравнению с интактным хрящом в 2—3 раза. В то же время в экспериментальной группе в свободном объеме элюировались высокомолекулярные фракции с достаточно высоким содержанием компонентов ГАГ хрящей. Кроме того, в суставном хряще щенков с переломом появлялась фракция с V_e 110 мл, содержащая около 50 % ГУК от суммы концентраций во всех фракциях. У интактных животных эта фракция отсутствовала.

Эти структурные и количественные изменения ГАГ нашли свое отражение и в изменении количественных и качественных соотношений неколлагеновых белков сыворотки крови. На фоне общего снижения количества гликопротеидов сыворотки крови (по концентрации гексозаминов) во все сроки наблюдения, за исключением 1-х суток после операции, для группы щенков с иммобилизованным суставом было характерным изменение углеводной части этих макромолекул — преобладало накопление СК и гексоз (повышение концентрации СК в сыворотке крови — свидетельство воспалительных процессов в тканях сустава [12]). Соотношение СК/гексозамины/гексозы в сыворотке крови щенков без иммобилизации локтевого сустава на 7-е сутки после операции было равно 1,3/1,0/1,4 (с иммобилизацией 1,2/1,0/1,2), а в норме — 1,2/1,9/1,3. К 28-му дню наблюдения это соотношение у щенков с подвижным суставом было равно 1,4/1,0/1,2, тогда как в группе с иммобилизованным суставом — 2,2/1,0/2,1, что согласуется с морфологическими исследованиями В. С. Песчанского, обнаружившего у животных с иммобилизованным суставом расстройство кровообращения в виде кровоизлияний, отека и венозной гиперемии с наличием стазов и тромбозом мелких вен, а в суставном хряще — дистрофические и деструктивные изменения, преимущественно в его поверхностной зоне. Этими изменениями вполне объясняется снижение содержания ГУК суставного хряща в 2,6 раза по сравнению с нормой через неделю после операции у щенков с мобильным суставом ($p < 0,05$) и в 7 раз ($p < 0,05$) — с иммобилизованным, причем к 28-му дню после операции концентрация ГУК у животных с мобильным суставом достигает нормальных значений, а у щенков с иммобилизованным суставом становится в 6 раз ниже, чем у интактных. Наши данные согласуются с наблюдениями [6], когда дефект в травмированном суставном хряще заполняется массой нового гиалинового хряща в случае сохранения движений в суставе, а в случае их отсутствия — рыхлой соединительной тканью.

Таким образом, при внутрисуставных переломах

изменения количества и качественного состава ГАГ — основных компонентов хрящевой ткани — на достоверном уровне коррелируют с изменениями концентрации компонентов ГАГ в сыворотке крови, а изменения сывороточных уровней этих компонентов адекватны и синхронны таковым в суставном хряще локтевого сустава оперированной конечности экспериментальных животных, что позволяет использовать эти показатели в качестве диагностических тестов для оценки интенсивности и направленности процессов непосредственно в месте повреждения и в случае начала процесса хондрогенерации предпринять меры, направленные на предотвращение неблагоприятных исходов. Кроме того, полученные результаты подтверждают клинические наблюдения, свидетельствующие о целесообразности применения при лечении внутрисуставных переломов метода чрескостного остеосинтеза по Г. А. Илизарову, позволяющего при стабильной фиксации отломков обеспечивать раннюю функцию сустава, играющую основную роль в сохранении биомеханических свойств хрящевой ткани, которая принимает на себя основную механическую нагрузку при локомоциях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Герасимов А. М., Фурцева Л. Н. Биохимическая диагностика в травматологии и ортопедии. — М., 1986.
2. Грачева Л. И., Десятниченко К. С., Ерофеев С. А., Угенькин А. А. // Всесоюзная школа по биологии опорно-двигательного аппарата, 8-я: Материалы. — Киев, 1990. — С. 48—49.
3. Илизаров Г. А., Знаменский Г. Б. // Актуальные проблемы чрескостного остеосинтеза по Илизарову. — Курган, 1987. — Вып. 12. — С. 3—8.
4. Карякина Е. В., Косыгин Д. В. // Лаб. дело. — 1982. — № 10. — С. 15—17.
5. Павлова В. Н., Копьева Т. Н., Слуцкий Л. И., Павлов Г. Г. Хрящ. — М., 1988.
6. Хэм А., Кормак Д. Гистология: Пер. с англ. — М., 1983. — Т. 3.
7. Bitter T., Muir H. M. // *Analyt. Biochem.* — 1962. — Vol. 4. — P. 330—334.
8. Elson I., Morgan W. // *Biochem. J.* — 1933. — Vol. 27. — P. 1824—1831.
9. Holt C. // *Klin. Wschr.* — 1954. — Bd 32. — S. 66—67.
10. Kempson G. E. // *Adult Articular Cartilage* / Ed. M. A. R. Freeman. — London, 1979. — P. 353—414.
11. Maroudas A. // *Adult Articular Cartilage* / Ed. M. A. R. Freeman. — Oxford, 1973. — P. 100—130.
12. Shamberger R. J. // *Anticancer Res.* — 1986. — Vol. 6, N 6. — P. 717—720.
13. Warren L. // *J. biol. Chem.* — 1959. — Vol. 234, N 8. — P. 1971—1975.

Поступила 20.09.91

RELATIONSHIP BETWEEN CHANGES IN THE COMPOSITION OF GLYCOSAMINOGLYCANS IN ARTICULAR CARTILAGE AND BLOOD SERUM OF PUPPIES WITH INTRAARTICULAR FRACTURES.

L. I. Gracheva, K. S. Desyatnichenko

Reconstructive Traumatology and Orthopedics, Research Centre, Kurgan.

Quantitative and qualitative changes in the composition of glycosaminoglycans isolated from cartilage tissue significantly correlated with those of major serum components in treated puppies with intraarticular fractures. At the same time, the glycosaminoglycans composition was altered in blood serum adequately and simultaneously to those occurred in articular cartilage of the impaired extremity.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.98:578.828.61-07:616.153.96-097-078.33

*М. Р. Фархутдинов, Ф. Г. Галиуллин,
Э. Г. Давлетов, Ш. Ф. Габбасов, Б. Н. Сафин*

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В МЕТОДЕ ИММУНОБЛОТТА

Башкирский медицинский институт, Уфа

Наблюдаемая в настоящее время тенденция к увеличению заболеваемости синдромом приобретенного иммунодефицита (СПИД) определяет актуальность разработки чувствительных методов выявления инфицированности вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), пригодных для массового обследования пациентов.

Инфицирование ВИЧ ведет к репликации вируса в клетках-мишенях, образованию и накоплению специфических антител в сыворотке крови [5]. Наиболее иммуногенными белками вирусной частицы являются поверхностные гликопротеины gp160/120, а также трансмембранный белок gp41. К этим белкам антитела выявляются у 98 % инфицированных индивидуумов [10]. Антитела к основным внутренним белкам ВИЧ (p24 и p17) выявляются примерно у 75 % инфицированных и не более чем у 50 % больных с клинически выраженным СПИДом.

Основным и наиболее распространенным методом выявления инфицированности ВИЧ является иммуоферментный анализ (ИФА) антител к специфическим белкам в сыворотке крови [16]. Альтернативным подходом к иммуохимической диагностике СПИДа, являющимся одновременно и средством подтверждения тестов первого поколения, является метод иммуоблоттинга или вестерн-блотта [11]. В этом тесте исследуемые сыворотки реагируют с индивидуальными вирусными белками, полученными разделением по молекулярной массе с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ). Затем образующиеся комплексы антиген — антитело определяются с помощью ИФА Elisa или радиоиммунной реакции, выявляемой на автордиограммах. Предложены также лабораторные тесты, включающие выделение вируса или обнаружение его компонентов (антигенов, нуклеиновых кислот, обратной транскриптазы). Все эти системы имеют ряд недостатков, к числу которых относятся их трудоемкость и сложность определения, а главное, опасность работы с нативным вирусом. Поэтому перспективными представляются разработки по получению отдельных белков вируса или их блоков с помощью техники рекомбинантных ДНК с их экспрессией в про- или эукариотических клетках.

Целью настоящей работы явилось изучение возможности использования в иммуохимической реакции определения антител к ВИЧ предшест-

венников поверхностных и внутренних белков ВИЧ-1, полученных генно-инженерными методами.

Для создания рекомбинантных конструкций нами был использован вирус осповакцины (ВОВ). Этот вирус, как и другие поксовирусы, обладает рядом необычных молекулярно-биологических свойств. Интересна структурно-функциональная организация вирусов данной группы. Изучение делеционных мутантов вируса ВОВ позволило заключить, что нет четких ограничений размеров молекулы ДНК, способной образовывать инфекционную частицу. И наконец, ВОВ является наиболее изученным представителем семейства поксовирусов. Вирус осповакцины размножается в цитоплазме клетки, причем частицы его синтезируют функциональную мРНК, которая копируется, метилируется и полиаденилируется. Данный вирус имеет уникальные сигналы инициации транскрипции, узнаваемые только вирусной РНК-полимеразой [9, 15].

Методика. Создание рекомбинантных конструкций на основе вируса осповакцины для экспрессии чужеродных генов можно условно разделить на следующие этапы: получение рекомбинантной плазмиды; введение в геном вируса; выделение рекомбинантного вируса.

Получение рекомбинантной плазмиды описано [3].

Нами в работе были использованы эндонуклеазы рестрикции, Т4 ДНК-лигаза и фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I фирмы «Ферментас» (Вильнюс). Трансфекцию проводили по описанной методике [14] с использованием штамма WR осповакцины. Селекцию рекомбинантов, содержащих клонированный ген в составе вирусного гена ТК, проводили по ТК-фенотипу на ТК-клетках в присутствии 5-бромдезоксиридина Bd VR [1]. Присутствие чужеродной ДНК в составе вирусного генома определяли с помощью ДНК-гибридизационного теста [2, 3], а с помощью ДОТ-анализа с антителами тестировали экспрессию чужеродного гена [1]. Электрофоретическое разделение белков проводили по методу [7] в 13 % ПААГ. Перенос белков на нитроцеллюлозный фильтр осуществляли в течение ночи при напряжении 9 В/см² [12]. Затем фильтр ополаскивали дистиллированной водой и для контроля переноса белков окрашивали фильтры красителем Попсо. При наличии четких белковых полос фильтр разрезали на полоски шириной 0,3—0,4 см. После отмывки красителя для закрытия мест неспецифического связывания полоски инкубировали в 5 % растворе сухого молока (1 ч при 37 °С). Затем фильтр отмывали в буфере, содержащем 0,15 М NaCl, 0,02 М трис-НСl рН 7,5, 0,05 % твин-20 (буфер А). Для выявления антител полоски инкубировали в течение 1 ч с используемой сывороткой в разведении 1:100—1:200 при 37 °С в буфере, содержащем 0,15 М NaCl и 0,02 М трис-НСl рН 7,5 (буфер Б). Отмывали 5-кратно по 5 мин буфером А. Определение реакции антиген — антитело осуществляли за счет инкубации полосок с иммунопероксидазным кроличьим конъюгатом против человеческого иммуноглобулинов в течение 1 ч при 37 °С. После 5-кратной отмывки буфером А места локализации комплекса выявляли инкубацией стрипа в растворе, содержащем 0,06 мг/мл хлорнафтола, 20 % метанола, 0,02 М трис-НСl рН 7,5, 0,5 М NaCl и 0,005 % H₂O₂. Иммунопероксидазный кроличий конъюгат против человеческих IgG получали [17] методом периодатного окисления углеводного компонента пероксидазы с последующим ковалентным его связыванием с антителами к человеческому IgG, выделенными из антисыворотки кролика путем аффинной хроматографии на колонке с ковалентно-связанным иммунохимически чистым человеческим IgG. Имобилизацию человеческого IgG на сефарозе осуществляли по известной схеме [4]. Специфические антитела элюировали с иммуносорбента 0,1 М глициновым буфером рН 2,3. Концентрацию антител

устанавливали методом Лоури [8]. Антитела к ВИЧ определяли иммуноферментным методом, используя тест-системы «Вектор» и «Антиген» (СНГ), «Organon teknika» (Голландия), «Abbott» (США).

Результаты и обсуждение. В результате генно-инженерных манипуляций мы получили рекомбинантную плазмиду (инсерционный вектор), которая содержит гибридный ген, фланкированный вирусными последовательностями ДНК. В конструкции находится промотор осповакцины, состыкованный в соответствующей ориентации с кодирующей частью чужеродного гена. Последовательность вводится в вирусный ТК-ген, не существенный для развития вируса в культуре клеток. Это обеспечивает возможность селекции ТК-рекомбинантов с помощью 5-бромдезоксигуанидина. Между фланкирующими последовательностями и вирусным геномом происходит гомологичная рекомбинация, вследствие чего ген оказывается в составе вирусной ДНК.

Нами получены штаммы — продуценты осповакцины, содержащие в составе своего генома последовательности, кодирующие протеин — предшественник р50 — внутренних вирионов белков р17 и р24 и поверхностного белка gp120. Рекомбинантные белки синтезируются в культуре клеток почки зеленой мартышки CV-1, зараженной штаммами вируса осповакцины. Полученные белки после разделения в ПААГ переносятся на нитроцеллюлозную мембрану и инкубируются с сыворотками крови. Комплекс антигена с антителами выявляется конъюгатом кроличьих антител к иммуноглобулинам человека, меченных пероксидазой. Окрашивание происходит при добавлении хромогенного субстрата. Контролем служила сыворотка с ВИЧ-антителами и нормальная человеческая сыворотка. Была проанализирована панель из сероположительных, серонегативных и ложноположительных сывороток. Полученные результаты представлены на рис. 1 и 2. На исследуемых полосках в случаях положительно реагирующих сывороток на уровне белков с мол. м. 50 000 и 120 000 проявлялись четко окрашенные полосы, свидетельствующие о наличии в данных сыворотках антител к ВИЧ.

В настоящее время существующие тест-системы для определения ВИЧ основаны на использовании вирусного лизата либо синтетических пептидов, либо антигенов, полученных генно-инженерными методами. Последнее необходимо признать более перспективным, так как использование таких антигенов безопасно по сравнению с нативными антигенами. Однако разработанные продуценты вирусных антигенов относятся в основном к прокариотической системе и, по-видимому, вследствие измененного процессинга эти тест-системы дают большое количество ложноположительных реакций. В связи с этим особый интерес представляют эукариотические продуценты.

В предлагаемой нами системе антигены синтезируются в клетках почки зеленой мартышки, что исключает ложноположительные реакции с клеточными белками [13], а взаимодействие сывороточных антител с белками самой осповакцины конкурентно блокируется противооспенной сывороткой кролика.

Таким образом, оказалось возможным применение рекомбинантных антигенов для выявления

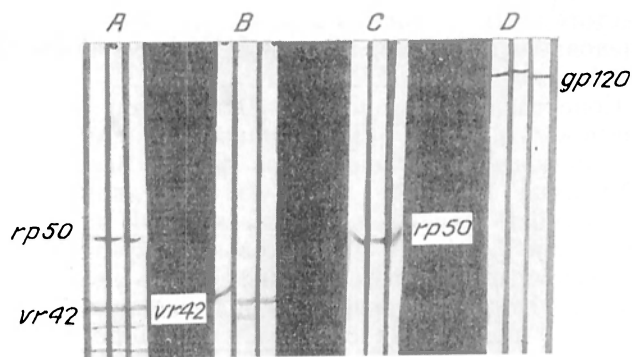


Рис. 1. Результаты ИФА реакции рекомбинантных внутренних и поверхностных белков ВИЧ-1 со специфическими антителами.

А — полоски с рекомбинантным антигеном р50, положительно реагирующие с антителами к внутренним белкам ВИЧ-1 и антителами к белкам вируса осповакцины VR42; *В* — полоски с белками ВОВ; антитела сыворотки реагируют с белком VR42; *С* — полоски с рекомбинантным антигеном р50, положительно реагирующие с антителами к внутренним белкам ВИЧ-1, с предварительной забивкой гипериммунной кроличьей сывороткой к оспенным антигенам; *Д* — полоски с рекомбинантным антигеном gp120, положительно реагирующие с антителами к поверхностным белкам ВИЧ-1, с предварительной забивкой гипериммунной кроличьей сывороткой к оспенным антигенам.

антител и к внутренним, и к оболочечным белкам вируса. Имеющиеся данные [8] свидетельствуют, что при переходе от латентной фазы инфекции к клинически выраженному симптомокомплексу СПИДа часто происходят исчезновение или резкое снижение титра антител к внутренним белкам и повышение титра к оболочечным. Бесспорно положительными признаются при этом пробы, взаимодействующие как с внутренними, так и оболочечными белками ВИЧ. Поэтому предлагаемая нами тест-система с рекомбинантными белками позволяет выявить сыворотки крови, истинно положительные на наличие антител к ВИЧ-1.

При испытании в созданной нами тест-системе иммуноблотта нескольких образцов сывороток доноров и лиц, страдавших различными острыми и хроническими заболеваниями, несмотря на положительные реакции и полученные при исследовании их в тест-системах ИФА, мы ни в одном из этих случаев антитела обнаружить не смогли. Иначе говоря, эти данные находятся в соответствии с существующими указаниями о высокой

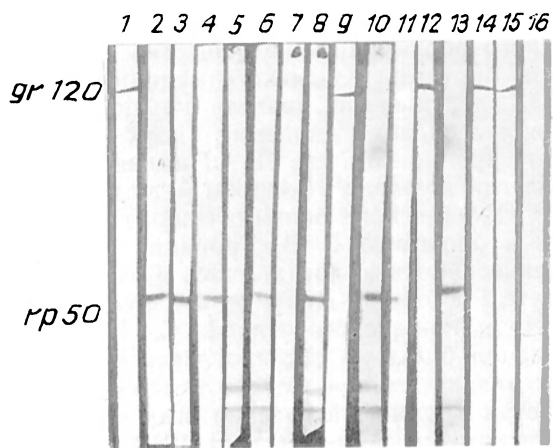


Рис. 2. Результаты иммуноблоттинга сывороток крови ВИЧ-инфицированных и здоровых лиц с использованием рекомбинантных белков.

Полоски 1, 9, 12, 14, 15 с рекомбинантным антигеном gp120, а также полоски 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 13 с рекомбинантным антигеном р50, положительно реагирующие с антителами сыворотки крови ВИЧ-1-инфицированных людей. Полоски 7, 16 — контроль (сыворотка здоровых людей).

частоте ложноположительных результатов при исследовании сывороток на анти-ВИЧ и тест-системе ИФА.

Сопоставление результатов определения антигенов в крови людей разработанным нами методом и с помощью диагностикумов фирм «Вектор» и «Антиген» показало хорошую корреляционную зависимость данных, полученных этими разными методами. Главными положительными критериями нашего метода являются специфичность и высокая чувствительность, скорость получения данных, простота проведения анализа и учета результатов, а также его экономичность. Тест-система, предложенная нами, позволяет использовать полученные рекомбинантные белки для иммунохимического выявления ВИЧ-1 и рекомендовать его для клинического применения в целях диагностики.

Авторы выражают благодарность И. И. Фридлянской (Санкт-Петербургский институт цитологии РАН) за предоставленные штаммы клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гловер Д. Клонирование ДНК: Пер. с англ.— М., 1988.— С. 476—477.
2. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование: Пер. с англ.— М., 1984.— С. 332.
3. Маниатис Т. и др. // Там же.— С. 291.
4. Остерман Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот.— М., 1985.
5. Chandra A., Gerber T., Kaul S. et al. // FEBS Lett.— 1986.— Vol. 200.— P. 327—332.
6. Coates A. R. M., Cookson J., Barton G. J. et al. // Ibid.— 1987.— Vol. 326.— P. 549—550.

7. Laemmli V. K. // Nature.— 1970.— Vol. 227.— P. 680—685.
8. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem.— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
9. Moss B. // Molecular Biology of Animal Viruses / Ed. D. P. Nayak.— 1978.— Vol. 2.— P. 849.
10. Sanchez R., Power M. D., Barr P. J. et al. // Science.— 1985.— Vol. 227.— P. 484—492.
11. Schneider J., Yamamoto N., Hinuma Y. et al. // Virology.— 1984.— Vol. 132.— P. 1—11.
12. Towbin H., Staebelin T., Gordon J. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1979.— Vol. 76.— P. 4350—4354.
13. Van der Poel C. R., Reesink H. W., Tersmette M. et al. // Lancet.— 1986.— Vol. 2.— P. 752—753.
14. Weir J. P., Bajszar G., Moss B. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1982.— Vol. 79.— P. 1210.
15. Weir J. P., Moss B. // J. Virol.— 1983.— Vol. 46.— P. 530.
16. Weiss S. H., Goldvei J. J., Sarugadnow M. G. et al. // J. A. M. A.— 1985.— Vol. 253.— P. 221—225.
17. Wilson M. B., Nakane P. K. // Immunofluorescence and Related Staining Techniques.— Amsterdam, 1980.— P. 215—244.

Поступила 29.05.91

PRODUCTION OF RECOMBINANT PROTEINS AND THEIR USE IN IMMUNOBLOTTING

M. R. Farkhutdinov, F. G. Galiullin, E. G. Davletov, Sh. F. Gabbasov, B. N. Safin

Bashkir Medical School, Ufa.

Chemico-enzymatic synthesis and cloning of genes coding viral proteins — precursors of p50 and gp120 in the eukariotic vector system were carried out. The recombinant proteins obtained were shown to be used in immunochemical evaluation of AIDS virus antibodies in blood serum.

НЕКРОЛОГ

УДК 577.1:92 Троицкий

ПАМЯТИ ГЕРМАНА ВАСИЛЬЕВИЧА ТРОИЦКОГО

17 октября 1992 г. на 79-м году жизни умер Герман Васильевич Троицкий, председатель Крымского биохимического общества, профессор кафедры биохимии Крымского медицинского института, заслуженный деятель науки Украины, член-корреспондент Академии наук Украины, лауреат премии им. А. В. Палладина, член редколлегии журнала «Вопросы медицинской химии» и «Украинского биохимического журнала».

Путь в биохимию Г. В. Троицкий начал еще в студенческие годы, когда, учась в медицинском институте Ростова-на-Дону, он под руководством акад. Н. А. Рожанского и проф. С. Д. Балаховского начал большую исследовательскую работу по изучению витаминов. Спустя 3 года после окончания вуза Герман Васильевич стал кандидатом медицинских наук. Это было в 1940 г. ... Война прервала его научную работу. Майор медицинской службы Г. В. Троицкий — на фронте с 1941 г. В составе действующей армии он прошел путь от Сталинграда до Берлина. Орден Красной Звезды и другие боевые награды — свидетельство мужества, проявленного на полях сражений. В конце войны — Германия, Штаргарт. На попечении



военврача Троицкого освобожденные из неволи, доведенные до крайней степени истощения узники концлагерей. Герман Васильевич и его коллеги делают все, чтобы отвоевать у смерти этих людей.