

ТОМ 39

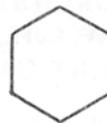
ВЫПУСК 4

ИЮЛЬ — АВГУСТ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

# ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

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

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

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

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



© В. З. ГОРКИН, Л. Н. ОВЧИННИКОВА, 1993

УДК 616.153.1:577.152.143]-07(048.8)

*В. З. Горкин, Л. Н. Овчинникова*

## СИСТЕМА АМИНОКСИДАЗ: СОВРЕМЕННЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ В ИССЛЕДОВАНИЯХ ПРИРОДЫ, ФУНКЦИЙ И ИХ НАРУШЕНИЙ

Институт биологической и медицинской химии РАМН, Москва

За последние годы в области биохимии аминов важное место заняли исследования природы компонентов биологической системы аминоксидаз (АО): флавиносодержащих моноаминоксидаз (МАО), медьзависимых диаминоксидаз (ДАО) и АО плазмы крови и семикарбазидчувствительных тканевых АО, а также природных модуляторов свойств этих ферментов в норме и при патологических состояниях [9, 22, 91].

Особенно важны клонирование комплементарных ДНК, соответствующих МАО типа А [избирательно блокируемых хлоргиллином (N-(2,4-дихлорфенокси)пропил - N - метил - 2 - пропиниламин·HCl) и предпочтительно катализирующих дезаминирование физиологических концентраций серотонина или норадреналина] или МАО типа Б [избирательно блокируемых депренилом (N-фенилизопропил-N-метил-2-пропинамид·HCl) и предпочтительно катализирующих дезаминирование низких концентраций 2-фенилэтиламина (ФЭА) или бензиламина] [31, 38, 56, 57, 62]. Эти выдающиеся работы однозначно решили вопрос о множественности флавиносодержащих МАО, которые оказались различающимися по первичной структуре белками [31], биосинтез которых кодируют разные гены [56].

Доказано, что синтезируемые в цитоплазматических полисомах молекулы МАО включаются в митохондриальные мембраны при участии 76-членного полипептида убиквитина [102, 104]. В тканях млекопитающих МАО-А и МАО-Б локализованы в различных клетках [31, 47]. Свойство претерпевать инициируемое частичным окислением тиоловых групп качественное модифицирование (трансформацию) каталитической активности с появлением способности катализировать дезаминирование таких не относящихся к числу субстратов АО азотистых соединений, как глюкозамин или  $\gamma$ -аминоасляная кислота [8, 52], принадлежит именно МАО-А.

Установлена роль МАО в метаболизме 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) и других нейротоксических производных пиридина [49, 58], что привело к разработке наилучшей экспериментальной модели болезни Паркинсона. Доказано, что при шизофрении наруше-

на обратимость [53] модифицирования свойств МАО-А мозга человека [52].

Доказана эффективность и безопасность ингибиторов МАО в геронтопсихофармакологии [16], с чем связано ускорение изысканий обратимых избирательных ингибиторов МАО [15], среди которых наиболее известны в настоящее время [78] моклобемид [RO 11-1161; *n*-хлор-N-(2-морфолиноэтил)бензамид] и бромфаромин [GCP 11305; 4-[5-метокси-7-бром-бензофуранил-2) пиперидин].

Существенные достижения в изучении медьзависимых ДАО и АО тканей или плазмы крови связаны с открытием в их составе кофермента пирролохинолинхинона (метоксатии) [45]. Доказано участие медьзависимых АО в регуляции процессов роста и деления клеток, иммунного ответа организма, аллергических и воспалительных реакций [27].

Ранее не известные данные получены в исследованиях природных факторов регуляции свойств АО [22]. Так, важный компонент эндогенного ингибитора МАО трибулина [47] был идентифицирован с индол-2,3-дионом (изатин) [50].

Результаты таких исследований часто становятся основой для разработки новых диагностических подходов [24] и новых лекарственных средств [17, 18, 76].

Целью настоящей статьи является обсуждение не рассмотренных в предшествующих обзорных работах [9, 52] медико-биологических направлений этих исследований.

**МАО.** По современным представлениям [95], МАО-А плаценты человека состоит из двух субъединиц с мол. м. по 65 кДа каждая, МАО-Б печени быка состоит из двух субъединиц с мол. м. по 57 кДа каждая. Остаток ФАД связан с цистеином полипептидных цепей, составляющих каждую из субъединиц молекул обоих ферментов. Так, наблюдали ковалентное присоединение флавина (при помощи механизма аутофлавиации) к остатку цистеина апофермента МАО-А (ферментный препарат получали, используя комплементарную ДНК, соответствующую МАО-А печени человека, с последующим экспрессированием в клетках дрожжей) [96]. Свойства флавиносодержащих МАО существенно изменяются при модифицировании липидных компонентов биомембран (например, при введении в организм антиоксидантов) [19]. На активность МАО влияют также остатки сиаловых кислот гликолипидов мембранного микроокружения МАО; обработка нейраминидазой митохондриальных фракций из лимфоцитов и гранулоцитов крови свиньи подавляла активность МАО-Б [32].

При помощи  $^3\text{H}$ -паргилина, специфически

блокирующего каталитические центры MAO, показано, что содержание MAO-A в плаценте человека равно 3,9 пмоль/мг белка, содержание MAO-B в тромбоцитарных мембранах человека равно 5,7 пмоль/мг белка, тогда как содержание обоих изоферментов MAO в коре и хвостом ядре мозга человека не превышает 1,6--2 пмоль/мг белка [71]. Иммунохимическими методами показано, что в крови человека содержится 0,33 мкг MAO-B на  $10^8$  тромбоцитов, что соответствует 16 500 молекулам MAO-B на 1 тромбоцит [99].

Полностью расшифрована первичная структура MAO-A и MAO-B [31, 48, 56, 57, 62]. Отмечены различия в первичной структуре MAO-A и MAO-B, а также генов, кодирующих биосинтез этих ферментов [38]. Структурный ген MAO-A локализован на X-хромосоме человека [56]. Делеции в этом локусе сопровождаются аномалиями развития мозга, хотя поражаемые в таких случаях гены не были идентичны генам, участвующим в биосинтезе MAO [87].

Относительно высокое (по сравнению с другими тканями) содержание мРНК, участвующих в биосинтезе MAO-A и MAO-B, отмечено в тканях тонкой кишки [54].

Все белки, полученные путем экспрессии в клетках млекопитающих комплементарных ДНК, соответствующих MAO-A и MAO-B человека, обнаруживали аминоксидазную активность [62]. Первичная структура MAO-A или MAO-B из одного органа животных разных видов характеризуется большим сходством, чем первичная структура MAO-A и MAO-B из одного биологического объекта. Так, полипептидная цепь каждой из субъединиц MAO-B печени крыс, состоящая из 520 аминокислотных остатков, на 88 % совпадает с последовательностью аминокислот в MAO-B печени человека [57]. В области С-конца полипептидных цепей субъединиц MAO локализован остаток цистеина, участвующий в ковалентном связывании с ФАД [56, 57]. В области N-концов полипептидных цепей MAO имеется домен, связывающий фосфатные эфиры аденозина [56], что характерно и для других ФАД-содержащих ферментов. В условиях инициируемых окислением тиоловых групп MAO модификаций свойств MAO [52] способность этих ферментов взаимодействовать с фосфатными эфирами аденозина (АМФ, АДФ) резко возрастает и сопровождается дезаминированием фосфатных эфиров аденозина, протекающим по уравнению гидролитической реакции [8, 28, 52]. На поверхности MAO обнаружено 5 гидрофобных локусов, участвующих во взаимодействиях с биомембранами [57].

Биосинтез MAO печени крысы осуществляется во фракции свободных (но не связанных с мембранами) полисом [81]. В системе, содержащей лизат ретикулоцитов крови кролика и мРНК различных фракций полисом печени крысы, синтезированные MAO по величинам молекулярной массы идентичны MAO наружных мембран митохондрий печени крысы. Синтезированные во фракции цитоплазматических полисом молекулы MAO, не подвергаясь процессингу, связанному с действием протеиназ [57], транспортируются при участии требующего затраты энергии про-

цесса в наружные мембраны митохондрий печени крысы, где имеются центры, вовлекаемые в соответствующие специфические белок-белковые взаимодействия.

В быстрорастущих тканях (плацента), где интенсивность биосинтеза белков особенно высока, скорость синтеза MAO может превышать скорость ее включения в митохондриальную мембрану; при этом содержание MAO в микросомальной фракции и в цитозоле могло бы становиться относительно высоким по сравнению с содержанием MAO во фракции митохондрий. В плаценте человека отмечено относительно высокое содержание растворимой MAO в цитозоле; по молекулярной массе (61 кДа) эта растворимая MAO почти не отличалась от мембранно-связанных митохондриальной и микросомальной MAO (62 и 61 кДа соответственно) [14], но особенности каталитических свойств этих форм MAO не были идентичны. Так, растворимая цитоплазматическая MAO плаценты человека взаимодействовала с избирательным ингибитором MAO-A [N-(*o*-хлорфеноксэтил)-циклопропил-амин; Лилли 51641] обратимо (даже после преинкубации в течение 3 ч при 37 °С, тогда как мембранно-связанные MAO с этим ингибитором взаимодействовали необратимо [52]; обладала по сравнению с мембранно-связанными MAO более низким сродством к субстратам (в 4--5 раз для серотонина и в 7--8 раз для ФЭА); требовала для насыщения каталитических центров серотонином в 5 раз более высокой его концентрации, чем мембранно-связанные MAO. Множественные формы MAO быстрорастущих тканей, возможно, представляют собой продукты незавершенного биосинтеза MAO.

Синтезированная в бесклеточной системе, содержащей лизат ретикулоцитов кролика и поли(А)<sup>+</sup>РНК печени быка, MAO-B включалась в митохондрии (или их наружные мембраны) печени крысы [102]. Для связывания синтезированной MAO с митохондриальными мембранами АТФ не требовался, но для включения MAO-B в мембраны АТФ необходим. Обработка трипсином митохондриальных мембран печени крысы предотвращала включение (но не связывание!) MAO-B в мембраны, что указывало на участие в этом процессе фактора пептидной природы. Этот фактор был идентифицирован с убиквитином (состоящий из 76 аминокислотных остатков полипептид, способный к участию в ферментативной конъюгации с белками) [104]. Обработывая лизат ретикулоцитов антителами к убиквитину, можно снизить его содержание в системе, что предотвращало включение MAO-B в мембраны; добавление в пробы убиквитина возвращало (в присутствии АТФ) включение MAO в мембраны к исходному уровню. Мутантные формы убиквитина, не способные участвовать в АТФ-зависимом ферментативном его конъюгировании с белками, не обладают свойством участвовать в процессе включения MAO в биомембраны. Синтезированная в бесклеточной системе MAO-A человека связывается и включается в митохондриальные мембраны печени крысы [103]. Истощение запасов эндогенного АТФ (при помощи апиразы, КФ 3.6.1.5; АТФ-дифосфогидролаза) или убиквитина (при

помощи очищенных антител к этому полипептиду) не влияло на связывание MAO-A, но предотвращало включение этого фермента в мембраны. Очевидно, каталитически полноценная конформация MAO-A формируется в процессе связывания с мембранами, причем этот процесс предшествует АТФ- и убиквитинзависимому включению MAO-A в мембраны. Синтезированная в бесклеточной системе трансляции MAO-A не катализировала самоалкилирование в пробах с ферментактивируемым ингибитором хлоргидрином в отсутствие митохондрий, но алкилирование фермента осуществлялось в присутствии MAO-A, включенной в мембраны или связанной с ними (в условиях дефицита АТФ). Взаимодействие хлоргидрина (или паргидрина) с MAO-A, связанной с мембранами при дефиците АТФ, предотвращало включение MAO-A в мембраны при возвращении содержания АТФ в пробах к исходному уровню [103].

В микросомальной фракции гомогената печени крысы имеются ингибируемые хлоргидрином и депренилом флавинодержащие MAO, составляющие до 80 % от общей активности АО фракции (субстрат: бензиламин) [51]; остаточная активность АО соответствовала доле ингибируемой семикарбазидом активности АО микросомальной фракции. В митохондриальной фракции гомогената печени крысы соотношение флавинодержащих и семикарбазидчувствительных АО составляло соответственно 95 и 5 % от общей активности АО. Можно допустить, что остаточная семикарбазидчувствительная активность АО микросомальной фракции зависит от наличия продуктов незавершенного биосинтеза MAO. Судя по чувствительности к действию ингибиторов, такая незрелая MAO могла бы иметь свойства MAO, модифицированной путем частичного окисления тиоловых групп [52]; можно ожидать наличие в микросомальной фракции глюкозаминдезаминазной (и/или кадавериндезаминазной и т. д.) активности, указывающей на возможное модифицирование свойств MAO.

Важное биологическое значение имеют и посттрансляционные модификации MAO. Так, достаточно контакта (20 ч, 5 °C) очищенной MAO-B (субстрат: бензиламин) тромбоцитов крови человека с очищенной или мембранно-связанной MAO-A (субстрат: октопамин) плаценты человека, чтобы индуцировать резкое повышение в препаратах MAO-B активности АО, обладавшей, по данным ингибиторного анализа, проведенного с применением хлоргидрина и депренила, каталитическими свойствами, характерными как для MAO-A, так и для MAO-B, при сохранении иммуноспецифичности, свойственной MAO-B [92]. Такой модифицирующий эффект имеет ферментативную природу, поскольку он предотвращается при контролируемом прогревании препаратов, содержащих MAO-A. Маловероятно участие протеолиза или липидов в посттрансляционных модификациях MAO-B, реализация которых в организме вполне правдоподобна [92]. Не подтверждено образование гибридных молекул при взаимодействии MAO-B и MAO-A в инкубационных пробах. Гипотеза об изменении конформации активных центров MAO-B в таких си-

стемах лишь в общих чертах характеризует сущность обнаруженного явления.

Инкубация митохондрий печени крысы с очищенной липоксигеназой (КФ 1.13.11.12) ретикулоцитов кролика приводит к быстрому инактивированию MAO-B (субстраты: бензиламин или ФЭА) в особенности MAO-A (субстрат: серотонин) при одновременном появлении совершенно отсутствовавшей в контроле активности ДАО (субстрат: путресцин) [97]. Трактую это явление как следствие модифицирования каталитических свойств митохондриальной MAO, авторы предполагают, что оно может быть связано с изменениями фосфолипидного окружения мембранно-связанных АО.

При патологических состояниях и интоксикациях возможны следующие основные изменения свойств MAO: частичное или (значительно реже) полное ингибирование каталитической активности; стимуляция каталитической активности; частичная сольюбилизация мембранно-связанных MAO; модифицирование каталитических свойств MAO-A; сочетание этих явлений [8—10, 90]. Так, при алкогольной интоксикации реализуется именно этот последний вариант. При хронической экспериментальной алкогольной интоксикации в печени крыс были обнаружены [23] наряду с количественными также и качественные изменения дезаминирования азотистых соединений, а именно появление отсутствующих в норме в этом биологическом объекте реакций дезаминирования субстрата ДАО кадаверина (1,5-пентаметилендиамин) и глюкозамина, относящегося к числу аминсахаров, дезаминирование которых АО вообще не катализируют. В еще большей степени такие качественные изменения дезаминирования азотистых соединений были выражены при хронической интоксикации этанолом у человека. Так, в митохондриях ствола мозга человека, страдавшего при жизни хроническим алкоголизмом, была обнаружена реакция дезаминирования глюкозамина, отсутствовавшая в норме, но достигавшая при указанном патологическом состоянии 80 % от величины  $V_{\text{макс}}$  для реакции дезаминирования серотонина в контроле [23].

Поразительно сходные с указанными выше изменения катализируемых MAO процессов дезаминирования азотистых соединений были отмечены и у потомков алкоголизованных животных [29], причем сольюбилизации (сопровождавшейся проникновением сольюбилизированных MAO, в том числе и MAO с качественно измененными каталитическими свойствами, в плазму циркулирующей крови [30]) подвергалась в большей мере MAO-B, чем MAO-A. Можно предполагать, что свойство MAO претерпевать количественные и качественные изменения каталитической активности и физико-химических характеристик при хронической алкогольной интоксикации генетически детерминировано [30].

Данные о стимуляции активности MAO в организме алкоголизованных животных [23] не противоречат результатам острых экспериментов. Так, уже через 1 ч после введения этанола (3,1 г на 1 кг массы тела) внутрь крысам, отобранным по предпочтению к этанолу, в хвостом ядре, обонятельном бугорке и медиальной префронтальной коре больших полушарий мозга

отмечали снижение содержания дофамина при одновременном нарастании содержания дезаминированных и окисленных продуктов его метаболизма 3,4-диоксифенилуксусной и гомованилиновой кислот [43].

Стимуляцию активности MAO наблюдали в мозжке мышей, которые в течение первой, второй и четвертой генерации получали питьевую воду, обогащенную солями марганца, но при этом не было отмечено генетически детерминируемой чувствительности к воздействиям марганца [68].

В моче больных в период выхода из делирия соотношение концентраций диоксифенилуксусной кислоты и дофамина повышается [2], что свидетельствует о повышении активности MAO и может рассматриваться как компенсаторный процесс, приводящий к нормализации содержания дофамина в крови (вслед за периодом резкого его повышения при алкогольном делирии).

Данные об особенностях нарушениями свойств при алкогольной интоксикации согласуются с результатами исследования воздействия эндотоксина бактерии *Salmonella thyphimurium* на MAO митохондрий печени [21]. В первые часы после внутрибрюшинного введения мышам указанного токсина, обладающего свойством накапливаться в печени и стимулировать там процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ), наблюдали в постмитохондриальной надосадочной фракции гомогената печени снижение тираминдезаминазной и появление кадавериндезаминазной активности. Вероятно, нарушения структуры биомембран в результате активизации ПОЛ, о чем свидетельствовало накопление малонового диальдегида, способствовали частичной солюбилизации под влиянием эндотоксина и модифицированию каталитических свойств MAO. Эти процессы могли бы обусловить наблюдавшееся в эксперименте снижение тираминдезаминазной активности в митохондриях и одновременно появление в системе кадавериндезаминазной активности, свойственной модифицированной MAO. В этих экспериментах с бактериальным эндотоксином не наблюдали отмеченного при алкогольной интоксикации [23, 29] стимулирования активности MAO. По-видимому, наряду с неспецифическими для алкогольной интоксикации нарушениями дезаминирования биогенных аминов [10] существуют характерные именно для определенных интоксикаций или патологических состояний особенности изменений свойств ферментов, катализирующих дезаминирование биогенных аминов.

Частичная солюбилизация мембранно-связанных MAO печени крысы с изменениями каталитических свойств (чувствительности к действию специфических ингибиторов) была обнаружена при исследовании влияния на животных гепатотоксинов аллилформиата и четыреххлористого углерода [70]. Если в норме скорость дезаминирования ФЭА в плазме крови крыс весьма низка (в среднем 0,014 пмоль/мин на 1 мг белка), то после введения животным вызывающего перилобулярные некрозы ткани печени аллилформиата скорость этой реакции возрастала примерно в 100 раз. При этом повышение серотониндезаминазной активности, которая в норме также весьма низка, выражено в меньшей

мере (в среднем в 10 раз). В аналогичных опытах с четыреххлористым углеродом, вызывающим центрлобулярные некрозы ткани печени, отмечено обратное явление: преимущественное повышение в плазме крови серотониндезаминазной, но не ФЭА-дезаминазной активности, что указывает, в частности, на преимущественно центрлобулярную локализацию MAO-A и перилобулярную локализацию MAO-B в клетках печени крысы [70].

В мозговом слое надпочечников MAO-A или MAO-B обнаружены в различных клетках [101]. В культуре эндотелиальных клеток мозгового слоя надпочечников обнаружена MAO-A, содержание которой, судя по специфическому связыванию <sup>3</sup>H-паргилина, повышалось под влиянием стероидных гормонов — гидрокортизона, дексаметазона или прогестерона (но не эстрадиола). В культурах хромаффинных клеток обнаружена исключительно MAO-B, не чувствительная к воздействию стероидных гормонов.

Таким образом, при экспериментальных токсических поражениях печени [70] (как и при алкоголизме [30]) в плазме крови, которая в норме практически свободна от активности MAO, удается обнаружить появление MAO. Ингибиторный анализ показал, что при инкубации с плазмой крови крыс, подвергавшихся воздействию гепатотоксинов, хлоргилин в значительно более низких концентрациях блокировал дезаминирование серотонина, чем ФЭА, тогда как депренил, наоборот, в более низких концентрациях ингибировал дезаминирование ФЭА, чем серотонина [70]. Однако ни один из этих избирательных ингибиторов MAO даже в 0,1 мМ концентрациях не блокировал указанные аминоксидазные активности полностью. Так, остаточная активность после преинкубации с 0,1 мМ депренилом в течение 40 мин при 37 °С плазмы крови крыс, отравленных четыреххлористым углеродом, составляла 50 % от исходной в опытах с ФЭА в качестве субстрата и 20 % в аналогичных опытах с серотином. Эти данные свидетельствуют о том, что АО плазмы крови животных, отравленных гепатотоксинами, неидентичны митохондриальным MAO-A или MAO-B, хотя и катализируют дезаминирование серотонина или ФЭА. Вероятно, при отравлении гепатотоксинами (как и при алкогольной интоксикации) происходит частичная солюбилизация мембранно-связанных MAO, которые проникают в кровотоки, но их каталитические свойства оказываются измененными. При интоксикациях аллилформиатом или четыреххлористым углеродом в тромбоцитах крови крыс обнаружить активность MAO вообще не удавалось, что может быть следствием солюбилизации мембранно-связанных MAO [70].

Однако эта проблема требует дальнейших исследований в связи с данными о существовании ранее неизвестных множественных форм тромбоцитарных MAO [20], которые обычно считали относящимися исключительно к числу MAO-B [8]. Эти исследования важны в свете представлений о сходстве процессов обмена биогенных аминов тромбоцитов и серотонинергических нейронов головного мозга [98]. В отличие от указанных нейронов тромбоциты не содержат триптофангидроксилазу, но обладают полным

набором рецепторов, ферментов и механизмов транспорта аминов, их предшественников и метаболитов через мембраны [100]. Представление о множественности изоформ MAO-B согласуется с данными о существовании двух вариантов MAO-B [100], один из которых с относительно высоким сродством к норадреналину ( $K_m$  380 мкМ) при менее высоком сродстве к серотонину ( $K_m$  1100 мкМ) локализован в тромбоцитах, тогда как другой, характеризуемый относительно высоким сродством к серотонину при низком сродстве к норадреналину, локализован в хромаффинных клетках надпочечников.

На основе представлений о множественности тромбоцитарной MAO-B человека важны исследования нарушений свойств мембранно-связанных MAO при патологических состояниях. Так, активность MAO (субстрат: бензиламин) тромбоцитов крови больных с выраженным алкогольным абстинентным синдромом или при остром алкогольном делирии снижена в 2 раза (по сравнению со здоровыми людьми или больными, находящимися в состоянии длительной ремиссии); при выходе из делирия активность тромбоцитарной MAO возрастала, достигая величин ( $188 \pm 27$  нмоль/мг белка за 1 ч), которые превышали норму ( $103 \pm 8$  нмоль/мг белка за 1 ч) [1].

Тенденция к некоторому снижению [93] активности MAO (субстрат: ФЭА) тромбоцитов отмечается лишь при алкоголизме II типа (наследственном) [39]. При алкоголизме I типа (обусловленном преимущественно воздействием факторов внешней среды, но не генетической предрасположенности) это явление не наблюдается. Этанол (400 мМ) в большей мере ингибировал (примерно на 12 %) активность тромбоцитарной MAO, чем в аналогичных системах с тромбоцитами крови здоровых людей (примерно на 6 %) [93]. При деменции (болезни Альцгеймера) активность MAO (субстрат: бензиламин) тромбоцитов была повышена ( $43,27 \pm 1,91$  нмоль/мг белка за 1 ч, норма  $26,84 \pm 0,95$  нмоль/мг белка за 1 ч) [36]. Можно допустить, что более информативные данные будут получены в дальнейшем при исследовании множественных форм MAO тромбоцитов крови человека.

Снижение активности MAO (субстрат: тирамин), сопровождающемуся повышением содержания норадреналина и адреналина в гиппокампе, полосатом теле, стволовой части мозга (но не в коре больших полушарий или мозжечке), придают важное значение при смертельных, нарушающих функции дыхательного центра интоксикациях сероводородом [94].

В развитие исследований роли MAO в токсическом действии МФТП доказано участие MAO-B в предотвращаемых депренилом превращениях МФТП с образованием пиридиниевых метаболитов в культурах гепатоцитов крысы [88]. Катализируемое MAO-B окисление МФТП сопровождалось генерацией свободных радикалов, что было установлено путем регистрации спектров электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) в присутствии 5,5-диметил-1-пирролидин-N-оксида [80]. Интересно, что этанол (а также ацетальдегид) усиливал нейротоксический эффект

МФТП, замедляя удаление из организма производных фенилпиридиния, образующихся при окислении МФТП [105]. В ряду производных МФТП многие соединения подвергаются ферментативным превращениям при участии не только MAO-B, но и MAO-A [5, 55, 59]. Аналогичная ситуация наблюдается в системах, где содержание MAO-A значительно превышает содержание MAO-B. Примером таких биологических систем служит культура эндотелиальных клеток капилляров головного мозга, рассматриваемая как модель гематоэнцефалического барьера. В этих условиях, когда активность MAO-A обычно в 2—5 раз превышала активность MAO-B, МФТП в большей мере, чем в опытах в условиях целого организма, окислялся при участии MAO-A [84].

Проблема активации MAO [8] привлекает за последние годы внимание исследователей, хотя зависимость между строением и действием активаторов MAO все еще не исследована. Так, пестицид байгон (2-изопропоксифенил-N-метилкарбамат) [11] при его введении внутрь крысам избирательно стимулирует реакцию окислительного дезаминирования ФЭА (субстрата MAO-B), но не серотонина (субстрата MAO-A) или тирамина, окисляющегося при участии MAO обоих типов, в ходе их инкубации с митохондриальными фракциями тканей печени или мозга этих животных. В опытах с мембранно-связанными MAO мозга быка байгон избирательно стимулировал MAO-B, но не MAO-A, снижая кажущуюся величину константы Михаэлиса при неизменном значении максимальной скорости реакции. Солюбилизация MAO предотвращала стимулирующий эффект байгона на активность MAO. По-видимому, байгон как липофильное соединение взаимодействуя с липидами биомембран, изменяет конформацию мембранно-связанных MAO-B, повышая сродство ФЭА к каталитическому центру [13]. Изыскание новых соединений в рядах производных байгона может привести к созданию новых препаратов для лечения заболеваний (например, некоторых форм шизофрении), связанных с накоплением ФЭА в тканях мозга.

У практически здоровых людей, подвергавшихся по характеру их профессии воздействию пестицидов, активность MAO тромбоцитов почти в 2 раза выше, чем у доноров, не подвергавшихся воздействию пестицидов [12]. Повышенная активность MAO тромбоцитов свидетельствует о возможном повышении активности MAO, в частности, в тканях мозга [72].

Лечение пациентов номифензином (8-амино-4-фенил-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин малеат) сопровождалось повышением активности MAO тромбоцитов и позитивным клиническим эффектом при хронической шизофрении [44]. При действии на суспензию тромбоцитов номифензин, подобно байгону, не изменял активность MAO. Свойством стимулировать активность AO в организме обладает антагонист ГАМК пикротоксин [75].

Индукующий  $\Delta$ -сон пептид (120 мкг на 100 г массы тела) через 60 мин после парентерального введения не изменял активность MAO (субстраты: серотонин, бензиламин) головного мозга крыс, генетически предрасположенных к разви-

тию каталепсии (которую рассматривают как экспериментальную модель шизофрении), тогда как у контрольных животных отмечали стимуляцию активности МАО-А, что может свидетельствовать о нарушении структуры МАО мозга при экспериментальной кататонии [6]. Это заключение соответствует данным о свойствах МАО головного мозга больных шизофренией [53].

Биологическую роль МАО связывают с защитой организма (особенно в эндотелии капилляров и тканях легких, где активность МАО очень высока) от интоксикации аминами [100]. Вместе с тем МАО может выполнять и другие функции, не связанные с инактивацией аминов [52]. За последние годы внимание исследователей привлечено к участию МАО в следующих процессах: окислении МФТП до избирательно поражающих дофаминергические пейроны и вызывающих явления паркинсонизма пиридиниевых производных [9]; деалкилировании милацетамида (2-н-пентилацетамид) до пентоевой кислоты, перекиси водорода и глицинамида, который распадается до аммиака и ингибиторного нейротрансмиттера глицина [100]; регуляции стимулируемой субстратами МАО проникновения катионов кальция из митохондрий мозга [82]; регуляции функций аденилатциклазы в связи с концентрацией дофамина у дофаминорецепторов [65] и опосредуемым серотонинорецепторами ингибированием форсколинстимулируемой аденилатциклазы мозга крысы [89].

ДАО относится к числу медьзависимых ферментов; органическим кофактором, по-видимому, является пирролохинолинхинон [41], ковалентно связанный с апоферментом; в ряде бактериальных источников открыт фермент, катализирующий освобождение пирролохинолинхинона из его аддуктов [25]. В организме млекопитающих пирролохинолинхинон не синтезируется.

Димерная молекула ДАО содержит 2 атома меди, которым приписывают структурную роль [46].

ДАО (мол. м. 170 кДа) почек свиньи является гликопротеином, содержащим 5 % гексоз, 3,25 % глюкозамина, 2,61 % ацетилглюкозамина и 0,25 % ацетилнейраминовой кислоты. Восстановление дисульфидной связи в ДАО дитиотреитолом с последующим алкилированием тиоловых групп йодацетамидом не изменяло скорость взаимодействия с конканавалином А, тогда как модифицирование остатка аргинина фенилглиоксалием (но не гистидина при помощи этоксиуравьиного ангидрида) снижает сродство ДАО к конканавалину [86]. Очевидно, что не только углеводный компонент, но и белковая часть молекулы ДАО участвует во взаимодействии с конканавалином. В значительной мере ДАО связана электростатически с клеточными структурами (во всяком случае, в местах локализации гепарансульфатов). Так, внутривенное введение экзогенного гепарансульфата приводит к освобождению ДАО в эндотелиальных клетках микрососудов кишечника, что сопровождается соответственно снижением или возрастанием активности ДАО в слизистой оболочке кишечника или плазме крови. При этом решающим фактором в освобождении ДАО кишечника является

высокая плотность заряда высокосульфатированных гликозаминогликанов [26].

Биосинтез ДАО (в частности, стимулируемый эстрогенами биосинтез ДАО в матке крысы) блокируется ингибиторами синтеза белка актиномицином и циклогексимидом [85].

Доказано антипролиферативное действие (например, в слизистой оболочке кишечника) ДАО, связанное с ее участием в метаболизме полиаминов. В течение 4 дней после частичной резекции тонкой кишки крысы активность ДАО возрастает в 4 раза; на 8-й день, когда пролиферативные процессы достигают максимума, активность ДАО снижается (до 50 % от исходных величин), что указывает на появление в подобных системах фактора, ингибирующего пролиферацию [60]. Ингибитор ДАО аминоканоиндин существенно повышал скорость роста новообразований, индуцируемых канцерогенным соединением азоксиметаном [61]. Однако активность ДАО в сыворотке крови онкологических больных не рассматривается в настоящее время как надежный биохимический маркер роста новообразований [79].

Рассматривая модификацию каталитической активности митохондриальной МАО, приводящую к индуцированию гистаминдезаминазной активности [8, 52] в связи с угнетением роста экспериментальных опухолей головного мозга [3], следует отметить принципиальное различие в действии пиразидола, ингибирование которым серотониндезаминазной активности митохондрий мозга сопровождается индуцированием в данном биологическом объекте мощной гистаминдезаминазной активности, с действием близкого по строению соединения, 3,3а-дегидропиразидола, торможение активности МАО которым не приводит к появлению свойства катализировать окисление гистамина [3]. Сравнительное исследование механизма торможения активности МАО пиразидолом и 3,3а-дегидропиразидолом выявило различия на этапе образования ферментингибиторных комплексов. Торможение активности МАО пиразидолом сопровождается дегидрированием его пиперазинового кольца и вероятным образованием в положении 2—3 азометиновой связи ( $—C=N—$ ). Именно последняя, оказывая свойственное ей электроноакцепторное влияние [4], способствует мягкому окислению тиолов до остатков цистеинсульфеновой кислоты ( $—SH \rightarrow SOH$ ) на каталитической поверхности МАО=А, что и лежит в основе, как предполагается [7], изменений субстратной специфичности фермента. В противоположность этому при торможении серотониндезаминазной активности МАО дегидропиразидолом существенные изменения в его структуре с образованием новых окисляющих группировок не обнаружены. Установлено, что пиразидол (в отличие от дегидропиразидола), вызывая в тканях головного мозга крыс модифицирование свойств МАО с индуцированием гистаминдезаминазной активности в опытах на крысах с дедифференцированной астроцитомой, статистически достоверно продлевает жизнь животных-опухоленосителей, а также вызывает статистически достоверное снижение скорости роста злокачественной глиомы крыс [3].

Можно предполагать, что модифицирование

каталитических свойств MAO с индуцированием активности, свойственной ДАО, в тканях животных-опухоленосителей [8, 52] представляет собой явление адаптивного характера, приводящее к снижению скорости роста новообразований.

*Семикарбазидчувствительные АО (бензиламин-оксидазы)* вновь интересуют исследователей [91]. Классификация этой группы АО еще не завершена. Так, в соединительной ткани пульпы зуба свиньи, быка и человека обнаружено 6 различных АО [69]: 1) растворимая семикарбазидчувствительная (субстрат: бензиламин), не исключено, что эта АО может быть компонентом плазмы крови; 2) растворимая семикарбазидчувствительная (субстраты: бензиламин, триптамин), удельная активность которой выше, чем в плазме крови; 3) связанная семикарбазидчувствительная (субстраты: бензиламин, триптамин, тирамин, ФЭА); 4) связанная семикарбазидчувствительная (субстрат: серотонин); 5) митохондриальная хлоргилнчувствительная (субстрат: серотонин), соответствует по свойствам MAO-A; 6) митохондриальная депренилчувствительная (субстраты: бензиламин, тирамин, ФЭА). Интересно отметить, что семикарбазидчувствительные АО связаны с плазматической мембраной клеток соединительной ткани.

В тканях аорты крыс и пупочной артерии человека обнаружили семикарбазидчувствительную АО (субстраты: метиламин или бензиламин) [73]. В системах с метиламином максимальная скорость дезаминирования составляет примерно 60—70 % от соответствующих величин, характеризующих реакцию дезаминирования бензиламина. В противоположность бензиламину метиламин встречается в организме человека. Метиламин может образоваться и всасываться после бактериальной деградации в кишечнике креатинина, лецитина и холина. Пищевые нагрузки этими соединениями повышают выведение с мочой метиламина у человека и крысы. Метиламин может образоваться при эндогенном внутриклеточном метаболизме саркозина, креатинина, адrenalина. Хотя метиламин не относится к субстратам MAO, выведение с мочой эндогенного метиламина у крыс резко возрастает после введения ингибитора MAO фенипразина.

В культурах нейронов и фибробластов метиламин обнаруживает цитотоксические свойства. При уремии в плазме крови содержание метиламина возрастает примерно в 10 раз (достигая концентрации 8 мкМ). Метиламин проникает сквозь гематоэнцефалический барьер, вызывая нарушения функций мозга. Кровеносные капилляры, клетки гладкой мускулатуры богаты семикарбазидчувствительными АО, которые в сочетании с АО плазмы крови составляют барьер на пути проникновения эндогенного метиламина в мозг.

Семикарбазидчувствительные медьзависимые АО (в частности, лизилоксидаза [63]) содержат в качестве органических кофакторов пиридоксальфосфат [37] и пирролохинолинхинон [67], что делает ферменты чувствительными к действию реагентов на карбонильные группы, резистентными к ингибированию хлоргилином или депренилом при высокой чувствительности к про-

паргиламину, рассматриваемому как селективный ингибитор семикарбазидчувствительных АО [73].

Установлено, что молекула АО плазмы крови [40] содержит 2 атома меди, которые играют структурную роль или участвуют в каталитическом действии фермента.

Показано, что соединение (E)-2-(3',4'-диметоксифенил)-3-фтораллиламин (МДЛ 72145) селективно ингибирует мембранно-связанные семикарбазидчувствительные АО, которые катализируют дезаминирование первичных аминов, но не снижает активность MAO-B. Через 1 ч после внутрибрюшинного введения крысам активность АО в аорте и жировой ткани была снижена в 20 раз при неизменной активности MAO-B [42].

Семикарбазидчувствительные АО катализируют окислительное дезаминирование аллиламина с образованием акролеина, токсическое действие которого в культурах эндотелиальных или гладкомышечных клеток предотвращалось семикарбазидом или диэтилдитиокарбаматом, но не хлоргилином или паргилином [74].

Активность семикарбазидчувствительной АО сердца и легких кролика или плазмы крови свиньи на 50 % ингибировал, 3,5-диэтокси-4-аминометилпиридина дигидрохлорид в концентрации  $10^{-7}$  М, тогда как активность ДАО почек свиньи лишь в небольшой мере снижалась этим соединением даже при конечной концентрации  $10^{-3}$  М [33]. Этот ингибитор привлек внимание, в частности, при моделировании нарушений системы АО в динамике течения ожоговой болезни, когда снижению активности АО в плазме крови придают важное патогенетическое значение [83].

Рост новообразований у экспериментальных животных [66] и человека [64] сопровождается снижением активности АО в плазме крови, но значение этого явления исследуется.

Предполагают, что повышение активности тромбоцитарной MAO в крови больных, выходящих из алкогольного делирия, обусловлено не столько индуцированием биосинтеза молекул MAO, сколько изменением соотношений природных модуляторов активности MAO [22] в сторону преимущественного функционирования активаторов, но не ингибиторов аминоксидазных систем [2].

Природные модуляторы АО постепенно привлекают все большее внимание исследователей [22]. Особый интерес вызывает эндогенный ингибитор MAO трибулин [48], рассматриваемый в настоящее время как один из биохимических маркеров стрессорной реакции [35]. Трибулин представляет собой сочетание низкомолекулярных, экстрагируемых из биологических объектов этилацетатом в кислой среде веществ, обладающих свойствами ингибировать каталитическую активность MAO и взаимодействовать с бензодиазепиновыми рецепторами [48]. Количественно преобладающим компонентом трибулина оказался изатин (2,3-диоксоиндол) [34]. Были исследованы фармакологические препараты, физические воздействия и другие факторы, эффекты которых на живые существа сопровождаются явлениями тревоги, беспокойства, возбуждения и которые вызывают параллельные изменения концентрации изатина и трибулина [48]. Но этот параллеле-

лизм был выражен не всегда; очевидно, в препаратах трибулина, помимо изатина, имеются и родственные ему соединения (возможно, его метаболиты), которые могли бы играть определенную роль во взаимодействии трибулина с бензодиазепиновыми рецепторами [48].

Трибулин не относится к числу минорных компонентов среди азотистых соединений клетки. В тканях головного мозга, где максимальная концентрация (1 мкМ) трибулина отмечается в гиппокампе, что сопоставимо с содержанием важного медиатора серотонина. Максимальной концентрации (10—20 мкМ) среди периферических тканей трибулин достигает в семенниках и семявыводящем протоке, причем не удается отметить какого-либо параллелизма между тканевым распределением трибулина и другими известными в настоящее время физиологически активными веществами [48].

За последние годы не удалось подтвердить гипотезу о важном значении повышения концентрации нейротоксического метаболита триптофана хинолиновой кислоты в патогенезе дегенерации головного мозга при болезни Хантингтона [77]. Представленная информация не исчерпывает проблему в целом. Исследования особенностей нарушений функциональных взаимосвязей компонентов биологической системы аминоксидаз, раскрывающие патогенетическую сущность этих нарушений и указывающие подходы к изысканию способов их коррекции с целью создания новых лекарственных средств, еще только начинаются.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Анохина И. П., Дроздов А. З. // Биологические и медицинские аспекты алкоголизма.— М., 1984.— С. 29—38.
2. Анохина И. П., Коган Б. М., Дроздов А. З., Губский Л. В. // Алкоголизм (клиника, терапия, судебно-психиатрическое значение).— М., 1983.— С. 62—69.
3. Бауманис Э. А., Горкин В. З., Лислянский Н. И., Кожухов А. Н. // Пат. физиол.— 1990.— № 4.— С. 32—35.
4. Бауманис Э. А., Горкин В. З., Чипенс Г. И. // Химия и биология иммунорегуляторов.— Рига, 1985.— С. 222—236.
5. Бачурин С. О., Саблин С. О., Гришина Г. В. и др. // Биоорг. химия.— 1989.— Т. 15, № 5.— С. 620—626.
6. Войтенко Н. Н., Колпаков В. Г., Алехина Т. А. // Бюл. экспер. биол.— 1990.— № 9.— С. 306—308.
7. Горкин В. З. // Молекул. биол.— 1976.— № 4.— С. 717—736.
8. Горкин В. З. Аминоксидазы и их значение в медицине.— М., 1981.
9. Горкин В. З. // Пат. физиол.— 1988.— № 2.— С. 89—92.
10. Горошинская И. А., Цветненко Е. З., Френкель М. Л. и др. // Укр. биохим. журн.— 1987.— Т. 49, № 2.— С. 84—86.
11. Зейналов Т. А. // Вопр. мед. химии.— 1985.— № 5.— С. 60—64.
12. Зейналов Т. А., Горкин В. З. // Там же.— 1990.— № 1.— С. 78—81.
13. Зейналов Т. А., Ермолаев К. М., Позднев В. Ф., Камышанская Н. С. // Нейрохимия.— 1986.— Т. 5, № 2.— С. 131—138.
14. Киркель А. З., Тищенко Л. А., Аксенова Л. Н. и др. // Вопр. мед. химии.— 1991.— № 4.— С. 25—28.
15. Ковельман И. Р., Точилкин А. И., Коркин В. З. // Хим.-фарм. журн.— 1991.— № 8.— С. 4—15.
16. Концевой В. А., Андрусенко М. П. // Журн. невропатол. и психиатр.— 1989.— № 9.— С. 127—138.
17. Машковский М. Д. // Фармакол. и токсикол.— 1985.— № 2.— С. 5—14.
18. Машковский М. Д., Андреева Н. И. // Хим.-фарм. журн.— 1985.— № 11.— С. 1292—1302.
19. Молочкина Е. М., Боровок Н. В., Бурлакова Е. Б. // Нейрохимия.— 1990.— Т. 9, № 1.— С. 57—67.
20. Москвитина Т. А. // Бюл. экспер. биол.— 1990.— № 2.— С. 152—153.
21. Натанзон Л. В., Галаев Ю. В. // Вопр. мед. химии.— 1989.— № 3.— С. 58—59.
22. Овчинникова Л. Н. // Там же.— 1988.— № 6.— С. 16—23.
23. Овчинникова Л. Н., Горкин В. З., Анохина И. П. // Там же.— 1989.— № 2.— С. 124—128.
24. Однопозов А. К., Лифшиц Р. И., Горкин В. З. // Там же.— 1988.— № 2.— С. 68—72.
25. Adachi O., Okamoto K., Matsushita K. et al. // *Agricul. biol. Chem.*— 1990.— Vol. 54.— P. 2481—2483.
26. Agostinelli E., Riccio P., Befami O. et al. // *Biochim. biophys. Acta.*— 1989.— Vol. 993.— P. 228—232.
27. Agostinelli E., Riccio P., Mucigrosso J. et al. // *Perspectives in Polyamine Research* / Ed. A. Perin et al.— Milano, 1988.— P. 11—15.
28. Akopyan Z. I., Kulygina A. A., Terzeman I. I., Gorkin V. Z. // *Biochim. biophys. Acta.*— 1972.— Vol. 289.— P. 44—56.
29. Anokhina I. P., Ovchinnikova L. N., Khristolyubova N. A., Gorkin V. Z. // *Biogen. Amin.*— 1990.— Vol. 7.— P. 95—105.
30. Anokhina I. P., Ovchinnikova L. N., Shamakina I. Yu. et al. // *Ann. Med.*— 1990.— Vol. 22.— P. 353—356.
31. Bach A. W. J., Lan N. C., Johnson D. L. et al. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.*— 1988.— Vol. 85.— P. 4934—4938.
32. Balsa M. D., Gomez N., Unzeta H. // *J. Pharm. Pharmacol.*— 1991.— Vol. 43.— P. 95—100.
33. Bancelli G., Bertocci B., Buffoni F. et al. // *Pharmacol. Res. Commun.*— 1988.— Vol. 20.— P. 165.
34. Bhattacharya S. K., Banerjee P. K., Glover V., Sandler M. // *Neurosci. Lett.*— 1991.— Vol. 125.— P. 65—68.
35. Bhattacharya S. K., Tripathy M., Acharya S. B. // *J. Neural. Transmis.*— 1991.— Vol. 84.— P. 135—140.
36. Bonucelli U., Piccini P., Bongibanni P. et al. // *Pharmacol. Res. Commun.*— Vol. 20.— P. 52.
37. Buffoni F. // *Pharmacol. Res. Commun.*— 1988.— Vol. 20.— P. 159—161.
38. Chen S., Weyler W. // *Biochem. biophys. Res. Commun.*— 1988.— Vol. 156.— P. 445—450.
39. Cloninger C. R., Bohman M., Sigvardsson S. // *Arch. gen. Psychiat.*— 1981.— Vol. 38.— P. 861—868.
40. Colliso D., Knowles P. F., Smith R. A. et al. // *Biochem. J.*— 1989.— Vol. 264.— P. 663—669.
41. Duine J. A. // *Ital. J. Biochem.*— 1991.— Vol. 40.— P. 13—14.
42. Elliott J., Callingham B. A., Barrand M. A. // *J. Pharm. Pharmacol.*— 1989.— Vol. 41.— P. 37—41.
43. Fadda F., Mosca E., Colombo G., Gessa G. L. // *Life Sci.*— 1989.— Vol. 44.— P. 281—287.
44. Filinger E. J. // *Gen. Pharmacol.*— 1989.— Vol. 20.— P. 821—822.
45. Gallop P. M., Paz M. A., Fluckiger R., Kagan H. M. // *TIBS.*— 1989.— Vol. 14.— P. 343—346.
46. Giartosio A., Agostinelli E., Mondovi B. // *Biochem. biophys. Res. Commun.*— 1988.— Vol. 154.— P. 66—72.
47. Glover V., Bhattacharya S. K., Sandler M. // *Nature.*— 1981.— Vol. 292.— P. 347—349.
48. Glover V., Bhattacharya S. K., Sandler M. // *Indian J. exp. Biol.*— 1991.— Vol. 29.— P. 1—5.
49. Glover V., Gibb C., Sandler M. // *J. Neural. Transmis.*— 1986.— Vol. 20.— P. 65—76.
50. Glover V., Halket J. M., Watkins H. et al. // *J. Neurochem.*— 1988.— Vol. 51.— P. 656—659.
51. Gomez N., Balsa D., Unzeta M. // *Biochem. Pharmacol.*— 1988.— Vol. 18.— P. 3407—3413.
52. Gorkin V. Z. *Amine Oxidases in Clinical Research.*— Oxford, 1983.— P. 282.
53. Gorkin V. Z., Moskvitina T. A., Kamyshanskaya N. S. et al. // *Biogen. Amin.*— 1985.— Vol. 3.— P. 229—239.
54. Grimsby J., Lan N. C., Neve R. et al. // *J. Neurochem.*— 1990.— Vol. 66.— P. 1166—1169.
55. Heikkila R. E., Kindt M. V., Sonsalla P. K. et al. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.*— 1988.— Vol. 85.— P. 6172—6176.
56. Hsu Y.-P. P., Powell J. P., Sims K. B., Breakfield X. O. // *J. Neurochem.*— 1989.— Vol. 53.— P. 12—18.
57. Ito A., Kuwahara T., Inadome S., Sagara Y. // *Biochem. biophys. Res. Commun.*— 1988.— Vol. 157.— P. 970—976.
58. Javitch J. A., d'Amato R. J., Strittmatter S. M.,

- Snyder S. H. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1985.— Vol. 82.— P. 2173—2177.
59. Kindt M. V., Youngster S. K., Sonsalla P. K. et al. // J. Pharm.— 1988.— Vol. 146.— P. 313—318.
  60. Kusche J., Mennigen R., Erpenbach K. // Agents and Actions.— 1988.— Vol. 23.— P. 354—356.
  61. Kusche J., Mennigen R., Leisten L., Elbers A. // Biogen. Amin.— 1989.— Vol. 6.— P. 27—38.
  62. Lan N. C., Chen C., Shih J. C. // J. Neurochem.— 1989.— Vol. 52.— P. 1652—1654.
  63. Levene C. I., Carrington M. J. // Pharmacol. Res. Commun.— 1988.— Vol. 20.— P. 157—158.
  64. Lewinsohn R. // Ibid.— P. 45—49.
  65. Liccione J., Azzaro H. J. // Arch. Pharmacol.— 1988.— Vol. 337.— P. 151—158.
  66. Lizcano J. N., Escrich E., Tipton K. F., Unzeta M. // J. Neural. Transmis.— 1990.— Vol. 32.— P. 323—326.
  67. Morpurgo L., Befani O., Sabatini S. et al. // Biochem. J.— 1988.— Vol. 256.— P. 565—570.
  68. Nishida M., Yakushiji H., Kawada J. et al. // Biochem. int.— 1991.— Vol. 23.— P. 307—316.
  69. Norquist A., Orelund L. // Pharmacol. Res. Commun.— 1988.— Vol. 20.— P. 169—171.
  70. Obata T., Egashira T., Yamanaka Y. // Jap. J. Pharmacol.— 1988.— Vol. 48.— P. 142—144.
  71. O'Carroll A.-M., Anderson M. C., Tobbia I. et al. // Biochem. Pharmacol.— 1989.— Vol. 38.— P. 901—905.
  72. Prasad A., Rampling R. P., Glover V., Sandler M. // Psychiat. Res.— 1987.— Vol. 22.— P. 111—116.
  73. Precious E., Gunn C. E., Lyles C. A. // Biochem. Pharmacol.— 1988.— Vol. 37.— P. 707—713.
  74. Ramos K., Grossman S. L., Cox L. R. // Toxicol. appl. Pharmacol.— 1988.— Vol. 95.— P. 61—71.
  75. Rattan A. K., Mangat H. K. // Indian J. Physiol. Pharmacol.— 1989.— Vol. 33.— P. 203—206.
  76. Reversible MAO-A Inhibitors as Antidepressants / Eds G. D. Burrows, M. Da Prada.— Vienna.— 1989.— P. 1—103.
  77. Reynolds G. P., Pearson S. J., Halket J., Sandler M. // J. Neurochem.— 1988.— Vol. 50.— P. 1959—1960.
  78. Riederer P., Laux G., Beckman H. et al. // Pharmacopsychiatry.— 1988.— Vol. 21.— P. 283—284.
  79. Romano M., Pasquinelli R. // Int. J. Biol. Markers.— 1989.— Vol. 4.— P. 194—196.
  80. Rosetti Z. L., Sotgiu A., Sharp D. E. et al. // Biochem. Pharmacol.— 1988.— Vol. 37.— P. 4573—4574.
  81. Sagara Y., Ito A. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1982.— Vol. 109.— P. 1102—1107.
  82. Sandri G., Panfili E., Ernster L. // Biochim. biophys. Acta.— 1990.— Vol. 1035.— P. 300—305.
  83. Santoni G., Banchelli G. // Pharmacol. Res. Commun.— 1988.— Vol. 20.— P. 346.
  84. Scriba G. K. E., Borchardt R. T. // Brain Res.— 1989.— Vol. 501.— P. 175—178.
  85. Sessa A., Perin A. // Pharmacol. Res. Commun.— 1988.— Vol. 20.— P. 181—182.
  86. Shah M. A., Ali R. // Biochem. J.— 1988.— Vol. 253.— P. 103—107.
  87. Sims K. B., Ozelius L., Corey T. et al. // Hum. Genet.— 1989.— Vol. 45.— P. 424—434.
  88. Singh Y., Swanson E., Sokolowski E. et al. // Toxicol. appl. Pharmacol.— 1988.— Vol. 96.— P. 347—359.
  89. Sleight A. J., Marsden C. A., Palfreyman M. G. et al. // Europ. J. Pharmacol.— 1988.— Vol. 154.— P. 255—261.
  90. Smith D. F. // J. Neural. Transmis.— 1989.— Vol. 76.— P. 205—210.
  91. Structure and Functions of Amine Oxidases / Ed. B. Mondovi.— Boca Raton, 1985.— P. 1—204.
  92. Szutowicz A., Tomaszewicz M., Orsulak P. J. // J. Biol. Chem.— 1989.— Vol. 264.— P. 17 660—17 664.
  93. Tabakoff B., Hoffman P. L., Lee J. M. et al. // New Engl. J. Med.— 1988.— Vol. 318.— P. 134—139.
  94. Warena M. W., Smith K. A., Blashko C. S. et al. // Arch. Toxicol.— 1989.— Vol. 63.— P. 131—136.
  95. Weyler W. // Pharmacol. Res. Commun.— 1988.— Vol. 20.— P. 73—75.
  96. Weyler W., Tilow C. C., Salach J. J. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1990.— Vol. 173.— P. 1205—1211.
  97. Wiesner R., Kasuschke A., Kühn H. et al. // Biochim. biophys. Acta.— 1989.— Vol. 986.— P. 11—17.
  98. Wirz-Justice A. // Experientia (Basel).— 1988.— Vol. 44.— P. 145—152.
  99. Yeomanson K. B., Billett E. E. // Pharmacol. Res. Commun.— 1988.— Vol. 20.— P. 85—86.
  100. Youdim M. B. H. // Experientia (Basel).— 1988.— Vol. 44.— P. 137—141.
  101. Youdim M. B. H., Banerjee D. K., Kelner K. et al. // FASEB J.— 1989.— Vol. 3.— P. 1753—1759.
  102. Zhuang Z., Hogan M., McCauley R. // FEBS Lett.— 1988.— Vol. 238.— P. 185—190.
  103. Zhuang Z., Marks B., McCauley R. // J. Biol. Chem.— 1991.— Vol. 266.— P. 22 051—22 059.
  104. Zhuang Z., McCauley R. // Ibid.— 1989.— Vol. 264.— P. 14 594—14 596.
  105. Zuddas A., Di Porzio U., Kopin I. J., Corsini G. U. // Pharmacol. Res. Commun.— 1988.— Vol. 20.— P. 407—408.

Поступила 18.03.92

© Н. И. Сьяксте, 1993

УДК 616-008.93:576.315.42/.451-085(048.8)

Н. И. Сьяксте (Рига)

## МОДИФИКАЦИЯ СТРУКТУРЫ ХРОМАТИТА И ЯДЕРНОГО МАТРИКСА ПРИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ. ВОЗМОЖНОСТИ КОРРЕКЦИИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИМИ ПРЕПАРАТАМИ

В эукариотической клетке ответ на изменение условий существования опосредуется изменением экспрессии генов и как предварительный этап структурными перестройками хроматина. Подобные изменения происходят и при развитии многих патологических состояний. Исследования по изменению структуры хроматина при патологии, за исключением новообразований, где они играют определенную этиологическую роль, малочисленны. То же самое можно сказать и о влиянии фармакологических препаратов на структуру хроматина, опять-таки кроме противоопухолевых соединений, для которых хроматин является основной мишенью. Тем не менее имеющиеся работы заслуживают обобщения.

Согласно современным представлениям, хроматин имеет многоуровневую организацию. Первый уровень — нуклеосомная структура. Нуклеосомы представляют собой октамерные комплексы гистонов H2a, H-2b, H3 и H4, вокруг которых намотан участок ДНК длиной примерно 140 пар оснований. Этот ДНК-белковый комплекс называют кор-частицей (сердцевиной). Кор-частицы связаны между собой отрезками ДНК примерно в 60 пар оснований — линкером. С линкером ассоциированы гистон H1 и негистоновые белки, среди которых наибольший интерес представляет группа высокоподвижных при электрофорезе НМГ-белков, преимущественно связанных с транскрипционно-активным хроматином. Активация хроматина т. е. улучшение его доступности для РНК-полимераз, осуществляется путем модификации — ацетилирования и фосфорилирования его белковых компонентов и деметилирования цитозина в определенных участках ДНК. В целом активный хроматин образует менее компактную структуру по сравнению с неактивным. Нуклеосомы, организуясь в соленид или в комплексы по 5—12 нуклеосом — нуклеомеры, образуют следующий, наднуклеосомный, уровень организации хроматина. Участки хроматина, содержащие от 60 до 150 тыс. пар осно-

ваний ДНК, замыкаются в квазициркулярные петельные структуры на ядерном матриксе — скелете ядра, так называемые домены — третий уровень организации хроматина. Замкнутость этих структур позволяет поддерживать суперспирализованное состояние ДНК в доменах. Ядерный матрикс образован ядерной ламиной, расположенной под ядерной мембраной и содержащей поровые комплексы. Характерным компонентом ламины являются три белка — ламины А, В, С. Помимо ламины, ядерный матрикс еще содержит внутриядерные фибриллы и остаточное ядрышко. Далее мы проследим изменения перечисленных структур при патологических процессах и действии фармакологических препаратов, по возможности отдельно рассматривая разные уровни укладки хроматина. Как уже отмечалось выше, опухоли и противоопухолевые препараты требуют отдельного рассмотрения и здесь рассматриваться не будут.

*Заболевания центральной нервной системы (ЦНС).* Изменениям структуры хроматина и синтезу нуклеиновых кислот в нейронах отводится важная роль в функционировании ЦНС [18, 25]. Нарушения ее функциональной активности сказываются даже на первичной структуре ДНК головного мозга — снижается уровень метилирования ДНК у крыс, лишенных нормальной поисковой активности [35]. Угасание функций ЦНС при старении сопровождается снижением транскрипционной активности хроматина, изменением модификации входящих в него белков, в частности ацетилирования гистонов и негистоновых белков [83]. Нейромедиаторы, а именно катехоламины, связываются со структурами клеточного ядра, включая ядерный матрикс, вызывая дефекты вторичной структуры ДНК и ослабляя ДНК-гистоновые взаимодействия [11].

Изменения в структуре генетического аппарата найдены и при тяжелейшем поражении ЦНС, сопутствующем старению, — болезни Альцгеймера. По имеющимся данным, первичная структура ДНК не меняется [99]. Активность фермента метилгуанинтрансферазы, вызывающей модификацию оснований ДНК, также не меняется [70]. Есть данные об ослаблении репарации дефектов вторичной структуры ДНК в нейронах страдающих этим заболеванием [100], что может способствовать накоплению повреждений. В Т-лимфоцитах больных нарушена репарация поврежденных химическими канцерогенами, но нормально протекает репарация разрывов, индуцированных  $\gamma$ -лучами [46]. Структура хроматина в головном мозге при болезни Альцгеймера существенно меняется: нарастает содержание гистона H1<sup>o</sup>, характерного для покоящихся клеток, снижается чувствительность к микрококковой нуклеазе хроматина в целом, что говорит о его компактизации и инактивации [82]; при других нарушениях памяти подобных изменений не находят. РНК-синтезирующая активность клеток головного мозга при болезни Альцгеймера снижается, но это не сказывается на первичной структуре хроматина: длина нуклеосомного повтора, т. е. размер фрагмента ДНК, связанного с кор-частицей, не меняется [98]. Для наднуклеосомного уровня упаковки хроматина характерна большая стабилизация, здесь важ-

ную роль отводят ионам алюминия, содержание которых в мозге больных повышено. Считается, что эти ионы генерируют сшивки ДНК — белок [63]. В системе *in vitro* ионы алюминия упрочняют ДНК-белковые комплексы; предполагается, что аналогичный процесс происходит *in vivo* [83]. Имеется сообщение, что суперспирализация доменов ДНК при болезни Альцгеймера выше, чем в норме [82]. Изменения структуры хроматина неравномерны по геному. Чувствительность последовательностей гена легкой цепи нейрофиламентов в нейронах верхней височной доли при болезни Альцгеймера резко снижается, что говорит о компактизации структуры хроматина в его домене. В то же время конформация хроматина этого гена и других генов в коре мозжечка не меняется [82]. Подобная избирательная компактизация указывает скорее всего на вторичный характер этого процесса и малую вероятность участия в нем столь неспецифических агентов, как ионы алюминия.

У больных шизофренией обнаружены нарушения процессов репарации и термодинамических свойств хроматина лимфоцитов, изменено соотношение конденсированного и диффузного хроматина в ядрах нейронов разных типов [25].

Структура хроматина и ядра модифицируется при вирусных заболеваниях ЦНС. При амиотрофическом лейкоспонгиозе отмечаются перераспределение хроматина и лизис ядерного матрикса в ядрах нейронов [38]. Подострый энцефалит при СПИДе сопровождается накоплением специфических многоядерных клеток с ядрами, соединенными между собой мостиками [87]. Инфекция вирусом клещевого энцефалита сопровождается снижением уровня фосфорилирования ядерных белков. Вирус в ядро не проникает [30].

При алкогольной интоксикации метаболит этанола ацетальдегид связывается со структурами ядерного матрикса, причем с наиболее прочным ДНК-белковым комплексом [12, 50]. С ядерным скелетом ассоциированы многие ферментативные активности, включая репликацию, транскрипцию, метилирование и др., поэтому последствия связывания с ядерным матриксом могут сказываться на очень многих процессах. При алкогольном делирии меняется качественный состав ядерных белков [25]. Этанол вызывает разрывы ДНК, ацетальдегид — разрывы и межнитевые сшивки ДНК [45, 46].

Структура хроматина органов меняется при нарушении их нормальной иннервации. Односторонняя экстирпация верхнего шейного симпатического узла приводит к множественным изменениям в клетках больших полушарий с оперированной стороны. Наблюдается изменение спектра гистонов, ДНК-белковых и ДНК-липидных взаимодействий [34] и состава фосфолипидов хроматина [21]. При ваготомии отмечаются изменения в степени суперспирализации ДНК в клетках печени [52]: релаксируют домены с высокой плотностью супервитков, остаются интактными домены с низкой плотностью. Перерезка VIII черепно-мозгового нерва у лягушки вызывает увеличение площади ядер и ДНК по Фель-

гену в ядрах нейронов мозжечка и вестибулярного ядра [60].

На структуре ядра сказывается также ишемия головного мозга [25]. Уретановый наркоз вызывает угнетение экспрессии генома, снижение синтеза пре-мРНК. В условиях клинической смерти синтез пре-мРНК усиливается, но снижается ее транспорт в цитоплазму. Экспрессию генома в данном случае можно нормализовать введением циклических нуклеотидов [4]. У собак с нарушениями ЦНС в результате перенесенной клинической смерти наблюдаются гипердиплоидность клеток Пуркинье и изменения структуры хроматина клеток-зерен. У животных, переживших клиническую смерть, подобных нарушений нет [1]. Нарушается структура хроматина и при радиационном поражении мозга: хроматин деконденсируется — повышается его чувствительность к микрокеновой нуклеазе, нарастает содержание белков ядерного матрикса [75].

Как видим, фрагментарность материала пока не позволяет составить целостную картину изменений структуры хроматина в нервных клетках и клетках других тканей при нервных болезнях, однако во многих случаях имеются четкие указания на нарушения транскрипции. Поэтому представляет интерес поиск соединений, усиливающих экспрессию генома, тем самым исправляющих нарушенный процесс транскрипции. Среди подобных соединений хорошо изучен препарат класса антифеинов этимизол [9, 10, 27—29, 39]. Он усиливает синтез РНК в нейронах [39], увеличивая матричную активность хроматина [28]. Его действие опосредуется активацией Са-зависимой АТФазы [27]. Препарат усиливает фосфорилирование НМГ-белков хроматина [29], т. е. запускает процесс, характерный для активации хроматина. В опытах *in vitro* показано, что этимизол активирует фосфорилирование белка НМГ-14 выделенной из мозга цАМФ-независимой протеинкиназой N11 [9, 10]. Неактивные аналоги препарата таким свойством не обладают или вызывают противоположный эффект. Данные об активации протеинкиназы N11 этимизолом имеют большое фундаментальное значение. Эта протеинкиназа активирует ДНК-топоизомеразу II — фермент, очень активный в нейронах и, возможно, играющий важную роль в функциях памяти [18].

Структурные изменения хроматина клеток головного мозга и печени наблюдаются и при действии седативных препаратов, например фенобарбитала [23]. При действии последнего происходит перераспределение повторяющихся последовательностей ДНК между фракциями хроматина, различающимися по транскрипционной активности [17]. При действии аминазина наблюдаются структурные изменения в ядрах нейронов [25].

*Заболевания сердечно-сосудистой системы.* Изменения в структуре хроматина наблюдаются также при патологии сердечно-сосудистой системы. Высказывается мнение, что многие заболевания сердца, сопутствующие старению, вызваны изменениями в генетическом аппарате клеток пожилых людей [49]. Данные о накоплении разрывов ДНК в клетках сердечной мышцы при стрессе и инфарктах обобщены ранее

[45, 46]. Ишемия сопровождается увеличением содержания НМГ-белков [2, 14, 17], что характерно для процесса активации хроматина [48]. Увеличивается температура плавления, и изменяются профили денатурации надмолекулярных комплексов ДНК [26]. При гипертрофии миокарда наблюдается нарушение связи хроматина с ядерным матриксом [16]. В сердце больных с пороком митрального клапана с возрастом по сравнению со здоровыми наблюдается большее увеличение объема ядер и плоидности ДНК в кардиомиоцитах. При ишемической болезни сердца полиплоидизация отстает от гипертрофии [40]. В постинфарктном периоде наблюдается увеличение синтетической активности в ядрах одноядерных кардиомиоцитов [41]. При гипертонии отмечены структурные перестройки клеток эндотелия, которые сказываются на его способности связывать акридиновый оранжевый — наблюдается депрессия генома [78]. Гипероксия вызывает накопление разрывов ДНК в клетках эндотелия сосудов, которые легко репарируются в отличие от разрывов, вызванных перекисью водорода [77].

Несмотря на то что фактический материал очень скуден, он все же указывает на наличие структурных перестроек хроматина, связанных с изменением его экспрессии. Поэтому уместно рассмотреть данные о влиянии сердечных препаратов на структуру хроматина. Противоишемический препарат гутимин не изменял повышенного содержания НМГ-белков в ядрах ишемизированных кардиомиоцитов [48]. Возможно, это вполне закономерный результат, так как препарат действует синергично с адаптивными системами клетки и также может способствовать активации генома. Именно таким механизмом обладает противоишемический препарат милдронат — аналог  $\gamma$ -бутиробетанина. Считается, что в основе его кардиопротекторного действия лежит способность ингибировать синтез карнитина, предотвращая тем самым накопление токсичных промежуточных продуктов  $\beta$ -окисления жирных кислот [95]. Однако милдронат способен воздействовать и на структуру и функции клеточного ядра. Препарат активирует репликативный и репаративный синтез ДНК во многих органах, включая сердце [8], он также усиливает экспрессию генома, повышает синтез пре-мРНК [5]. Активация хроматина опосредуется изменением его структуры — наблюдаются изменения АДФ-рибозилирования гистонов и негистоновых белков хроматина [6], усиление их метилирования [7]. Препарат вызывает изменения структуры хроматина *in toto*: изменяются кривые плавления хроматина [32]. Возможно, милдронат облегчает адаптацию клеток к ишемии, способствуя активации синтеза нуклеиновых кислот, который сопутствует адаптации. Таким образом, модификация структур клеточного ядра является звеном патогенеза заболеваний сердца, а ее коррекция может быть важным элементом действия сердечных препаратов.

*Аутоиммунные заболевания.* Роль поврежденной ДНК и хроматина в патогенезе аутоиммунных заболеваний определена. Структуры ядра служат мишенью для связывания аутоантител. Обнаружены антитела к гистонам H1, H2b,

белкам ядерного матрикса, включая все ламины, белкам норовых комплексов [42], топоизомеразе I [13]; с белками ядерного матрикса связываются антитела к гетерохроматину [73]. Некоторые аутоантитела специфичны для определенных заболеваний, при синдроме наложения склеродермы и полимиозита вырабатываются аутоантитела к комплексу негистоновых белков с мол. м. 70 и 80 кД. Белок с мол. м. 70 кД в выделенных препаратах хроматина находится во фракции олиго- (не моно) нуклеосом, связывается с двуничей ДНК и, по-видимому, участвует в процессе репарации [85, 86]. Белок с мол. м. 80 кД является компонентом ядерного матрикса [105]. Наблюдается повышенный уровень хромосомных aberrаций [19] и разрывов ДНК [45, 46]. Выделен кластерогенный фактор, повреждающий ДНК у больных склеродермой. Им оказались инозиновые нуклеотиды, которые повреждают ДНК по радикальному механизму [57]. В ядрах аутоиммунных мышей NZB/NZW повышен синтез поли-АДФ-рибозы [74], что может свидетельствовать об активации репаративных процессов в ответ на действие кластерогенного фактора. При развитии мышей NZB/NZW наблюдаются стадийные изменения в структуре ядерного матрикса. Нарастают толщина ламины и число поровых комплексов. К 12—13-му месяцу развития число их снижается, появляются фибриллы толщиной 5 нм. Наблюдаются фрагментация и сегрегация остаточных ядрышек, дегградация ядерного матрикса. Среди белков ядерного матрикса увеличивается содержание полипептидов с мол. м. 150—200 кД, триплет с мол. м. 70—60 кД. Предполагается, что первоначальные изменения ядерного матрикса отражают компенсаторную реакцию на аутоиммунный процесс, поздние — далеко зашедшую патологию [47]. В лимфоцитах больных ревматоидным артритом хроматин конденсирован сильнее, чем в норме у серопозитивных больных, и активирован у серонегативных [44].

*Наследственные болезни.* При исследовании наследственных заболеваний человека основное внимание уделяется способности клеток репарировать повреждения ДНК [45, 46], однако отмечены определенные изменения и в структуре хроматина. В ДНК больных атаксией-телеангиэктазией, прогерией, анемией Фанкони, некоторых больных с синдромом Дауна наблюдаются дефекты вторичной структуры ДНК [24]. Хроматин клеток больных пигментной ксеродермой более чувствителен к действию эндогенных нуклеаз, чем хроматин нормальных клеток [91], нарушается его нуклеосомная структура: наблюдается снижение плотности нуклеосом и более редкое расположение фибрилл хроматина [92]. Белки из ядерных экстрактов клеток больных атаксией-телеангиэктазией хуже связываются с ДНК и образуют менее плотные структуры по сравнению с нормальными клетками в опытах по реконструкции хроматина *in vitro* [88].

*Гормональные нарушения.* Структура ядра нарушается и при некоторых эндокринных заболеваниях. Способность гормонрецепторных комплексов тиреоидных гормонов связываться с ДНК определяется особенностями структуры хроматина, так как гистоны ингибируют их связыва-

ние [93]. Мишенью тиреоидных гормонов являются белки ядерного матрикса, у тиреоидэктомированных животных состав этих белков в клетках печени меняется, исчезает белок с мол. м. 41 кД. В ответ на введение трийодтиронина увеличивается содержание белка с мол. м. 52 кД [2]. Изменяется также ассоциация доменов определенных генов с ядерным матриксом. В печени гипотиреоидных животных ассоциация генов аполипопротеинов А-I и А-IV резко снижается, гипертиреоидных — повышается. Ассоциация других генов аполипопротеинов — С-III и Е, а также гена альбумина не зависит от тиреоидного статуса [56].

С ядерным матриксом связываются половые гормоны, поэтому эта структура может быть вовлечена и в развитие половых нарушений [58]. Андрогены регулируют фосфорилирование белков ядерного матрикса клеток простаты [72]. В зависимости от гормонального статуса степень конденсации хроматина этих клеток меняется [64]. Ферменты, метаболизирующие половые гормоны, также расположены в ядре [71]. Данные о взаимодействии с хроматином глюкокортикоидов и модификации ими его структуры чрезвычайно многочисленны и требуют отдельного рассмотрения. С белками ядерного матрикса связывается инсулин. Не исключено, что причина диабета типа II — нечувствительность к инсулину — кроется именно в изменениях белков матрикса [103]. Биологическая активность простагландинов опосредуется изменениями степени фосфорилирования белков хроматина [51].

*Авитаминозы и другие нарушения питания.* Структура ядра, и в особенности ядерного матрикса, изменяется при развитии гиповитаминозов. Витамин Е связывается с ядерным матриксом и хроматином, в последнем — с наиболее прочно ассоциированными с ДНК белками. При гиповитаминозе Е снижается активность ДНК- и РНК-полимеразы ядерного матрикса [20], изменяется его белковый состав [15]. С возрастом на фоне авитаминоза Е быстрее снижается матричная активность хроматина и нарастает число сшивок ДНК — белок [102]. При авитаминозе РР в хроматине клеток печени возрастает число гиперчувствительных к ДНКазе I участков, снижается уровень поли-АДФ-рибозилирования гистов. Введение НАД вызывает конденсацию хроматина и усиление поли-АДФ-рибозилирования гистонов, особенно H1 [33]. С хроматином связывается витамин D [37], причем процесс регулируется витамином B<sub>6</sub> [43].

На структуре хроматина сказываются и другие нарушения питания. При голодании в гепатоцитах мыши происходят множественные изменения высших уровней упаковки хроматина, проявляющиеся в изменении критической концентрации электролитов, при которой исключается метахромазия окраски метиленовым синим [55]. При недостатке незаменимых аминокислот метионина и цистеина в эпителиальных клетках кишечника наблюдается накопление гистона H1 в хроматине, а выделенный хроматин образует более крупные агрегаты, что, по-видимому, отражает его компактизацию и инактивацию [89].

*Инфекционные заболевания.* Дифтерийный ток-

син при связывании с клеткой вызывает фрагментацию хроматина. Запускается апоптоз — процесс программируемой клеточной гибели [65].

С ядерным матриксом ассоциируются многие вирусы посредством вирусной ДНК [76]. Капсидные белки вируса простого герпеса транспортируются по цитоскелету в ядерный матрикс, где и связываются с ним [59]. Сборка капсиды также происходит на ядерном матриксе [61], белки капсиды остаются с ним связанными вплоть до поздних стадий инфекции [104]. При аденовирусной инфекции с матриксом связывается ДНК вируса [97], осуществляются ее репликация [109] и транскрипция [110], нарушается открепление пре-мРНК хозяина от ядерного матрикса [68].

В клетках эпидермиса человека, больного псориазом, обнаружено увеличение содержания прочно связанной с ядерным матриксом ДНК [53].

*Гипертермия.* Относительно хорошо исследованы изменения структуры ядра при гипертермическом воздействии на организм. Инкубация культуры клеток меланомы при 44 °С сопровождается резким усилением синтеза ядерных белков, с ядром ассоциируются специфические белки теплового шока с мол. м. 70—72 кД [67]. Изменения в основном касаются ядерного матрикса. Во время инкубации клеток HeLa при 45 °С возрастает масса ядерного матрикса, ультраструктура не меняется. Появляются характерные для теплового шока полипептиды с мол. м. 25,8, 28,5, 60, 66, 75, 81, 88, 100 и 155 кД. Нарастание массы ядерного матрикса пропорционально цитотоксичности теплового шока: при 15 % увеличении массы не наблюдается гибели клеток, при 35 % гибнет до 63 % всех клеток [106]. В ядерном матриксе фибробластов китайского хомячка в ответ на гипертермию появляются полипептиды с мол. м. 84—86, 70 и 26 кД. Преобладает полипептид с мол. м. 70 кД, который сохраняется в матриксе в течение суток после прогревания клеток [14]. В печени крыс, подвергнутых тепловому шоку, происходят аналогичные изменения ядерного матрикса. Резко нарастает содержание полипептида с мол. м. 70, 100, 55, 40, 30 кД, появляется несколько белков в ядрышке. Морфологических изменений при этом не отмечается [3, 54]. Другими авторами, однако, отмечаются нарушения стабильности ядерной ламинины [80]. Изменяется состав нуклеопротеидных комплексов. В ядрах появляются ДНК-белковые частицы, нерастворимые в солях, но растворимые в детергентах. ДНК, вовлеченная в эти комплексы, содержит последовательности целого ряда онкогенов [81]. Тепловой шок препятствует откреплению пре-мРНК от ядерного матрикса, нарушая нормальный процессинг РНК [68]. Гены белков теплового шока постоянно ассоциированы с ядерным матриксом вне зависимости от транскрипции [96], однако структура этих генов при активации тепловым шоком претерпевает существенные изменения [69].

*Токсикозы.* Структура ядра повреждается при действии многих токсичных соединений; повреждения молекулы ДНК подробно обсуждены ранее [46]. При бронхите, вызванном повышенным содержанием окиси серы в атмосферном воздухе,

наблюдаются изменения ультраструктуры хроматина клеток реснитчатого эпителия [101]. Воспаление в ответ на введение скипидара сопровождается ассоциацией с ядерным матриксом в клетках печени ДНК генов  $\alpha_1$ -гликопротеина и транскретина — белков острой фазы [62].

Наиболее глубоко изучен ядерный компонент токсического действия тяжелых металлов. Ионы никеля вызывают снижение температуры плавления ДНК и хроматина [36], сшивки ДНК с гистонами H1 и некоторыми прочно связанными с ДНК негистоновыми белками (мол. м. 48, 52, 70, 95 кД), в основном в неактивном хроматине [90]. При инкубации *in vitro* ионы никеля образуют сшивки ДНК с гистонами нукleosомы, однако *in vivo* места контактов ДНК — гистоны малодоступны для них [66]. Хром сшивает с ДНК ламинины С и А и многие другие белки ядерного матрикса [108], в основном негистоновый белок с мол. м. 45 кД [84]. Ионы свинца, меди, ртути и алюминия также образуют сшивки с ламинами, белками матрикса и хроматина, каждый из ионов — со специфической группой белков [107]. При хронической интоксикации свинцом в ядерном матриксе накапливается белок 32/6,3, образующий внутриядерные включения. Ионы кальция снижают содержание этого белка [79]. Ионы цинка также связываются с ядром, в основном с ядерной оболочкой и ядрышком [31].

В заключение отметим, что на основании приведенного материала можно прийти к заключению о том, что изменения структуры клеточного ядра являются звеном патогенеза многих заболеваний и мишенью действия самых различных лекарственных средств. Исследования предмета находятся еще в начальной стадии, но, безусловно, проблема заслуживает дальнейшего интенсивного изучения.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Аврущенко М. Ш., Маршак Т. Л. // Нейрохимия.— 1988.— Т. 7, № 2.— С. 232—237.
2. Адылова А. Т. // Науч. докл. высш. школы: биол. науки.— 1989.— № 1.— С. 33—37.
3. Акопов С. Б., Бульдьева Т. В., Кузьмина С. Н., Збарский И. Б. // Биохимия.— 1988.— Т. 50, № 7.— С. 1127—1131.
4. Антонян А. А., Хачатрян В. Г., Адамян М. Х., Хачатрян Г. С. // Всесоюзный симпозиум «Структура и функции клеточного ядра», 9-й.— Черниголова, 1987.— С. 254.
5. Блюм Я. Б., Вербовикова Е. А., Калвиньш И. Я. и др. // Изв. Латв. АН.— 1990.— № 10.— С. 105—109.
6. Блюм Я. Б., Калвиньш И. Я., Братусь Н. И. и др. // Там же.— № 8.— С. 120—125.
7. Блюм Я. Б., Калвиньш И. Я., Кучеренко Н. Е., Лукевиц Э. Я. // Укр. биохим. журн.— 1987.— Т. 58, № 5.— С. 18—24.
8. Блюм Я. Б., Калвиньш И. Я., Кучеренко Н. Е., Лукевиц Э. Я. // Там же.— 1988.— Т. 60, № 6.— С. 19—23.
9. Богданова Н. А., Куликова О. Г. // Биохимия.— 1991.— Т. 56, № 1.— С. 41—48.
10. Богданова Н. А., Куликова О. Г., Бородкин Ю. С. // Бюл. eksper. биол.— 1991.— № 2.— С. 159—161.
11. Божко Г. Х. // Вопр. мед. химии.— 1984.— № 4.— С. 12—17.
12. Божко Г. Х., Хоменко К. И. // Там же.— 1988.— № 2.— С. 19—23.
13. Бронштейн И. Б., Шустер А. М., Громова И. И. и др. // Бюл. eksper. биол.— 1990.— № 12.— С. 598—600.
14. Бульдьева Т. В., Акопов С. Б., Кузьмина С. Н., Збар-

- ский И. Б. // Биохимия.— 1987.— Т. 41, № 3.— С. 494—504.
15. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Чабаный В. Н. и др. // Укр. биохим. журн.— 1990.— Т. 62, № 6.— С. 22—30.
  16. Далмане А. Р., Калынина М. Э., Цирицне С. М. и др. // Всесоюзный симпозиум «Структура и функции клеточного ядра», 9-й.— Черногоровка, 1987.— С. 9.
  17. Дударева Н. А., Дашкевич В. С., Салганик Р. И. // Биохимия.— 1981.— Т. 46, № 7.— С. 1258—1265.
  18. Иванов В. А., Тумшалова Н. А. // Успехи соврем. биол. 1988.— Т. 105, № 2.— С. 163—178.
  19. Ильинских Н. Н., Бессуднова С. С., Ильинских И. Н. // Цитол. и генет.— 1987.— Т. 21, № 1.— С. 64—70.
  20. Капралов А. А., Петрова Г. В., Левицкий Е. А. // Рукопись деп. в ВИНТИ 13.02.90.— № 816.— Р. 90.
  21. Карагезян К. Г., Овсян Г. А., Овсепян А. М., Сукманян Л. В. // Всесоюзный симпозиум «Структура и функции клеточного ядра», 9-й.— Черногоровка, 1987.— С. 63.
  22. Кляшева Р. И. // Всесоюзный биохимический съезд, 5-й: Тезисы стендовых сообщений.— М., 1986.— Т. 2.— С. 358—359.
  23. Кормилец М. В., Немировский Л. Е. // Арх. анат.— 1988.— № 6.— С. 56—59.
  24. Коротков Е. В., Пронина Н. В., Лашкова Д. Л. и др. // Докл. АН СССР.— 1983.— Т. 271, № 5.— С. 1250—1253.
  25. Кример Л. С., Ойфа А. И. // Цитология.— 1989.— Т. 31, № 9.— С. 995—1004.
  26. Круглова Н. Л. // Всесоюзный симпозиум «Структура и функции клеточного ядра», 10-й.— М., 1990.— С. 141.
  27. Куликова О. Г. // Вестн. АМН СССР.— 1985.— № 9.— С. 50—54.
  28. Куликова О. Г., Белянцева Л. М., Разумовская Н. И., Бородин Ю. С. // Нейрохимия.— 1985.— Т. 4, № 1.— С. 3—9.
  29. Куликова О. Г., Богданова Н. А., Разумовская Н. И. // Там же.— 1988.— Т. 7, № 2.— С. 189—196.
  30. Мальдов Д. Т. // Всесоюзный симпозиум «Структура и функции клеточного ядра», 9-й.— Черногоровка, 1987.— С. 171.
  31. Марков Ю. Г. // Всесоюзный симпозиум «Структура и функции клеточного ядра», 10-й.— М., 1990.— С. 19.
  32. Медведев К. С., Бабенюк Ю. Д., Братусь Н. И., Кучеренко Н. Е. // Там же.— 1990.— С. 104.
  33. Мулякко Н. А., Васильева С. М., Донченко Т. В. // Укр. биохим. журн.— 1990.— Т. 62, № 6.— С. 16—22.
  34. Овсян Г. А., Кочарян К. М., Саакян Л. А. // Всесоюзный биохимический съезд, 5-й: Тезисы стендовых сообщений.— М., 1986.— Т. 2.— С. 364.
  35. Павленко Л. Н. // Всесоюзный симпозиум «Молекулярные механизмы генетических процессов», 7-й.— М., 1990.— С. 46—47.
  36. Патиашвили Л. Д., Монаселидзе Д. Р., Чанчалашвили З. И. // Биополимеры и клетка.— 1988.— Т. 4, № 4.— С. 188—192.
  37. Плещитый К. Д. // Вопр. мед. химии.— 1990.— № 5.— С. 2—4.
  38. Полющук Н. Н., Мантейфель В. М., Серебрякова Е. В. // Всесоюзный симпозиум «Структура и функции клеточного ядра», 9-й.— Черногоровка, 1987.— С. 27.
  39. Разумовская Н. И., Белянцева Л. М., Куликова О. Г. // Вестн. АМН СССР.— 1985.— № 9.— С. 44—50.
  40. Селиванова Г. В., Власова Т. Д. // Цитология.— 1990.— Т. 32, № 7.— С. 704—711.
  41. Селиванова Г. В., Нилова В. К., Власова Т. Д. и др. // Там же.— 1988.— Т. 30, № 11.— С. 704—711.
  42. Семенов М. В. // Там же.— 1990.— Т. 32, № 10.— С. 956—976.
  43. Сергеев И. Н., Спиричев Б. В. // Бюл. exper. биол.— 1990.— № 12.— С. 631—632.
  44. Соколова З. А., Зубкова С. М., Царфис Г. Г. и др. // Тер. арх.— 1985.— № 12.— С. 80—82.
  45. Сьякте Н. И., Сьякте Т. Г. // Вопр. мед. химии.— 1988.— № 4.— С. 9—19.
  46. Сьякте Т. Г., Сьякте Н. И. Химические соединения, повреждающие ДНК.— Рига, 1991.
  47. Троицкая Л. В., Филатова Н. С., Попова В. С. и др. // Цитология.— 1987.— Т. 22, № 11.— С. 1226—1232.
  48. Федорова Н. А., Суркова Е. Е. // Всесоюзный симпозиум «Структура и функции клеточного ядра», 10-й.— М., 1990.— С. 123.
  49. Фролькис В. В. // Геронтология и гериатрия.— Киев, 1989.— С. 3—12.
  50. Хоменко Е. И., Божко Г. Х. // Укр. биохим. журн.— 1984.— Т. 56, № 2.— С. 191—194.
  51. Цудзевич Б. А., Кучеренко Н. Е., Блюм Я. Б. // Всесоюзный биохимический съезд, 5-й: Тезисы стендовых сообщений.— М., 1986.— Т. 2.— С. 135.
  52. Щербо И. В., Папонов В. Д., Дубовая Т. К. // Бюл. exper. биол.— 1990.— № 12.— С. 596—598.
  53. Язовик Н. З., Федорова Т. А., Детинкин О. Н. // Вопр. мед. химии.— 1987.— № 2.— С. 62—64.
  54. Akopov S. B., Buldyayeva T. V., Troitskaya L. P. et al. // Nuclear Workshop, 11-th: Program and Abstracts.— Chernogolovka, 1989.— P. 49.
  55. Amaral M. S. L. V., Melo M. L. S. // Cytobios.— 1989.— Vol. 59, No 238—239.— P. 159—165.
  56. Apostolopoulos J. J., La Scala M. J., Shen P., Howlett G. G. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1989.— Vol. 161, No 2.— P. 576—582.
  57. Auclair Ch., Gouyette A., Levy A., Emerit I. // Arch. Biochem.— 1990.— Vol. 278, No 1.— P. 238—244.
  58. Barrack E. R., Coffey D. S. // J. biol. Chem.— 1980.— Vol. 325, No 15.— P. 7265—7275.
  59. Ben-Ze'ev A., Abulafia R., Bratosin S. // Virology.— 1983.— Vol. 125, No 2.— P. 601—607.
  60. Bernocchi G., Giacometti S., Scherin E., Valli P. // Basic appl. Histochem.— 1989.— Vol. 33, No 3.— P. 209—217.
  61. Bibor-Hardy V., Dagenais A., Simard R. // J. Cell. Biol.— 1984.— No 4, Pt. 2.— P. 129a.
  62. Birch H., Schreider G. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1986.— Vol. 137, No 2.— P. 622—639.
  63. Bjorksten J. // Rejuvenation.— 1983.— Vol. 11, No 4.— P. 101—110.
  64. Carmo-Fonseca M. // J. Ultrastruct. Molec. Struct. Res.— 1988.— Vol. 101, No 1.— P. 4—12.
  65. Chang M. P., Bramhall J., Graves S. et al. // J. biol. Chem.— 1989.— Vol. 264, No 26.— P. 15 261—15 267.
  66. Cicarelli R. B., Wetherhahn K. E. // Chem.-Biol. Interact.— 1985.— Vol. 52.— P. 347—360.
  67. Delpino A., Fanuele E., Mattei E. et al. // J. exp. clin. Cancer Res.— 1989.— Vol. 8, No 4.— P. 199—209.
  68. Denome R. M., Werner E. A., Patterson R. J. // Nucl. Acids Res.— 1989.— Vol. 17, N 5.— P. 2081—2098.
  69. Dixon D. K., Jones D., Candido E. P. M. // DAN cell. Biol.— 1990.— Vol. 9, No 3.— P. 177—191.
  70. Edwards J. A., Wang L. G., Sellow R. B., Kaminskas E. // Mutat. Res.— 1989.— Vol. 219, No 5—6.— P. 267—272.
  71. Enderle-Schmitt U., Neuhaus Ch., Aumuller G. // Biochim. biophys. Acta.— 1989.— Vol. 897, No 1.— P. 21—28.
  72. Goueli S. A., Ahmed K. // Arch. Biochem.— 1984.— Vol. 234.— P. 646—650.
  73. Haaf T., Dominguez-Steglich M., Schmid M. // Cytogenet. cell. Genet.— 1990.— Vol. 53, No 1.— P. 40—51.
  74. Haug B., Sibley J. T., Lee J. S. // FEBS Lett.— 1987.— Vol. 215, No 2.— P. 252—256.
  75. Jaberoboansari A., Landis M. R., Wallen C. A., Wheeler K. T. // Radiat. Res.— 1989.— Vol. 119, No 1.— P. 57—72.
  76. Jones C., Su R. T. // Biochim. biophys. Acta.— 1987.— Vol. 910, No 1.— P. 52—62.
  77. Junod A. F., Jornet L., Peetersen H. // J. cell. Physiol.— 1989.— Vol. 140, No 1.— P. 177—185.
  78. Kerényi T., Lehmann R., Voss B., Jellingeh H. // Morph. igazsagugui. orv. szem.— 1990.— Vol. 30, No 1.— P. 28—35.
  79. Klenn E., Shelton K. P. // J. biol. Chem.— 1989.— Vol. 264, No 29.— P. 16 969—16 972.
  80. Krachmarov Ch. // Докл. Болг. АН.— 1989.— Т. 42, № 11.— С. 107—110.
  81. Littlewood T. D., Hancock D. C., Evan G. I. // J. Cell Sci.— 1987.— Vol. 88, No 1.— P. 65—72.
  82. Lukiw W. J., Crapper McLachlan D. R. // Molec. Brain Res.— 1990.— Vol. 7.— P. 227—233.
  83. Lukiw W. J., Kruck T. P. A., McLachlan D. R. // FEBS Lett.— 1989.— Vol. 255, No 1—2.— P. 59—62.
  84. Miller C. A., Costa M. // Carcinogenesis.— 1989.— Vol. 10, No 4.— P. 667—672.
  85. Mimori T., Hardin J. A. // J. biol. Chem.— 1986.— Vol. 261.— P. 10 375—10 379.
  86. Mimori T., Hardin J. A., Steitz J. A. // Ibid.— P. 2274—2278.
  87. Misuzawa H., Hireno A., Llena F. // Acta neuropath.— 1988.— Vol. 76, No 2.— P. 166—169.
  88. Mohamed R., Lavin M. F. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1989.— Vol. 158, No 3.— P. 749—754.
  89. Norrel M., von der Dechen A. // Biochem. int.— 1989.— Vol. 18, No 2.— P. 351—363.
  90. Palierno S. R., Sugiyama M., Basilion J. P., Coste M. // Cancer Res.— 1985.— Vol. 45.— P. 5787—5794.

91. *Player A. N., Kantor G. J.* // *Mutat. Res.*—1987.— Vol. 184, No 2.— P. 169—178.
92. *Puvion-Dutilleul F., Sarasin A.* // *Ibid.*—1988.— Vol. 219, No 1.— P. 57—70.
93. *Sakurai A., Ichikawa K., Hashizuma K.* // *J. Endocr.*—1989.— Vol. 121, No 2.— P. 337—341.
94. *Sarkander H.-I.* // *Cell Ageing.*—Basel, 1984.— P. 158—177.
95. *Simkhowich B. Z., Shutenko Zh. V., Meirena D. V. et al.* // *Biochem. Pharmacol.*—1988.— Vol. 37, No 2.— P. 195—202.
96. *Small D., Nelkin B., Vogelstein B.* // *Nucl. Acids Res.*—1985.— Vol. 13, No 7.— P. 2413—2431.
97. *Smith H. C., Berezney R., Brewster J., Rekosh D.* // *Biochemistry (Wash.)*—1985.— Vol. 24, No 5.— P. 1197—1202.
98. *Smith T. A. D., Vallis Y., Neary D., Itzhaki R. F.* // *Gerontology.*—1989.— Vol. 35, No 5.— P. 268—274.
99. *Spector R., Kornberg A.* // *Neurobiol. Aging.*—1985.— Vol. 6, No 1.— P. 25—28.
100. *Steinberg J. J., Passman R., Scicutella A., Gleeson J.* // *J. cell. Biochem.*—1989.— Suppl. 13.-C.— P. 166.
101. *Stratmann U., Lehman R., Steinbeck Th.* // *Anat. Anz.*—1989.— Bd 164, No 1.— S. 493—494.
102. *Summerfield F. W., Tappel Al. L.* // *Arch. Biochem.*—1984.— Vol. 233, No 2.— P. 408—416.
103. *Thompson K. A., Soler A. P., Smith R. M., Jarret L.* // *Europ. J. Cell Biol.*—1990.— V. 37, No 5.— P. 442—446.
104. *Tsutsui Y., Nishiyama Y., Yoshida S. et al.* // *Arch. Virol.*—1983.— Vol. 77, No 1.— P. 27—38.
105. *Verheijen R., Kuijpers H., van Venroij W., Ramaekers F.* // *Nuclear Workshop, 11-th: Program and Abstracts.*—Chernogolovka, 1989.— P. 38—41.
106. *Warters R. J., Brizgys L., Sharma R., Roli Roli J. L.* // *Int. J. Radiat. Biol.*—1986.— Vol. 50, No 2.— P. 253—268.
107. *Wedrychowski A., Schmidt W. N., Hnilica L. S.* // *J. biol. Chem.*—1985.— Vol. 260, No 11.— P. 7150—7155.
108. *Wedrychowski A., Ward W. S., Schmidt W. N., Hnilica L. S.* // *Ibid.*—1986.— Vol. 261, No 7.— P. 3370—3376.
109. *Younghusband H. B.* // *Canad. J. Biochem. Biol.*—1983.— Vol. 63, No 6.— P. 654—660.
110. *Zhai Zh., Chem F., Nickerson J. A., Penman Sh.* // *Science in China (Ser. B).*—1989.— Vol. 32, No 2.— P. 176—184.
111. *Zhai Zh., Nickerson J. A., Krochmalnic G., Penman Sh.* // *J. Virol.*—1987.— Vol. 61, No 4.— P. 1007—1018.

Поступила 06.06.91

© Т. И. ПЕСТИНА, Я. М. СОКОВНИНА, 1993

УДК 616.15-07:616.153.1:577.152.361(048.8)

Т. И. Пестина, Я. М. Соковнина (Москва)

## АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗА ФОРМЕННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ КРОВИ: РАСПРОСТРАНЕНИЕ, СВОЙСТВА В НОРМЕ И ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Институт биологической и медицинской химии РАН, Москва

Аденозиндезаминаза (АДА; КФ 3.5.4.4) — важнейший фермент обмена пуринов, катализирующий гидролитическое дезаминирование аденозина с образованием инозина и аммиака. Генетическая недостаточность этого фермента у человека приводит к возникновению иммунодефицитных состояний, обусловленных несостоятельностью как Т-, так и В-клеточного иммунитета. Недостаточность АДА является ауто-сомно-рецессивным признаком [35, 38, 90]. Исследования последних лет показали, что функциональная активность тромбоцитов в основном зависит от обменных процессов, регулирующих метаболизм аденозина и их нарушений, обусловленных дефицитом АДА [52, 79].

Эти наблюдения стимулировали изучение характера изменений АДА в форменных элементах крови при ряде гематологических заболеваний. Изучение каталитических свойств фермента и их молекулярной структуры дает новую информацию о причинах недостаточности АДА при заболеваниях крови. В настоящее время выделен и охарактеризован ген АДА. Ген АДА расположен в 20-й хромосоме в локусе 20q.12 — g13.11 региона, вблизи онкогена src, где наиболее часто происходят делеция и реоранжировка последовательностей онкогена, наблюдаемые при миелопролиферативных заболеваниях. По-видимому, перестройки в области гена АДА могут затрагивать онкоген и, по мнению ряда авторов, являться причиной злокачественных заболеваний крови человека [3, 8, 46, 97]. Следует отметить, что АДА человека является генетически полиморфным ферментом и что наблюдаемые формы АДА контролируются двумя аллельными генами. Эти аллели определяют 3 фенотипа с различной электрофоретической подвижностью и незначительными различиями в активности АДА [34, 48, 56]. Генетическая гетерогенность сопровождается различными мутациями в структурном гене [7, 8]. В настоящем обзоре приведены данные литературы о локализации и распространении АДА и результаты сравнительного изучения физико-химических и кинетических свойств фермента в форменных элементах крови в норме и при различных гематологических заболеваниях. В первом разделе обзора рассматриваются локализация и ряд свойств множественных форм АДА в норме, во втором — свойства фермента при патологии.

### I. Распространение, локализация и некоторые свойства множественных форм АДА в норме

АДА — фермент, широко распространенный в тканях человека и животных [91]. Он играет главную роль в развитии и функции клеток крови; отклонения в его активности в клетках крови связаны с развитием определенных заболеваний. Наиболее высокая активность обнаружена в лимфоидной ткани (селезенка, лимфоузлы, тимус) [11]. В крови АДА обнаружена во всех форменных элементах крови с наибольшей активностью в лимфоцитах ( $467 \pm 139$  нмоль/мг/ч) в сравнении с таковой в эритроцитах ( $56,7 \pm 20,5$  нмоль/мг/ч) и тромбоцитах ( $214,7 \pm 7,9$  нмоль/мг/ч) [13, 21]. Активность фермента в Т-лимфоцитах в 5—20 раз превышает таковую в В-лимфоцитах, в свою очередь в кортикальных Т-лимфоцитах она значительно выше, чем в медуллярных. В процессе созревания Т-лимфоцитов из клеточных предшественников активность АДА увеличивается [10, 95].

Значительная часть фермента локализована в цитозоле, и только 2 % от общей активности обнаруживается во фракции плазматических мембран эритроцитов и тромбоцитов в виде комплекса с гликопротеидами [91]. Таким образом, установлено, что АДА может участвовать и во внеклеточном превращении аденозина в инозин. Была также обнаружена митохондриальная форма АДА в коре головного мозга крысы [78].

В настоящее время достигнута высокая степень очистки АДА из форменных элементов крови. Получены гомогенные препараты фермента [4, 26, 65, 74, 95]. На высокоочищенных гомогенных препаратах показано, что АДА в различных клетках и тканях человека и животных содержится в виде множественных форм, различающихся по молекулярной массе (36, 114, 298, 444 кД) и кинетическим свойствам. Основной формой фермента, обнаруживаемой во многих тканях человека (желудок, селезенка, тонкая кишка, тимус), является форма с наименьшей мол. м. — 34—36 кД — АДА<sub>1</sub>. Эта форма присутствует и во всех форменных элементах крови (лимфоцитах, гранулоцитах, лейкоцитах, тромбоцитах) [5, 24]. Промежуточная форма фермента — АДА<sub>2</sub> (мол. м. 100—114 кД), обнаруженная в качестве минорного компонента в печени и селезенке человека, гомологична присутствующей в качестве главного компонента в печени низших позвоночных [71, 91]. В сыворотке эта форма является также основным компонентом: клеточный источник ее не определен [70]. Промежуточная форма фермента отличается от АДА<sub>1</sub> (мол. м. 36 кД) не только по молекулярной массе, но и по некоторым другим параметрам, имеет более низкий оптимум рН (5,5—6,5), более высокую К<sub>м</sub> (2000 мкмоль/л против 50 мкмоль/л в эритроцитах), низкую дезаминирующую активность 2'-дезоксиаденозина и нечувствительна к ингибитору эритро-9(2-гидрокси-3-нонил)аденозину (ЕННА) и *o*-коформицину в той концентрации, при которой наблюдается ингибирование АДА с малой и большой молекулярной массой. Обе формы различаются и по электрофоретической подвижности [91]. При изучении субстратной специфичности АДА<sub>1</sub> и АДА<sub>2</sub> на частично очищенных препаратах с использованием аденозина, 2'-*o*-метиладенозина, 2'-*d*-аденозина и 3'-*o*-метиладенозина продемонстрировано, что АДА<sub>1</sub> более активна в сравнении с АДА<sub>2</sub>. АДА<sub>2</sub> также дезаминирует в более низкой степени 1-метиладенозин, N<sup>σ</sup>-метиладенозин, N<sup>σ</sup>-изопентаниладенозин и N<sup>σ</sup>-, N<sup>σ</sup>-диметиладенозин в сравнении с АДА<sub>1</sub> (мол. м. 36 кД) [91].

Обнаруженное сходство изоформы АДА<sub>2</sub> (мол. м. 110 кД) человека и птиц в К<sub>м</sub> и других кинетических параметрах (оптимум рН, субстратная специфичность, ингибирование) говорит в пользу того, что они произошли от общего предка [69].

АДА с большой мол. м. (298 кД) встречается в виде тканеспецифических электрофоретических вариантов (печень, почки, легкие, мышцы, простата, фибробласты кожи) [75, 91]. В почках и клетках желудочно-кишечного тракта обнаруживают форму с мол. м. 440 кД [6]. АДА с мол. м. 298 кД содержит 2 молекулы с малой мол. м. (36 кД) и 1 молекулу выделенного и очищенного до гомогенного состояния специфического белка, названного фактором превращения, с мол. м. 213 кД, не обладающего АДА-специфичностью [87]. При исследовании показано, что молекулярные виды АДА могут взаимопревращаться. При условиях денатурации большая форма АДА превращается в малую форму энзима с выделением фактора превращения, кото-

рый является димером. Если эритроцитарную АДА с малой молекулярной массой добавить к различным тканевым экстрактам, содержащим фактор превращения АДА, то это ведет к образованию большой, тканеспецифической электрофоретической, форме энзима. Эти вариации порождены гетерогенностью углеводной части в связанном белке и не обусловлены вариациями АДА с малой молекулярной массой, присутствующей в комплексе. Процесс связывания малой формы с фактором превращения не энзиматический процесс. К настоящему времени фактор превращения выделен и очищен до гомогенного состояния, состоит из 2 субъединиц с мол. м. 97 и 85 кД и связан с малой формой фермента ковалентными связями [75, 77]. АДА с мол. м. 298 кД имеет следующие параметры: оптимум рН 7,0—7,4, К<sub>м</sub> аденозина 95 мМ, P<sub>i</sub> 4,7—5,2 [75, 87]. Формы АДА с большой молекулярной массой проявляют более высокую тепловую стабильность по сравнению с малыми формами: предполагают, что связывающий белок (гликопротеид) может стабилизировать фермент *in vivo* [26, 91]. Комплекс АДА с фактором превращения представлен в большинстве клеток человека в виде мембранно-связанных и цитоплазматических форм [9]. В настоящее время наиболее хорошо охарактеризован фермент из эритроцитов крови человека (мол. м. 36 кД), изучены его физико-химические и кинетические параметры, изоферментный состав, аминокислотная последовательность [5, 24, 56, 84, 85, 97]. Клонирована ДНК-последовательность АДА [96]. Фермент является мономером, имеет одну полипептидную цепь, показывает множественные электрофоретические формы, возникающие в результате посттрансляционной модификации единственного гена. Эта гетерогенность, возможно, обусловлена модификацией сульфгидрильных форм фермента [24]. Изоформы мало отличались по молекулярной массе, изоферментному спектру, каталитической активности в присутствии различных субстратов и ингибиторов, оптимуму рН. С аденозином в качестве субстрата для всех изоформ АДА эритроцитов составляла 28—44 мкМ [56, 72].

Активность гомогенного фермента АДА эритроцитов составляет 538 мкмоль/мин/мг, оптимум рН находится в интервале 6,0—8,0, К<sub>м</sub> аденозина равна 52 мМ, K<sub>i</sub> инозина 700 мкМ, радиус Стокса 24 Å и S 20W 3,8·10<sup>-13</sup> С. Эритроцитарная форма АДА имеет изоэлектрическую точку (ИЭТ) 4,6—4,9 [24, 25]. К настоящему времени известно большое количество ингибиторов АДА, в том числе продукты реакции и различные аденозиновые аналоги. Среди наиболее сильных ингибиторов нужно отметить коформицин с K<sub>i</sub> 10·10<sup>-12</sup>М и дезоксикоформицин с K<sub>i</sub> 2,5·10<sup>-12</sup>М; тип ингибирования конкурентный. Ингибирующее влияние оказывают и некоторые другие аналоги аденозина: ЕННА с K<sub>i</sub> 1,6×10<sup>-9</sup>М, 1,6-дигидро-6-(гидроксиметилпуририбозид) (DHMPR) с K<sub>i</sub> 1,3·10<sup>-6</sup>М [27, 64, 65].

Такие ингибиторы, как 4-амино-5-имидазолкарбоксамид-рибонуклеозид, 4-амино-5-имидазолкарбоксамид-НСl, 2,6-диаминопурин, 6-хлорпурин, йодопурин и аденин, ингибируют активность фермента на 15—60%. АМФ, дАМФ, АДФ, дАДФ,

АТФ, дАТФ, цитозин, цАМФ, дЦМФ, дЦДФ, ЦТФ, дЦТФ не ингибируют фермент, в то время как аденин и 6-метилмеркаптопурин заметно ингибируют [4, 5, 24, 27, 51, 64]. При исследовании влияния тиоловых реагентов на эритроцитарную АДА показано, что окисленный глутатион и йодоацетат не влияют на активность АДА, в то время как *p*-хлормеркурийбензоат в сходных условиях вызывает уменьшение энзиматической активности [23]. Следует отметить, что для активности АДА не требуется кофактора. Установлено, что  $Ni^{+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  ингибируют АДА (мол. м. 36 кД),  $Na^{+}$ ,  $K^{+}$ ,  $Mg^{2+}$  не оказывают влияния на него [5]. АДА эритроцитов — термостабильный фермент, сохраняющий активность при глубоком замораживании ( $-70^{\circ}C$ ) в течение нескольких лет. Присутствие глицерола или диметилсульфоксида необходимо для сохранения активности в процессе замораживания. Фермент хорошо сохраняется при  $4^{\circ}C$  в течение 3 нед. Стабильность очищенного фермента достигается добавлением сывроточного альбумина, сахарозы или пуририбозиды [17]. Наблюдается 36 % потеря активности при нагревании фермента в течение 5 мин при  $70^{\circ}C$ . Обработка фермента 1 мМ *p*-меркурийбензоатом при  $25^{\circ}C$  в течение 30 мин приводит к 30 % потере активности [12]. Данные о свойствах АДА лимфоцитов и тромбоцитов весьма ограничены. В лимфоцитах обнаружены 2 формы фермента с различной молекулярной массой, в то время как только 1 форма (мол. м. 36 кД) присутствует в эритроцитах [95]. Ферменты отличаются по термостабильности,  $K_m$ , ингибиторному эффекту и профилю рН. АДА с низкой и высокой молекулярной массой в лимфоцитах взаимопревращаются при тепловой обработке и различаются по ответу на алкилирующие агенты, такие, как *N*-этилмалеимид [95]. Нами были изучены некоторые кинетические и физико-химические свойства АДА тромбоцитов. В тромбоцитах присутствует АДА с мол. м. 44 кД, и она не отличается по  $K_m$  аденозина и  $V_{max}$  от АДА эритроцитов [24, 31]. При сопоставлении результатов по характеру влияния ряда ингибиторов на активность АДА тромбоцитов и эритроцитов существенных различий не отмечено. Средние значения ингибирования в присутствии 6-метиламинопурина, 6-хлорпуририбозиды, аденина, 6-меркаптопурина, 6-хлорпурина и формидина составляли 41—65 %. При действии 8-азааденина наблюдалось слабое ингибирование [2].

Не было различий и при изучении влияния катионов двухвалентных металлов на активность АДА тромбоцитов в сравнении с АДА эритроцитов. Аналогичные результаты были получены при изучении термостабильности АДА. Фермент также хорошо сохраняется при  $4^{\circ}C$  и глубоком замораживании, как и в случае эритроцитарного фермента.

Таким образом, вышеописанные данные показывают, что изученные свойства АДА эритроцитов и тромбоцитов человека весьма близки и различаются незначительно по отдельным параметрам.

Следует отметить, что каталитическая ак-

тивность всех форм АДА человека кодируется единственным генетическим локусом, а множественные формы возникают через комплексобразование или вторичную модификацию. Все множественные формы АДА в тканях человека — продукты одного структурного гена и множественность форм — продукт модификации первичного гена [3].

## II. Сравнительная характеристика активности, кинетических и физико-химических свойств АДА при патологии

Серьезные нарушения в активности АДА наблюдаются при иммунодефицитных заболеваниях различной этиологии: тяжелом комбинированном иммунодефицитном заболевании (ТКИД) [44, 66], синдроме приобретенного иммунодефицита (СПИД) [61, 90]. Так, у пациентов со СПИД показано увеличение АДА в 1,5—2 раза в 0-лимфоцитах и эритроцитах в сравнении с нормой. Имеется тенденция к увеличению АДА при прогрессировании заболевания [23, 29, 59]. Показатель активности АДА, по-видимому, может быть использован как диагностический маркер СПИД для выявления возможного инфицирования у асимптоматических индивидуумов в группах риска. С другой стороны, аутосомно-рецессивная форма ТКИД сопровождается полным отсутствием АДА не только в эритроцитах, но и в лимфоидных клетках при сохранении на уровне нескольких процентов от нормы АДА в других тканях [57, 76]. Так, в селезеночной ткани обнаруживают 0,5 % АДА от нормальной активности. Низкий уровень активности АДА и в амниотической жидкости [41]. В сывотке детей, больных ТКИД, отмечено 50 % снижение активности фермента [70]. В последние годы было установлено, что основным механизмом полного дефицита АДА в лимфоцитах, наблюдаемого при ТКИД, является точковая мутация гена, вызываемая замещением одной из аминокислот на другую [66]. После клонирования нормального и мутантного гена АДА в экспрессионном векторе и его трансфекции в фибробластах человека оказалось, что трансфекция нормального клона АДА обусловлена энзиматической активностью, в 40 раз превышающей мутантную последовательность. Эти результаты ясно показывают, что мутантная АДА-последовательность не кодирует активный фермент [7, 8].

Большой интерес представляют результаты исследований, проведенные на В-лимфобластных мутантных клеточных линиях. Показан ряд различных мутаций в обоих аллелях в клеточной линии GM 2606 (замена аргинина на триптофан в положении 101 и аргинина на цитидин в положении 211). В мутантной линии GM 2825A обнаружена в одном аллеле замена аланина на валин в положении 329, в другом аллеле выявлена делеция экзона 4 [7, 8]. Эти мутации приводят к изменению молекулярной структуры белка, уменьшению белковой стабильности, нарушению транскрипции, а также не исключают возможность, что мутация может затрагивать и активный центр фермента. В настоящее

время мало известно о молекулярных основах недостаточности АДА у человека.

Патофизиология синдромов, вызванная дефицитом АДА, приводит к избыточному накоплению не только аденозина и дезоксиаденозина [50, 82], но и их метаболитов, прежде всего дАТФ [32], АТФ [73], цАМФ [40, 73], в эритроцитах и лимфоцитах больных. Аденозин, по современным данным, выполняет в организме важную роль медиатора ряда физиологических процессов, участвует в межклеточных взаимодействиях и регулирует функциональную активность клеток различных систем, и в частности гемо- и иммунопоэза. Аккумуляция токсичных нуклеозидов и нуклеотидов вызывает блокирование синтеза пиримидинов *de novo*, угнетение синтеза РНК, ДНК, ингибирование реакции метилирования рибо- и дезоксирибонуклеотидов [11, 33, 38]. Установлено, что аденозин вызывает ингибирование агрегации тромбоцитов путем стимулирования аденилатциклазы и увеличения уровня цАМФ [52, 79]. Исследования *in vitro* также показали, что увеличение концентрации этих соединений в лимфоцитах подавляет пролиферацию лимфоцитов, вызывая иммуносупрессию клеток лимфоидной системы [45]. Аккумуляция токсичных адениннуклеозидов и нуклеотидов приводит к гибели не только зрелых клеток, но и предшественников Т-лимфоцитов. Для Т-лимфоцитов дезоксиаденозин более токсичен, чем аденозин, вероятно, вследствие увеличения концентрации дАТФ — основного ингибитора рибонуклеотидредуктазы, участвующей в синтезе ДНК. Однако в литературе встречаются работы, в которых не отмечается увеличения уровня дАТФ и дАДФ в мононуклеарных клетках больных ТКИД с дефицитом АДА, но обнаруживается высокая концентрация этих веществ в тромбоцитах [83].

В настоящее время опубликован ряд работ, в которых описываются случаи, когда у иммунологически нормальных детей наблюдается различная степень частичного дефицита в активности АДА не только в эритроцитах [16], но и в лимфоидных клетках [28, 42, 43]. При генетической недостаточности АДА у этих детей, однако, отмечается нормальный или незначительно увеличенный уровень токсичных метаболитов: АТФ, дАТФ, цАМФ — в лимфоцитах в сравнении с резко увеличенным их количеством у больных ТКИД [28, 42]. Было установлено, что вариантный фермент АДА кодируется 2 аллелями (один из которых ответствен за синтез неактивной формы АДА). Наблюдаемый дефект, как было установлено, генетически обусловлен, так как хотя бы один из родителей имел полный или частичный дефицит АДА эритроцитов [39]. Было описано 50 % снижение АДА в эритроцитах в популяции африканских племен без каких-либо клинических и иммунологических отклонений [39]. Характеристика остаточной активности АДА у иммунологически нормальных детей в их лимфоидных клетках выявила значительную генетическую гетерогенность. Обнаруживают по крайней мере 5 различных мутаций в структурном гене АДА, приводящих к значительным изменениям физико-химических свойств, таких, как термостабильность, электрофоретическая подвиж-

ность и изоэлектрофоретических характеристик [43].

Анализ литературы не дает исчерпывающей информации о свойствах фермента при данной патологии, об этом имеются лишь отрывочные сведения. Так, при изучении свойств АДА в сыворотке больных ТКИД показано, что сывороточный фермент обладает свойствами промежуточной формы АДА<sub>2</sub> (мол. м. 110 кД) [70]. Выявлены различия при исследовании остаточной активности АДА в ткани селезенки больных ТКИД в сравнении с нормой, выражающейся в изменении  $K_m$ , оптимума рН, чувствительности к ингибированию ЕННА. Вопрос о присутствии мутантной формы АДА в селезенке больных ТКИД остается открытым [76].

В культуре клеток лимфобластов при синдроме иммунной недостаточности обнаружена АДА, идентичная селезеночной АДА с мол. м. 92—110 кД и не чувствительной к ингибированию ЕННА [27]. При обследовании 2 пациентов выявлена остаточная активность АДА в культуре клеток фибробластов (1 и 10 % в сравнении с нормой соответственно). Фермент обнаруживает изменение электрофоретической подвижности и увеличение тепловой стабильности, при этом субстратная специфичность, оптимум рН и  $K_m$  не отличаются от нормы [28]. Это дает возможность предположить об изменении в структуре фермента.

Отклонения в активности АД обнаружены в форменных элементах крови (лимфоцитах, гранулоцитах, эритроцитах) и при различных гематологических заболеваниях. Активность АДА снижена при хроническом лимфолейкозе (ХЛЛ) [36, 68], множественной миеломе, хроническом миелолейкозе (ХМЛ) [49], а также при В-клеточном остром лимфолейкозе [55, 100] и снижена в Т-клетках периферической крови при болезни Ходжкина [60]. Однако в некоторых исследованиях было показано, что активность АДА в лимфоцитах при ХЛЛ не отличается от нормальных величин или даже превышает ее [30, 35]. Неоднородность данных можно объяснить, по-видимому, изучением активности фермента на разных стадиях ХЛЛ [98]. По-видимому, низкий уровень АДА при ХЛЛ определяется снижением клона В-лимфоцитов, преобладающего при ХЛЛ, а также уменьшением доли Т-клеток [88]. Противоречивые результаты показаны при острой лимфобластной лейкемии: отмечено как увеличение, так и снижение активности АДА [4, 8, 53, 100].

Т-клеточные заболевания (Т-клеточный острый лимфолейкоз — ОЛЛ) сопровождаются увеличением активности АДА в лимфоцитах, в меньшей степени выраженным при остром миелолейкозе (ОМЛ) и синдроме Сезари [14, 49, 54, 55, 92, 93]. Увеличение активности фермента установлено в лимфоцитах при макроглобулинемии Вальденстрема [81] и 85-кратное увеличение — в эритроцитах при наследственной гемолитической анемии [63, 89]. Умеренное увеличение активности АДА в эритроцитах описано при врожденной гипопластической анемии [37], сидеробластной анемии и у пациентов с миелодиспластическим синдромом [20, 47, 94]. Гиперпродукция АДА наблюдалась только в эритроцитах, тогда как

в В-лимфоцитах, гранулоцитах, тромбоцитах и фибробластах кожи активность была в пределах нормы. Изменение суммарной активности АДА является следствием измененного количества каталитически и иммунологически нормального фермента. Исследования показали отсутствие амплификации гена или каких-либо вставок, делеций или перестроек гена АДА [47]. Предполагают, что увеличение активности АДА в эритроцитах, по-видимому, связано с отклонением функции эритроидной стволовой клетки, патологией эритроцитопоэза [37].

Высокий уровень АДА, обнаруживаемый в бластных клетках у больных ОЛЛ, ОМЛ, ХМЛ и сопровождаемый значительно большим увеличением активности фермента в лимфоцитах по сравнению с таковой в миелоцитах, послужил поводом для использования АДА в диагностических целях в качестве биохимического маркера В- и Т-лимфоидных заболеваний и дифференциальной диагностики В- и Т-бластных заболеваний [14, 18]. Изменение активности АДА при разных формах лейкозов наблюдалось и в тромбоцитах [1]. Изучению свойств АДА при лейкозах посвящено незначительное число работ.

Исследования изоферментного спектра при гематологических заболеваниях выявили различия в распределении изоформ в клетках крови в зависимости от их природы [71]. Так, изучение изоферментного спектра АДА при остром лимфобластном лейкозе и остром нелимфобластном лейкозе при одинаковой общей активности АДА показало, что АДА<sub>2</sub> (мол. м. 110 кД) экспрессируется исключительно в нелимфоидных клетках: остром миелобластном лейкозе, остром монобластном лейкозе, остром миелоцитарном лейкозе, хроническом миелолейкозе с бластной трансформацией нелимфоидного типа, тогда как другая, АДА<sub>1</sub> (мол. м. 40 кД), — в обоих лимфоидных и нелимфоидных типах клеток [71, 86]. В дальнейшем это было подтверждено тем, что АДА<sub>2</sub> (мол. м. 110 кД) обнаружена в культуре миелобластных клеточных линий КГ<sub>1</sub> и МЛ<sub>2</sub> и гистоцитов клеточной линии U937, но не обнаружена в промиелоцитарной (HL60), эритролейкемической (K562) и Т-лимфобластной (CCRF-CEMD) клеточных линиях [71].

Различное распределение АДА<sub>1</sub> (мол. м. 40 кД) и АДА<sub>2</sub> (мол. м. 110 кД) при лейкозах лимфоидных и нелимфоидных типов может использоваться как новый биохимический маркер незрелых нелимфоидных клеток [71]. Была подтверждена идентичность изучаемой АДА<sub>2</sub> (мол. м. 110 кД) в клетках больного острым монобластным лейкозом с высокой Км аденозина  $2 \cdot 10^{-3}$  моль/л и нечувствительностью к ингибированию ЕННА с данными, сообщаемыми для АДА<sub>2</sub> селезенки (Км  $2 \cdot 10^{-3}$  моль/л) и сывороточной АДА<sub>2</sub> (Км  $2,8 \cdot 10^{-3}$  моль/л) [70, 76]. Следует отметить, что различные формы могут взаимопревращаться и при бластной трансформации лимфоцитов, вызванной митогеном. Они отличаются чувствительностью к ингибиторам и при электрофокусировании обнаруживают гетерогенность, природа которых неясна [15, 22].

На очищенной из лейкоэмических гранулоцитов до гомогенного состояния в 3038 раз АДА со

специфической активностью 486 мкмоль/мин/мг, сходной с известной для очищенного фермента из эритроцитов активностью 538 и 515 ед/мг [4], показано, что фермент является мономером с мол. м. 44 кД и не отличается от эритроцитарного фермента по аминокислотному составу. При исследовании субстратной специфичности показано, что фермент не способен к гидролизу аденина, АМФ, гуанозина, дезоксиаденозина, цитидина и *δ*-цитидина, но специфичен к аденозину и *δ*-аденозину с Км 48 и 34 мкмоль,  $V_{\max}$  416 и 312 мкмоль/мин/мг соответственно [95]. Однако имелись различия при ингибировании ЕННА (К<sub>i</sub> 15 нмоль) и *δ*-коформацином (К<sub>i</sub> 92 и 66 пкмоль) при использовании в качестве субстратов аденозина и *δ*-аденозина соответственно в сравнении с К<sub>i</sub> 1,6 и 2,5 — 15 пкмоль соответственно для эритроцитарного фермента с аденозином в качестве субстрата. В отличие от электрофоретически гетерогенной АДА эритроцитов (Р<sub>i</sub> 4,70, 4,83, 4,94, 5,06), показывающей 4 полосы на электрофорезе, АДА (мол. м. 44 кД) гранулоцитов имела 1 полосу с Р<sub>i</sub> 4,4 [24].

Судя по отсутствию существенных отличий изозимного спектра АДА лимфоцитов при ХЛЛ и соотношения большой и малой форм фермента от наблюдаемого в нормальных клетках, физико-химические и молекулярные характеристики АДА существенно не затрагиваются лейкозным процессом [66, 88]. Энзимологические и иммунологические исследования АДА были выполнены при ОЛЛ и ОМЛ. Отмечено отсутствие изменений при данных заболеваниях в термостабильности, электрофоретической подвижности, иммунологической реактивности, Км аденозина (57 и 58 мкмоль) в сравнении с описанной для АДА моноядерных клеток доноров (Км 48 и 65 мкмоль). Эти результаты дают возможность предположить, что увеличение активности при ОЛЛ и ОМЛ в лейкоэмических клетках связано с увеличением степени синтеза структурно нормального фермента, а увеличение плазменной АДА у этих больных отражает увеличение числа лейкоэмических клеток в костном мозгу [58].

Следует отметить, что в последнее время в литературе практически отсутствуют данные о свойствах АДА тромбоцитов как в норме, так и при лейкозах. В то же время изучение свойств АДА тромбоцитов имеет общебиологическую ценность, а также практическое значение для медицины. Нами изучен ряд физико-химических и кинетических свойств АДА тромбоцитов при ХМЛ [2]. По кинетическим характеристикам АДА тромбоцитов больных ХМЛ (Км  $36,2 \pm 6,4$  мкмоль и  $V_{\max}$   $0,13 \pm 0,03$  мкмоль/мин) практически не отличается от фермента донора и аналогичного фермента эритроцитов, хотя незначительные отличия в значении каталитических констант наблюдаются у некоторых больных как в сторону увеличения (Км 76,9 мкмоль,  $V_{\max}$  0,29 мкмоль/мин), так и в сторону снижения почти в 3 раза в сравнении с нормой.

Сравнительный анализ результатов исследованных физико-химических свойств АДА тромбоцитов доноров и больных ХМЛ выявил ряд отклонений от нормы. При исследовании влияния различных структурных аналогов пурина на активность АДА тромбоцитов наблюдалось разное воз-

действие их на активность последней. Выявлено, что азааденин подавлял активность в большей степени (в 4,6 раза) по сравнению с нормой. Однако ряд других структурных аналогов пурина: 6-метиламинопурин, 6-хлорпуририбозид — ингибировали фермент при ХМЛ в меньшей степени (лишь в 1,8 раза) по сравнению с нормой. N<sup>6</sup>-метиладенозин, 6-меркаптопурин, 6-хлорпурин, 2,6-диаминопурин, формидин оказывали ингибирующее влияние в равной степени как в норме, так и при ХМЛ [2].

Изучение влияния ионов двухвалентных металлов на активность АДА тромбоцитов при ХМЛ показало, что ионы Cu<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> и Ba<sup>2+</sup> ингибируют активность фермента с той же эффективностью, что и фермент доноров. Однако значительные различия выявлены в ингибировании активности АДА при ХМЛ ионами Mn<sup>2+</sup> (в 2,2 раза) по сравнению с таковым доноров. Mg<sup>2+</sup> и Cs<sup>+</sup> не оказывают выраженного ингибирующего действия. При исследовании термолабильности АДА отмечено, что АДА тромбоцитов при ХМЛ более чувствительна к тепловой обработке в сравнении с нормой [2].

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об изменении каталитических свойств АДА тромбоцитов больных ХМЛ по сравнению с нормой но действию ряда ингибиторов, ионов металлов и температуры. Однако причина наблюдаемых нами изменений физико-химических и кинетических свойств АДА, сопровождающихся снижением ее активности при ХМЛ, до сих пор неясна.

Ответ на воздействие ряда ингибиторов (8-азааденина, 6-метиламинопурина, формидина) и ионов металлов (Mn<sup>2+</sup>) был аномальным и при ХЛЛ, неходжкинской лимфоме и подобным наблюдаемому в случае ХМЛ [2]. Данный подход с использованием ингибиторов может быть применен не только в качестве показателей аномальности фермента, но и для констатации фенотипических изменений. Разработка таких критериев весьма актуальна в плане прогноза болезни и дает возможность использовать не классическое (стандартное) определение активности фермента, что является в ряде случаев малоинформативным, а изменение каталитических параметров АДА в ответ на воздействие ряда ингибиторов и ионов металлов.

В последнее время расширился интерес к ингибиторам АДА в связи с возможностью их использования в качестве противоопухолевых, противовирусных и иммуносупрессивных агентов. Клинические исследования ингибиторов при лечении лейкозов показали, что *д*-коформидин блокирует созревание стволовых клеток костного мозга, а ЕННА потенцирует способность аденозина ингибировать лимфоцитарный blastogenesis и вызывает цитоллиз лимфоцитов. Комбинация 10 мкмоль *д*-аденозина и 10 мкмоль *д*-коформидина полностью подавляет синтез ДНК в Т-клетках человека, при этом в нормальных клетках костного мозга синтез ДНК не подавляется при использовании 20 мкмоль *д*-коформидина [99]. Сообщалось о получении хорошего эффекта при лечении *д*-коформидином лимфобластного лейкоза у детей; для некоторых пациентов

с ОЛЛ тимического фенотипа была достигнута полная временная ремиссия [62, 67].

Таким образом, приведенный в настоящем обзоре материал не дает исчерпывающей информации о свойствах АДА в форменных элементах крови при патологии. Многие вопросы остаются неизученными и нерешенными. Обнаруженные различия в активности и свойствах АДА при целом ряде гематологических заболеваний, выражающихся в изменении электрофоретической подвижности, термолабильности в ответе на воздействие ряда ингибиторов, активаторов, ионов металлов, могут быть использованы для разработки критериев в целях раннего выявления и прогноза заболеваний, что весьма актуально. Раскрытие физико-химической сущности изменений активности АДА при различных заболеваниях крови имеет важное значение для понимания патогенеза вышеуказанных заболеваний. Сравнительные исследования кинетических и в большей степени физико-химических свойств фермента дают определенную информацию о механизмах, ответственных за изменение активности АДА при патологии, но наиболее полное представление о причине недостаточности фермента дает изучение молекулярной структуры и молекулярной патологии самих мутантных белков. Молекулярный анализ нормальной и мутантной кДНК и нормального гена АДА продемонстрировал точковые мутации и мутации, представляющие собой делеции части гена. Точковые мутации, идентифицированные внутри кодирующей последовательности, индуцируют конформационные изменения в молекуле белка, сопровождающиеся более быстрой денатурацией и деградацией. Дополнительная информация об этих мутациях может быть получена путем изучения мРНК и их продуктов трансляции из нормальных и мутантных клеток. Дальнейшее изучение молекулярной структуры мутантного белка АДА важно для понимания этиологии недостаточности АДА, что приведет к лучшему пониманию причин и механизмов болезни и подскажет более совершенные методы лечения.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Соковина Я. М., Пестина Т. И., Тенцова И. А. и др. // Вестн. АМН СССР. — 1984. — № 8. — С. 75.
2. Соковина Я. М., Пестина Т. И., Туркина А. Г., Воронин И. И. // Вопр. мед. химии. — 1987. — № 6. — С. 71—74.
3. Aitken D. A., Ferguson-Smith M. A. // Cytogenet. Cell Genet. — 1978. — Vol. 22. — P. 514—517.
4. Agarwal R. P., Sagar S. M., Parks R. E. // Biochem. Pharmacol. — 1975. — Vol. 24. — P. 693—701.
5. Agarwal R. P., Parks R. E. // Meth. Enzymol. — 1978. — Vol. 51. — P. 502—507.
6. Akedo H., Nishihara H., Shinkai K. et al. // Biochim. biophys. Acta. — 1972. — Vol. 276. — P. 257—271.
7. Akesson A. L., Wiginton D. A., Dusing M. R. et al. // J. biol. Chem. — 1988. — Vol. 263, N 31. — P. 16 291—16 296.
8. Akesson A. L., Wiginton D. A., Hutton J. J. // J. Cell. Biochem. — 1989. — Vol. 39. — P. 217—218.
9. Andy R. J., Kornfeld R. // J. biol. Chem. — 1984. — Vol. 259. — P. 9823—9839.
10. Barton R. J., Martiniunk R. et al. // J. Immunol. — 1979. — Vol. 122. — P. 216.
11. Barton R. W., Goldschneider I. // Molec. Cell. Biochem. — 1979. — Vol. 28, N 1—3. — P. 135—147.
12. Ballistuzzi G., Iudicone P., Santolamazza P., Petrucci R. // Ann. hum. Genet. — 1981. — Vol. 45. — P. 15—19.

13. *Ben-Bassat I., Simoni F., Holtzman F., Ramot B.* // Israel J. med. Sci.— 1979.— Vol. 15.— P. 925—927.
14. *Bertazzoni D., Brusamolto E., Isernia P.* et al. // Blood.— 1982.— Vol. 60, N 3.— P. 685—688.
15. *Borgini F.* // J. Biochem.— 1977.— Vol. 26, N 6.— P. 308—314.
16. *Borkowsky W., Gershon A. A., Shenkman L.* et al. // Pediat. Res.— 1980.— Vol. 14.— P. 885—889.
17. *Buel E., Mac Quarrie R.* // Prepar. Biochem.— 1981.— Vol. 11, N 4.— P. 363—380.
18. *Casoli C., Magnani G.* // J. med. Virol.— 1988.— Vol. 24, N 4.— P. 413—422.
19. *Carson D. A.* // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1977.— Vol. 74.— P. 5677.
20. *Chottiner E. B., Ginsburg D., Mitchell B. S.* / Ed. K. Mikanagi, K. Nishioka, W. N. Kelley.— London, 1988.— Vol. 253.— P. 493—497.
21. *Coleman M. S., Hutton J. J.* // Biochem. Med.— 1975.— Vol. 13.— P. 46—51.
22. *Constino J.* // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1978.— Vol. 85.— P. 198—202.
23. *Corbo R. M., Scacchi R., Martuno E.* // Enzyme.— 1988.— Vol. 39, N 1.— P. 50—53.
24. *Daddona P. E., Kelley W. N.* // J. biol. Chem.— 1977.— Vol. 252, N 1.— P. 110—115.
25. *Daddona P. E., Fronman M. A., Kelley W. N.* // J. clin. Invest.— 1979.— Vol. 64.— P. 798—803.
26. *Daddona P. E., Frohman M. A., Kelley W.* // J. biol. Chem.— 1980.— Vol. 255, N 12.— P. 5681—5687.
27. *Daddona P. E., Kelley W. N.* // Biochim. biophys. Acta.— 1981.— Vol. 658.— P. 280—290.
28. *Daddona P. E., Mitchell B. S., Mewissen H. J.* et al. // J. clin. Invest.— 1983.— Vol. 72, N 2.— P. 483—492.
29. *Cowan M. J., Brady R. O., Widdner K. J.* // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1986.— Vol. 83.— P. 1089—1091.
30. *Demeoca F., Viallard J. L., Boumsell L.* et al. // Leuk. Res.— 1982.— Vol. 6.— P. 211—220.
31. *Doni M. G.* // Haemostasis.— 1981.— Vol. 10.— P. 79—88.
32. *Donofrio J.* et al. // J. clin. Invest.— 1978.— Vol. 62.— P. 884—887.
33. *Foelinova J., Kuzela S.* // Neoplasma.— 1976.— Vol. 23.— P. 223—231.
34. *Franco R.* // J. Histochem. Cytochem.— 1990.— Vol. 38, N 5.— P. 653—658.
35. *Gan T. E., Hallam L., Van der Weyden M. B.* // Leuk. Res.— 1982.— Vol. 6.— P. 215—222.
36. *Ganeshaguri K.* // Ibid.— 1981.— Vol. 5.— P. 215.
37. *Gladder B. E., Bacher K.* // Brit. J. Haemat.— 1988.— Vol. 68.— P. 165—168.
38. *Green H., Chan T.-S.* // Science.— 1973.— Vol. 182.— P. 836—837.
39. *Harts S. L., Lane A. B., Jenkins T.* // Hum. Genet.— 1986.— Vol. 74, N 3.— P. 307—312.
40. *Hirschhorn R., Grossman J., Weissman G.* // Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.).— 1970.— Vol. 133.— P. 1361—1365.
41. *Hirschhorn R., Beratis N., Rosen F. S.* et al. // Lancet.— 1975.— Vol. 1.— P. 73.
42. *Hirschhorn R., Roegner V., Jenkins T.* et al. // J. clin. Invest.— 1979.— Vol. 64.— P. 1130.
43. *Hirschhorn R., Ellenbogen A.* // Amer. J. hum. Genet.— 1986.— Vol. 38.— P. 13—25.
44. *Hirschhorn R.* // Clin. Immunol. Immunopath.— 1986.— Vol. 40.— P. 157—165.
45. *Hovi T., Smyth J. F., Allison A. C.* et al. // Clin. exp. Immunol.— 1976.— Vol. 23.— P. 395—403.
46. *Jhanwar S. C., Berkoens T. M., Breukel C.* et al. // Cytogenet. Cell. Genet.— 1989.— Vol. 50.— P. 168—171.
47. *Kanno H., Fujii H., Tanc K.* et al. // Amer. J. Hemat.— 1988.— Vol. 27.— P. 216—220.
48. *Komatsu M., Kido A., Oya M.* // Hum. Genet.— 1987.— Vol. 77.— P. 385—391.
49. *Koya M., Kanoh T., Sawada H.* // Blood.— 1981.— Vol. 58.— P. 1107—1111.
50. *Kultesh J. F., Schmalstieg F. C., Nelson J. A.* // J. Liquid. Chromotogr.— 1978.— Vol. 1.— P. 97.
51. *Kurz L. C., Weitkamp E., Frieden C.* // Biochemistry (Wash.).— 1987.— Vol. 26.— P. 3027—3032.
52. *Lee C. H., Evans S. P., Rosenberg M.* et al. // Blood.— 1979.— Vol. 53.— P. 465—471.
53. *Liso V., Tursi A., Specchia G.* et al. // Scand. J. Haemat.— 1978.— Vol. 21, N 2.— P. 167—175.
54. *Ludwig H., Winterlaither H., Kurmits R.* et al. // Advanc. exp. Med. Biol.— 1979.— Vol. 122-B.— P. 333—337.
55. *Luacchini A., Montali U., Borghini F.* et al. // Ital. J. Biochem.— 1982.— Vol. 31, N 6.— P. 396—403.
56. *Mac Quarrie R., Buel E.* // Molec. Cell. Biochem.— 1982.— Vol. 48.— P. 121—126.
57. *Morgan G., Levinsky R. J., Hugh-Jones K.* et al. // Clin. exp. Immunol.— 1987.— Vol. 70.— P. 491—499.
58. *Morisaki T., Fujii H., Miva S.* // Amer. J. Hemat.— 1985.— Vol. 19.— P. 37—45.
59. *Murray J. L., Loftin K. C., Munn C. G.* et al. // Blood.— 1985.— Vol. 65, N 6.— P. 1318—1324.
60. *Murray J. L., Perez-Soler R., Bywaters D.* et al. // Amer. J. Hemat.— 1986.— Vol. 21.— P. 57—66.
61. *Palomba E.* // Pediat. infect. Dis. J.— 1989.— Vol. 8.— P. 862—865.
62. *Paplack D., Sattan S.* // Cancer Res.— 1981.— Vol. 41.— P. 3343—3348.
63. *Perignor J.-L., Hamet M., Bue H. A.* et al. // Clin. chim. Acta.— 1982.— Vol. 124.— P. 205—212.
64. *Philips A. V., Robbins D. J., Colleman M. S.* // Biochemistry (Wash.).— 1987.— Vol. 26.— P. 2893—2903.
65. *Philips A. V., Colleman M. S.* // Ibid.— 1989.— Vol. 28.— P. 2040—2050.
66. *Polmar S.* // Semin. Hemat.— 1980.— Vol. 17, N 1.— P. 30—43.
67. *Prentice G., Ganeshguru K., Bradstock K.* et al. // Lancet.— 1980.— Vol. 38.— P. 170—172.
68. *Ramot B., Brok-Simoni F., Barnea N.* // Brit. J. Hemat.— 1977.— Vol. 36.— P. 67—70.
69. *Ratech H., Thorbecke G., Meredith G.* // Enzyme.— 1981.— Vol. 26.— P. 74—84.
70. *Ratech H., Hirschhorn R.* // Clin chim. Acta.— 1981.— Vol. 115.— P. 341—347.
71. *Ratech H., Martiniuk F., Borer W. Z.* et al. // Blood.— 1988.— Vol. 72, N 5.— P. 1627—1632.
72. *Rogers P. A., Hopkinson D. A.* // Ann. hum. Genet.— 1981.— Vol. 45.— P. 21—28.
73. *Schmalstieg F. C., Nelson J. A., Mills G. C.* et al. // J. Pediat.— 1977.— Vol. 91, N 1.— P. 48—51.
74. *Schrader W. P., Stacy A. R., Pollara B.* // J. biol. Chem.— 1976.— Vol. 251, N 13.— P. 4026—4032.
75. *Schrader W. P., Stacy A. R.* // Ibid.— 1977.— Vol. 252.— P. 6409—6415.
76. *Schrader W. P., Pollara B., Mewissen H. J.* // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1978.— Vol. 75, N 1.— P. 446—450.
77. *Schrader W. P., Stacy A. R.* // J. biol. Chem.— 1979.— Vol. 254.— P. 11 958—11 963.
78. *Schrader W. P., West C. A., Strominger N. L.* // J. Histochem. Cytochem.— 1987.— Vol. 35, N 4.— P. 443—451.
79. *Seegmiller J. E., Watanabe T., Shreier M. M.* et al. // Advanc. exp. Med. Biol.— 1977.— Vol. 76A.— P. 412—417.
80. *Sidi Y., Boer P., Pick J.* // Lancet.— 1979.— Vol. 1.— P. 500—503.
81. *Sidi Y., Boer P., Pick J.* et al. // Biomedicine (Express).— 1980.— Vol. 33.— P. 39—42.
82. *Simmonds H. A., Panavi G. S.* // Lancet.— 1978.— Vol. 14.— P. 60—63.
83. *Simmonds H. A., Goday A., Morris G. S.* // Biosci. Rep.— 1984.— Vol. 4.— P. 809—819.
84. *Smyth F., Poplack D. G., Holiman B. J.* // J. clin. Invest.— 1978.— Vol. 62.— P. 710—712.
85. *Stoecler J. D., Bell C. A., Parks R. E.* // Biochem. Pharmacol.— 1982.— Vol. 31.— P. 1723—1728.
86. *Swallow D. M., Evans L., Hopkinson D. A.* // Nature.— 1977.— Vol. 269.— P. 261—262.
87. *Tiotta P. P.* // Advanc. exp. Med. Biol.— 1979.— Vol. 122b.— P. 163—168.
88. *Tung R., Quagliata F., Conclyn L. M.* et al. // J. clin. Invest.— 1976.— Vol. 57.— P. 756—761.
89. *Valentine W. N., Paglia D. E., Tartaglia A. P.* // Science.— 1977.— Vol. 195.— P. 783—786.
90. *Valls V.* // Aids.— 1990.— Vol. 4, N 4.— P. 365—366.
91. *Van der Weyden M. B., Kelley W. N.* // J. biol. Chem.— 1976.— Vol. 251, N 18.— P. 5448—5456.
92. *Van der Weyden M. B., Bailey L., Carson O. M.* // Experientia (Basel).— 1978.— Vol. 34.— P. 531—532.
93. *Van der Weyden M. B., Ellims P. M., Eng Gan T.* // Amer. J. Hemat.— 1983.— Vol. 14.— P. 301.
94. *Van der Weyden M. B.* // Brit. J. Haemat.— 1989.— Vol. 73, N 1.— P. 129—131.
95. *Wiginton D. A., Coleman M. S., Hutton J. J.* // Biochem. J.— 1981.— Vol. 195.— P. 389—397.
96. *Wiginton D. A., Adrian G., Friedman R. L.* et al. //

97. Wiginton D. A., Kaplan D. J., States J. C. et al. // Biochemistry (Wash.).— 1986.— Vol. 25.— P. 8234—8244.
98. Yasmineh W. G., Brynes R. K., Lum C. T., Abbanezhad M.

99. Yu A., Bahcay B., Kung F., Nyhhan N. // Conc. Res.— 1981.— Vol. 41.— P. 2677—2682.
100. Zimmer J., Khalifa A. S., Lightbody J. J. // Cancer. Res.— 1975.— Vol. 35.— P. 68—70.

Поступила 18.03.92

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

© В. В. ИВАНОВ, М. П. СТЕННИКОВА, 1993

УДК 616.379-008.64-07:616.153.915-39

В. В. Иванов, М. П. Стенникова

### СООТНОШЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И РЕЦЕПЦИИ ИНСУЛИНА В АДИПОЦИТАХ

Томский медицинский институт

Изменение чувствительности периферических тканей к инсулину при диабете — важное звено в его патогенезе [8]. Действие гормона на метаболизм определяется в первую очередь состоянием рецепторного аппарата клеточных мембран. Так как инсулиновый рецептор является структурным элементом мембраны, ее физико-химическое состояние в значительной мере определяет рецепцию гормона [2, 5]. С этой точки зрения представляет интерес исследование роли перекисного окисления липидов (ПОЛ) — эффективного модификатора состава и физико-химических свойств биологических мембран [1]. Повышенное содержание продуктов липидной пероксидации в сыворотке крови и эритроцитах выявлено у больных сахарным диабетом [4, 16], а также при экспериментальном сахарном диабете [7].

Целью настоящей работы явилось исследование соотношения интенсивности ПОЛ, стимулированного прооксидантами, и уровня рецепции инсулина адипоцитами.

**Методика.** Эксперименты выполнены на адипоцитах, полученных из эпидидимальной жировой ткани нелинейных белых крыс-самцов массой 180—200 г с помощью коллагеназы [17]. Связывание инсулина с жировыми клетками исследовали с использованием меченого  $^{125}\text{I}$ -инсулина, как описано ранее [6].  $^{125}\text{I}$ -инсулин с удельной активностью 5—6 МБк на 1 мкг белка получали с применением хлорамина Т [14]. Адипоциты ( $10^6$  клеток на 1 мл) инкубировали при  $25^\circ\text{C}$  с  $^{125}\text{I}$ -инсулином (0,2 нг на 1 мл) и немеченым гормоном в концентрации 2,5—100 нг/мл. Неспецифическое связывание гормона определяли в присутствии 10 мкг на 1 мл немеченого инсулина. Специфическое связывание рассчитывали как разность между общим и неспецифическим связыванием гормона. Усредненные кривые связывания инсулина в зависимости от его концентрации использовали для построения графической зависимости Сэтчарда с целью определения кинетических констант связывания инсулина и числа рецепторов [18]. Радиоактивность проб измеряли на счетчике фирмы «Трасог Аналитик», модель 1197.

ПОЛ в адипоцитах стимулировали добавлением к суспензии клеток одновременно с инсулином гидроперекиси кумола в конечной концентрации  $3 \cdot 10^{-7}$ — $3 \cdot 10^{-3}$  М и ионов двухвалентного железа (0,2 мМ). О состоянии ПОЛ судили по уровню конечного продукта — малонового диальдегида (МДА), который определяли в реакции с тиобарбитуровой кислотой [1].

Результаты обрабатывали статистически с применением непараметрического критерия Вилкоксона—Манна—Уитни [3].

Использованы кристаллический инсулин отечественного производства, хлорамин Т, метабисульфит натрия («Sigma», США), сефадекс G-50 («Farmacia F. Chem.», Швеция),  $\text{Na}^{125}\text{I}$  (ВО «Изотоп»), коллагеназа (ISN, США), трис(гидроксиметил)-аминометан («Reanal», Венгрия),  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaCl}$ , глюкоза (ВНТ, Англия), гидроперекись кумола («Merck», Германия),  $\text{FeSO}_4$ , тиобарбитуровая кислота отечественного производства.

**Результаты и обсуждение.** Установлено, что гидроперекись кумола в присутствии ионов двухвалентного железа оказывает существенное влияние на связывание инсулина адипоцитами крыс

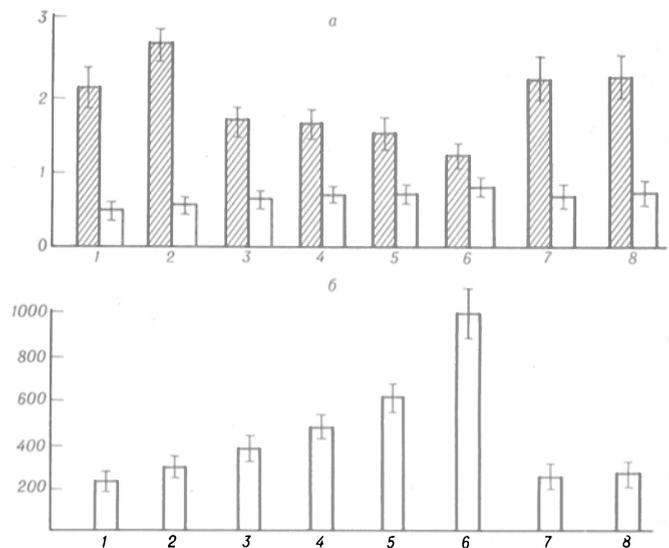


Рис. 1. Влияние гидроперекиси кумола и ионов двухвалентного железа на специфическое и неспецифическое связывание инсулина адипоцитами крыс (а) и содержание в них МДА (б). По осям абсцисс: 1 — контроль, 2, 3, 4, 5, 6 — добавление в инкубационную среду гидроперекиси кумола в концентрации  $3 \cdot 10^{-7}$ ,  $3 \cdot 10^{-6}$ ,  $3 \cdot 10^{-5}$ ,  $3 \cdot 10^{-4}$ ,  $3 \cdot 10^{-3}$  М соответственно в присутствии  $\text{Fe}^{2+}$  (0,2 мМ); 7 — добавление гидроперекиси кумола ( $3 \cdot 10^{-3}$  М) без ионов  $\text{Fe}^{2+}$ , 8 — добавление ионов  $\text{Fe}^{2+}$  (0,2 мМ); по осям ординат: на а — % связанного инсулина от общей радиоактивности на  $2 \cdot 10^6$  клеток, на б — содержание МДА, нмоль на  $2 \cdot 10^6$  клеток. Заштрихованные столбики — специфическое связывание, светлые — неспецифическое.

(рис. 1, а). Величина и направленность эффекта зависят от концентрации добавленной в среду инкубации гидроперекиси кумола. Прооксидант в концентрации  $3 \cdot 10^{-7}$  М увеличивал специфическое связывание гормона жировыми клетками на 20 % ( $p < 0,05$ ), что составляло  $2,54 \pm 0,17$  % от общей радиоактивности (в контроле  $2,14 \pm 0,18$  %). Более высокие концентрации гидроперекиси кумола уменьшали показатель клеточно-связанной метки, и максимальное ингибирование (на 50 %) отмечалось в присутствии  $3 \cdot 10^{-3}$  М прооксиданта.

При оценке неспецифического связывания гормона было установлено, что при концентрации гидроперекиси кумола  $3 \cdot 10^{-7}$ — $3 \cdot 10^{-4}$  М его величина относительно контроля существенно не менялась (см. рис. 1, а). При концентрации прооксиданта  $3 \cdot 10^{-3}$  М неспецифическое связывание инсулина увеличивалось почти в 2 раза. Это свидетельствует о процессах дезорганизации мембран, ведущих к увеличению адсорбции инсулина на их поверхности, и является подтверждением цитотоксичности достигаемого уровня свободнорадикального окисления липидов [11].

Полученные в результате экспериментов данные свидетельствуют о том, что влияние гидроперекиси кумола на рецепцию инсулина адипоцитами связано с ее способностью активировать ПОЛ. Увеличение эффекта ингибирования специфического связывания инсулина жировыми клетками возрастающими концентрациями прооксиданта наблюдалось одновременно с нарастанием уровня МДА в адипоцитах (рис. 1, б). Этот вывод подтверждается данными о том, что раздельное добавление гидроперекиси кумола и ионов  $Fe^{2+}$  не вызывало существенной стимуляции липидной пероксидации и не изменяло уровень рецепции гормона (см. рис. 1, а, б). Отсутствие стимуляции ПОЛ в изолированных адипоцитах при раздельном добавлении прооксидантов описано нами ранее и связано с особенностями инициации свободнорадикального окисления в целостных жировых клетках [6].

С целью выяснения механизмов влияния ПОЛ на связывание инсулина нами были получены кривые связывания гормона адипоцитами при концентрации перекиси кумола  $3 \cdot 10^{-7}$  М, когда наблюдалось увеличение связывания, и  $3 \cdot 10^{-3}$  М, когда отмечалось его максимальное ингибирование. Результаты показывают, что специфическое связывание гормона было повышено при концентрации гидроперекиси кумола  $3 \cdot 10^{-7}$  М и снижено при концентрации  $3 \cdot 10^{-3}$  М в сравнении с контролем при всех концентрациях немеченого гормона (рис. 2, а). На основании анализа полученных данных в координатах Скэтчарда (рис. 2, б) были рассчитаны основные характеристики связывания гормона с рецептором, представленные в таблице.

При концентрации прооксиданта  $3 \cdot 10^{-7}$  М адипоциты связывали 350 пг инсулина на  $2 \cdot 10^5$  клеток, что соответствует 120 000 связывающих мест на клетку, тогда как в контроле эти показатели существенно ниже (235 пг на  $2 \cdot 10^5$  клеток и 55 000 рецепторов на клетку соответственно). Напротив, при концентрации прооксиданта  $3 \cdot 10^{-3}$  М число рецепторов, приходящихся на 1 адипоцит, было достоверно ниже, чем в контроле,

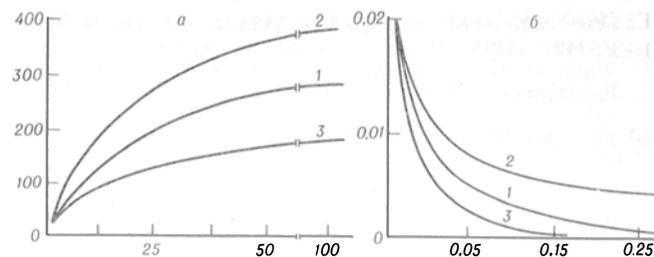


Рис. 2. Влияние прооксидантов на инсулин-рецепторное взаимодействие в адипоцитах крыс.

а — связывание инсулина адипоцитами при возрастающих концентрациях немеченого гормона: по оси абсцисс — концентрация добавленного инсулина, нг/мл, по оси ординат — специфически связанный инсулин, пг на  $2 \cdot 10^5$  клеток; б — выражение данных в виде графической зависимости Скэтчарда: по оси абсцисс — специфически связанный инсулин (В), пг на  $2 \cdot 10^5$  клеток, по оси ординат — отношение специфически связанного инсулина к свободному (В/Г). 1 — контроль; 2 и 3 — добавление гидроперекиси кумола в концентрации  $3 \cdot 10^{-7}$  и  $3 \cdot 10^{-3}$  М соответственно в присутствии  $0,2$  мМ  $Fe^{2+}$ .

и составляло 23 000. Согласно двухкомпонентной модели, при низкой концентрации гидроперекиси кумола число рецепторов с высоким сродством уменьшалось почти в 3 раза, а число рецепторов с низким сродством увеличивалось в 2,6 раза. Константа связывания для первого типа рецепторов составляла  $1,57 \cdot 10^9$  М $^{-1}$ , а для низкоаффинных рецепторов —  $0,06 \cdot 10^8$  М $^{-1}$ . При высокой концентрации гидроперекиси кумола отмечался иной характер изменений. Число рецепторов с высоким сродством к инсулину уменьшилось в 5,5 раза, а с низким — более чем в 2 раза. Рассчитанные для этих связывающих участков константы сродства составили  $0,45 \cdot 10^9$  и  $0,02 \cdot 10^9$  М $^{-1}$  соответственно, т. е. в обоих случаях уменьшились (см. таблицу).

Результаты о разнонаправленном действии слабой и более выраженной активации ПОЛ на связывание инсулина подтверждаются данными о противоположных эффектах малых и высоких концентраций продуктов этого процесса на активность мембранно-связанных ферментов и рецепторов [12, 15]. Умеренная стимуляция ПОЛ, появление липидных зон с различной вязкостью могут сопровождаться концентрированием рецепторов с образованием рецепторных кластеров, способствовать преобладанию полимерной формы рецептора, в которой сродство к гормону увеличивается [10]. Уменьшение связывания инсулина при значительной стимуляции липоперекисления в адипоцитах может быть обусловлено усилением деградации гормон-рецепторного комплекса лизо-

#### Влияние гидроперекиси кумола в присутствии ионов $Fe^{2+}$ на параметры связывания инсулина адипоцитами крыс

Исследуемый параметр	Контроль	Гидроперекись кумола	
		$3 \cdot 10^{-7}$ М	$3 \cdot 10^{-3}$ М
$R_0$	55 000	120 000	23 000
$R_1$	11 000	4 000	2 000
$K_1$ (М $^{-1}$ )	$0,61 \cdot 10^9$	$1,57 \cdot 10^9$	$0,45 \cdot 10^9$
$R_2$	44 000	116 000	21 000
$K_2$ (М $^{-1}$ )	$0,36 \cdot 10^8$	$0,06 \cdot 10^8$	$0,2 \cdot 10^8$

Примечание.  $R_0$  — общее количество рецепторов на клетку;  $R_1$  — количество рецепторов с высоким сродством на клетку;  $K_1$  — константа связывания для  $R_1$ ;  $R_2$  — количество рецепторов с низким сродством на клетку;  $K_2$  — константа связывания для  $R_2$ .  $p < 0,05$  для всех показателей гидроперекиси кумола, кроме показателя  $0,45 \cdot 10^9$ .

мальными ферментами [14], выход которых повышается вследствие увеличения проницаемости мембран лизосом в процессе свободнорадикального окисления липидов [1], а также изменением тиол-дисульфидного соотношения, играющего существенную роль в рецепции гормона [9, 13].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о модулирующем влиянии ПОЛ на чувствительность жировых клеток к инсулину, что может являться одной из причин развития инсулинорезистентности.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М., 1972.
2. Гребенщиков Ю. Б., Мошковский Ю. И. Физико-химические свойства, структуры и функциональная активность инсулина. — М., 1986.
3. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев в медико-биологических исследованиях. — Л., 1973.
4. Ефимов А. С., Науменко В. Г. // Пробл. эндокринологии. — 1985. — № 1. — С. 6—9.
5. Ефимов А. С., Бездробный Ю. В. Структура и функции инсулиновых рецепторов. — Киев, 1987.
6. Иванов В. В., Стенникова М. П., Перебоева Л. А. // Укр. биохим. журн. — 1987. — Т. 59, № 2. — С. 57—61.
7. Мажуль Л. М. // Вопр. мед. химии. — 1987. — № 2. — С. 41—44.
8. Экспериментальный сахарный диабет. Роль в клинической диабетологии / Баранов В. Г., Соколовверова И. М., Гаспьярян Э. Г. и др. — Л., 1983.
9. Clark S., Harrison L. C. // J. biol. Chem. — 1983. — Vol. 258. — P. 11434—11437.
10. Ginsberg B. H., Labour J., Spector A. A. // Biochim. biophys. Acta. — 1982. — Vol. 690, N 2. — P. 157—164.
11. Glieman J. A., Soone O. // J. biol. Chem. — 1978. — Vol. 253, N 5. — P. 7857—7863.
12. Goldberg N. B., Graft G. // Advanc. cyclic. Nucl. Res. — 1978. — N 9. — P. 101—130.
13. Green A., Olefsky J. M. // Cell. Biol. — 1982. — Vol. 79, N 2. — P. 427—431.
14. Greenwood N. S., Hunter W. M., Clover I. S. // J. Biochem. — 1963. — Vol. 89, N 1. — P. 114—125.
15. Kramer R., Rademaker B., Rozendal W. // FEBS Lett. — 1986. — Vol. 198, N 1. — P. 80—84.
16. Nishigaki I., Hagihara M., Tsunekawa H. // Biochem. Med. — 1981. — Vol. 25. — P. 373—378.
17. Rodbell M. // J. biol. Chem. — 1964. — Vol. 239, N 2. — P. 375—380.
18. Scatchard G. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1949. — Vol. 51, N 2. — P. 660—662.

Поступила 18.02.91

#### CORRELATION OF LIPID PEROXIDATION ACTIVITY AND INSULIN RECEPTION IN ADIPOCYTES.

V. V. Ivanov, M. P. Stennikova

Medical School, Tomsk.

Influence of prooxidants (cumene hydroperoxide and  $Fe^{2+}$ ) on insulin reception by adipocytes was studied in experimental conditions. Cumene hydroperoxide ( $10^{-7}$  M) in the presence of  $Fe^{2+}$  (0.2 mM) increased the specific binding of the hormone. The higher concentrations ( $10^{-6}$ — $10^{-3}$  M) of the prooxidant resulted in significant accumulation of malonic dialdehyde and inhibited insulin binding by fat tissue cells. The inhibition of insulin specific binding was shown to occur due to a decrease in the content of insulin receptors as well as in the rate of their affinity to the hormone.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.831.9-008.6-092:612.017.1]-07

А. П. Хохлов, И. Г. Фетисова, А. М. Подлесный,  
В. П. Чехонин, В. К. Малаховский

#### ЗАЩИТНАЯ РЕАКЦИЯ КЛЕТОК МОЗГА ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ПРОНИЦАЕМОСТИ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА

Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова, Московский НИИ психиатрии им. В. П. Сербского

Изменение проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и появление нейроспецифических белков (НСБ) в крови зафиксировано при ряде неврологических заболеваний и критических состояний, а также на фоне приема лекарственных средств [1, 5, 10].

В большинстве случаев этот процесс сопровождается образованием соответствующих антител, создавая угрозу аутоиммунного поражения мозга. В то же время высокий уровень антигенов в биологических жидкостях создает определенное препятствие для развития аутоиммунного повреждения мозга, поскольку нейтрализация антител будет в данном случае происходить в крови.

Ограничение белоксинтезирующей активности нервных клеток, например при болезни Альцгеймера, приводит к снижению титра специфических антигенов в крови и тем самым увеличивает вероятность проникновения антител в клетки мозга с вытекающими отсюда последствиями [4]. Таким образом, активация белоксинтезирующих процессов в глиальных клетках на фоне увеличенной проницаемости ГЭБ может явиться одним из важных защитных механизмов, направленных на устранение возможных патологических последствий.

Для подтверждения этого предположения исследовали динамику специфических глиальных белков и антител к ним в крови больных после нейрохирургических операций.

Методика. Всего обследовано 23 больных, из них у 14 (основная группа) верифицировали опухоль головного мозга (9 больных с менигиомами различной локализации, 3 с глиобlastомами, 1 с краииофарингиомой и 1 больной с ангиоретикулемой мозжечка). В группу сравнения вошли 9 больных (5 с грыжей межпозвоночного диска пояснично-крестцовой локализации, 2 с опухолью спинного мозга и 2 с периферическими посттравматическими нейропатиями). Возраст больных обеих групп 35—45 лет.

Средняя длительность комбинированного наркоза 6 ч 26 мин и 4 ч 6 мин, длительность операции 5 ч 28 мин и 2 ч 54 мин в основной группе и группе сравнения соответственно. Вводный наркоз осуществляли гексеналом, основной наркоз — нейрорелептаналгезией и закисью азота (в 19 случаях использовали фентанил с дроперидолом, в 4 — дипидолор), для миорелаксации применяли ардуан (павулон) и дитилин (листенон).

Кровь брали до начала наркоза, перед разрезом (спустя 20—30 мин до начала анестезии),

Содержание НСБ (в нг/мл) в крови больных основной группы на фоне наркоза и в послеоперационном периоде

Время взятия крови	НСБ							
	1. $\alpha_1$ -ГМ		2. $\alpha_2$ -ГМ		3. $\alpha_2$ -ГП		4. ГФА	
	А	<i>p</i>	А	<i>p</i>	А	<i>p</i>	А	<i>p</i>
Контроль	1,45	—	1,14	—	84,96	—	89,6	—
0,5 ч	2,38	0,4	2,06	0,3	191,3	0,034	221,4	0,02
2 ч	14,8	0,001	18,0	0,00001	617,0	0,005	739,7	0,0001
6 ч	22,72	0,04	28,15	0,03	814,18	0,13	942,0	0,097
1 сут	21,16	0,75	23,6	0,38	744,8	0,52	940,71	0,86
3 сут	16,0	0,08	18,6	0,30	611,17	0,80	728,8	0,067
7 сут	8,02	0,197	9,9	0,21	314,7	0,029	390,8	0,21
15 сут	4,01	0,012	3,57	0,016	17,5	0,01	129,7	0,05
21 сут	1,34	0,01	1,32	0,015	12,42	0,84	78,2	0,016

Примечание. Здесь и в табл. 2 в столбцах 1—4 приводится средний уровень белка (А) и достоверность различий между соседними по вертикали величинами (*p*). Различия достоверны при  $p \leq 0,05$ .

через 2—6 ч от начала операции, на 1, 3, 7, 14 и 21-е сутки после операции.

Исследовали следующие белки:  $\alpha_1$ - и  $\alpha_2$ -глобулины мозга ( $\alpha_1$ -ГМ,  $\alpha_2$ -ГМ),  $\alpha_2$ -гликопротеид ( $\alpha_2$ -ГП), глиофибриллярный антиген (ГФА) и антитела к ним. Известно, что  $\alpha_2$ -ГМ локализован преимущественно в олигодендроцитах, тогда как гликопротеид и глиофибриллярный кислый протеин являются классическими астроцитарными белками [11].

Количество НСБ и аутоантител к ним определяли иммуноферментными методами (в частности, «сэндвич»-методом и методом ДИФАИХ) с использованием моноспецифических сывороток [2, 3, 6], регистрацию результатов иммуноферментного анализа проводили на многоканальном спектрофотометре типа «Titertek Multiskan» (фирма «Flow», Англия). Обработку полученных данных проводили с помощью непараметрических критериев Вилкоксона—Манна—Уитни.

Результаты и обсуждение. При исследовании крови, полученной в дооперационный период, у большинства больных с опухолями головного мозга выявили высокий уровень НСБ. По всей видимости, используемые в качестве премедикации противоопухолевые средства (лазикс, кортикостероиды) способствовали повышению проницаемости ГЭБ. Подобные эффекты дегидратирующих средств описаны в литературе [5]. В группе сравнения, где противоопухолевые средства не применялись, обнаруживались следы НСБ.

Достоверное увеличение концентрации всех исследованных НСБ ( $p < 0,05$ ) отмечено уже через 30 мин от начала комбинированного наркоза. В дальнейшем титр белков в крови постоянно увеличивался. Через 2 ч от начала операции количество белков в среднем повышалось в 6—8 раз от среднего исходного уровня, а через 6 ч — более чем в 10 раз. Максимальные цифры обычно регистрировали через 6 ч от начала анестезии (табл. 1).

В этот период количество  $\alpha_1$ -ГМ и  $\alpha_2$ -ГМ превысило 20 нг/мл,  $\alpha_2$ -ГП — 900 нг/мл, а ГФА — 940 нг/мл. При этом антител в крови к 4 перечисленным антигенам зарегистрировано не было. Достоверное снижение уровня НСБ отметили лишь на 7-е сутки после оперативного вмешательства. В дальнейшем титр НСБ снижался. Появление следовых количеств антител было выявлено на 15-е сутки после наркоза. И хотя к 21-му дню их титр повысился, тем не менее он был ниже уровня НСБ и составлял 0,05—0,1 нг/мл для глобулинов мозга и 1,5—3 нг/мл для  $\alpha_1$ -ГП и ГФА.

Сходные результаты были получены при обследовании больных групп сравнения, у которых не проводили манипуляций на ткани мозга (табл. 2). Достоверные различия между группами (основная группа и группа сравнения) были зафиксированы только во время операции. Содержание НСБ в этот период было существенно выше в основной группе. Сопоставление уровней белка в крови

Таблица 2

Содержание НСБ (в нг/мл) в крови больных группы сравнения на фоне наркоза и в послеоперационном периоде

Время взятия крови	НСБ							
	1. $\alpha_1$ -ГМ		2. $\alpha_2$ -ГМ		3. $\alpha_2$ -ГП		4. ГФА	
	А	<i>p</i>	А	<i>p</i>	А	<i>p</i>	А	<i>p</i>
Контроль	0,27	—	0,39	—	39,27	—	46,9	—
0,5 ч	1,2	0,0019	1,26	0,005	166,5	0,04	188,3	0,08
2 ч	5,28	0,0004	6,48	0,001	513,3	0,04	373,2	0,06
6 ч	18,08	0,001	20,6	0,006	674,3	0,48	834,5	0,055
Послеоперационный период								
1 сут	18,08	0,1	18,06	0,46	622,04	0,73	963,0	0,5
3 сут	18,84	0,04	15,27	0,12	527,50	0,50	484,5	0,08
7 сут	7,84	0,13	8,91	0,33	314,7	0,29	338,7	0,16
15 сут	0,48	0,006	0,48	0,01	17,5	0,01	19,17	0,06
21 сут	0,1	0,50	0,1	0,59	12,42	0,84	0,6	0,042

больных двух групп во всех других временных интервалах как до, так и после операции не выявило достоверных различий, что позволило сделать заключение: появление большого количества НСБ в крови практически не зависит от травматического повреждения мозга и определяется только после введения наркотических препаратов. При этом существенной разницы в динамике астроцитарных и олигодендроглиальных белков не отмечено. Низкий уровень антител свидетельствовал об их активной нейтрализации.

Таким образом, наркоз является ведущим фактором, влияющим на повышение проницаемости ГЭБ для НСБ в направлении мозг—кровь. При этом динамика НСБ, характеризующаяся стабильным выходом значительных количеств протеинов из клеток глии в кровь, позволяет предположить, что под влиянием наркоза происходит усиление синтеза глиальных белков.

Действительно, период полужизни различных антигенов в крови колеблется, по данным авторов [8], от 12 до 36 ч, поэтому зарегистрированный нами стабильный уровень НСБ (по крайней мере в течение 72 ч) не может быть обусловлен только мобилизацией тканевых резервов и определяется активностью белоксинтезирующих систем. В предварительных опытах на животных с введением сублетальных доз гексенала было показано, что этот эффект может быть реализован за счет стабилизации полирибосомальных комплексов.

Не исключено, что массивированный выброс НСБ в биологические жидкости на фоне дегидратирующей терапии, приема алкоголя, нейролепсии и травматического повреждения мозга [5, 7, 9] представляет защитную реакцию, препятствующую аутоиммунному повреждению мозга.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Морковкин А. В., Чехонин В. П., Каменных Л. Н. // Журн. невропатол. и психиатр.— 1986.— № 10.— С. 1974.
2. Чехонин В. П., Морозов Г. В. // Биотехнология.— 1987.— Т. 3, № 5.— С. 624—626.
3. Чехонин В. П., Щербаков В. М., Морозов Г. В., Морковкин В. М. // Нейрохимия.— 1988.— № 3.— С. 440—445.
4. Allen S. S., Dawbarn D., Wilcock O. K. // Brain Res.— 1987.— Vol. 454.— P. 275—281.
5. Bradbury M. The Conception of a Blood-brain Barrier.— New York; Blisbain; Toronto, 1979.
6. Hebrichsen M. et al. // J. Neurochem.— 1985.— Vol. 44.— P. 560—566.
7. Mokuno K., Kato K., Kawai K. et al. // J. neurol. Sci.— 1983.— Vol. 60.— P. 443—454.
8. Selkol D. G. et al. // J. Neurochem.— 1986.— Vol. 46.— P. 1820—1834.
9. Takayasy M., Shibuya M., Kanamory M. et al. // J. Neurosurg.— 1985.— Vol. 63.— P. 417—420.
10. Volodin I. N., Chekhonin V. P., Tabolin V. A. et al. // J. Neuropath.— 1989.— Vol. 3.— P. 10—14.
11. Warecka K. // Scand. J. Immunol.— 1982.— Vol. 15, Suppl. 9.— P. 279—292.

Поступила 21.04.92

#### PROTECTIVE RESPONSE OF BRAIN CELLS TO ALTERATIONS IN HEMATOENCEPHALIC BARRIER PERMEABILITY.

A. P. Khokhlov, I. G. Fetisova, A. M. Podlesny, V. P. Chekhonin, V. K. Malakhovskiy

I. M. Sechenov Medical Academy, V. P. Serbsky Institute of Forensic Psychiatry, Moscow.

General anesthesia carried out in neurosurgical operations caused liberation of neurospecific proteins into blood. High content of these antigens was maintained in biological fluids within 7 days, which occurred apparently due to activation of biosynthesis. Antibodies to the antigens were detected only within 21 days after the surgical intervention. A gross liberation of specific proteins into blood, occurring under critical conditions, appears to be a protective response of brain cells to autoimmune impairments.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.633:615.356]-053.3-07

В. М. Коденцова, О. А. Вржесинская,  
С. Н. Денисова, А. А. Сокольников, Н. А. Бекетова,  
В. А. Исаева, О. К. Нетребенко, В. Б. Спиричев

#### НОРМЫ ЧАСОВОЙ ЭКСКРЕЦИИ С МОЧОЙ ВИТАМИНОВ ГРУППЫ В ДЛЯ ДЕТЕЙ 9—13 ЛЕТ

Институт питания РАМН, Москва

В качестве параметров, отражающих обеспеченность организма витаминами, определяют их содержание в крови, экскрецию с мочой, а также активность ферментов, зависящих от коферментных форм витаминов. Для массовых исследований более удобно, доступно и менее трудоемко определение экскреции витаминов и их метаболитов с мочой. В зарубежных исследованиях для этих целей обычно пользуются величиной суточной экскреции, в отечественных — наряду с суточной определяют часовую экскрецию. Обоснованность использования последней величины нуждается в подтверждении. Поэтому одной из задач исследования явилось установление корреляционной связи между часовой экскрецией витаминов и их метаболитов и содержанием их в крови или (в случае тиамин) величиной ТДФ-эффекта для взрослых и детей 9—13 лет.

Существенным препятствием для использования величин часовой экскреции при оценке витаминной обеспеченности детей является отсутствие общепринятых критериев нормальных величин этих показателей для детей разного возраста. Применение же с этой целью соответствующих критериев, принятых для взрослых, по-видимому, недопустимо в связи с существенными возрастными различиями в потребностях, уровне потребления и степени утилизации витаминов у детей и взрослых. Сведения о суточной экскреции витаминов у детей разного возраста, обнаруженные нами в литературе, носят фрагментарный характер [8, 9, 11], имеются единичные данные о нормах часовой экскреции [8]. Вместе с тем многочисленные работы свидетельствуют о том, что концентрации витаминов группы В в крови не зависят от пола и возраста людей и для детей 1—16 лет не отличаются от соответствующих показателей для взрослых [12—14, 18]. В связи с этим одной из задач работы было определение величин часовой экскреции с мочой рибофлавина, тиамин, 4-пиридоксильной кислоты (4-ПК) и 1-метилникотинамида (1-МНА), характерных для нормальной обеспеченности этими витаминами детей 9—13 лет. С этой целью были исследованы зависимости

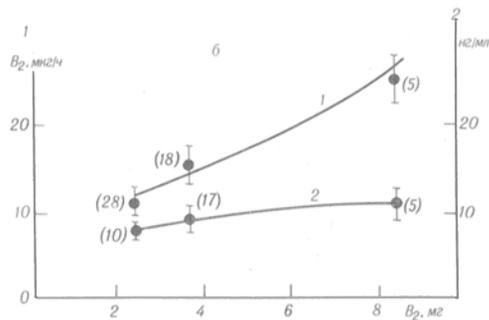
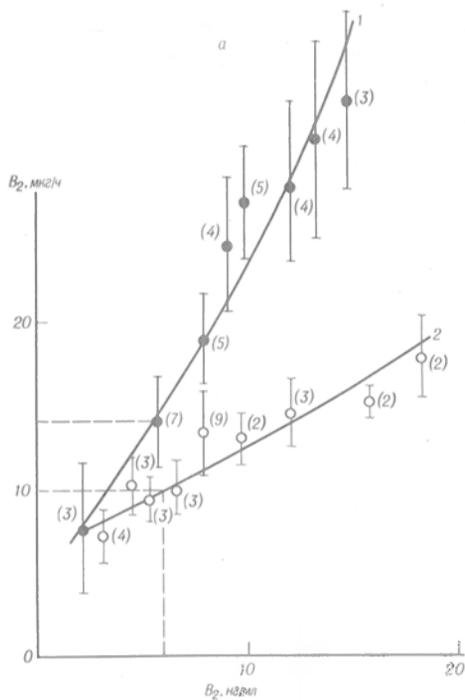


Рис. 1. Зависимость между показателями обеспеченности организма витамином  $B_2$ .

а — зависимость часовой экскреции рибофлавина (в мкг/ч) от его концентрации в плазме (в нг/мл) для взрослых (1) и детей (2); б — зависимость экскреции с мочой (в мкг/ч, кривая 1) и концентрации в плазме (в нг/мл, кривая 2) от содержания рибофлавина (в мг) в рационе детей.

На рис. 1—4 в скобках рядом с точкой указано количество обследованных.

между содержанием этих витаминов в крови и часовой экскрецией их с мочой, а также между уровнем потребления этих витаминов с пищей, концентрацией их в крови и часовой экскрецией.

**Методика.** Исследование витаминной обеспеченности было проведено у 31 здорового ребенка обоего пола в возрасте 9—13 лет и 35 взрослых обоего пола. Первое обследование детей было проведено в октябре. Второе обследование тех же детей проводили через 3 нед ежедневного приема 2 таблеток (1 красной и 1 синей) поливитаминного препарата «Дуовит» фирмы КРКА (Словения) (1-я группа, 18 человек) или 3 драже в день отечественного поливитаминного препарата «Ундевит» (2-я группа, 9 детей). Содержание витаминов в рационе рассчитывали с использованием таблиц химического состава продуктов с учетом потерь при тепловой обработке [10]. Фоновый рацион обеспечивал поступление 1,75 мг витамина  $B_1$ , 2,51 мг  $B_2$ , 2 мг  $B_6$  и 24,15 мг ниацина в сутки. С учетом этих величин и содержания

витаминов в принимаемых препаратах дети 1-й группы получали в сутки 2,75 мг витамина  $B_1$ , 3,71 мг  $B_2$ , 4 мг  $B_6$  и 37,15 мг ниацина, дети 2-й группы — 9,49, 8,51, 5,0 и 84,15 мг соответственно.

Обеспеченность витаминами оценивали по их экскреции с мочой, собранной за 1 ч натощак, и концентрации этих витаминов в плазме.

Рибофлавин в моче и в плазме крови определяли титрованием рибофлавинсвязывающим апопротеином [2, 4], 4-ПК — с помощью ВЭЖХ [15], 1-МНА — флюориметрическим методом [17], тиамин — тиохромным методом [6]. Концентрацию никотинамидных коферментов в эритроцитах измеряли флюоресцентным методом [6], пиридоксальных коферментов — методом ВЭЖХ [20]. Во всех флюоресцентных методах использовали соответствующий внутренний стандарт. Интенсивность флюоресценции измеряли на спектрофлюориметре «Perkin Elmer MPF-43A».

Активность транскетолазы эритроцитов и вели-

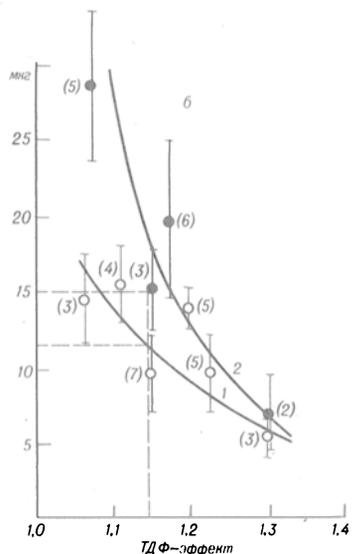
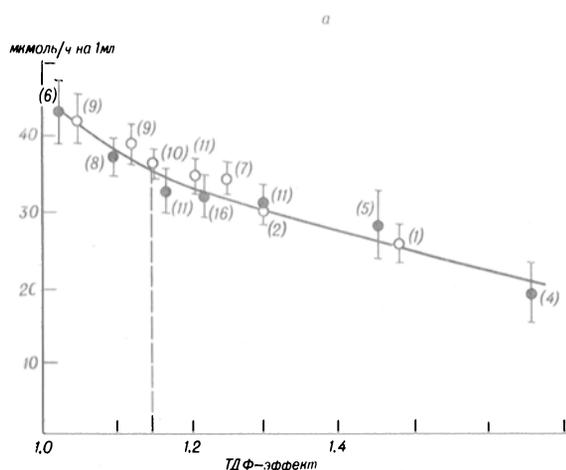
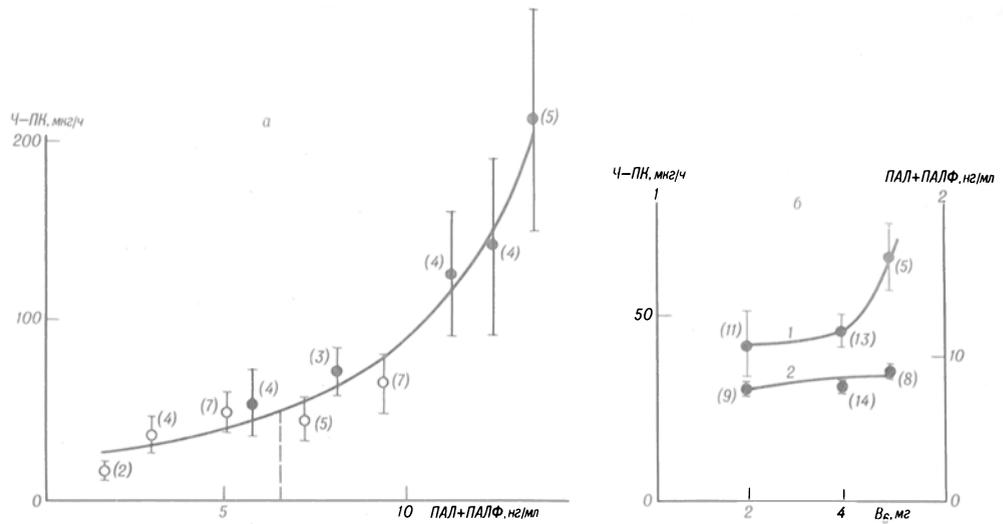


Рис. 2. Зависимость между показателями обеспеченности витамином  $B_1$ .

а — зависимость между активностью транскетолазы (в мкмоль/ч на 1 мл эритроцитов) и величиной ТДФ-эффекта; б — между величиной ТДФ-эффекта и экскрецией тиамина с мочой (в мкг/ч) для детей (1) и взрослых (2).

Рис. 3. Зависимость между показателями обеспеченности витамином В<sub>6</sub>.

а — зависимость часовой экскреции 4-ПК (в мкг/ч) от концентрации ПАЛ+ПАЛФ (в нг/мл) в плазме крови для детей (светлые символы) и взрослых (темные символы); б — зависимость экскреции с мочой 4-ПК (1) и концентрации ПАЛ+ПАЛФ в плазме (2) от содержания витамина В<sub>6</sub> (в мг) в рационе детей.



чину ТДФ-эффекта в качестве показателей обеспеченности обследуемых тиаминном определяли после предварительной инактивации трансальдолазы [19].

Коэффициент ранговой корреляции между содержанием витаминов в крови и экскрецией их с мочой рассчитывали по Спирмену [3].

Результаты и обсуждение. Ранее нами было показано [1], что дефицит рибофлавина в рационе крыс даже при нормальном содержании в нем пиридоксина и никотиновой кислоты сопровождается существенным (на 50—75 %) снижением экскреции с мочой 4-ПК и 1-МНА. Недостаточность витамина В<sub>6</sub> при нормальном содержании в пище никотиновой кислоты также приводит к снижению выделения 1-МНА. Это обусловлено участием витамина В<sub>2</sub> и ПАЛФ-зависимых ферментов в метаболизме пиридоксина и синтезе никотинамидных коферментов из триптофана. Аналогичное снижение экскреции 4-ПК и 1-МНА с мочой в результате недостаточности рибофлавина было обнаружено у людей. С учетом этого при установлении норм экскреции с мочой 4-ПК принимались во внимание только показатели людей, адекватно обеспеченных витамином В<sub>2</sub> (концентрация рибофлавина в плазме более 5 нг/мл), а 1-МНА — показатели людей с нормальной обеспеченностью витаминами В<sub>2</sub> и В<sub>6</sub> (экскреция 4-ПК выше 40 мкг/ч).

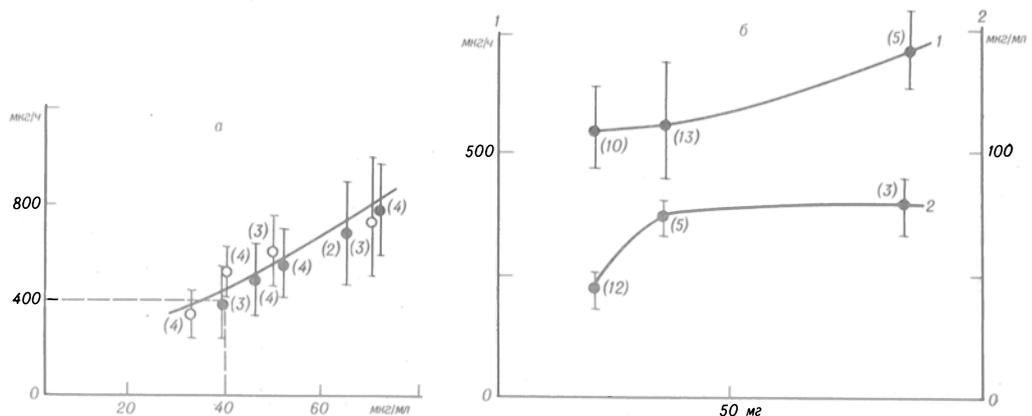
Для анализа полученных данных был использован следующий подход, примененный в работе [16]. Близкие по величине значения (концент-

рация рибофлавина в плазме, ТДФ-эффект и т. д.) объединяли в группы и для каждой образовавшейся группы рассчитывали среднее значение экскреции соответствующего витамина или его метаболита. Полученные результаты для взрослых и детей представлены на рис. 1—4. Как следует из рисунков, обнаружена четкая взаимозависимость между всеми исследованными параметрами. Во всех случаях имеет место монотонное нелинейное изменение линии регрессии. В таких случаях для оценки корреляции между двумя параметрами используют коэффициент ранговой корреляции Спирмена [3]. Величины этих коэффициентов представлены в таблице, из которой видно, что как для взрослых, так и для детей обнаруживается выраженная взаимозависимость между концентрацией витаминов в крови и их часовой экскрецией с мочой. Это доказывает возможность использования часовой экскреции витаминов в качестве показателей обеспеченности витаминами группы В.

Принимая во внимание, что концентрация рибофлавина в плазме, соответствующая нормальной обеспеченности как для взрослых, так и для детей, превышает 5 нг/мл (см. рис. 1, а), можно считать, что часовая экскреция этого витамина с мочой для взрослых равна 14 мкг, что согласуется с данными литературы [5, 6]. Для детей эта величина несколько ниже и составляет 10 мкг/ч. Дальнейшее подтверждение этой величины было получено при исследовании зависимости экскреции с мочой и концентрации рибофлавина в плазме

Рис. 4. Зависимость между показателями обеспеченности ниацином.

а — зависимость экскреции 1-МНА с мочой (в мкг/ч) от концентрации НАД+НАДФ (в мкг/мл эритроцитов) для детей (светлые символы) и взрослых (темные символы); б — зависимость экскреции 1-МНА (1) и концентрации НАД+НАДФ (2) от содержания в рационе детей ниацина (в мг).



**Коэффициенты корреляции между показателями обеспеченности витаминами группы В**

Исследуемая зависимость	$r$	$n$	$p$
Рибофлавин в плазме — экскреция рибофлавина с мочой:			
взрослые	0,603	35	$\leq 0,01$
дети	0,603	31	$\leq 0,01$
ТДФ-эффект — экскреция тиамин с мочой:			
взрослые	-0,529	23	$\leq 0,01$
дети	-0,332	22	$\leq 0,05$
ТДФ-эффект — активность транскетолазы:			
взрослые	-0,632	60	$\leq 0,01$
дети	-0,368	49	$\leq 0,01$
ПАЛ+ПАЛФ в плазме — экскреция 4-ПК с мочой:			
взрослые	0,511	20	$\leq 0,01$
дети	0,469	25	$\leq 0,01$
НАД+НАДФ в эритроцитах — экскреция 1-МНА с мочой:			
взрослые	0,404	17	$\leq 0,05$
дети	0,420	14	$\leq 0,05$

от его содержания в рационе. При потреблении 2,51 мг рибофлавина в день (рекомендуемое суточное потребление 1,9 мг) концентрация рибофлавина в плазме превосходит нижнюю границу нормы и составляет  $8,1 \pm 1,3$  нг/мл, при этом величина часовой экскреции равна  $11,2 \pm 1,6$  мкг. Потребление 8,51 мг рибофлавина приводит к увеличению концентрации свободного рибофлавина в плазме лишь на 30 %, при этом его экскреция увеличивается более чем в 2 раза. Таким образом, в качестве величины часовой экскреции, соответствующей нормальной обеспеченности рибофлавином, для детей 9—13 лет следует принять 10—11 мкг/ч.

Активность транскетолазы эритроцитов и величины ТДФ-эффекта отражают насыщенность транскетолазы коферментом *in vivo* и служат функциональным тестом обеспеченности организма тиамин [19]. В соответствии с представленными на рис. 2, а данными зависимости между активностью транскетолазы и величиной ТДФ-эффекта для детей и взрослых полностью совпадают. При нормальной обеспеченности организма витамином В<sub>1</sub> (ТДФ-эффект  $\geq 1,15$ ) активность транскетолазы, измеренная после предварительной инактивации трансальдолазы, превышает 35 мкмоль/ч на 1 мл эритроцитов. Как следует из рис. 2, б, для взрослых величине ТДФ-эффекта  $\geq 1,15$  соответствует выделение более 15 мкг тиамин за 1 ч натошак, что совпадает с величинами, принятыми в литературе для нормальной обеспеченности организма тиамин [6]. У детей 9—13 лет часовая экскреция тиамин, соответствующая адекватной обеспеченности организма этим витамином (ТДФ-эффект  $\geq 1,15$ ), составляет 11—12 мкг/ч.

Рекомендуемое суточное потребление витаминов В<sub>1</sub> и В<sub>2</sub> для детей данного возраста составляет 75—85 % от величины рекомендуемого потребления для взрослых [7]. Установленные нормы экскреции тиамин и рибофлавин для детей 9—13 лет составляют 70—80 % от величин для взрослых людей. Таким образом, обнаруживается определенная пропорциональность между величинами

эксcreции и рекомендуемым потреблением. Это служит дополнительным аргументом в пользу принятия в качестве норм указанных выше величин экскреции тиамин и рибофлавин.

Исследование зависимости экскреции 4-ПК и 1-МНА от концентрации в крови ПАЛ+ПАЛФ и НАД+НАДФ (см. рис. 3, а и 4, а) показало полное совпадение кривых зависимости для детей и взрослых, что свидетельствует о том, что величины экскреции метаболитов этих витаминов, соответствующие нормальной обеспеченности, для детей этого возраста и взрослых не различаются. Этот вывод получил подтверждение и при исследовании зависимости концентрации коферментных форм этих витаминов в крови и экскреции их метаболитов с мочой от содержания витамина В<sub>6</sub> и ниацина в рационе (см. рис. 3, б и 4, б). Нормальному содержанию ПАЛ+ПАЛФ в плазме ( $7,9 \pm 1,2$  нг/мл) и НАД+НАДФ в эритроцитах ( $44,4 \pm 3,3$  мкг/мл) соответствует выделение соответственно  $42 \pm 9,1$  4-ПК и  $547 \pm 115$  мкг/ч 1-МНА. Увеличение в рационе витамина В<sub>6</sub> в 1,5 и ниацина в 3,5 раза по сравнению с рекомендуемым потреблением приводит к повышению уровня ПАЛ+ПАЛФ на 10 % при увеличении экскреции 4-ПК в 1,6 раза (см. рис. 3, б), уровня НАД+НАДФ в 1,6 раза при увеличении экскреции в 1,3 раза (см. 4, б). Однако поскольку в случае ниацина 1-МНА не является единственным продуктом метаболизма, то возможно, что при этом увеличивается и экскреция пиридонов. Таким образом, для детей 9—13 лет нормы часовой экскреции 4-ПК и 1-МНА совпадают с величинами для взрослых.

В целом, полученные данные свидетельствуют о том, что часовая экскреция витаминов группы В и их метаболитов коррелирует с их содержанием в крови и в рационе как взрослых, так и детей и может быть использована в качестве критерия обеспеченности витаминами В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>6</sub> и ниацином. Величины, соответствующие нормальной обеспеченности этими витаминами, для детей 9—13 лет равны 10—11 мкг/ч для рибофлавин, 11—12 мкг/ч для тиамин, более 40 мкг/ч для 4-ПК и 400-600 мкг/ч для 1-МНА.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Алексеева И. А., Коденцова В. М., Вржесинская О. А. и др. // Эстонская респ. науч. конф. «Питание и здоровье»: Материалы.— Таллинн. 1991.— Т. 1.— С. 13—15.
2. Вржесинская О. А., Коденцова В. М., Рысик В. В., Спиричев В. Б. // Вопр. питания.— 1991.— № 4.— С. 67—72.
3. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях.— Л., 1973.
4. Коденцова В. М., Алексеева И. А., Сокольников А. А. и др. // Вопр. питания.— 1991.— № 3.— С. 59—64.
5. Коденцова В. М., Вржесинская О. А., Алексеева И. А., Спиричев В. Б. // Вопр. мед. химии.— 1991.— № 5.— С. 76—79.
6. Методы оценки витаминной обеспеченности населения.— М., 1987.
7. Нормы физиологических потребностей в пищевых веществах и энергии для различных групп населения СССР.— М., 1991.
8. Потребность человека в витаминах / Под ред. М. И. Смирнова.— М., 1966.— С. 270.
9. Пятницкая И. Н., Богданов Н. Г. // Теоретические и клинические аспекты науки о питании.— М., 1985.— Т. 6.— С. 121—131.
10. Химический состав пищевых продуктов.— М., 1987.
11. Хмелевский Ю. В., Усатенко О. К. Основные биохими-

- ческие константы человека в норме и при патологии.— Киев, 1987.
12. *Bamji M. S., Bhaskaram P., Jacob C. M.* // *Ann. Nutr. Metab.*— 1987.— Vol. 31, N 3.— P. 191—196.
  13. *Donald E. A.* // *Vitamin W<sub>6</sub> Pyridoxal Phosphate: Chemical Biochemical and Medical Aspects.*— New York, 1986.— Pt B.— P. 477—505.
  14. Editorial // *Pediatr. pat.*— 1974.— Vol. 9.— P. 301—309.
  15. *Gregory Y. F., Kirk J. R.* // *Amer. J. clin. Nutr.*— 1979.— Vol. 32.— P. 879—883.
  16. *Horwitt M. K.* // *Ibid.*— 1986.— Vol. 44.— P. 973—986.
  17. *Huff J. W., Perlzweig W. A.* // *J. biol. Chem.*— 1947.— Vol. 167.— P. 157—167.
  18. *Sancar D. V. S.* // *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*— 1978.— Vol. 48.— P. 140—144.
  19. *Takeuchi T., Nishino K., Itokawa Y.* // *Clin. Chem.*— 1984.— Vol. 30.— P. 658—661.
  20. *Ubbink J. B., Serfontein W. J., De Villiers L. S.* // *J. Chromatogr.*— 1986.— Vol. 375.— P. 399—404.

Поступила 28.01.92

#### HOURLY EXCRETION OF VITAMINS B WITH URINE IN CHILDREN OF 9-13 YEARS UNDER NORMAL CONDITIONS.

*V. M. Kodentsova, O. A. Vrzhesinskaya, S. N. Denisova, A. A. Sokolnikov, N. A. Beketova, V. A. Isaeva, O. K. Netrebenko, V. B. Spirichev*

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

Values of hour excretion of vitamins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> and PP with urine in children of 9-13 years, studied under conditions of normal consumption of these vitamins, were estimated considering the correlation between the vitamins B concentration in blood and excretion of their metabolites with urine as well as using these parameters dependence on content of the vitamins in daily ration; for this purpose 35 adult persons and 31 children of both sexes were examined. Normal rate of riboflavin excretion with urine constituted 10-11 µg/h in children of this age, while of thiamine—11-12 µg/h. Under conditions of normal thiamine consumption, activity of erythrocyte transketolase, measured after preinactivation of transaldolase, exceeded 35 µmol/h/1 ml of erythrocytes. Rates of excretion with urine of 4-pyridoxic acid and 1-methyl nicotinamide were similar both in children and in adult persons and were equal to more than 40 µg/h and 400-600 µg/h, respectively.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.127-008.939.6-07

*М. Н. Цветкова, Л. И. Ковалев, С. С. Шишкин*

#### ИЗУЧЕНИЕ АУТОЛИТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ БЕЛКОВ МИОКАРДА ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ДВУХМЕРНОГО ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА

Медико-генетический научный центр РАМН, Москва

Использование биопсийных и аутопсийных образцов тканей человека — один из основных подходов к изучению различных проблем медицинской химии. Роль этого подхода значительно выросла с появлением высококоразрешающего двухмерного электрофореза по О'Фарреллу, позволяющего в ходе одного цикла анализа разделять многокомпонентный белковый экстракт (например, полный лизат образца ткани) на тысячи фракций, большинство из которых представлено индивидуальными полипептидными цепями [1, 3, 6, 9]. Развитие указанной технологии и комплекса сопутствующих методов открыло возможность создания новой номенклатуры и обширных компьютерных каталогов белков человека [8, 10, 11]. Однако на пути к достижению таких целей имеется целый ряд препятствий, в частности необ-

ходимость учитывать возможный вклад аутолитических изменений белков при интерпретации результатов фракционирования.

Естественно, что исследования аутолитической деградации белков в различных тканях человека имеют и специальное значение, в частности для развития представлений о механизмах катаболических процессов, для решения отдельных биохимических аспектов трансплантологии и биотехнологии. До настоящего времени сравнительно небольшое число работ по изучению аутолитических изменений в образцах тканей человека выполнялось с использованием двухмерного электрофореза [2, 6]. Вместе с тем поиски белковых фракций, изменения которых могли бы оцениваться как признаки аутолитической деградации, представляются важным этапом в исследованиях нормального «белкового портрета» изучаемой ткани, а также различных его модификаций при патологии.

В представленной работе приведены результаты изучения двухмерным электрофорезом изменений белков миокарда человека в посмертном периоде на основе использования ранее построенной двухмерной карты [6]. Аутолитические изменения параллельно анализировались в образцах ткани взрослых лиц и в образцах эмбриональной ткани.

**Методика.** Объектом исследований явились образцы миокарда левого желудочка взрослого человека и плода сроком 27 нед с посмертным периодом не более 3 ч, не имевших признаков сердечно-сосудистой патологии. Исследуемые образцы хранили при комнатной температуре (22 °С) в течение 1, 2 и 3 сут в стерильных чашках Петри под закрытой крышкой, а затем замораживали при —20 °С до проведения электрофоретического анализа. Приготовление лизатов сердца, фракционирование методом двухмерного электрофореза по О'Фарреллу с некоторыми модификациями, окраску гелей кумасси R-250 проводили, как описано ранее [6, 14].

**Результаты и обсуждение.** По имеющимся данным литературы, различные типы мышечной ткани характеризуются сравнительно медленным развитием аутолитических процессов [5, 7]. В предыдущей работе нами было показано, что за 8 ч посмертного периода в образцах сердечной мышцы человека при электрофоретическом анализе обнаруживаются лишь незначительные изменения в распределении белковых фракций [6]. При более длительных сроках хранения удалось выявить ряд закономерно появляющихся и уверенно детектируемых признаков аутолитической деградации по результатам изучения мышечных белков. Вместе с тем общая картина расположения белковых фракций на двухмерных электрофореграммах, включающая ряд высокомолекулярных компонентов, сохранялась даже через 3 сут аутолиза. На рис. 1 в качестве примера приведены контрольные электрофореграммы, на которых обозначены некоторые фракции в соответствии с их расположением на двухмерной карте (по 6) и выделены три зоны, где наблюдались характерные аутолитические изменения. Динамика аутолитического процесса для сердечной мышцы взрослого человека по отмеченным зонам электрофореграмм представлена на

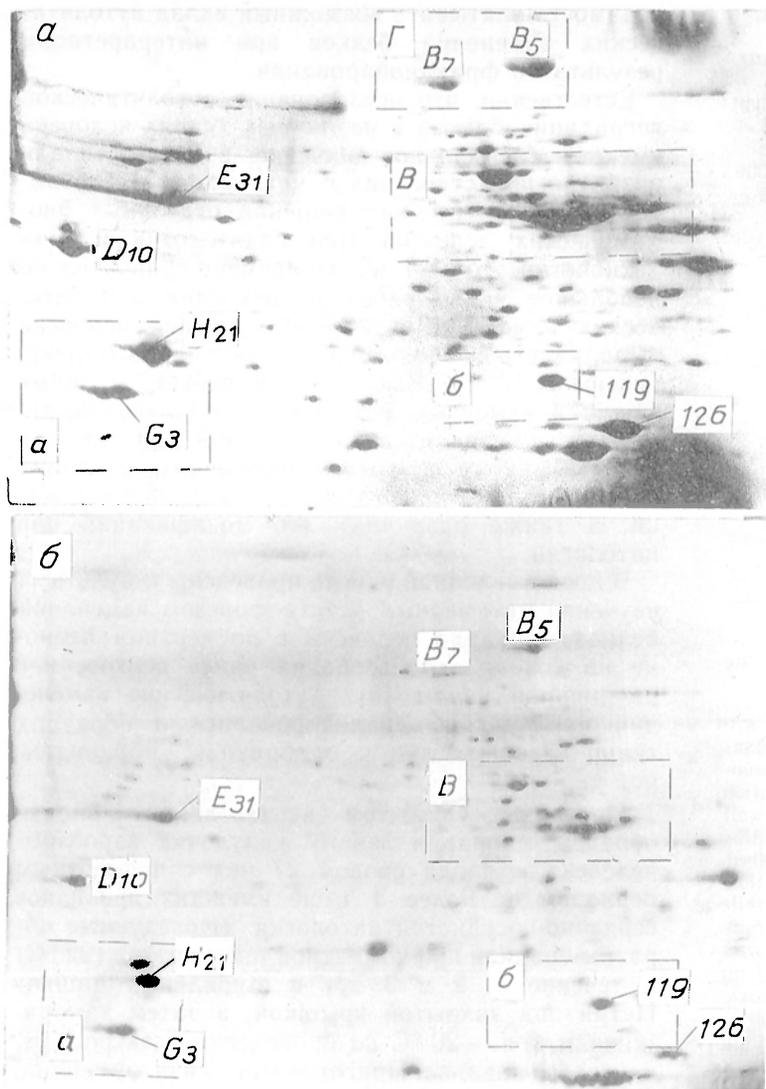


Рис. 1. Обзорная электрофореграмма белков миокарда левого желудочка взрослого (А) и плода 27 нед (Б).

Обозначения белковых пятен даны в соответствии с построеной ранее двухмерной картой [6]. Квадратами выделены анализируемые зоны: а — легкие цепи миозина, б — область 119, в — область мышечных ферментов, г — область В5-В7.

рис. 2. В частности, было найдено, что в зоне а рядом с идентифицированными ранее фракциями легких цепей миозина сердечной мышцы (MLC1 — номер на карте Н21 и MLC2 — G3) [3, 6] через 1 сут хранения появляются следы трех дополнительных фракций (Мм 22 кД, ОЭП 0,17; Мм 19,5 кД, ОЭП 0,15; Мм 18 кД, ОЭП 0,25). Ко 2-м суткам хранения наблюдалось резкое увеличение их представленности, а к завершению 3-го дня аутолиза представленность дополнительных фракций заметно снижалась по сравнению с малоизменявшейся фракцией Н21, выполнявшей роль реперной точки в зоне а. Особенно это касалось дополнительной фракции с Мм 18 кД и ОЭП 0,25, которая на 3-и сутки хранения практически исчезала.

В зоне б яркие изменения происходили уже через 1 сут хранения. Около фракции 119 выявлялось два дополнительных пятна (рис. 2, б). Представленность этих фракций возрастала к 2-м суткам хранения и сохранялась примерно на том же уровне через 3 сут. Фракция 119 за указанный период практически не изменялась. Зона в, по данным ряда авторов, содержит некоторые мышечные ферменты — пируваткиназу, креатинкиназу и др. [11, 13]. Здесь, как видно из рис. 2, в, тоже происходят определенные изменения, касающиеся, однако, в основном минорных фракций.

Приведенные на рис. 2, г данные свидетельствуют об относительной сохранности за 3 сут хранения высокомолекулярных фракций В5 и В7. Известно, что интенсивность катаболических процессов в различных тканях на разных стадиях онтогенеза может существенно изменяться. Соответственно параллельно с изучением аутолитического процесса в миокарде взрослых нам казалось важным проанализировать ход аналогичного процесса в миокарде плодов сроком 26—27 нед развития, поскольку образцы этих тканей используются для изучения патогенеза врожденной патологии сердечной мышцы. Полученные результаты представлены на рис. 3. В целом у плодов для трех выделенных зон аутолитические изменения были сходны с описанными выше результатами, полученными при изучении миокарда взрослых. Однако наблюдались и некоторые отличия.

В зоне а дополнительные фракции, характерные для аутолиза, детектировались только на 3-и сутки, но уменьшение представленности фракции G3, так же как и у взрослых, становилось заметным после 2 сут хранения. Надо отметить, что присутствующая во II триместре беременности эмбриональная желудочковая легкая цепь миозина (MLC1emb/A) оказалась весьма стабильной, подобно MLC1v/s (фракция Н21) (см. рис. 2, а и 3, а). Дополнительные фракции

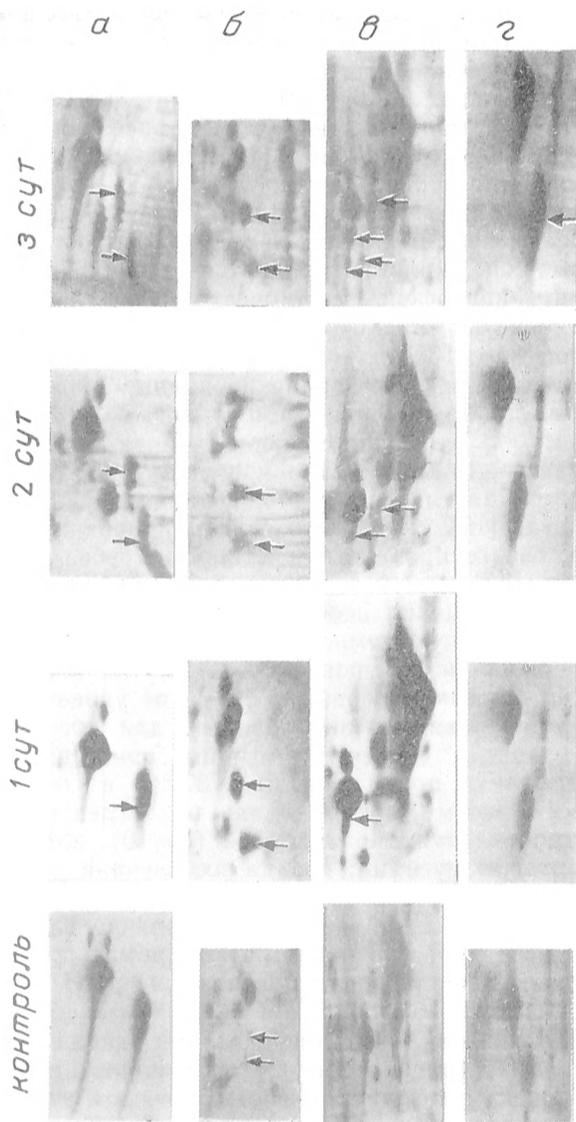


Рис. 2. Фрагменты обзорной электрофорограммы белков миокарда левого желудочка взрослого, в которых обнаружены изменения по срокам аутолиза.

Обозначения те же, что на рис. 1. Стрелками обозначены пятна белков, проявляющие выраженные количественные изменения.

в зоне б появлялись в эмбриональной мышце, как и в мышце взрослых, в 1-е сутки хранения. Через 3 сут представленность этих дополнительных фракций несколько уменьшалась.

У эмбрионов в зоне в отмечались более выраженные, чем у взрослых, аутолитические изменения. Таким образом, по-видимому, нельзя считать, что аутолитическая деградация белка идет более интенсивно в эмбриональной мышце, но, очевидно, этот процесс имеет некоторые особенности по сравнению с процессом в миокарде взрослого человека.

Темпы аутолитической деградации белков миокарда оказались более высокими, чем в скелетных мышцах, где, по данным С. В. Лисаковского и соавт. [4], признаки протеолиза выявляются после 4 сут хранения. Вместе с тем в обоих объектах процесс, захватывающий различные сократительные белки, имел сходные черты.

Полученные результаты позволяют считать обнаруженные изменения белков в зонах а и б характерными маркерами аутолитической деградации в образцах миокарда человека. Они могут

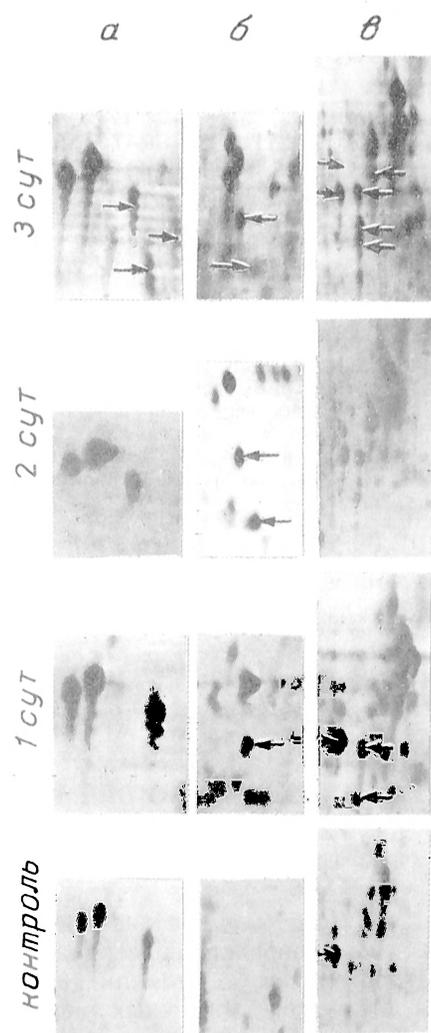


Рис. 3. Фрагменты обзорной электрофорограммы белков миокарда левого желудочка плода 27 нед.

Обозначения те же, что на рис. 1. Стрелками обозначены меняющиеся фракции.

быть использованы для оценки состояния биоптатов и аутоптатов при изучении белков миокарда человека.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Громов П. С., Захаров С. Ф., Шишкин С. С. и др. // Биохимия.— 1988.— Т. 53.— С. 1316—1326.
2. Громов П. С., Захаров С. Ф., Гачиньска М. и др. // Бюл. экпер. биол.— 1988.— № 9.— С. 292—296.
3. Ковалев Л. И., Пуляева Е. В., Шишкин С. С. и др. // Молекул. генетика.— 1988.— № 8.— С. 28—32.
4. Лисаковский С. В., Володина Т. В., Козельцев В. Л. // Вопр. мед. химии.— 1988.— Вып. 6.— С. 117—122.
5. Лушников Е. Ф., Шапиро Н. А. // Аутолиз.— М., 1974.
6. Пуляева Е. В., Ковалев Л. И., Цветкова М. Н. и др. // Биохимия.— 1990.— Вып. 3.— С. 489—498.
7. Ребров Л. Б., Козельцев В. Л., Шишкин С. С. и др. // Вестн. АМН СССР.— 1983.— № 10.— С. 82—89.
8. Шишкин С. С. // Вопр. мед. химии.— 1989.— № 6.— С. 2—14.
9. Anderson N. L., Anderson N. G. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1977.— Vol. 74.— P. 5421—5425.
10. Celis J. E., Heffers H., Rasmussen H. H. et al. // Electrophoresis.— 1991.— Vol. 12, N 11.— P. 765—801.
11. Krauss M. R., Collins P. J., Blose S. H. // Nature.— 1989.— Vol. 337, N 6208.— P. 669—670.
12. Nakamura M., Imai H., Hirabayashi T. // Develop. Biol.— 1989.— Vol. 142, N 2.— P. 389—397.
13. Oh-Ishi M., Hirabayashi T. // Comp. Biochem. Physiol.— 1989.— Vol. 92B, N 4.— P. 609—617.

ESTIMATION OF AUTOLYTIC ALTERATIONS IN HUMAN MYOCARDIAL PROTEINS BY MEANS OF TWO-DIMENSIONAL ELECTROPHORESIS.

M. N. Tsvetkova, L. I. Kovalev, S. S. Shishkin

Medical Genetic Research Centre, Academy of Medical Sciences of the Russian Federation, Moscow.

Alterations of myocardial proteins were studied in the left ventricular tissue of adult persons and fetuses during natural autolysis. The most pronounced alterations were observed in proteins from regions of myosin light chains, region 119 and the region of muscle enzymes. When autolysis was studied in the myocardium and skeletal muscle, proteolytic alterations were observed in skeletal muscles later.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.127-005.4-008.939.15-07-02

Г. А. Бояринов, Н. Н. Андреева, И. В. Мухина

**ВЛИЯНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ ГУТИМИНА В ПРЕДЫШЕМИЧЕСКОМ ПЕРИОДЕ НА ФОСФОЛИПИДЫ МИОКАРДА ВО ВРЕМЯ РЕПЕРФУЗИИ**

ЦНИЛ Нижегородского медицинского института

В последние годы большое значение в развитии необратимых повреждений сердца придается прогрессирующим после ишемии нарушениям функций и структуры клеточных мембран [3]. В первую очередь эти изменения касаются фосфолипидов [1, 13]. По мнению ряда авторов [8, 17], одним из ответов клетки на изменения условий функционирования является адаптационная реакция мембран, которая проявляется в перегруппировке жирнокислотного состава мембранных липидов. В работе, выполненной нами ранее, была установлена направленность этих изменений в кардиомиоцитах в реперфузионном периоде после 90 мин гипотермической ишемии (8—12 °С).

Учитывая высокую вариабельность жирнокислотного состава, степени ненасыщенности фосфолипидов, их роль в адаптации клетки, а также имеющиеся сведения об эффективности однократного применения гутимиона в качестве компонента предишемической защиты миокарда при выключении сердца из кровообращения [4, 8], пред-

**Влияние превентивного применения гутимиона на соотношение групп жирных кислот (в %) в составе фосфолипидов миокарда в постишемическом периоде ( $M \pm m$ )**

Фракции	Постишемический период								
	Контроль			двукратное введение гут мина			трехкратное введение гутимиона		
	Н	М	П	Н	М	П	Н	М	П
ЛФХ	68,52±2,32	16,8±1,95	14,54±0,82	53,23±2,87*	23,86±0,67*	22,34±2,27	73,25±2,74	16,84±1,11	9,97±1,62*
ФС	69,47±1,66	14,12±1,0	16,84±1,64	48,89±3,12*	26,31±1,17*	24,27±1,73*	70,92±2,40	17,96±1,54	10,61±1,68*
СМ	69,44±1,76	15,33±1,30	14,64±1,46	57,91±4,95	20,61±2,34	21,08±2,57	76,12±2,06*	14,07±0,84	9,40±1,21
ФХ	73,36±3,52	12,55±1,24	13,57±1,62	78,35±3,34	3,72±1,01*	18,48±1,63	75,65±2,96	14,59±0,98	9,8±2,49
ФЭА	75,40±2,66	11,24±1,68	13,48±1,21	79,31±1,88	0,90±0,10*	20,25±2,04*	78,95±2,71	13,35±2,02	7,85±0,59*

Примечание. Н — насыщенные, М — моноеновые, П — полиеновые жирные кислоты. Звездочка — различия с контролем достоверны при  $p < 0,05$ .

ставлялось целесообразным изучить влияние двух- и трехкратного превентивного использования данного препарата на механизм формирования устойчивых защитно-приспособительных реакций кардиомиоцитов на уровне фосфолипидов, повышающих резистентность сердечной мышцы при ишемии и реперфузии.

**Методика.** Эксперименты выполнены на 30 белых крысах-самцах массой 200—220 г. Животных содержали на стандартном рационе, включающем картофель, хлеб, овес, морковь. Крысам в течение 2 ( $n=10$ ) и 3 ( $n=10$ ) дней в суточной дозе 100 мг/кг внутривнутрибрюшинно вводили гутимин. Затем у гепаринизированных животных под внутривнутрибрюшинным нембуталовым наркозом (25 мг/кг) извлекали сердце. Далее в опытах использовали модель изолированного сердца по методу Лангендорфа в модификации E. Fallen и соавт. [15]. Перфузию сердец проводили при 37 °С оксигенированным раствором Кребса—Хензелята. Тотальную ишемию создавали путем полного прекращения перфузии на 90 мин. Внутримиекардиальную температуру во время ишемии поддерживали на уровне 8—12 °С, так как, согласно данным литературы [9], этот уровень гипотермии является оптимальным для обеспечения защиты сердечной мышцы при ишемии. Реперфузию проводили при 37 °С в течение 90 мин, затем миокард брали на исследование. Контролем служили животные ( $n=10$ ), которым не вводили гутимин; сердца их изучали в аналогичных условиях.

Миокардиальные липиды экстрагировали по J. Folch [16]. Тонкослойную хроматографию фосфолипидов, получение метиловых эфиров жирных кислот фосфолипидов и их газохроматографический анализ проводили, как описано [2], на хроматографе «Цвет-162» с ионизационно-пламенным детектором в изотермическом режиме (температура термостата колонок 180 °С, температура испарителя 200 °С). Идентифицировали метиловые эфиры жирных кислот в пробах с помощью стандартов. Количественную оценку хроматограмм осуществляли по методу [12]. Содержание отдельных жирных кислот выражали в процентах от суммы, принятой за 100 %.

**Результаты и обсуждение.** Проведенное исследование показало, что в реперфузионном периоде после двукратного превентивного применения гутимиона в ряде фосфолипидов миокарда увеличилось содержание групп ненасыщенных жирных кислот по сравнению с контролем: в лизофосфатидилхолине (ЛФХ), фосфатидилсерине (ФС) относительное количе-



моноеновых кислот, а в ЛФХ и ФЭА повысилось относительное количество полиненасыщенных кислот.

Увеличение содержания групп моно- и полиеновых кислот и парциальной доли отдельных ненасыщенных жирных кислот в составе фосфолипидов, вероятно, является и результатом снижения интенсивности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в миокарде, которые, согласно данным литературы [1, 6], активизируются в реперфузионном периоде. Способность гутимина ингибировать реакции ПОЛ, окисляясь, принимая на себя часть супероксидных радикалов, показана в работах [4, 11]. Поэтому есть основания полагать, что двукратное применение антигипоксанта вызывает перераспределение состава жирных кислот фосфолипидов кардиомиоцитов еще в предишемическом периоде и в результате этого обеспечивает недоступность субстратов для ПОЛ при ишемии и в реперфузионном периоде. Перераспределение жирнокислотного состава фосфолипидов в данной серии по сравнению с контролем свидетельствует и о повышении текучести липидного компонента мембран, так как, согласно исследованиям [18], увеличение содержания насыщенных кислот и уменьшение ненасыщенных коррелирует с изменениями вязкости фос-

фолипидов. Снижение же вязкости фосфолипидов соответственно облегчает функционирование липидзависимых мембранных ферментов, образование сложных мультиферментных комплексов, реализацию явлений рецепции и проницаемости [1, 13]. Косвенным доказательством повышения активности мембранных ферментов могут служить работы [7, 14], в которых отмечалось повышение АТФазной активности в ткани миокарда даже при однократном применении гутимина перед выключением сердца из кровообращения. Снижение суммарного содержания моноеновых жирных кислот в ФХ и ФЭА и некоторых отдельных ненасыщенных кислот, очевидно, связано с реализацией сложного механизма регуляции текучести бислоя мембран, которые, согласно концепции Е. Крепса [8], являются «мишенью» адаптации.

Миристиновая, пентадекановая и пальмитиновая жирные кислоты, парциальная доля которых уменьшилась во время реперфузии в ФС, ФХ, СМ и ФЭА, вполне могут образовать пул СЖК и быть использованы миокардом в качестве энергетического субстрата. В работе [4] показано, что профилактическое однократное применение гутимина активирует поглощение миокардом после 60 мин ишемии в период восстановления сердечной деятельности в большей степени насы-

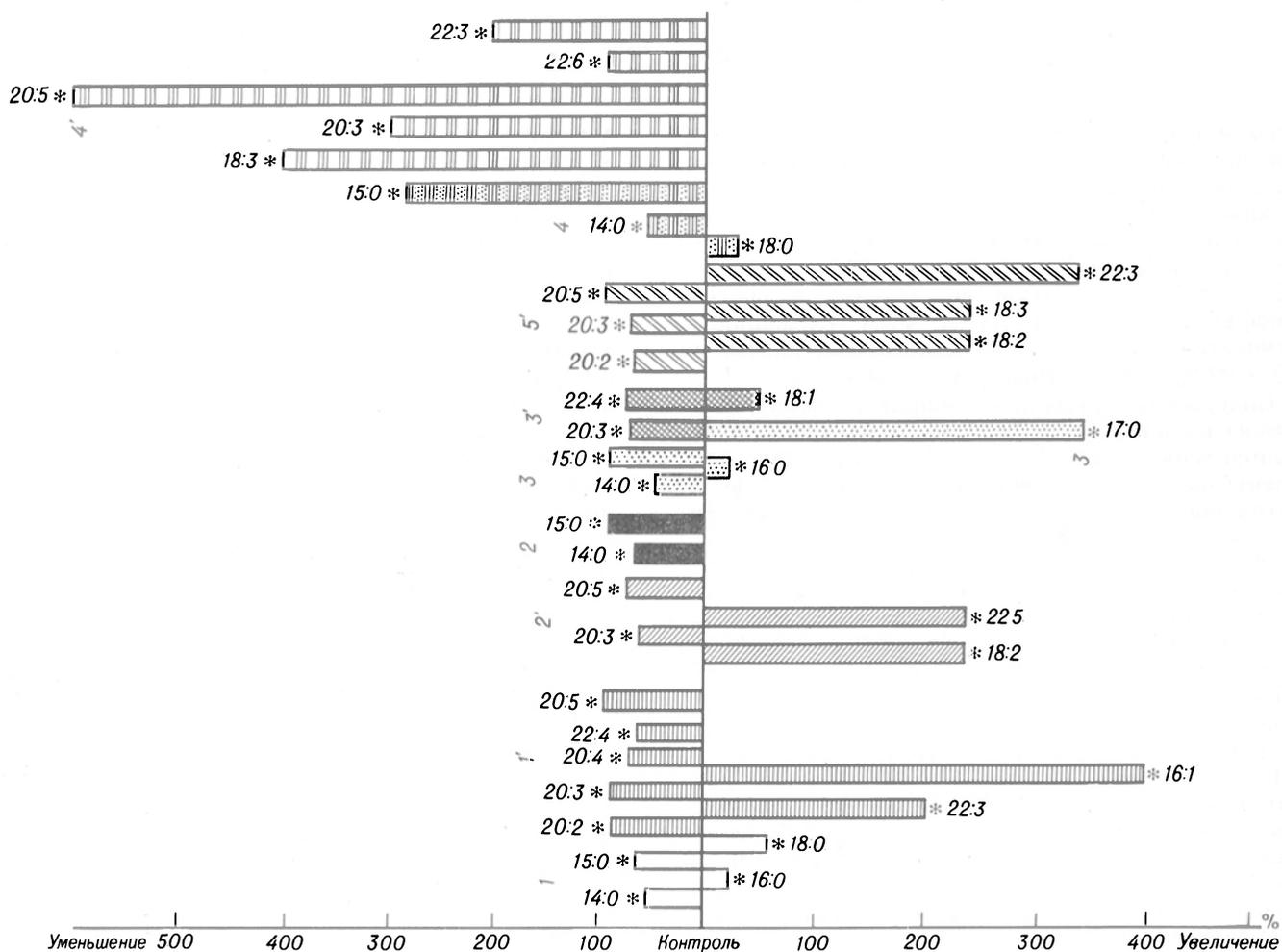


Рис. 2. Изменение содержания жирных кислот (в %) в составе фосфолипидов миокарда в реперфузионном периоде после трехкратного профилактического введения гутимина.

Насыщенные жирные кислоты: 1 — ЛФХ, 2 — ФС, 3 — СМ, 4 — ФЭА; ненасыщенные жирные кислоты: 1' — ЛФХ, 2' — ФС, 3' — СМ, 4' — ФЭА, 5' — ФХ.

щенных жирных кислот 14:0, 15:0 и 16:0. Отсутствие жирных кислот в перфузате при постановке нашего эксперимента не исключает использования в качестве энергетических субстратов эндогенных источников: жирных кислот, освободившихся в результате гидролиза фосфолипидов фосфолипазой A<sub>1</sub> (14:0, 15:0, 16:0).

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют, что двукратное превентивное применение гутимина уже в прединфарктном периоде вызывает перераспределение содержания жирных кислот в составе фосфолипидов миокарда, которое предупреждает повреждающее действие таких факторов, как процессы ПОЛ и деградация фосфолипидов, имеющих место во время и после ишемии при использовании только гипотермической защиты сердца во время выключения его из кровообращения.

Дальнейшее исследование показало, что в реперфузионном периоде после трехкратного превентивного применения гутимина и гипотермической защиты миокарда уменьшилось содержание группы полиеновых жирных кислот в ЛФХ на 31 % и в ФС, СМ и ФЭА в среднем на 39 % в каждой фракции. В СМ увеличилось относительное количество группы насыщенных кислот на 10 % (см. таблицу).

Содержание отдельных жирных кислот в составе фосфолипидов изменилось неоднозначно (рис. 2). Однако процесс снижения парциальной доли ненасыщенных кислот превалирует, о чем свидетельствует уменьшение относительного количества группы полиеновых кислот в некоторых фосфолипидных фракциях. Жирнокислотный профиль ЛФХ миокарда в постинфарктном периоде в этой серии изменился следующим образом: увеличилось содержание 16:0 на 21 %, 18:0 на 61 %, 16:1 в 4 раза, 22:3 в 2 раза; уменьшилось относительное количество 14:0 и 15:0 на 54 и 64 % соответственно, 20:2 и 20:3 в среднем на 83 % каждой, 20:4 и 22:4 в среднем на 65 % каждой и 20:5 на 96 %. В ФС отмечалось повышение парциальной доли только ненасыщенных жирных кислот — линолевой и докозапентаеновой (в среднем в 2,4 раза каждой). Параллельно в данной фракции уменьшилось содержание полиеновых кислот 20:3 и 20:5 на 67 и 74 % соответственно. Содержание миристиновой кислоты снизилось в ФС на 64 %, пентадекановой — на 94 %. В составе жирных кислот СМ наблюдалось возрастание доли 16:0 на 20 %, 17:0 в 3,6 раза и 18:1 на 47 % и уменьшение относительного количества 14:0 на 46 %, 15:0 на 82 %, 20:3 и 22:4 в среднем на 72 % каждой. В ФХ увеличение содержания линолевой, линоленовой кислот в 2,6 раза каждой и докозатриеновой в 3,4 раза сопровождалось значительным уменьшением относительного количества эйкозадиееновой и эйкозатриеновой в среднем на 74 % каждой, а эйкозапентаеновой на 96 %. В жирнокислотном составе ФЭА произошли следующие изменения: увеличилось содержание стеариновой кислоты на 38 %, парциальная доля миристиновой и пентадекановой кислот уменьшилась на 57 % и в 2,8 раза соответственно. Значительно снизилось относительное количество ненасыщенных кислот 18:3, 20:3, 20:5 и 22:3 — в 4, 2,9, 6 и 2 раза соответственно и докозагексаеновой — на 90 %.

Снижение содержания полиеновых кислот после трехкратного применения гутимина указывает на возрастание микровязкости ЛФХ, ФС, СМ и ФЭА и соответственно уменьшение текучести липидного компонента мембран. ЛФХ является предпочтительным липидом для Са-АТФазы, ФС — для Na, К-АТФазы [1], следовательно, изменение физико-химических свойств этих фосфолипидов повлияет на активность вышеуказанных ферментов и процессы проницаемости. Для ферментов дыхательной цепи безразлично физико-химическое состояние ФЭА [1], поэтому увеличение микровязкости этой фосфолипидной фракции, очевидно, изменит функционирование дыхательной цепи митохондрий. Кроме того, преобладание уменьшения содержания отдельных ненасыщенных жирных кислот над увеличением относительного количества некоторых из них в фосфолипидах можно объяснить доминированием процессов деацилирования над реацилированием, т. е. равновесие смещается в сторону фосфолиполиза.

Учитывая вышеизложенные факты по изменению жирнокислотного состава фосфолипидов и предположения о дальнейшей биохимической трансформации продуктов гидролиза фосфолипидов в миокарде в постинфарктном периоде в зависимости от кратности превентивного применения гутимина, считаем, что двукратное введение препарата по сравнению с трехкратным способствует формированию в прединфарктном периоде устойчивых противоинфарктных и противореперфузионных приспособительных реакций на уровне жирнокислотного состава фосфолипидов. Убедительным подтверждением этого является увеличение количества арахидоновой кислоты во всех без исключения фосфолипидных фракциях, суммарного содержания моноеновых кислот в ЛФХ, ФС и полиеновых — в ЛФХ, ФС и ФЭА.

Результаты исследования обращают внимание кардиохирургов на тот факт, что при операциях на открытом сердце с целью предупреждения реперфузионных повреждений кардиомиоцитов не следует применять гутимин длительными курсами в качестве прединфарктной защиты миокарда.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Биленко М. В. // Ишемические и реперфузионные повреждения органов. — М., 1989. — С. 11—174.
2. Богдарин Ю. А., Бояринов Г. А. и др. // Лаб. дело. — 1982. — № 9. — С. 17—19.
3. Болдырев А. А. // Введение в биохимию мембран. — М., 1986. — Кн. 1. — С. 5—109.
4. Бояринов Г. А., Гордеев А. С. // Фармакол. и токсикол. — 1986. — № 2. — С. 91—101.
5. Дагис А. С., Толейкис А. И., Прашквичюс А. К. // Бюл. экпер. биол. — 1985. — № 1. — С. 43—45.
6. Демуринов Е. А. // Метаболические и нейрогуморальные механизмы ишемических повреждений миокарда. — М., 1985. — С. 104—116.
7. Королев Б. А., Шмерельсон М. Б. и др. // Всесоюзная конф. сердечно-сосудистых хирургов, 2-я: Тезисы докладов. — М., 1978. — С. 121—122.
8. Кренис Е. П. // Липиды клеточных мембран. Эволюция липидов мозга. Адаптационная функция липидов. — Л., 1981. — С. 339.
9. Малышев Ю. И. // Труды кафедры хирургических болезней и межобластного кардиохирургического центра. — Челябинск, 1986. — С. 5—16.

10. Матюшин И. Ф., Бояринов Г. А. и др. // Бюл. exper. биол.— 1982.— № 10.— С. 75—77.
11. Перетягин С. П., Контрищикова К. Н. // Перекисное окисление липидов и антиоксидантная терапия при ишемической болезни сердца.— Горький, 1988.— С. 69—73.
12. Пецев Н., Коцев Н. // Справочник по газовой хроматографии.— М., 1987.— С. 111—135.
13. Фролова Е. В. // Проблемы низкотемпературной консервации органов. Методы борьбы с низкотемпературными повреждениями.— М., 1987.— С. 5—53.
14. Шмерельсон М. Б., Бояринов Г. А. и др. // Всесоюзное науч. о-во анестезиологов: Пленум, 6-й: Тезисы докладов.— Донецк, 1979.— С. 90.
15. Fallen E. T., Elliot W. G., Gorlin R. // J. appl. Physiol.— 1967.— Vol. 22, N 4.— P. 836—839.
16. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G. // J. biol. Chem.— 1957.— Vol. 226.— P. 497—509.
17. Guy A. T. // Biochem. Cell. Biol.— 1986.— Vol. 64.— P. 66—69.
18. Victor T., Merwe van der N. et al. // Biochim. biophys. Acta.— 1985.— Vol. 834 (L 73), N 2.— P. 215—223.

Поступила 25.03.92

#### EFFECT OF GUTIMINE ON MYOCARDIAL PHOSPHOLIPIDS DURING REPERFUSION AT PREISCHEMIC PERIOD.

G. A. Boyarinov, N. N. Andreeva, I. V. Mukhina

Central Research Laboratory, Medical School, Nizhny Novgorod.

Physico-chemical properties of phospholipids were studied in heart muscle at postischemic period after preventive treatment with gutimine. Two administrations of the drug, as compared with its three times treatment, during the preischemic period contributed to development of stable adaptive antiischemic and antireperfusion responses involving alterations in fatty acid composition of phospholipids as demonstrated by an increase in content of arachidonic acid in all the phospholipid fractions studied as well as in total content of monoenoic acids in lysophosphatidyl choline and phosphatidyl serine and of polyenoic acids in lysophosphatidyl choline, phosphatidyl serine and phosphatidyl ethanolamine.

© Л. А. ГРУБИНА, И. Ф. ГУРИНОВИЧ, 1993

УДК 616-006-07:616.633:547.979.733

Л. А. Грубина, И. Ф. Гуринович

#### СОДЕРЖАНИЕ КОПРОПОРФИРИНА В МОЧЕ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ И ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

Институт физики АН Беларуси, Минск

Любой опухолевый процесс, являясь заболеванием всего организма, сопровождается обменными нарушениями. Одним из показателей этих нарушений служит порфириновый обмен.

Порфирины представляют собой сложные соединения класса тетрапирролов. В живом организме они встречаются, как правило, в виде комплексов с железом, кобальтом и магнием, являясь составной частью гемоглобина, миоглобина, каталазы, пероксидазы, цитохромов, витамина В<sub>12</sub> и хлорофилла. Основное назначение комплексов порфиринов с железом — это осуществление таких процессов, как биологическое окисление и транспорт кислорода. Синтез гема проходит с большой эффективностью, о чем свидетельствует тот факт, что побочные продукты, которыми являются безметалльные порфирины, присутствуют в биологических тканях и экскретах в микроколичествах. В здоровом организме всегда можно обнаружить в крови прото- и копропорфи-

рины (КП), а в моче — преимущественно КП. Функции безметалльных порфиринов неизвестны. Их содержание варьирует в зависимости от той или иной патологии, причем отклонения от нормы имеют место как в биосинтезе порфиринов, так и в характере их выведения.

Наиболее ясная картина нарушений порфиринового обмена наблюдается при хорошо изученных в этом плане заболеваниях, таких, как порфирия, свинцовая анемия и различные виды интоксикаций [4, 6, 7], при которых характерно увеличение суммарного содержания всех порфиринов, присутствующих в эритроцитах, желчи и моче. Что касается порфиринового обмена при онкологических заболеваниях, то долгие годы этот вопрос оставался нерешенным. Немногочисленные литературные данные противоречивы, базируются на обследовании небольших групп больных или экспериментальных животных с привитыми опухолями [5, 10, 13]. Все это требовало дополнительных исследований с учетом многих факторов, и в первую очередь типа опухоли, а затем систематизации материала в целом. Уже на первых этапах работы при определении количественного содержания порфиринов в крови и моче была выявлена зависимость этого показателя от типа опухоли и ее локализации [1—3]. Настоящая работа представляет собой обобщение выполненных нами исследований по оценке содержания порфиринов в моче.

**Методика.** В работе проводилось определение основного порфиринового компонента в моче — КП. Для этого были использованы две методики. Первая известна как способ Римингтона [9], который состоит в следующем. В 50 мл мочи, взятой из суточного диуреза, добавляли 5 мл ледяной уксусной кислоты и вели многократную экстракцию порфирина этиловым эфиром. Затем проводили нейтрализацию эфирного раствора и окисление порфириногенов путем добавления 20 мл 0,5 % раствора ацетата натрия и 0,1 мл 1 % раствора йода. Полученную смесь промывали 10 мл воды. Заключительной стадией была экстракция КП 1,5 н. соляной кислоты. Концентрацию выделенного КП определяли после измерения оптической плотности порфиринового раствора по формуле:

$$C_{\text{КП}} = \frac{|2D_{\text{max}} - (D_{430} + D_{380})| \cdot 728 \cdot V_{\text{к}} \cdot V_{\text{с}}}{l \cdot V \cdot 1000}, \text{ мкг/сут,}$$

где  $V_{\text{с}}$  — суточный диурез мочи;  $V$  — объем мочи, взятой для анализа;  $V_{\text{к}}$  — объем солянокислого экстракта;  $l$  — длина кюветы, в которой производили измерение спектра поглощения;  $D_{\text{max}}$  — величина оптической плотности в максимуме поглощения полосы Сорс;  $D_{430}$ ,  $D_{380}$  — величина оптической плотности при длине волны 430 и 380 нм соответственно; 728 — поправочный коэффициент для КП в 1,5 н. соляной кислоты.

Описанный способ трудоемок и требует наличия высокочувствительного спектрометра, так как погрешность измерения зависит главным образом от точности определения оптической плотности.

Сущность второй методики заключается в оценке содержания КП непосредственно в нативной моче путем измерения ее спектра флуоресценции и сравнения интенсивности суммарного

спектра всех присутствующих в моче порфиринов с эталоном известной концентрации КП. Из суточного диуреза мочи отмеряли определенное (10 мл) количество и подкисляли соляной кислотой до получения 0,3 н. раствора. Регистрировали спектр флюоресценции образца и эталона при возбуждении их светом с  $\lambda=400$  нм. Интенсивность флюоресценции регистрировали при  $\lambda=650$  нм. Концентрацию КП рассчитывали по формуле

$$C_{\text{КП}} = \frac{I_{06} \cdot C_{\text{эт}} \cdot V_{06} \cdot V_c}{I_{\text{эт}} \cdot V_m}, \text{ мкг/сут,}$$

где  $I_{06}$ ,  $I_{\text{эт}}$  — интенсивность флюоресценции образца и эталона;  $C_{\text{эт}}$  — концентрация КП, мкг/л;  $V_{06}$  — объем анализируемого раствора;  $V_m$  — объем мочи, взятой для анализа;  $V_c$  — суточный диурез мочи. Обе методики, как показано в [1], дают сопоставимые результаты и могут быть использованы в зависимости от обстоятельств.

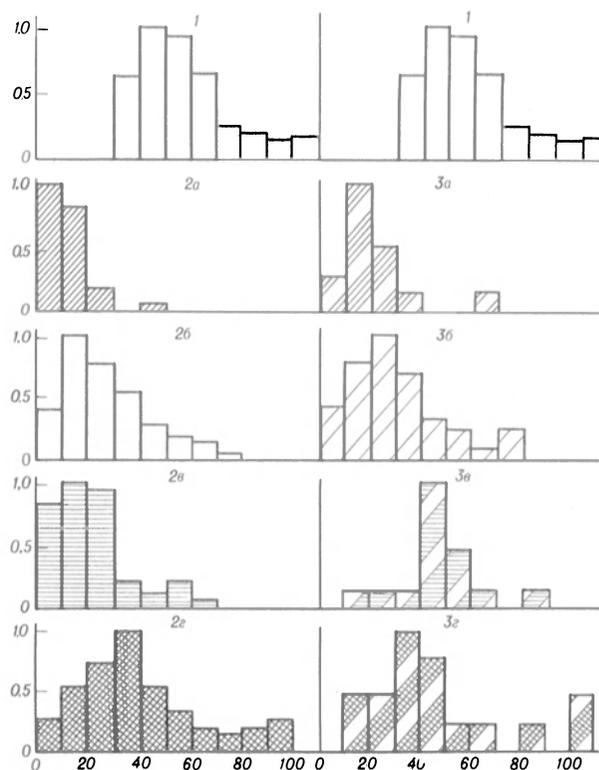
Была проанализирована моча 392 человек, госпитализированных в Минский городской онкологический диспансер. Обследовали только первичных больных, т. е. не проходивших предварительно в клинике курса лечения. Диагноз у всех пациентов ставили после гистологического исследования опухоли. У 266 больных были диагностированы злокачественные опухоли, у 126 — доброкачественные. Как правило, злокачественные заболевания соответствовали I и II стадиям, исключение составили больные раком желудка (III и IV стадии с метастазами). В контрольную группу включено 115 здоровых людей разного пола в возрасте 20—55 лет.

**Результаты и обсуждение.** Моча представляет собой многокомпонентную систему. В ее состав входят углеводы, витамины, гормоны, минеральные вещества и ряд азотсодержащих соединений, таких, как белки, свободные аминокислоты, мочевины и порфирины [8]. Порфирины с 5—7 карбоксильными группами присутствуют в следовых количествах [12]. Содержание уропорфирина составляет до 20 % от общего содержания порфиринов в моче [7]. Наиболее существенные количества приходится на долю КП, который представляет собой сумму двух изомеров — I и III [11].

Исследование закономерностей выведения КП, присущих злокачественным опухолевым процессам, базировалось на материале, который относится к 4 локализациям опухолей в области женской половой сферы (аденокарцинома, папиллярная карцинома яичников, внутриэпителиальный рак шейки матки, рак тела матки), щитовидной железы (недифференцированный, папиллярный, фолликулярный рак), кишечника (аденокарцинома, недифференцированный рак) и желудка (аденокарцинома, недифференцированный рак). Доброкачественные процессы включали следующие заболевания: фибромиома, киста яичников, аденома (женская половая сфера), тиреодит Хашимото, токсический, аденоматозный и узловой зоб (щитовидная железа), гастрит, язва ободочной и двенадцатиперстной кишки (кишечник), полипоз, аденома, язва, гастрит (желудок).

Результаты проведенной работы представлены на рисунке и в таблице. Гистограммы построены для каждой локализации и характеризуют вероятностное распределение уровня КП в моче или нормированную долю случаев ( $n/n_0$ ) с концентрацией КП, соответствующей выбранным интервалам (0—10, 11—20 мкг/сут и т. д.). Подразделение данных по онкоэтиологическим формам в пределах одной локализации в настоящей работе не приводится, так как было показано ранее на примере опухолей щитовидной железы [1], что параметр выведения КП с мочой практически не зависит от формы рака и лишь саркома является исключением, вызывая наиболее резкое снижение уровня КП.

Анализ полученных данных позволяет сделать вывод о наличии специфических изменений характера выведения с мочой КП при опухолевых процессах. Чувствительными параметрами таких нарушений служат как средние значения, так и интервалы наиболее вероятных. Последние, определенные по гистограмме (при  $n/n_0 > 0,5$ ) и рассчитанные ( $\bar{X} \pm \sigma$ ), содержат 80 % и более всех величин в каждой группе. Наиболее ярко нарушение порфиринового обмена при злокачественных процессах выражено при локализациях опухолей в области женской половой сферы, кишечника и щитовидной железы, т. е. для заболеваний на ранних стадиях. Интервал наиболее вероятных значений концентрации КП в моче таких больных сильно смещен в сторону низких величин, практически не перекрываясь с аналогичным параметром контрольной группы (38—76 мкг/сут). Средние концентрации



Содержание КП в моче здоровых (1), больных со злокачественными (2) и доброкачественными (3) процессами.

По оси абсцисс — концентрация КП, мкг/сут; по оси ординат —  $n/n_0$ . а — женская половая сфера; б — щитовидная железа; в — кишечник; г — желудок.

Содержание КП (в мкг/сут) в моче у здоровых и больных людей

Группа обследованных	Число наблюдений	$\bar{X} \pm S_x$	Область крайних значений	Интервал вероятных значений $\bar{X} \pm \sigma$
Контрольная	115	57 ± 2	30—110	38—76
Больные со злокачественными опухолями:	266			
женской половой сферы	57	13 ± 1	1—50	5—21
щитовидной железы	79	28 ± 2	1—72	11—45
кишечника	61	21 ± 2	1—66	6—36
желудка	69	45 ± 4	7—108	16—74
Больные с доброкачественными заболеваниями:	126			
женской половой сферы	16	21 ± 3	0—66	7—35
щитовидной железы	81	31 ± 2	1—82	12—50
кишечника	14	48 ± 5	17—89	31—65
желудка	15	40 ± 6	7—109	15—65

Примечание.  $\bar{X}$  — среднее значение;  $S_x$  — среднее квадратичное отклонение;  $\sigma$  — стандартное отклонение.

за сутки, свойственные опухолям указанных локализаций, отличаются от контроля с высокой достоверностью ( $p < 0,001$ ). Группа больных со злокачественными процессами в желудке по этому параметру также различается с контрольной ( $p < 0,01$ ). Вместе с тем концентрации КП ниже 30 мкг/сут — самого низкого уровня у здоровых людей — нехарактерны для основного контингента таких больных и наблюдаются только у 40 % обследованных. Отличие картины нарушения порфиринового обмена в последнем случае от 3 предыдущих нельзя однозначно связать только с локализацией опухолевого процесса, так как немаловажную роль может играть и тот факт, что все рассмотренные опухоли соответствовали III и IV, а не ранним стадиям заболевания желудка. Поэтому одним из возможных объяснений аномалий концентрации КП в моче больных раком желудка по сравнению с таковой у больных с другими онкологическими заболеваниями может быть и взаимосвязь ее со стадией заболевания. В литературе имеются указания на фазовый характер выведения КП у экспериментальных животных с привитыми опухолями [5]. Однако на спонтанно растущих опухолях эти вопросы в полной мере не рассматривались. Вероятно, на уровне выведения КП будут сказываться оба фактора как стадия заболевания, так и локализация опухоли. Предварительные данные [1], полученные на небольшом экспериментальном материале, позволяют предположить, что локализация опухоли оказывает наиболее сильное влияние на закономерности выведения КП.

Анализируя данные по доброкачественным процессам, можно отметить следующую тенденцию: здесь так же, как и при злокачественных заболеваниях, прослеживается взаимосвязь между уровнем КП, выводимого с мочой, и локализацией процесса. Так, доброкачественным опухолям женской половой сферы свойственны низкие значения КП, и вся гистограмма в целом практически не отличается от той, которая характерна для злокачественных опухолей такой же локализации. Низкие уровни выведения КП преобладают (60 %) и при доброкачественных заболеваниях щитовидной железы, однако и значения, соответствующие норме, также имеют место. Развитие доброкачественных опухолей в желудке сопровождается, как и у онкологических больных, низкими значениями в 40 % случаев.

При доброкачественных процессах в области кишечного тракта наблюдается сходство порфиринового показателя с контролем; как по интервалу наиболее вероятных значений, так и по среднесуточной концентрации КП они достоверно не различаются со здоровым организмом ( $p > 0,05$ ).

Итак, любой опухолевый процесс сопровождается в большей или меньшей степени нарушением порфиринового обмена, которое сопровождается изменением количественного содержания в моче КП. Несмотря на индивидуальный характер таких нарушений, свойственный каждому типу опухоли, можно выделить одну существенную закономерность — для большинства рассмотренных случаев характерен пониженный уровень КП в моче. Это свойство характерно именно для опухолевого процесса, так как любое другое заболевание вызывает порфирурию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Грубина Л. А. Соединения класса порфиринов в диагностике и лечении онкологических заболеваний: Автореф. дис. ...канд.-хим. наук.— Минск, 1990.
2. Гуринович И. Ф., Грубина Л. А., Некрашевич С. Ф. и др. // Вопр. мед. химии.— 1988.— № 5.— С. 34—37.
3. Гуринович Г. П., Гуринович И. Ф., Грубина Л. А. и др. // Докл. АН БССР.— 1983.— Т. 27.— С. 565—567.
4. Идельсон Л. И. // Тер. арх.— 1987.— № 6.— С. 143—150.
5. Кубатиев А. А. Порфирины, витамин В<sub>12</sub> и рак.— Тула, 1973.
6. Медико-биологические аспекты изучения и применения порфиринов / Под ред. В. И. Музыки, Х. А. Кахна.— Таллинн, 1989.
7. Порфирины / Кузнецова Н. П., Панков Б. С., Чубарова А. С. и др.— М., 1981.
8. Хмелевский Ю. В., Усагенько О. К. Основные биохимические константы человека в норме и при патологии.— Киев, 1987.
9. Eales L. // The Porphyrins / Ed. D. Dolphin.— New York, 1979.— Vol. 6, Pt A.— P. 779—780.
10. Gorodetsky R., Fuks Z., Peretz T. et al. // Europ. Cancer Clin. Oncol.— 1986.— Vol. 22, N 12.— P. 1515—1521.
11. Lim C. K., Peters T. J. // Clin. chim. Acta.— 1984.— Vol. 139.— P. 55—63.
12. Schreiber W. E., Raysys V. A., Labble R. F. // Clin. Chem. 1983.— Vol. 29, N 3.— P. 527—530.
13. Hdagawa M., Horie Gutaka, Hiragama Chisato // Biochem. Med.— 1984.— Vol. 31, N 2.— P. 131—139.

Поступила 26.07.92

ESTIMATION OF COPROPORPHYRIN IN URINE OF HEALTHY PERSONS AND OF CANCER PATIENTS.

L. A. Grubina, I. F. Gurinovich

Institute of Physics, Academy of Sciences of Byelorus, Minsk.

Content of coproporphyrin was estimated in urine of females with genital, thyroid and gastrointestinal cancer. A rate of coproporphyrin elimination with urine depended on the type of tumor and its site. Concentration of coproporphyrin was decreased in urine of patients with both malignant and benign tumors as compared with that of healthy persons.

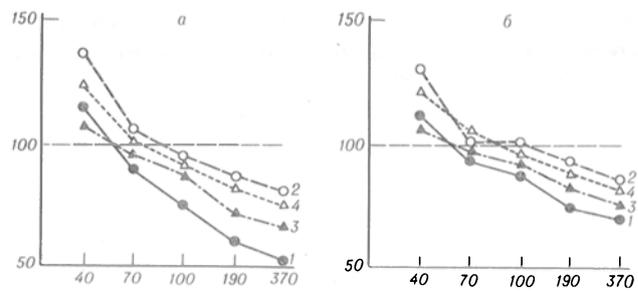


Рис. 1. Активность КФ (а) и ДНКазы (б) в лимфоцитах периферической крови (1, 2) и лизосомах печени (3, 4) крыс.

Здесь и на рис. 2 и 3: по осям абсцисс — дни, по осям ординат — изменения, % от результатов контрольной группы, принятых за 100%. 1 и 3 — ТЭ; 2 и 4 — ТЭ+Тз.

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.36-002.2-099-092:1612.017.1]-008.64-021.5-07:1616.36-018.1+616.155.32

А. И. Николаев, Ж. И. Мамутов, Х. С. Мухаматов

ИЗМЕНЕНИЕ СОСТОЯНИЯ ЛИЗОСОМ ПЕЧЕНИ И ЛИМФОЦИТОВ В ДИНАМИКЕ РАЗВИТИЯ ВТОРИЧНОГО ИММУНОДЕФИЦИТА И ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ

Среднеазиатский медицинский педиатрический институт, Ташкент

Переваривание фагоцитированного материала с помощью кислых гидролаз является важнейшей функцией лизосом. В пролиферирующих клетках фагоцитированные комплексы антиген — антитело легко катаболизируются до низкомолекулярных соединений. Установлено, что в условиях иммунодепрессии происходит торможение процесса обработки антигенного материала ферментами лизосом [5]. В этих случаях могут образоваться растворимые иммунные комплексы, способствующие обострению патологического процесса. Лизосомы имеют большое значение в регуляции внутриклеточного обмена (внутриклеточный протеолиз, образование и распад ферментов и гормонов и т. п.) [10, 12]. Однако в доступной нам литературе мы не нашли сообщений, посвященных исследованию влияния тимуса на функциональное состояние лизосом.

В настоящей работе представлены данные по изучению активности лизосомальных ферментов в печени и лимфоцитах, уровня циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови крыс в динамике развития вторичного иммунодефицита, вызванного тимэктомией (ТЭ), и при хроническом гелиотринном гепатите (ХГГ) на фоне ТЭ, а также при коррекции выявленных сдвигов тимозином (Тз) и алиментарными факторами.

Методика. Опыты проводили на белых беспородных крысах-самцах с исходной массой 120—150 г. Каждая опытная группа состояла из 7—10 особей. Всех животных разделили на 5 групп. В 1-ю группу вошли ложнооперированные крысы (контроль), во 2-ю — тимэктомированные крысы, в 3-ю — тимэктомированные крысы, получавшие Тз, в 4-ю — крысы с ХГГ на фоне ТЭ, в 5-ю — крысы с ХГГ на фоне ТЭ, которым назначали Тз в сочетании с дополнительным рационом и витаминами А и Е. Моделирование вторичного иммунодефицита, получение 5-й фракции Тз и

оценку полноты ТЭ осуществляли, как описано ранее [8]. ХГГ на фоне гормональной недостаточности тимуса вызывали введением алкалоида гелиотрина [1] тимэктомированным крысам через 6 мес после операции. Животным 3-й группы через 1, 2, 3, 6 и 12 мес после ТЭ в течение 10 дней внутримышечно вводили Тз (0,5 мкг на 1 г массы тела). Крысы 5-й группы через 40 и 80 сут после затравки гелиотрином получали по той же схеме и такую же дозу Тз и дополнительный рацион, содержащий белков в 2 раза, жиров в 2,5 раза, углеводов в 1,4 раза, витаминов и микроэлементов в 1,5 раза больше, чем в контроле, а также витамины А (ретинола ацетат) и Е (5% масляный раствор токоферола ацетата) в суточной дозе соответственно 30 000 МЕ и 0,5 мг/кг (перорально).

Лимфоциты периферической крови выделяли на градиенте фиколл — верографин [14], фракцию лизосом из печени — с помощью дифференциального центрифугирования в градиенте плотности сахарозы [3].

В лимфоцитах периферической крови, гомогенатах печени и в ее лизосомных фракциях определяли 4 лизосомальные кислые гидролазы (кислая фосфатаза — КФ, катепсин D, ДНКазы и РНКазы) по описанным методам [2, 9, 13, 15, 16]. ЦИК в сыворотке крови выявляли по методу [4]. Активность лизосомальных ферментов и содержание ЦИК изучали на 40, 70, 100, 190 и 370-е сутки после ТЭ, а также на 50-е и 80-е сутки после окончания затравки гелиотрином.

Результаты и обсуждение. Как видно из рис. 1 и 2, на 40-е сутки после ТЭ наблюдается тенденция к повышению активности всех лизосомальных кислых гидролаз в лимфоцитах пери-

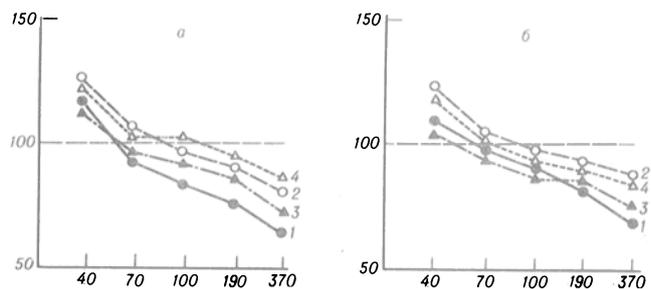


Рис. 2. Активность РНКазы (а) и катепсина D (б) в лимфоцитах (1, 2) и лизосомах печени (3, 4) крыс.

Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

Таблица 1

Влияние Тэ на содержание ЦИК в сыворотке крови тимэктомированных крыс

Группа животных	Концентрация ЦИК, г/л
190-е сутки после операции	
Ложнооперированные	2,4±0,14
Тимэктомированные	3,2±0,28*
Тимэктомированные, получавшие Тэ	2,6±0,25
370-е сутки после операции	
Ложнооперированные	2,5±0,16
Тимэктомированные	3,5±0,27*
Тимэктомированные, получавшие Тэ	2,9±0,32

Примечание. Здесь и в табл. 2 приведена достоверность различий по сравнению с ложнооперированными крысами: звездочка —  $p < 0,05$ .

ферической крови крыс. По мере развития иммунодефицита (70-е и 100-е сутки) наряду с нарушением иммунологических показателей (уменьшение количества Т-клеток) в лимфоцитах снижается активность лизосомальных кислых гидролаз. В отдаленные сроки и к концу эксперимента (через 190 и 370 сут после операции) зарегистрировано значительное снижение активности лизосомальных ферментов. Во фракции лизосом печени отмечена аналогичная динамика их изменений. Статистически значимое повышение содержания ЦИК в сыворотке крови выявлено через 190 и 370 сут после Тэ (табл. 1). Уровень ЦИК оказался максимально повышенным при ХГГ на фоне Тэ (табл. 2). Введение Тэ тимэктомированным животным повышает активность кислых гидролаз в лимфоцитах периферической крови и лизосомных фракциях печени. В более поздние сроки после Тэ (190-е и 370-е сутки) Тэ хотя и способствует восстановлению активности кислых гидролаз в лимфоцитах и лизосомных фракциях печени, однако она не достигает нормы. Через 50 сут после окончания затравки и 255 сут после Тэ активность кислых гидролаз в лимфоцитах у тимэктомированных крыс с ХГГ значительно снижалась (рис. 3). Аналогичная динамика обнаружена и в лизосомах печени. По мере прогрессирования ХГГ и нарастания дефицита гормонов тимуса (через 80 сут после окончания затравки и 285 сут после

Таблица 2

Влияние Тэ и алиментарных факторов на содержание ЦИК в сыворотке крови крыс к ХГГ на фоне Тэ

Группа животных	Концентрация ЦИК, г/л	
	255 сут после Тэ и 50 сут после окончания затравки гелиотрином	285 сут после Тэ и 80 сут после окончания затравки гелиотрином
Ложнооперированные	2,6±0,22	2,8±0,23
Тимэктомированные	3,6±0,33*	4,0±0,35*
ХГГ на фоне Тэ	4,7±0,26***	5,2±0,28***
ХГГ на фоне Тэ+Тэ+дополнительный рацион+витамины А и Е	3,2±0,26	3,8±0,32*

Примечание. Одна звездочка —  $p < 0,05$ , три звездочки —  $p < 0,01$ .

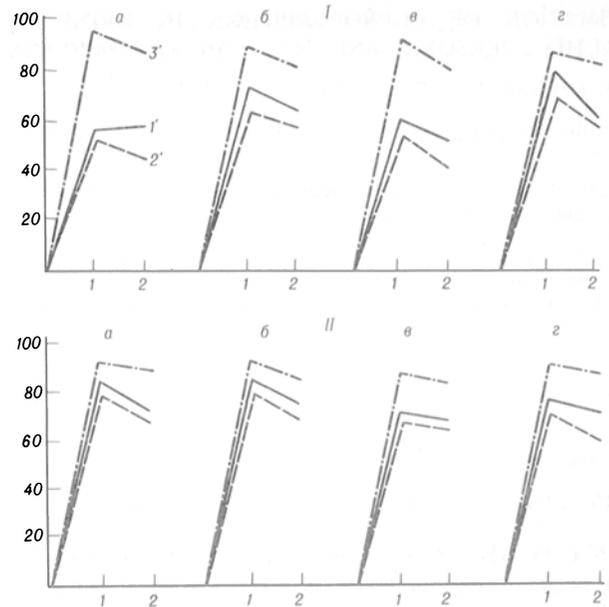


Рис. 3. Активность КФ (а), ДНКазы (б), РНКазы (в) и катепсина D (г) в лимфоцитах периферической крови (I) и лизосомах печени (II) крыс с ХГГ на фоне Тэ.

1 — через 50 сут после окончания затравки и 255 сут после Тэ; 2 — через 80 сут после окончания затравки и 285 сут после Тэ. 1' — Тэ; 2' — ХГГ на фоне Тэ; 3 — ХГГ на фоне Тэ+Тэ+дополнительный рацион+витамины А и Е.

Тэ) активность кислых гидролаз существенно уменьшалась. Максимально снижена активность КФ в лимфоцитах и катепсина D в лизосомах печени (на 54,2 и 36,6 % соответственно). Эти данные свидетельствуют, что в условиях дефицита гормонов тимуса легко развиваются хронизация патологического процесса и его утяжеление.

Таким образом, в условиях иммунного дефицита, вызванного Тэ, возникают выраженные изменения активности ферментов лизосомального аппарата клеток. В ранний срок после удаления тимуса они выражаются в активации лизосомальных ферментов, о чем свидетельствует возрастание их активности в иммунокомпетентных клетках и лизосомах печени. Надо полагать, что изменение активности лизосомальных гидролаз в ранний срок после Тэ носит компенсаторно-приспособительный характер, направленный на адаптивные перестройки метаболизма и структур клеток. Действительно, было показано, что в адаптивные реакции организма при интенсивной физической нагрузке, голодании и других экстремальных условиях одними из первых среди субклеточных структур включаются лизосомы [10].

При продолжающемся воздействии патологических факторов (в условиях нашего эксперимента — Тэ) вследствие истощения метаболических процессов «пораженного» организма со временем наблюдается срыв компенсаторно-приспособительных механизмов [6]. С этим согласуется установленное нами в отдаленные сроки опыта (190-е и 370-е сутки после Тэ) значительное снижение активности кислых гидролаз в лимфоцитах и лизосомах печени. Основной причиной уменьшения активности лизосомальных ферментов в поздние сроки после удаления вилочковой железы у животных является, вероятно, угнетение синтетических процессов (синтеза белка, нуклеиновых кислот, АТФ) при отсутствии гормонального воздействия тимуса на организм. Не исключено

также, что усиление интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) и нарушение фосфолипидного состава мембран [8] также являются одной из причин снижения активности лизосомальных ферментов. Показано, что лизосомальная мембрана очень чувствительна к повреждающему действию продуктов ПОЛ [17]. Удаление из лизосом фосфолипидов с помощью ацетона и разрушение фосфолипидов под влиянием фосфолипазы С приводят к резкому снижению мембранно-связанного фермента лизосом  $\beta$ -глюкозидазы [11]. По предположению этих авторов, действие между ферментами и фосфолипидами — один из основных путей регуляции активности ферментов субклеточных структур.

Установленные нами отрицательные корреляционные связи между снижением активности лизосомальных ферментов в лимфоцитах и повышением уровня ЦИК в сыворотке крови свидетельствуют об угнетении иммунной и катаболической функции лизосом при ХГГ на фоне ТЭ.

В результате нарушения структурно-функционального состояния лизосом, связанного с дефицитом гормонов тимуса и интоксикацией гепатотоксическим ядом гелиотрином, изменяются уникальные механизмы эндо-, экзо- и фагоцитоза в ретикулоэндотелиальной системе (РЭС) и соответственно иммунохимический гомеостаз. В этих условиях антигены в клетках РЭС до конца не расщепляются лизосомальными ферментами и длительно в них сохраняются. Их иммунная активность выше нативной, что и создает условия для развития аутоиммунных реакций. На это указывает повышение концентрации ЦИК и снижение активности кислых гидролаз в лизосомах печени и лимфоцитах периферической крови тимэктомированных животных, особенно в период полного развития вторичного иммунодефицита.

Положительный эффект, полученный при использовании Тз, по всей вероятности, связан с усилением синтетических и пролиферативных процессов. Это наше предположение подтверждается исследованиями других авторов [7, 18], установивших усиление синтеза белка, ДНК, РНК и повышение содержания АТФ после введения гормонов тимуса интактным и тимэктомированным животным. Можно полагать, что гормоны тимуса, увеличивая активность лизосомальных ферментов, оказывают регулирующее влияние на внутриклеточные метаболические процессы, тем самым стабилизируя структуру и функцию мембран. Это подтверждает установленное нами снижение интенсивности ПОЛ, содержания ЛФХ и активности фосфолипазы  $A_2$  при иммуностимуляции Тз [8].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что при дефиците гормонов тимуса снижается функциональная активность лизосомального аппарата клеток. Введение Тз, особенно в сочетании с алиментарными факторами, восстанавливает активность лизосомальных ферментов и содержание ЦИК, что подтверждает их участие в регуляции структурно-функционального состояния лизосом.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Абдуллаев Н. Х. Патохимия и патогенетическая терапия хронических гепатитов и циррозов печени.— Ташкент. 1968.— С. 238.

2. Адигамов Л. Ф. // Вопр. мед. химии.— 1969.— № 4.— С. 363—369.
3. Ариков А. И., Панченко Л. Ф., Капитонов А. Б. и др. // Цитология.— 1971.— № 1.— С. 887.
4. Барановский П. В., Рудык Б. И. // Лаб. дело.— 1982.— № 12.— С. 35—37.
5. Кенигсберге Я. Э., Гриц М. А. // Журн. микробиол.— 1978.— № 7.— С. 65—68.
6. Кондрашева М. И. // Регуляция энергетического обмена и устойчивость организма.— Пушкино, 1975.— С. 5—10.
7. Костодинов Д. А. Исследование биологической активности и некоторых химических свойств экстрактов вилочковой железы и их фракций: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— М., 1973.
8. Мамутов Ж. И. // Вопр. мед. химии.— 1990.— № 2.— С. 28—30.
9. Матульская Л. И., Фаломеева О. М. // Лаб. дело.— 1980.— № 10.— С. 568—588.
10. Панин Л. Е., Майнская Л. Е. Лизосомы: роль в адаптации и восстановлении.— Новосибирск, 1987.
11. Покровский А. А., Конь И. Я., Соловьев В. И. // Бюл. экпер. биол.— 1974.— № 3.— С. 49—52.
12. Покровский А. А., Тутельян В. А. Лизосомы.— М., 1976.— С. 378.
13. Поляков Я. В. // Новые методы научных исследований в клинической и экспериментальной медицине.— Новосибирск, 1980.— С. 84—85.
14. Хейфец Л. Б., Абалкин В. А. // Лаб. дело.— 1973.— № 10.— С. 579—581.
15. Anson M. L. // J. gen. Physiol.— 1938.— Vol. 20, N 2.— P. 79—89.
16. Bodansky A. // J. biol. Chem.— 1933.— Vol. 101, N 1.— P. 93—104.
17. Desai I. D., Sawant P. L., Tappet A. L. // Biochim. biophys. Acta.— 1964.— Vol. 86, N 11.— P. 277—285.
18. Vogel J. E., Incefy G. S., Grood R. A. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1975.— Vol. 72, N 3.— P. 1175—1178.

Поступила 15.05.92

#### THE STATUS OF LIVER TISSUE AND LYMPHOCYTE LYSOSOMES IN DYNAMICS OF SECONDARY IMMUNODEFICIENCY AND IN CHRONIC HEPATITIS.

A. I. Nikolaev, Zh. I. Mamutov, Kh. S. Mukhamedov

Medico-Pediatric School, Tashkent.

Activity of acid hydrolases, acid phosphatase, cathepsin D, DNA- and RNAases in lysosomal fractions of liver tissue and peripheral blood lymphocytes as well as concentration of circulating immune complexes in blood serum were studied in thymectomized rats and in thymectomized rats with chronic heliotritic hepatitis; thymosine and alimentary factors were used for treatment and correction of the impairments observed. The rate of thymus hormones deficiency was found to be responsible for impairments of functional activity of lysosomes in lymphocytes and liver tissue. Activation of the lysosomal enzymes studied was detected within early periods (40 days) after thymectomy, while a decrease in the enzymatic activity was observed within later periods and to the end of the experiment (190 and 370 days). Besides, concentration of circulating immune complexes was increased in liver tissue and the most distinct increase occurred within 370 days after thymectomy. Activity of lysosomal enzymes in liver tissue and lymphocytes and content of circulating immune complexes in blood were normalized in thymectomized animals after treatment with thymosine and alimentary factors.

М. Г. Асадуллин, А. Н. Садова, В. П. Глухов,  
М. В. Борисова

## АТРОМБОГЕННЫЙ МАТЕРИАЛ НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО ПОЛИЭТИЛЕНА

Казанский медицинский институт, Казанский химико-технологический институт

В связи с проблемой создания искусственных органов возникла острая необходимость использования полимерных материалов, обладающих комплексом специальных свойств. Известно [3], что далеко не все полимеры пригодны для биомедицинских целей. Так, полимеры биомедицинского назначения должны быть физически, механически и химически устойчивы к окружающей биологической среде и не должны оказывать вредного влияния на орган, в который они внедряются, а также должны быть воспроизводимо получены и переработаны без деструкции.

В настоящее время ни один из известных полимеров полностью не удовлетворяет этим требованиям [4]. Использование полимерных материалов при изготовлении клапанов сердца, в качестве заменителей дефектных кровеносных сосудов, при диагностировании, в аппаратах для переливания крови и т. д. показало, что при их применении возникают тромбоз, тромбофлебит и даже перифлебит. Для устранения этого используют антикоагулянты, например гепарин, применение которого, однако, ограничено во времени, так как длительное его использование может привести к кровосточивости [3]. Создание полимерных материалов, которые не вызывают тромбообразования и в то же время не нарушают естественный регулирующий механизм свертывания крови, является весьма актуальной задачей.

Одним из способов создания таких материалов является фиксация на их поверхности адсорбцией или химическими связями веществ, стимулирующих растворение образовавшегося тромба, например трипсина [6], стрептокиназы или урокиназы [7, 9].

В работе [6] описан атромбогенный материал, полученный путем иммобилизации к лавсану или фторолону трипсина через межмолекулярную сшивку с помощью глутарового альдегида. Однако этот материал не имеет протеолитической избира-

тельности, что приводит к ускорению двух первых фаз свертывания крови, расщеплению многих белков плазмы крови и тканей. Протеолитическое действие на белки плазмы крови вызывает активизацию калликреин-кининовой системы крови и связанные с этим изменения гемодинамики [8].

В настоящей работе в качестве объекта исследования выбран полиэтилен низкой плотности, модифицированный на стадии переработки полимерным комплексом полиакриловой кислоты и Е-капролактама, полученного в процессе радикальной полимеризации акриловой кислоты в среде лактама. В качестве атромбогенных веществ, фиксируемых на поверхности модифицированного полиэтилена, использовали фибринолитики стрептокиназу или урокиназу.

**Методика.** Модификацию полиэтилена низкой плотности марки 15803-020 осуществляли в процессе совместного вальцевания с модификатором при температуре 150 °С в течение 20 мин. Модифицированный полиэтилен подвергали переработке методом экструзии. Были получены трубки с наружным диаметром 2, 4, 6 мм. Введение модификатора не изменило режим переработки полиэтилена.

Для активации поверхности модифицированного полиэтилена его обрабатывали раствором тионилхлорида в хлороформе в присутствии нескольких капель диметилформамида [5].

Иммобилизацию подготовленной поверхности полиэтилена фибринолитиком проводили следующим образом. Катетер из модифицированного полиэтилена помещали в 0,8 % раствор стрептокиназы или урокиназы в 0,08 М вероналовом буфере рН 7,6 и выдерживали его в течение 3 ч при 0—5 °С. Условия получения атромбогенного материала представлены в табл. 1.

Проводили исследования полученного материала на фибринолитическую активность и протеолитическую избирательность. Сущность метода определения фибринолитической активности заключается в следующем. В колбу на 50—100 мл помещают 1,5 % гель агар-агара и нагревают на водяной бане до разжижения в 15 мл буфера рН 8,0. Во второй колбе готовят раствор тромбина (0,1 %) в количестве 2 мл. В третьей колбе готовят 0,6 % раствор фибриногена на вероналовом буфере в количестве 4 мл. Раствор тромбина переносят в чашку Петри, раствор фибриногена смешивают при охлаждении до 40—50 °С с раствором агар-агара и тоже переносят в чашку Петри.

Таблица 1

Условия получения атромбогенного материала на основе модифицированного полиэтилена и результаты его испытания

Концентрация тионилхлорида, %	Время обработки тионилхлоридом, мин	Концентрация фибринолитика, %	Время иммобилизации фибринолитика, ч	Температура иммобилизации, °С	Фибринолитическая активность, %	Протеолитическая избирательность
10	15	0,8	3	0	75—77	Наблюдается во всех случаях
20	15	0,8	3	0	90—93	
25	20	1,0	4	5	98—100	
30	20	1,0	4	5	70—71	
20	20	1,1	4	5	98—99	
20	20	1,0	4	5	98—100	
25	15	0,8	3	0	98—100	
25	15	0,7	3	0	80—86	
20	15	0,8	5	5	98—100	
25	20	1,0	2	5	68—70	
20	15	0,8	3	1	40—41	
25	20	1,0	3	6	80—81	

Таблица 2

Фибринолитическая активность модифицированного полиэтилена, иммобилизованного стрептокиназой при непрерывной смене среды

Сутки	Зона лизиса фибрина, мм
1-е	498—503
2-е	490—500
3-е	500
4-е	490
5-е	476—468
6-е	450—441
7-е	440—439
8-е	430
9-е	410
10-е	350—352
11-е	300—302
12-е	208—210
15-е	6—8

Все 3 компонента и полимерный материал, иммобилизованный фибринолитиком, перемешивают и оставляют на 30—40 мин при комнатной температуре. Полученный комплекс оставляют при 37 °С на 16—18 ч. По истечении указанного времени измеряют зону лизиса в миллиметрах.

Неспецифическую протеолитическую активность определяли по гидролизу сывороточного альбумина человека. Продукты протеолиза обнаруживали по поглощению при 280 нм после осаждения белка ТХУ. Для этого готовили раствор альбумина в концентрации 2 мг/мл в 0,05 М фосфатном буфере, в него помещали материал на основе модифицированного полиэтилена, поверхность которого иммобилизована фибринолитиком.

Результаты и обсуждение. Атромбогенную активность полимерного материала оценивали по фибринолитической активности. Эту активность выявляли по зоне лизиса при периодической смене среды фибрин-агара через 1 сут. Показатели фибринолитической активности на срок от 1 до 15 дней представлены в табл. 2. Анализ результатов показал, что фибринолитическая активность полученного материала постепенно уменьшалась, сохраняясь в течение 15 сут.

Результаты исследования протеолитической избирательности представлены в табл. 3. Сопоставление результатов опытов, представленных в табл. 2 и 3, дает основание сделать вывод, что материал, полученный на основе модифицированного полиэтилена, обладает избирательной фибринолитической активностью.

Учитывая слабую тромбогенность полиэтилена, можно рекомендовать для проверки в экспериментах *in vivo* предлагаемый материал с целью изготовления самоочищающихся катетеров, ис-

Таблица 3

Данные спектрофотометрических испытаний атромбогенного материала на основе модифицированного полиэтилена

Время, ч	$E_{280 \text{ нм}}$
2	0,001
3	0,003
4	0,002
5	0,004
20	0,003
30	0,001

пользуемых в медицинской практике для введения в кровеносные сосуды.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Зубаиров Д. М., Зинкевич О. Д. // *Вопр. мед. химии.*— 1976.— № 5.— С. 187—191.
2. Зубаиров Д. М., Зинкевич О. Д. // *Казан. мед. журн.*— 1976.— № 3.— С. 23—28.
3. Полимеры медицинского назначения: Пер. с яп.— М., 1981.
4. Полимеры в медицине / Под ред. Н. А. Платэ.— М., 1960.
5. Способ получения материала, обладающего атромбогенным действием: А. с. 1173584 СССР.
6. Салганик Р. И. и др. // *Вопр. мед. химии.*— 1982.— № 1.— С. 113—115.
7. Hoffman A. S. et al. // *Tasaio.*— 1972.— Vol. 8.— P. 10.
8. Kaplan H. P. // *Progress in Hemostasis and Thrombosis* / Ed. Fh. H. Spactwete.— New York, 1978.— Vol. 4, 90, 127—175.
9. Zubairov D. M., Zinkevich O. D., Asadullin M. G. // *Thrombosis and Thrombolysis* / Ed. E. I. Chazov, V. N. Smirnov.— New York, 1986.— P. 179—196.

Поступила 26.06.91

## ATHROMBOGENIC MATERIAL BASED ON MODIFIED POLYETHYLENE.

M. G. Asadullin, A. N. Sadova, V. P. Glukhov, M. V. Borisova  
Medical School, Chemicco-Technological Institute, Kazan.

An athrombogenic material, exhibiting selective proteolytic activity, was developed. The material was obtained after modification of polyethylene by means of the polymer complex containing polyacrylic acid and  $\epsilon$ -caprolactam. The modified polyethylene was treated with thionyl chloride and then it was maintained in the solution containing streptokinase or urokinase. The athrombogenic material exhibited fibrinolytic activity within 15 days; its athrombogenic properties were studied *in vitro*.

© И. В. МАЗЕПА, 1993

УДК 616.155.392-092-07

И. В. Мазепа

## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ И ГИДРОДИНАМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ДНК ЗДОРОВЫХ И ЛЕЙКОЗНЫХ ТКАНЕЙ

Ивано-Франковский медицинский институт

Аналогия в организации генетического аппарата нормальной и раковой клетки при существенных отличиях фенотипических свойств трансформированной клетки [3], прикладное значение таких отличий как основы диагностики и лечения злокачественных новообразований требуют существенного обновления как технических средств, так и методических подходов при изучении молекулярных превращений в онкогене и его составных компонентах.

Противоречивость большинства результатов изучения физико-химических свойств ДНК раковых клеток обусловлена отсутствием систематических экспериментов и достаточно чувствительных методов для выявления незначительных изменений в структуре ДНК [5].

С использованием высокочувствительного кинетического формальдегидного метода [5] было показано, что количество участков локальной денатурации в ДНК раковых клеток увеличи-

вается. В связи с изложенным имеет смысл выяснить, как изменяется стабильность вторичной структуры ДНК в органах лейкозных животных и отражаются ли изменения структуры на физико-химических свойствах, зависящих от состояния макромолекулярной организации нуклеиновых кислот. В данной работе представляются результаты сравнительного изучения температуры молекулярного плавления с анализом ширины интервала температурного перехода и характеристической вязкости ДНК здоровых и пораженных лейкозом тканей.

**Методика.** В качестве лейкозных моделей использованы эритромиелоз Швеца на беспородных крысах и вирусный лейкоз Раушера на мышах линии BALB/c.

Препараты ДНК из тканей животных получены методом J. Maguir [8] с дополнительной обработкой проназой («Serva») и РНКазой («Reanal»).

Учитывая особенности макромолекулярной структуры ДНК и ее легкую повреждаемость при незначительных механических воздействиях, процесс получения препаратов нуклеиновых кислот и все манипуляции при изучении свойств полинуклеотидов проведены в строго идентичных щадящих условиях. Препараты ДНК от здоровых и лейкозных особей получены при параллельном выделении, что позволяло свести к минимуму изменения в изучаемых параметрах в результате неодинакового дозирования механических воздействий и влияния неспецифических нуклеаз.

Условия выделения ДНК, анализ чистоты и нативности полученных препаратов нуклеиновых кислот описаны в работе [2].

Температуру молекулярного плавления препаратов ДНК определяли на сконструированной на базе спектрофотометра СФ-4 установке, используя хромелькопелевую термопару, термостабилизирующую камеру и комбинированный измеряющий цифровой прибор Ш 300. Точность измерения температуры в кювете достигала 0,1 °С. Стабилизация температуры в камере обеспечивалась ультратермостатом с точностью 0,1 °С.

Измерение характеристической вязкости проведено на ротационном вискозиметре, изготовленном по принципу Зимма — Крозерса [9].

Изготовленная модель вискозиметра позволила проводить работу при изучении градиента скорости от 0,1 до 3,5 см<sup>-1</sup>.

Рабочие концентрации ДНК (0,002, 0,003, 0,004 %) готовили на стандартном солевом растворе, содержащем 0,15 М хлорида натрия и 0,015 М цитрата натрия. Температурный

режим вискозиметра стабилизировали ультратермостатом на уровне 25,0±0,1 °С.

**Результаты и обсуждение.** Характеристика чистоты препаратов ДНК из тканей подопытных крыс и мышей основана на анализе белковых примесей и содержания РНК. Состояние целостности структуры (нативность) ДНК изучено по величине гиперхромного эффекта.

Результаты изучения примесей белка, РНК и величины гиперхромного эффекта препаратов ДНК из тканей здоровых (печень, селезенка) и пораженных лейкозом (печень, селезенка, опухоль) крыс и мышей представлены в табл. 1. Как видно из табл. 1, использованные в работе препараты ДНК здоровых и пораженных лейкозом тканей крыс и мышей являются высокоочищенными и нативными и по своим характеристикам аналогичны описанным в литературе [4, 6—8]. При этом следует отметить, что при сравнительном анализе чистоты препаратов нуклеиновых кислот установлено достоверное увеличение примеси белка, РНК и величины гиперхромного РНК и величины эффекта в ДНК лейкозных тканей.

Результаты определения величины температуры молекулярного плавления и ширины интервала температурного перехода препаратов ДНК из тканей здоровых и пораженных лейкозом крыс и мышей представлены в табл. 2. Можно отметить, что температура молекулярного плавления и ширина интервала температурного перехода препаратов ДНК печени и селезенки здоровых крыс находятся приблизительно на одинаковом уровне.

Сравнение температуры плавления ДНК печени и селезенки, полученных от пораженных лейкозом крыс, показало, что средний уровень температуры молекулярного плавления ДНК из тканей крыс с лейкозом в среднем на 1,0—1,5 °С ниже, чем препаратов ДНК, полученных от здоровых особей. При этом ширина интервала температурного перехода спираль — клубок препаратов ДНК из тканей пораженных лейкозом крыс в среднем на 0,2—0,4 °С больше контрольных показателей. Аналогичный характер имеют изменения показателей температуры плавления ДНК селезенки мышей, зараженных лейкозом Раушера, которые в среднем на 1,5 °С ниже контрольных значений.

Полученные сведения относительно величины температуры молекулярного плавления и ширины интервала температурного перехода препаратов ДНК здоровых и пораженных лейкозом тканей дают основание заключить, что препараты ДНК пораженных лейкозом тканей характеризуются сниженной термостабильностью. Учитывая особен-

Таблица 1

Содержание белка и РНК и величина гиперхромного эффекта (в %) в препаратах ДНК из тканей здоровых и пораженных лейкозом крыс и мышей ( $M \pm m$ ;  $n=8$ )

Источник препарата ДНК	Белок		РНК		Гиперхромный эффект	
	контроль	лейкоз	контроль	лейкоз	контроль	лейкоз
<b>Крысы</b>						
Печень	0,49±0,2	0,84±0,03*	1,04±0,09	1,74±0,14*	37,1±0,3	33,5±0,3*
Селезенка	0,46±0,04	0,89±0,04*	1,18±0,09	1,80±0,12*	37,0±0,2	33,7±0,1*
Опухоль	1,09±0,07	1,09±0,07*		2,14±0,12*		33,4±0,4*
<b>Мыши</b>						
Селезенка	0,56±0,07	0,91±0,03*	1,06±0,08	1,84±0,13*	—	—

Примечание. Здесь и в табл. 2: звездочка —  $p < 0,05$ ; для опухоли приведена достоверность относительно контрольных величин печени.

Характеристика некоторых физико-химических свойств препаратов ДНК тканей здоровых и пораженных лейкозом крыс и мышей ( $M \pm m$ ;  $n=8$ )

Исследуемый показатель	Печень		Селезенка		Опухоль
	контроль	лейкоз	контроль	лейкоз	
Температура плавления, °С:					
1	86,2±0,1	85,1±0,1*	86,6±0,2	85,1±0,2*	84,9±0,1*
2	—	—	86,5±0,1	85,0±0,1*	—
Температурный интервал плавления, °С:					
1	8,50±0,09	8,66±0,05	8,64±0,07	9,06±0,09*	9,66±0,14*
2	—	—	8,56±0,07	8,75±0,11	—
Характеристическая вязкость, дл/г:					
1	68,26±1,64	53,60±1,29*	64,29±1,22	47,84±1,38*	48,90±1,65*
2	—	—	66,30±1,01	47,00±1,65*	—

Примечание. 1 — крысы, 2 — мыши.

ности молекулярной организации ДНК, можно допустить, что определенный вклад в снижение термостабильности вторичной структуры ДНК вносят разрыв водородных связей, изменение нуклеотидного состава или деполимеризации макромолекулы.

Вопрос о причастности процессов деполимеризации к снижению термостабильности ДНК из тканей пораженных лейкозом крыс и мышей решался путем определения характеристической вязкости ДНК, позволяющей охарактеризовать размер, форму и конформационные особенности в молекуле [3].

При исследовании характеристической вязкости препаратов ДНК важно было выяснить не только влияние злокачественного процесса на конформационные параметры нуклеиновой кислоты, но и роль тканевых и видовых факторов. Для решения этих вопросов изучены препараты ДНК печени и селезенки здоровых и пораженных лейкозом крыс, а также опухоли, возникающей на месте инокуляции лейкозного материала, и селезенки здоровых и пораженных лейкозом линейных мышей (см. табл. 2). Характеристическая вязкость препаратов ДНК печени и селезенки здоровых крыс имеет приблизительно одинаковые значения. При сравнении этих данных с аналогичными результатами крыс-опухоленосителей видно, что характерной особенностью препаратов ДНК этих животных является снижение показателей характеристической вязкости. Степень снижения вязкости для различных препаратов ДНК приблизительно одинакова, хотя более выражена для селезенки. Вязкость препаратов ДНК из опухоли сходна с вязкостью ДНК селезенки пораженных лейкозом крыс.

Лейкозный процесс у мышей оказывает одинаковое действие на конформационные характеристики препаратов ДНК, выражающееся достоверным снижением величин вязкости в условиях сформированного лейкоза.

Таким образом, результаты сравнительного исследования температуры молекулярного плавления, ширины интервала температурного перехода и характеристической вязкости препаратов ДНК различных органов здоровых и пораженных лейкозом крыс и мышей дают основание заключить, что злокачественный процесс существенно снижает термостабильность молекулы ДНК, особенно опухоли. Снижение стабильности вторичной структуры ДНК лейкозных тканей сопровождается снижением величины характеристической вяз-

кости, свидетельствующим о нарушениях конформации макромолекулы.

Полученные нами результаты о снижении температуры молекулярного плавления ДНК лейкозных тканей согласуются с данными работы [5], в которой доказано достоверное увеличение участков локальной денатурации в ДНК раковых клеток.

Установление факта снижения температуры молекулярного плавления нуклеиновых кислот лейкозных тканей, содержащих повышенные количества белковых примесей, в совокупности с имеющимися сведениями о роли прочно связанных с ДНК белков (гистонов) в регуляции генетических процессов дает основание предположить, что снижение термостабильности ДНК лейкозных тканей обусловлено увеличением белковой компоненты. Другими словами, имеются основания отождествить причины увеличения участков локальной денатурации ДНК раковых клеток и снижения термостабильности ДНК лейкозных клеток.

На участках локально денатурации, увеличивающихся в молекуле нуклеиновой кислоты в процессе трансформации ткани, функциональные группы, активно взаимодействуя с белками [1, 5] или металлами, препятствуют процессу комплементарного спаривания азотистых оснований двух спиралей. Модифицированная стабилизирующая система в макромолекуле изменяет подвижность жестких фрагментов макромолекулы и приводит к формированию нового термодинамического равновесия.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Андроникашвили Э. Л. Современное состояние вопроса о мутагенезе и канцерогенезе.— Тбилиси, 1984.
2. Бабенко Г. А., Мазепа И. В., Мосулишвили Л. М. и др. // Укр. биохим. журн.— 1980.— Т. 52, № 5.— С. 551—555.
3. Васильев Ю. М. // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева.— 1986.— Т. 31, № 3.— С. 252—259.
4. Жижина Г. П., Бобович С. И., Круглякова К. Е. // Докл. АН СССР.— 1973.— Т. 209, № 5.— С. 1142—1145.
5. Жижина Г. П., Круглякова К. Е., Тодоров И. Н., Эмануэль Н. М. // Успехи соврем. биол.— 1986.— Т. 101, № 1.— С. 3—17.
6. Збарский И. Б. // Там же.— 1972.— Т. 73, № 1.— С. 3—25.
7. Фрайфельдер Д. Физическая биохимия.— М., 1980.
8. Мартур J. A. // J. biol. Chem.— 1961.— Vol. 3, N 1.— P. 203—218.
9. Zimm B. H., Crothers D. M. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1962.— Vol. 48, N 5.— P. 905—911.

Поступила 28.01.92

Stability of secondary structure was studied in DNA preparations obtained from healthy and leukemic rats and mice of BALB/c strain by means of estimation of molecular melting point temperature, of the temperature-dependent transition interval and specific viscosity. The secondary structure stability and values of the DNA specific viscosity were decreased in the DNA preparations obtained from liver, spleen tissues and tumors of rats with Shvetz leukemia and from spleen of mice infected by Rausher viral leukemia as compared with these patterns of healthy animals. Strain- and tissue-dependent alterations of the patterns studied were not found.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 612.822.2.014.46:615.221

А. И. Фоменко, С. П. Степаненко, П. К. Пархомец, Г. В. Донченко

### ВЛИЯНИЕ NAD НА ЗАХВАТ И ВЫСВОБОЖДЕНИЕ $^{14}\text{C}$ -ГАМК ПРИ ВВЕДЕНИИ КОНВУЛЬСАНТА

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

Нарушение функционирования ГАМК-ергической системы при расстройствах психической деятельности и действии антидепрессантов показано в результате нейрофармакологических и нейрофизиологических исследований последних лет [7, 8, 13, 18], на основании которых была сделана попытка сформулировать ГАМК-ергическую гипотезу развития депрессии [11]. Однако, несмотря на доказательство участия ГАМК-ергической системы в развитии неврологических заболеваний, связанных с судорожно-пароксизмальными состояниями, конкретная роль тормозной системы в указанных процессах остается при этом неясной.

Судорожная активность не только затрагивает изменение уровня ГАМК, ферментов ее синтеза и распада [6], но и приводит к значительным нарушениям в системах, ответственных за пре- и постсинаптическое торможение [13, 15, 17].

Одним из лекарственных препаратов, модулирующих ГАМК-ергическую передачу, является никотинамид, который используют наряду с бензодиазепинами для лечения судорожных состояний.

Функциональная связь никотинамидных нуклеотидов с ГАМК-ергической системой была установлена в исследованиях по взаимодействию никотинамида и NAD с участками специфического связывания бензодиазепинов на ГАМК-бензодиазепиновом рецепторном комплексе нейрональных мембран [1]. Показано, что ГАМК-бензодиазепиновый рецепторный комплекс может вовлекаться в механизм действия никотинамида в нервной клетке [2].

Никотинамид опосредованно через NAD конкурирует за участки связывания бензодиазепинов и усиливает ГАМК-ергическую передачу [3]. Однако оставалось неизвестным, какая система

тормозного контроля — пре- или постсинаптическая — принимает участие в действии NAD на ГАМК-ергическую передачу. Выяснение этого вопроса и составило основную цель работы.

**Методика.** Опыты проводили на крысах-самцах массой тела 120–150 г. Никотинамид вводили внутривенно из расчета 150 мг на 1 кг массы тела животного 2 раза в сутки на протяжении недели. Коразол вводили контрольным животным или на фоне введенного никотинамида из расчета 30 мг на 1 кг массы тела за 50 с до декапитации (в фазе, предшествующей началу эпилептогенных судорог).

Синапсосомы и синаптические мембраны из коры головного мозга контрольных и подопытных животных выделяли, используя градиент сахарозы [4]. Все буферы содержали 0,5 мМ фенолметилсульфонилфторид (PMSF).

Захват  $^{14}\text{C}$ -ГАМК синапсосомами определяли в среде общим объемом 0,2 мл, содержащей 5 мМ трис-HCl-буфер pH 7,4, 120 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 1 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 0,5 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 10 мМ глюкозу, 1 мМ гидроксиламин, 1 мМ PMSF, 100 мкг белка синапсосом, различные количества 4-амино- $n$ - $^{14}\text{C}$ -ГАМК (удельная активность 232 мКи/ммоль, «Amersham», Англия). После 3 мин инкубации при 37 °C пробы быстро фильтровали через фильтры GF/C («Whatman»), затем промывали 5 мМ трис-HCl-буфером, не содержащим ионов, и подсчитывали радиоактивность на фильтрах. При изучении влияния NAD на захват  $^{14}\text{C}$ -ГАМК синапсосомами преинкубировали в течение 5 мин с NAD в концентрации  $10^{-6}$  М при 32 °C, а затем проводили инкубацию, как описано выше. Захват выражали в пикомолях  $^{14}\text{C}$ -ГАМК, накопленного синапсосомами за 3 мин.

Высвобождение  $^{14}\text{C}$ -ГАМК из синапсосом, полученных из мозга контрольных и подопытных животных, изучали, используя перфузионную камеру.

Синапсосомы, содержащие 100 мкг белка, после преинкубации в течение 5 мин при 37 °C инкубировали в течение 5 мин с радиоактивной ГАМК в условиях, описанных выше для захвата  $^{14}\text{C}$ -ГАМК, с добавлением ингибитора синтеза ГАМК 1 мМ гидроксиламина. Содержимое проб с нагретыми радиолигандами синапсосомами помещали на фильтр GF/C («Whatman»), находящийся в перфузионной камере. Пробы промывали под давлением 4 мл 5 мМ трис-HCl, не содержащим ионов, и затем проводили перфузию со скоростью 0,8 мл в 1 мин раствором, используемым для инкубации. Фракции отбирали через каждые 30 с и подсчитывали радиоактивность, используя сцинтилляционную жидкость СЖ-103. При изучении влияния NAD на высвобождение  $^{14}\text{C}$ -ГАМК из синапсосом в используемый для перфузии буфер добавляли NAD в концентрации  $10^{-6}$  М.

Содержание ГАМК определяли радиолигандным методом по вытеснению меченого  $^3\text{H}$ -муцимола из участков его специфической связи с ГАМК-рецепторным комплексом синаптических мембран, обработанных триптоном X-100 [14]. Пробы для определения ГАМК готовили следующим образом: 1 г мозга гомогенизировали с 3 мл холодной дистиллированной воды, затем добавляли 0,4 мл 50 % сульфосалициловой кислоты. Экстракт центрифугировали 15 мин при 20 000 г. В инкубационную смесь для связывания  $^3\text{H}$ -муцимола брали по 10 мкл разведенного в 25 раз экстракта.

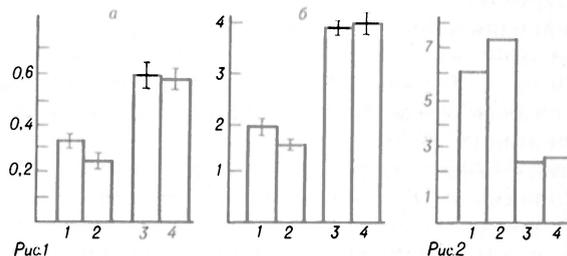


Рис. 1. Содержание (в мкмоль на 1 г ткани) NAD (а) и ГАМК (б) в коре головного мозга крыс.

Здесь и на рис. 2: 1 — контроль; 2 — введение коразола; 3 — введение никотинамида; 4 — введение никотинамида + коразола.

Рис. 2. Захват  $^{14}\text{C}$ -ГАМК (в имоль на 100 мкг белка) синапсосомами коры головного мозга крыс.

Содержание NAD определяли по методу [10].  
Белок определяли по методу [12].

**Результаты и обсуждение.** Многие распространённые заболевания нервной системы характеризуются резкими сдвигами уровня никотинамидных коферментов в мозгу [5]. При введении больших доз никотинамида, используемого в клинике наряду с другими препаратами для лечения заболеваний, связанных с судорожным состоянием, наблюдается умеренное повышение уровня никотинамидных динуклеотидов в головном мозге. Для выяснения роли NAD в регуляции судорожной активности нами был исследован ответ ГАМК-ергической тормозной системы на хроническое введение никотинамида контрольным животным и животным с введенным конвульсантом.

В связи с данными об ограниченном проникновении предшественников NAD в мозг возник вопрос о создании подходящей модели, позволяющей значительно увеличить уровень NAD в мозге. Обычно никотинамид в используемых дозах (150 и 250 мг на 1 кг массы животного) вызывает незначительное повышение уровня NAD в мозге. Некоторые исследователи при изучении метаболизма нейротрансмиттеров применяли однократную дозу — 1000 мг никотинамида на 1 кг массы тела [9], которая значительно превосходит применяемую в клинике. В связи с этим мы вводили никотинамид в течение недели 2 раза в сутки по 150 мг на 1 кг массы тела. Животных забивали через 6 ч после последней инъекции. При длительном введении никотинамида наблюдается значительное увеличение уровня как NAD, так и ГАМК в коре головного мозга подопытных крыс (рис. 1).

При введении конвульсанта интактным животным уже через 50 с (до начала судорог) наблюдается снижение уровня NAD и ГАМК на 23 и 20 % соответственно по сравнению с контролем (см. рис. 1). В то же время на фоне дополнительного введения никотинамида указанный эффект конвульсанта не проявлялся.

Приимая во внимание данные литературы о способности никотинамида усиливать действие ряда наркотических и снотворных веществ, а также функциональное сходство с диазепамом [9], результатом действия которого является усиление ГАМК-ергической синаптической передачи, нами были предприняты исследования состояния систем захвата и высвобождения нейромедиатора, участвующих в реализации тормозного действия ГАМК при дополнительном введении никотинамида.

Через 50 с после введения животным конвульсанта (рис. 2) наблюдается увеличение захвата  $^{14}\text{C}$ -ГАМК, что свидетельствует о снижении тормозного эффекта ГАМК. В этих экспериментах использовали 1,1 мкМ  $^{14}\text{C}$ -ГАМК. В условиях длительного введения никотинамида, сопровождающегося повышением уровня NAD и ГАМК в мозге (см. рис. 1), наблюдается заметное торможение (на 60 %) захвата  $^{14}\text{C}$ -ГАМК синапсосомами, что происходит при эпилепсии после введения антиконвульсантов, блокирующих поступление ГАМК обратно в нейрон.

Таким образом, в результате введения никотинамида повышается уровень эндогенной ГАМК, снижается накопление синапсосомами

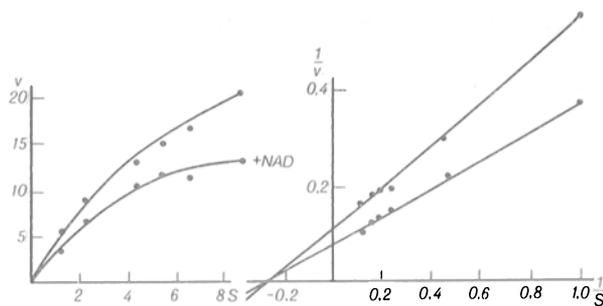


Рис. 3. Влияние NAD на кинетику захвата  $^{14}\text{C}$ -ГАМК синапсосомами контрольных животных.

*a* — зависимость захвата  $^{14}\text{C}$ -ГАМК ( $v$ , нмоль на 100 мкг белка за 1 мин) от концентрации субстрата ( $S$ , мкМ); *b* — та же зависимость в координатах Лайнуивера — Берка.

экзогенной  $^{14}\text{C}$ -ГАМК и удлиняется тем самым время существования ГАМК в синаптической щели, что приводит к активированию ГАМК-ергической передачи.

В условиях этих опытов введенный коразол не снижал тормозной эффект ГАМК (см. рис. 2). Не исключено, что активация биосинтеза NAD при введении никотинамида способствует адаптации организма к экстремальным воздействиям. Основанием для этого предположения являются результаты проведенных нами ранее опытов *in vitro* о специфическом взаимодействии NAD с ГАМК-бензодиазепиновым комплексом в концентрациях, на 3 порядка меньших, чем никотинамид [3]. Для подтверждения возможности реализации эффекта никотинамида на захват ГАМК опосредованно через NAD исследована кинетика интенсивности захвата  $^{14}\text{C}$ -ГАМК синапсосомами контрольных животных и животных с введенным конвульсантом при действии NAD. Согласно полученным данным,  $K_m$  захвата  $^{14}\text{C}$ -ГАМК синапсосомами животных с повышенной судорожной активностью (рис. 3) практически не отличается от  $K_m$  контрольных животных (рис. 4) и составляет соответственно 4,16 и 3,84 мкМ. Увеличение захвата  $^{14}\text{C}$ -ГАМК синапсосомами животных с введенным конвульсантом происходило за счет изменения  $V_{\text{макс}}$

При изучении кинетики захвата  $^{14}\text{C}$ -ГАМК синапсосомами при действии NAD показано, что он тормозит захват  $^{14}\text{C}$ -ГАМК синапсосомами более эффективно у животных с введенным конвульсантом (см. рис. 4) по сравнению с контролем (см. рис. 3).

Кинетическими исследованиями показано, что торможение NAD захвата  $^{14}\text{C}$ -ГАМК синапсосомами является неконкурентным и напоминает то, ко-

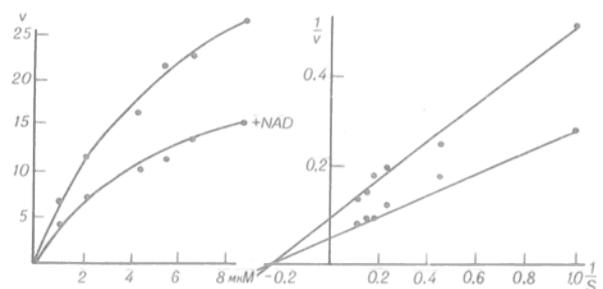


Рис. 4. Влияние NAD на кинетику захвата  $^{14}\text{C}$ -ГАМК синапсосомами при введении коразола.

Обозначения те же, что на рис. 3.

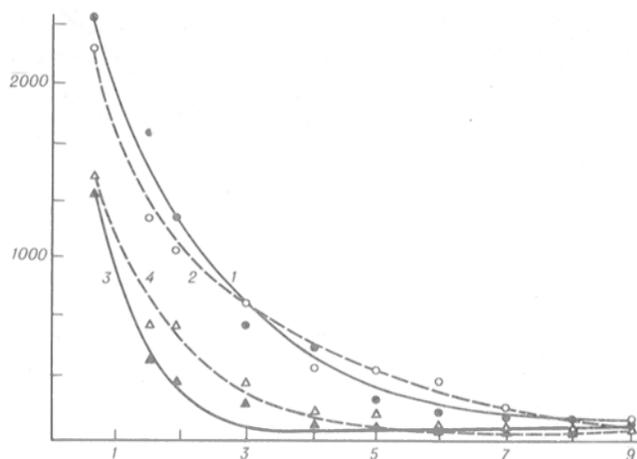


Рис. 5. Высвобождение  $^{14}\text{C}$ -ГАМК (в имп/мин на фракцию) из синапсосом.

По оси абсцисс — время, мин. 1 — контроль; 2 — контроль+NAD; 3 — введение коразола; 4 — введение коразола+NAD.

торое оказывают бензодиазепины, проявляя антиконвульсантный эффект [16].

В связи с тем что эффект многих фармакологических агентов достигается через воздействие на физиологическое высвобождение ГАМК [13], нами для характеристики вклада этой потенциально важной пресинаптической системы контроля в реализацию действия NAD на ГАМК-ергическую передачу было изучено высвобождение  $^{14}\text{C}$ -ГАМК из нагруженных меткой синапсосом при различных модельных состояниях. Показано, что спонтанное высвобождение  $^{14}\text{C}$ -ГАМК проходило практически за 10 мин. Высвобождение  $^{14}\text{C}$ -ГАМК заметно тормозилось на первых минутах у животных, которые находились в состоянии повышенной судорожной активности после введения коразола (рис. 5). При этом торможение высвобождения нейромедиатора коррелировало с содержанием ГАМК у подопытных животных (см. рис. 1).

При исследовании влияния NAD на кинетику высвобождения изучаемого нейромедиатора из синапсосом контрольных животных и животных с введенным конвульсантом было показано, что NAD в концентрации, при которой проявлялся тормозящий эффект на процесс накопления синапсосомами ГАМК, не оказывал влияния на ее высвобождение (см. рис. 5).

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что системное введение никотинамида, сопровождаемое повышением уровня NAD и ГАМК, способствует восстановлению постсинаптического тормозного действия ГАМК при стрессовом воздействии. При этом действие NAD на ГАМК-ергическую передачу осуществляется в основном на постсинаптическом уровне, о чем свидетельствуют данные по изучению влияния NAD на системы захвата и высвобождения тормозного нейротрансмиттера.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Фоменко А. И., Пархомец П. К., Степаненко С. П., Донченко Г. В. // Укр. биохим. журн.— 1991.— Т. 63, № 3.— С. 65—69.
2. Фоменко А. И., Степаненко С. П., Пархомец П. К. // Всесоюзная конф. «Клиническая витаминология»: Тезисы.— М., 1991.— С. 45—46.

3. Фоменко А. И., Халмуратов А. Г., Пожарун С. В., Степаненко С. П. // Нейрохимия.— 1988.— Т. 7, № 1.— С. 26—32.
4. Abita J., Chicheportiche R., Schwetz H., Lozdunski M. // Biochemistry (Wash.).— 1977.— Vol. 16, N 9.— P. 1838—1864.
5. Bonavita Y., Guarneri R., Amor G. // J. Neurochem.— 1970.— Vol. 17, N 8.— P. 1613—1614.
6. Casey K. E., Wood J. D. // Comp. Biochem. Physiol.— 1973.— Vol. B-45, N 4.— P. 741—748.
7. Claude G., Waster-Lain C. G., Morin A. M., Dwyer B. E. // Handbook of Neurochemistry.— London, 1983.— Vol. 10.— P. 339—419.
8. Enna S. J. // Biochem. Pharmacol.— 1981.— Vol. 30, N 9.— P. 907—913.
9. Kennedy B., Leonard B. E. // Biochem. Soc. Trans.— 1980.— Vol. 8, N 1.— P. 59—60.
10. Klingenberg M. // Methods of Enzymatic Analysis.— New York, 1963.— P. 528.
11. Lloyd K. G., Zivkovic B., Morselli P. L. // Progr. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiat.— 1989.— Vol. 13, N 3—4.— P. 343—351.
12. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem.— 1951.— Vol. 193, N 1.— P. 265—275.
13. Meldrum D. S. // Clin. Neuropharmacol.— 1982.— Vol. 6, N 1.— P. 293—316.
14. Mousah A., Jacqmin P., Lesne M. // Clin. chim. Acta.— 1987.— Vol. 170, N 2—3.— P. 151—160.
15. Olsen R. W. // Molec. Cell Biochem.— 1984.— Vol. 39, Pt 2.— P. 261—279.
16. Olsen R. W., Lamar E. E., Bayless J. D. // J. Neurochem.— 1977.— Vol. 28, N 2.— P. 299—309.
17. Ross S. M., Craig C. R. // Ibid.— 1981.— Vol. 36, N 3.— P. 1006—1011.
18. Wood J. D. // Progr. Neurobiol.— 1975.— Vol. 5, N 1.— P. 77—79.

Поступила 24.10.91

#### EFFECT OF NAD ON BINDING AND LIBERATION OF $^{14}\text{C}$ -GABA IN ADMINISTRATION OF THE CONVULSION PRODUCING DRUG

A. I. Fomenko, S. P. Stepanenko, P. K. Parkhomets, G. V. Donchenko

A. V. Palladin Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Ukraine, Kiev.

Administration of corazole into animals led to a decrease in content of NAD and  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) in brain. Under these conditions, binding of  $^{14}\text{C}$ -GABA was increased and its liberation was inhibited in the synaptosomes of the brain cortex. Additional administration of nicotinamide, accompanied by considerable increase in content of NAD and GABA, caused a decrease in accumulation of exogenous GABA in the synaptosomes and removed the effects produced by the convulsant agent. Kinetics of  $^{14}\text{C}$ -GABA binding in the presence of NAD demonstrated that the more effective inhibition of the binding occurred in the animals treated with the convulsant drug. NAD appears to affect the GABA-ergic transmission at the postsynaptic level.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.36-018.1-008.939.6-02:[615.849.112+615.831.4]-07

Н. А. Мулякко, С. М. Васильева, Г. В. Донченко

#### ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ СОДЕРЖАНИЕМ НАД И СКОРОСТЬЮ РЕПАРАЦИИ ИНДУЦИРОВАННЫХ РАЗРЫВОВ ДНК ЯДЕР ПЕЧЕНИ КРЫС

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

В настоящее время накоплено достаточно экспериментальных данных, подтверждающих факт участия поли(АДФ-рибозил)ирования ядерных белков в процессе репарации повреждений ДНК, индуцированных  $\gamma$ -УФ-облучением и действием алкилирующих агентов [14]. Однако меха-

низ этого участия до сих пор остается невыясненным.

Субстратом поли(АДФ-рибозил)ирования является НАД, а степень поли(АДФ-рибозил)ирования ядерных белков зависит от внутриядерного содержания НАД [1]. При индукции повреждений ДНК N-метилнитрозомочевинной, помимо увеличения активности поли(АДФ-рибозо)полимеразы, в печени цыплят обнаружено возрастание НАД-пирофосфорилазной активности [4]. Показано, что никотинамид стимулирует репаративный синтез ДНК в лимфоцитах человека, подвергнутых УФ-радиации [8]. При добавлении к спленоцитам мыши конканавалина А, который индуцирует репарацию [10], получена четкая корреляция во времени увеличения внутриклеточной концентрации НАД с увеличением поли(АДФ-рибозо)полимеразной активности и с уменьшением количества разрывов цепи ДНК. Это согласуется с выводом других авторов [12], что никотинамид, добавленный в культуральную среду, защищает лимфоциты человека от повреждения  $\gamma$ -радиацией. При этом было высказано предположение, что НАД может служить скоростным лимитирующим фактором для эксцизионной репарации в исследуемых клетках.

Целью настоящего исследования явилось изучение интенсивности процессов репарации ДНК ядер печени крыс после обработки их интеркалирующим в ДНК агентом — бромистым этидием — в условиях различного содержания НАД.

**Методика.** Опыты проводили на крысах линии Вистар массой тела 150—200 г. Ядра из клеток печени получали по методу [13]. Содержание НАД в хлоратных экстрактах гомогенатов печени определяли спектрофотометрически по специфическому его восстановлению при участии дрожжевой алкогольдегидрогеназы [11].

Контроль за расщеплением ДНК в ядрах проводили по методу [5], основываясь на соотношении экстинции при 260 нм кислоторастворимой и кислотонерастворимой фракций аликвот инкубационной смеси.

Поли(АДФ-рибозо)полимеразную активность определяли по связыванию  $^{14}\text{C}$ -НАД с удельной радиоактивностью 310 мКи/ммоль («Amersham», Англия) с кислотонерастворимым материалом на фильтрах «Сынпор» с диаметром пор 0,4 мкм [15]. Внеплановый синтез ДНК изучали по методу [7] с использованием в инкубационной среде 12 мКи  $^3\text{H}$ -ТТФ («Amersham», Англия) и 80 мКи АТФ, ГТФ, ЦТФ. Инкубацию проводили в трис-НСl-буфере рН 7,5 с добавлением 20 мМ гидроксимочевины («Colbiochem», США). Реакцию останавливали через 30 мин добавлением холодной 10 % ТХУ и 2 % пирофосфата натрия. Радиоактивность считали на фильтрах «Сынпор» с диаметром пор 0,2 мкм в жидкостном сцинтилляционном счетчике «Beckman» (США).

Для определения НАД-пирофосфорилазной активности аликвоты ядер инкубировали 20 мин при 38 °С в среде, содержащей 0,25 М глицил-глициновый буфер рН 7,4, 0,5 мкМ АТФ, 0,3 мкМ никотинамидмоноуклеотид («Serva», Германия), 30 мкМ никотинамид, 1,5 мкМ MgCl и 1 мг белка в общем объеме 0,8 мл [6]. О НАД-пирофосфорилазной активности судили по количеству НАД, образовавшемуся в условиях инкубации.

Содержание белка определяли по методу [9], предварительно подвергая ядра гипотоническому шоку.

**Результаты и обсуждение.** Ранее нами было показано, что введенные животным никотиновая кислота и никотинамид в качестве предшественников биосинтеза НАД стимулирует синтез кофермента [3]. На основании результатов этих исследований мы избрали путь стимуляции биосинтеза НАД введением животным никотинамида в дозе 500 мг/кг массы на 3 ч с целью увеличения внутриядерного содержания НАД. Также было установлено значительное (до 23 %) повышение выхода кислоторастворимого материала ДНК при введении цыплятам бромистого этидия [2]. В условиях предварительного введения птицам никотинамида бромистый этидий не вызывает столь существенных разрушений ДНК. Вероятно, это связано с увеличением внутриядерного содержания НАД в печени и его влиянием на нуклеазную активность ядер. Исходя из этого предположения, мы исследовали содержание НАД в печени контрольных животных и крыс на фоне введения им никотинамида после обработки печени бромистым этидием.

Как показано на рис. 1, содержание НАД в печени увеличивалось более чем в 3 раза после введения животным никотинамида. При этом через 5 мин инкубации с бромистым этидием содержание НАД в печени подопытных животных резко падает, в то время как у контрольных животных остается практически на исходном уровне. В течение последующих 10 мин инкубации уровень НАД в печени подопытных животных на 12 % выше такового контрольных. После 20 мин инкубации с мутагеном содержание НАД в печени животных обеих групп снижается, достигая 240 нмоль на 1 г ткани. Кроме этого, обнаружено, что НАД в печени животных опытной группы интенсивно расходуется в первые 5 мин после внесения в среду мутагена. Можно предположить, что его распад происходит преимущественно по гликозидной связи с образованием большого

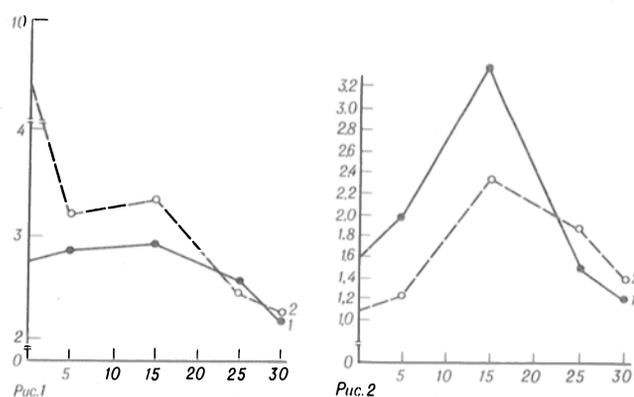


Рис. 1. Динамика изменения содержания НАД при инкубации с бромистым этидием ткани печени крыс в контроле (1) и при введении им никотинамида (2).

По оси абсцисс — время инкубации, мин; по оси ординат — содержание НАД, нмоль · 10<sup>-2</sup> на 1 г ткани.

Рис. 2. НАД-пирофосфорилазная активность ядер при инкубации с бромистым этидием ткани печени крыс в контроле (1) и при введении им никотинамида (2).

По оси абсцисс — время инкубации, мин; по оси ординат — мкмоль НАД на 1 мг белка/мин.

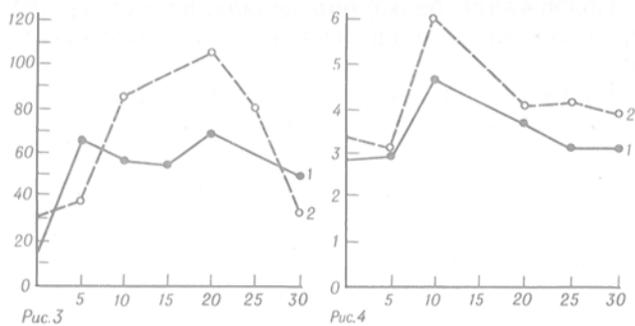


Рис. 3. Нуклеазная активность ядер при инкубации с бромистым этидием ткани печени крыс в контроле (1) и при введении им никотинамида (2).

По оси абсцисс — время инкубации, мин; по оси ординат — выход кислоторастворимого материала ДНК, %

Рис. 4. Внеплановый синтез ДНК ядер при инкубации с бромистым этидием ткани печени крыс в контроле (1) и при введении им никотинамида (2).

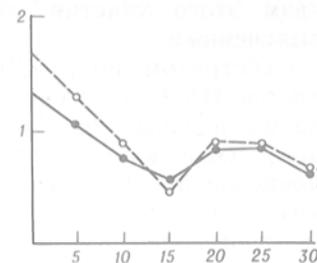
По оси абсцисс — время инкубации, мин; по оси ординат —  $\text{имп/мин} \cdot 10^{-3}$  на 1 мг ДНК.

количества никотинамида [14]. Однако в условиях нашего эксперимента (рис. 2) НАД-пирофосфорилазная активность ядер печени подопытных животных оказалась заметно ниже, чем в контроле. В то же время обращает на себя внимание тот факт, что НАД-пирофосфорилазная активность ядер печени животных обеих групп достигает максимального значения к 15 мин инкубации ткани с мутагеном, когда отмечается начало резкого снижения уровня НАД в печени. Это дает основание предположить, что по крайней мере в первые 10 мин инкубации ткани печени с мутагеном преобладают процессы синтеза НАД и использования его в качестве субстрата в реакциях поли(АДФ-рибозил)ирования, направленных на активацию репарации ДНК, и в таком случае указанные процессы должны преобладать именно у контрольных животных. У животных с повышенным содержанием НАД, где он быстро расходуется в течение 10 мин инкубации, по-видимому, НАД-пирофосфорилаза ингибируется значительным количеством освобожденного никотинамида. С целью проверки указанного предположения мы исследовали кинетику изменения степени разрушения ДНК и внепланового синтеза ДНК в печени контрольных крыс и крыс с предварительным введением никотинамида.

На рис. 3 представлены кривые выхода кислоторастворимого материала ДНК у животных контрольной и опытной групп при инкубации ткани печени с внесением в среду 200 мкг бромистого этидия на 1 г ткани. Через 5 мин после начала инкубации не наблюдается существенных изменений в нуклеазной активности ядер как в опыте, так и в контроле. Однако в последующие 15 мин нуклеазная активность резко повышается, достигая максимального значения через 10 мин после внесения мутагена у обеих групп исследованных животных. При этом в печени подопытных животных выход кислоторастворимого материала ДНК превышает на 28 % контрольный уровень. Это свидетельствует о том, что процесс вырезания участков ДНК с интеркалирующим агентом в условиях повышенного содержания НАД в печени происходит более интенсивно, хотя по времени не отличается от контроля.

Рис. 5. Поли(АДФ-рибозо)-полимеразная активность ядер при инкубации с бромистым этидием ткани печени крыс в контроле (1) и при введении им никотинамида (2).

По оси абсцисс — время инкубации, мин; по оси ординат —  $\text{имп/мин} \cdot 10^{-3}$  на 1 мг белка.



Из результатов, представленных на рис. 4, видно, что внеплановый синтез ДНК в процессе инкубации печени с бромистым этидием происходит довольно интенсивно. Репаративный синтез ДНК в печени животных контрольной группы уже через 5 мин после внесения мутагена увеличивается почти в 5 раз по сравнению с начальным его уровнем и существенно не изменяется в процессе последующей инкубации. В условиях предварительного введения животным никотинамида начальный уровень репаративного синтеза ДНК в печени оказался в 3 раза выше контрольного и в целом (за исключением первых 5 мин) в течение всего исследуемого интервала времени осуществлялся значительно интенсивнее, чем в контроле, достигая максимального значения в промежутке 10—20 мин после начала инкубации с мутагеном. Через 30 мин инкубации включение <sup>3</sup>H-ТТФ в печени животных опытной группы достигает исходного уровня, в то время как у контрольных животных этот процесс еще достаточно активен и превышает начальный уровень внепланового синтеза ткани почти в 4 раза. По-видимому, внеплановый синтез ДНК в печени стимулированных никотинамидом животных завершается быстрее, чем у контрольных.

Поскольку допускается, что участие НАД в репарации ДНК может осуществляться через поли(АДФ-рибозил)ирование ядерных белков [14] и показанная нами степень поли(АДФ-рибозил)ирования зависит от внутриядерного содержания НАД [1], представлялось целесообразным исследовать поли(АДФ-рибозо)иолимеразную активность ядер печени в условиях нашего эксперимента. Как видно на рис. 5, уровень поли(АДФ-рибозо)полимеразной активности ядер печени животных с повышенным содержанием НАД превышает таковой контрольных животных до внесения мутагена. После внесения мутагена поли(АДФ-рибозо)полимеразная активность ядер печени снижается у обеих групп животных. Однако поли(АДФ-рибозо)полимеразная активность печени животных опытной группы в первые 10 мин после начала инкубации оказывается выше, чем в контроле, что согласуется с повышенным содержанием НАД в этом интервале времени, т. е. расщепление НАД на поли(АДФ-рибозил)ирование ядерных белков, возможно, не является единственным путем его использования в процессе репарации ДНК.

Таким образом, согласно полученным данным, значительное увеличение содержания НАД в печени животных после предварительного введения им никотинамида способствует более интенсивному протеканию репаративных процессов, что выражается в повышении уровня внепланового синтеза ДНК и нуклеазного ее расщепления по сравнению с контролем.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Муляво Н. А., Халмуратов А. Г. // Биохимия.— 1981.— Т. 49, № 10.— С. 1623—1627.
2. Муляво Н. А., Петик А. В., Донченко Г. В. // Там же.— 1989.— Т. 54, № 1.— С. 140—144.
3. Халмуратов А. Г. О метаболизме никотиновой кислоты и 3-метилпиридина в тканях животных и его регуляция: Дис. ... д-ра биол. наук.— Киев, 1974.— С. 99.
4. Халмуратов А. Г., Муляво Н. А. // Биохимия.— 1985.— Т. 50, № 5.— С. 844—848.
5. Ходарев Н. П., Вотрин И. И., Дебов С. С. // Вопр. мед. химии.— 1981.— № 4.— С. 539—544.
6. Atkinson M. R., Jackson J. F., Merton R. N. // Nature.— 1961.— Vol. 192, N 4806.— P. 946—949.
7. Berger N. A., Johnson E. S. // Biochim. biophys. Acta.— 1976.— Vol. 425, N 1.— P. 1—17.
8. Berger N. A., Sicorsci G. W. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1980.— Vol. 95, N 1.— P. 67—72.
9. Bradford M. M. // Analyt. Biochem.— 1976.— Vol. 72.— P. 248—254.
10. Greer W. L., Kaplan J. G. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1984.— Vol. 122, N 1.— P. 366—372.
11. Kirchner J., Watson J., Chaykin S. // J. biol. Chem.— 1966.— Vol. 241, N 3.— P. 851—853.
12. Kol R., Ben-Hur E. // Radiat. Environ. Biophys.— 1983.— Vol. 22.— P. 133—140.
13. Pennual R., Sunders J., Lin S. H. M. // Biochemistry (Wash.).— 1964.— Vol. 3, N 10.— P. 1454—1459.
14. Shall S. // Advanc. Radiat. Biol.— 1984.— Vol. 11.— P. 1—89.
15. Tanigawa I., Kawamura M., Shimoyama M. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1977.— Vol. 76, N 2.— P. 406—412.

Поступила 03.03. 92

## CORRELATION BETWEEN CONTENT OF NAD AND THE RATE OF REPAIR OF THE BREAKS INDUCED IN DNA OF RAT LIVER CELL NUCLEI.

N. A. Mulyavko, S. M. Vasilyeva, G. V. Donchenko

A. V. Palladin Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Ukrain, Kiev.

Within 3 hrs after administration of NAD into rats at a dose of 500 mg/kg of body mass more than a 3-fold increase in content of the nicotinamide in liver tissue, an increase in output of acid soluble material from DNA by 28%, 3-fold activation of the DNA reparative synthesis simultaneously with a decrease in NAD-pyrophosphorylase activity by 31% in liver tissue were detected during reparation of the DNA breaks induced after incubation with ethidium bromide under conditions of NAD excess in liver tissue. Distinct decrease in content of NAD as well as in activity of poly(ADP-ribose)polymerase was found in rat liver nuclei of both control and experimental animals during incubation of liver tissue with ethidium bromide. The rate of the DNA reparative synthesis was shown to correlate directly with the poly(ADP-ribose) polymerase activity and with the content of NAD in liver tissue.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 612.124:547.962.41.08

С. Г. Жабин, Н. А. Зорин, В. С. Горин,  
О. Ф. Лыкова

## ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ КОМПЛЕКСОВ МАКРОГЛОБУЛИНОВ С ПЛАЗМИНОМ

ЦНИИЛ Новокузнецкого института усовершенствования врачей

Установлено, что наиболее важными ингибиторами плазмина (ПЛ) являются  $\alpha_2$ -антиплазмин (АП) и  $\alpha_2$ -макроглобулин (МГ) [1, 8]. Оба

этих ингибитора образуют устойчивые комплексы с ПЛ, однако природа их совершенно различна. В результате взаимодействия этой сериновой протеиназы с серпинами, к которым относятся, кроме АП,  $\alpha_1$ -антихимотрипсин,  $\alpha_1$ -ингибитор протеиназы (ИП), антитромбин III (АТ III) и другие белки, остаток серина из активного центра фермента ковалентно связывается с карбонильной группой ингибитора, высвобождающейся при расщеплении специфической реактивной петли [11, 15, 17]. Фермент, находящийся в комплексе с серпином, утрачивает какую-либо протеолитическую или эстеразную активность. Реагируя с МГ, ПЛ также разрывает пептидную связь, но затем он попадает в полость одной из субъединиц, что вызывает значительную конформационную перестройку молекулы ингибитора и захлопывание «створки» этой полости, называемой «ловушкой» [1, 7]. Активный центр фермента остается свободным, но из-за стерических препятствий он не может взаимодействовать с крупными белками, например соевым ингибитором трипсина (СИТ). Такой же механизм связывания протеиназы установлен для гомологов МГ — ассоциированных с беременностью  $\alpha_2$ -гликопротеина (АБГ) и протеина А (РАРР-А) [3, 14]. Вместе с тем окончательно не выяснено, какого размера белковые полимеры способны проникать в полость «ловушки» этих МГ. Так, по данным К. Н. Веремеенко и соавт. [1], комплекс МГ — ПЛ довольно интенсивно лизирует фибрин, который является полимером со значительной молекулярной массой. Пока неизвестно, какая цепь ПЛ (легкая или тяжелая) взаимодействует с карбонильной группой остатка глутаминовой кислоты в молекуле МГ и его гомологов. В С-концевом отделе молекулы АП уже известны фрагменты, связывающие ПЛ [11], однако способен ли ПЛ взаимодействовать с цепями МГ и их фрагментами, до сих пор не установлено.

Поэтому целью настоящей работы явилось исследование ряда структурных характеристик комплексов ПЛ с МГ, АБГ и РАРР-А.

Методика. МГ выделяли из плазмы крови доноров цинк-хелатной хроматографией, а РАРР-А и АБГ последовательно извлекали из плазмы крови беременных женщин с помощью гепаринагарозы и иминодиуксуснокислой агарозы по уже описанным методикам [2, 3]. Для получения высокоочищенного препарата ИП использовали сочетание цинк-хелатной хроматографии на иминодиуксуснокислой агарозе («Кемотекс», Эстония) и ионообменной хроматографии [12]. АП был выделен из плазмы крови доноров с помощью аффинной хроматографии на плазминоген (ПЛГ)-агарозе [16]. ПЛГ получали аффинной хроматографией на лизин-агарозе [9] и последующей гель-хроматографией на сефадексе G-200 («Pharmacia», Швеция). Очистку АТ III производили на гепарин-агарозе, а примесные белки убирали затем ионообменной хроматографией на ДЭАЭ-сефадексе и гель-хроматографией на сефадексе G-200 [13]. Для трансформации ПЛГ в ПЛ использовали урокиназу, иммобилизованную на бронецианактивированной агарозе («Кемотекс», Эстония). Содержание активной фракции ПЛ и коммерческого препарата бычьего трипсина («Sigma», США)

оценивали с помощью 4-нитрофенол-4'-гуанидинобензоата («Sigma», США) [7]; в работе применяли препараты ПЛ и трипсина (ТР), содержащие соответственно 85 и 65 % активного энзима. Комплексы ПЛ с МГ конструировали посредством инкубации их эквимольных количеств в течение 1 ч при 37 °С. Непрореагировавшие компоненты удаляли гель-хроматографией на колонке (1,5×90 см) TSK-геля HW-60 («Toyo Soda», Япония). Поиск нужных фракций осуществляли как электрофорезом в градиенте (4—16 %) пор полиакриламидного геля (ПААГ) [5], так и путем определения остаточной амидазной активности ПЛ в присутствии СИТ или АП. Затем эти фракции диализовали против 0,1 М трис-НСI-буфера рН 7,5 и концентрировали диализом против декстрана с мол. м. 70 000 до концентрации 2 мг/мл. Протеолитическую активность комплексов оценивали следующим образом: 10 мг азофирина («Диагностикум», г. Львов) суспендировали в 1 мл 0,1 М трис-НСI-буфера рН 7,5 и добавляли 1 мл раствора комплекса, инкубировали смесь 1 ч при 37 °С, затем фильтровали ее через капроновые фильтры («Химифил», Таллинн). Далее к фильтру добавляли 10 мкл 5 М раствора NaOH и интенсивность окраски проб оценивали на спектрофотометре при длине волны 440 нм против контрольной пробы, где препарат был заменен рабочим буфером. Тест на остаточную амидазную активность проводили в плоскодонных планшетах фирмы «Flow» (США). К 80 мкл раствора комплекса приливали 80 мкл 0,1 М трис-НСI-буфера рН 7,5, содержащего в различных опытах следующие ингибиторы ПЛ: диизопропилфлуорофосфат (ДИ ПФФ; «Sigma», США) в концентрации 10 мМ, фенолметилсульфонилфторид (ФМСФ; «Реагент», Днепропетровск) в концентрации 10 мМ, тразилол («Вауег», Германия) в концентрации 500 КИЕ/мл, СИТ в концентрации 50 мкг/мл, а также ИП, АТ III, АП в концентрации 500 мкг/мл. Эти смеси инкубировали 30 мин при 37 °С, а затем вносили 40 мкл 1 мМ раствора субстрата S-2251 («Вектор», Новосибирск) диметилформамиде. После 30-минутной инкубации при 37 °С реакцию оста-

навливали добавлением 40 мкл концентрированной уксусной кислоты и проводили фотометрию при длине волны 405 нм. Аналогичным образом получали комплексы МГ с трипсином, а при оценке их остаточной гидролазной активности на соответствующем этапе вносили 40 мкл 5 мМ раствора N-бензоил-D,L-аргинин-пара-нитроанилида (БАПНА) в рабочем буфере.

Высокоочищенными препаратами ПЛГ иммунизировали кроликов, а затем из моноспецифических антисывороток выделяли антитела к ПЛГ с помощью иммобилизованного на агарозе антигена. Молекулярную структуру комплексов оценивали при помощи электрофореза в градиенте пор ПААГ (4—16 %) после обработки их додецилсульфатом натрия с восстановлением меркаптоэтанолом [5]. Фрагменты комплексов переносили электрофоретически на нитроцеллюлозу (тип ВА85, «Sigma», США) [6]. Блоты обрабатывали кроличьими аффинноочищенными антителами к ПЛГ, вторичными козьими антителами к иммуноглобулинам кролика, меченными пероксидазой хрена («Биос», Новосибирск). Для проявления полос использовали 3,3'-диаминобензидин («Sigma», США). ИП, АТ III, АП и МГ в нативной форме (конечная концентрация ингибиторов 100 мкг/мл) инкубировали с ТР (конечная концентрация фермента 1 мг/мл) в течение 1 и 24 ч при 37 °С. Затем проводили электрофорез в градиенте пор ПААГ (5—30 %) с обработкой додецилсульфатом натрия и меркаптоэтанолом, после чего осуществляли электроперенос на нитроцеллюлозу. Далее блоты инкубировали в растворе ПЛ (100 мкг/мл) в течение 2 ч при 37 °С. Иммунопроявление фрагментов, связывающих ПЛ, выполняли по описанной выше схеме.

Результаты и обсуждение. По данным электрофореза, молекулярная масса комплексов МГ с ПЛ была следующей: МГ — ПЛ — 810 кД. АБГ — ПЛ — 450 кД. РАРР-А — ПЛ — около 900 кД. Какие-либо примесные белки и фрагменты в их препаратах отсутствовали. Нами не обнаружена протеиназная активность данных комплексов в отношении азофирина. Такие же результаты для МГ — ПЛ получили ранее и другие

Влияние различных ингибиторов на амидазную активность комплексов МГ с ПЛ и ТР

Ингибитор		АБГ — ПЛ		МГ — ПЛ		РАРР-А — ПЛ	
		АБГ — ТР	МГ — ТР	МГ — ТР	РАРР-А — ТР		
ФМСФ	(0,17 кД)	—	—	—	—	—	—
ДИПФФ	(0,19 кД)	—	—	—	—	—	—
Тразилол	(6,5 кД)	—	—	—	—	—	—
СИТ	(21,7 кД)	—	+	+	+	+	+
ИП	(51,3 кД)	+	+	+	+	+	+
АТ III	(58,0 кД)	+	+	+	+	+	+
АП	(70,0 кД)	+	+	+	+	+	+

Примечание. — отсутствие активности фермента; + фермент активен. В числителе — показатель активности комплексов МГ с ПЛ, в знаменателе — с ТР. В скобках — молекулярная масса.

исследователи [7]. Гидролазная активность комплексов по отношению к синтетическим субстратам S-2251 и БАПНА была достаточно высокой, сведения об ее подавлении различными ингибиторами представлены в таблице.

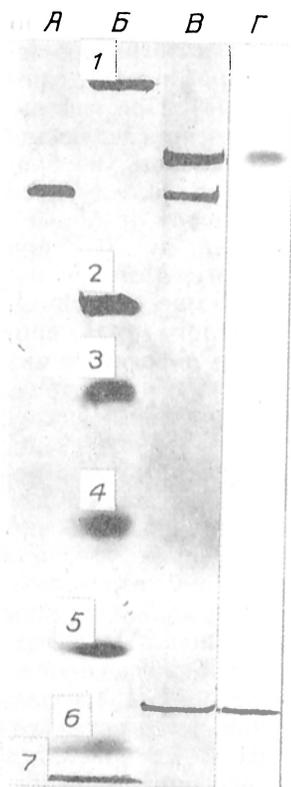
Таким образом, низкомолекулярные ингибиторы, имеющие мол. м. менее 6,5 кД, свободно проникают в полость «ловушки» МГ и блокируют активный центр находящихся там протеиназ. Следовательно, в плазме крови или в тканях субстратов для протеиназы, иммобилизованной на МГ, может оказаться не только пептид, но и небольшой белок. Как видно из таблицы, ПЛ и ТР в таких условиях защищены от инактивирующего воздействия своих естественных ингибиторов, например АП и ИП. По-видимому, малодоступны они и для кислотостабильного ингибитора трипсина мочи (22 кД) и цепи интер- $\alpha$ -трипсин ингибитора (30 кД) [4, 10]. Исключение составляет комплекс АБГ — ПЛ, который в присутствии СИТ теряет свою амидазную активность. Объяснить этот факт можно тем, что АБГ (360 кД) является димером, тогда как МГ (720 кД) и РАРР-А (820 кД) — это тетрамеры, и поэтому АБГ не способен экранировать активный центр столь крупного фермента, как ПЛ (около 90 кД), от СИТ. Иначе говоря, створки полости «ловушки» АБГ смыкаются в меньшей степени, чем при захватывании ТР. Не исключено, что более выраженная иммуномодулирующая активность АБГ каким-либо образом связана с этим его свойством [18].

При электрофоретическом исследовании комплекса МГ—ПЛ зафиксирована его фрагментация при восстановлении дисульфидных связей меркаптоэтанолом на три компонента: 240, 180 и 25 кД (см. рисунок). По данным иммуноблоттинга, фрагменты с мол. м. 240 и 25 кД взаимодействуют с аффинноочищенными антителами про-

тив ПЛГ. Поскольку мол. м. единственной цепи нативного МГ равна 180 кД, можно сделать вывод о том, что фрагмент с мол. м. 240 кД является ее комплексом с тяжелой цепью ПЛ (60—65 кД), а фрагмент с мол. м. 25 кД — это легкая цепь ПЛ, в состав которой входит активный центр фермента. Аналогичные результаты были получены и для АБГ—ПЛ. Наиболее тяжелый компонент РАРР-А в тех же условиях имел мол. м. около 270 кД, а промежуточный, соответствующий цепи нативного РАРР-А — 205 кД. Следовательно, тяжелая цепь служит своеобразным спейсером между ловушечными структурами МГ и активным центром ПЛ. Как свидетельствуют наши результаты и наблюдения других авторов, гидролазная активность связанного ПЛ снижается не более чем на 10—20 % по отношению к таковой для свободного энзима [7]. Такое вряд ли было бы возможно, если бы в связывании с МГ участвовала легкая цепь фермента, так как это вызвало бы, по всей видимости, деформацию активного центра. Лизиисвязывающие кринглы тяжелой цепи ПЛ играют важную роль в его комплексообразовании с АП и другими серпинами [11]. Поэтому можно предположить, что в соединении МГ с ПЛ большое значение имеют остатки лизина в его ловушечной зоне. Но в настоящее время господствует основанное на гипотетических рассуждениях представление о ведущей роли в комплексообразовании карбонильной группы глутаминовой кислоты МГ и  $\epsilon$ -аминогруппы фермента [14].

По данным иммуноблоттинга АП, АТ III и ИП, а также цепи АБГ, МГ и РАРР-А, перенесенные на нитроцеллюлозу, сохраняют способность взаимодействовать с ПЛ. Трипсиновые фрагменты этих белков, кроме АП, в тех же условиях утрачивают это свойство. При инкубации АП и ТР, взятом в молярном избытке, из его структуры высвобождаются только два фрагмента, связывающие ПЛ: с мол. м. 62 и 40 кД, причем содержание последнего резко возрастает через 24 ч. Поскольку в ходе комплексообразования ПЛ атакует С-концевой отдел АП, можно предположить, что они содержат именно этот отрезок молекулы. Обнаруженный факт еще раз указывает на наличие высокого аффинитета к ПЛ и его быстрореагирующего ингибитора. Отсутствие аналогичного результата для МГ, скорее всего, свидетельствует о лабильности их сайтов, связывающих ферменты. Но не исключено, что в данном случае имеет место блокировка этих сайтов трипсином, что служит косвенным доказательством универсальности механизма захвата протеиназ МГ.

Таким образом, нами показано, что молекулярная структура комплексов МГ—ПЛ, АБГ—ПЛ, РАРР-А—ПЛ во многом однотипна. Но, хотя эти белки являются близкими гомологами, они в разной степени сужают субстратную специфичность ПЛ. Механизм их связывания с протеиназами существенно отличается от такового для других антиплазминов. Так как реакции ограниченного протеолиза играют важную роль в функционировании практически всех регуляторных систем организма, дальнейшее изуче-



Молекулярная структура комплекса МГ — ПЛ.

а — электрофореграмма нативного МГ; б — электрофореграмма маркеров молекулярной массы: 1 — ферритин (440 кД), 2 — фосфорилаза (94 кД), 3 — бычий сывороточный альбумин (67 кД), 4 — овалбумин (43 кД), 5 — карбангидраза (30 кД), 6 — СИТ (22 кД), 7 — лактальбумин (14 кД); в — электрофореграмма комплекса МГ — ПЛ; г — иммуноблот комплекса МГ — ПЛ, проявленный антителами к ПЛГ.

ние биологической активности комплексов МГ с протеиназами представляет значительный интерес.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Веремеенко К. Н., Голобородько О. П., Кизим А. И.* Протеолиз в норме и при патологии.— Киев, 1988.
2. *Зорин Н. А., Жабин С. Г., Мальцева Н. В.* и др. // Гематол. и трансфузиол.— 1990.— № 5.— С. 31—33.
3. *Зорин Н. А., Жабин С. Г., Белогородова Т. И., Архипова С. В.* // Вопр. мед. химии.— 1991.— № 3.— С. 48—50.
4. *Платонова Л. В., Пасхина Т. С.* // Там же.— 1990.— № 6.— С. 79—81.
5. *Такач Б.* // Методы исследований в иммунологии / Под ред. И. Лефковитса, Б. Пернса: Пер. с англ.— М., 1981.— С. 95—120.
6. *Тсанг В. К. В., Берс Д. Е., Хэнкок К.* // Иммуноферментный анализ / Под ред. Т. Нго, Г. Ленхоффа: Пер. с англ.— М., 1988.— С. 341—366.
7. *Barrett A. J., Starkey S. Ph. M.* // Biochem. J.— 1973.— Vol. 133.— P. 709—724.
8. *Collen D.* // Europ. J. Biochem.— 1976.— Vol. 69.— P. 209—216.
9. *Deutsch D. G., Mertz E. T.* // Science.— 1970.— Vol. 170, N 3961.— P. 1095—1096.
10. *Enghild J. J., Thgersen I. B., Pizzo S. V., Salvesen G.* // J. Biol. Chem.— 1989.— Vol. 264, N 27.— P. 15 975—15 981.
11. *Hortin G. L., Trimpe B. L., Fok K. F.* // Thromb. Res.— 1989.— Vol. 54.— P. 621—632.
12. *Kurecki T., Kress L. F., Laskowski M.* // Analyt. Biochem.— 1979.— Vol. 99.— P. 415—420.
13. *Miller-Anderson M., Borg H., Andersson L.-O.* // Thromb. Res.— 1974.— Vol. 5.— P. 439—452.
14. *Sand O., Folkersen J., Westergaard J. G., Soltrup-Jensen L.* // J. Biol. Chem.— 1985.— Vol. 260, N 29.— P. 15 723—15 735.
15. *Travis J., Shien B.-H., Potempa J.* // Tokai J. exp. clin. Med.— 1988.— Vol. 13, N 6.— P. 313—320.
16. *Wiman B., Collen D.* // Europ. J. Biochem.— 1977.— Vol. 78.— P. 19—26.
17. *Wiman B., Collen D.* // J. Biol. Chem.— 1979.— Vol. 254, N 18.— P. 9291—9297.
18. *Zorin N. A., Maltseva N. V., Gorin V. S. et al.* // Oncodevelopmental Proteins in Clinical Application.— New York, 1990.— P. 92.

Поступила 25.01.92

## STRUCTURAL FEATURES OF MACROGLOBULIN-PLASMIN COMPLEXES

S. G. Zhabin, N. A. Zorin, V. S. Gorin, O. F. Lykova  
Central Research Laboratory, Institute for Postgraduate Training of Physicians, Novokuznetsk.

Activities of plasmin and trypsin contained in complexes with  $\alpha_2$ -macroglobulin, related to pregnancy  $\alpha_2$ -glycoprotein and with protein A were studied in presence of various inhibitors with a molecular mass of 0.2-70.0 kDa. Specific characteristics of interaction between plasmin and these macroglobulins inhibitors as well as with  $\alpha_1$ -inhibitor of proteinases, antithrombin III and  $\alpha_2$ -antiplasmin were studied using electrophoresis and immunoblotting.

## МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.008.931:577.152.34]-074

Е. А. Строев, Е. А. Рязанова, В. Д. Тавинцев

### МЕТОД СЕРИЙНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ КАЛЬПАИНОВ В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

Рязанский медицинский институт им. И. П. Павлова

Кальпаины (КФ 3, 4.22.17) — кальцийактивируемые нейтральные тиоловые протеиназы, обнаруженные в различных органах и тканях животных и человека, характеризуются близкими физико-химическими и энзиматическими свойствами [8—10]. Одно из уникальных свойств этих ферментов заключается в абсолютной зависимости их протеолитической активности от ионов Са. Кальпаины способны активировать ряд ключевых ферментов обмена, воздействовать на белки-рецепторы некоторых мембранных систем, вызывать деградацию миофибриллярных структур и белков цитоскелета клетки [4], таким образом участвуя в регуляции процессов клеточного метаболизма и развитии обменных нарушений при патологии [2, 7, 11, 13, 14].

Определение активности этих ферментов связано с некоторыми трудностями. Вместе с кальпаинами в биологическом материале присутствуют их эндогенные высокоспецифичные ингибиторы (кальпастатины), препятствующие обнаружению

протеиназ непосредственно в тканевых гомогенатах [10]. Для отделения кальпаинов от кальпастатинов используют кислотное фракционирование [3], высаливание сульфатом аммония [2], ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе, гель-хроматографию [8], хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе, гель-хроматографию [8], хроматографию на фенил-сефарозе [4]. При использовании этих методов нами отмечены следующие недостатки: трудоемкость, длительность, необходимость значительного количества исследуемого материала (масса мышечного образца от 2,5—3 г при кислотном фракционировании, до 20 г при высаливании сульфатом аммония). Метод с использованием фенил-сефарозы более чувствителен, но требует выполнения целого ряда промежуточных операций и наличия дорогостоящих реактивов (пенстатин А, лейпентин), что затрудняет его применение в экспериментальных исследованиях.

В настоящей работе предложен метод определения активности кальпаинов, основанный на различиях гидрофобных свойств протеиназ и их ингибиторов [1]. При соответствующих условиях кальпаины вступают в гидрофобное взаимодействие с октил-сефарозой СЛ-4В, а кальпастатины не образуют комплекса с матрицей. После отмывки балластных белков гидрофобная связь между кальпаинами и октил-сефарозой СЛ-4В разрывается за счет использования детергента (хололата натрия), повышения рН с 7,0 до 8,0 и уменьшения ионной силы буферного раствора. Та-

ким образом, возможно получение фракции кальпаинов, не содержащей кальпастатины и используемой для измерения истинной пезамаскированной ингибиторами протеиназной активности.

**Методика. Получение материала для исследования.** Эксперименты выполнены на 60 белых нелинейных крысах-самцах массой 160–200 г, содержащихся в обычных условиях вивария. Активность кальпаинов определяли в тканевых гомогенатах печени, сердца, скелетной мышцы и гомолизате эритроцитов крыс. Кроме того, использовали кровь 10 доноров. Все процедуры проводили при температуре 0–4 °С. У животных, находящихся под эфирным наркозом, забирали кровь из брюшной аорты в присутствии 3 % раствора ЭДТА в качестве антикоагулянта (в соотношении 1:10) и центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин. Эритроциты промывали 3 раза 0,9 % раствором хлорида натрия с 2 мМ ЭДТА и центрифугировали 10 мин при 1000 об/мин. Для гемолиза использовали буфер следующего состава: 20 мМ трис-НСl, 2 мМ ЭДТА pH 7,5, который добавляли к эритроцитам в соотношении 1:9 и выдерживали в холодильнике в течение 15 мин. Затем гемолизат центрифугировали на центрифуге ЦЛР-1 (40 мин при 16 000 g). Полученный супернатант использовали для определения в нем активности кальпаина. Аналогично получали гемолизат эритроцитов из донорской крови.

Ткани массой 0,5–1 г измельчали, тщательно промывали холодной суспендирующей средой, содержащей 50 мМ трис-ацетата, 50 мМ хлорида натрия, 4 мМ ЭДТА pH 7,6 [12], затем сушили между листами фильтровальной бумаги, взвешивали, измельчали и гомогенизировали в 8 объемах суспендирующей среды в гомогенизаторе типа Поттера — Эльвегейма с тефлоновым пестиком при 1500 об/мин в течение 90 с. После центрифугирования гомогената в центрифуге ЦВР-1 при 30 000 g в течение 30 мин полученный надосадок использовали для определения кальпаинов.

**Гидрофобная хроматография на октил-сефарозе CL-4B.** После центрифугирования тканевого гомогената или гемолизата эритроцитов к полученной надосадочной жидкости добавляли раствор хлорида натрия до конечной концентрации 0,25 М. Затем пробы наносили на колонки с октил-сефарозой CL-4B ((0,9×3,0 см), предварительно уравновешенные буфером А (20 мМ трис-НСl, 0,25 М NaCl, 4 мМ ЭДТА pH 7,0). Балластные белки отмывали буфером А. Для элюции кальпаинов использовали буфер В pH 8,0, содержащий 20 мМ трис-НСl, 4 мМ ЭДТА и 0,5 % холата натрия. Рабочая скорость составляет 30 мл/ч. Объем активной фракции, содержащей кальпаины, равен 1,5 мл. При этом использовали установку, состоящую из нескольких хроматографических колонок с октил-сефарозой CL-4B и многоканального перистальтического насоса, возможности которого определяют количество одновременно работающих колонок.

**Определение активности кальпаинов.** Активность кальпаинов оценивали по количеству кислоторастворимых продуктов, образующихся при ферментативном гидролизе щелочно-денатурированного казеина. Предварительная подготовка субстрата заключалась в том, что к водному раствору казеина добавляли 0,2 н. раствор гидроксида натрия до pH 11,0 и выдерживали при 90 °С в течение 5 мин. Затем использовали 0,2 н. раствор соляной кислоты для нейтрализации субстратного раствора до pH 7,5 [5]. В инкубационную смесь, содержащую 0,25 % щелочно-денатурированного казеина, 20 мМ трис-НСl, 5 мМ 2-меркаптоэтанол pH 7,5, добавляли раствор хлорида кальция до конечной концентрации 2 мМ. После преинкубации в течение 5 мин при комнатной температуре прибавляли фракцию кальпаинов в объеме 0,4 мл и инкубировали 30 мин при 30 °С. Реакцию останавливали 1,5 мл холодной 8 % ТХУ. Пробы центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин. Измеряли оптическую плотность надосадочной жидкости при длине волны 280 нм против контроля на спектрофотометре СФ-46. Контрольная проба отличается от опытной только тем, что вместо хлорида кальция содержит 2 мМ ЭДТА.

В отличие от тканевых кальпаинов при определении активности фермента в эритроцитах инкубационная смесь содержала 1 мМ хлорид кальция.

Белок определяли по методу Лоури [6]. Активность кальпаинов выражали в микромолях тирозина за 1 ч на 1 мг белка или на 1 г ткани.

Регенерация октил-сефарозы CL-4B. С целью удаления детергента и сильно адсорбированных гидрофобных веществ исследуемого материала после каждого эксперимента проводили регенерацию октил-сефарозы CL-4B, что позволяет многократно использовать матрицу без изменения ее хроматогра-

## Активность кальпаинов (в мкмоль тирозина за 1 ч) в биологическом материале

Исследуемый материал	Активность кальпаинов	
	на 1 мг белка	на 1 г ткани
Печень	1,20±0,05	0,664±0,04
Миокард	1,10±0,06	0,608±0,03
Скелетная мышца	0,52±0,03	0,258±0,01
Эритроциты	1,06±0,11	—
	0,90±0,07*	—

Примечание. Для эритроцитов имеется в виду кальпаин 1. Звездочка — эритроциты человека. Представлены средние данные из 10–12 опытов.

фических свойств и заключается в следующем: колонки с октил-сефарозой CL-4B последовательно промывали 1 объемом дистиллированной воды и этанола, 2 объемами н-бутанола, 1 объемом этанола, затем водой и уравновешивающим буфером.

**Результаты и обсуждение.** Результаты определения активности кальпаинов в печени, сердце, скелетной мышце и эритроцитах представлены в таблице. Отметим, что самый низкий уровень активности протеиназ обнаружен в скелетной мышце, что согласуется с данными литературы [4, 9]. Активность кальпаина в эритроцитах крыс мало отличается от активности этого фермента в эритроцитах человека.

Предлагаемый способ характеризуется высокой воспроизводимостью и точностью, достаточной чувствительностью. Преимущества метода заключаются в следующем: время определения уменьшается в 3–4 раза по сравнению с другими способами, метод не вызывает затруднений при выполнении вследствие упрощения техники, не требует малодоступных и дорогостоящих реактивов, позволяет проводить определения одновременно в нескольких параллельных пробах. Все это имеет существенное значение для определения активности кальпаинов в исследовательской работе и клинической практике при проведении серийных определений и наличии небольшого количества исследуемого материала.

Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что разработанный способ позволяет проводить количественное определение активности кальпаинов в биологическом материале и может быть рекомендован для использования в клинической практике и экспериментальных исследованиях различных физиологических и патологических состояний человека и животных.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Строев Е. А., Рязанова Е. А., Тавинцев В. Д. А. с. № 4699987/30-14/077647 СССР.
2. Brooks B. A., Goll D. E., Peng Y. S. et al. // Amer. J. Physiol. — 1983. — Vol. 244. — P. 175–181.
3. Bush W. A., Stromer M. H., Goll D. E. et al. // J. Cell Biol. — 1972. — Vol. 52. — P. 367–381.
4. Gopalakrishna R., Barsky S. H. // Analyt. Biochem. — 1985. — Vol. 148. — P. 413–423.
5. Guroff G. // J. Biol. Chem. — 1964. — Vol. 239. — P. 149–155.
6. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265–275.
7. Miyamoto T., Hashizume K., Johikawa K. et al. // Endocrinology. — 1988. — Vol. 123. — P. 1916–1922.
8. Murachi T. // Trends biochem. Sci. — 1983. — Vol. 8. — P. 167–169.

9. Murachi T., Hatanaka M., Yasumoto Y. et al. // Biochem. int.— 1981.— Vol. 2.— P. 651—656.
10. Murachi T., Tanaka K., Hatanaka M. et al. // Advanc. Enzyme Regul.— 1981.— Vol. 19.— P. 407—424.
11. Spalla M., Tsang W., Kuo T. H. et al. // Biochim. biophys. Acta.— 1985.— Vol. 830.— P. 258—266.
12. Tolnai S. // Canad. J. Biochem.— 1981.— Vol. 59.— P. 242—249.
13. Tolnai S., Von Atthen J. // Life Sci.— 1987.— Vol. 41.— P. 1117—1122.
14. Toyooka T. // FEBS Lett.— 1980.— Vol. 177.— P. 122—124.

Поступила 26.07.91

#### A PROCEDURE FOR SERIAL ESTIMATION OF THE ACTIVITY OF CALPAINS IN BIOLOGICAL MATERIAL

E. A. Stroev, E. A. Ryazanova, V. D. Tavintsev

Acad. I. P. Pavlov Medical Institute, Ryazan

A procedure for quantitatively estimating the activity of calpains involved chromatography on the hydrophobic sorbent octyl-Sepharose Cl-4B, which enabled one to measure the true proteinase activity unmasked by the inhibitors calpastatins. After binding with the sorbent and removal of the contaminating proteins the calpains were eluted using 0.5 % sodium cholate as well as by an increase of pH value from 7.0 to 8.0 and by a decrease of the buffer ionic strength. Activity of the calpains was estimated using casein as a substrate in mice heart, liver and sckeletal muscle, in rat and human erythrocytes. Simple and rapid technique of enzymatic activity estimation allowed one to use the procedure developed in the laboratory and clinical settings and to carry out serial measurement of the activity in small quantities of the material.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 612.015.1:577.152.3131-074

Г. А. Грибанов, А. Н. Панкрушина,  
Е. Н. Кириллова

#### УЛЬТРАМИКРОМЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПИРОФОСФАТАЗЫ С ПОМОЩЬЮ МАЛАХИТОВОГО ЗЕЛЕННОГО Б

Тверской университет

Химические соединения, содержащие пирофосфорные группировки, богаты энергией и могут принимать участие в энергообеспечении бактериальных, растительных и животных клеток [5, 6].

При определении пирофосфатазной активности в микрообъектах часто приходится сталкиваться с необходимостью получения биологического материала в относительно больших количествах (в связи с невысокой чувствительностью известных методов), использовать значительные количества реактивов.

Ранее нами была показана возможность использования комплекса реактивов, содержащих краситель трифенилметанового ряда — малахитовый зеленый Б, для микро- и ультрамикроразличения неорганического фосфата [1], активности ряда ферментов фосфорно-энергетического обмена — кислой и щелочной фосфатаз [2], АТФазы [3], глюкозо-6-фосфатазы [4].

В настоящей работе анализируется возможность использования высокочувствительного комплекса реактивов на неорганический фосфат для ультрамикроразличения пирофосфатазы в ткани печени и некоторых ультраструктурах при различных значениях рН.

**Методика.** Опыты проводили на крысах-самцах линии Вистар массой 150—200 г. Животных декапитировали и при соблюдении правил асептики выделяли печень. Навеску ткани (0,3 г) гомогенизировали в 0,1 М цитратном буфере рН 4,0 или в 0,1 М трис-НСl-буфере рН 7,36 на холоду в соотношении 1:9. Выделение ядер и митохондрий из гомогената печени крыс осуществляли по стандартной методике [4]. Из гомогената отбирали аликвоты по 0,2 мл и готовили исследуемую и контрольную инкубационные смеси. В пробы вносили по 0,5 мл раствора соответствующего буфера (цитратного или трис-НСl в зависимости от необходимого значения рН), по 0,2 мл гомогената суспензии ядер или митохондрий, по 0,2 мл субстрата (0,01 М раствора пирофосфата натрия). В контрольные пробирки сразу добавляли 0,5 мл 6 % раствора НСlO<sub>4</sub>. Обе пробирки инкубировали в термостате при 37 °С в течение 60 мин. После инкубации в исследуемую пробу добавляли 0,5 мл 6 % раствора НСlO<sub>4</sub>. Содержимое пробирок перемешивали и выдерживали их на льду в течение 5 мин, фильтровали через бумажный фильтр и в фильтрах определяли количество неорганического фосфора. Для этого из проб отбирали аликвоты фильтра (по 0,2 мл), прибавляли по 1,6 мл воды, по 2 мл красящего реактива (3 объема 0,2 % малахитового зеленого Б, 1 объем 4,2 % молибдата аммония в 5 н. НСl) и по 0,08 мл 1,5 % раствора твина-20. После развития окраски (5—10 мин) исследуемые образцы колориметрировали на ФЭК (спектрофотометре) при длине волны 630—650 нм в кюветах с длиной оптического пути 10 мм против контроля на реактивы.

Количество неорганического фосфата находили по предварительно построенному калибровочному графику. Расчет активности фермента проводили по формуле:

$(P_{\text{иссл}} - P_{\text{к}}) \times 5:31$  мкмоль P<sub>ii</sub> на 1 мл гомогената в 1 ч.

**Активность пирофосфатазы (в мкмоль/мл/ч) в гомогенате ткани и суспензиях ультраструктур печени крыс в кислой (рН 4,0) и нейтральной (рН 7,36) средах**

№ опыта	Гомогенат печени		Ядра печени		Митохондрии печени	
	рН 4,0	рН 7,36	рН 4,0	рН 7,36	рН 4,0	рН 7,36
1	0,061	0,027	0,119	0,085	0,119	0,061
2	0,079	0,063	0,131	0,100	0,060	0,053
3	0,106	0,065	0,139	0,074	0,087	0,039
4	0,103	0,055	0,124	0,095	0,097	0,050
5	0,081	0,044	0,142	0,095	0,098	0,045
6	0,076	0,042				
7	0,084	0,055				
<i>M ± m</i>	0,084 ± 0,006	0,050 ± 0,005	0,131 ± 0,004	0,09 ± 0,005	0,092 ± 0,01	0,05 ± 0,004

где  $P_{\text{иссл}}$  — содержание  $P_{\text{н}}$  в опытной пробе;  $P_{\text{к}}$  — содержание  $P_{\text{н}}$  в контрольной пробе; 5 — коэффициент пересчета на 1 мл образца (объем, взятый для анализа, 0,2 мл); 31 — масса 1 мкмоль  $P_{\text{н}}$  (в мкг).

Результаты и обсуждение. Данные по определению активности пирофосфатазы в гомогенате ткани, суспензии ядер и митохондрий клеток печени крыс в нейтральной и кислой средах представлены в таблице.

Как следует из результатов таблицы, активность пирофосфатазы во всех исследованных структурах в кислой среде выше, чем в нейтральной, что совпадает с литературными данными [7].

Наибольшая активность определяемого фермента наблюдалась в ядрах печени крыс как в кислой, так и в нейтральной среде. Синтез пирофосфата идет независимо и параллельно синтезу АТФ [8]. Высокая активность в ядрах пирофосфатазы может быть связана также и с ее участием в синтезе предшественников нуклеиновых кислот и реакциях транскрипции [9].

Описанный метод позволяет определять активность пирофосфатазы в гомогенате ткани и в суспензиях ультраструктур. Для определения активности фермента используют навески ткани, составляющие всего несколько десятых грамма, минимальные объемы гомогената или суспензии ультраструктур. Метод прост и экономичен, отличается быстротой анализов и удобен в работе.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Грибанов Г. А., Базанов Г. А. // Лаб. дело.— 1976.— № 9.— С. 527.
2. Грибанов Г. А., Щенникова В. В. // Там же.— 1980.— № 4.— С. 231.
3. Грибанов Г. А., Щенникова В. В., Федоровский М. М. // Вопр. мед. химии.— 1985.— № 6.— С. 134.
4. Грибанов Г. А., Панкрушина А. Н. Лабораторный практикум для студентов.— Калинин, 1985.
5. Кулаев И. С. Неорганические полифосфаты и их физиологическая роль.— М., 1975.
6. Кулаев И. С. Биохимия высокомолекулярных полифосфатов.— М., 1975.
7. Лизосомы / Под ред. Д. Дингла.— М., 1980.
8. Мансурова С. Э., Шахов Ю. А., Кулаев И. С. // Докл. АН СССР.— 1973.— Т. 231, № 5.— С. 1027.
9. Мецлер Д. Биохимия.— М., 1980.

Поступила 14.01.92

#### ULTRAMICROMETHOD FOR ESTIMATION OF PYROPHOSPHATASE USING MALACHITE GREEN B.

G. A. Gribanov, A. N. Pankrushina, E. N. Kirillova  
State University, Tver.

A modified sensitive micromethod is described for estimation of pyrophosphatase activity both in homogenate and suspensions of nuclear and mitochondrial fractions of rat liver tissue using a kit of reagents containing malachite green B. The analysis may be carried out in the preparation containing only 0.2 mg of biological material; the procedure is reproducible, rapid and allows to the requisite amount of reagents to be decreased. The activity of pyrophosphatase in homogenate, nuclear and mitochondrial fractions of rat liver tissue was higher at acid pH values as compared with that in the neutral medium; the highest enzymatic activity was detected in the nuclear fraction.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.153:615.214.241-078.33

А. Н. Ермаков, Д. Э. Бобрин, Б. Н. Изотов,  
А. М. Егоров, С. А. Еремин

#### ПОЛЯРИЗАЦИОННЫЙ ФЛЮОРОИММУНО-АНАЛИЗ ФЕНОБАРБИТАЛА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ TD<sub>x</sub>-АНАЛИЗАТОРА ФИРМЫ «АВВОТТ»

Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова, Московский университет им. М. В. Ломоносова

В последние годы в качестве экспресс-методов анализа различных лекарственных средств все большее распространение получают иммунохимические методы, отличающиеся хорошей чувствительностью, специфичностью, простотой проведения анализа и широкой сферой применения. В частности иммуноанализ применяют для определения барбитуратов [8, 9]. Наиболее чувствительные методики радиоиммуноанализа (РИА), однако они имеют ряд недостатков. Во-первых, ограниченный срок жизни радиоактивной метки (около 2 мес) требует постоянного обновления реактивов. Во-вторых, радиация опасна для здоровья, и поэтому при проведении РИА в лаборатории необходимы особые меры предосторожности. В-третьих, проведение большого количества анализов ставит вопрос об удалении радиоактивных отходов. Кроме того, в РИА усложнена стандартизация, так как срок годности наборов РИА зависит от периода полураспада радиоактивной метки. Наконец, для РИА необходимы специальные реагенты и дорогое аналитическое оборудование.

По указанным причинам разрабатываются альтернативные методы иммунохимического анализа, не требующего радиоактивных изотопов. К их числу относится поляризационный флюороиммуноанализ (ПФИА), основанный на сочетании конкурентного иммуноанализа с принципами поляризации флюоресценции [4—6, 16]. В качестве маркера антигена в данном методе используется флюоресцентный краситель флюоресцеин. Образование иммунного комплекса устанавливается путем измерения поляризации флюоресценции (ПФ), которая возрастает при связывании меченного флюоресцентной меткой антигена (трейсера) с антителами. Концентрация лекарственного вещества в пробе может быть определена из калибровочного графика зависимости значения ПФ от концентрации вещества. ПФИА позволяет проводить прямое измерение ПФ без процедуры разделения компонентов реакции. Таким образом специфичность этого иммуноанализа объединена с быстротой и удобствами гомогенных методов, при этом он характеризуется большой точностью и стабильностью реактивов [1].

Целью данного исследования является разработка ПФИА для качественного и количественного определения фенобарбитала в моче человека.

Методика. Фенобарбитал, апробарбитал, бутабарбитал, барбамил, секобарбитал, этаминалнатрий, флюоресцеинизотиоцианат изомер I (ФИТЦ), тартразин, полный адъювант Фрейнда получены от фирмы «Sigma», бычий сывороточный альбумин (БСА) — из Белорусского НИИ эк-

спериментальной медицины, наркотические, одурманивающие вещества и другие соединения, используемые при изучении кросс-реактивности, были предоставлены кафедрой токсикологической химии Московской медицинской академии. Также были использованы пластины для тонкослойной хроматографии «Силуфол УФ<sub>254</sub>» производства «Kavalier» (ЧСФР).

Для исследования готовили буферный раствор, по составу близкий к моче, согласно ранее описанной прописи [7], путем растворения в 1 л дистиллированной воды 22 г мочевины, 8,25 г хлорида натрия, 5,2 г хлорида калия, 1,5 г креатинина, 1,4 г однозамещенного фосфата натрия, 1,1 г двузамещенного фосфата натрия, 1 г азидата натрия, 10 мг тартразина; рН полученного раствора 7,4.

В качестве буфера для анализа при разработке ПФИА фенобарбитала использовали TD<sub>x</sub>-буфер фирмы «Abbott» (США), представляющий собой 0,1 М фосфатный буфер рН 7,4, содержащий 0,1 г/л бычьего  $\gamma$ -глобулина и 1 г/л азидата натрия [14].

Стандарты фенобарбитала готовили путем разбавления концентрированного раствора в этаноле (1 г/л) синтетической мочой до следующих концентраций: 0,5, 2, 5, 20 и 100 мкг/мл.

Следуя ранее описанной процедуре [12], синтезировали 5-этил-5-(4'-флюоресцеинтиокарбамил-аминофенил)барбитуровую кислоту путем взаимодействия 5 мг 5-этил-5-(4'-аминофенил)барбитуровой кислоты, приготовленной нитрованием и последующим восстановлением фенобарбитала [3], с 8,5 мг раствора ФИТЦ в 500 мл пиридина. Реакцию проводили в темноте в течение 24 ч при комнатной температуре. Затем реакционную смесь наносили на пластинки «Силуфол УФ<sub>254</sub>» (по 70 мкл на пластинку) и хроматографировали в системе этилацетат — метанол — уксусная кислота (90:8:2). Главную полосу с R<sub>f</sub> 0,69 соскребали с пластинок и элюировали с 3 мл метанола. Полученное вещество сохраняли в метанольном растворе при —20 °С. Для приготовления рабочей концентрации трейсера 20 мкл метанольного раствора разбавляли 4 мл 0,05 М карбонатного буфера рН 9,0, после чего спектрофотометрически определяли оптическую плотность при длине волны 492 нм и по коэффициенту экстинкции флюоресцеина  $8,78 \times 10^4$  л·моль<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup> рассчитывали концентрацию приготовленного раствора [10]. Затем полученный раствор трейсера разбавляли TD<sub>x</sub>-буфером до концентрации 60 нмоль/л и использовали в разработке анализа, описанного ниже.

В качестве иммуногена для получения специфичных к фенобарбиталу антител использовали конъюгат фенобарбитала с БСА, синтезированный по ранее описанной методике [12], согласно которой к раствору 50 мг 5-этил-5-(4'-аминофенил)барбитуровой кислоты в 5 мл 0,1 М HCl добавляли при охлаждении на ледяной бане 20 мг нитрата натрия и полученную смесь перемешивали в течение 10 мин. Избыток азотистой кислоты удаляли добавлением 10 мг мочевины. Затем 1 М раствором бикарбоната натрия устанавливали рН между 8,0 и 9,0, после чего диазотированный раствор барбитурата добавляли по каплям к перемешиваемому раствору 60 мг БСА в 3 мл 1 М бикарбоната натрия. Реакцию проводили при 4 °С в течение

30 мин. Полученный продукт очищали диализом в проточной воде при 4 °С в течение 3 дней. Выделенное вещество лиофилизировали, получив 74 мг иммуногена. Количество молекул фенобарбитала, связанных с одной молекулой БСА, определяли по измерению интенсивности полосы циклического амида при 1770 см<sup>-1</sup> в ИК-спектре конъюгата, впрессованного в диски KBr. Согласно полученным данным, соотношение гаптен: БСА равно 40:1.

Антитела к фенобарбиталу получали иммунизацией 6 взрослых кроликов массой 2,5 кг, вводя им подкожно в несколько точек вдоль позвоночника и внутримышечно в область микроузлов задних лап по 2 мг конъюгата в расчете на 1 кролика. Иммунизацию проводили 50 % эмульсией водного раствора конъюгата и полного адьюванта в течение 3 нед с интервалом 7 сут. Реиммунизацию осуществляли ежемесячно в течение 3 дней, вводя внутривенно по 1—1,5 мг конъюгата в 1 мл физиологического раствора. Через 7—9 дней после последней иммунизации отбирали кровь и методом ПФ определяли титр полученных антисывороток при 50 % связывании меченого антигена. Для этого в стеклянных кюветках готовили по 500 мкл различных разведений антисыворотки в TD<sub>x</sub>-буфере (начиная с 4·10) и добавляли к ним по 500 мкл раствора трейсера в концентрации 10 нмоль/л. В последнюю кювету, предназначенную для измерения фона трейсера, вносили 500 мкл TD<sub>x</sub>-буфера и 500 мкл меченого антигена. После этого кюветы устанавливали в специальную карусель, инкубировали 20 мин при комнатной температуре и измеряли ПФ на TD<sub>x</sub>-анализаторе по программе «Photo check». Антисыворотку с наилучшим титром (1:160), полученную от одного из животных после 3-го кровопускания на 4-м месяце иммунизации, использовали в разработке анализа, описанного в деталях ниже.

Для измерения ПФ использовали TD<sub>x</sub>-анализатор фирмы «Abbott» (США). Исследования проводили в автоматическом режиме по модифицированной нами программе № 21, предназначенной для анализа канамицина. Откорректированный протокол анализа отличается от оригинала только тем, что в нем изменены концентрации стандартов. В параметры 21.4, 21.8, 21.9, 21.10, 21.11 и 21.12 введены соответственно концентрации фенобарбитала 100.00, 0,50, 2.00, 5.00, 20.00 и 100.00 мкг/мл.

21.1.	SPL VOL	10,0
21.2.	SPL REP	1
21.3.	LOLIM	0,00
21.4.	HILIM	100,00
21.5.	CAL VOL	10,0
21.6.	CAL REP	2
21.7.	CONC A	0,00
21.8.	CONC B	0,50
21.9.	CONC C	2,00
21.10.	CONC D	5,00
21.11.	CONC E	20,00
21.12.	CONC F	100,00
21.13.	UNITS	0
21.14.	CRU FIT	2
21.15.	MX DEV	5,0
21.16.	MN POLA	150,0
21.17.	MN SPAN	70,0
21.18.	MODE	1
21.19.	GAIN	30
21.20.	MX BKG	1800,00
21.21.	MN TR	2141
21.22.	C DATE	05/17/90
21.23.	C TIME	12:14:19

Методика анализа. В лунки для образцов пластмассовых катриджей вносят по 50 мкл стандартов или образцов мочи. Катриджи вместе со стеклянными кюветами (11×50 мм) устанавливают в измерительную карусель. Карусель помещают в прибор. Туда же устанавливают набор реагентов, содержащий 3 отдельных флакона, в которых находится разбавленная в 3 раза буфером для анализа антисыворотка к фенобарбиталу, раствор трейсера в концентрации 60 нмоль/л и буфер для анализа. Всю систему термостатируют при 35 °С в течение 5—7 мин и запускают в анализ по программе, соответствующей нанесенному на набор с реагентами коду, представляющему собой чередующиеся в определенной последовательности черно-белые полосы. Во время анализа прибор автоматически засасывает из лунки с образцом примерно 25 мкл и разбавляет их в лунке для разведения, расположенной в том же катридже. Это разбавление образца обеспечивает большую точность пипетирования. Половина конечного объема разбавленного образца и буфер, давая половину конечного реакционного объема, выливаются в кювету. Карусель передвигается к следующему положению, и процедура повторяется. По окончании этой стадии измеряется фоновая интенсивность флуоресценции в каждой кювете. Затем в кювету добавляют вторую половину объема разбавленного образца вместе с небольшими количествами трейсера и антисыворотки (по 25 мкл) и буфером для анализа конечный реакционный объем доводят до 2050 мкл, разбавляя, таким образом, антисыворотку и трейсер в 82 раза. После инкубационного периода, во время которого реакция достигает равновесия, измеряют общую интенсивность флуоресценции, значения которой корректируются микропроцессором относительно измененного ранее фона. Далее ЭВМ прибора рассчитывает ПФ для каждой кюветы и по построенной заранее и сохраняющейся в памяти прибором в течение месяца калибровочной кривой определяет концентрацию образцов. Время анализа 20 проб 15 мин [15].

Результаты и обсуждение. Ключевым пунктом в создании любого иммуноанализа является получение подходящих антител, так как именно они определяют прежде всего чувствительность и специфичность метода. С этой целью нами были изучены 34 антисыворотки к фенобарбиталу, полученные по различным схемам. Из них

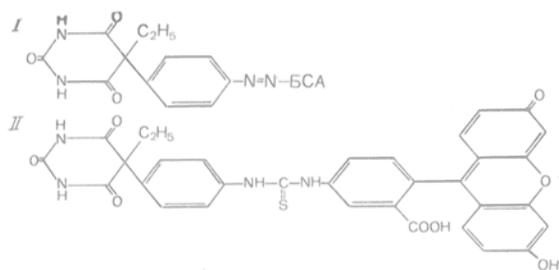


Рис. 1. Структурные формулы иммуногена (I) и меченного флуоресцеином фенобарбитала (II).

выбрали ту антисыворотку, которая удовлетворяла нас по титру антител и специфичности.

Помимо хороших антител, для разработки ПФИА необходимо синтезировать меченный флуоресцеином антиген, иммунологические свойства которого мало отличаются от исходного лекарственного соединения. Исследовав 4 трейсера, различающихся по структуре гаптана и природе ножки, связывающей его с меткой, мы установили, что наилучшее взаимодействие с антителами имел трейсер, в котором гаптан и связывающая его с меткой ножка почти полностью идентичны таковым в иммуногене, используемом для получения антител (рис. 1).

Для выбора оптимальных условий проведения ПФИА мы исследовали разведения антисыворотки 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 и концентрации трейсера 50, 60 и 80 нмоль/л. Анализ множества комбинаций с использованием различных концентраций антисыворотки и трейсера показал, что наиболее подходящими для разработки ПФИА фенобарбитала являются следующие условия: антисыворотка с начальным разведением 1:2 и трейсер с концентрацией 60 нмоль/л. ПФ растворов увеличивается, что является положительным фактом, но при этом уменьшается чувствительность анализа и увеличивается неспецифическое связывание, а значит, возрастает погрешность измерений. Кроме того, это приводит к неэкономичному расходованию реагента, а следовательно, к увеличению стоимости анализа. Использование более разбавленного раствора антисыворотки хотя и позволяет несколько увеличить чувствительность анализа и уменьшить расход реагента, однако ограничивается минимальным значением ПФ для нулевого стандарта (параметр 21.16), при котором калибровочная кривая может быть принята прибором. Данный параметр программы специфичен для каждого анализа и не подлежит корректировке. Что касается трейсера, то наблюдается обратная зависимость: при использовании более концентрированных растворов ПФ незначительно уменьшается, а чувствительность анализа остается практически неизменной. Применение же более разбавленных растворов трейсера, позволяющее увеличить ПФ и уменьшить расход реагента, ограничивается минимальным значением общей интенсивности раство-

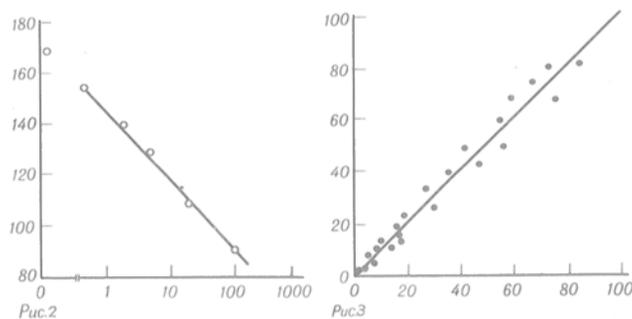


Рис. 2. Калибровочная кривая для количественного определения фенобарбитала методом ПФИА.

По оси абсцисс —  $\lg C$ , где  $C$  — концентрация фенобарбитала, мкг/мл; по оси ординат — поляризация флуоресценции, мР.

Рис. 3. Корреляция между концентрацией фенобарбитала, установленная при анализе образцов мочи методами ПФИА ( $y$ ) и ВЭЖХ ( $x$ ).

По оси абсцисс — ВЭЖХ; по оси ординат — ПФИА.

ра (параметр 21.21), которое необходимо для принятия прибором калибровки и которое почти полностью зависит от концентрации трейсера. Данный параметр программы также не подлежит корректировке.

Используя вышеуказанные реагенты и стандартные раствора фенобарбитала известной концентрации, мы построили калибровочную кривую, удовлетворяющую всем критериям калибровки (рис. 2) [15].

Определение чувствительности проводили по методу [11]. Для этого, используя обычную процедуру анализа, произвели 20 повторных измерений нулевого стандарта и с 95 % доверительной вероятностью рассчитали минимально определяемую концентрацию фенобарбитала. Она составила 0,09 мкг/мл.

Для достоверного определения наличия наркотических и одурманивающих веществ в организме человека часто используется величина пороговой концентрации (threshold или cut-off), которая как минимум в 3 раза превышает предел обнаружения данного метода. Величина cut-off рассчитывается как среднее значение из 30 определений образцов нормальной человеческой мочи, не содержащих анализируемого вещества, минус 3 S.D.. Используя данную методику, мы установили величину cut-off для фенобарбитала в 0,5 мкг/мл.

Разработанная для качественного и количественного определения фенобарбитала методика ПФИА была охарактеризована по точности, сходимости, воспроизводимости и линейности результатов анализа.

Точность измерений, выраженную в виде процента аналитического открытия (АО), устанавливали путем добавления известных количеств фенобарбитала к образцам мочи человека и последующим определением его концентрации в этих образцах. Процент АО рассчитывали по формуле:

$$\text{АО, \%} = \frac{\text{Найденная концентрация}}{\text{Расчетная концентрация}} \times 100.$$

Проанализировав таким образом два образца нормальной мочи человека, к которым добавили 10, 25 и 50 мкг/мл фенобарбитала, установили, что АО колеблется от 90,0 до 110,2 % (в среднем 98,8 %). При добавлении фенобарбитала в концентрации 25 и 50 мкг/мл к образцу мочи, содержащему 9,9 мкг/мл данного барбитурата, АО составило 96,1 и 94,2 % соответственно.

Для оценки сходимости результатов анализа использовали 3 промежуточных стандарта, содержащие 1, 10 и 50 мкг/мл фенобарбитала. Изменив концентрацию каждого из них 10 раз, вычисли-

Таблица 1

Средние значения анализируемых концентраций и КВ, установленные при определении сходимости и воспроизводимости результатов ПФИА фенобарбитала

Концентрация стандартов, мкг/мл	Сходимость измерений		Воспроизводимость измерений	
	X, мкг/мл	КВ, %	X, мкг/мл	КВ, %
1,0	1,0	3,5	1,0	4,0
10,0	10,4	4,5	9,7	4,8
50,0	50,8	4,4	49,7	4,6

ли средние значения и коэффициенты вариации (КВ) (табл. 1).

При изучении воспроизводимости анализировали те же стандарты в течение 5 дней при различных условиях (см. табл. 1). В обоих случаях КВ не превышал 5 %, что свидетельствует о высокой точности и хорошей воспроизводимости данной методики.

Этот вывод подтверждают и результаты проведенного нами теста на линейность, для выполнения которого 3 образца мочи, содержащие высокие концентрации фенобарбитала (17,6, 30,4 и 46,7 мкг/мл), разбавляли буфером для анализа в 2, 4, 8 и 16 раз и вычисляли средний процент АО для каждого образца. Он составил соответственно 97,6, 100,6 и 99,7 %.

Изучая специфичность разработанной методики анализа [2], мы исследовали различные производные барбитуровой кислоты и близкие по структуре лекарственные вещества. Процент перекрестных реакций во всех случаях не превышал 7,2 (табл. 2). Для соединений из других фармакологических групп, не похожих по структуре на фенобарбитал, таких, как морфин, кодеин, метадон, налорфин, бензоилэксгонин, 11-нор- $\Delta^9$ -ТГК-СООН, d, l-эфедрин, d, l-амфетамин, d-метамфетамин, d, l-фенилпропаноламин, фенциклидин, аминазин, дипразин, амитриптилин, хлосепид, диазепам, метаквалон, кофеин, клофелин, анаприлин, карбамазепин, димедрол, никотин, папаверин, теофиллин, атропин, новокаин, перекрестное реагирование было менее 0,1 %. Это свидетельствует о достаточно высокой специфичности разработанной методики анализа, что позволяет определять фенобарбитал в присутствии множества других соединений или их метаболитов.

В результате проведенных исследований установлена высокая степень корреляции результатов ПФИА с результатами других методов анализа. Например, из 85 образцов мочи, проанализированных методом ПФИА на фенобарбитал и ЕМІТ-st-анализом («Сува») на группу барбитуратов, 36 показали отрицательные результаты в обоих методах, 49 были положительными в ПФИА и 44 — в ЕМІТ-st-анализе. Пять образцов мочи, для которых имелось несоответствие, исследовали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Во всех случаях было установлено наличие фенобарбитала в концентрации

Таблица 2

Перекрестные реакции различных барбитуратов и структурно-подобных соединений в ПФИА фенобарбитала

Вещество	Перекрестные реакции при 50 % вытеснении, %
Фенобарбитал	100
Апробарбитал	1,2
Барбамил	7,2
Барбитал	0,9
Барбитуровая кислота	0,1
Бутабарбитал	3,5
Гексамидин	0,1
Гексобарбитал	0,1
Дифенин	0,1
Метилфенобарбитал	0,1
Секобарбитал	3,2
Этаминал-натрий	3,4

0,7—2,2 мкг/мл, что меньше величины cut-off (3 мкг/мл), установленной для фенобарбитала в EMIT-st-анализе. Помимо этого, методом ВЭЖХ проанализировали еще 25 образцов мочи, имевших положительный ответ на ПФИА. Исследования проводили на приборе «Милихром-2» с использованием хроматографической колонки  $C_{18}$  зернением 5 мкм, длиной 62 мм и внутренним диаметром 2 мм. В качестве элюента выбрали систему ацетонитрил — 0,05 М фосфатный буфер (25:75). Объемная скорость элюента была 100 мкл/мин. Масштаб регистрации 0,05 ед. опт. пл. Объем вводимой пробы 4 мкл. Длина волны УФ-детектора 220 нм. Количественное определение проводили методом абсолютной калибровки. Из 25 образцов мочи, давших позитивный ответ в ПФИА, в 2 обнаружили высокие концентрации веществ в объемами удерживания, похожими на барбитал и этаминал. Остальные 23 образца содержали фенобарбитал в концентрации от 2 до 84,4 мкг/мл. По результатам исследования этих образцов мочи методом ПФИА ( $y$ ) и методом ВЭЖХ ( $x$ ) построили регрессионную прямую, описываемую уравнением  $y = x + 0,4$  с коэффициентом корреляции 0,98 (рис. 3) [13].

Констатируя высокую степень корреляции результатов ПФИА с результатами других методов анализа, следует отметить, что разработанный ПФИА фенобарбитала по своей чувствительности превосходит EMIT-st-анализ и сопоставим по ней с методом ВЭЖХ, но уступает последнему в селективности. По этой причине положительные результаты, получаемые с использованием данной методики ПФИА, как, впрочем, и с использованием всех других иммунохимических методов, требуют подтверждения альтернативными методами анализа, такими, как газожидкостная хроматография, ВЭЖХ, хромато-масс-спектрометрия.

Таким образом, на основе полученных реагентов разработана экспресс-методика для идентификации и количественного определения фенобарбитала в моче методом ПФИА. Данная методика не только может быть использована для аналитической диагностики фенобарбитала в наркологии и судебной медицине, но и может служить основой получения своевременных фармакокинетических данных для оптимизации фармакотерапии и изучения метаболизма фенобарбитала в организме.

## СОДЕРЖАНИЕ

### Обзоры

- Горкин В. З., Овчинникова Л. И. Система аминоксидаз: современные достижения в исследованиях природы, функций и их нарушений . . . . . 2
- Сьякте Н. И. Модификация структуры хроматина и ядерного матрикса при патологических процессах. Возможности коррекций фармакологическими препаратами . . . . . 10
- Пестина Т. И., Соковнина Я. М. Аденозиндеаминаза форменных элементов крови: распространение, свойства в норме и при различных гематологических заболеваниях . . . . . 16

### Оригинальные статьи

- Иванов В. В., Стенникова М. П. Соотношение интенсивности перекисного окисления липидов и рецепции инсулина в адипоцитах . . . . . 23

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бекбергенов Б. М., Житников В. Г. // Антибиотики.— 1988.— № 1.— С. 72—76.
2. Abraham G. E. // J. clin. Endocr.— 1969.— Vol. 29.— P. 866—870.
3. Bousquet E. W., Adams R. // J. org. Chem.— 1930.— Vol. 52.— P. 224—229.
4. Chen R. F., Bowman R. L. // Science.— 1965.— Vol. 147.— P. 729—732.
5. Dandliker W. B., de Saussure V. A. // Immunochemistry.— 1970.— Vol. 7.— P. 799—828.
6. Dandlike W. B., Kelly K. J., Dandlier J., Levin J. // Ibid.— 1973.— Vol. 10.— P. 219—227.
7. Eremin S. A., Gallacher G., Lotey H. et al. // Clin. Chem.— 1987.— Vol. 33, N 10.— P. 1903—1906.
8. Flynn E. J., Spector S. // J. Pharmacol. exp. Ther.— 1972.— Vol. 181, N 3.— P. 547—554.
9. Law B., Moffat A. C. // J. forens. Sci. Soc.— 1981.— N 21.— P. 55—66.
10. Pourfarzaneh M., White G. W., Landon J., Smith D. S. // Clin. Chem.— 1980.— Vol. 26, N 6.— P. 730—733.
11. Rodbard D. // Analyt. Biochem.— 1978.— Vol. 90.— P. 1—12.
12. Sadki A. M., Pourfarzaneh M., Rowell F., Smith D. S. // Ther. Drug Monit.— 1982.— Vol. 4, N 4.— P. 397—403.
13. Smith D. S., Pourfarzaneh M., Kamel R. S. // Clin. Chem.— 1980.— Vol. 26.— P. 1105—1106.
14. Tail J. F., Franklin R. W., Simpson J. B., Ashwood E. R. // Ibid.— 1986.— Vol. 32.— P. 248—254.
15. TD<sub>x</sub> System Operation Manual (Abbott Laboratories).— Irving, Tex., 1985.
16. Tengerdy R. P. // J. Lab. clin. Med.— 1967.— Vol. 70.— P. 707—714.

Поступила 06.05.92

## POLAROGRAPHIC FLUOROIMMUNOASSAY OF PHENOBARBITAL USING TD<sub>x</sub>-ANALYZER "ABBOTT".

A. N. Ermakov, D. E. Bobrina, B. N. Izotov, A. M. Egorov, S. A. Eremin

I. M. Sechenov Medical Academy, M. V. Lomonosov State University, Moscow.

Polarographic fluoroimmunoassay was developed for identification and estimation of phenobarbital in urine. The study was carried out using TD<sub>x</sub>-analyzer "Abbott" (USA) under conditions of automatic service by modified program N 21 intended for analysis of canamycin. In the procedure developed rabbit antiserum against phenobarbital was used at the initial dilution 1:2 and the tracer 5-ethyl-5-(4'-fluorosceine thiocarbonyl aminophenyl)barbituric acid was applied at the initial concentration of 60 nmol/l. The minimal content of phenobarbital evaluated in urine was as small as 0.09 µg/ml and it was measured in the limits of 0.5 µg/ml. Specificity of the analysis and its reproducibility were studied. The results of the polarographic fluoroimmunoassay correlated highly to the data of EMIT-st-assay and HPLC.

## CONTENTS

### Review of Literature

- Gorkin, V. Z., Ovchinnikova, L. N. The system of amine oxidases: current advances in studies of nature, functions and their impairments . . . . . 2
- Sjacte, N. I. Structure modification of chromatin and nuclear matrix in pathological states. Possible correction by means of drugs . . . . . 10
- Pestina, T. I., Sokovkina, Ya. M. Adenosine deaminase in formed blood elements: activity, distribution, properties in health and different blood diseases . . . . . 16

### Original Papers

- Ivanov, V. V., Stennikova, M. P. Correlation of lipid peroxidation activity and insulin reception in adipocytes . . . . . 23

- Хохлов А. П., Фетисова И. Г., Подлесный А. М., Чехонин В. П., Малаховский В. К. Защитная реакция клеток мозга при изменении проницаемости гематоэнцефалического барьера
- Коденцова В. М., Вржесинская О. А., Денисова С. Н., Сокольников А. А., Бекетова Н. А., Исаева В. А., Нетребенко О. К., Спиричев В. Б. Нормы часовой экскреции с мочой витаминов группы В для детей 9—13 лет
- Цветкова М. П., Ковалев Л. И., Шишкин С. С. Изучение аутолитических изменений белков миокарда человека методом двухмерного электрофореза
- Бояринов Г. А., Андреева Н. П., Мухина И. В. Влияние применения гутимина в предшемическом периоде на фосфолипиды миокарда во время реперфузии
- Грубина Л. А., Гуринович И. Ф. Содержание копропорфирина в моче здоровых людей и онкологических больных
- Николаев А. И., Мамутов Ж. И., Мухамедов Х. С. Изменение состояния лизосом печени и лимфоцитов в динамике развития вторичного иммунодефицита и при хроническом токсическом гепатите
- Асадуллин М. Г., Садова А. Н., Глухов В. П., Борисова М. В. Атромбогенный материал на основе модифицированного полиэтилена
- Мазепа И. В. Сравнительное изучение стабильности вторичной структуры и гидродинамических свойств ДНК здоровых и лейкозных тканей
- Фоменко А. И., Степаненко С. П., Пархомец П. К., Донченко Г. В. Влияние NAD на захват и высвобождение <sup>14</sup>C-ГАМК при введении конвульсанта
- Мулявко Н. А., Васильева С. М., Донченко Г. В. Взаимосвязь между содержанием НАД и скоростью репарации индуцированных разрывов ДНК ядер печени крыс
- Жабин С. Г., Зорин Н. А., Горин В. С., Лыкова О. Ф. Изучение структурных особенностей комплексов макроглобулинов с плазмином
- Методы биохимических исследований
- Строев Е. А., Рязанова Е. А., Тавинцев В. Д. Метод серийного определения активности кальпаинов в биологическом материале
- Грибанов Г. А., Панкрушина А. Н., Кириллова Е. Н. Ультрамикрометод определения пирофосфатазы с помощью малахитового зеленого Б
- Ермаков А. Н., Бобрин Д. Э., Изотов Б. Н., Егоров А. М., Еремин С. А. Поляризационный флюороиммуноанализ фенобарбитала с использованием TD-анализатора фирмы «АВВОТТ»
- Khokhlov, A. P., Fetisova, I. G., Podlesny, A. M., Chekhonin, V. P., Malakhovskiy, V. K. Protective response of brain cells to alterations in hematoencephalic barrier permeability
- Kodentsova, V. M., Vrzhesinskaya, O. A., Denisova, S. N., Sokolnikov, A. A., Beketova, N. A., Isaeva, V. A., Netrebekno, O. K., Spirichev, V. B. Hour excretion of vitamins B with urine in children of 9-13 years under normal conditions
- Tsvetkova, M. N., Kovalev, L. I., Shishkin, S. S. Estimation of autolytic alterations in human myocardial proteins by means of two-dimensional electrophoresis
- Boyarinov, G. A., Andreeva, N. N., Mukhina, I. V. Effect of gutimine on myocardial phospholipids during reperfusion at preischemic period
- Grubina, L. A., Gurinovich, I. F. Estimation of coproporphyrin in urine of healthy persons and of cancer patients
- Nikolaev, A. I., Mamutov, Zh. I., Mukhamedov, Kh. S. The status of liver tissue and lymphocyte lysosomes in dynamics of secondary immunodeficiency and in chronic hepatitis
- Asadullin, M. G., Sadova, A. N., Glukhov, V. P., Borisova, M. V. Athrombogenic material based on modified polyethylene
- Mazepa, I. V. Stability of secondary structure and hydrodynamic properties of DNA obtained from normal and leukemic tissues
- Fomenko, A. I., Stepanenko, S. P., Parkhomets, P. K., Donchenko, G. V. Effect of NAD on binding and liberation of <sup>14</sup>C-GABA in administration of the convulsion producing drug
- Mulyavko, N. A., Vasilyeva, S. M., Donchenko, G. V. Correlation between content of NAD and the rate of repair of the breaks induced in DNA of rat liver cell nuclei
- Zhabin, S. G., Zorin, N. A., Gorin, V. S., Lykova, O. F. Structural features of macroglobulin-plasmin complexes
- Methods of Biochemical Investigations
- Stroev, E. A., Ryazanova, E. A., Tavintsev, V. D. A procedure for serial estimation of the activity of calpains in biological material
- Gribanov, G. A., Pankrushina, A. N., Kirillova, E. N. Ultramicromethod for estimation of pyrophosphatase using malachite green B
- Ermakov, A. N., Bobrina, D. E., Izotov, B. N., Egorov, A. M., Eremin, S. A. Polarographic fluoroimmunoassay of phenobarbital using TD-analyzer "Abbott"

Адрес редакции журнала:

Москва, 109801, Солянка, 14

РАМН

Тел. 297-16-44

Зав. редакцией Э. А. Половинко

Технический редактор Л. И. Агафонова.

Художественный редактор И. И. Корюкова  
Корректор С. Д. Федоренко

Сдано в набор 17.05.93. Подписано в печать 02.07.93. Формат 60×88<sup>1</sup>/<sub>8</sub>. Печать офсетная. Усл. печ. л. 7,84.  
Усл. кр. отт. 8,33. Уч. изд. л. 9,93. Тираж 646. Заказ 687.

Ордена Трудового Красного Знамени  
Издательство «Медицина» Москва 101000. Петровверигский пер. 618

Набрано на ордена Трудового Красного Знамени  
Чеховском полиграфическом комбинате  
Министерства печати и информации Российской Федерации  
142300, г. Чехов Московской области  
Отпечатано в Подольском филиале  
142110, г. Подольск, ул. Кирова, 25