

ТОМ 39

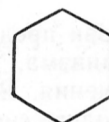
ВЫПУСК 5

СЕНТЯБРЬ — ОКТЯБРЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

# ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

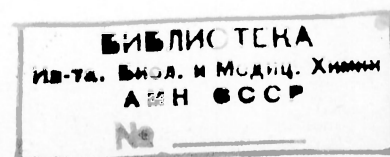
В. А. ТУТЕЛЬЯН (зам. редактора), А. И. АРЧАКОВ, И. П. АШМАРИН, Т. Т. БЕРЕЗОВ,  
Ю. В. БУКИН, А. В. ВАСИЛЬЕВ, Е. Н. ГЕРАСИМОВА, В. З. ГОРКИН, И. Б. ЗБАРСКИЙ,  
В. Л. КОЗЕЛЫЦЕВ (ответственный секретарь), А. Н. КЛИМОВ, Б. Ф. КОРОВКИН,  
Л. А. ЛОКШИНА, В. Н. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАНЧЕНКО, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ,  
Ю.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

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

БАЕВ А. А. (Москва)  
БЫЧКОВ С. М. (Москва)  
КОНСТАНТИНОВ А. А. (Хабаровск)  
КУДРЯШОВ Б. А. (Москва)  
ЛЯХОВИЧ В. В. (Новосибирск)  
ПАСХИНА Т. С. (Москва)  
ТУРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)  
ТЯХЕПЫЛД Л. Я. (Тарту)  
ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)



МОСКВА · МЕДИЦИНА · 1993



© Д. А. СОЛОВЬЕВ, 1993

УДК 615.919:598.12].015.4.07(048.8)

Д. А. Соловьев (Киев)

## ТРОМБИНОПОДОБНЫЕ ФЕРМЕНТЫ ЗМЕИНЫХ ЯДОВ

Свертывание крови представляет собой защитную реакцию организма, направленную на прекращение кровотечения. Вместе с тромбоцитами и системой фибринолиза система свертывания крови образует общую систему гемостаза. Многие внутренние заболевания сопровождаются нарушениями системы гемокоагуляции. Часто встречаются различные геморрагические и тромбогические заболевания: тромбоэмболии, диссеминированное внутрисосудистое свертывание (ДВС-синдром) и др. Новым направлением в диагностике и терапии подобных заболеваний является диагностическое, профилактическое и лечебное применение гемокоагулирующих ферментов из ядов змей.

Влияние змеиных ядов на свертывание крови впервые исследовал еще в XVIII веке Фонтана, который разделял змеиные яды на прокоагулянтные и антикоагулянтные [25]. В 30-х годах нашего века Р. Макфарлан впервые начал систематические исследования влияния змеиных ядов на свертывание крови [45, 46]. К настоящему времени из ядов многих видов змей выделены и охарактеризованы компоненты, влияющие на различные звенья системы гемостаза. Это специфические и неспецифические ферменты, которые оказывают разнообразное действие на различные этапы свертывания крови: активируют тромбоциты, факторы свертывания II, V, VII, X, XII, протеин C, обладают тромбиноподобной, плазминоподобной и калликреинноподобной активностью. Некоторые из них проявляют уникальную специфичность, отличную от специфичности факторов системы свертывания, и благодаря этому служат ценным инструментом при исследовании молекулярных механизмов гемостаза и находят широкое применение в медицине.

Ферменты из яда змей в зависимости от их действия на систему гемостаза можно разделить на 3 основные группы: прокоагулянтные, антикоагулянтные и фибринолитические. Для практической медицины наиболее важными из прокоагулянтных ферментов змеиных ядов являются тромбиноподобные ферменты (ТПФ), воздействующие на конечный этап свертывания крови — превращение фибриногена в фибрин.

ТПФ действуют на фибриноген подобно тромбину. Тромбин, фактор II системы гемокоагуляции, циркулирует в плазме крови в форме протромбина — неактивного предшественника сериновой протеазы. В процессе активации системы свертывания

крови протромбиназный комплекс, состоящий из факторов Ха, VIIIa, отрицательно заряженных фосфолипидов и ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , активирует протромбин, расщепляя одну пептидную связь в молекуле последнего [47]. При этом протромбин теряет крупный участок своей полипептидной цепи и превращается в промежуточное производное — претромбин 2, который далее автокаталитически переходит в тромбин, активирующий фибриноген. Молекула фибриногена состоит из 3 пар неидентичных полипептидных цепей, называемых A $\alpha$ , B $\beta$  и B $\gamma$ . От NH<sub>2</sub>-концевых участков A $\alpha$ -цепей тромбин отщепляет фибринопептиды A (фпА), от NH<sub>2</sub>-концевых участков B $\beta$ -цепей — фибринопептиды B (фпВ) с образованием соответственно  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей;  $\gamma$ -цепь остается интактной. Скорость отщепления фпА и фпВ под действием тромбина неодинакова: вначале быстро освобождается фпА; отщепление фпВ идет медленнее, но значительно ускоряется после начала полимеризации образовавшегося фибрина дезАА. Отщепление фпВ приводит к образованию сгустков нормального фибрина дезААВВ [44, 56]. Формирование сгустка заканчивается после ковалентной прошивки специфической транслугаминазой — фактором XIIIa (фибринстабилизирующий фактор), который также активируется тромбином [20].

ТПФ из ядов змей в отличие от тромбина отщепляют от молекулы фибриногена предпочтительно только один какой-нибудь тип фибринопептидов. Поэтому такие ферменты принято разделять на 3 подгруппы:  $\alpha$ -специфические, отщепляющие от молекулы фибриногена только фпА;  $\beta$ -специфические, отщепляющие предпочтительно фпВ; истинно тромбиноподобные, или  $\alpha$ ,  $\beta$ -специфические, освобождающие оба типа фибринопептидов со скоростью, близкой к скорости действия тромбина. Необходимо также отметить, что название «коагулирующий фермент» по отношению к  $\alpha$ -специфическим ТПФ носит довольно условный характер, так как большинство из этих ферментов, которые *in vitro* вызывают свертывание плазмы, при введении *in vivo* (в зависимости от дозы) вызывают дефибринацию, т. е. выступают как антикоагулянты.

В данном обзоре будут рассмотрены преимущественно  $\alpha$ -специфические ТПФ. Подобные ферменты были обнаружены в ядах многих тропических видов змей семейства *Crotalidae* (ямкоголовые змеи), в основном принадлежащих к родам *Agkistrodon* (щитомордник), *Crotalus* (гремучие змеи) и *Bothrops* [36, 62]. Несмотря на то что ТПФ из ядов разных видов змей несколько отличаются друг от друга по физико-химическим свойствам и биологическому действию на другие факторы свертывания и тромбоциты, они имеют ряд общих биологических характеристик и обладают сходной субстратной специфичностью. Все



изученные до настоящего времени ТПФ являются в основном одноцепочечными гликопротеидами, имеют мол. м. 25—38 кД. За исключением пептидазы А лейкостомы, все они — сериновые протеазы, имеющие в активном центре остатки Сер и Гис; все они обладают эстеразной и амидазной активностью в системах с синтетическими пептидными субстратами.

Наиболее изученным ТПФ является **анкрод** (КФ 3.4.21.28), впервые выделенный М. Эсноуфом и Г. Тунна в 1967 г. из яда Малайского щитомордника *Agkistrodon (Calloselasma) rhodostoma* [23]. Он является типичным ферментом этой группы. Мол. м. анкрода составляет 35 кДа. Высокое содержание углеводов (29 %) объясняет его высокую стабильность [49]. По данным аминокислотного анализа, основными аминокислотами являются Асп, Арг, Гли, Иле [34]. Анкрод отщепляет от молекулы фибриногена только фпА, не затрагивая В $\beta$ -цепь. Скорость отщепления фпА соответствует скорости отщепления их тромбином [24, 32]. Фермент обладает эстеразной активностью (субстраты: метиловый эфир бензоиларгинина — БАМЕ и метиловый эфир тозиларгинина — ТАМЕ), амидазной активностью (синтетические пептидные хромогенные субстраты тромбина: S2160 и Chromozym TH, но не гидролизует казеин, инсулин и глюкагон [18]. В активном центре фермента содержится остаток Сер, так как анкрод ингибируется ДФФ, хотя К $_i$  у анкрода больше, чем у тромбина. Он также инактивируется субстратными аналогами  $\alpha$ -N-нитробензоксикарбонил-аргинил-хлорметилкетона, что указывает на наличие в активном центре остатка Гис [19]. В отличие от тромбина анкрод не ингибируется гирудином, ингибитором трипсина из бобов сои, трасилолом (апротинином), комплексом антитромбин III (АТ III) — гепарин, однако связывается с гепарин-агарозой [40] и может взаимодействовать с иммобилизованным  $\alpha_2$ -макроглобулином. С этими сорбентами связывается также и большинство других ТПФ [54]. Анкрод не действует на такие факторы свертывания, как факторы V, VIII, IX [49, 62], не вызывает агрегацию тромбоцитов, не активирует фактор XIII [14], не активирует *in vitro* плазминоген (однако *in vivo* частично индуцирует фибринолиз [68] и не оказывает прямого фибринолитического действия [53]. Фибрин, образовавшийся из фибриногена под действием анкрода, легче лизируется плазмином, чем физиологически нормальная форма, образовавшаяся под действием тромбина. Это обусловлено отсутствием ковалентных связей, образующихся в норме под действием фактора XIIIa, и особенностью структуры сгустка фибрина дезАА, что используется в терапии с целью дефибрикации крови при лечении и профилактике ряда тромботических заболеваний [15, 55]. Сейчас ряд зарубежных фирм выпускает анкрод под коммерческими названиями «Argvin», «Argwin», «Venacil», «Ancrod».

Хорошо изучены аналогичные анкроду ТПФ из 4 подвидов южноамериканской змеи *Bothrops atrox*, известные под общим названием **батроксибины** (КФ 3.4.21.29). У всех 4 батроксибинов NH $_2$ -концевая аминокислота Вал, основные аминокислоты Асп, Гли, Про, Иле [65]. По сравнению

с анкродом батроксибины содержат меньше углеводов и более лабильны. Специфичность батроксибинов из двух подвидов змей: *B. a. asper* (коммерческое название «Reptilase», «Haemostase») с мол. м. 32 кД и *B. a. moojeni* («Defibrase», «Defibrol») с мол. м. 36 кД [26, 33] — не отличается от специфичности анкрода. В отличие от большинства ТПФ ядов змей батроксибин из подвида *B. a. marajoensis* («Reptilase-R», «Atroxin») с мол. м. 41,5 кД [33] способен активировать в присутствии Ca $^{2+}$  и фосфолипидов фактор XIII. Кроме того, его активность частично ингибируется высокими концентрациями гепарина [11]. Батроксибин из подвида *B. a. prador* подробно не охарактеризован.

Так же, как батроксибины, хорошо изучена **кроталаза** (КФ 3.4.21.30), впервые выделенная в 1971 г. из яда ромбической гремучей змеи (*Crotalus adamanteus*) [43]. Мол. м. кроталазы, определенная различными методами, составляет 31,7—34,2 кД. Фермент содержит 5,4 % углеводов, основные аминокислоты Асп, Гли, Про, Лей. Специфичность кроталазы такая же, как у анкрода и рептилазы, однако в отличие от них при длительной инкубации она незначительно гидролизует  $\beta$ -цепь молекулы фибриногена с COOH-конца. По своему строению и функционированию кроталаза больше сходна с калликреином плазмы, чем с тромбином, ингибиторы калликреина подавляют ее активность значительно сильнее, чем ингибиторы тромбина, и она способна образовывать комплексы с высокомолекулярным кининогеном [41]. Сходный фермент был выделен из яда ядозуба (*Heloderma horridum horridum*) [9]. Кроме того, в отличие от остальных ТПФ кроталаза способна, подобно фактору Ха, в присутствии Ca $^{2+}$  и отрицательно заряженных фосфолипидов активировать протромбин в претромбин 2 [41]. Такой же способностью обладает **акутин** — ТПФ из яда формозанского щитомордника (*Agkistrodon acutus*) [58, 59]. Мол. м. акутина составляет 33,5 кД, он содержит 5 % углеводов, основные аминокислоты Асп, Гли, Глу, Цис [50]. В работе других авторов описывается выделение из китайского и тайваньского подвидов этой змеи 4 ТПФ (по 2 в яде каждого подвида), значительно различающихся по своим физико-химическим свойствам и влиянию удельной активности на синтетические субстраты [35] (см. таблицу).

Нами были выделены в гомогенном виде и охарактеризованы 2  $\alpha$ -специфичных ТПФ из ядов 2 видов змей, обитающих в Средней Азии и на Дальнем Востоке: щитомордников обыкновенного (*Agkistrodon halys halys*) и восточного (*Agkistrodon halus Blomhoffü*), названных нами «**анцистрон-Н**» и «**анцистрон-В**» соответственно. Подобно большинству остальных ТПФ, это сериновые протеазы с мол. м. анцистрона-Н 34 кД и анцистрона-В 29 кД, основные аминокислоты Вал, Сер, Асп и Глу, Гли, Сер, Асп [6, 7]. NH $_2$ -концевая аминокислота у обоих ферментов Вал. Оба фермента не активировали протромбин, протеин С, факторы свертывания VIII, X и XIII. Они гидролизировали синтетические пептидные субстраты, специфичные для тромбина, и эфиры аргинина. Коагулирующая активность их не ингибировалась гирудином и АТ III в присутствии гепарина.

# α-Специфичные ТПФ ядов змей

Вид змеи	Мол. м., кД	Угле- воды, %	Основные аминокислоты	Специфичность к субстратам и ингибиторам	Источник литературы
<i>Agkistrodon calliginosus</i>	Λ—35 В—42	—	—	Сильная на ТAME, S2238, S2366, ка- зеинолитической активности нет	[66]
<i>A. bilineatus</i>	28	+	—	—	[21]
<i>A. piscivorus leukostoma</i>	22,5	—	Глу, Гли, Сер, Асп	БАЕЕ, синтетические дипептиды, гемогло- бин	[61, 69]
<i>A. acutus</i>	33,5	5	Асп, Глу, Лиз, Цис	Нет активности на ТAME и на казеин	[51, 58]
китайский подвид	Λ—44 В—70	9,5 10,1	Асп, Глу, Гли, Иле Глу, Асп, Лей, Цис	Высокая на БАЕЕ, ТAME, БАМЕ Слабая на ТAME, БАЕЕ, нет активности на БАМЕ	[35]
тайваньский подвид	Λ—44 В—25	9,8 Нет	Асп, Гли, Лей, Вал Асп, Глу, Сер, Лиз	Высокая на БАЕЕ, ТAME, БАМЕ Высокая на ТAME, нет активности на БАМЕ, БАЕЕ	[35]
<i>Bothrops asper</i>	30	+	Асп, Гли, Про, Ала	ТAME, S2160	[36]
<i>B. colombiensis</i>	67	2	—	—	[28]
<i>B. neuvedei</i>	—	+	—	БАЕЕ	[36]
<i>B. insularis</i>	45	22	Асп, Про, Гли, Ала	Ингибируется комплексом АТНП — гепа- рин	[60]
<i>B. jararaca</i>	40	—	—	Активирует фактор X	[27]
<i>Crotalus atrox</i>	37,2	3,4	—	Гидролизует	[70]
				β-цепь фибриногена, нет активности на БАЕЕ, казеин, фибрин	[13]
<i>C. adamanteus</i>	31,7	5,4	Асп, Глу, Про, Лей	БАЕЕ, ТAME, казеин, активирует про- тромбин	[41, 42]
<i>C. viridis helleri</i>	92	—	—	—	[13]
<i>C. horridus horridus</i>	19 29,5	+	Асп, Глу, Сер, Гли Асп, Гли, Про, Лей	Ингибируется PMSF и гепарином Расщепляет БАЕЕ, казеин, гемоглобин и альбумин	[16] [57]
<i>C. ruber. ruber</i>	32	—	—	—	[48]
<i>Trimeresurus gramineus</i>	29	14	Асп, Цис, Лей, Гли	Не гидролизует казеин	[51]
<i>T. okinawensis</i>	35	6	Асп, Лей, Гли, Про, Арг	Расщепляет ТAME, БАЕЕ, слабо — казеин, фибрин	[10]
<i>T. summatranus</i>	—	—	—	—	[67]
<i>T. flavoviridis</i>	65	—	—	S2238, S2366	[21, 37]
<i>Lachesis muta nontivaga</i>	36,3	+	Глу, Гли, Асп, Арг	—	[39]

Примечание. S2160—Phe—Val—Arg—pNa; S2238—Phe—Pip—Arg—pNa, S2302—Pro—Phe—Arg—pNa, S2366—Glu—Pro—Arg—pNa. В том случае, когда из яда данного вида одним и тем же автором было выделено более 1 ТПФ, эти ферменты обозначены А и В.

Анализ субстратной специфичности выделенных ферментов показал, что специфичность действия анцистрона-В гораздо шире по сравнению с анцистроном-Н. Последний расщеплял только тромбиновые субстраты и очень медленно субстрат S2302 калликреина плазмы, тогда как анцистрон-В гидролизировал с большей  $K_m$  (т. е. с невысоким сродством) все исследованные аргининовые субстраты. Сравнение физико-химических и биологических особенностей анцистрона-Н и анцистрона-В, а также анализ их ферментативной активности свидетельствуют о том, что это типичные α-специфичные ТПФ змеиных ядов. Сопоставление их с известными коммерческими препаратами ТПФ показало, что анцистрон-Н чрезвычайно похож на анкрод (из яда *A. rhodostoma*), тогда как анцистрон-В скорее ближе к батроксобином, а именно к рептилазе (из яда *B. atrox asper*). Нами также были исследованы яды щитомордников каменистого (*A. saxatilis*) и водяного (*A. piscivorus piscivorus*), в которых были обнаружены ранее не описанные в литературе α-специфичные ТПФ.

α-Специфичные ТПФ ядов других видов змей мало отличаются по своим характеристикам и специфичности действия от анкрода. Краткие сведения о них приведены в таблице. Все они — сериновые протеазы, за исключением пептидазы А лейкостомы — α-специфичного ТПФ из яда западного мокассинового щитомордника (*Agkistrodon piscivorus leukostoma*). Фермент

представляет собой металлопротеазу с мол. м. 22,5 кД, содержащую 2 моль Са и 1 моль Zn на 1 моль белка [61]. Единственная полипептидная цепь фермента состоит из 205 аминокислотных остатков. Основные аминокислоты Глу, Гли, Сер, Асп. Пептидаза обладает эстеразной и амидазной активностью (субстраты: этиловый эфир бензоиларгинина — БАЕЕ и лейцил-нафтиламид), гидролизует казеин и гемоглобин, расщепляет некоторые синтетические пептиды. Активность ее ингибируется ЭДТА и о-фенантролином. Содержимое этого фермента в яде довольно велико — 17 % от общего содержания белков [69].

Существует ряд методов промышленного выделения батроксобинов при помощи аффинной хроматографии на п-аминобензамидин-агарозе [33] и анкрода на агматин (4-аминобутилгуанидин)-агарозе [29]. Нами был разработан простой одностадийный метод выделения ТПФ из яда змей путем аффинной хроматографии на агарозе с иммобилизованным красителем цикакроном голубым F3CA [7].

Кроме α-специфичных ТПФ, в ядах некоторых видов змей содержатся и β-специфичные, которые отщепляют фибринопептиды в порядке, обратном тому, в каком отщепляет их тромбин, т. е. вначале с большей скоростью отщепляется фпВ, затем с гораздо меньшей скоростью — фпА. Такие ферменты содержатся в ядах Южной медноголовой змеи (*A. contortrix contortrix*) [22, 31] и палласова щитомордника (*A. halys Pallas*)

[30]. Аналогичный фермент был выделен нами и из яда щитомордника обыкновенного (*A. halys halys*).

В яде габоской гадюки (*Bitis gabonica*) содержится фермент, который отщепляет от молекулы фибриногена обе пары фибринопептидов с той же скоростью и в том же порядке, что и тромбин. Кроме того, он активирует фактор XIII в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  и фосфолипидов. Этот фермент — **габоназа** — содержит много углеводов — 20,3 % [52]. Аналогичный фермент обнаружен в яде бушмейстера (*Lochesis mutta mutta*) [17].

Так как к настоящему времени накоплен большой опыт медицинского применения гемокоагулирующих ферментов из яда змей, в частности тромбиноподобных, а для того чтобы рассмотреть хотя бы основные области их применения, требуется отдельный обзор, мы только кратко упомянем некоторые случаи их использования.

$\alpha$ -Специфичные ТПФ широко применяются за рубежом в медицине для диагностических и терапевтических целей. Нужно отметить, что для медицинских целей необходимо использовать только очищенные препараты, а не цельные яды ввиду функциональных различий в разных партиях ядов, как это видно на примере акутина, и возможности побочного действия других веществ, содержащихся в ядах змей [63]. Так как активность этих ферментов не ингибируется АТ III в присутствии гепарина, основная область их применения — диагностика нарушений коагуляции при гепаринотерапии или на фоне гипергепаринемии. Рептилазный тест (рептилазное время свертывания плазмы крови) аналогичен тромбиновому тесту и используется наряду с ним. Применяя данный тест в комбинации с традиционными методами (тромбиновое, тромбопластиновое, каолинкефалиновое время свертывания и др.), можно получить очень ценную информацию о состоянии системы гемостаза, которую другими способами получить чрезвычайно трудно.

В настоящее время существует также несколько методик использования ТПФ из яда змей для оценки концентрации продуктов деградации фибриногена (ПДФ) в плазме крови при ДВС-синдромах. Одна из первых публикаций на эту тему принадлежит З. Латалло [38]. Он сравнивал рептилазное («Reptilase-R» — препарат ТПФ из яда *B. a. marajoensis*) и тромбиновое время свертывания нормальной и гепаринизированной плазмы в присутствии и в отсутствие ПДФ. Удлинение времени образования сгустка из рептилазного фибрина пропорционально удлинению образования тромбинового сгустка в нормальной (негепаринизированной) плазме как в присутствии, так и в отсутствие ПДФ. На основании этих данных был предложен тест для обнаружения ПДФ в плазме гепаринизированной крови.

Американская фирма «Sigma» выпускает набор для полуколичественного определения уровня ПДФ в плазме крови: «Atroxin/Thrombin time» — procedure N 845 (Atroxin — смесь ТПФ из ядов *B. a. moojeni* и *B. a. asper.*), в инструкции к которой со ссылкой на собственные неопубликованные разработки фирмы предлагается таблица детектирования ПДФ по разнице удлинения атроксинового и тромбинового времени свертывания плаз-

мы в присутствии ПДФ, при этом атроксиновое время значительно более чувствительно к наличию ПДФ, нежели тромбиновое. При высоких концентрациях гепарина атроксиновое время так же удлинено, как и тромбиновое, и тест неэффективен [12].

При исследовании влияния цельного яда *A. halys halys* на свертывание крови было выяснено, что анцистродоновое время (т. е. под действием цельного яда *A. halys* [8]) значительно менее чувствительно к наличию в плазме ПДФ, нежели тромбиновое, и при острых ДВС-синдромах дает завышенное содержание фибриногена по сравнению с тромбиновым [1]. Позднее, уже после появления препарата анцистрона-Н, Е. М. Нейко и соавт. обнаружили, что анцистроновое время практически нечувствительно к наличию даже высоких концентраций ПДФ в плазме [4]. Это согласуется с данными, ранее опубликованными в литературе, что самосборка фибрина дезАА не ингибируется ПДФ [3]. Вероятно, что разница во влиянии ПДФ на свертывание плазмы под действием анцистрона, атроксина и рептилазы объясняется не различиями в действии ферментов на фибриноген, а количеством внесенного в исследуемую плазму фермента и различными условиями проведения теста.

За рубежом препараты  $\alpha$ -специфичных ТПФ также широко используются в качестве агентов дефибринирующего действия для коррекции нарушений системы свертывания крови или системы контроля гемостаза и для профилактики предынфарктных и предынсультных состояний. В литературе описано уже много случаев успешного применения этих ферментных препаратов при лечении ряда заболеваний, таких, как тромбоз глубоких вен, диабетическая и ретинальная микроангиопатия, легочная эмболия, пурпурная гангрена, церебральный паралич и др. При этом арвин (анкрод) чаще применяют в качестве препарата дефибринирующего действия в клинической практике [15], тогда как батроксобины (рептилаза, атроксин) — в основном как диагностические препараты. Это, конечно, не исключает использования анкрода в диагностических, а батроксобинов — в клинических целях [64]. Вероятно, более высокая специфичность анкрода легче поддается контролю и оказывает меньше побочных действий на систему гемостаза. Проблеме клинического применения ТПФ был посвящен побочный семинар VIII Международного конгресса по тромбозам и гемостазу (12—18 июля, 1981 г., Торонто).

Анцистрон-Н, являясь практически полным аналогом арвина, может быть также применен и для клинических целей. В опытах на кроликах проверялась возможность использовать его *in vivo* в качестве агента дефибринирующего действия. Оказалось, что при внутривенном введении анцистрона-Н в дозе 0,25 НИЕ на 1 кг массы животного через 120 мин в крови подопытных животных развивалась глубокая гипофибриногенемия [2]. Мы также проверяли возможность использования анцистрона-Н для аналогичных целей в опытах по изучению влияния снижения уровня фибриногена на метастазирование карциномы Льюиса у мышей. Оказалось, что парентеральное введение мышам анцистрона-Н в дозе 2,5 НИЕ на 1 кг



массы животного (что вызывает снижение уровня фибриногена до 30 % от нормального) уменьшает метастазирование в 2,7–3 раза [5]. Все это показывает, что выделенные нами ТПФ имеют широкие перспективы как в научно-исследовательских целях, так и в клинической медицине и возможности применение их в этой области заслуживают дальнейшего изучения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Балуда В., Баркаган З., Гольдберг Е. и др. // Лабораторные методы исследования гемостаза.— Томск, 1980.— С. 188.
2. Глазунова Г. А., Угарова Т. П., Колтакова С. И., Таранина Т. С. // Механизмы регуляции гемостаза на уровне молекулярных взаимодействий.— Свердловск, 1988.— С. 107–111.
3. Луговой Э., Гоголинская Г., Дерзкая С., Белицер В. // Биохимия.— 1978.— Т. 43, № 6.— С. 1045–1052.
4. Нейко Е. М., Середюк Н. Н., Фабрика А. В. // Врач. дело.— 1990.— № 4.— С. 57–60.
5. Петик А. В., Шмалько Ю. П., Соловьев Д. А. // Экспер. онкол.— 1991.— Т. 13, № 5.— С. 68–69.
6. Угарова Т. П. // Биохимия человека и животных.— М., 1989.— Т. 13.— С. 65–74.
7. Угарова Т. П., Соловьев Д. А., Золотухин В. А. и др. // Методы получения и анализа биохимических реактивов.— Рига, 1987.— С. 122.
8. Цивкина Л., Колтакова С., Бакрадзе М. // Вопросы герпелологии.— Л., 1977.— С. 222.
9. Alagon A., Possani L., Smart J., Schleuning W. // Thrombos. Haemost.— 1985.— Vol. 54.— P. 312.
10. Anderson L. // Haemostasis.— 1972.— Vol. 1.— P. 31–43.
11. Aronson D. // Thrombos. Haemost.— 1976.— Vol. 36, N 1.— P. 9–13.
12. Atroxin / Thrombin Clotting Time. Instruction // Sigma Catalog. Procedure N 845.— 1991.— P. 1984.
13. Bajwa S., Markland F., Russell F. // Toxicol.— 1981.— Vol. 19.— P. 53–59.
14. Barlow G., Hollman W., Lorand L. // Res. Commun. chem. Path. Pharmacol.— 1970.— Vol. 1.— P. 39–42.
15. Bell W. // Haemostasis and Animal Venoms.— New York, 1988.— P. 541–553.
16. Bonilla C. // Thrombos. Res.— 1975.— Vol. 6.— P. 151–169.
17. Campos S., Escobar E., Lazo F. et al. // Haemostasis and Animal Venoms.— New York, 1988.— P. 107–115.
18. Collins J., Jones J. // Europ. J. Biochem.— 1972.— Vol. 26, N 4.— P. 510–517.
19. Collins J., Jones J. // Ibid.— 1974.— Vol. 42, N 1.— P. 81–87.
20. Curtis C. // Thrombosis and Haemostasis.— Edinburgh, 1987.— P. 216–222.
21. Denson K., Russel R., Almagro E., Bishop R. // Toxicol.— 1972.— Vol. 10.— P. 557–562.
22. Dyr J., Blomback B., Kornalik F. // Thrombos Res.— 1983.— Vol. 30, N 2.— P. 185–194.
23. Esnouf M., Tunnah G. // Brit. J. Haemat.— 1967.— Vol. 13.— P. 581–590.
24. Ewart M., Halton M., Basford J., Dodgson K. // Biochem. J.— 1970.— Vol. 118, N 2.— P. 603–609.
25. Fontana F. Cerise et surquelques poisons Vegetaux.— Florence, 1781.
26. Funk C., Gmur R., Herold R., Stroub P. // Brit. J. Haemat.— 1971.— Vol. 21, N 1.— P. 43–52.
27. Furukawa Y., Hayashi K. // Toxicol.— 1977.— Vol. 15.— P. 107–114.
28. Gabrijelcic D., Drujan B., Gubensek F. // Ibid.— 1982.— Vol. 20.— P. 275–278.
29. Griffin J. // Thrombos Haemost.— 1979.— Vol. 42, N 1.— P. 261.
30. Guan L., Chi C., Juan M. // Thrombos. Res.— 1984.— Vol. 35, N 3.— P. 301–310.
31. Herzig G., Ratnoff J., Shainoff A. // J. Lab. clin. Med.— 1970.— Vol. 76.— P. 451–463.
32. Holleman W., Coen L. C. // Biochim. biophys. Acta.— 1970.— Vol. 200, N 3.— P. 587–589.
33. Holleman K., Weiss P. // J. biol. Chem.— 1976.— Vol. 251, N 6.— P. 1663–1669.
34. Hutton R. // Biochem. J.— 1975.— Vol. 131, N 4.— P. 799–807.
35. Komori Y., Nikai T., Yamaguchi Y., Suzihara H. // Comp. Biochem. Physiol.— 1987.— Vol. 88, N 2.— P. 643–649.
36. Kornalik F. // Pharmacol. Ther.— 1985.— Vol. 29.— P. 353–405.
37. Kosugi T., Ariga K., Kinjo K., Mihara H. // Ketsueki to Miyakkan.— 1984.— Vol. 15.— P. 311–313.
38. Lalallo Z., Teisseyre E. // Scand. J. Haemat.— 1981.— Vol. 13, Suppl.— P. 261–266.
39. Magalhaes A., de Oliveira G., Diniz C. // Toxicol.— 1958.— Vol. 19.— P. 279–283.
40. Malhotra O. // Biochim. biophys. Acta.— 1982.— Vol. 702.— P. 178–192.
41. Markland F. // J. Toxicol. Toxin. Rev.— 1983.— Vol. 2.— P. 119–160.
42. Markland F. // Haemostasis and Animal Venoms.— New York, 1988.— P. 149–173.
43. Markland F., Damus P. // J. biol. Chem.— 1973.— Vol. 246, N 21.— P. 6460–6473.
44. Martinelli R., Sheraga B. // Biochemistry.— 1986.— Vol. 19.— P. 2343–2350.
45. McFarlane R. // Oxford med. School Gaz.— 1965.— Vol. 17.— P. 100–115.
46. McFarlane R., Barnet B. // Lancet.— 1934.— Vol. 2.— P. 985–987.
47. Milelich J., Jackson C., Megerus P. // J. biol. Chem.— 1978.— Vol. 253.— P. 6908–6916.
48. Mori N., Sugihara H. // Comp. Biochem. Physiol.— 1989.— Vol. 92, N 4.— P. 537–547.
49. Nolan C., Hall L., Barlow G. // Meth. Enzymol.— 1976.— Vol. 45.— P. 205–213.
50. Ouyang C., Shyong J., Teng C. // Thrombos. Diathes. haemorrh. (Stuttg.).— 1971.— Bd 26.— S. 224–234.
51. Ouyang C., Yang F. // Biochim. biophys. Acta.— 1974.— Vol. 351.— P. 354–363.
52. Pirkle H., Theodor J., Miyada D., Simmons C. T. // J. biol. Chem.— 1985.— Vol. 261, N 19.— P. 8830–8835.
53. Pitney W. // Thrombos. Diathes. Haemorrh. (Stuttg.).— 1969.— Bd 38 (Suppl.).— S. 81–86.
54. Pitney W., Regoezi E. // Brit. J. Haemat.— 1970.— Vol. 19.— P. 67–81.
55. Prentice L., Edman W., McNicol G. // Ibid.— 1974.— Vol. 27.— P. 77–87.
56. Shainoff J., Dardik B. // Science.— 1979.— Vol. 204, N 43.— P. 200–202.
57. Shu Y., Moran J., Geren C. // Biochim. biophys. Acta.— 1983.— Vol. 748.— P. 236–244.
58. Seegers W., Teng C., Novoa E. // Thrombos. Res.— 1980.— Vol. 19.— P. 11–20.
59. Seegers W., Teng C., Ghoshman A., Novoa E. // Ann. N. Y. Acad. Sci.— 1981.— Vol. 370.— P. 453–467.
60. Selestre H., Giglio J. // Toxicol.— 1987.— Vol. 25, N 11.— P. 1135–1144.
61. Spiekerman A., Frederix K., Wagner F., Prescott J. // Biochim. biophys. Acta.— 1973.— Vol. 293, N 2.— P. 464–475.
62. Stocker K. // Fibrinolytics and Antufibrinolytics.— Berlin, 1978.— P. 451–454.
63. Stocker K. // Thrombos. Res.— 1983.— Vol. 31, N 5.— P. 765–766.
64. Stocker K. // Haemostasis and Animal Venoms.— New York, 1988.— P. 525–540.
65. Stocker K., Barlow G. // Meth. Enzymol.— 1976.— Vol. 45.— P. 214–223.
66. Suzuki T., Takahashi H. // Toxicol.— 1984.— Vol. 22.— P. 29–38.
67. Tan N., Tan C. // Ibid.— 1989.— Vol. 27, N 6.— P. 697–702.
68. Turpie A., Prentice L., McNicol G. // Brit. J. Haemat.— 1971.— Vol. 20.— P. 217–225.
69. Wagner F., Spiekerman A., Prescott J. // J. biol. Chem.— 1968.— Vol. 243.— P. 4487–4493.
70. Zahra P., Sapru N., Tu G., Bailly V. // Biochim. biophys. Acta.— 1983.— Vol. 747.— P. 225–231.

Поступила 23.06.92



Е. Н. Орлов, Е. М. Антипов, Н. Н. Николаев

## НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ПОЛУЧЕНИЯ СТЕРОИДНЫХ ПРОФИЛЕЙ МОЧИ

Газожидкостная хроматография (ГЖХ) является идеальным инструментом для надежного анализа гормонов стероидной структуры благодаря высокой чувствительности и разрешающей способности. Хроматограммы сложной смеси стероидов — стероидные профили (СП) — являются незаменимым средством для диагностики многих заболеваний, связанных с нарушениями синтеза и метаболизма гормонов. Задачи дифференцирования различных форм дефицита ферментов на отдельных стадиях биосинтеза гормонов могут быть успешно решены по анализу соотношения индивидуальных стероидов между собой.

Первые статьи, посвященные ГЖХ стероидов, появились в 1960 г. В. Ван ден Хювел и соавт. [44] показали возможность разделения смеси стероидов на неподвижной фазе (НФ) SE-30. Затем Л. Д. Литвинов [1] сделал предварительное сообщение о применении ГЖХ как перспективного метода определения функционального состояния надпочечников.

В настоящее время проблема хроматографии стероидов достаточно хорошо изучена. В развитых странах ГЖХ стероидов биологических жидкостей заняла место стандартного метода в клиническом анализе. К сожалению, в нашей стране данный подход применяется редко, прежде всего из-за относительно малой известности данной методики, но главным образом ввиду недостатка большинства необходимых реактивов, а также ложно сложившихся представлений о его высокой трудоемкости.

Используют два типа хроматографических колонок: насадочные и капиллярные. Лучшими разделяющими свойствами обладают капиллярные колонки, но техника работы с ними и соответствующие известные методики достаточно сложны и больше подходят для научных исследований. Для клинического использования целесообразно применение насадочных колонок. Они просты в изготовлении и удобны при использовании. Для выполнения анализов пригодны любые отечественные газовые хроматографы, снабженные детектором ионизации в пламени (ДИП). Некоторые исследования, требующие предварительной подготовки материала, довольно трудоемки, но значительная часть их легко и быстро выполняема, информативна, дешева и не требует дефицитных реактивов, поэтому отвечает требованиям скринингового исследования.

Известно много методов определения стероидов мочи, различающихся процедурой гидролиза конъюгатов, способом очистки и химической структурой производного.

**Ферментативный гидролиз (ФГ) конъюгатов.** Большинство методик выполнено с применением ФГ, позволяющего избежать деструкции стероидов. К его недостаткам относятся длительность процесса (до 96 ч), а также трудность достижения полной конверсии. В первых работах

ГЖХ использовали как вспомогательный метод для количественного определения стероидов после разделения их при помощи тонкослойной хроматографии (ТСХ). Например, М. Куршнер и М. Липсет [28] гидролизovali конъюгаты мочи глюкуронидазой печени быка, проводили экстракцию, ТСХ, элюировали стероиды, переводили их в производные, а затем каждый стероид количественно определяли газохроматографически.

В дальнейшем ГЖХ становится самостоятельным методом, и все стероиды определяют сразу за одно хроматографирование. Для повышения избирательности в некоторых методиках после проведения гидролиза и экстракции производят очистку с использованием колоночной и ТСХ, что значительно усложняет анализ. Описан точный и чувствительный метод определения субмикροколичеств основных фракций 17-кортикостероидов (17-КС) и прегнандиола [33]. Для очистки экстракта применяли ТСХ. Для определения фракций 17-КС применяли колоночную хроматографию на окиси алюминия [18]. Помимо ТСХ, использовали осаждение кетостероидов реактивом Жирара [31]. С целью разделения изомеров андростендиолов и прегнандиолов мочи применяли очистку, включающую последовательное удаление кетостероидов реактивом Жирара, колоночную хроматографию на окиси алюминия, ТСХ на силикагеле F<sub>254</sub> [3]. Выделенные зоны подвергали ГЖХ. На СП идентифицированы многие пики изомеров стероидов. Хорошие результаты могут быть достигнуты без применения предварительной очистки. Именно эти методы будут рассмотрены ниже.

С целью улучшения хроматографических свойств исследуемых соединений (повышение их летучести, термостабильности и селективности) почти все методики включают стадию получения производных стероидов. При этом гидроксильные группы переводят в соответствующие эфиры, а кетоны — в оксимы. При сравнении поведения разных эфиров стероидов [8, 45] было показано, что трифторацильные производные обладают наилучшими хроматографическими свойствами и чувствительность ДИП к ним выше.

Немодифицированные стероиды для ГЖХ применяют редко, так как в этом случае не удастся разделить на неполярных НФ два важных андрогена; дегидроэпиандростерон и андростерон, но упрощение, связанное с отсутствием одной стадии, заслуживает внимания. Описан простой метод определения недериватизированных основных фракций 17-КС и главных метаболитов прогестерона [34]. Приведен СП ребенка, страдающего адреногенитальным синдромом. Метод применяли для диагностики вирилизирующего синдрома у девочек.

В ряде работ стероиды переводят в триметилсилильные (ТМС) производные. Описана исчерпывающая процедура гидролиза, экстракции, получения ТМС-производных важнейших 17-КС прегнандиола и прегнантриола [20]. Для медицинских целей в основном используют стеклянные колонки. Несмотря на утверждение [4], что использование маталлических колонок приводит к распаду стероидов, такие колонки с успехом применяли в методе, пригодном для рутинных определений фракций 17-КС, а также прегнандиола

и прегнантриола [7]. Детально описаны все стадии процесса гидролиза, экстракции, приготовления ТМС-производных. Авторы привели СП больных гирсутизмом и гиперкортицизмом.

Часто стероиды хроматографируют в виде двойного метокситриметилсилильного (МО-ТМС) производного. Опубликовано [13] сообщение о количественном определении МО-ТМС-производных; дан критический обзор методов гидролиза, разделения и количественного определения 17-КС. Описан простой метод количественного определения основных фракций 17-КС и 17-оксикортикостероидов в виде МО-ТМС-производных [43]. Приведены СП здоровых мужчин, мальчика с адреногенитальным синдромом, женщины с синдромом Иценко — Кушинга и синдромом Штейна — Левентала. Авторы определяли 15 метаболитов стероидных гормонов в виде МО-ТМС-производных и привели пример применения метода при исследовании больной с адреногенитальным синдромом [37]. Разделяли 24 клинически важных стероида на колонке, содержащей смесь двух носителей: 9 частей OV-1 (1 %) и 1 часть OV-225 (3 %) [38]. Определяли 26 эндогенных стероидов в виде их МО-ТМС-производных [39], что является наибольшим достижением в области ГЖХ стероидов мочи с применением насадочных колонок.

Е. Хорнинг и соавт. [21, 22] развил ГЖХ-метод стероидного анализа, впервые применив бензилоксим-ТМС- производные. Для анализа мочи новорожденных использованы бензилоксим-ТМС- производные кетостероидов [10]. Эти производные являются устойчивыми соединениями с хорошими хроматографическими свойствами. Получены СП, содержащие около 20 пиков с 2 резко разграниченными областями, из которых первая содержит оксистероиды, а вторая — кетостероиды. Проводили сравнение СП у разных детей, а также у одного ребенка в разные сроки жизни. Представлены СП взрослых мужчин, женщин и новорожденных [9].

ГЖХ обладает достоинством высокоэффективной жидкостной хроматографии, позволяющей определять сульфаты и глюкорониды стероидов, имеющие разное биологическое значение. В моче новорожденных определяли сульфаты стероидов, для чего мочу предварительно фракционировали на колонке, заполненной липофильным гелем [2]. Разделяли глюкорониды и сульфаты стероидов на колонке, заполненной амберлитом XAD-2, а затем первые подвергали ФГ, а вторые разлагали сольватически в этилацетате [27].

Для диагностики функционального состояния системы мать — плацента — плод важно знать экскрецию прегнандиола и эстриола. Предложен вариант одновременного их определения [5]. Применяли дериватизацию ацетилхлоридом. Описан быстрый (производительностью 6 образцов за 8 ч) и чувствительный (начиная с 6 нед беременности) метод определения эстрона, 17 $\beta$ -эстрадиола, эстриола и прегнандиола в течение беременности [23]. Стероиды хроматографируют в виде гексафторбутиратных производных, причем в данном случае применяли детектор, основанный на принципе захвата электронов. Комбинированная методика ГЖХ-определения основных фракций 17-КС, прегнандиола, прегнантриола и од-

новременно флюориметрически общего содержания эстрогенов изложена [36]. В водной фазе, полученной после промывки гидролизата щелочью, определяли эстрогены, используя при этом реакцию Кобера — Иттриха.

**Кислотный гидролиз (КГ) конъюгатов.** Большое значение имеют методы, где расщепление конъюгатов стероидов проводят при помощи КГ. Эта процедура значительно упрощает метод, сокращает время, затрачиваемое на выполнение анализа, и удешевляет его, поскольку исключает применение  $\beta$ -глюкоронидазы. Недостатком КГ является кислотное разрушение многих стероидов. Описан простой метод получения СП в течение 1,5 ч с применением КГ и хроматографии свободных стероидов [41]. Приведены СП для здоровых мужчин и женщин, а также для беременных женщин, женщин, больных раком яичников и молочной железы. Представлены СП, характерные для синдрома Иценко — Кушинга, адреногенитального синдрома, гипопитуитаризма, синдрома Штейна — Левентала, феохромоцитомы, а также приведена корреляция между колориметрическим и газохроматографическим методом определения суммарных 17-КС [19]. Предпринята попытка корреляции СП с опухолями тестикул [15]. Сделано сравнение КГ и ФГ конъюгатов стероидов и предложена [42] комбинированная с экстракцией процедура КГ, в которой значительно уменьшена деструкция последних. Разработан метод количественного определения индивидуальных стероидов [29].

Дальнейшее развитие метода с применением КГ включало стадию получения производных. Силилированию трифторацетамидом подвергали экстракт стероидов [40], полученный после проведения комбинированного КГ. Представлены СП для ряда заболеваний, в том числе СП женщины, страдающей врожденной адренальной гиперплазией вследствие дефицита 21-гидроксилазы, ребенка, больного раком надпочечников, женщины с признаками гирсутизма, являющегося следствием вирилизирующей опухоли надпочечников, и больного олигоспермией. Метод позволяет определять среди прочих стероидов прегнандиол и прегнантриол. Переводили стероиды в ацильные производные, а также применяли силилирование гексаметилдисилазаном [24]. Применяли КГ конъюгатов в комбинации с экстракцией и хроматографировали их в виде ацильных производных [17]. Для разделения андростерона и этиохоланолона в качестве НФ использовали циклогександиметанолсукцинат. Приведены нормы экскреции индивидуальных стероидов для здоровых мужчин и женщин. Модернизировав метод [24], авторы изучали по изменению СП экскрецию стероидов у детей с дефицитом 21-гидроксилазы на разных этапах развития ребенка [25].

**Автоматизированные методы.** Процессы, где присутствует стадия экстракции, с трудом поддаются автоматизации, поэтому особый интерес представляют работы, где для рутинных определений удастся применять автоматизацию. Для определения эстриола и прегнандиола у беременных использовали [35] разработанный ранее [6] полуавтоматический экстрактор, обрабатывающий одновременно 12 образцов, а также автоматический инжектор, что позволило проводить до



60 анализов за рабочий день. Предложена автоматизированная система для быстрого выполнения систематических анализов, состоящая из устройства для ввода пробы, держателя для шприца Гамильтона, 2 колонок, интегратора, самописца и телетайпа [32]. Описана полуавтоматическая компьютеризированная газожидкостная система для определения СП мочи с целью первичного отбора пациентов с эндокринными заболеваниями [30]. Система представляет собой хроматограф, снабженный автоматическим устройством для ввода проб. ДИП соединен последовательно с интегратором, телетайпом и перфоратором. Перфолента обрабатывается в вычислительном центре больницы, и полученные результаты распечатываются в стандартной форме.

**Совершенствование техники хроматографирования.** Показана возможность прогнозирования относительной молярной чувствительности ДИП, что позволило в качестве стандарта обходиться одним веществом известной стероидной структуры; приведена формула расчета [11]. Найдена зависимость относительного времени удержания, выраженной в метиленовых единицах, от температуры колонки, что важно для идентификации стероидов [12]. Показана целесообразность применения металлических колонок, изготовленных из никеля [14]. Такая колонка технологична, удобна при использовании, прочна и в 10 раз дешевле стеклянной.

**Дальнейшее развитие метода.** Все методики выполнены с использованием НФ, которые применяли и 30 лет назад; это в основном неполярные и полуполярные силиконы. Широкие перспективы, как оказалось, открываются при использовании в качестве НФ низкомолекулярных жидких кристаллов, обладающих уникальной селективностью. Первыми Д. Кирк и П. Шоу [26] рекомендовали жидкие кристаллы эфира холестерина в качестве неподвижных жидких фаз для разделения эпимеров стероидов. Разделяли эпимеры стероидов на нематических жидких кристаллах [N,N-бис(*n*-метилоксибензилидена)-а,а'-би-*n*-толуидине] с необычно высокой разрешающей способностью, на которых можно, например, разделить 4 эписмера 3 $\alpha$ / $\beta$ -окси-5 $\alpha$ / $\beta$ -андростан-17-она за 15 мин [46]. Предложено использовать новые нематические жидкие кристаллы, обладающие повышенной термостабильностью [16]. По своим разделяющим свойствам насадочные колонки, где НФ являются жидкие кристаллы, превосходят возможности традиционных стационарных фаз и могут успешно конкурировать с капиллярными колонками.

Таким образом, СП мочи, полученные с использованием насадочных колонок, позволяют решать сложные задачи диагностики. Возможности метода далеко не исчерпаны как с научной, так и с практической точки зрения. Его простота и доступность дают право надеяться, что метод займет достойное место в клиническом анализе в нашей стране.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Литвинов Л. Д. // Актуальные вопросы клинической медицины.— М., 1963.— С. 64—67.
2. Anderson R. A., Defaye G., Madani C., Chambaz E. M. // J. Chromatogr.— 1974.— Vol. 99, N 1.— P. 485—494.
3. Berthou F., Bardou L., Floch H. H. // Ibid.— 1974.— Vol. 93, N 1.— P. 149—165.
4. Bober H., Gaul H. // Beckman Rep.— 1967.— N 4.— S. 6—17.
5. Bottem J. K., Belderok W. J. // Clin. chim. Acta.— 1976.— Vol. 68, N 2.— P. 199—201.
6. Brown J. B., MacLeod S. C., Macnaughtan C. et al. // J. Endocr.— 1968.— Vol. 42, N 1.— P. 5—15.
7. Chevins R., Launay J. M., Julien R., Dreux C. // Clin. chim. Acta.— 1974.— Vol. 55, N 3.— P. 333—343.
8. Gupta D., Breilmaier E., Jung G. et al. // Chromatographia.— 1971.— Vol. 4, N 12.— P. 572—575.
9. Devaux P. G., Horning M. G., Horning E. C. // Analyt. Lett.— 1971.— Vol. 4, N 3.— P. 151—160.
10. Devaux P. G., Horning M. G., Hill R. M., Horning E. C. // Analyt. Biochem.— 1971.— Vol. 41, N 1.— P. 70—82.
11. Edwards R. W. H. // J. Chromatogr.— 1978.— Vol. 153, N 1.— P. 1—6.
12. Edwards R. W. H. // Ibid.— Vol. 154, N 2.— P. 183—190.
13. Engel L. L., Neville A. M., Orr J. C., Raggatta P. R. // Steroids.— 1970.— Vol. 16, N 4.— P. 377—386.
14. Fenimor D. C., Whitford J. H., Davis C. M. // J. Chromatogr.— 1977.— Vol. 140, N 1.— P. 9—15.
15. Frensdorff E. L., van Kampen E. J., Hoek W. // Clin. chim. Acta.— 1970.— Vol. 22, N 1.— P. 77—81.
16. Janini G. M., Manning W. B., Zielinsky W. L., Muschik C. M. // J. Chromatogr.— 1980.— Vol. 193, N 3.— P. 444—450.
17. Juricskay Z., Kecskes L. // Acta biochim. biophys. Acad. Sci. hung.— 1978.— Vol. 13, N 4.— P. 279—291.
18. Heyns W., Hendriks A., De Moor P. // Ann. Endocr.— 1965.— Vol. 26, N 2.— P. 168—169.
19. Hoek W., van Kampen E. J. // Clin. chim. Acta.— 1968.— Vol. 19, N 3.— P. 371—381.
20. Holub W. R. // Clin. Chem.— 1971.— Vol. 17, N 11.— P. 1083—1088.
21. Horning E. C., Devaux P. G., Moffat A. C. et al. // Clin. chim. Acta.— 1971.— Vol. 34, N 2.— P. 135—144.
22. Horning M. G., Hung A., Hill R. M., Horning E. C. // Ibid.— P. 261—268.
23. Kaplan H. G., Hreshchyshyn M. M. // Steroids.— 1972.— Vol. 19, N 6.— P. 763—770.
24. Kecskes L., Juricskay Z. // Acta biochim. biophys. Acad. Sci. hung.— 1975.— Vol. 10, N 1—2.— P. 37—49.
25. Kecskes L., Juricskay Z., Kosztolanyi G., Szecsenyi M. // Ibid.— 1981.— Vol. 16, N 1—2.— P. 57—75.
26. Kirk D. N., Shaw P. M. // J. Chem. Soc.— 1971.— N 23.— P. 3979—3982.
27. Kulpmann W. R., Breuer H. // Z. klin. Chem. klin. Biochem.— 1977.— Bd 15, N 4.— S. 225—231.
28. Kirschner M. A., Lipsitt M. B. // Steroids.— 1964.— Vol. 3, N 3.— P. 277—294.
29. Macarulla J. M., Gomez-Capilla J. A., Osorio C. // Rev. esp. Fisiol.— 1974.— Vol. 30, N 2.— P. 67—70.
30. Makin H. L. J., Trafford D. J. H. // J. clin. Chem. clin. Biochem.— 1982.— Vol. 20, N 12.— P. 899—905.
31. Matthijssen C., Coldzieher J. W. // Acta endocr. (Kbh.).— 1971.— Vol. 68, N 2.— P. 311—333.
32. Maurier J. C. // Aggressologie.— 1976.— Vol. 17, N 4.— P. 251—259.
33. Pinelli A., Formento M. L. // J. Chromatogr.— 1972.— Vol. 68, N 1.— P. 67—75.
34. Sanghvi A., Wight C., Serenko A., Balachandran R. // Clin. chim. Acta.— 1974.— Vol. 56, N 1.— P. 49—57.
35. Scommegna A., Chatteraj S. C. // Obstet. and Gynec.— 1968.— Vol. 32, N 2.— P. 277—284.
36. Taylor G. F., Carter N. G. // Pathology.— 1981.— Vol. 13, N 1.— P. 97—100.
37. Tomsova Z., Gregorova I., Jarosova M. // Vnitřn. Lek.— 1978.— Vol. 24, N 7.— P. 691—694.
38. Tomsova Z., Gregorova I., Horky K. // J. Chromatogr.— 1980.— Vol. 200, N 1.— P. 221—223.
39. Tomsova Z., Gregorova I., Horky K. // Adv. Steroid Anal.— Budapest, 1982.— P. 259—263.
40. Trocha P., D'Amato N. A. // Clin. Chem.— 1978.— Vol. 24, N 2.— P. 193—199.
41. Van Kampen E. J., Hoek W. // Clin. chim. Acta.— 1967.— Vol. 16, N 4.— P. 442—444.
42. Van Kampen E. J., Anker A. P. // Ibid.— 1971.— Vol. 34, N 2.— P. 241—260.
43. Van de Calseyde J. F., Scholtis R. J. H., Schmidt N. A., Leijten C. J. // Ibid.— 1972.— Vol. 38, N 1.— P. 103—111.
44. Van den Heuvel W. J. A., Sweeley C. C., Horning E. C. //

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.127-005.4-07:616.153.915

А. Седлакова, Й. Коллар, М. Ондрейкова,  
А. Рыникова, В. Роздобудькова, С. Питкова

### ВЛИЯНИЕ РОЛИТЕТРАЦИКЛИНА НА УРОВЕНЬ НЕЭСТЕРИФИЦИРОВАННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ, ФОСФОЛИПИДОВ И ТРИАЦИЛГЛИЦЕРИНОВ ПРИ ИШЕМИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ МИОКАРДА

Институт экспериментальной медицины Университета им. П. Й. Шафарика, Кошице, ЧСФР

Липиды вместе с глюкозой, лактатом и пируватом являются главным энергетическим субстратом для организма вообще и для сердца особенно. Около 50—80 % общего энергетического потребления в сердце составляет окисление жиров, и при некоторых экстремальных условиях эта доля повышается на 90—100 %. Кроме того, липиды играют важную роль в структуре биомембран. Ключевым звеном при образовании энергии из липидов в миокарде является поступление свободных неэстерифицированных жирных кислот (НЭЖК) из циркуляции и ЖК триацилглицеринов (ТГ), фосфолипидов (ФЛ) и эфиров холестерина после гидролиза циркулирующих хиломикронов и липопротеидов липопротеидлипазой (ЛПЛ) и другими липолитическими ферментами [28, 29, 33]. ЖК в сердце подвергаются  $\beta$ -окислению в митохондриях или эстерификации с образованием новых сложных липидов. Аккумуляция высших ЖК в клетках сердца и высвобождение их в экстрацеллюлярную среду при ингибировании  $\beta$ -окисления ведут к разным повреждениям миокарда, которые проявляются при многих сердечно-сосудистых заболеваниях [26]. При гипоксии и аноксии в результате снижения циркуляции крови в сосудах при ишемии миокарда нарушается утилизация ЖК, нарушено  $\beta$ -окисление, снижены активность цикла Кребса и синтез АТФ [24, 30]. Эти нарушения ведут к накоплению липидов, в том числе ЖК и их метаболитов, в миокарде [5, 11, 15—17]. Гидролиз мембранных ФЛ и диспропорция между деацилированием и реацилированием содействуют накоплению липидов и НЭЖК [12, 16, 22]. Степень, в какой НЭЖК выступают в качестве патогенного компонента при ишемии миокарда, точно не определена, и существуют противоположные данные о повышении и снижении уровня НЭЖК [5, 16]. Первичным патогенным эффектом считается разобщение окислительного фосфорилирования в митохондриях, в результате чего создаются условия метаболического ингибирования. ЖК выступают как ингибиторы окисления глюкозы и утилизации лактата в миокарде и увеличивают ишемическое

повреждение посредством аккумуляции потенциально токсических продуктов их метаболизма, особенно высших ацил-КоА и ацилкарнитинов [16, 17], которые вместе с лизофосфолипидами вызывают нарушения сократительной способности, тахикардию и дисритмию [12, 18, 20, 22, 26]. Большая роль отводится повышению образования липоперекисей и другим видоизменениям липидов (в том числе холестерина — липопротеидов низкой плотности — ЛПНП) и метаболитов арахидоновой кислоты — простагландинов, простацклинов, тромбоксанов и др., которые появляются в миокарде при деградации мембранных ФЛ миоцитов и кровяных клеток — макрофагов, тромбоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов и др. — при ишемическом повреждении в повышенном количестве [23, 27, 31]. Эти метаболиты повреждают клеточные мембраны миоцитов, могут включаться в липиды сосудистых стенок и, таким образом, вызывать атеросклеротические изменения.

Актуальным для медицинской практики становится вопрос использования и исследования лекарственных средств, влияющих на метаболизм липидов [32, 34]. Известно, что препараты тетрациклина в митохондриях сердца ингибируют дыхание и снижают содержание АТФ, общих нуклеотидов, отношение АТФ/АДФ и активность АТФазы [2, 6]. Данных о влиянии на метаболизм липидов мы в литературе не нашли. Препараты тетрациклина благодаря их флуоресценции применяются в медицинской практике для диагностики и в гистохимии [19]. Применение ролитетрациклина (РТЦ) при кратковременной и долговременной полной окклюзии коронарной артерии вызывало снижение активности креатинкиназы в сыворотке и частично предотвращало появление преждевременных сокращений в желудке и предсердиях сердца у кроликов и собак [13, 14].

В настоящей работе мы исследовали влияние РТЦ на уровень НЭЖК, ФЛ и ТГ в миокарде и НЭЖК и ФЛ в сыворотке крови у кроликов после окклюзии коронарной артерии.

**Методика.** Эксперименты выполняли на кроликах стандартной породы шиншилла массой тела  $3,25 \pm 1,0$  кг. После анестезии тиопенталом («Спофа», ЧСФР, 30 мг/кг) отбирали кровь из шейной вены и после вскрытия грудной полости и перикарда лигировали коронарную артерию на 60 мин. РТЦ вводили внутривенно в однократной дозе 40 мг/кг кроликам без лигирования, перед лигированием или после него. Исследованы следующие экспериментальные группы: 1-я, контрольная, группа — кролики без лигирования и без введения РТЦ с мнимой операцией; 2-я группа — кролики, которые после мнимой операции получали РТЦ; 3-я группа — кролики с лигированием коронарной артерии; 4-я группа — кролики, которые после лигирования получали РТЦ; 5-я груп-



Концентрация НЭЖК и ФЛ в сыворотке кроликов после ишемизации миокарда и введения РТЦ

Группа животных	НЭЖК, ммоль/л	ФЛ, ммоль/л
1-я — контроль	647,4±75,5 (11)	1,30±0,12 (11)
2-я:		
перед введением РТЦ	507,4±37,4 (5)	1,26±0,13 (5)
0 мин после введения РТЦ	522,0±42,4 (11)	1,11±0,09 (11)
30 мин « » РТЦ	587,2±65,0 (11)	1,16±0,08 (11)
60 мин « » РТЦ	669,3±99,5 (11)	1,05±0,09 (11)
3-я — лигирование:		
0 мин	1130,3±141,7**К (11)	1,06±0,14 (7)
30 мин	1450,8±197,7**К (11)	1,64±0,14 (7)
60 мин	1383,9±263,3**К (11)	1,55±0,16 (7)
4-я — лигирование+РТЦ:		
0 мин	1398,9±128,8**К, Р (8)	1,46±0,15 <sup>Р</sup> 2,00 (9)
30 мин	1052,6±131,8**К, Р (8)	1,35±0,15 (9)
60 мин	941,7±85,0**К, Р, Л (7)	1,30±0,13 (7)
5-я — РТЦ+лигирование:		
0 мин	387,4±50,3**К, Л (7)	1,07±0,15*Л (7)
30 мин	568,1±105,9**Л (7)	1,07±0,16**Л (7)
60 мин	561,4±72,6*Л (7)	1,02±0,14**Л (7)

Примечание. Здесь и в табл. 2: приведены средние арифметические±средние ошибки средней арифметической. Различия между группами статистически достоверны: одна звездочка —  $p<0,05$ , две —  $p<0,01$ ; К — сравнение с контрольной группой, Р — с группой с РТЦ, Л — с группой с лигированием; в скобках — число животных.

па — кролики, которые перед лигированием получали РТЦ. Пробы крови отбирали перед лигированием и через 30 и 60 мин после него. В группах с введением РТЦ пробы крови отбирали перед мнимой операцией, перед введением РТЦ после операции и на 30-й и 60-й минутах после введения РТЦ. В контрольной группе кровь брали из шейной вены тотчас после ее обнажения. После окончания операционной и медикаментозной процедуры (1 ч) отбирали пробы из ишемической и неишемической части миокарда. В отдельных группах обследовали 5—11 животных, в 5-й группе по некоторым показателям обследовали только 3 миокарда. Эксперименты выполняли на сытых животных. В сыворотке крови определяли концентрацию НЭЖК [24] и ФЛ [3], в миокарде — концентрацию НЭЖК [25], ФЛ и ТГ при помощи пакетов Био-Ла («Лакхема», ЧСФР, № РND 50—442—82). Результаты обработаны статистически по критерию  $t$  Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Сравнивали группы с лигированием с контрольной группой и эффект РТЦ — с контрольной группой и группой с лигированием.

Ишемическое повреждение миокарда, вызванное лигированием коронарной артерии, ведет к

нарушениям содержания липидов в самом сердце и сыворотке крови (табл. 1 и 2). После лигирования содержание НЭЖК в сыворотке крови и в миокарде повысилось более чем в 2 раза, а в ишемизированном миокарде — более чем в 2,5 раза. Повышение содержания ФЛ в сыворотке было статистически недостоверно, в миокарде после лигирования оно было статистически достоверно ( $p<0,05$ ). Содержание ТГ в неишемизированной части миокарда после лигирования повысилось в 2 раза, в ишемизированной — в 6,7 раза. Эти результаты в основном согласуются с данными других авторов [5, 7, 11, 16].

Решающую роль при ишемическом повреждении миокарда играет адренергическая стимуляция [9, 18, 21], сопровождающаяся повышением липолиза ТГ в жировой ткани, ведущим к повышению в кровотоке уровня НЭЖК, которые в зависимости от концентрации поступают в сердце [32]. Катехоламины в кардиомиоцитах активируют нейтральную ТГ-липазу, расщепляющую эндогенные ТГ [28] и липопероксидацию в плазматических мембранах миоцитов [1]. В сердце находится также ЛПЛ, активируемая глюкокортикоидами [4, 8]. Таким образом, в ишемизированном миокарде создаются условия, приводящие к накоплению

Концентрация НЭЖК, ТГ и ФЛ в миокарде после ишемизации и введения РТЦ

Таблица 2

Группа животных	НЭЖК, ммоль/г	ТГ, ммоль/г	ФЛ, ммоль/г
1-я — контроль	5,83±0,72 (5)	3,49±0,20 (5)	33,84±3,16 (5)
2-я — РТЦ	6,51±0,59 (8)	3,85±0,17 (8)	31,97±0,66 (8)
3-я — лигирование:			
неишемизированной части	13,11±1,80**К (18)	8,12±1,10**К (12)	42,97±2,10*К
ишемизированной « »	17,12±3,78**К	23,60±7,51**К	44,02±2,10*К (10)
4-я — лигирование+РТЦ			
неишемизированной части	11,50±1,35**К, Р (7)	17,90±8,63 (7)	45,44±1,43**К, Р (5)
ишемизированной « »	11,97±2,77**К, Р	54,26±14,92*НИ, **К, Р	48,84±1,14**К, Р
5-я — РТЦ+лигирование			
неишемизированной части	17,70±0,52**К, Р (3)	7,22±0,92**К, Р (4)	36,83±1,68*Л, Р (3)
ишемизированной « »	27,40±8,55**К, Р	15,05±3,98**К, Р	40,85±3,34*Р

Примечание. НИ — сравнение ишемизированной и неишемизированной части миокарда.

липидов (см. табл. 2). Адренергическая стимуляция в ишемизированном миокарде ведет к активации также эндогенных фосфолипаз [7, 10], гидролизующих мембранные ФЛ с высвобождением ЖК и лизофосфолипидов. Большая роль при повреждении миокарда отводится изменениям уровня фосфоинозитолов, при гидролизе которых высвобождается арахидоновая кислота и диацилглицерин [10, 11, 26]. Мы отметили повышение содержания ФЛ в миокарде после 60-минутной ишемии, вызванной лигированием коронарной артерии, когда наряду с процессами повреждения могут происходить восстановительные процессы с рефосфорилированием лизофосфолипидов. При этом отмечено повышение общего содержания липидного фосфора [2].

После введения РТЦ нормальным кроликам уровень липидных показателей в сыворотке крови и миокарде почти не отличался от контроля. Но при введении РТЦ животным с ишемическим повреждением миокарда мы отмечали изменение содержания липидов в сыворотке крови и миокарде. Содержание НЭЖК в сыворотке крови снижалось независимо от времени введения РТЦ (до или после лигирования). Содержание ФЛ снизилось только при введении РТЦ перед лигированием. Введение РТЦ после лигирования вызвало постепенное снижение содержания НЭЖК до уровня, который был статистически достоверно ниже, чем после лигирования (3-я группа), но выше, чем в контрольной группе (1-я группа) и группе с введением РТЦ (2-я группа) (см. табл. 1). Введение РТЦ перед лигированием (5-я группа) препятствовало повышению уровня НЭЖК, вызванному ишемией. Уровень НЭЖК в сыворотке крови, был ниже, чем в контрольной группе, в начале отбора крови и на 30-й и 60-й минутах он повысился до уровня в контрольной группе и группе с введением РТЦ. Во все исследуемое время содержание НЭЖК в сыворотке крови в 5-й группе было в 2—3 раза ниже по сравнению с группой с лигированием.

При ишемии миокарда эффект РТЦ существенно отличался от такового в сыворотке. Введение РТЦ после лигирования вызвало статистически недостоверное снижение содержания НЭЖК по сравнению с таковым в группе с лигированием, но оно было выше, чем в контрольной группе и группе с введением РТЦ. Содержание ТГ в 4-й группе было более чем в 2 раза выше, чем в группе с лигированием (3-я), и почти в 5 (в неишемизированной части) и 14 (в ишемизированной части) раз миокарда превышало таковое в 1-й и 2-й группах (контроль и группа с введением РТЦ). Содержание ФЛ было статистически достоверно выше по сравнению с контролем и группой с введением РТЦ. Эффект РТЦ был более отчетливым в ишемизированной части миокарда. Содержание ТГ в неишемизированной части миокарда было статистически достоверно выше по сравнению с контролем и группой с введением РТЦ. РТЦ не влиял на изменения концентрации ТГ (и НЭЖК), вызванные, по-видимому, стрессовыми факторами.

Снижение содержания липидов в сыворотке при ишемическом повреждении миокарда под влиянием РТЦ может указывать на повышение утилизации циркулирующих липидов с возможностью их увеличенного поступления в отдельные органы и ткани. РТЦ, вводимый перед лигирова-

нием (т. е. перед ишемическим повреждением миокарда), не вызывает нарушения содержания липидов в миокарде. Применение РТЦ при ишемическом повреждении миокарда может вызвать важнейшие нарушения метаболизма липидов, которые проявляются особенно массивной аккумуляцией ТГ в ишемическом участке и неповрежденной части миокарда.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бахова Л. К., Фадеева Т. К. // Вопр. мед. химии.— 1988.— № 1.— С. 22—24.
2. Barnova E., Barna K., Guzy J. // Bratisl. lek. Listy.— 1991.— Vol. 92.— P. 330—336.
3. Bartlett G. R. // J. biol. Chem.— 1959.— Vol. 234.— P. 466—468.
4. Borensztajn J., Robinson D. S. // J. Lipid Res.— 1970.— Vol. 11.— P. 111—118.
5. Van Bilsen M., Van der Vusse G. J., Willemsen P. H. W. et al. // Circulat. Res.— 1989.— Vol. 64.— P. 304—314.
6. Guzy J., Barnova E., Barna K. // Biologia (Bratisl.)— 1989.— Vol. 44.— P. 1147—1153.
7. Hostetter K. Y., Yellison E. J. // Molec. cell. Biochem.— 1989.— Vol. 88.— P. 77—82.
8. De Gasquet P., Pequignet-Planche E., Tonnu N. T., Diaby F. A. // Herm. Metab. Res.— 1975.— Vol. 7.— P. 152—157.
9. Endoh M., Hiramoto T., Ishibata A. et al. // Circulat. Res.— 1991.— Vol. 68.— P. 1179—1190.
10. Ефимова Л. В. // Вопр. мед. химии.— 1990.— № 6.— С. 34—36.
11. Janero D. R., Burchardl Ch. // J. Cell. Physiol.— 1989.— Vol. 140.— P. 150—160.
12. Kinnaird A. A., Choy P. C., Man R. Y. K. // Lipids.— 1988.— Vol. 23.— P. 32—35.
13. Kollar J., Ondrejko M., Rynikova A. et al. // UEMu. Vedecka konf. Zbornik prac.— Kosice, 1990.— P. 19—21.
14. Kollar J., Pitkova S., Rynikova A., Ondrejko M. // Ibid.— P. 52—54.
15. Kollar J., Benhalchi M., Hijova E. // Ibid.— P. 22—24.
16. Liedtke A. J., De Maison L., Eggleston A. M. et al. // Circulat. Res.— 1988.— Vol. 62.— P. 535—542.
17. Lopaschuk G. D., McNeil G. F., McVeigh J. J. // Molec. cell. Biochem.— 1989.— Vol. 89.— P. 175—179.
18. Lukas A., Ferrier G. R. // Canad. J. Physiol. Pharmacol.— 1989.— Vol. 67.— P. 765—771.
19. Malek P. // Tetracyklinove antibiotika v organizme.— Praha, 1962.— P. 299.
20. Man R. Y. K., Kinnaird A. A., Bihler I., Choy P. C. // Lipids.— 1990.— Vol. 25.— P. 450—454.
21. Meij J. T. A., Bordonali A., Dekkers D. H. W. et al. // Cardiovasc. Res.— 1990.— Vol. 24.— P. 94—101.
22. Miyazaki Y., Gross R. W., Sobel B. E., Saffitz J. E. // Amer. J. Physiol.— 1990.— Vol. 259.— P. C325—C331.
23. Mullane K. M., Pinto A. // Fed. Proc.— 1987.— Vol. 46.— P. 54—62.
24. Novak M. // Physiol. bohemoslov.— 1962.— Vol. 11.— P. 551—554.
25. Novak M. // J. Lipid. Res.— 1965.— Vol. 6.— P. 431—436.
26. Otani H., Prasad M. R., Engelman R. M. et al. // Circulat. Res.— 1988.— Vol. 63.— P. 930—936.
27. Schror K. // Basic Res. Cardiol.— 1987.— Vol. 82.— P. 235—243.
28. Stam H., Schoonderwoerd K., Hulasman W. C. // Lipid Metabolism in the Normoxic and Ischaemic Heart / Eds H. Stam, G. J. van der Vusse.— Darmstadt, 1986.— P. 19—28.
29. Stremmel W. // Molec. cell. Biochem.— 1989.— Vol. 88.— P. 23—29.
30. Stremmel W. // J. clin. Invest.— 1988.— Vol. 81.— P. 844—852.
31. Tada M., Kuzuya T., Hoshita S., Nishida M. // J. molec. cell. Cardiol.— 1988.— Vol. 10.— P. 135—143.
32. Troutz M., Jellison E. J., Hostetter K. Y. // Biochem. Pharmacol.— 1987.— Vol. 36.— P. 4251—4256.
33. Fournier N. // Lipids in Modern Nutrition / Eds M. Horisberger, U. Bracco.— New York, 1987.— P. 29—42.
34. Шутенко Ж. Б. // Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучения механизма их действия.— М., 1991.— С. 4—11.

Поступила 26.06.92

# INFLUENCE OF ROLYTETRACYCLINE ON CONTENT OF UNESTERIFIED FATTY ACIDS, PHOSPHOLIPIDS AND TRIACYLGLYCERINES IN ISCHEMIC IMPAIRMENT OF MYOCARDIUM.

A. Sedlakova, J. Kollar, M. Ondreykova, A. Rynikova, V. Rozdobudkova, S. Pitkova

Institute of Experimental Medicine, P. J. Shafarik University, Koshitse, CzSFR

Myocardial ischemia developed in rabbits after ligation of coronary artery within 60 min. Single dose of rolytetra-cycline 40 mg/kg was administered intravenously before or after ligation. Alterations in content of unesterified fatty acids and phospholipids were studied in blood serum as well as of unesterified fatty acids, phospholipids and triacyl glycerols — in the myocardium. After ligation of coronary artery content of unesterified fatty acids and phospholipids was increased 2-fold in blood serum as compared with control values, while in the ischemic myocardium these substances were increased more than 2-fold and triacyl glycerol — about 7-fold. Administration of rolytetra-cycline before ligation of the artery led to a decrease in content of unesterified fatty acids and phospholipids in blood serum down to control values; the ligation-induced high content of triacyl glycerols and phospholipids in the myocardium was also decreased, while alterations in unesterified fatty acids content were not similar. Rolytetra-cycline administered after the artery ligation caused a decrease in content of unesterified fatty acids but triacyl glycerols were markedly increased. The antibiotic did not affect the lipid content in nonischemized tissues of myocardium.

© Л. Ф. БОГМАТ, 1993

УДК 616.12-008.331.1-021.3-06:616.13-004.6-036.4-053.67]-07:616.154:577.175.53

Л. Ф. Богмат

## ГОРМОНЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ В ФОРМИРОВАНИИ ПРЕДВЕСТНИКОВ АТЕРОСКЛЕРОЗА У ПОДРОСТКОВ С ПЕРВИЧНОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

Харьковский НИИ охраны здоровья детей и подростков

Гипертоническая болезнь и частые ее осложнения на фоне атеросклеротических повреждений сосудов (инфаркт миокарда, инсульт) занимают по-прежнему ведущее место среди причин заболеваемости и смертности взрослых.

Патогенетическое значение гормонов надпочечников при гипертонической болезни в значительной степени связывают с потенцирующим действием их на сосудистую реактивность, что проявляется при повышении концентрации кортикостероидов в плазме крови [1, 3, 2, 6, 9].

До определенного времени большинство исследователей, изучая проблемы атеросклероза, не отводили кортикостероидным гормонам существенной роли в атерогенезе человека [10]. В последние годы появились сообщения по изучению функционального состояния коры надпочечников у больных

с различными стадиями и клиническими формами атеросклероза, а также о влиянии их на развитие экспериментального атеросклероза [5, 7, 8]. Результаты этих исследований неоднозначны, порой противоречивы.

Практически отсутствуют данные по изучению влияния кортикостероидов на формирование предвестников атеросклероза у подростков.

Все вышеизложенное послужило основанием для изучения особенностей липидного спектра, содержания кортизола, альдостерона и активности ренина плазмы крови у подростков с первичной артериальной гипертензией.

Методика. У 131 подростка [юноши 12—18 лет с первичной артериальной гипертензией (ПАГ)] содержание общего холестерина (ОХ), триглицеридов (ТГ) и холестерина липопротеидов высокой плотности (ХЛПВП) определяли на автоанализаторе «Согопа» фирмы «Technikon» (Швеция). Забор крови проводили из локтевой вены в утренние часы натощак после 12-часового голодания.

Активность ренина плазмы (АРП) и содержание альдостерона и кортизола в сыворотке крови определяли радиоиммунным методом с применением диагностических наборов фирмы «LIS» (Франция). Для исключения влияния ортостатического положения на уровень гормонов забор крови проводили после 10-минутного отдыха в горизонтальном положении исследуемого. Подростки в течение месяца не принимали лекарств и находились на обычном для каждого из них пищевом и водно-солевом режиме.

Статистическая обработка материала проведена с использованием методов корреляционного анализа (нелинейной корреляции). Достоверность различий определяли по критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение. В табл. 1 представлены данные по определению базального уровня альдостерона и кортизола и АРП у подростков с первичной артериальной гипертензией с учетом возраста. Как следует из табл. 1, средний уровень АРП в младшей возрастной группе (12—14 лет) был несколько выше, чем в средней (15—16 лет) и старшей (17—18 лет), однако эти различия были недостоверны. Уровень альдостерона практически не зависел от возраста обследуемых. Средние значения базального уровня кортизола имели определенные возрастные различия и характеризовались достоверным снижением от 12 к 18 годам ( $p < 0,05$ ).

Содержание ОХ у обследуемых юношей, как и в популяции подростков Харькова в целом повышалось к 15—16 годам с последующим снижением к 17—18. Содержание ТГ увеличивалось к 15 годам и сохранялось на одном уровне и в старшем подростковом возрасте. Содержание ХЛПВП возрастных изменений не претерпевало.

Используя средние показатели и их стандартные

Таблица 1

АРП, содержание гормонов надпочечников и липидов сыворотки крови у подростков с ПАГ в зависимости от возраста

Возраст, годы	АРП, нг/мл	Альдостерон, нг/мл	Кортизол, нмоль/л	ОХ, мг/дл	ТГ, мг/дл	ХЛПВП, мг/дл
12—14 (n=24)	9,0±1,0	229,2±25,2	606,3*±54,2	200,3±8,2	108,0*±8,1	45,0±1,3
15—16 (n=77)	6,8±0,8	210,2±12,6	598,9±49,9	223,9±17,3	135,4*±19,9	45,8±0,8
17—18 (n=30)	7,4±1,5	221,3±19,4	469,7*±68,0	196,6±6,7	132,1±9,2	44,8±1,2

Примечание. В скобках — число обследованных. Звездочка —  $p < 0,05$ .



Корреляционные взаимосвязи гормонов надпочечников и АРП у подростков с ПАГ при различных их уровнях

Уровень гормонов и АРП	Статисти- ческий показатель	Коэффициент нелинейной корреляции ( <i>I</i> , <i>p</i> )		
		АРП и альдостерон	АРП и кортизол	кортизол и альдостерон
АРП:				
высокая (20,0±2,6 пг/мл)	<i>I</i>	0,721	0,591	0,891
	<i>p</i>	<0,01	<0,05	<0,001
низкая (1,7±0,2 пг/мл)	<i>I</i>	0,834	0,756	0,721
	<i>p</i>	<0,01	<0,01	<0,01
Альдостерон:				
высокий (323,0±16,0 пг/мл)	<i>I</i>	0,422	0,853	0,215
	<i>p</i>	>0,1	<0,001	>0,1
низкий (130,4±6,2 пг/мл)	<i>I</i>	0,493	0,589	0,426
	<i>p</i>	<0,02	<0,001	<0,02
Кортизол:				
высокий (881,0±37,0 нмоль/л)	<i>I</i>	0,657	0,414	0,490
	<i>p</i>	<0,01	>0,1	<0,02
низкий (345,0±13,0 нмоль/л)	<i>I</i>	0,497	0,551	0,498
	<i>p</i>	<0,05	<0,05	<0,01

отклонения, в каждой возрастной группе подростков были выделены лица с высокими (более  $M+2\sigma$ ) и низкими (ниже  $M-2\sigma$ ) уровнями АРП и гормонов надпочечников. При этом высокие показатели АРП были выявлены у 15 (11,4 %), альдостерона — у 34 (25,9 %), кортизола — у 23 (17,5 %) юношей. У 10 из них высокий уровень альдостерона сочетался с высокими показателями кортизола. Это свидетельствовало о значительной функциональной активности коры надпочечников и требовало исключения у них синдрома Кона (первичного гиперальдостеронизма). Однако в отличие от последнего высокие уровни кортикостероидов у обследуемых сопровождалась также и высокими показателями АРП (от  $6,5 \pm 1,2$  до  $10,3 \pm 1,8$  пг/мл). Это позволило выявленные изменения у юношей с ПАГ рассматривать как проявление гиперфункции коры надпочечников с гиперпродукцией кортизола, альдостерона и отсутстви-

ем по типу обратной связи угнетения продукции ренина.

Высокая АРП сопровождалась прямой, сильной и средней степени выраженности корреляционной зависимостью между гормонами надпочечников (табл. 2). При высоком уровне альдостерона взаимосвязь его с кортизолом исчезала, но появлялась сильная корреляционная зависимость между АРП и кортизолом ( $I = +0,853$ ;  $p < 0,001$ ). Высокие значения кортизола создавали иную взаимосвязь между АРП и гормонами надпочечника; коэффициенты корреляции между АРП и кортизолом были недостоверны, а между АРП и альдостероном и между кортизолом и альдостероном были прямыми средней степени выраженности.

Низкий уровень АРП, который выявлен у 19 (14,5 %) юношей с ПАГ, сопровождался достоверным снижением уровня альдостерона (до  $155,8 \pm 15,0$  пг/мл;  $p < 0,01$ ) и средним — кортизола

Таблица 3

Содержание липидов сыворотки крови у подростков с ПАГ в зависимости от уровня кортикостероидов и АРП и их коэффициенты корреляции

Уровень гормонов и АРП	Статистический показатель	ОХ, мл/дл	ТГ, мл/дл	ХЛПВП, мл/дл
<b>АРП:</b>				
высокая ( $20,0 \pm 2,6$ пг/мл)	$M \pm m$	$196,4 \pm 9,4$	$141,2 \pm 13,5$	$46,0 \pm 1,4$
	<i>I</i>	0,787	0,271	0,218
	<i>p</i>	<0,01	>0,1	>0,1
низкая ( $1,7 \pm 0,2$ пг/мл)	$M \pm m$	$196,6 \pm 8,2$	$95,0 \pm 6,2$	$45,2 \pm 1,9$
	<i>I</i>	0,597	0,514	0,592
	<i>p</i>	<0,01	<0,05	<0,02
<b>Альдостерон:</b>				
высокий ( $323,6 \pm 16,2$ пг/мл)	$M \pm m$	$198,5 \pm 6,9$	$122,2 \pm 11,0$	$47,2 \pm 0,9$
	<i>I</i>	0,286	0,465	0,328
	<i>p</i>	>0,1	<0,02	>0,1
низкий ( $130,4 \pm 6,2$ пг/мл)	$M \pm m$	$199,1 \pm 5,3$	$118,0 \pm 6,8$	$46,0 \pm 0,2$
	<i>I</i>	0,481	0,489	0,330
	<i>p</i>	<0,01	<0,01	<0,05
<b>Кортизол:</b>				
высокий ( $881,1 \pm 37,0$ нмоль/л)	$M \pm m$	$193,1 \pm 6,5$	$134,2 \pm 10,2$	$47,2 \pm 1,0$
	<i>I</i>	0,336	0,442	0,378
	<i>p</i>	>0,1	<0,05	>0,1
низкий ( $345,1 \pm 13,0$ нмоль/л)	$M \pm m$	$201,8 \pm 4,9$	$117,0 \pm 7,0$	$43,0 \pm 1,7$
	<i>I</i>	0,422	0,426	0,405
	<i>p</i>	<0,05	<0,02	<0,05



(620,3±74,0 нмоль/л). Этот уровень АРП создавал высокую степень взаимодействия кортикостероидов у обследуемых подростков. Низкое содержание кортизола, выявленное у 34 (25,9 %) юношей с ПАГ, сопровождалось повышением АРП (до 12,7±2,0 нг/мл) и альдостерона (до 214,3±16,8 нг/мл), а корреляционные коэффициенты подтверждали прямую зависимость между АРП и уровнем кортикостероидов. Низкий уровень альдостерона, выявляемый у 43 (32,8 %) обследуемых, сопровождался достоверным, средней силы корреляционным взаимодействием с содержанием кортизола и АРП. Таким образом, было установлено, что у подростков с ПАГ гормональный баланс кортикостероидов неоднороден.

В табл. 3 представлены данные по изучению содержания основных фракций липидного спектра крови у подростков с ПАГ в зависимости от уровня гормонов надпочечников и АРП, а также коэффициенты корреляции между отдельными их показателями. Как видно из табл. 3, содержание ТГ зависит от уровня гормонов надпочечников и АРП. Однако изучение корреляционных связей показало, что высокий уровень АРП тесно взаимосвязан с показателями общего холестерина ( $I=+0,787$ ;  $p<0,001$ ), а высокий уровень альдостерона и кортизола имеет средней степени прямую корреляционную взаимосвязь с показателями концентрации триглицеридов ( $I=+0,465$ ;  $p<0,01$  и  $I=+0,442$ ;  $p<0,01$ ). В то же время низкий уровень АРП, альдостерона и кортизола имеет средней силы корреляционную связь со всеми исследованными компонентами липидного спектра крови.

Исходя из полученных данных, можно предположить, что у подростков с ПАГ низкие уровни гормонов надпочечников и АРП определяют оптимальное соотношение отдельных компонентов липидного спектра крови. Гиперфункция же коры надпочечников уже в этом возрасте, как и у части взрослых лиц, страдающих гипертонической болезнью [2], не только способствует прогрессированию самой гипертонии, но и создает предпосылки к формированию атерогенных сдвигов липидного спектра сыворотки крови.

Таким образом, проведенные исследования позволили установить, что у подростков с ПАГ гиперфункция коры надпочечников является не только патогенетическим компонентом поддержания гипертонии за счет повышения реактивности сосудов, но и компонентом, участвующим в формировании предвестников атеросклероза. Уже в этом возрасте закладываются отдельные патогенетические формы гипертонической болезни взрослых, имеющие определенные метаболические характеристики и предпосылки к раннему развитию атеросклероза.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Воцаль В., Янушкевич В., Фальтыновски Т. и др. // Кардиология.— 1988.— № 12.— С. 34—37.
2. Коган А. С., Куликов Л. К., Лагерева Л. И. и др. // Тер. арх.— 1990.— № 9.— С. 68—71.
3. Кучеренко А. Г., Банкова В. В., Надеждина Е. А., Марков Х. М. // Кардиология.— 1983.— № 4.— М. 66—70.
4. Мороз Е. В. // Физиол. журн.— 1982.— Т. 28, № 6.— С. 752—755.
5. Салуи М. Н., Соколов Е. Я. // Пат. физиол.— 1977.— № 4.— С. 70—74.
6. Теппермен Дж., Теппермен Х. Физиология обмена веществ и эндокринной системы: Пер. с англ.— М., 1989.
7. Титов В. Н., Творогова М. Г., Масенко В. П. и др. // Тер. арх.— 1981.— № 12.— С. 40—44.

8. Хмельницкий О. К., Ступина А. С. Функциональная морфология эндокринной системы при атеросклерозе и старении.— Л., 1989.
9. Шхвацабая И. К., Устинова С. Е., Учитель И. А. и др. // Кардиология.— 1983.— № 4.— С. 5—10.
10. Stout P. W. Hormones and Atherosclerosis.— Boston, 1982.

Поступила 24.03.92

#### IMPORTANCE OF ADRENAL HORMONES IN DEVELOPMENT OF PREDICTORS OF ATHEROSCLEROSIS IN ADOLESCENTS WITH PRIMARY ARTERIAL HYPERTENSION.

L. F. Bogmat

Institute of Children and Adolescent Health Care, Kharkov.

The components of blood lipid spectrum (total cholesterol, triglycerides and high density lipoprotein cholesterol) were studied in 131 adolescents (12—18 years old) with primary arterial hypertension at various levels of adrenal hormones (hydrocortisone and aldosterone) and blood plasma renin activity. The optimal ratio of lipid components in blood was detected if concentrations of adrenal hormones and blood plasma renin activity were low. Hyperfunction of the adrenal cortex in teenagers contributed both to the development of hypertension and to atherosclerotic changes in vessels. This suggests that definite forms of hypertension occurred in adults, with specific impairments in the metabolism of blood serum lipids, were developed during the juvenile age.

© В. В. ДАВЫДОВ, 1993

УДК 612.014.46:547.461.8

В. В. Давыдов

#### ВЛИЯНИЕ МАЛОНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ПРОЦЕСС ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ДЕКАРБОКСИЛИРОВАНИЯ ПИРУВАТА

Запорожский медицинский институт

Ранее было показано, что малоновая кислота оказывает выраженное антигипоксическое действие [1]. Предпринятые попытки изучения механизма этого действия дали основания предполагать, что в его основе может лежать способность малоната ограничивать использование пировиноградной кислоты в реакции окислительного декарбоксилирования. Проверке данного предположения и посвящено настоящее исследование.

**Методика.** Работа выполнена на 40 крысах-самках Вистар массой 200—230 г. Животных декапитировали, извлекали головной мозг, отмывали от крови и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе Поттера — Эльвегея с 0,32 М сахарозой. Гомогенат фильтровали через 4 слоя марли. Из приготовленного таким образом филтратата при помощи дифференциального центрифугирования выделяли грубую митохондриальную фракцию [2]. Осадок грубой митохондриальной фракции коры больших полушарий головного мозга далее подвергали троекратному замораживанию при  $-17^{\circ}\text{C}$  и оттаиванию при  $10^{\circ}\text{C}$  в течение 30 мин. После этого к 4 мл суспензии митохондрий, подвергнутых процедуре замораживания — оттаивания, добавляли 0,4 мл 1 % раствора тритона X-100. Пробы выдерживали 15 мин при  $4-6^{\circ}\text{C}$ , интенсивно встряхивали и центрифугировали при 10 000 g в течение 15 мин при  $4-6^{\circ}\text{C}$ . Осадок, содержащий 2,5—3 мг белка, суспендировали с 2 мл 0,07 М трис-буфера pH 7,5. Полученную суспензию использовали далее для определения активности пируватдегидрогеназы

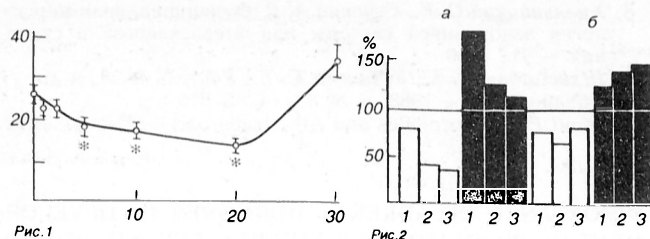


Рис. 1. Влияние малоновой кислоты на активность пируватдегидрогеназы мозга крыс.

По оси абсцисс — концентрация малоновой кислоты в инкубационной среде, мкмоль/мл; по оси ординат — активность пируватдегидрогеназы, нмоль/мг белка в 1 мин. Звездочка —  $p < 0,05$  по отношению к пробам без малоновой кислоты.

Рис. 2. Влияние пирувата (а) и НАД<sup>+</sup> (б) на изменение активности пируватдегидрогеназы мозга крыс под действием малоновой кислоты.

Активность пируватдегидрогеназы в среде без малоновой кислоты принята за 100 %. Светлые столбики — изменение активности пируватдегидрогеназы в присутствии 10 мкмоль/мл малоновой кислоты в среде инкубации; темные столбики — изменение активности пируватдегидрогеназы в присутствии 30 мкмоль/мл малоновой кислоты в среде инкубации. Концентрация субстратов в среде инкубации: а: 1 — 0,3 мкмоль/мл, 2 — 3,0 мкмоль/мл, 3 — 3,0 мкмоль/мл; б: 1 — 0,1 мкмоль/мл, 2 — 1,0 мкмоль/мл, 3 — 10,0 мкмоль/мл.

[2]. Определение активности пируватдегидрогеназы проводили в среде инкубации, содержащей в конечном объеме 2 мл 140 мкмоль триса, 5 мкмоль пирувата натрия, 20 мкмоль хлористого магния, 2 мкмоль тиаминпирофосфата, 2 мкмоль окисленного НАД, 5 мкмоль цистеина, 1 мкмоль ди-натриевой соли ЭДТА (рН 7,5). В среду инкубации вносили суспензию разрушенных митохондрий (0,08—0,15 мг белка). После этого проводили 3-минутную преинкубацию проб при 25 °С. Реакцию начинали внесением 0,1 мл 0,1 % раствора коэнзима А. Через каждую минуту в течение 3 мин регистрировали изменение оптической плотности пробы при 340 нм. Предварительно проведенные эксперименты выявили линейную зависимость скорости восстановления НАД пробами разрушенных митохондрий от времени в течение первых 5 мин реакции. При изучении влияния малоната на активность пируватдегидрогеназного комплекса в реакционную смесь во время преинкубации дополнительно вносили нейтрализованную малоновую кислоту. Полученные данные подвергали статистической обработке по Стьюденту.

**Результаты и обсуждение.** Из рис. 1 видно, что характер действия малоновой кислоты на ферменты пируватдегидрогеназного комплекса определяется величиной ее концентрации в среде инкубации. Так, увеличение концентрации малоната от 1 до 20 мкмоль/мл сопровождается прогрессивным торможением активности ферментативного комплекса. Максимальный ингибирующий эффект проявляется при концентрации 5—10 мкмоль/мл, когда скорость окисления пирувата снижается на 30 % по сравнению с ее исходной величиной. Дальнейшее увеличение концентрации малоновой кислоты до 30 мкмоль/мл приводит к увеличению скорости окисления пирувата на 34 % по сравнению с ее величиной в среде без малоната.

Таким образом, малоновая кислота действительно оказывает модулирующее влияние на функционирование пируватдегидрогеназного комплекса, что в определенной мере соответствует имеющимся в литературе сведениям [3]. Однако характер

этого воздействия определяется концентрацией малоната в инкубационной среде.

Для изучения механизма регуляторного действия малоната далее было проведено исследование его эффекта в условиях изменения содержания субстратов пируватдегидрогеназной реакции в среде инкубации (рис. 2). Исследования показали, что увеличение концентрации пирувиноградной кислоты сопровождается повышением ингибирующего действия малоната при концентрации последнего в среде, равной 10 мкмоль/мл. Одновременно с этим происходит снижение окисляющего влияния малоновой кислоты на окислительное декарбоксилирование пирувата при введении в среду инкубации 30 мкмоль/мл малоновой кислоты.

Увеличение содержания в среде инкубации другого субстрата пируватдегидрогеназной реакции — НАД<sup>+</sup> — не оказывает существенного влияния на ингибирующее действие малоната при его концентрации в среде 10 мкмоль/мл. Однако при этом происходит увеличение активирующего влияния малоната на скорость окислительного декарбоксилирования пирувиноградной кислоты при концентрации последнего в среде инкубации, равной 30 мкмоль/мл.

Полученные данные указывают на то, что регуляторное действие малоновой кислоты на окислительное декарбоксилирование пирувата в значительной мере модулируется концентрацией субстратов пируватдегидрогеназной реакции в клетке. Однако причины и механизм этой модуляции неясны. Неясным остается и механизм влияния малоната на пируватдегидрогеназный комплекс.

Вместе с тем обнаруженное свойство малоновой кислоты выступать в роли модулятора функциональной активности пируватдегидрогеназного комплекса имеет важное биологическое значение. Оно связано с тем, что малонат является одним из промежуточных продуктов обмена веществ [5] и уровень его может варьировать в зависимости от функционального состояния клеток. Учитывая этот факт, а также ключевое значение окислительного декарбоксилирования пирувата в регуляции метаболизма [4], можно предположить существование особого механизма регуляции скорости аэробных процессов, связанного с малонатом.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Давыдов В. В., Репецкая А. В. // Физиол. журн. — 1991. — Т. 37, № 5. — С. 111—112.
2. Методы биохимических исследований / Под ред. М. И. Прохоровой. — Л., 1982. — С. 36—38.
3. Островский Ю. Н., Величко М. Г., Якубчик Т. Н. Пируват и лактат в животном организме. — Минск, 1984. — С. 11.
4. Sin G. M., Dragur M. // Lipids. — 1982. — Vol. 17, N 5. — P. 349—355.
5. Riley K. M., Koeppen A. H. // J. Neurochem. — 1989. — Vol. 52, Suppl. 1. — P. 138.

Поступила 07.09.92

#### EFFECT OF MALONIC ACID ON OXIDATIVE DECARBOXYLATION OF PYRUVATE.

V. V. Davydov

Medical School, Zaporozh'e.

Effect of malonic acid on the activity of pyruvate dehydrogenase was studied in rat brain hemispheres. Malonate was shown to regulate the oxidative decarboxylation of pyruvic

acid. The rate of the reaction depended on the concentration of malonic acid as well as on the content of pyruvate dehydrogenase substrates in the experimental samples.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.13-004.6-092:612.17.015.1

Ф. Н. Гильмиярова, В. М. Радомская,  
Л. Н. Виноградова, И. Г. Кретьова, Л. Н. Самыкина

# СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ МИОКАРДА ЧЕЛОВЕКА ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ

Самарский медицинский институт

Выяснение механизмов атеросклероза ведется с различных позиций [1—4, 9, 11, 12, 14]. Учитывая важную роль маламдегидрогеназы (КФ 1.1.1.37) в метаболизме и энергообеспечении миокарда, а также установленное нарушение функции фермента на ранних стадиях атеросклероза, нами был изучен этот фермент, выделенный из сердечной мышцы человека при отсутствии признаков заболеваний и с морфологически верифицированным атеросклерозом.

**Методика.** Маламдегидрогеназу выделяли из сердечной мышцы людей, погибших в результате травм, не совместимых с жизнью (контрольная группа — 22 человека). Опытную группу составили погибшие в результате внезапной сердечной смерти с морфологическими проявлениями атеросклероза (60 человек). С помощью морфометрии аорты оценивали степень и стадию атеросклеротического процесса. Очистку маламдегидрогеназы проводили по методу, разработанному нами. Определяли активность фермента с субстратом оксалоацетатом [10] и L-малатом [7]. Аминокислотный анализ фермента осуществляли на анализаторе LKB 4101 (Швеция) в трехбуферной натриевой системе. Молекулярную массу маламдегидрогеназы определяли электрофоретически в градиенте полиакриламидного геля по кривым регрессии. Количество и тип SH-групп изучали по [5]. Изoeлектрическое фокусирование проводили в колонке 110 мл LKB (Швеция), используя амфолины с диапазоном pH 3,5—10,0 [14].

**Результаты и обсуждение.** Маламдегидрогеназа, выделенная из сердечной мышцы человека, была очищена в 480—500 раз, в контрольной группе удельная активность фермента в среднем составила  $131,5 \pm 19,3$  ед/мг белка. При атеросклерозе активность фермента достоверно снижалась до  $101,0 \pm 2,2$  ед/мг белка.

Изучение свойств фермента показало, что оптимальный pH маламдегидрогеназы в норме находится в зоне 7,3—7,8, а при атеросклеротическом процессе отмечается его смещение в более кислую сторону — до 6,7—7,3. Фермент при атеросклерозе проявляет более низкую активность, более термостабилен и при 70 °C сохраняет 30 % активности, в то время как маламдегидрогеназа в контрольной группе при этой температуре инактивируется. Атеросклеротический процесс сопровождается достоверным снижением (на 50 %) по сравнению с контролем содержания SH-группы до  $2,0 \pm 0,36$  ( $p < 0,01$ ), что, возможно, связано с конформационной перестройкой молекулы, маскиров-

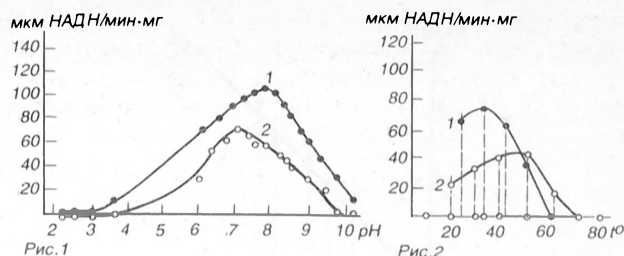


Рис. 1. Влияние pH на активность маламдегидрогеназы из миокарда.

Здесь и на рис. 2—4: 1 — контрольная группа, 2 — атеросклероз.

Рис. 2. Влияние температуры на активность маламдегидрогеназы из миокарда.

кой этих функциональных групп. Анализируя кинетические характеристики маламдегидрогеназы, следует отметить, что зависимость скорости реакции от содержания субстратов и коферментов носит гиперболический характер и подчиняется уравнению Михаэлиса — Ментен. Характерно, что реакция окисления малата ферментом протекает в 37 раз медленнее, чем восстановление оксалоацетата с участием НАДН. Известно, что в миокарде человека фонд НАДН на порядок выше, чем содержание  $\text{НАД}^+$ ; таким образом, малат служит формой депонирования восстановленных эквивалентов (см. рис. 1, 2).

При атеросклеротическом процессе отмечается резкое снижение сродства маламдегидрогеназы к оксалоацетату:  $K_m$  увеличивается до 0,02. Следовательно, концентрация субстрата, при которой скорость реакции равна полумаксимальной, составляет  $293 \pm 30$  мкмоль, т. е. она в 2,3 раза выше по сравнению с контролем. Аналогичная тенденция установлена и для НАДН (см. рис. 3, 4).

В соответствии с результатами, полученными нами, мол. м. фермента составляет  $65\,500 \pm 90$  Д. По данным изoeлектрического фокусирования, маламдегидрогеназа из сердечной мышцы человека характеризуется микрогетерогенностью, состоит из 3 субформ в диапазоне pH 4,65—5,97. Максимум активности определяется у формы с изoeлектрической точкой при pH 5,97 (рис. 5).

По результатам 72-часового гидролиза, маламдегидрогеназа цитоплазмы миокарда человека содержит  $659 \pm 79$  аминокислотных остатков. Отношение кислых аминокислот к основным в маламдегидрогеназе в контрольной группе составляет 1,69, при атеросклерозе снижается до 1,57. В целом в молекуле фермента содержание аминокислотных остатков с положительно и отрицательно заряженными боковыми группами (pH 7,0) равно 221 (33,5 %), аминокислот с неполярными груп-

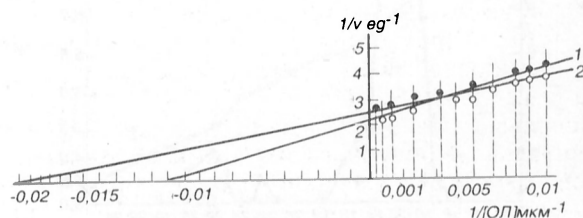


Рис. 3. Зависимость в двойных обратных координатах начальной скорости реакции от концентрации оксалоацетата.



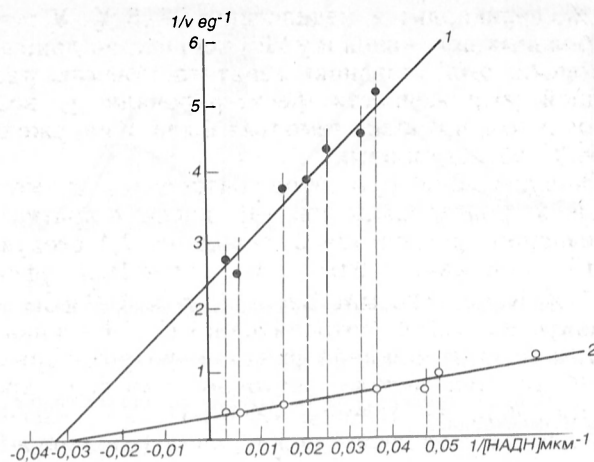


Рис. 4. Зависимость в двойных обратных координатах начальной скорости реакции от концентрации НАДН.

нами выявлено 293 остатка (44,5 %), аминокислотных остатков с полярными незаряженными группами — 135 (20,4 %) на 1 моль фермента. Преобладание в белке заряженных аминокислотных остатков и аминокислот, содержащих полярные группы, принятые при условном значении pH 7,0 не несущих заряда, определяет в целом гидрофильный характер макромолекулы малакдегидрогеназы, ее растворимость, легкую экстрагируемость.

При атеросклеротическом процессе соотношение аминокислот в молекуле белка несколько изменяется. Отношение содержания кислых и основных аминокислот изменяется до 1,57. Суммарное содержание аминокислотных остатков с заряженными радикалами составляет 203, т. е. на 30,8 % ниже, чем в контроле. Было обнаружено 311 гидрофобных неполярных аминокислотных остатков и 137 аминокислотных остатков с полярными незаряженными группами.

Характерно, что повышение содержания холестерина изменяет липидную вязкость и функционирование мембранно-связанных ферментов [2]. Очевидно, это правомерно и для растворимых ферментов, учитывая, что цитоплазматические

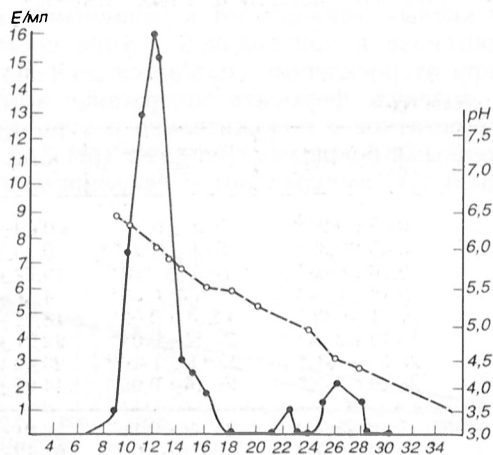


Рис. 5. Изоэлектрическое фокусирование малакдегидрогеназы из миокарда человека.

ферменты, так же как и мембранные, связаны в единую полибелковую систему, которая адсорбирована на структурных элементах клетки [6, 13].

Полученные результаты свидетельствуют о структурных изменениях в молекуле малакдегидрогеназы миокарда человека при атеросклерозе. Они проявляются нарушением функциональных свойств фермента, снижением каталитической активности. Как известно, в миокарде из 5,5 мкмоль/мин/г ткани цитоплазматического НАДН на долю малак-аспартатной системы в транспорте восстановленных эквивалентов приходится 4 мкмоль/мин/г ткани [8]. Падение активности фермента при атеросклерозе на 25 % создает предпосылки для нарушения снабжения субстратом (НАДН) электронно-транспортной цепи, снижения процессов энергопродукции в миокарде. Кроме того, изменение структурных характеристик фермента может обуславливать нарушение межбелкового, в том числе фермент-ферментного, взаимодействия в цитоплазме, обеспечивающего постоянство и динамичность метаболических процессов в клетке.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Кретьова В. Г. Обмен никотинамидных коферментов при алкогольной интоксикации: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Челябинск, 1989.
2. Назорев В. А. // Стенка сосудов в атеро- и тромбогенезе. — М., 1983. — С. 31—41.
3. Смирнов В. И., Репин В. С. // Бюл. Всесоюз. кардиол. науч. центра. — 1985. — № 2. — С. 13—31.
4. Титов В. И., Чернядьева И. Ф., Громодова М. М. // Лаб. дело. — 1986. — № 12. — С. 707—715.
5. Boyer G. D. // J. Amer. Chem. Soc. — 1954. — Vol. 76. — P. 4331—4337.
6. Bronstein W. W., Knull H. K. // Canad. J. Biochem. — 1981. — Vol. 59. — P. 494—499.
7. Crow K. E., Bragg T. I., Hardman M. J. // Arh. Biochem. — 1983. — Vol. 225. — P. 621—629.
8. Hopkins P. N., Williams R. R. // Atherosclerosis. — 1981. — Vol. 40. — P. 1—52.
9. Noakes T. D. Exercise and the Heart: MD Thesis. — Cape town, 1981.
10. Ochoa S. // Meth. Enzymol. — 1955. — Vol. 1. — P. 735—739.
11. Ross R., Glomsel J. // New Engl. J. Med. — 1976. — Vol. 295. — P. 369—376.
12. Sinesky M., Pinkerton E., Su Hurland, Simon F. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1979. — Vol. 76. — P. 4893—4897.
13. Trai Ynn-Ho, Nurthy S. N., Prasanna P. N., Steck T. L. // J. biol. Chem. — 1982. — Vol. 33. — P. 343—350.
14. Vesterberg O., Svensson H. // Acta chem. scand. — 1966. — Vol. 20. — P. 820—824.

Поступили 07.09.92

#### STRUCTURE-FUNCTIONAL PROPERTIES OF MALATE DEHYDROGENASE FROM HUMAN MYOCARDIUM IN ATHEROSCLEROSIS.

F. N. Gilmiyarova, V. M. Radomskaya, L. N. Vinogradova, I. G. Kretova, L. N. Samykina

Medical School, Samara.

A homogeneous preparation of malate dehydrogenase was obtained from human myocardium, the enzyme structure-functional properties were studied. Alterations in structure characteristics of the enzyme, increase in its hydrophobic moiety, decrease of the enzyme activity were observed during impairments in atherosclerosis. The alterations of the enzyme properties appear to be involved in deterioration of energy metabolism as well as they are related to activation of liposynthesis in atherosclerosis.



М. К. Соболева, В. И. Шарапов

**ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ МЕМБРАН У БОЛЬНЫХ СЕПСИСОМ**

Новосибирский медицинский институт Минздрава России

Умеренная или тяжелая анемия является классическим гематологическим синдромом, сопровождающим течение сепсиса. В клинике и эксперименте при стрептококковом, стафилококковом, пневмококковом сепсисе [5, 20], бартонеллезе [14], септицемии, обусловленной *Neisseria* [5], клостридий [12] и *H. influenzae* [11, 13], более чем у половины обследованных обнаруживают признаки гемолиза [5, 20], в связи с чем традиционным является представление о септической анемии как о гемолитической. Одной из важных причин гемолиза при данном заболевании может явиться снижение деформируемости эритроцитов, обнаруживаемое у больных при bacteriemia различной этиологии [16, 17]. Полагают, что последняя возникает под воздействием бактериальных токсинов-гемолизин, а также избытка активных форм кислорода, образующегося в процессе активации нейтрофилов при остром воспалении [5, 16]. Большинство исследователей, изучающих проблему малокровия при остром воспалении, считают, что причины гемолиза эритроцитов при сепсисе до конца не выяснены, так как не изучены основные изменения структуры и функции эритроцитарных мембран, развивающиеся в динамике септического процесса [5, 8, 13, 20].

Цель работы — изучение функционального состояния эритроцитарной мембраны и ее жирнокислотного состава у больных сепсисом.

Методика. Обследовано 58 детей, больных сепсисом различной этиологии, в возрасте от 2 мес до 3 лет. Наиболее характерным сочетанием пиемических очагов было наличие гнойного менингоэнцефалита и тяжелой двусторонней пневмонии (встречалось у 100 % обследованных). Реже регистрировали следующие пиемические очаги: пиелонефрит — 16 %, остеомиелит — 19 %, абсцессы клетчатки и мягких тканей — 14 %, энтероколит и фибринозно-гнойный перитонит —

19 %, перикардит и медиастинит — 6 %. У всех 58 больных при жизни и у 20 умерших, по данным аутопсии, были признаки гепатита. Анемию различной выраженности регистрировали у всех 58 больных, признаки гемолиза были обнаружены у 56 % обследованных.

Общую фракцию липидов эритроцитарных мембран экстрагировали по [9] после 4-кратного отмывания эритроцитов буфером pH 7,4 следующего состава: 0,05 М трис-HCl-буфер, 0,87 % NaCl, 0,25 мМ CaCl<sub>2</sub>, 0,25 мМ MgCl<sub>2</sub> — и получения теней эритроцитов по [7]. Жирнокислотный состав липидной фракции эритроцитарных мембран определяли методом газовой хроматографии на приборе «Хром-4» [4]. Рассчитывали относительное содержание индивидуальных жирных кислот, суммарное содержание насыщенных индивидуальных жирных кислот, индекс насыщенности (ИН) — отношение суммы насыщенных жирных кислот к сумме ненасыщенных. О функциональном состоянии эритроцитарной мембраны судили по уровню продуктов реакций перекисного окисления липидов (ПОЛ): диеновых конъюгатов (ДК) и малонового диальдегида (МДА), которые определяли одновременно в плазме и эритроцитах. ДК выявляли по методу Plazet в модификации [1], МДА — по Staucliff в модификации [21]. Концентрацию липопротеинов и SH-групп в эритроцитах определяли цитофотометрически на аппарате «Leits» после окраски мазков периферической крови на липопротеины по Barenbaum, на SH-группы по Shevremont-Frederick [10]. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) определяли по [6], супероксиддисмутазы (СОД) — по [15]. Полученные результаты обработаны общепринятыми статистическими методами с использованием критерия *t* Стьюдента.

Результаты и обсуждение. У больных сепсисом в острый период болезни выявлено снижение относительного содержания насыщенных (миристиновой, пентадекановой, пальмитиновой, стеариновой) и увеличение количества полиненасыщенных (линолевой и арахидоновой) жирных кислот. Особенно значительным в период развернутых клинических проявлений сепсиса оказалось увеличение содержания в эритроцитарных мембранах арахидоновой кислоты (табл. 1). Содержание мононенасыщенных жирных кислот

Таблица 1

Содержание жирных кислот (в %) в эритроцитарных мембранах у больных сепсисом

Жирная кислота	Разгар болезни (37)	Терминальное состояние (20)	Стабилизация процесса (18)	Выздоровление (18)	Контроль (9)
Миристиновая C <sub>14:0</sub>	0,02±0,01*	0,39±0,11*	0,05±0,01*	0,06±0,01*	0,09±0,01
Пентадекановая C <sub>15:0</sub>	0,04±0,01*	0,26±0,08*	0,06±0,06*	0,06±0,01*	0,15±0,02
Пальмитиновая C <sub>16:0</sub>	12,60±0,12*	30,41±0,04*	16,10±0,08*	16,91±0,01*	19,72±0,04
Пальмитолеиновая C <sub>16:1</sub>	2,14±0,12*	4,02±0,12	2,62±0,01*	2,98±0,06*	4,51±0,01
Стеариновая C <sub>18:0</sub>	10,20±0,08*	21,52±0,16*	11,61±0,06*	14,91±0,03*	18,11±0,12
Олеиновая C <sub>18:1</sub>	15,10±0,25*	24,06±0,07*	18,12±0,04*	20,14±0,04*	22,21±0,08
Линолевая C <sub>18:2</sub>	31,2±0,09*	11,12±0,11*	25,10±0,02*	22,11±0,13**	20,42±0,17
Арахидоновая C <sub>20:4</sub>	36,80±0,04*	7,21±0,16*	28,40±0,02*	26,10±0,05*	14,81±0,13
Сумма насыщенных жирных кислот	22,68±0,21*	52,58±0,09*	27,82±0,02*	31,92±0,11*	39,01±0,12
Сумма ненасыщенных жирных кислот	77,12±0,07*	47,42±0,11*	72,18±0,03*	78,08±0,07*	61,12±0,06
ИН	0,27±0,02*	1,11±0,03*	0,39±0,02*	0,41±0,02*	0,64±0,02

Примечание. Здесь и в табл. 2: в скобках — число обследованных; звездочка — достоверность различий с контролем (*p* < 0,05).

Уровень продуктов ПОЛ и показатели метаболической активности эритроцитов у больных сепсисом

Показатели	Разгар болезни (58)	Терминальное состояние (18)	Стабилизация процесса (39)	Выздоровление (34)	Контроль (47)
ДК в плазме, ммоль/л	39,30±0,23*	6,90±0,18*	20,70±0,19*	16,40±0,31*	14,10±0,16
ДК в эритроцитах, ммоль/л	42,40±0,24*	8,10±0,25*	22,30±0,10*	19,10±0,08*	16,40±0,17
МДА в плазме, ммоль/л	7,10±0,12*	1,40±0,17*	5,30±0,08*	2,50±0,07*	2,04±0,10
МДА в эритроцитах, ммоль/л	8,70±0,08*	1,90±0,05*	6,90±0,17*	3,60±0,11*	3,07±0,06
Концентрация липопротеинов	0,471±0,001*	0,419±0,004*	0,456±0,004*	0,469±0,003*	0,536±0,002
Концентрация SH-групп	0,251±0,001*	0,111±0,001*	0,231±0,002*	0,159±0,004*	0,172±0,003
Активность Г-6-ФДГ, ЕД на 1 мл эритроцитов	3,88±0,09*	1,08±0,36*	3,26±0,10*	2,57±0,16	2,64±0,28
Активность СОД, ЕД на 1 мл эритроцитов	168,6±1,3*	101,2±2,6*	186,7±3,1*	208,7±3,5*	228,4±5,2

уменьшалось умеренно. В эту фазу болезни в эритроцитах больных сепсисом обнаружено увеличение активности Г-6-ФДГ и SH-групп, которое, по-видимому, носило компенсаторный характер, и резкое возрастание интенсивности реакций ПОЛ, о чем свидетельствовало увеличение содержания ДК и МДА как в плазме, так и в эритроцитах (табл. 2), уменьшение концентрации липопротеинов в эритроцитах, а также снижение активности СОД.

В период стабилизации процесса (при уменьшении интоксикации, купировании лихорадки, прекращении метастазирования пиемических очагов) происходило уменьшение содержания ненасыщенных жирных кислот за счет снижения в эритроцитарных мембранах арахидоновой и линолевой кислот ( $p < 0,01$  по сравнению с параметрами в период разгара болезни) и увеличения содержания насыщенных (миристиновой, пентадекановой, пальмитиновой) и мононенасыщенных (пальмитолеиновой и олеиновой) жирных кислот. У больных в период стабилизации процесса в связи с указанными изменениями жирнокислотного состава эритроцитарных мембран достоверно снижалась интенсивность процессов ПОЛ: уровень ДК и МДА как в плазме, так и в эритроцитах в сравнении с показателями в период разгара болезни снижался, параллельно в эритроцитах обнаруживалось снижение активности Г-6-ФДГ, концентрации SH-групп, а также уменьшение концентрации липопротеинов (см. табл. 2). Активность СОД у больных в период стабилизации процесса достоверно увеличивалась в сравнении с показателями в период разгара болезни ( $p < 0,01$ ), оставаясь все-таки более низкой, чем у здоровых доноров (см. табл. 2).

В эритроцитах умирающих больных обнаружено значительное ( $p < 0,001$  в сравнении с показателями в острый период болезни) снижение содержания линолевой и арахидоновой жирных кислот и увеличение мононенасыщенных (пальмитолеиновой и олеиновой) и насыщенных жирных кислот (см. табл. 1). Следует отметить, что наиболее значительно ( $p < 0,01$ ) увеличивалось содержание миристиновой, пентадекановой и пальмитиновой жирных кислот, в то время как содержание стеариновой кислоты возрастало не столь существенно ( $p < 0,05$ ). Нарастание концентрации насыщенных жирных кислот приводило к резкому (в среднем в 4,7 раза) возрастанию ИН в динамике болезни до значений, превышающих величины ИН у здоровых доноров в 1,8 раза (см. табл. 1).

Характерной особенностью метаболизма эритроцитов больных сепсисом в терминальной стадии являлось резкое истощение ПОЛ: уровень ДК и

МДА как в плазме, так и в эритроцитах падал до патологически низких (не встречающихся у здоровых доноров) величин (см. табл. 2), концентрация липопротеинов в эритроцитах при этом закономерно снижалась. В эритроцитах больных с терминальной стадией сепсиса выявлено снижение содержания SH-групп, СОД и Г-6-ФДГ, свидетельствующее об истощении компенсаторных возможностей эритроцитарного метаболизма. Ограничение процессов ПОЛ в терминальной стадии болезни, по-видимому, обусловлено истощением основного субстрата ПОЛ — полиеновых жирных кислот и значительным увеличением в мембранах клеток красной крови насыщенных жирных кислот, труднодоступных для окисления. Резкое увеличение содержания насыщенных жирных кислот, как известно, сопровождается повышением жесткости и утратой эластичности эритроцитарной мембраны [2, 3] и наряду со снижением уровня липопротеинов, падением активности СОД, SH-групп, Г-6-ФДГ, по-видимому, является одним из возможных механизмов гемолиза эритроцитов у больных сепсисом.

Возможно, инаktivация эритроцитарной Г-6-ФДГ связана еще и с ингибирующим ее активностью эффектом быстрой утилизации арахидоновой кислоты. Последний выявлен в эксперименте, где было показано, что быстрая утилизация даже 10 % арахидоновой кислоты приводит к 50 % инаktivации Г-6-ФДГ [3, 19].

В момент выздоровления перед выпиской из стационара происходила нормализация активности Г-6-ФДГ, SH-групп, увеличивалось содержание липопротеинов, тогда как полной нормализации жирнокислотного состава эритроцитарной мембраны и ее функциональных свойств не наблюдалось (см. табл. 1 и 2). В мембранах эритроцитов реконвалесцентов сепсиса сохранялось снижение ИН: содержание насыщенных (миристиновой, пентадекановой, пальмитиновой и стеариновой) и мононенасыщенных (пальмитолеиновой и олеиновой) жирных кислот было пониженным, одновременно сохранялось увеличенным содержание полиненасыщенных жирных кислот (в основном за счет арахидоновой кислоты). Высокий уровень последней, наиболее доступной для окисления благодаря наличию двойных связей, и недостаточной высокой активности СОД, несмотря на нормализацию активности SH-групп, Г-6-ФДГ, обуславливают по-прежнему более высокую, чем у здоровых доноров, активность реакций ПОЛ (см. табл. 2). Уровень промежуточного (ДК) и конечного (МДА) продуктов ПОЛ как в плазме, так и в эритроцитах оставался по-прежнему повышенным. С позиций альтернативной теории [18],

увеличение содержания арахидоновой кислоты в эритроцитарных мембранах у реконвалесцентов сепсиса может носить защитный характер и компенсирует недостаточно высокий уровень активности СОД, во многом определяющий функциональную сохранность эритроцитарной мембраны.

Таким образом, у больных сепсисом обнаружены значительные и стойкие нарушения жирнокислотного состава и функциональных свойств эритроцитарной мембраны. Выявлен фазовый характер этих нарушений: в острый период болезни происходит снижение уровня насыщенных и моновенасыщенных жирных кислот, при этом увеличивается содержание полиеновых жирных кислот. Значительное содержание полиеновых жирных кислот и падение активности СОД несмотря на компенсаторное увеличение активности Г-6-ФДГ, SH-групп, обуславливают высокую интенсивность реакций ПОЛ в период разгара септического процесса. В момент стабилизации болезни и при выздоровлении в эритроцитарных мембранах происходит увеличение содержания насыщенных и моновенасыщенных жирных кислот при снижении уровня полиеновых жирных кислот, наблюдается тенденция к нормализации концентраций эритроцитарных липопротеинов, SH-групп, активности СОД и Г-6-ФДГ и параметров ПОЛ. В терминальной фазе септического процесса в эритроцитарных мембранах происходит резкое увеличение содержания насыщенных и моновенасыщенных жирных кислот, снижение до патологически низких величин содержания полиненасыщенных жирных кислот, падение активности Г-6-ФДГ, СОД, SH-групп, приводящее к истощению ПОЛ. Обнаруженные изменения жирнокислотного состава эритроцитарных мембран у больных в терминальной стадии болезни, сопровождающиеся увеличением ее жесткости, наряду с падением метаболической активности эритроцитов могут являться причиной гемолиза у больных сепсисом.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гаврилов В. В., Мишкорудная М. И. // Лаб. дело.— 1983.— № 3.— С. 33—35.
2. Котык А., Яначек К. Мембранный транспорт: Пер. с англ.— М., 1980.
3. Ляхович В. В., Цырлов И. Б. Структурные аспекты биохимии монооксигеназ.— Новосибирск, 1978.
4. Шарапов В. И., Грек О. Р., Зыков А. А. // Вопр. мед. химии.— 1988.— № 2.— С. 107—110.
5. Abshire Th. C., Reeves J. D. // J. Pediat.— 1989.— Vol. 103.— P. 868—871.
6. Bergmeyer H. V. Methods of Enzymatic Analysis 2.— New York, 1984.
7. Dodge J. T., Mitchell C., Hanahan D. J. // Arch. Biochem.— 1963.— Vol. 100.— P. 119—130.
8. Fieldman B. F., Kaneko J. J., Farver T. B. // Amer. J. vet. Res.— 1981.— Vol. 42.— P. 1109—1118.
9. Folch K., Lees M., Sloane-Stanley G. H. // J. biol. Chem.— 1957.— Vol. 226.— P. 497—509.
10. Hayhay F., Quaglini D. Hematological Cytochemistry.— Edinburgh, 1980.
11. Kaplan K. M., Oski F. A. // Pediatrics.— 1980.— Vol. 65.— P. 1101—1109.
12. Mahn H. E., Dantuono L. M. // Amer. J. Obstet. Gynec.— 1955.— Vol. 70.— P. 604—612.
13. O'Brien R. T., Santos J. I., Glasgow L., Landaw S. A. // J. Pediat.— 1981.— Vol. 98.— P. 928—936.
14. Rickeltes W. E. // Blood.— 1978.— Vol. 3.— P. 1025—1038.
15. Shaffer S. G., O'Neill D. H., Thibeault D. W. // J. Pediat.— 1982.— Vol. 101.— P. 942—946.
16. Siils R. H., Caserta M. T., Landaw S. A. // Ibid.— P. 549—564.

17. Smith R. T., Platou F. S., Good R. A. // Pediatrics.— 1956.— Vol. 17.— P. 549—564.
18. Sosenko I. R., Innis Sh. M., Frank L. // J. Pediat.— 1988.— Vol. 112.— P. 630—637.
19. Wills E. D. // Biochem. J.— 1971.— Vol. 123.— P. 983—991.
20. Winthrope M. M. // Clin. Hemat.— 1974.— Vol. 4.— P. 671—692.
21. Yoshioka T., Kawada K., Shimada T. // Amer. J. Obstet. Gynec.— 1979.— Vol. 135.— P. 372—376.

Поступила 22.11.91

#### FATTY ACID COMPOSITION AND FUNCTIONAL STATE OF ERYTHROCYTE MEMBRANES IN PATIENTS WITH SEPSIS.

M. K. Soboleva, V. I. Sharapov

Medical School, Novosibirsk.

Distinct alterations in fatty acid composition and in the functional state of erythrocyte membranes were detected in 58 patients with sepsis; these alterations were phase-dependent and correlated highly with clinical picture. Considerable increase in content of saturated and monounsaturated fatty acids and a decrease in concentration of lipoproteins were found in erythrocyte membranes under inauspicious conditions of sepsis development. In these patients activities of superoxide dismutase and glucose-6-phosphate dehydrogenase were decreased, while content of SH-groups was lowered and lipid peroxidation was inhibited. The alterations observed in fatty acid composition of erythrocyte membranes and a decrease in metabolic activity of red blood cells may be responsible for hemolysis in patients with sepsis.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 612.111.7.06.08

В. И. Закревский, А. А. Кубатиев, Ю. В. Галаев

#### ЭФФЕКТ ФОСФОЛИПИДОВ ЛИПОСОМ ПРИ КОЛЛАГЕНИНДУЦИРОВАННОЙ АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ

Волгоградский медицинский институт, Центральный институт усовершенствования врачей, Москва

Роль фосфолипидов в гемостазе многообразна. Они составляют основу тканевого и тромбоцитарного тромбопластина, являются необходимыми компонентами процессов агрегации и секреции тромбоцитов [5, 7, 10]. Агрегация тромбоцитов сопровождается активным переносом на внешнюю поверхность цитоплазматической мембраны фосфатидилсерина, фосфатидилинозита и фосфатидилэтаноламина [1, 9, 11]. На функциональную активность тромбоцитов влияют уровень содержания и состав липидов плазмы крови [1].

Введение в кровь дополнительного количества фосфолипидов в форме липосом может изменить поведение тромбоцитов. Описано влияние липосом на агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ [2, 3, 12]. Была выявлена зависимость эффекта липосом от их фосфолипидного состава, заряда, дозы и времени инкубации. АДФ как индуктор агрегации имеет определенные механизмы рецепции и действия на тромбоциты. Однако агрегация тромбоцитов может быть вызвана и другими агонистами, в частности коллагеном. Поэтому данные, полученные с использованием одного индуктора — АДФ — не позволяют полностью оценить эффект липосом на активность тромбоцитов.

Нами изучено влияние липидного состава липо-



сом на агрегацию тромбоцитов в плазме крови, индуцированную коллагеном.

**Методика.** Исследовали агрегацию тромбоцитов крови крыс-самцов Вистар. Артериальную кровь получали пункцией брюшного отдела аорты после лапаротомии под эфирным наркозом. Из крови, стабилизированной гепарином (50 ЕД/мл), готовили плазму, богатую тромбоцитами (ПБТ) в концентрации  $5 \cdot 10^6$  клеток на 1 мл [13]. Агрегацию изучали на двухканальном агрегометре «Labo-ARAST» (Германия) при  $37^\circ\text{C}$  и скорости перемешивания 1000 об/мин. В кювету вносили 0,23 мл ПБТ, 0,02 мл суспензии липосом инкубировали 5—15 мин. Индукцию агрегации осуществляли добавлением в инкубационную смесь коллагена (тип 1) («Chrono-Log Corp.», США) в конечной концентрации 1 и 4 мкг/мл. Измеряли максимальную амплитуду агрегации (процент светопропускания), которую выражали в процентах к контролю.

Количество тромбоксана  $B_2$  и простациклина измеряли на максимуме агрегации. Применяли соответствующие тест-наборы для радиоиммунного определения производства Института изотопов (Венгрия). Измерения проводили на сцинтиляционном счетчике RIA-Gamma («LKB-Wallack», Швеция).

Для приготовления липосом использовали яичный лецитин (ЯЛ) и фосфатидилинозит (ФИ) (Харьковский завод бактериальных препаратов), холестерин (ХОЛ), дицетилфосфат (ДЦФ), трис и хлорид натрия («Sigma», США), фосфатидилсерин — ФС («Serva», Германия), стеариламин (СА) («Aldrich», США). Малые однослойные липосомы готовили из расчета 15 мкмоль липидов в 1 мл 10 мМ трис-НСI-буфера pH 7,5 с 0,15 М NaCl путем озвучивания высушенной пленки липидов в буфере при  $20^\circ\text{C}$  в атмосфере азота до просветления взвеси. Липидный состав препаратов липосом приведен в разделе «Результаты и обсуждение». В работе использовали общепринятую статистическую обработку результатов.

**Результаты и обсуждение.** Предварительная 10-минутная инкубация ПБТ со всеми исследованными препаратами липосом приводила в большинстве случаев к ингибированию агрегации, индуцированной 4 мкг/мл коллагена. Уровень снижения агрегации зависел от вида заряженного липида в липосомной мембране.

Из исследованных отрицательно заряженных липосом (ЯЛ—ХОЛ ДЦФ=7:2:1, ЯЛ—ФС—ХОЛ=4:4:2) значительным (примерно в 10 раз) ингибирующим свойством обладали ФС-липосомы (рис. 1). Везикулы, содержащие ДЦФ и ФИ, достоверно значимого снижения агрегации по срав-

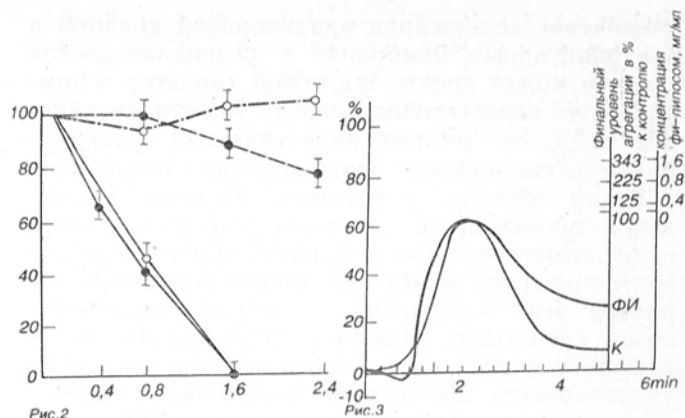


Рис. 2. Эффект дозы липосом на коллагениндуцированную агрегацию тромбоцитов в плазме.

Инкубация тромбоцитов с липосомами 5 мин, доза коллагена 1 мкг/мл. По оси абсцисс — содержание липидов липосом, мг/мл; по оси ординат — агрегация — % от контроля. Темный квадрат — ЯЛ—ХОЛ—ДЦФ=7:2:1; темный кружок — ЯЛ—ФС—ХОЛ=4:4:2; темный треугольник — ЯЛ—ФИ—ХОЛ=4:4:2; темный ромб — ЯЛ—СА=9:1.

Рис. 3. Влияние ФИ-содержащих липосом на дезагрегацию коллагенстимулированных тромбоцитов в плазме.

Представлены агрегатограммы контроля (К) и опыта (ФИ). Конечный (5 мин) уровень агрегации (в % к контролю) для различных доз липосом приведен в правом верхнем углу рисунка.

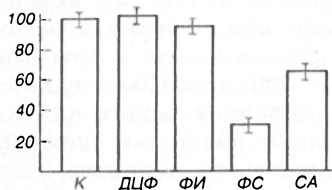
нению с контролем не вызывали. Положительно заряженные липосомы (ЯЛ—СА=9:1) в 2 раза снижали максимальную величину агрегации. Эффект СА-липосом оказался аналогичен описанному [12] для агрегации ПБТ, индуцированной АДФ.

Более выраженный эффект липосом наблюдали при использовании низкой дозы индуктора — 1 мкг/мл, вызывающей обратимую агрегацию. В этом случае 5-минутная инкубация ПБТ как с ФС, так и с СА-липосомами в дозе 1,6 мг/мл приводила к полному ингибированию агрегации. Несмотря на противоположный заряд и различный липидный состав мембраны этих липосом, ингибирующий эффект был практически одинаковым и дозозависимым (рис. 2). Возможно, ФС- и СА-липосомы блокируют одни и те же факторы, влияющие на агрегацию тромбоцитов при индукции коллагеном. Однако механизм ингибирования может быть разным. Положительно заряженные СА-липосомы могут неспецифически связываться с отрицательно заряженными белковыми компонентами плазмы и мембраны тромбоцита. Фосфатидилсерин способен избирательно взаимодействовать с теми же факторами гемостаза, но с одновременным вовлечением кальция [5, 10].

ДЦФ-липосомы в низкой дозе — 0,8 мг/мл — не влияли на агрегацию, но при увеличении их концентрации в 3 раза (в том же объеме) отмечалось достоверное снижение активности тромбоцитов в среднем до 75 %.

ФЛ-липосомы не оказывали заметного влияния на максимальную амплитуду агрегации, но снижали скорость и уровень дезагрегации, причем их действие было дозозависимым (рис. 3). Обнаруженный эффект, вероятно, связан с включением липосомного ФИ в цитоплазматическую мембрану тромбоцитов и вовлечением в фосфоинозитидный цикл, стимулирующий процесс агрегации [10]. Эффект ФИ зависел не только от дозы, но и от времени инкубации липосом с тромбоцитами. Предыдущая ПБТ с 0,8 мг (1 мкмоль) на 1 мл

Рис. 1. Влияние липосом различного состава на агрегацию тромбоцитов в плазме, вызванную коллагеном (4 мкг/мл). Доза липосом — 0,8 мг (1 мкмоль) липидов в 1 мл плазмы.



По оси ординат — агрегация, % от контроля. К — контроль (агрегация без липосом); ДЦФ-липосомы состава: ЯЛ—ХОЛ—ДЦФ=7:2:1; ФИ-липосомы состава: ЯЛ—ХОЛ—ФИ=4:4:2; ФС-липосомы состава: ЯЛ—ХОЛ—ФС=4:4:2; СА-липосомы состава ЯЛ—СА=9:1.

ФИ-везикул в течение 5, 10 и 15 мин приводила к снижению уровня дезагрегации соответственно в 2, 25, 3,21 и 2,15 раза по сравнению с контролем. Значительный эффект при 10-минутной инкубации с последующим снижением можно объяснить изменением соотношения скорости накопления липосомного ФИ на мембране тромбоцитов и его утилизации.

ФИ, присутствующий в мембране клетки, под влиянием агонистов может превращаться двумя путями. Распад ФИ на диацилглицерол и фосфоинозит приводит к активации протеинкиназы С и мобилизации  $\text{Ca}^{2+}$ , способствуя агрегации. При расщеплении ФИ фосфолипазой  $\text{A}_2$  высвобождается арахидоновая кислота — предшественник простаглицина и тромбоксана. В зависимости от условий и вида индуктора превращение ФИ идет с преобладанием того или иного пути [10].

Мы исследовали изменение содержания простаглицина и тромбоксана В в ПБТ при инкубации с ФИ-липосомами и последующей индукцией агрегации 1 мкг/мл коллагена. Не было обнаружено достоверных различий в концентрации тромбоксана В<sub>2</sub> и простаглицина у препаратов ПБТ, ПБТ, агрегированной коллагеном (контроль — К), и ПБТ+липосомы с последующим добавлением коллагена (опыт). Отношения значений для тромбоксана в К к ПБТ и в опыте к К составили: К/ПБТ=1,031±0,056 (n=12), опыт/К=1,026±0,058 (n=6), а для простаглицина — 1,112±0,068 (n=12) и 1,066±0,050 (n=5) соответственно.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при индукции агрегации 1 мкг коллагена значительного расщепления мембранного ФИ фосфолипазой  $\text{A}_2$  не происходит. Очевидно, дозозависимое торможение дезагрегации тромбоцитов ФИ-липосомами связано с вовлечением этого фосфолипида в фосфоинозитидный цикл тромбоцитов. Это — путь превращения ФИ в тромбоцитах является основным при индукции агрегации тромбоцитом [10].

Образование тромбина в ПБТ является одним из обязательных компонентов активирующего действия коллагена. Вклад образующегося тромбина в агрегацию особенно заметен при низких дозах коллагена. Этим можно объяснить мощное ингибирующее действие липосомального ФС, который способен снижать активность протромбинового комплекса [1, 4, 6, 8]. Однако ингибирующее действие ФС-липосом определяется не только инактивацией плазменных факторов, но и непосредственным взаимодействием везикул с мембраной тромбоцитов. Косвенным подтверждением этому может служить влияние ФИ-липосом на процесс дезагрегации, свидетельствующее о модификации мембраны тромбоцитов липосомальными фосфолипидами.

Обнаруженные эффекты отдельных видов фосфолипидов следует учитывать при конструировании липосомных препаратов, предназначенных для медицинских целей.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Андреев Г. В., Суворова Л. А. // Успехи соврем. биол. — 1986. — Т. 101, № 3. — С. 436—448.
2. Бердичевский В. Р., Маркосян Р. А., Позин Е. Я. и др. // Биол. эксперим. биол. — 1979. — № 8. — С. 141—143.

3. Борников В. Т., Зайнутдинов Б. П., Иманходжаев Т. М. и др. // Кардиология. — 1989. — № 6. — С. 22—24.
4. Бышевский А. Ш., Мухомова И. А. // Биохимия. — 1976. — Т. 41, № 3. — С. 543—547.
5. Зубаиров Д. М. Биохимия свертывания крови. — М., 1978.
6. Терсенов О. А., Чабанов М. К. // Вопр. мед. химии. — 1981. — № 5. — С. 619—623.
7. Фермилан Ж., Ферстрате М. Гемостаз. — М., 1984.
8. Чабанов М. К. // Фармакол. и токсикол. — 1981. — № 4. — С. 425—428.
9. Bevers E. M., Comfurius P., Zwaal R. F. A. // Biochim. biophys. Acta. — 1983. — Vol. 736, N 1. — P. 57—66.
10. Biochemistry of Platelets / Eds. D. R. Phillips, M. A. Shuman. — Orlando, 1986. — P. 25—34.
11. Comfurius P., Bevers E. M., Zwaal R. F. A. // Biochim. biophys. Acta. — 1989. — Vol. 983, N 2. — P. 212—216.
12. Juliano R. L., Hsu M. Y., Petersen D. et al. // Exp. Cell. Res. — 1983. — Vol. 146, N 2. — P. 422—427.
13. Mustard J. F., Perry D. W. // Brit. J. Haemat. — 1972. — Vol. 22, N 2. — P. 193—196.

Поступила 01.04.92

#### INFLUENCE OF LIPOSOME PHOSPHOLIPIDS ON COLLAGEN-INDUCED PLATELET AGGREGATION

V. I. Zakrevsky, A. A. Kubatiev, Yu. V. Galaev

Medical School, Volgograd, Central Institute for Postgraduate Training of Physicians, Moscow.

Influence of the charge-bearing phospholipids containing in liposome membrane on collagen-induced platelet aggregation was studied. The aggregation was inhibited after preincubation of blood platelets with liposomes containing egg lecithin/cholesterol/phosphatidylserine (stearyl amine); the effect was dose-dependent. Phosphatidylinositol incorporated into liposomes did not affect distinctly thrombocytes activation but decreased the rate of cell disaggregation; this effect was also dose-dependent. Use of phosphatidylinositol containing liposomes did not affect the content of thromboxane and prostacyclin in the system. The effect of the charge-bearing phospholipids on platelet aggregation observed should be considered in production of medicinal drugs.

© А. В. КОЗЛОВ, 1993

УДК 616.127-007.21-092-07

А. В. Козлов

#### СОСТОЯНИЕ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНОЙ СИСТЕМЫ В МИОКАРДЕ КРЫС ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ЕГО ДИСТРОФИИ

Институт усовершенствования врачей, Санкт-Петербург

Аденилатциклазная система миокарда в физиологических условиях играет ключевую роль в его адаптации к экстремальным раздражителям [16]. Нарушение передачи гормонального сигнала внутрь клетки может явиться фактором, ответственным за формирование молекулярных и клеточных механизмов повреждения сердечной мышцы [6]. Тем не менее малоизученными остаются процессы, затрагивающие аденилатциклазную систему кардиомиоцита, не установлены наиболее уязвимые ее звенья, повреждение которых неблагоприятно сказываются на передаче гормонального сигнала внутрь клетки [4]. Неясно также, каким образом отражаются дефекты мембранно-связанной циклазной системы на состоянии ферментных систем клетки, регулируемых при участии циклических нуклеотидов. Целью данной работы явилось выявление дефектов в образовании вторичного мессенджера — цАМФ — при участии аденилатциклазной системы при эксперименталь-

ной миокардиодистрофии, вызванной введением новодрина, ваготомией и коарктацией аорты.

**Методика.** Работа выполнена на белых беспородных крысах-самцах массой до 200 г. Дистрофию миокарда вызывали различными методическими приемами — экстракардиальной денервацией, гемодинамической перегрузкой и гиперстимуляцией  $\beta$ -адренорецепторов. Оперативное вмешательство осуществляли под эфирным наркозом. Левостороннюю ваготомию проводили путем иссечения участка нерва на шее. Гипертрофию миокарда вызывали путем сужения просвета брюшного отдела аорты [2]. Новодрин в дозе 80 мкг/кг массы вводили однократно внутримышечно. Миокард для исследований извлекали под гексеновым наркозом (100 мг/кг массы внутривенно). После торакотомии сердце замораживали *in situ* охлажденными в жидком азоте щипцами Волленбергера, извлекали из грудной клетки и хранили между двумя блоками сухого льда до исследования. Экстракцию нуклеотидов проводили 0,6 М хлорной кислотой. После осаждения денатурированного белка и нейтрализации надосажденной жидкости кристаллическим  $K_2CO_3$  пробы лиофилизировали и хранили при  $-20^\circ C$ . Срезы миокарда обрабатывали аналогичным образом. Содержание цАМФ определяли наборами фирмы «Amersham». Препараты мембран сердца крысы выделяли по методу [8]. Активность аденилатциклазы определяли с использованием  $^3H$ -АТФ. Конечная концентрация реактивов в инкубационной среде (общий объем 50 мкл) составляла: трис-НСI-буфер рН 7,4,  $MgCl_2$  15 ммоль/л, АТФ 0,4 ммоль/л,  $^3H$ -АТФ  $1,6-2 \cdot 10^6$  имп/мин, цАМФ 2 ммоль/л, ГТФ 0,01 ммоль/л, теofilлин 8 ммоль/л, дитиотреитол 1 ммоль/л, креатинфосфат 15 ммоль/л, креатинкиназа 0,5 мг/мл, бычий сывороточный альбумин 0,1 мг/мл. Реакцию инициировали внесением мембранного препарата (до 80 мкг белка в пробу) и останавливали после 10-минутной инкубации при  $37^\circ C$ . Остановку реакции и отделение  $^3H$ -цАМФ от продуктов реакции осуществляли по [17], за исключением того, что подготовку окиси алюминия, элюцию цАМФ проводили 0,1 М трис-НСI-буфером рН 7,3. Потерю цАМФ в процессе хроматографии оценивали по поглощению элюатов при 295 нм. Препараты  $^3H$ -АТФ очищали от примесей хроматографией на миниколонках с Dowex 50X4 в  $H^+$ -форме. Элюировали нуклеотид водой, для его идентификации в порциях элюата использовали тонкослойную хроматографию на пластинах «Silufol UV» в системе растворителей диоксан — изопропанол — аммиак — вода (4:2:1:4). Данный способ очистки препаратов  $^3H$ -АТФ снижал величину фона до 0,02—0,04 %. Для получения срезов извлеченный из грудной клетки миокард помещали на 2—3 мин в охлажденный до  $0^\circ C$  0,15 М КСI, а затем переносили в охлажденный раствор Кребса — Рингера (КР). Тонкие срезы миокарда из ткани левого желудочка вырезали лезвием бритвы параллельно длинной оси сердца, как это описано [12]. Срезы преинкубировали 20 мин при  $37^\circ C$  в растворе КР, уравновешенном 95 %  $O_2$  и 5 %  $CO_2$ , затем переносили в сосудики аппарата Варбурга, содержащие раствор КР и агонист, инкубировали 20 мин при постоянном встряхивании и пропускании смеси  $O_2$  и  $CO_2$ . После окончания инкубации срезы извлекали и после удале-

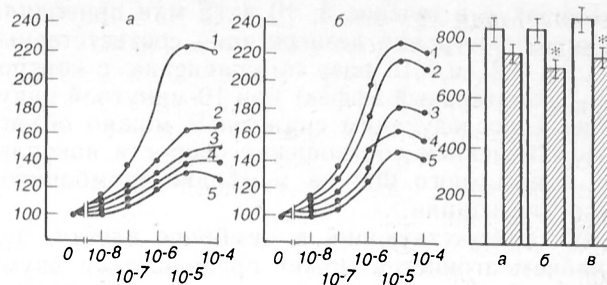


Рис. 1

Рис. 2

Рис. 1. Зависимость активности аденилатциклазы наружных мембран миокарда крыс от концентрации адреналина.

По осям абсцисс — концентрация адреналина в инкубационной среде, М; по осям ординат — активность аденилатциклазы, % к базальной активности. а — через 24 ч, б — через 2 нед после левосторонней ваготомии (3), коарктации аорты (4) и введения новодрина (5). 1 — контрольная группа; 2 — ложнопонируемые животные.

Рис. 2. Содержание цАМФ в миокарде крыс через 2 нед после левосторонней ваготомии (а), коарктации аорты (б) и введения новодрина (в).

По оси ординат — содержание цАМФ, нмоль/г ткани. Светлые столбики — контроль, заштрихованные — опыт. Звездочка —  $p < 0,05$  по сравнению с соответствующим контролем.

ния избытка жидкости фильтровальной бумагой замораживали в жидком азоте. Для предотвращения окисления адреналина в среду инкубации добавляли  $NaHSO_3$  ( $10^{-7}$  М). Содержание белка определяли по [18], предварительно разрушая мембраны дезоксихолом натрия (10 г/л). Радиоактивность образцов определяли с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика в сцинтиляторе следующего состава: ППО 8,0 г, ПОПОП 0,6 г, нафталин 150 г, метанол 100 мл, диоксан до 1 л. Статистическую обработку проводили с использованием критерия Стьюдента.

**Результаты и обсуждение.** Проведенные исследования показали, что в первые сутки после оперативного вмешательства на аденилатциклазу наружных мембран одинаковое влияние оказывали ваготомия, коарктация аорты и ложная операция, при которых снижалась стимуляция аденилатциклазы адреналином во всем интервале использованных концентраций ( $10^{-4}$ — $10^{-8}$  М). Аналогичный эффект отмечали и через сутки после введения новодрина (рис. 1, а). К концу недели чувствительность аденилатциклазы к адреналину восстанавливалась полностью только в миокарде ложнопонируемых животных, адреналин-стимулируемая активность мембран миокарда после ваготомии, коарктации аорты и введения новодрина оставалась сниженной и на более поздних сроках наблюдения (рис. 1, б). Эти данные могут свидетельствовать о том, что повреждение сердечной мышцы, вызываемое различными методическими приемами, сопровождается формированием стереотипного ответа — десенситизацией аденилатциклазы наружных мембран миокарда к адреналину. В случае ложной операции десенситизация носит кратковременный характер и, вероятнее всего, обусловлена гиперкатехоламинемией в ответ на операционный стресс, что не противоречит данным литературы [4]. Стойкая десенситизация, развивающаяся после воздействия на миокард избытка катехоламинов, экстракардиальной денервации и коарктации аорты, является, на наш взгляд, признаком повреждения аденилатциклазной системы, отражающим структурно-функциональную перестройку мембраны. Вероятно, не по-



**Влияние адреналина ( $10^{-6}$  М) на содержание цАМФ в срезах миокарда через 2 нед после левосторонней ваготомии, коарктации аорты и введения новодрина**

Группа животных	Содержание цАМФ, пмоль/г массы					
	инкубация без адреналина			инкубация в присутствии адреналина		
	исходный уровень	через 20 мин	изменения, %	исходный уровень	через 20 мин	изменения, %
Ваготомия (6):						
л/о	429±88	363±45	—15,4	398±44	368±30	—7,5
оп	491±67	503±74	+2,4	516±72	651±61	+26,2*
Коарктация аорты (5):						
л/о	442±54	350±39	—20,8	484±48	442±52	—8,7
оп	386±48	302±52	—21,5	378±62	366±39	—3,2
Введение новодрина (6):						
к	417±37	342±56	—18,0	437±56	409±63	—6,4
оп	370±61	292±51	—21,1	392±44	380±51	—3,1

Примечание. В скобках — число животных; л/о — группа ложнооперированных животных; к — контрольная группа; оп — опытная группа. Звездочка — достоверные различия в характере ответа на адреналин ваготомированного миокарда по сравнению с другими моделями миокардиодистрофии.

следняя роль в этом процессе принадлежит ускорению перекисного окисления липидов мембран [1]. Вместе с тем нельзя исключить, что стойкая десенситизация связана с изменениями свойств структурных белков мембран, регулирующих число рецепторов на поверхности клетки [15], и нарушением процессов синтеза рецепторных белков в клетке [19]. Появились работы, позволяющие связывать низкую способность аденилатциклазы активироваться гормонами с уровнем G-белков при патологии миокарда [14].

Данные литературы, касающиеся оценки состояния аденилатциклазной системы при экспериментальной дистрофии миокарда, противоречивы. С одной стороны, выявлено снижение ее реакции на адреналин в миокарде после денервации, введения новодрина и коарктации аорты [5, 10, 15], с другой — денервация миокарда приводит к возрастанию реакции аденилатциклазы на адреналин [20]. Возможно, что подобная неоднозначность экспериментальных данных в первую очередь связана с неодинаковым подходом к формированию экспериментальных моделей, различием методических приемов выделения мембранных фракций, а также возрастом экспериментальных животных [3].

В физиологических условиях в клетках миокарда функционируют механизмы, надежно контролирующие определенный уровень циклических нуклеотидов за счет сбалансированности скоростей их синтеза и распада [7]. При дистрофии миокарда эта сбалансированность нарушается, что выявляется при сравнении активности аденилатциклазы, участвующей в синтезе цАМФ, с уровнем последнего в миокарде. В частности, не измененный по сравнению с контролем уровень миокардиального цАМФ после ваготомии или его снижение через 2 нед после коарктации аорты и введения новодрина обнаруживались на фоне угнетения реакции аденилатциклазы на адреналин (рис. 2). В более демонстративной форме особенности дисрегуляторных расстройств в аденилатциклазной системе выявились при изучении реакции аденилатциклазы на адреналин на тканевом уровне. В этих опытах использовали тканевые срезы, полученные из миокарда животных через 2 нед после начала эксперимента. К моменту исследования масса сердца у животных с коарк-

тацией аорты составляла  $859 \pm 33$  мг, в контрольной группе —  $652 \pm 29$  мг ( $p < 0,05$ ).

Как видно из таблицы, инкубация срезов, полученных как из миокарда крыс контрольной группы, так и из миокарда крыс после введения новодрина и коарктации аорты, сопровождалась снижением в них содержания цАМФ в среднем на 19 %, присутствие в среде инкубации адреналина ( $10^{-6}$  М) способствовало поддержанию цАМФ в срезах на уровне, близком к исходному. Более устойчивой оказалась система в ваготомированном миокарде. В процессе инкубации срезов содержание в них цАМФ не изменялось, а добавление в среду инкубации адреналина повышало уровень нуклеотида приблизительно на 26 %.

Совокупность полученных данных свидетельствует о том, что в дистрофически измененном миокарде дефекты в передаче гормонального сигнала внутрь клетки при участии аденилатциклазной системы могут локализоваться в различных звеньях. В случае дистрофии, вызванной новодрином и гипертрофией, нарушение активации аденилатциклазы адреналином, вероятнее всего, связано со снижением числа  $\beta$ -адренорецепторов на мембране клетки [6]. При денервационной дистрофии повышение реакции ткани на адреналин можно объяснить улучшением процессов сопряжения  $\beta$ -адренорецепторов и аденилатциклазы на уровне G-белков [9], что позволяет существенно ускорять синтез цАМФ в ответ на гормон даже при уменьшенном количестве рецепторов. Вполне допустимо, что гиперреактивность ваготомированного миокарда связана с разбалансированностью скоростей синтеза цАМФ и его распада при участии аденилатциклазы и фосфодиэстеразы на уровне их регуляции через систему кальций-кальмодулин [7].

Развитие постденервационной гиперчувствительности миокарда к катехоламинам может также вызываться нарушениями регуляции гормона чувствительности по принципу обратной связи через реакции цАМФ-зависимого фосфорилирования — либо на уровне  $\beta$ -адренорецептора [11], либо на уровне мембранной фосфодиэстеразы цАМФ [13]. Возможно, что формирование дистрофии миокарда связано с появлением дефектов в аденилатциклазной системе на уровне образования вторичного мессенджера — цАМФ — при

участии аденилатциклазы, специфика дистрофического процесса скорее всего определяется характером нарушения деятельности внутриклеточных ферментных систем, регулируемых цАМФ.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Демуров Е. А., Изнатов В. А. // Метаболические и нейрогуморальные механизмы ишемических повреждений миокарда. — М., 1985. — С. 35—38.
2. Коган А. Х. // Бюл. экспер. биол. — 1961. — № 1. — С. 112—115.
3. Кульчицкий О. К., Ефимов Д. А. // Вопр. мед. химии. — 1990. — № 5. — С. 69—71.
4. Матюшкин А. И. // Фармакол. и токсикол. — 1987. — № 4. — С. 100—105.
5. Солтыцкая Л. П., Балашов Н. В., Солтыцкий В. В. // Вопр. мед. химии. — 1990. — № 1. — С. 84—87.
6. Сысолятина Н. А. // Фармакол. и токсикол. — 1987. — № 4. — С. 106—111.
7. Ткачук В. А. Введение в молекулярную эндокринологию. — М., 1983.
8. Baker S. P., Boyd H. M., Polter L. T. // Brit. J. Pharmacol. — 1980. — Vol. 68, N 1. — P. 57—63.
9. Bilczikian J. P., Steinberg S. F., Horn E. M. et al. // Molec. Cell. Biochem. — 1988. — Vol. 82, N 1—2. — P. 13—18.
10. Bobic D. C., Korner P., Carson V., Oliver J. P. // Circulat. Res. — 1980. — Vol. 46, N 6. — Suppl. 1. — P. 43—44.
11. Bode D. C., Brunton L. L. // Molec. Cell. Biochem. — 1988. — Vol. 82, N 1—2. — P. 5—11.
12. Ganote Ch. E., Jennings R. B., Hill H. L., Grochowsky E. // J. molec. cell. Cardiol. — 1976. — Vol. 8, N 3. — P. 189—204.
13. Gettys T. W., Blacmore P. F., Redmon J. B. et al. // J. biol. Chem. — 1987. — Vol. 262, N 1. — P. 333—339.
14. Insel P. A., Ransnas H. A. // Circulation. — 1988. — Vol. 78, N 6. — P. 1511—1513.
15. Limas C. J., Limas G. // Circulat. Res. — 1984. — Vol. 55, N 4. — P. 524—530.
16. Opie L. H. // Cardiovasc. Res. — 1982. — Vol. 16, N 3. — P. 483—507.
17. Salomon Y. // Advanc. Cycl. Nucl. Res. — 1979. — Vol. 60. — P. 35—55.
18. Shachterle G. A., Pollack R. L. // Analyt. Biochem. — 1973. — Vol. 5. — P. 654—655.
19. Stiles G. L., Caron M. G., Lefkowitz R. G. // Pharmacol. Rev. — 1984. — Vol. 64, N 2. — P. 661—743.
20. Valner D., Lavallae M., Amano J. et al. // Circular. Res. — 1985. — Vol. 57, N 1. — P. 55—64.

Поступила 27.07.92

#### THE ADENYLATE CYCLASE SYSTEM IN RAT MYOCARDIUM IMPAIRED WITH DYSTROPHIC DEGENERATION.

A. V. Kozlov

Institute for Postgraduate Training of Physicians, St. Petersburg.

Development of myocardial dystrophy, occurred after left-lateral vagotomy, aorta coarctation and novodrine administration, was accompanied by impairments in the adenylate cyclase system of rat myocardium at the step of secondary messenger production (cAMP) managed by adenylate cyclase of outer membranes. Dystrophic degenerations appear to depend on the type of deteriorations in intracellular enzymatic systems, which are regulated by cAMP, as shown by dissimilar response of myocardium to the agonist effect; this effect was increased in dystrophy caused by denervation and was altered only slightly after aorta coarctation and novodrine administration.

В. М. Коденцова, О. А. Вржесинская,  
А. А. Сокольников, Л. А. Харитончик,  
В. Б. Спиричев

#### ОБМЕН ВИТАМИНОВ ГРУППЫ В У БОЛЬНЫХ С ИНСУЛИНЗАВИСИМОЙ И ИНСУЛИННЕЗАВИСИМОЙ ФОРМАМИ САХАРНОГО ДИАБЕТА

Институт питания РАМН, Москва

Дефицит витаминов является фактором, способствующим развитию сахарного диабета [6]. Многие витамины выступают синергистами инсулина, обладая гипогликемическим свойством [3]. Этим объясняется интерес к исследованию особенностей обмена витаминов при диабете. Однако результаты исследования витаминной обеспеченности больших групп больных и здоровых людей, приведенные во многих работах [3, 6—8, 11—13], часто носят противоречивый характер. Так, описано как уменьшение, так и увеличение экскреции тиамина и рибофлавина при диабете по сравнению со здоровыми людьми [8, 11, 13]. Среди больных сахарным диабетом отмечается более высокая доля людей с дефицитом водорастворимых витаминов [8, 12]. На наш взгляд, такие исследования не всегда могут выявить особенности обмена витаминов при этом заболевании, поскольку в первую очередь отражают характер питания. Кроме того, при оценке обеспеченности больных людей обычно используются критериями, принятыми для здоровых.

Информативным подходом к решению этой проблемы может служить исследование зависимости экскреции витаминов или их метаболитов с мочой от концентрации витаминов в крови. Применение такого подхода при обследовании детей 9—13 лет, в течение 2—3 лет больных сахарным диабетом, позволило нам ранее выявить существенные изменения обмена витамина В<sub>2</sub>, проявляющиеся в повышенном выведении рибофлавина с мочой и сниженном содержании в эритроцитах, и установить, что величины, характерные для нормальной обеспеченности рибофлавином больных инсулинзависимым сахарным диабетом детей, отличаются от норм для здоровых детей.

В настоящем исследовании аналогичный подход был использован для изучения особенностей обмена витаминов В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>6</sub> и ниацина у взрослых людей, больных сахарным диабетом I и II типа, и для решения вопроса об оценке обеспеченности этих больных перечисленными витаминами с помощью критериев, принятых для здоровых людей.

Методика. Была обследована обеспеченность витаминами группы В 35 здоровых и 10 больных инсулинзависимым (I тип) и 10 инсулиннезависимым (II тип) сахарным диабетом взрослых людей обоего пола. Обеспеченность витаминами оценивали по их экскреции с мочой, собранной за 1 ч натощак, и концентрации этих витаминов в плазме и эритроцитах. Рибофлавин в моче и плазме крови определяли титрованием рибофлавинсвязывающим апопротеином [4], в эритроцитах — люмифлавиновым методом [10], 4-пиридок-

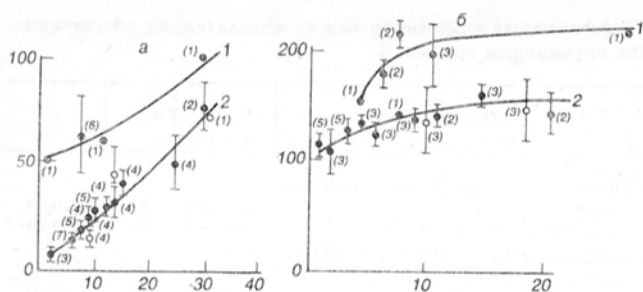


Рис. 1. Взаимосвязь между параметрами обеспеченности витамином В<sub>2</sub>.

По осям абсцисс — концентрация рибофлавина в плазме, нг/мл; по осям ординат: на а — экскреция рибофлавина с мочой, мкг/ч, на б — содержание рибофлавина в эритроцитах, нг/мл. а — зависимость между концентрацией рибофлавина в плазме (в нг/мл) и его часовой экскрецией с мочой (в мкг/ч); б — зависимость между содержанием общего рибофлавина в эритроцитах и его концентрацией в плазме, нг/мл. 1 — кривая для больных инсулин-зависимым сахарным диабетом; 2 — кривая для здоровых и больных инсулин-независимым сахарным диабетом. Здесь и на рис. 2—4: темные кружки — здоровые, светлые — больные инсулиннезависимым сахарным диабетом, светлые с крестиком — больные инсулинзависимым сахарным диабетом.

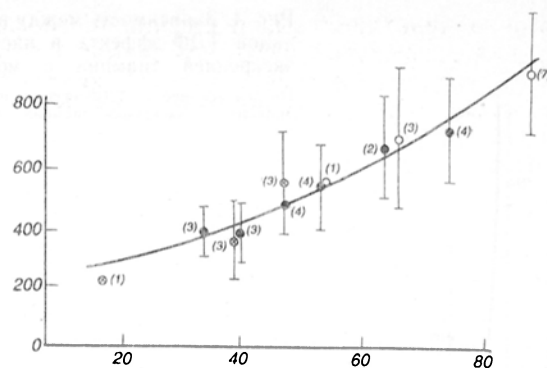


Рис. 3. Взаимосвязь между содержанием окисленных никотинамидных коферментов в эритроцитах и экскрецией 1-МНА с мочой.

По оси абсцисс — концентрация НАД+НАДФ в эритроцитах, мкг/мл; по оси ординат — экскреция 1-МНА, мкг/ч.

силовую кислоту (4-ПК) — по [14], тиамин [9], 1-метилникотинамид (1-МНА) — флюориметрическими методами [5]. Концентрацию никотинамидных коферментов в эритроцитах измеряли флюоресцентным методом [5], пиридоксальевых коферментов — методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [18]. Во всех флюоресцентных методах использовали соответствующий внутренний стандарт. Интенсивность флюоресценции измеряли на спектрофлуориметре «Perkin Elmer MRF-43A». Активность транскетолазы в гемолизатах эритроцитов и величину ее активации тиаминдифосфатом (ТДФ-эффекта) определяли после предварительной инактивации трансальдолазы [17]. Активность аспартатаминотрансферазы в гемолизатах эритроцитов и величину ее активации пиридоксальфосфатом (ПАЛФ-эффекта) измеряли после 3-кратного замораживания-оттаивания гемолизатов (1:1) [1]. Коэффициент ранговой корреляции между содержанием витаминов в крови и экскрецией их с мочой рассчитывали по Спирмену [2].

Результаты и обсуждение. Для анализа данных по витаминной обеспеченности людей был использован уже оправдавший себя ранее подход, в соответствии с которым лица, имеющие

близкие по величине значения концентрации рибофлавина в плазме, величине ТДФ-эффекта и другим подобным показателям, объединяли в группы и для каждой образовавшейся группы рассчитывали средние значения экскреции соответствующего витамина или его метаболитов [4, 15].

На рис. 1, а, представлены кривые зависимости экскреции рибофлавина от его концентрации в плазме крови для здоровых и больных людей. Во всем диапазоне концентраций рибофлавина в плазме крови экскреция этого витамина у больных инсулинзависимым сахарным диабетом в 1,3—6 раз превышает таковую у здоровых людей. Этот результат находится в полном соответствии с данными, полученными нами ранее для детей, страдающих сахарным диабетом.

Кривая зависимости содержания общего рибофлавина в эритроцитах от его концентрации в плазме крови (рис. 1, б) для больных сахарным диабетом I типа также повышена и несколько сдвинута вправо по сравнению с кривой для здоровых взрослых. Концентрация рибофлавина в плазме, при которой общее содержание рибофлавина в эритроцитах выходит на плато, составляет 8—10 нг/мл, что несколько выше принятой для здоровых (5 нг/мл [4]), а концентрация общего рибофлавина 150—170 нг/мл эритроцитов, превышающая нижнюю границу нормы для здоровых людей (130 нг/мл), не отражает нормальную обеспеченность этим витамином больных сахарным диабетом I типа. Возможно, это является следствием дегидратации, характерной для больных инсулинзависимым сахарным диабетом и сопровождающейся увеличением гематокрита и количества гемоглобина [16]. Любопытно при этом, что, как показано нами ранее, для детей 9—13 лет, страдающих сахарным диабетом I типа, эта кривая снижена по сравнению с кривой для здоровых детей. Одним из объяснений этого факта может быть меньшая продолжительность заболевания у детей по сравнению со взрослыми.

Таким образом, показатели обмена рибофлавина у взрослых людей свидетельствуют о существенном изменении метаболизма витамина В<sub>2</sub> при инсулинзависимом сахарном диабете. Это означает, что такие показатели, как экскреция рибофлавина и его содержание в эритроцитах, при

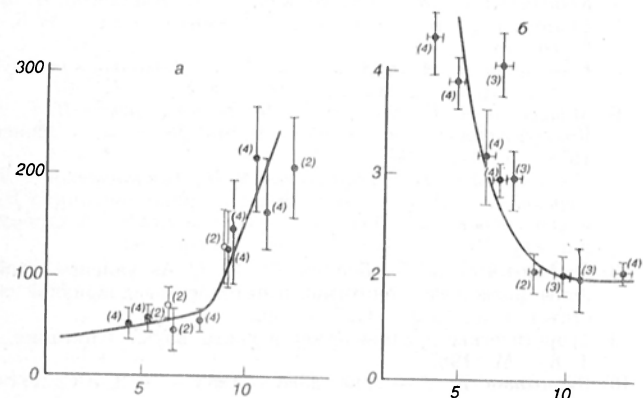


Рис. 2. Взаимосвязь между параметрами обеспеченности витамином В<sub>6</sub>.

По осям абсцисс — концентрация ПАЛФ, нг/мл; по осям ординат: на а — экскреция 4-ПК, мкг/ч, на б — величина ПАЛФ-эффекта. а — зависимость между концентрацией ПАЛФ в плазме крови и часовой экскрецией 4-ПК с мочой; б — зависимость величины ПАЛФ-эффекта от концентрации ПАЛФ в плазме крови.



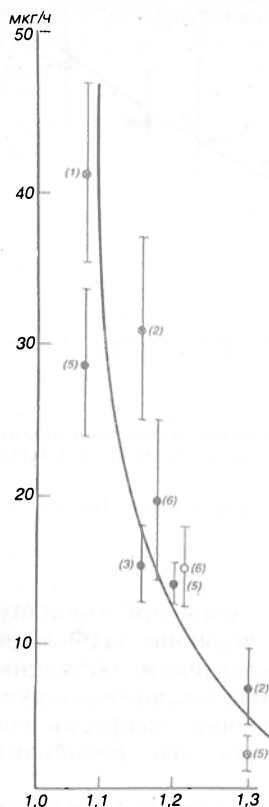


Рис. 4. Зависимость между величиной ТДФ-эффекта и часовой экскрецией тиамина с мочой. По оси абсцисс — ТДФ-эффект, по оси ординат — экскреция тиамина, мкг/ч.

использовании критериев, принятых для здоровых людей, не отражают обеспеченности организма больного этим витамином. Этот вывод приобретает большее значение, если учесть, что степень нарушения метаболизма рибофлавина может зависеть от тяжести и длительности заболевания.

При обследовании больных сахарным диабетом II типа было обнаружено, что их показатели обеспеченности рибофлавином (часовая экскреция рибофлавина с мочой, его концентрация в плазме крови и эритроцитах) вполне укладываются на кривые для здоровых людей (см. рис. 1). Другими словами, критерии обеспеченности рибофлавином для здоровых и больных сахарным диабетом II типа не различаются.

Зависимость экскреции 4-ПК от концентрации ПАЛФ одинакова для здоровых и больных сахарным диабетом I и II типа и характеризуется высокой степенью корреляции (см. таблицу, рис. 2). Через всю совокупность точек можно провести одну кривую (см. рис. 2, б). Таким образом, величины экскреции 4-ПК, содержание ПАЛФ в плазме крови, значения ПАЛФ-эффекта, характерные для нормальной обеспеченности витамином B<sub>6</sub>, у больных сахарным диабетом I и II типа практически совпадают с таковыми у здоровых людей.

Экскреция 1-МНА также обнаруживает выраженную корреляцию с содержанием НАД в эритроцитах у здоровых и больных сахарным диабетом I и II типа. Величины экскреции (рис. 3, см. таблицу) 1-МНА и содержание никотинамидных коферментов в эритроцитах больных сахарным диабетом обоих типов соответствуют принятым в качестве нормы при адекватной обеспеченности витамином для здоровых людей (более 40 мкг НАД+НАДФ на 1 мл эритроцитов и 400 мкг/ч).

При исследовании зависимости экскреции тиа-

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

Параметр	r	n	p
ТДФ-эффект — экскреция тиамина:			
здоровые	-0,529	23	≤0,01
сахарный диабет I типа	-0,782	10	≤0,01
Концентрация ПАЛФ в плазме — экскреция 4-ПК:			
здоровые	0,557	20	≤0,01
сахарный диабет I типа	0,850	9	≤0,01
Концентрация НАД+НАДФ в эритроцитах — экскреция 1-МНА:			
здоровые	0,404	17	≤0,05
сахарный диабет I типа	0,767	9	≤0,01
сахарный диабет II типа	0,475	9	≤0,10

мина от величины ТДФ-эффекта также обнаружено полное совпадение показателей у здоровых и больных сахарным диабетом людей (рис. 4, см. таблицу).

Суммируя полученные данные, еще раз отметим, что у взрослых людей, страдающих инсулинзависимым сахарным диабетом, наблюдаются существенные изменения обмена витамина B<sub>2</sub>, проявляющиеся в его повышенном выведении с мочой и увеличении содержания в эритроцитах. Это затрудняет использование данных показателей для оценки обеспеченности рибофлавином больных сахарным диабетом I типа, в то же время критерии обеспеченности этим витамином при инсулиннезависимом сахарном диабете совпадают с таковыми у здоровых.

У больных инсулиннезависимым и инсулинозависимым сахарным диабетом не обнаружено отличий в обмене витаминов B<sub>6</sub>, РР и B<sub>1</sub>. Нормы экскреции 4-ПК, 1-МНА, B<sub>1</sub> и содержание соответствующих витаминов в крови не отличаются от параметров для здоровых взрослых.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Глинка Е. Ю., Сокольников А. А., Коденцова В. М. // *Вопр. мед. химии.* — 1989. — № 2. — С. 52—59.
2. Гублер Е. В., Генкин А. А. *Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях.* — Л., 1973.
3. Зелинский Б. А., Зелинский С. Ц., Гончаров Л. И., Вернигородский В. С. // *Эндокринология.* — Киев, 1981. — Вып. 11. — С. 19—22.
4. Коденцова В. М., Вржесинская О. А., Алексеева И. А., Спиричев В. Б. // *Вопр. мед. химии.* — 1991. — № 5. — С. 76—79.
5. Коденцова В. М., Вржесинская О. А., Сокольников А. А. и др. // *Вопр. питания.* — 1992. — № 2. — С. 62—67.
6. Мойсеев А. Г., Кочурко С. П., Балаклеевская В. Г. // *Кокарбоксилаза и другие тиаминфосфаты.* — Минск, 1974. — С. 172—197.
7. Павловский М. П., Томашевский Я. И., Томашевская А. Я., Сергиенко А. А. *Изучение обмена тиамина (витамина B<sub>1</sub>) и его коррекция у больных и угрожаемых по сахарному диабету: Метод. рекомендации.* — Львов, 1982.
8. Подорожный П. Г., Березин П. К. // *Актуальные проблемы физиологии, биохимии и патологии эндокринной системы.* — М., 1972. — С. 375—392.
9. *Теоретические и клинические аспекты науки о питании.* — Т. 8. — М., 1987.
10. Чернышов В. Г. — *Лаб. дело.* — 1985. — № 3. — С. 171—173.
11. Чобитко В. Г. // *Труды Саратов. мед. ин-та.* — 1984. — № 110/127. — С. 8—11.
12. Davis R. E., Calder J. S., Curnow D. H. // *Pathology.* — 1976. — Vol. 8. — P. 151—156.
13. Field J. B., Federman D. P., McDaniel E. // *Diabetes.* — 1957. — Vol. 6. — P. 508—514.

14. Gregory Y. F., Kirk J. R. // Amer. J. clin. Nutr.— 1979.— Vol. 32.— P. 879—883.
15. Horwitt M. K. // Ibid.— 1986.— Vol. 44.— P. 973—986.
16. Jaklinska T., Niewiedziol B. // Pediat. Pol.— 1987.— Vol. 62.— P. 753—757.
17. Takeuchi T., Nishino K., Itokawa J. // Clin. Chem.— 1984.— Vol. 30.— P. 658—661.
18. Ubbink J. B., Serfontein W. J., De Villiers L. S. // J. Chromatogr.— 1986.— Vol. 375.— P. 399—404.

Поступила 25.09.92

# METABOLISM OF VITAMINS B IN PATIENTS WITH INSULIN-DEPENDENT AND INDEPENDENT FORMS OF DIABETES MELLITUS.

V. M. Kodentsova, O. A. Vrzhesinskaya, A. A. Sokolnikov, L. A. Kharitonchik, V. B. Spirichev

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

Metabolism of vitamins B, involving evaluation of these vitamins content in blood and excretion of their metabolites with urine, was studied in adult healthy persons as well as in patients with insulin-dependent and -independent forms of diabetes mellitus. Distinct alterations in metabolism of vitamin B<sub>2</sub> were detected in the insulin-dependent diabetes: its content in erythrocytes and the rate of excretion with urine were increased. This phenomenon made some problems in evaluation of riboflavin consumption in patients with diabetes mellitus of the I type, while parameters of vitamin consumption in insulin-independent diabetes were similar to those of healthy persons. Parameters of metabolism of vitamins B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub> and PP were not different in patients with insulin-dependent and -independent forms of diabetes mellitus. Rates of excretion of 4-pyridoxic acid, 1-methyl nicotinamide, thiamine with urine as well as concentration of the corresponding vitamins in blood were similar to those parameters of healthy persons.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 615.356:577.164.2].015.4.07

В. М. Коденцова, О. А. Вржесинская, А. А. Сокольников, Н. А. Бекетова, В. Б. Спиричев

## ВЛИЯНИЕ ОБЕСПЕЧЕННОСТИ РИБОФЛАВИНОМ НА ОБМЕН ВОДОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ

Институт питания РАМН, Москва

В метаболических превращениях тех или иных витаминов принимают участие ферменты, активность которых зависит от обеспеченности другими витаминами, выступающими в роли коферментов или физиологических модификаторов. Это означает, что недостаток одного из витаминов может влиять на обмен другого витамина, нарушая его превращение в физиологически активную форму, что в свою очередь может приводить к нарушению его функционирования в организме. Наиболее типичными примерами такого рода являются зависимость биосинтеза никотиновой кислоты из триптофана от рибофлавина и витамина В<sub>6</sub> [14], конкурентные отношения за использование лимитированного нуклеотидтрифосфатного фонда при синтезе коферментных форм витаминов (пиридоксальфосфат — ПАЛФ и тиаминфосфаты) [8, 9] и др.

Витаминный статус организма обычно оценивают, определяя поступление витамина с пищей, концентрацию его или его коферментных форм в крови, экскрецию с мочой самого витамина или его метаболита, а также с помощью функ-

циональных тестов по степени активации ферментов экзогенно добавленными коферментными формами витаминов [12]. Несмотря на разработку новых, более специфичных и удобных методов определения витаминов, трактовка получаемых результатов может быть в значительной мере затруднена вследствие существования межвитаминных взаимодействий, поскольку, как отмечено выше, на параметры, применяемые в качестве критериев обеспеченности одним витамином, может оказывать влияние обеспеченность другими витаминами. Ранее подобную ситуацию мы наблюдали в эксперименте на крысах с дефицитом витамина В<sub>6</sub> или В<sub>2</sub>. У этих животных при нормальном поступлении ниацина с рационом экскреция 1-метилникотинамида (1-МНА) — продукта метаболизма триптофана по ниациновому пути — оказалась сниженной по сравнению с контрольными животными, оптимально обеспеченными витаминами В<sub>2</sub> и В<sub>6</sub> [1, 5]. На основании этого был сделан вывод о том, что снижение экскреции 1-МНА с мочой не всегда однозначно свидетельствует о плохой обеспеченности организма ниацином вследствие его недостаточного поступления с пищей.

Учитывая широкое распространение среди населения дефицита рибофлавина, в настоящей работе с использованием как модельных экспериментов на крысах с различной обеспеченностью витамином В<sub>2</sub>, так и анализа результатов исследования обеспеченности витаминами 39 здоровых детей 9—13 лет и 45 взрослых обоего пола было исследовано влияние дефицита рибофлавина на метаболизм витаминов В<sub>1</sub>, В<sub>6</sub>, РР и С. Полученные данные могли бы иметь как теоретическое, так и практическое значение для корректировки рационов по результатам оценки витаминной обеспеченности людей.

**Методика.** В эксперименте использовали крыс-самцов Вистар с исходной массой тела 120—150 г. Животные в течение 10 дней получали полноценный полусинтетический рацион, содержащий 20 % казеина, отмытого от водорастворимых витаминов, 42,7 % крахмала, 20 % глюкозы, 9 % подсолнечного масла с добавленными витаминами А и D в количестве 300 и 20 МЕ соответственно на крысу в день, 4 % солевой смеси [16], 0,2 % холинхлорида и 0,1 % смеси водорастворимых витаминов, за исключением рибофлавина. Витаминная смесь имела следующий состав: тиамин и пиридоксин — по 0,5 %, пантотенат кальция — 2,8 %, никотиновая кислота — 2 %, викасол — 0,1 %, фолиевая кислота — 0,02 %, биотин — 0,01 %, цианокобаламин — 0,002 %, аскорбиновая кислота — 1,25 %, глюкоза — до 100 %. Затем животные были разделены на 5 групп по 8 крыс в каждой, получавших в течение 21 дня дробные количества рибофлавина с рационом. Животные 1-й группы продолжали получать исходный рацион, что обеспечивало поступление 3 мкг рибофлавина на крысу в день за счет примеси, содержащейся в казеине, животные 2-й группы — рибофлавин дополнительно с витаминной смесью в количестве 5 мкг на крысу в день, животные 3, 4 и 5-й групп — по 10, 20 и 30 мкг рибофлавина на крысу в день соответственно. За 1—3 дня до окончания эксперимента крыс помещали в метаболические клетки для сбора

Таблица 1

Коэффициенты корреляции между показателями обеспеченности крыс витаминами группы В

Параметр	$\rho$	$n$	$p$
От содержания витамина В <sub>2</sub> в рационе:			
содержание рибофлавина в печени	0,770	39	$\leq 0,01$
содержание витамина В <sub>6</sub> в печени	-0,356	35	$\leq 0,05$
содержание НАД+НАДФ в печени	0,441	35	$\leq 0,01$
содержание витамина В <sub>1</sub> в печени	0,447	37	$\leq 0,01$
содержание витамина С в печени	0,624	39	$\leq 0,01$
содержание НАД+НАДФ в эритроцитах	0,496	32	$\leq 0,01$
От содержания витаминов В <sub>2</sub> в печени:			
содержание ПАЛ в печени	-0,199	35	$\leq 0,10$
содержание витамина В <sub>1</sub> в печени	0,405	37	$\leq 0,01$
содержание витамина С в печени	0,548	39	$\leq 0,01$
содержание НАД+НАДФ в эритроцитах	0,489	32	$\leq 0,01$
От содержания витамина В <sub>6</sub> в печени:			
содержание НАД+НАДФ в печени	-0,302	34	$\leq 0,05$
От содержания НАД+НАДФ в печени:			
содержание витамина С в печени	0,326	32	0,05

рибофлавина в печени хорошо коррелировало с его уровнем в рационе (табл. 1).

На рис. 2 представлены зависимости содержания пиридоксала (ПАЛ) и пиридоксамина от уровня рибофлавина в рационе. В диапазоне от 8 до 33 мкг рибофлавина на крысу в день содержание витамина В<sub>6</sub> и экскреция 4-ПК не изменялись. При остром дефиците витамина В<sub>2</sub> происходило достоверное увеличение содержания витаминов В<sub>6</sub> в печени; экскреция 4-ПК при этом имела тенденцию к снижению. Подобное увеличение концентрации ПАЛФ в печени при дефиците рибофлавина у крыс отмечалось и другими авторами [9]. Возможным объяснением этих фактов может быть снижение активности ФАД-зависимой альдегидоксидазы печени, окисляющей ПАЛ в 4-ПК, результатом чего может быть уменьшение экскреции 4-ПК с мочой и накопление витаминов В<sub>6</sub> в печени. Расчет коэффициента корреляции подтвердил существование выраженной обратной корреляции между уровнем витаминов В<sub>6</sub> в печени животных и содержанием рибофлавина в их рационе или печени (см. табл. 1).

Учитывая, что для оценки обеспеченности чело-

Таблица 2

Активность В<sub>1</sub>- и В<sub>6</sub>-зависимых ферментов гемолизата эритроцитов при различном содержании рибофлавина в рационе крыс ( $n=5$ )

Показатель	Содержание рибофлавина в рационе, мкг	
	3	33
Транскетолаза, мкмоль/мин на 1 мл эритроцитов	18,1±1,4	18,6±1,0
ТДФ-эффект	1,28±0,05	1,31±0,10
Аспаратаминотрансфераза, мкмоль/мин на 1 мл эритроцитов	1,03±0,08	1,12±0,10

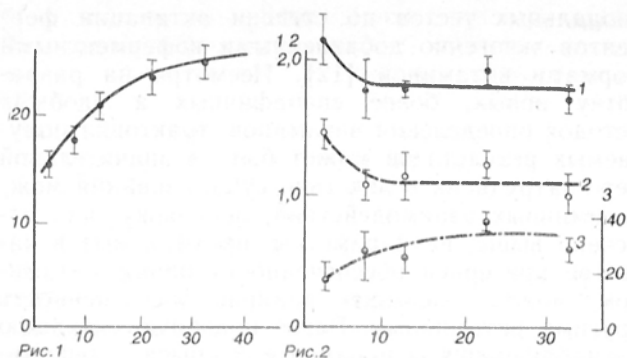


Рис. 1. Зависимость содержания витамина В<sub>2</sub> в печени крыс от его содержания в рационе.

Здесь и на рис. 2—4 по оси абсцисс — содержание рибофлавина в рационе крыс, мкг/сут на крысу; по оси ординат содержание общего рибофлавина в печени, мкг/г сырой ткани.

Рис. 2. Зависимость содержания витаминов В<sub>6</sub> (в мкг/г сырой ткани) в печени крыс и суточной экскреции с мочой 4-ПК (в мкг) от содержания рибофлавина в рационе.

1 — пиридоксаль; 2 — пиридоксамин; 3 — экскреция с мочой 4-ПК.

мочи, лишая пищи и предоставляя воду без ограничения. Для исследования мочи людей использовали утреннюю порцию, собранную за 1 ч натощак. Плазму крови людей и крыс получали после отделения эритроцитов из гепаринизированной крови по общепринятой методике. Концентрацию свободного рибофлавина в плазме крови животных и людей и общего рибофлавина в печени, рационе крыс и экскрецию его с мочой определяли с помощью титрования рибофлавин-связывающим апобелком [4]. Содержание пиридоксальных коферментов в плазме крови людей и печени крыс, а также экскрецию 4-пиридоксильной кислоты (4-ПК) с мочой определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [15, 19]. Концентрацию окисленных никотинамидных коферментов в эритроцитах, а также их содержание в печени крыс и экскрецию 1-МНА с мочой определяли флюоресцентным методом [6]. Содержание в печени витамина В<sub>1</sub> определяли методом ВЭЖХ с постколоночным окислением в тиохром феррицианиде калия по модифицированной методике [17], витамина С — спектрофотометрически [11]. Активность транскетолазы эритроцитов и степень ее активации тиаминдифосфата (ТДФ) (ТДФ-эффект) определяли после предварительной инактивации трансаальдолазы [18]. Активность аспаратаминотрансферазы исследовали ранее описанным методом [1]. Коэффициент ранговой корреляции ( $\rho$ ) рассчитывали по Спирмену [2].

Результаты и обсуждение. На рис. 1 представлена зависимость содержания общего рибофлавина в печени крыс от его поступления с рационом. Пребывание животных на рационе, лишенном витамина В<sub>2</sub> (что обеспечивало поступление за счет примеси в казеине не более 3 мкг рибофлавина на крысу в день), приводило к развитию дефицита этого витамина в организме. Концентрация рибофлавина в печени крыс, лишенных витамина В<sub>2</sub>, уменьшалась на 40 % по сравнению с животными, получавшими 33 мкг рибофлавина, что составляет 30 % от физиологической потребности крысы в этом витамине. Содержание



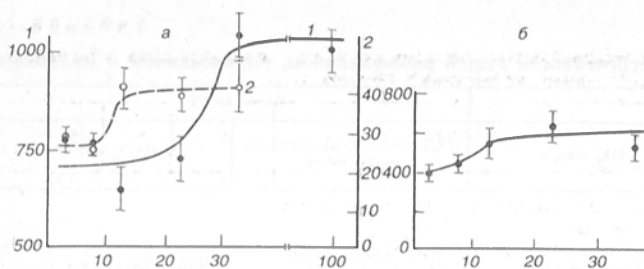


Рис. 3. Зависимость содержания НАД+НАДФ в печени и эритроцитах (а) и суточной экскреции 1-МНА (в мкг, б) от содержания рибофлавина в рационе крыс.

1 — содержание НАД+НАДФ в печени, мкг/г сырой печени; 2 — содержание НАД+НАДФ в эритроцитах, мкг/мл.

века витамином В<sub>6</sub> используют величину активности ПАЛФ-зависимой аспаратаминотрансферазы и степень ее активации экзогенным ПАЛФ, для крыс, лишенных витамина В<sub>2</sub> и получающих 33 мкг его, была определена активность этого фермента (табл. 2), которая у них практически не различалась. Таким образом, в отличие от экскреции 4-ПК на этот параметр обеспеченность витамином В<sub>2</sub> не влияет.

Содержание окисленных никотинамидных коферментов в печени также обнаруживает зависимость от обеспеченности крыс витамином В<sub>2</sub>. Уменьшение дозы рибофлавина в рационе крыс с 33 до 23 мкг в сутки при нормальном поступлении никотиновой кислоты с пищей приводит к достоверному снижению содержания НАД+НАДФ на 25 % (рис. 3, а). Концентрация никотинамидных коферментов в печени обнаруживает положительную корреляцию с содержанием рибофлавина в рационе и обеспеченностью этим витамином (по содержанию в печени) и отрицательную корреляцию с содержанием витамина В<sub>6</sub> в печени (см. табл. 1). Поскольку концентрация ПАЛ в печени при дефиците рибофлавина у крыс повышается, можно предположить, что активность ПАЛФ-зависимых ферментов не изменяется или по крайней мере не уменьшается. Это позволяет думать, что снижение уровня никотинамидных коферментов в печени является результатом снижения их синтеза из триптофана вследствие уменьшения активности ФАД-зависимых ферментов. Вероятно, следствием этого является уменьшенное выведение с мочой 1-МНА (рис. 3, б). Поскольку этот показатель широко используется для оценки обеспеченности организма ниацином, необходимо иметь в виду, что его снижение не всегда отражает дефицит ниацина в пище. Другой показатель, использующийся для оценки ниацинового статуса — содержание окисленных никотинамидных коферментов в эритроцитах — также зависит от обеспеченности витамином В<sub>2</sub>, обнаруживая положительную корреляцию с содержанием рибофлавина как в рационе, так и в печени животных (см. табл. 1). Однако снижение концентрации НАД+НАДФ в эритроцитах наступает при более остром дефиците рибофлавина, чем уменьшение экскреции 1-МНА и содержания никотинамидных коферментов в печени (см. рис. 3). Таким образом, этот параметр в меньшей степени зависит от обеспеченности рибофлавином и является более приемлемым для выявления дефицита ниацина в пище.

При поступлении с рационом 3 мкг рибофлавина содержание аскорбиновой кислоты в печени крыс снижалось на 35 %, тиамин — на 20 % по сравнению с крысами, получавшими по 33 мкг рибофлавина в день (рис. 4). Аналогичное влияние дефицита рибофлавина на уровень витамина С в органах отмечено у собак [7]. Уменьшение содержания витамина С может быть следствием снижения уровня никотинамидных коферментов при дефиците рибофлавина, так как в эндогенном синтезе этого витамина у крыс участвует НАДН-зависимый фермент. Наличие хорошей корреляции между содержанием витамина В<sub>2</sub> в рационе крыс и печени, а также содержанием НАД+НАДФ в печени животных и содержанием витамина С в этом органе подтверждает это предположение (см. рис. 1). Аналогичную положительную корреляцию с уровнем витамина В<sub>2</sub> в рационе и печени обнаруживает содержание витамина В<sub>1</sub> в печени (см. табл. 1). Определение активности транскетолазы и степени ее активации экзогенным ТДФ — параметров, применяющихся для оценки обеспеченности организма тиаминном, — показало, что во всем диапазоне использованных концентраций рибофлавина активность фермента одинакова (см. табл. 2). Степень ее активации ТДФ, превышающая величину 1,15, свидетельствует о существовании дефицита этого витамина при недостаточном поступлении с пищей витамина В<sub>2</sub>.

Результаты, полученные у животных, нашли подтверждение при обследовании витаминной обеспеченности людей. Все обследуемые были разделены на 2 группы. В группу обеспеченных витамином В<sub>2</sub> были отнесены люди, у которых концентрация свободного рибофлавина в плазме превышала 5 нг/мл, а часовая экскреция с мочой — 14 мкг [4]. Обеспеченные рибофлавином люди были подразделены еще на 3 подгруппы в зависимости от обеспеченности витаминами В<sub>6</sub> и РР. В подгруппу обеспеченных витамином В<sub>6</sub> были отобраны люди, у которых содержание ПАЛФ в плазме превышало 8,5 нг/мл, а экскреция 4-ПК — 60 мкг. В свою очередь из этой подгруппы были выделены люди с недостаточностью ниацина, т. е. те, у кого при нормальной обеспеченности витаминами В<sub>2</sub> и В<sub>6</sub> содержание НАД+НАДФ в эритроцитах было ниже 40 мкг/мл.

Как следует из результатов табл. 3, у детей

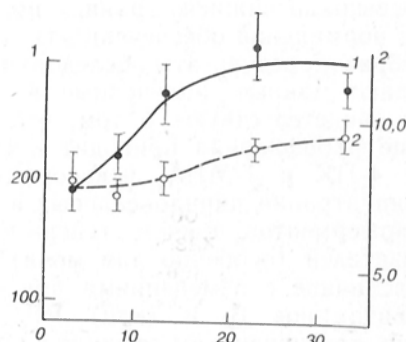


Рис. 4. Содержание (в мкг/г сырой ткани) восстановленной аскорбиновой кислоты (1) и тиамин (2) в зависимости от содержания рибофлавина в рационе крыс.

Показатели обеспеченности витаминами В<sub>6</sub> и РР при различной обеспеченности людей рибофлавином, пиридоксином и ниацином

Обследуемые	Витамин В <sub>6</sub>		Витамин РР	
	ПАЛ+ПАЛФ, нг/мл плазмы	4-ПК, мкг/ч	НАД+НАДФ, мкг/мкг/мл эритроцитов	1-МНА, мкг/ч
Обеспеченные рибофлавином:				
обеспеченные витамином В <sub>6</sub> :				
взрослые	14,1±0,7 (14)	92,7±11,8 (15)	70,3±5,0 (15)	624±74 (11)
дети	13,2±3,5 (7)	64,0±8,7 (7)	75,6±10,6 (7)	608±79 (7)
с дефицитом витамина В <sub>6</sub> :				
взрослые	6,8±0,4 <sup>a</sup> (7)	41,7±6,5 <sup>a</sup> (15)	72,5±8,2 (13)	469±47 (13)
дети	4,9±0,4 (14)	37,1±4,0 <sup>a</sup> (14)		517±39 (13)
обеспеченные витамином В <sub>6</sub> с дефицитом ниацина				
взрослые	—	55,7±10,0 <sup>a</sup>	32,7±2,3 <sup>a, г</sup>	384±67 <sup>a</sup>
С дефицитом рибофлавина:				
взрослые	16,5±2,2 <sup>б</sup> (9)	37,2±10,0 <sup>a</sup> (11)	50,7±2,0 <sup>a, б, в</sup> (12)	265±24 <sup>a, б</sup> (12)
дети	5,6±0,6 <sup>a</sup> (18)	26,1±3,3 <sup>a, б</sup> (18)	61,2±6,6 (13)	291±20 <sup>a, б</sup> (13)

Примечание. В скобках — число обследованных. а — достоверное отличие ( $p \leq 0,05$ ) от группы, обеспеченной витаминами В<sub>2</sub>, В<sub>6</sub>, и РР; достоверные отличия ( $p \leq 0,05$ ) между группами: б — с дефицитом рибофлавина и истинным дефицитом витамина В<sub>6</sub>, в — с дефицитом рибофлавина и истинным дефицитом витамина РР, г — с дефицитом витаминов РР и В<sub>6</sub>.

с дефицитом рибофлавина содержание ПАЛ+ПАЛФ в плазме достоверно снижено, экскреция 4-ПК снижена на 60 % у обеих возрастных групп. Причем у детей уменьшение выведения 4-ПК даже более выражено по сравнению с истинным пищевым дефицитом витамина В<sub>6</sub>. Это означает, что на основании определения концентрации пиридоксалевого кофермента и экскреции 4-ПК с мочой можно прийти к ошибочному выводу об алиментарном дефиците витамина В<sub>6</sub>, тогда как причиной снижения этих показателей является недостаточное поступление рибофлавина с пищей. Прямая корреляция между рибофлавиновым и пиридоксиновым статусом организма была обнаружена у больных серповидноклеточной анемией [13].

У взрослых людей с дефицитом рибофлавина достоверно снижено содержание НАД+НАДФ в эритроцитах (на 28 %), хотя эта величина находится в пределах, характерных для нормальной обеспеченности ниацином. У обеих возрастных групп снижена экскреция 1-МНА на 52—58 % по сравнению с людьми, обеспеченными всеми исследованными витаминами. Снижение экскреции 1-МНА при дефиците рибофлавина даже более выражено, чем при изолированном пищевом дефиците ниацина (38 %). Выведение 1-МНА в группах обследованных с дефицитом витамина В<sub>6</sub> имело тенденцию к снижению по сравнению с группами, обеспеченными всеми витаминами, однако превышало нижнюю границу нормы, принятую для нормальной обеспеченности ниацином.

Таким образом, результаты обследования людей подтверждают данные, полученные в опыте на крысах, и свидетельствуют о том, что недостаток в пище рибофлавина приводит к снижению экскреции 4-ПК и 1-МНА, некоторому уменьшению концентрации пиридоксалевого и никотинамидного кофермента, причем степень изменения этих показателей (особенно для мочи) сопоставима по величине с изменениями при дефиците в пище витаминов В<sub>6</sub> и (или) РР. Другими словами, по этим признакам дефицит в пище рибофлавина может быть ошибочно принят за дефицит в пище витаминов В<sub>6</sub> и (или) РР. Это может являться одной из причин того, что как подчеркивают ряд авторов [3, 10], недостаточность этих

витаминов у человека в изолированном, чистом виде практически не встречается и, как правило, носит характер сочетанного полигиповитаминоза.

Для того чтобы правильно скорректировать питание по содержанию этих витаминов, необходимо в первую очередь оценивать обеспеченность организма витамином В<sub>2</sub>. Об обнаружении дефицита пиридоксина можно, по-видимому, говорить в случае снижения содержания ПАЛ+ПАЛФ в крови и (или) экскреции 4-ПК при условии, если показатели обеспеченности рибофлавином соответствуют норме. Вывод о наличии дефицита ниацина может быть сделан при одновременном снижении содержания НАД+НАДФ в эритроцитах и экскреции 1-МНА при условии адекватной обеспеченности организма рибофлавином.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Глинка Е. Ю., Сокольников А. А., Коденцова В. М. // Вопр. мед. химии. — 1989. — № 2. — С. 52—59.
2. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. — Л., 1973.
3. Ефремов В. В., Бериулава И. Т. // Вопр. питания. — 1956. — № 5. — С. 26—30.
4. Коденцова В. М., Вржесинская О. А., Алексеева И. А., Спиричев В. Б. // Вопр. мед. химии. — 1991. — № 5. — С. 76—79.
5. Коденцова В. М., Вржесинская О. А., Спиричев В. Б. // Там же. — 1992. — № 1. — С. 22—24.
6. Коденцова В. М., Вржесинская О. А., Сокольников А. А. и др. // Вопр. питания. — 1992. — № 2. — С. 62—67.
7. Масленникова Е. М. // Там же. — 1954. — № 5. — С. 11.
8. Межвитаминовые отношения при ишемической болезни сердца и гипертонической болезни / Борец В. М., Миропчик В. В., Артаева Л. П. и др. — Минск, 1988.
9. Метаболические эффекты недостаточности функционально связанных В-витаминов / Под ред. Ю. М. Островского. — Минск, 1987.
10. Потребность человека в витаминах. — М., 1966.
11. Соколовский В. В., Лебедева Л. В., Лизалуп Т. Б. // Лаб. дело. — 1974. — № 3. — С. 160—162.
12. Теоретические и клинические аспекты науки о питании / Под ред. М. Н. Волгарева. — Т. 8. — М., 1987.
13. Adelekan D. A., Adekile A. D., Thurnham D. J. // Amer. J. clin. Nutr. — 1987. — Vol. 46. — P. 86—90.
14. Bender D. A., Bender A. E. // Nutr. Abstr. Rev. — 1986. — Vol. 56. — P. 695—719.
15. Gregory J. F., Kirk J. R. // Amer. J. clin. Nutr. — 1979. — Vol. 32. — P. 879—883.
16. Jones B. C., Foster C. // J. Nutr. — 1942. — Vol. 24. — P. 245—248.

17. Kimura E., Fujita T., Itokawa Y. // Clin. Chem.— 1982.— Vol. 28.— P. 29.
18. Takeuchi T., Nishino K., Itokawa Y. // Ibid.— 1984.— Vol. 30.— P. 658—661.
19. Ubbink J. B., Serfontein W. J., De Villiers L. S. // J. Chromatogr.— 1986.— Vol. 375.— P. 399—404.

Поступила 10.09.92

# EFFECT OF THE RIBOFLAVIN CONSUMPTION RATE ON METABOLISM OF WATER-SOLUBLE VITAMINS.

V. M. Kodentsova, O. A. Vrzhesinskaya, A. A. Sokolnikov, N. A. Bekeleva, V. B. Spirichev

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

Increase of vitamin B<sub>6</sub> derivatives by 36 % in liver tissue, decrease in content of thiamine by 20 %, of ascorbic acid — by 35 %, of oxidized nicotinamide coenzymes — by 27 %, simultaneously with a decrease in excretion of 1-methyl nicotinamide and 4-pyridoxyc acid with urine were observed in rats with alimentary deficiency in riboflavin as compared with the animals kept on a ration containing 1/3 of the vitamin physiological requirements. The same regularities were detected in adult persons and children examined for consumption of vitamins: a decrease in excretion of 4-pyridoxyc acid and 1-methyl nicotinamide with urine, slight decrease in content of pyridoxal coenzymes in blood plasma and of nicotinamide coenzymes in erythrocytes were observed in children with deficiency in riboflavin close to deficiency of corresponding enzymes in food ration as compared with normal level of vitamin consumption. This suggests that evaluation of pyridoxine and/or niacin deficiency in food ration should be related with the rate of riboflavin consumption.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.379-008.64-07:616-008.94:615.356:577.164.121-074

В. М. Коденцова, О. А. Вржесинская, А. А. Сокольников, И. А. Алексеева, В. Б. Спиричев

## ОБМЕН РИБОФЛАВИНА И ФУНКЦИОНАЛЬНО СВЯЗАННЫХ С НИМ ВИТАМИНОВ ГРУППЫ В ПРИ ИНСУЛИНЗАВИСИМОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Институт питания РАМН, Москва

Одним из характерных признаков сахарного диабета является повышенная экскреция рибофлавина с мочой [8, 9]; считается, что она может приводить к тканевому дефициту этого витамина. При использовании моделей стрептозотоцинового и аллоксанового диабета обнаружено уменьшение содержания ФАД в печени и активности сукцинатдегидрогеназы и глутатионредуктазы — витамин В<sub>2</sub>-зависимых ферментов [7, 8]. Нами установлено, что концентрация общего рибофлавина в эритроцитах больных сахарным диабетом детей как до, так и после дополнительного введения в рацион дозы витамина В<sub>2</sub>, обеспечивающей суточную потребность, оказалась существенно ниже величин, характерных для здоровых людей, обеспеченных рибофлавином. Это должно было бы приводить к снижению насыщения апофермента глутатионредуктазы ФАД, но дополнительной активации фермента экзогенным ФАД не обнаруживалось. Таким образом, оставалось неясным, насыщены ли ФАД и ФМН другие ферменты, активность которых зависит от витамина В<sub>2</sub>.

В поисках ответа на этот вопрос был пред-

принят следующий подход. Ранее нами было продемонстрировано, что у людей и животных с недостаточностью рибофлавина вследствие снижения активности витамин В<sub>2</sub>-зависимых ферментов, участвующих в обмене пиридоксина и эндогенном синтезе ниацина, снижается экскреция 1-метилникотинамида (1-МНА) и 4-пиридоксильной кислоты (4-ПК) даже при достаточном поступлении этих витаминов с пищей [1]. Кроме того, если при нормальной обеспеченности витамином В<sub>2</sub> выявляется корреляция между концентрацией пиридоксальных и никотинамидных коферментов в крови и экскрецией метаболитов витамина В<sub>6</sub> и ниацина с мочой, то при дефиците рибофлавина у людей такая зависимость не обнаруживается. В данной работе был исследован обмен витаминов группы В у детей, страдающих инсулинзависимым сахарным диабетом, и здоровых детей того же возраста, а также взрослых, адекватно обеспеченных рибофлавином и с недостаточностью этого витамина. Предполагалось на основании сравнения кривых зависимости экскреции 4-ПК и 1-МНА от концентрации коферментных форм витаминов в крови, полученных для больных диабетом и здоровых детей и взрослых с различной обеспеченностью витамином В<sub>2</sub>, косвенно определить, существует ли тканевый дефицит рибофлавина при сахарном диабете.

**Методика.** В работе использованы данные, полученные при исследовании витаминной обеспеченности 30 здоровых детей обоего пола 9—13 лет и детей этого же возраста, страдающих инсулинзависимым сахарным диабетом в течение 2—5 лет, а также здоровых взрослых. Повторное обследование больных детей было проведено после 2—3-недельной витаминизации. В течение этого периода дети, страдающие диабетом, получали дополнительно к рациону 1,55 мг рибофлавина в сутки в составе обогащенных поливитаминными премиксами 730/4 и 986 фирмы «Рош» (Австрия) вторых и третьих готовых блюд, что составляло 91—100 % от рекомендуемого потребления.

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

Содержание рибофлавина в моче и плазме крови определяли титрованием рибофлавинсвязывающим апопротеином [3], 4-ПК — с помощью ВЭЖХ [6], 1-МНА — флуориметрическим методом [4]. Концентрацию никотинамидных коферментов в эритроцитах измеряли флуоресцентным методом [3], пиридоксальных коферментов — методом ВЭЖХ [13]. Во всех флуоресцентных методах использовали соответствующий внутренний стандарт. Интенсивность флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре «Perkin Elmer MPF-43A».

Коэффициент ранговой корреляции между содержанием витаминов в крови и экскрецией их с мочой рассчитывали по Спирмену [2].

**Результаты и обсуждение.** В табл. 1 представлены показатели обеспеченности рибофлавином здоровых и больных сахарным диабетом детей до и после 2-недельного курса витаминизации. При практически одинаковом потреблении витамина В<sub>2</sub> (2,5—2,9 мг) экскреция этого витамина с мочой у больных сахарным диабетом детей на порядок превышала величину, характерную для здоровых детей. При этом концентрация сво-



Показатели обеспеченности рибофлавином здоровых и больных сахарным диабетом детей

Исследуемый показатель	Обследуемые дети		
	здоровые	больные	
Содержание рибофлавина в суточном рационе, мг	2,5	1,4	2,9
Свободный рибофлавин, нг/мл плазмы	$8,1 \pm 1,3$ $n=10$	$10,3 \pm 0,9$ $n=20$	$13,1 \pm 1,0^b$ $n=18$
Общий рибофлавин, нг/мл эритроцитов	$145 \pm 5$ $n=8$	$82 \pm 6^a$ $n=19$	$102 \pm 7^{a,b}$ $n=16$
Экскреция рибофлавина с мочой, мкг/ч	$11,0 \pm 1,6$ $n=28$	$81,6 \pm 16,8^a$ $n=32$	$117,3 \pm 22,2^{a,b}$ $n=23$
Активность глутатионредуктазы, нмоль НАДФН <sub>2</sub> /ч на 1 мл эритроцитов	$77,2 \pm 2,7$ $n=39$	$128,0 \pm 3,6^a$ $n=20$	$118,7 \pm 4,3^a$ $n=13$
Диапазон значений ФАД-эффекта	$1,01-1,18$ $n=39$	$1,00-1,16$ $n=20$	$1,01-1,18$ $n=13$
Константа активации глутатионредуктазы для ФАД, нМ	$1,58 \pm 0,50$ $n=3$	по	$0,04 \pm 0,01^a$ $n=3$

Примечание. Достоверность отличий ( $p \leq 0,05$ ): а — от показателей здоровых детей, б — от показателей больных детей до витаминизации, по — не определяли.

бодного рибофлавина в плазме крови у больных детей в 1,6 раза превышала этот параметр у здоровых детей, а содержание общего рибофлавина в эритроцитах было на 30 % снижено. В свою очередь, кривая зависимости экскреции рибофлавина от его концентрации в плазме крови для детей, страдающих сахарным диабетом, во всем диапазоне существенно (в 3—7 раз) выше, чем у здоровых детей. В то же время кривая зависимости концентрации общего рибофлавина от его содержания в плазме крови для больных детей несколько снижена и сдвинута вправо по сравнению с кривой для здоровых детей (рис. 1). При этом важно подчеркнуть, что при сахарном диабете, так же как и в норме, обнаруживается корреляция между исследованными показателями (табл. 2). Таким образом, показатели обмена рибофлавина свидетельствуют о существенном изменении метаболизма витамина В<sub>2</sub> при сахарном диабете, однако предположение о возникновении при этом заболевании тканевого дефицита рибофлавина не подтвердилось.

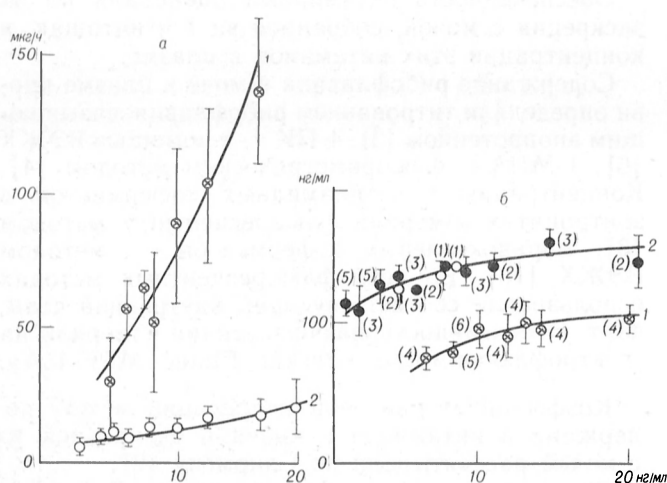


Рис. 1. Взаимосвязь между параметрами обеспеченности витамином В<sub>2</sub>.

а — зависимость между концентрацией рибофлавина в плазме (нг/мл) и его часовой экскрецией с мочой (мкг/ч); б — зависимость между содержанием общего рибофлавина в эритроцитах и его концентрацией в плазме. По оси абсцисс — концентрация в плазме, нг/мл; по оси ординат — содержание в эритроцитах, нг/мл. 1 — кривая для детей, больных сахарным диабетом, 2 — для здоровых людей. Здесь и на рис. 2: темные символы — взрослые, светлые — дети, светлые с крестиком — дети, больные сахарным диабетом.

Активность ФАД-зависимой глутатионредуктазы, степень активации которой экзогенным ФАД отражает степень насыщенности фермента коферментом и используется в качестве критерия обеспеченности организма витамином В<sub>2</sub>, у больных сахарным диабетом детей оказалась приблизительно в 1,5 раза выше, чем у здоровых людей (см. табл. 1). Это согласуется с данными других авторов [12]. При этом величина ФАД-эффекта никогда не превышала значения 1,2, принятого за нижнюю границу нормы. Таким образом, хотя резко сниженная по сравнению с нормой концентрация общего рибофлавина в эритроцитах при сахарном диабете должна была бы приводить к снижению насыщенности апофермента глутатионредуктазы ФАД, тем не менее дополнительная активация фермента экзогенным ФАД при этом практически не обнаруживается. Разгадка этого противоречия была найдена при исследовании зависимости активности глутатионредуктазы гемолизатов эритроцитов здоровых и больных детей от концентрации ФАД в координа-

Таблица 2

Коэффициенты корреляции между показателями обеспеченности витаминами группы В

Анализируемый параметр	r	n	p
Рибофлавин в плазме — экскреция рибофлавина с мочой:			
здоровые взрослые	0,603	35	$\leq 0,01$
здоровые дети	0,603	31	$\leq 0,01$
дети, больные сахарным диабетом	0,398	35	$\leq 0,01$
Рибофлавин в плазме — общий рибофлавин в эритроцитах:			
здоровые взрослые	0,296	30	$\leq 0,05$
дети, больные сахарным диабетом	0,293	31	$\leq 0,05$
НАЛ+НАЛФ в плазме — экскреция 4-ПК с мочой:			
здоровые взрослые	0,511	20	$\leq 0,01$
здоровые дети	0,469	25	$\leq 0,01$
дети, больные сахарным диабетом	0,460	41	$\leq 0,01$
НАД+НАДФ в эритроцитах — экскреция 1-МНА с мочой:			
здоровые взрослые	0,404	17	$\leq 0,05$
здоровые дети	0,420	14	$\leq 0,05$
дети, больные сахарным диабетом	0,489	26	$\leq 0,01$

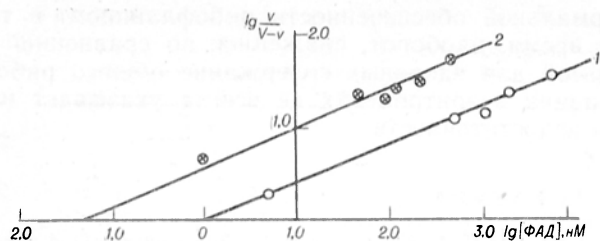


Рис. 2. Зависимость активности глутатионредуктазы эритроцитов здоровых (1) и страдающих сахарным диабетом (2) детей от концентрации экзогенного ФАД в координатах Хилла.

тах Хилла (рис. 2). Кажущаяся константа активации для фермента здоровых составила  $1,58 \pm 0,50$  нМ, что практически совпадает с данными Бютлера [5]. Для фермента больных сахарным диабетом эта величина составила  $0,040 \pm 0,007$  нМ, что указывает на увеличение сродства фермента к коферменту почти в 40 раз. По-видимому, именно этим и объясняется то, что при сниженном содержании общего рибофлавина в эритроцитах фермент оказывается насыщенным коферментом. Можно предположить, что увеличение сродства глутатионредуктазы к ФАД отражает свойства самого фермента и носит приспособительный характер.

Для того чтобы выяснить, насыщены ли другие витамин В<sub>2</sub>-зависимые ферменты коферментами, в дальнейшей работе была исследована зависимость экскреции 4-ПК от концентрации пиридоксальных коферментов (ПАЛ+ПАЛФ) в крови (рис. 3) для больных и здоровых детей и взрослых, в различной степени обеспеченных витамином В<sub>2</sub>.

Для оценки обеспеченности людей витамином В<sub>2</sub>

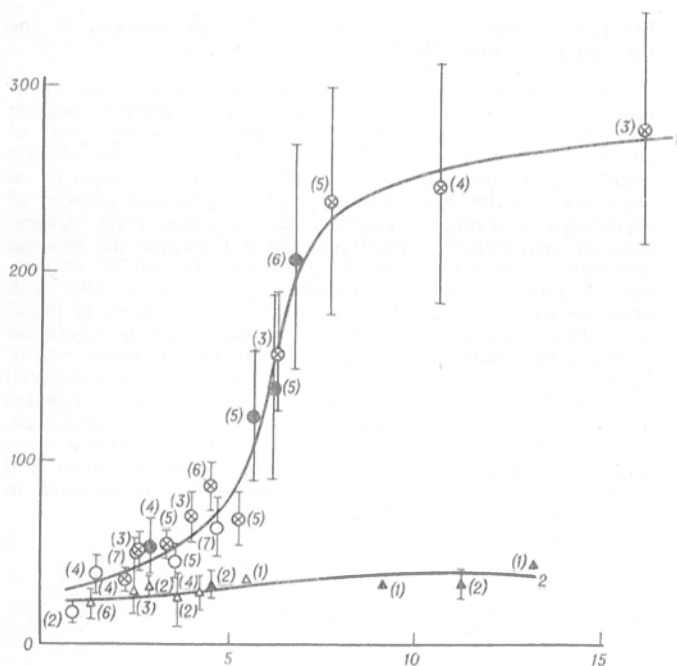


Рис. 3. Взаимосвязь между содержанием пиридоксальных коферментов в плазме и часовой экскрецией 4-ПК с мочой.

По оси абсцисс — концентрация ПАЛ+ПАЛФ, нг/мл, по оси ординат — экскреция 4-ПК, мг/ч. 1 — кривая для детей и взрослых, обеспеченных витамином В<sub>2</sub>, и детей, больных сахарным диабетом, 2 — для детей и взрослых с недостаточностью рибофлавина.

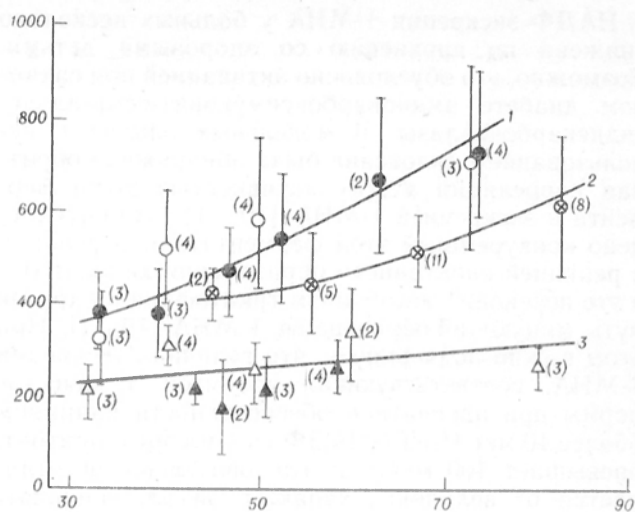


Рис. 4. Взаимосвязь между содержанием окисленных никотинамидных коферментов в эритроцитах и экскрецией 1-МНА с мочой.

По оси абсцисс — концентрация НАД+НАДФ в эритроцитах, мг/мл, по оси ординат — экскреция 1-МНА, мг/ч. 1 — кривая для детей и взрослых, обеспеченных витамином В<sub>2</sub>, 2 — для детей, больных сахарным диабетом, 3 — для детей и взрослых с недостаточностью витамина В<sub>2</sub>.

были определены параметры, отражающие поступление рибофлавина с пищей как в данный момент (концентрация свободного рибофлавина в плазме крови, экскреция его с мочой), так и в предшествующий период (содержание общего рибофлавина в эритроцитах) [4]. Взрослые и дети, у которых все 3 параметра превышали минимальные величины, характерные для нормальной обеспеченности человека рибофлавином (соответственно 5 нг/мл, 14 мкг/ч, 130 нг/мл), были отнесены в группу обеспеченных витамином В<sub>2</sub>. У остальных был обнаружен В<sub>2</sub>-гиповитаминоз.

Как следует из рис. 3, при недостаточности рибофлавина экскреция 4-ПК резко снижена по сравнению с нормой (40 мкг/ч) и практически не зависит от концентрации пиридоксальных коферментов в крови. Зависимость экскреции 4-ПК от содержания ПАЛ+ПАЛФ в плазме крови при сахарном диабете хорошо выражена, характеризуется высокой степенью корреляции (см. табл. 2) и не отличается от зависимости для здоровых детей и взрослых. Это можно трактовать как доказательство отсутствия снижения активности при диабете по крайней мере двух витамин В<sub>2</sub>-зависимых ферментов обмена пиридоксина: ФАД-зависимой альдегидоксидазы и ФМН-зависимой пиридоксаминфосфатоксидазы. Величины экскреции 4-ПК и содержание ПАЛ+ПАЛФ в крови, характерные для нормальной обеспеченности витамином В<sub>2</sub> у больных сахарным диабетом, совпадают с таковыми для здоровых людей.

Исследование зависимости экскреции 1-МНА от концентрации окисленных никотинамидных коферментов в эритроцитах у больных сахарным диабетом детей показало, что эта кривая резко отличается от кривой для здоровых людей с недостаточностью рибофлавина (рис. 4), причем, как и для здоровых, обеспеченных витамином В<sub>2</sub> людей, обнаруживается хорошая корреляция между этими параметрами (см. табл. 2). В то же время во всем диапазоне концентраций НАД+

+НАДФ экскреция 1-МНА у больных несколько снижена по сравнению со здоровыми детьми. Возможно, это обусловлено активацией при сахарном диабете аминокислотоксидазы-5-альдегидоксилазы. В модельных опытах с использованием аллоксана была обнаружена обратная корреляция между активностью этого фермента и экскрецией 1-МНА [10, 11], что обусловлено конкуренцией этой ферментативной реакции с реакцией спонтанного образования хинолината, а это переводит метаболизм триптофана на другой путь, минуя образование 1-МНА [10, 11]. При этом важно подчеркнуть, что величина экскреции 1-МНА, соответствующая принятой в качестве нормы при адекватной обеспеченности ниацином (более 40 мкг НАД+НАДФ на 1 мл эритроцитов), превышает 400 мкг/ч и, следовательно, не отличается от величины, характерной для здоровых людей.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об изменении метаболизма рибофлавина при сахарном диабете, что проявляется в его повышенном выведении с мочой и сниженном содержании в эритроцитах. Однако это не сопровождается снижением экскреции 1-МНА и 4-ПК до величин, характерных для здоровых людей с недостаточностью витамина В<sub>2</sub>, что можно рассматривать как доказательство отсутствия дефицита этого витамина при данном заболевании. В случае глутатионредуктазы эритроцитов это объясняется увеличением сродства фермента к ФАД по сравнению с ферментом здоровых людей, что делает невозможным использование величины ФАД-эффекта в качестве критерия обеспеченности рибофлавином при сахарном диабете. Окончательный ответ на вопрос, существует ли дефицит рибофлавина при сахарном диабете, могли бы дать исследование активности других витамин В<sub>2</sub>-зависимых ферментов и выяснение механизма изменения обмена рибофлавина при сахарном диабете и увеличения сродства глутатионредуктазы к коферменту.

Вместе с этим важно подчеркнуть, что, как следует из рис. 1, в качестве нижней границы нормы содержания общего рибофлавина в эритроцитах при сахарном диабете необходимо принять величину около 100 нг/мл. Данные, подтверждающие этот вывод, представлены в табл. 1: при содержании в рационе дозы рибофлавина, составляющей 79—80 % от рекомендуемого количества, концентрация рибофлавина в эритроцитах составляла 82±6 нг/мл, а потребление в течение 2 нед 2,5 мг рибофлавина приводило к увеличению этого показателя до 102±7 нг/мл. По этим же соображениям (см. рис. 1 и табл. 1) за нижнюю границу нормы содержания рибофлавина в плазме следует принять 10 нг/мл. Таким образом, если параметры, соответствующие нормальной обеспеченности витаминами В<sub>6</sub> и РР, при сахарном диабете не отличаются от критериев для здоровых, то показатели обеспеченности рибофлавином при этом заболевании существенно отличаются от показателей здоровых людей. Это необходимо учитывать при оценке обеспеченности рибофлавином людей, страдающих сахарным диабетом, поскольку повышенная экскреция этого витамина с мочой и содержание в плазме крови и нормальная величина ФАД-эффекта не отражают

нормальной обеспеченности рибофлавином, в то же время, наоборот, сниженное по сравнению с нормой для здоровых содержание общего рибофлавина в эритроцитах не всегда указывает на его недостаточность.

#### 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. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медикобиологических исследованиях.— Л., 1973.
3. Коденцова В. М., Вржесинская О. А., Алексеева И. А., Спиричев В. Б. // Вопр. мед. химии.— 1991.— № 6.— С. 76—79.
4. Теоретические и клинические аспекты науки о питании.— Т. 8.— М., 1987.
5. Beutler E. // J. clin. Invest.— 1969.— Vol. 48.— P. 1957—1966.
6. Gregory Y. F., Kirk J. R. // Amer. J. clin. Nutr.— 1979.— Vol. 32.— P. 879—883.
7. Navazio F., Siliprandi N. // 'Experientia' (Basel).— 1955.— Vol. 11.— P. 280—281.
8. Reddy A. S. // Biochim. biophys. Acta.— 1986.— Vol. 882.— P. 71—76.
9. Reddy A. S., Frank O., Baker H. // Int. J. Vitam. Nutr. Res.— 1990.— Vol. 60.— P. 252—254.
10. Sanada H., Miyazaki M., Takahashi T. // J. Nutr. Sci. Vitam.— 1980.— Vol. 26.— P. 449—459.
11. Shibata K. // Agric. biol. Chem.— 1987.— Vol. 51.— P. 811—816.
12. Som S., Basu D., Mukherjee S. et al. // Metabolism.— 1981.— Vol. 30.— P. 572—577.
13. Ubbink J. B., Serfontein W. J., De Villiers L. S. // J. Chromatogr.— 1986.— Vol. 375.— P. 399—404.

Поступила 18.03.91

#### METABOLISM OF RIBOFLAVIN AND THE FUNCTIONALLY ASSOCIATED VITAMINS B IN INSULIN-DEPENDENT DIABETES MELLITUS.

V. M. Kodentsova, O. A. Vrzhesinskaya, A. A. Sokolnikov, I. A. Alexeeva, V. B. Spirichev

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

In 35 children of 9-13 years old with insulin-dependent diabetes mellitus distinct alterations in metabolism of vitamin В<sub>2</sub> were detected, which were manifested as elevated rate of riboflavin excretion with urine and a decrease in the vitamin content in erythrocytes, as 1.5-fold increase in activity of erythrocyte glutathione reductase and augmented affinity of erythrocyte glutathione reductase to exogenous FAD. Alterations in metabolism of riboflavin did not involve the vitamin deficiency as shown by analysis of vitamins В<sub>6</sub> and РР (4-pyridoxic acid and 1-methyl nicotinamide, respectively) excretion with urine as well as by study of the coenzymes content in blood of healthy and sick children with various rates of riboflavin consumption. Rates of 4-pyridoxic acid and 1-methyl nicotinamide excretion with urine were similar both in healthy children of 9-13 years and in children of this age with diabetes mellitus. The data obtained suggest that rates of riboflavin consumption in patients with diabetes mellitus differed from those of healthy persons; these reasons should be taken into consideration in evaluation of vitamins В<sub>2</sub> consumption in patients with diabetes mellitus.



Б. Я. Власов, Б. Б. Буинов

## СОДЕРЖАНИЕ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРИ ЭКЗОГЕННОМ И ЭНДОГЕННЫМ ТИРЕОТОКСИКОЗЕ

Институт травматологии и ортопедии СО РАМН, Иркутск, Иркутский медицинский институт

Тиреоидные гормоны (ТГ) обладают целым рядом метаболических эффектов, большинство из которых, вероятно, реализуется с вовлечением механизмов биоэнергетики. Наиболее показательными в этом отношении являются исследования, посвященные изучению влияния ТГ на набухание митохондрий и разобщение в них дыхательного фосфорилирования [7].

Вместе с тем в литературе отсутствуют данные о влиянии ТГ на состояние обмена лимонной кислоты, синтез, которой лимитирует суммарную скорость цикла Кребса, поставляющего протоны и электроны в дыхательную цепь. В связи с клинической значимостью нарушения метаболизма ТГ мы поставили перед собой цель изучить содержание цитрата в сыворотке крови белых крыс в условиях экзогенного введения ТГ и у больных тиреотоксикозом II—III степени.

**Методика.** Экспериментальный тиреотоксикоз вызывали у белых беспородных крыс-самцов массой 200—250 г путем добавления к корму тиреоидина. Препарат давали по 0,1 г на каждое животное в сутки в течение 14 дней [8]. После окончания эксперимента животных декапитировали и в сыворотке крови после осаждения белков 5 % раствором метафосфорной кислоты определяли концентрацию цитрата флуориметрически [9]. Кровь у больных тиреотоксикозом II—III степени, находящихся в условиях специализированной клиники, брали натошак из локтевой вены и обрабатывали вышеуказанным способом. Контрольными группами служили интактные животные и практически здоровые доноры. Разность средних оценивали по Стьюденту [1] с общепринятым критерием достоверности ( $p < 0,05$ ).

**Результаты и обсуждение.** Как показали результаты опытов, при экзогенной интоксикации экспериментальных животных тиреоидином наблюдается достоверное повышение содержания цитрата в сыворотке крови по сравнению с таковым у интактных животных. Так, в опытной группе концентрация лимонной кислоты в сыворотке равна  $218 \pm 12$  мкмоль/л ( $n=10$ ), что превышает контрольный уровень ( $141 \pm 8,5$  мкмоль/л;  $n=10$ ) на 55 % ( $p < 0,001$ ).

При исследовании указанного параметра у больных тиреотоксикозом II—III степени также отмечается достоверное ( $p < 0,01$ ) повышение уровня лимонной кислоты по сравнению с таковыми у практически здоровых доноров. Так, если в группе больных тиреотоксикозом содержание цитрата составляло  $165 \pm 6,2$  мкмоль/л ( $n=19$ ), то в контрольной группе оно равнялось  $135 \pm 3,6$  мкмоль/л ( $n=34$ ). Более значительное повышение содержания лимонной кислоты в экспе-

риментальной группе, вероятно, связано с высокой дозой тиреоидина, необходимой для моделирования выраженной гиперфункции щитовидной железы.

Анализируя в самом общем виде полученные результаты, можно полагать, что наблюдаемая в сыворотке крови концентрация цитрата представляет собой разность между поступлением субстрата в сосудистое русло и выведением из него по некоторым метаболическим каналам, например через АТФ-цитратлиазную реакцию для биосинтеза ацил-КоА, жирных кислот. Необходимо также учитывать возможную потерю лимонной кислоты через почечный барьер.

Однако ряд косвенных данных свидетельствуют о том, что повышение уровня цитрата при тиреотоксикозе обусловлено его усиленным синтезом с последующим поступлением в кровь. Так, при экспериментальном гипертиреозе у белых крыс показана возможность повышения биосинтеза лимонной кислоты из липидного ацетил-КоА с параллельным увеличением активности цитратсинтазы [4]. При этом поступление ацетил-КоА в цикл Кребса за счет пируватдегидрогеназной реакции резко тормозится.

Стимуляция биосинтеза лимонной кислоты в условиях моделирования гиперфункции щитовидной железы и при клиническом тиреотоксикозе может быть также следствием снижения концентрации АТФ при проявлении разобщающего действия ТГ [5]. ТГ как разобщающие факторы могут, по-видимому, вызывать мобилизацию депо цитрата в костной ткани, где его концентрация в 100—200 раз превышает соответствующую величину в печени [3]. Такая возможность показана одним из нас [2] на примере действия 2,4-динитрофенола на минерализованные структуры.

Учитывая, что концентрация ТГ в крови часто не отражает выраженность тиреотоксикоза [6], определение содержания лимонной кислоты может оказаться дополнительным информативным диагностическим приемом для объективной оценки степени нарушения функции щитовидной железы, эффективности терапии и подготовленности больного к операции.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Асатиани В. С. Новые методы биохимической фотометрии. — М., 1964.
2. Власов Б. Я. // Сборник научных трудов Иркутского ИИИТО. — Иркутск, 1984. — С. 136—138.
3. Власов Б. Я., Хрущевская А. М. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 5. — С. 44—47.
4. Ещенко Н. Д., Вилкова В. А. // Регуляция энергетического обмена и физиологическое состояние организма. — М., 1978. — С. 176—178.
5. Ньюсхолм Э., Старт К. Регуляция метаболизма: Пер. с англ. — М., 1977.
6. Раскин М. А. Кислородный обмен больных диффузным токсическим зобом в связи с хирургическим лечением: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Саратов, 1988.
7. Рачев Р. Р. Митохондрии и тиреоидные гормоны. — Л., 1969.
8. Семинский И. Ж. Влияние гормонов щитовидной железы на структуру асептического воспаления: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 1988.
9. Шольц К. Ф., Николаева-Ромберг М. Н. // Биохимия. — 1971. — № 2. — С. 249—252.

Поступила 05.05.92

# CONTENT OF CITRIC ACID IN BLOOD SERUM UNDER CONDITIONS OF EXO- AND ENDOGENOUS THYROTOXICOSIS.

*B. Ya. Vlasov, B. B. Buinov*

Institute of Traumatology and Orthopedics, Siberian Branch of the Academy of Medical Sciences of the Russian Federation, Medical School, Irkutsk.

Content of citric acid was studied in blood serum of patients with thyroid hyperfunction and of rats with simulated hyperfunction of thyroid gland. Concentration of citrate was significantly increased in blood of these patients and of the experimental animals as compared with controls. Uncoupling effect of thyroid hormones, related to development of thyrotoxicosis, as well as possible liberation of citrate from osteal deposits, where its content is about 1 %, are discussed.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.155.392-092:612.118.223-083.337

*Л. П. Рыбакова, Ю. В. Тяготин, С. В. Гончарова, И. Н. Куликова, А. В. Трофимов*

## МОДИФИКАЦИЯ КОМПОНЕНТОВ КОМПЛЕМЕНТА ПОД ДЕЙСТВИЕМ КАТИОННЫХ БЕЛКОВ ЛЕЙКОЦИТОВ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ЛЕЙКОЗАМИ

НИИ гематологии и переливания крови, НИИ особо чистых биопрепаратов, Санкт-Петербург

Лейкозы, в том числе и хронические, достаточно часто сопровождаются инфекционно-воспалительными осложнениями бактериальной природы, являющимися непосредственной причиной смерти 60—70 % больных [1]. При миелопролиферативных заболеваниях (МПЗ) причиной данного явления считают снижение фагоцитарной активности нейтрофила [9, 16], хотя имеются сведения и об изменении некоторых показателей клеточного и гуморального иммунитета [3]. При лимфопролиферативных заболеваниях (ЛПЗ) значительные изменения претерпевает иммунный статус организма [2], сведения же о неспецифической защите весьма ограничены [7]. Допустимо полагать, что в отмеченных дефектах специфического и неспецифического иммунитета при МПЗ и ЛПЗ определенную роль могут играть и взаимоотношения отдельных гуморальных факторов этих двух систем. В частности, при активации лейкоцита, дегрануляции и выходе катионных белков (КБ) в межклеточное пространство последние, являясь, по современным представлениям, биологически активными веществами, отобранными эволюцией для осуществления молекулярных механизмов барьерных функций организма [6], по-видимому, способны взаимодействовать с компонентами системы комплемента, модифицируя их, и изменять цепь реакций неспецифической защиты, в том числе и в отношении инфекционных агентов.

Влияние компонентов системы комплемента на реакции фагоцитов в литературе обсуждается достаточно подробно [4], в то время как эффект воздействия секреторных продуктов нейтрофилов и лимфоцитов на состояние системы комплемента изучен мало.

В связи с тем что имеются сведения о сохранности антибактериальной активности КБ лейкоцитов больных хроническим миелолейкозом (ХМЛ) и хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) [8] при наличии у них частых инфекционно-воспалительных осложнений [1], возникает предположение о возможном дефекте в дальнедействующем звене неспецифической резистентности, в частности во взаимодействии КБ лейкоцитов при гемобластозах с компонентами системы комплемента сыворотки крови.

В работе проведено изучение влияния КБ лейкоцитов здоровых лиц и больных ХМЛ и ХЛЛ на изменение количественного содержания С1g, С3, С4, С5 компонентов комплемента и производных С3, который служит точкой конвергенции различных путей активации системы комплемента.

**Методика.** Лейкоциты человека выделяли из периферической крови 10 доноров, 11 больных ХМЛ и 9 больных В-ХЛЛ (в развернутой стадии заболевания с наличием лейкоцитоза до начала лечения) методом дифференциального центрифугирования [5]. КБ из белых клеток крови получали с помощью кислотной экстракции и последующей ионообменной хроматографии [8]. Активность нейтральных протеаз во фракции КБ определяли, используя в качестве субстрата 4 % азоказеин [12], и выражали в единицах активности трипсина.

В модельных экспериментах *in vitro* при изучении действия КБ на С3 компонент системы комплемента использовали С3, аффинно очищенный на колонке с сефарозой 6В, конъюгированной с моноклональными антителами (МАТ) G10, полученными в Санкт-Петербургском НИИ особо чистых биопрепаратов (НИИ ОЧБ). При определении компонентов комплемента сыворотки крови с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) использовали специфические МАТ, к С1g, С3, С4, С5 и фрагменту С3а, полученные в том же НИИ. ИФА проводили в 96-ячеечных платах, на которые первоначально наносили раствор МАТ к компонентам комплемента в объеме 50 мкл на ячейку. После часовой инкубации при комнатной температуре и постоянном перемешивании (на шейкере для плат) проводили трехкратное отмывание ИФА-буфером, содержащим твин-20 в конечной концентрации 0,15 %, в которые затем вносили исследуемый раствор в том же объеме, что и МАТ, раститрованный с шагом 2 на 8 ячеек. Инкубацию и отмывку повторяли, как описано ранее. В ячейки вносили раствор МАТ, конъюгированных с пероксидазой, к другому эпитопу того же компонента комплемента, инкубацию и отмывку ячеек повторяли, после чего вносили субстрат для определения пероксидазы — ортофенилендиамин — и перекись водорода. Величину пероксидазной активности оценивали по интенсивности окрашивания проб на ридере для 96-ячеечных плат при длине волны 490 нм.

При определении функционально активного С3 в связи с особенностями вторых МАТ, меченных пероксидазой (МАТ G10), которые специфически узнавали скрытую детерминанту С3, предварительно проводили одночасовую обработку исследуемого раствора забуференным до pH

7,4 метиламином (0,4 М) для гидролиза тиоэфирной связи. В результате этой обработки конформация молекулы изменялась таким образом, что эта детерминанта становилась доступной для связывания со вторыми МАТ, конъюгированными с пероксидазой.

Определение  $C3_{112O}$  (гемолитически неактивной формы С3) проводили без предварительной обработки исследуемого раствора метиламином, используя те же МАТ и методику, что и при определении функционально активной С3. Особенности МАТ G10 позволяли определить в исследуемом растворе как модифицированную гемолитически неактивную форму С3 с гидролизованной тиоэфирной связью, которая получила название  $C3_{112O}$  или С3b-подобной формы [11], так и функционально активную форму С3.

При определении фрагмента С3 вместо раствора первых МАТ в ячейки вносили раствор аффинно очищенного фрагмента С3а, который сорбировался на дне ячейки. В раститрованный исследуемый раствор добавляли МАТ-анти С3а в конечной концентрации 10 мкг/мл. Полученную смесь вносили в ячейки с сорбированным фрагментом С3а. МАТ-анти С3а, не связавшиеся с С3а в исследуемом растворе, реагировали с С3а, сорбированным на дне ячейки. После часовой инкубации и отмывки в ячейки вносили кроличьи иммуноглобулины к МАТ, конъюгированных с пероксидазой, повторяли инкубацию и отмывку и вносили субстрат для определения пероксидазы.

При определении С1g, С4, С5 описанную выше методику ИФА использовали в модификации, включающей специфические пары МАТ для определения разных компонентов комплемента.

Калибровочные кривые при определении содержания компонентов комплемента строили на смеси сывороток от нескольких доноров (стандарт), концентрацию отдельных компонентов в которой стандартизовали с помощью аффинно очищенных компонентов комплемента.

Полученные результаты обрабатывали на компьютере, используя стандартные программы для ИФА, разработанные в НИИ ОЧБ. Исследуемые в ИФА растворы получали следующим образом: а) при воздействии КБ на аффинно очищенный С3 смешивали равный объем С3 и КБ в фосфатно-солевом буфере рН 7,4, конечная концентрация С3 1 мкг/мл, концентрацию КБ варьировали. Образцы инкубировали 1 ч при комнатной температуре, разводили до конечной концентрации С3 10 мкг/мл и раститровывали для определения в ИФА с шагом 2; б) при воздействии КБ на компоненты комплемента С1g, С3, С4, С5 в сыворотке КБ и сыворотку смешивали в равных объемах и далее действовали, как описано в пункте а.

Результаты и обсуждение. При инкубации в системе *in vitro* КБ лейкоцитов с аффинно очищенным С3 обнаружено, что уже в сравнительно низких концентрациях (10 мкг/мл) КБ гранулоцитов доноров снижает уровень С3 примерно в 7 раз (рис. 1). Действие КБ белых клеток крови при ХМЛ в отношении С3 в 4—5 раз слабее по сравнению с таковым КБ доноров (см. рис. 1). Интересно отметить, что КБ из лимфоидных клеток больных В-ХЛЛ также обла-

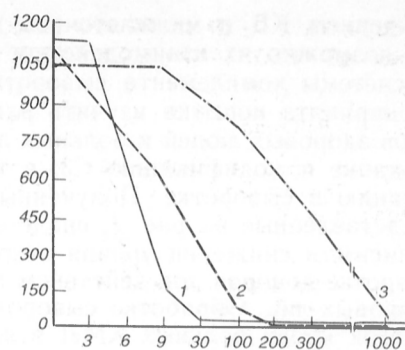


Рис. 1. Изменение содержания аффинно очищенного С3 компонента комплемента под влиянием КБ лейкоцитов доноров (1), больных ХМЛ (2) и ХЛЛ (3).

По оси абсцисс — концентрация КБ, мкг/мл; по оси ординат — концентрация С3, мкг/мл.

примерно на 2 порядка слабее по сравнению с таковым КБ гранулоцитов (см. рис. 1). Отмеченные различия, возможно, обусловлены клеточной специфичностью — наличием в составе КБ лимфоидных клеток больных ХЛЛ в основном ядерных гистонов и лизоцима, в то время как в составе КБ клеток миелоидного ряда значительная доля приходится на лизосомальные КБ. Не исключено, что определенный вклад в этот процесс вносит и лейкозная трансформация клеток. На основании изучения фракционного состава (электрофоретического профиля в ПАГ) КБ лейкоцитов донора и больных лейкозами было показано, что различие нормы и патологии касаются главным образом перераспределения белка в отдельных подфракциях и незначительного обеднения состава при патологических состояниях [8], что, возможно, отражается на функциональной активности этих протеинов в отношении С3. Основной вывод, который можно сделать на основании полученных данных, — это наличие различной степени воздействия КБ лейкоцитов доноров и больных лейкозами на уровень С3 компонента комплемента.

В целостном организме дегрануляция и распад лейкоцитов в очаге воспаления сопровождаются

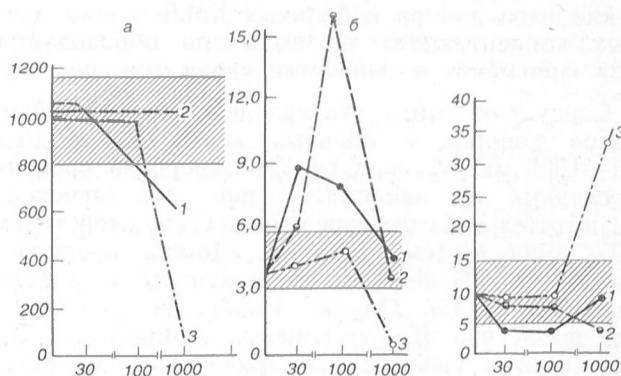


Рис. 2. Модификация С3 компонента комплемента в сыворотке крови доноров под влиянием КБ лейкоцитов.

По осям абсцисс — концентрации КБ, мкг/мл, по осям ординат: на а — концентрация С3, мкг/мл, на б — концентрация  $C3_{112O}$ -формы, мкг/мл, на в — концентрация С3а фрагмента, мкг/мл · 10<sup>-2</sup>. а — изменение концентрации С3 сыворотки крови под действием КБ лейкоцитов доноров (1), больных ХМЛ (2) и ХЛЛ (3); б — образование  $C3_{112O}$  или С3b-подобной формы под действием КБ лейкоцитов доноров (1), больных ХМЛ (2) и ХЛЛ (3); в — образование С3а фрагмента под действием КБ лейкоцитов доноров (1), больных ХМЛ (2) и ХЛЛ (3). Штриховка — концентрация компонентов системы комплемента и их производных в сыворотке в норме.



высвобождением КБ в межклеточное пространство, где возможно их взаимодействие с компонентами системы комплемента сыворотки крови. Была предпринята попытка изучить влияние КБ лейкоцитов здоровых людей и больных лейкозами на содержание и модификацию СЗ, а также его фрагментацию в сыворотке. Полученные результаты, представленные на рис. 2, свидетельствуют о дозозависимом снижении уровня открываемого СЗ в сыворотке доноров под действием КБ лейкоцитов здоровых лиц. Обработка сыворотки КБ из белых клеток крови больных ХМЛ в концентрации 30—1000 мкг/мл не изменяла общего количества открываемого в ИФА-тесте компонента СЗ, что, по-видимому, обусловлено особенностями использованного теста, позволяющего открывать молекулу СЗ с гидролизованной тиоэфирной связью (гемолитически неактивную форму). Вследствие этого полученный результат указывает лишь на то, что изменения в молекуле СЗ после обработки КБ из клеток больных ХМЛ если и происходят, то затрагивают только тиоэфирную связь. КБ больных ХЛЛ оказывали более выраженное действие на СЗ сыворотки крови при сравнительно высоких концентрациях — 1000 мкг/мл (см. рис. 2), которое было в значительной степени подобно таковому при действии на аффинно очищенный СЗ.

Добавление КБ гранулоцитов донора к сыворотке, в которой в незначительных количествах (1—5 мкг/мл) присутствует  $C3_{H_2O}$ -форма, приводит к повышению уровня данного компонента примерно в 2 раза при сравнительно низкой концентрации КБ (30 мкг/мл), увеличение концентрации КБ приводит к снижению уровня  $C3_{H_2O}$  до нормального в сыворотке (см. рис. 2).

Под действием КБ больных ХМЛ максимальное повышение уровня  $C3_{H_2O}$ , превышающее в 3—5 раз уровень данного компонента в норме, наблюдается при воздействии более высоких концентраций КБ (100 мкг/мл) по сравнению с таковыми доноров (см. рис. 2). КБ больных ХЛЛ в подобных концентрациях не вызывали изменения уровня  $C3_{H_2O}$ -формы (см. рис. 2), в то время как повышение уровня СЗa фрагмента увеличивалось в десятки раз (см. рис. 2). КБ из лейкоцитов донора и больных ХМЛ в исследуемых концентрациях не вызывали образования СЗa фрагмента в сыворотке крови (см. рис. 2).

Следует отметить, что при действии КБ лейкоцитов доноров и больных лейкозами в дозе 30—1000 мкг/мл на С1g, С4 сыворотки уровень последних не изменялся (рис. 3). Отмечено незначительное снижение уровня С5 под действием КБ доноров (см. рис. 3). Можно предположить, что КБ лейкоцитов неактивны в отношении С1g и С4. Однако нельзя не учитывать тот факт, что эти компоненты комплемента содержатся в сыворотке в значительно меньших количествах по сравнению с мажорным компонентом СЗ, в результате чего эффект взаимодействия гуморальных факторов — КБ — и минорных компонентов комплемента может быть недоступен для выявления в ИФА. При этом следует подчеркнуть, что особенностью использованных МАТ является их способность открывать в ИФА определенную конформацию СЗ и С5—СЗb-подобную конформацию (гемолитически

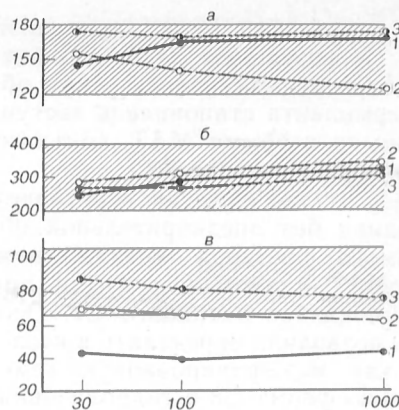


Рис. 3

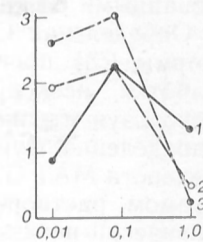


Рис. 4

Рис. 3. Влияние КБ лейкоцитов доноров и больных ХМЛ и ХЛЛ на содержание компонентов комплемента сыворотки крови.

По оси абсцисс — концентрация КБ, мкг/мл; по оси ординат — концентрация компонентов комплемента, мкг/мл. а — С1g; б — С4; в — С5. Остальные обозначения те же, что на рис. 2.

Рис. 4. Активность нейтральных протеаз, присутствующая в КБ лейкоцитов: доноров (1), больных ХМЛ (2) и ХЛЛ (3).

По оси абсцисс — концентрация КБ, мг/мл; по оси ординат — активность нейтральных протеаз, ед. активности трипсина.

неактивную форму) и гемолитически активную форму С5. Возможно, что определение изменений, вызываемых КБ именно в этих компонентах, указывает на общую особенность действия КБ, заключающуюся в их способности изменять (модифицировать или разрушать) функциональную активность белков плазмы.

В литературе имеются сведения, свидетельствующие о модификации различных компонентов комплемента, особенно СЗ и С5, нейтральными протеазами [15], которые, являясь гранулярными катионными протеинами, могут входить в состав КБ, выделенных методом ионообменной хроматографии и включающих подфракции с мол. м. 12—30 кД [8]. Согласно молекулярно-массовому распределению, составной частью данных подфракций могут являться эластаза и катепсин G. В связи с вышеизложенным целесообразно было определить, обладают ли КБ лейкоцитов доноров и больных лейкозами протеазной активностью. В результате проведенных исследований выявлена активность нейтральных протеаз, оптимумом действия которых для КБ лейкоцитов является диапазон концентраций 0,01—0,1 мг/мл (рис. 4). Наиболее выраженные отличия в уровне активности нейтральных протеаз были отмечены для сравнительно низких концентраций КБ — 0,01 мг/мл; наибольшая активность нейтральных протеаз характерна для КБ лейкоцитов больных ХЛЛ, несмотря на слабо выраженный гранулярный аппарат лимфоидных клеток, наименьшая — для КБ доноров (см. рис. 4). Возможно, именно с особенностями протеазной активности КБ связана модификация СЗ компонентов комплемента: КБ больных ХЛЛ при низких концентрациях расщепляют СЗ на физиологически неактивные фрагменты, при высоких — на фрагменты (видимо, СЗa и СЗb), сохраняющие физиологическую активность в такой степени, что СЗb способен образовывать жидкофазную СЗ-конвертазу (СЗbBb) с по-

следующей модификацией СЗ; КБ больных ХМЛ переводит СЗ в гемолитически активную  $C_{3H_2O}$  или СЗb-подобную форму (гидролизována тиоэфирная связь), избыток которой создает условия для возникновения ряда процессов, отсутствующих в здоровом организме.

Давая интерпретацию полученным результатам с точки зрения физиологии макроорганизма, необходимо отметить, что воздействие КБ лейкоцитов у больных лейкозами может приводить к усиленному катаболизму СЗ в организме в целом, снижению уровня гемолитически активной формы в очагах воспаления и появлению больших количеств СЗb-подобной формы и фрагмента СЗa. Повышенный уровень СЗb-подобной формы СЗ может нарушать функцию ретикулоэндотелиальной системы, вызывать СЗb-опосредованный лизис эритроцитов и приводить к изменению соотношения рецепторов на клеточной поверхности нейтрофилов и моноцитов вследствие блокады СЗb-рецепторов [13]. Фрагмент СЗa, являясь анафилотоксином, вызывает комплекс реакций, характерных для очагов воспаления. Все эти процессы вместе взятые могут обуславливать частые инфекционные осложнения при ХМЛ и ХЛЛ [3, 10, 14].

При действии КБ лейкоцитов доноров происходит снижение уровня СЗ (функционально активного), причем одновременное повышение количества СЗb-подобной формы менее выражено по сравнению с обработкой КБ от больных ХМЛ, а уровень фрагмента СЗa не выходит за пределы нормы. Это свидетельствует, по-видимому, о трансформирующем действии КБ лейкоцитов доноров на СЗ компонент с менее заметным образованием физиологически активных продуктов его деградации, что, возможно, выражается в ослаблении стимуляции ими процессов воспаления.

В условиях многофакторной системы макроорганизма взаимоотношения КБ лейкоцитов и компонентов комплемента, безусловно, носят более сложный характер, зависящий от содержания и активности ингибиторов протеаз и компонентов комплемента. Однако на основании представленных материалов можно сделать заключение, что при лейкозах образование избытка физиологически активных фрагментов СЗ компонента комплемента под действием КБ лейкозно-трансформированных клеток, по-видимому, способствует нарушению в системе гуморально-клеточной кооперации, что влечет за собой ослабление неспецифической резистентности организма. Степень продемонстрированных отклонений, вероятно, связана со стадией заболевания и выраженностью процессов малигнизации кроветворных клеток.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Агеев А. К. // Арх. пат.— 1983.— № 7.— С. 13—19.
2. Бергольц В. М., Кисляк П. С., Еремеев В. С. Иммунология и иммунотерапия лейкоза.— М., 1978.
3. Кравченко Н. И., Тищенко Л. М., Гусева С. А. и др. // Врач. дело.— 1985.— № 2.— С. 80—83.
4. Ложкина А. Н. // Успехи соврем. биол.— 1987.— Т. 104, № 1(4).— С. 36—55.
5. Луганова И. С., Егорова В. А., Сейц И. Ф. // Актуальные вопросы гематологии и переливания крови.— Л., 1963.— С. 215—220.

6. Пугаревский В. Е. Клиническая морфология нейтрофильных гранулоцитов.— Л., 1988.— С. 3—11.
7. Позднякова Л. В., Ермакова Г. Л., Рыбакова М. Е. и др. // Гематол. и трансфузиол.— 1990.— № 9.— С. 17—20.
8. Рыбакова Л. П., Ждан-Пушкина С. М. // Журн. микробиол.— 1990.— № 5.— С. 3—7.
9. Сарницкий И. П., Гусева С. А., Тищенко Л. М. // Врач. дело.— 1985.— № 11.— С. 92—94.
10. Gordon B. R., Coleman M., Kohen P. et al. // Blood.— 1981.— Vol. 58, N 5.— P. 904—910.
11. Hack C. E., Paardekooper I., Milligen F. // J. Immunol.— 1990.— Vol. 144, N 11.— P. 4249—4255.
12. Leung K. Y., Stevenson R. M. W. // J. gen. Microbiol.— 1988.— Vol. 134, N 1.— P. 151—160.
13. Lindgren S. // J. Lab. Clin. Med.— 1989.— Vol. 114, N 6.— P. 655—661.
14. Praz F., Karsentlj C., Binet J. L. et al. // Blood.— 1984.— Vol. 63, N 2.— P. 463—467.
15. Taylor J. C., Crawford J. P., Hugli T. E. // Biochemistry (Wash.) — 1977.— Vol. 16.— P. 3390—3396.
16. Wysocki H., Wierusz-Wysocka B., Sekierka H. et al. // Oncology.— 1988.— Vol. 45, N 2.— P. 79—83.

Поступила 07.09.92

#### MODIFICATION OF COMPLEMENT COMPONENTS BY MEANS OF CATION PROTEINS ISOLATED FROM LEUKOCYTES OF HEALTHY PERSONS AND PATIENTS WITH LEUKEMIA

L. P. Rybakova, Yu. V. Tyagotin, S. V. Goncharova, I. N. Kulikova, A. V. Trofimov

Institute of Hematology and Blood Transfusion,  
Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg.

Cation proteins (CP) were isolated from leukocytes by means of ion exchange chromatography. Enzyme immunoassay showed that these cation proteins modified  $C_3$  component of complement *in vitro*. CP obtained from healthy volunteers decreased the content of  $C_3$  purified by affinity chromatography and  $C_3$  of blood serum; however, content of  $C_{3H_2O}$  or  $C_{3b}$ -like form and  $C_{3a}$ -fragment were not altered. Effect of CP isolated from leukocytes of patients with chronic myeloleukemia and chronic lympholeukemia on  $C_3$  component was less distinct as compared with that of healthy volunteers. At the same time, content of  $C_{3b}$ -like form was increased the presence of CP from patients with myeloleukemia and of  $C_{3a}$ -fragment — in the presence of the proteins from patients with lympholeukemia. Excess of physiologically active  $C_3$  fragments, developed under conditions of these diseases, may contribute to a decrease in unspecific body resistance.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.831.9-008.6-008.931-07

О. Н. Терпиловская, Т. М. Третьяк, Е. А. Зеленуга,  
Р. Б. Пономарева

#### ПРОНИКНОВЕНИЕ ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ РНКазы ЧЕРЕЗ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКИЙ БАРЬЕР В ПАРЕНХИМУ МОЗГА

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,  
Пуцино, Институт высокомолекулярных соединений РАН,  
Санкт-Петербург

Вопрос о свойстве высокомолекулярных соединений проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) имеет важное значение, в частности, в связи с возможностью лечения ряда вирусных нейроинфекций. РНКазы уже давно используется в экспериментальной терапии опухолей [11], при заболеваниях вирусной этиологии [1, 3]. Механизм лечения вирусных нейроинфекций РНКазой неясен, поскольку ГЭБ ограничивает поступление вещества большой молекулярной

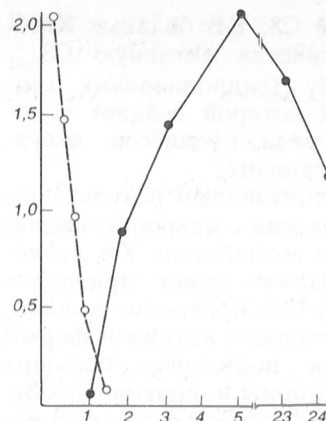
массы их кровотока в паренхиму мозга. Наиболее важная роль в этом процессе отводится межклеточным контактам эндотелиоцитов капилляров мозга [6]. Структура эндотелиоцитов не является жестко детерминированной и может изменяться в сторону увеличения проходимости веществ под влиянием повышенного артериального или осмотического давления, температуры и др. [8]. Следовательно, изучение возможности проникновения обычной или модифицированной РНКазы остается актуальной задачей. В ряде случаев значительно целесообразнее длительное пребывание препарата в организме, чему способствует экранирование РНКазы разнообразными модификаторами [2, 4, 10].

Задачей данной работы было выяснение возможности прохождения панкреатической РНКазы, модифицированной полимером альбумина, через ГЭБ.

**Методика.** В опытах использовали крыс Вистар массой 180—200 г. В хвостовую вену вводили исследуемый препарат в количестве 3,5 мг на крысу (1 мг препарата соответствует 33 ед. активности), растворенный в 0,1 М трис-НСI-буфере pH 7,0. Через 30 мин, 1, 1,5, 3,5, 5 и 24 ч крыс декапитировали, извлекали на холоду мозг, очищали от оболочек и сосудов, гомогенизировали в 0,1 М трис-НСI-буфере pH 7,0, центрифугировали 15 мин при 12 000 g. В надосадочной жидкости определяли активность РНКазы. Для определения активности РНКазы использовали реакционную смесь следующего состава: 0,4 мл 0,05 М трис-НСI pH 7,0, 0,5 мл РНК (дрожжевой) 8 мг/мл, 0,4 мл исследуемой жидкости. Инкубировали 15 мин при 37 °С. Продукты реакции осаждали 0,5 мл 0,75 % уранилацетата натрия в 25 %  $\text{HClO}_4$ , выдерживали при 4 °С 30 мин. Пробы центрифугировали и надосадочную жидкость спектрофотометрировали при 260 нм [9]. Для получения конъюгата сывороточного альбумина человека с панкреатической РНКазой 100 мг панкреатической РНКазы в 4 мл 0,05 М фосфатного буфера pH 7,4 и 100 мг сывороточного альбумина человека VII в 1 мл 0,05 М фосфатного буфера pH 7,4 перемешивали на магнитной мешалке 30 мин. К полученному конъюгату добавляли 0,5 мл 0,6 % глутарового альдегида, перемешивали в течение 30 мин при 4 °С. Через 30 мин добавляли  $\text{KCN}$  и еще раз перемешивали в течение 2 ч до получения гомогенной смеси. 5,4 мл смеси наносили на колонку  $\text{AsA 44}$  (2,6×60 см). Элюировали в 0,05 М фосфатном буфере с 1 М мочевиной pH 7,4 со скоростью 18 мл/ч. Эксперимент проводили с конъюгатом с мол. м. более 300 000 Д.

**Результаты и обсуждение.** Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о том, что экзогенная РНКазы в нативной и конъюгированной форме проникает в головной мозг и сыворотку крови, не теряя ферментативной активности. Нативная РНКазы оказывалась наиболее активной на 15—30-й минуте после введения, но уже к 90-й минуте ее активность снижалась до нулевых значений как в сыворотке крови, так и в ткани мозга (см. рисунок).

Наше предположение относительно того, что



Динамика распределения активности РНКазы в нативной и конъюгированной форме в ткани мозга.

По оси абсцисс — время, ч; по оси ординат — оптическая плотность. а — нативная форма РНКазы, б — конъюгированная.

ГЭБ окажется труднопроходимым для фермента с относительно большой мол. м. — 300 000 Д для конъюгата РНКазы с альбумином — оказалось несостоятельным. Изучение распределения РНКазы выявило, что максимальная ее активность обнаруживается через 3,5—5 ч после введения и остается достаточно высокой в течение 24 ч как в крови, так и в ткани мозга.

Механизм проникновения РНКазы в паренхиму мозга пока остается неизвестным. Вполне вероятным предположением может оказаться то, что фермент как биологически активное соединение приводит в конечном счете к увеличению пор между эндотелиоцитами [7]. В роstrum (переднюю часть мозга) не могут проникать простейшие белки, в то время как в каудальные структуры мозга эти же белки проникают [2].

Свойства барьера обуславливаются возрастом животного, поскольку лишь клетки капилляров мозга взрослого животного приобретают способность к синтезу специфических белков, таких, как  $\gamma$ -глутамилтранспептидаза или белок с мол. м. 74 кД, участвующих в формировании межклеточных контактов. В индукции синтеза специфического белка участвуют астроциты [5]. Отдельные авторы сообщают об усилении экстравазации капилляров мозга агонистами адреналина [7].

В своих опытах мы попытались проверить влияние L-ДОФА на интенсивность поступления в мозг конъюгата РНКазы, однако достоверных различий между контрольными и подопытными животными не получили. Следовательно, конъюгат РНКазы с альбумином при внутривенном введении достигает головного мозга, проникает в паренхиму мозга и достаточно длительное время проявляет там ферментативную активность. Это наблюдение позволяет делать вывод о перспективности препаратов такого рода для экспериментальной медицины.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Лапик А. С., Салганик Р. И. // Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. биол. — 1976. — № 5, Вып. 1. — С. 95—99.
2. Поп Р. Б., Кавуценко А. П., Калачева Т. П. и др. // Биохимия. — 1975. Т. 40, № 3. — С. 468—474.
3. Салганик Р. И., Мосонов А. И., Китаева Т. Г. // Вопр. вирусол. — 1964. — № 1. — С. 61—66.
4. Bartholmeyns Y., Moore S. // Science. — 1974. — Vol. 186, N 4162. — P. 444—445.
5. Bouchand C., Le Bert M., Duponey P. // Biol. Cell. — 1989. — Vol. 67. — P. 159—165.



6. Dorovini-Zis K., Bowman P. D., Betz A. L., Goldstein G. W. // Fed. Proc.— 1987.— Vol. 46, N 8.— P. 2521—2522.
7. Long Y. B., Holaday Y. W. // Science.— 1985.— Vol. 227, N 4694.— P. 1580—1583.
8. Mayhan W. G., Heistad D. D. // Amer. J. Physiol.— 1985.— Vol. 249.— P. 712—718.
9. Poznansky M. C. // Appl. Biochem. Biotechnol.— 1984.— Vol. 10.— P. 41—56.
10. Riquelme P., Intern J. // Protein Res.— 1975.— Vol. 7, N 5.— P. 379—387.
11. Yoon Sang-Chung, Gullino P. M. // J. biol. Chem.— 1973.— Vol. 248, N 13.— P. 4750—4755.

Поступила 03.06.92

# PENETRATION OF PANCREATIC RIBONUCLEASE THROUGH THE HEMATOENCEPHALIC BARRIER INTO BRAIN PARENCHYMA.

O. N. Terpilovskaya, T. M. Tretyak, E. A. Zelepuga, R. B. Ponomareva

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Academy of Sciences of the Russian Federation, Puschino Institute of High Molecular Substances, Academy of Sciences of the Russian Federation, St. Petersburg.

Penetration of exogenous RNAases, native and albumin polymer-bound, from circulation into the brain parenchyma was studied. Native pancreatic RNAase was found to extend through the hematoencephalic barrier; maximal enzymatic activity was detected within 15-30 min after administration into a rat tail vein. The enzyme activity was not observed within 90 min both in blood serum and brain tissue. The conjugate of RNAase and human albumin with molecular mass of 300,000 penetrated through the hematoencephalic barrier. Maximal enzymatic activity was estimated within 3-5 hrs after administration and maintained rather high within 24 hrs in blood and brain parenchyma. This suggests that the preparations of this kind are promising in experimental medicine.

Содержание (в % от общей суммы липидов и фосфолипидов) и состав липидов и фракции фосфолипидов в эритроцитах больных ХПН

Показатель	Контроль	ХПН	p
Фракция липидов:			
ОФ	60,6±2,1	57,14±0,38	>0,5
МГ	0,32±0,01	0,66±0,02	<0,001
ХС	27,8±1,01	20,3±0,39	<0,05
СЖК	3,76±0,11	10,5±0,5	<0,01
ДГ	0,68±0,02	1,91±0,13	<0,01
ТГ	3,72±0,08	5,32±0,24	<0,05
МЭЖК	1,11±0,07	1,44±0,02	<0,05
ЭХС	1,98±0,06	2,78±0,15	<0,05
Фракция фосфолипидов:			
ЛФХ	3,91±0,15	7,19±0,30	<0,05
ФС	10,15±0,51	6,70±0,32	<0,05
ЛФЭ	4,62±0,13	8,56±0,59	<0,05
СМ	19,6±0,80	26,80±0,25	<0,05
ФИ	2,69±0,68	2,12±0,04	<0,05
ФХ	27,8±0,9	20,95±0,72	<0,05
ЛКЛ	0,74±0,02	1,04±0,03	<0,05
ФЭ	20,3±0,80	15,11±0,45	<0,05
КЛ	6,70±0,11	5,2±0,1	<0,05
ХФК	1,97±0,03	3,51±0,13	<0,05
ФК	1,69±0,06	3,16±0,14	<0,05

ляторами многих механизмов функционирования мембран. На основе изучения состояния обмена фосфолипидных фракций в определенной степени можно приблизиться к пониманию клеточного механизма клиники уремии интоксикации при хронической почечной недостаточности (ХПН). В данной работе был исследован качественный и количественный состав фракций липидов в эритроцитах больных ХПН.

Методика. Обследован 221 больной ХПН терминальной стадии в возрасте 16—62 лет, из них мужчин было 144, женщин — 77. У 121 больного к ХПН привел хронический гломерулонефрит, у 49 — пиелонефрит, у 51 — мочекаменная болезнь или поликистоз почек. По тяжести состояния и степени уремии интоксикации больные были разделены на 3 группы: больные средней тяжести, тяжелые и крайне тяжелые. Контрольную группу составили 20 практически здоровых лиц в возрасте 25—45 лет. Венозную кровь, собранную в пробирки с цитратом натрия, центрифугировали, надосадочную жидкость и слой лейкоцитов отсасывали. Эритроциты трижды промывали физиологическим раствором и осаждали центрифугированием при 2000 об/мин. Липиды эритроцитов экстрагировали по [6]. Фракционирование индивидуальных липидов проводили методом горизонтальной хроматографии в модификации [5]. Были получены следующие фракции липидов: общие фосфолипиды (ОФ), моноглицериды (МГ), ХС, свободные жирные кислоты (СЖК), диглицериды (ДГ), ТГ, метиловые эфиры жирных кислот (МЭЖК), ЭХС, лизофосфатидилхолин (ЛФХ), фосфатидилсерин (ФС), лизофосфатидилэтаноллин (ЛФЭ), сфингомиелин (СМ), фосфатидилинозитол (ФИ), фосфатидилхолин (ФХ), лизокардиолин (ЛКЛ), фосфатидилэтаноллин (ФЭ), кардиолин (КЛ), лизофосфатидная кислота (ЛФК), фосфатидная кислота (ФК). Липидный фосфор определяли по [18], процентное содержание отдельных фракций липидов — методом денситометрического анализа.

Результаты и обсуждение. Как видно из полученных данных, у больных с ХПН в терминальной стадии отмечаются определенные нарушения как в содержании различных липидных фракций, так и в соотношении фосфолипидов

© Р. Н. АКАЛАЕВ, А. А. АБИДОВ, 1993

УДК 616.61-008.64-036.12-07:616.153.915

Р. Н. Акалаев, А. А. Абидов

## ФОСФОЛИПИДНЫЙ СОСТАВ ЭРИТРОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

Республиканский центр гемодиализа Ташкентского медицинского института

Нарушение липидного обмена является признаком, общим для различных заболеваний почек. Наиболее выраженные и клинически значимые отклонения показателей фракции липидов могут до некоторой степени определять течение и прогноз заболевания [10]. Развитие в почках самых разнообразных патологических процессов часто сопровождается повышением содержания плазменных триглицеридов (ТГ), повышением соотношения между свободным холестерином (ХС) и эфиром ХС (ЭХС), а также повышением уровня фосфолипидов плазмы крови [7].

У детей, страдающих нефротическим синдромом на почве гломерулонефрита, наблюдается увеличение суммарного содержания фосфолипидов плазмы, происходящего в основном за счет холин- и серинфосфатидов и их лизосоединений [9, 15].

Фосфолипиды участвуют в проницаемости мембран для воды и водорастворимых молекул [1]. Фосфолипиды являются эффективными регу-

(см. таблицу). Хотя содержание ОФ уменьшается недостоверно, содержание индивидуальных фосфолипидов изменяется существенно. У больных ХПН обнаружено достоверное снижение количественного содержания индивидуальных фосфолипидов мембран эритроцитов основных фракций — ФС, ФХ, КЛ. Уменьшение содержания данных фракций, по-видимому, связано с их частичным гидролизом фосфолипазой А<sub>2</sub>, на что указывает одновременное возрастание уровня их монацильных лизопродизольных (ЛФЭ, ЛКЛ и ЛФХ) и ЛФК. Накопление данных фракций является непосредственным результатом усиленного распада структурных фосфолипидов в условиях уремии интоксикации в органах и тканях, откуда гидрофильные метаболиты могут легко поступить в кровь.

Большое значение при заболеваниях почек, особенно при их функциональной недостаточности, придается гемолизу как одной из причин анемии. В этом отношении представляет интерес обнаруженный нами высокий уровень лизофосфолипидов, которые являются гемолитическими ядами. Поэтому не исключено, что одной из причин развития анемии у больных хронической уремией является именно возрастание содержания лизосоединений.

Считают, что в развитии гемолиза играют роль внеклеточные факторы. Было показано уменьшение длительности жизни эритроцитов доноров после переливания крови больным ХПН [13]. В то же время *in vitro* аутогемолиз эритроцитов больных снижался при инкубации в сыворотке здоровых людей, а аутогемолиз эритроцитов здоровых лиц повышался при инкубации в сыворотке больных хронической уремией [14].

Можно полагать, что в условиях ХПН в крови накапливаются токсические продукты, способствующие распаду клеточных структур, в том числе самих эритроцитов. Это подтверждается тем, что дефект в метаболизме эритроцитов сглаживается при переливании больным крови здоровых лиц и после лечения гемодиализом [8]. ФЭ, как установлено [11], в силу своей прокоагулянтной активности способствует увеличению агрегации тромбоцитов. Уменьшение содержания этого фосфолипида при ХПН может играть определенную роль в развитии осложнений в свертывающей системе больных. С этих позиций также можно трактовать уменьшение содержания нейтрального ФХ, отрицательно заряженного ФС и возрастание содержания СМ. Направленность выявленных нарушений в составе липидных фракций и фосфолипидов в эритроцитах тяжелых и крайне тяжелых больных ХПН терминальной стадии повышает уровень ЭХС. Образование ЭХС в мембранах представляет собой один из путей детоксикации или выведения из метаболического русла избытка СЖК [6]. С другой стороны, повышение уровня ЭХС существенно увеличивает проницаемость мембраны эритроцитов для одновалентных ионов [4] и тем самым может снижать осмотическую стойкость эритроцитов при ХПН. Следует отметить, что количество СЖК возрастает почти параллельно с накоплением азотистых оснований и среднемолекулярных пептидов в сыворотке крови больных. Данное обстоятельство указывает на то, что при ХПН развитие уре-

мической интоксикации у больных сопровождается существенной активацией процессов диацилирования липидов эритроцитов. Учитывая определенное сходство в строении и функции плазматических мембран с форменными элементами крови, можно предположить, что выявленная активация фосфолипазы А<sub>2</sub> с возрастанием содержания жирных кислот почти в 3 раза может являться отрицательным фактором в цепи развития почечной недостаточности путем ограничения энергетического обеспечения функции органа [12]. Следовательно, при развитии у больных ХПН метаболизм основных фосфолипидов мембран эритроцитов зависит от степени уремии интоксикации.

В настоящее время вопрос о роли КЛ в функционировании плазматических мембран остается открытым. Возможно, уменьшение доли КЛ на фоне суммарного уменьшения уровня основных фосфолипидов является отражением снижения стабильности мембран эритроцитов за счет электростатического и гидрофобного взаимодействия КЛ с белковыми компонентами [3]. Исходя из этого, можно предположить, что повышение уровня ФК является своего рода пусковым механизмом активации кальций-зависимых фосфолипаз [2], что и имело место в нашем исследовании, судя по возрастанию содержания СЖК и лизофосфолипидов. При значительном изменении липидного состава изменяется ригидность биомембран. Повышение микровязкости мембран в условиях патологии чаще всего обусловлено соотношениями ХС/ОФ, ФЭ/ФХ [17]. Об изменениях микровязкости можно судить по изменению данных соотношений. Нами проанализированы соотношения ХС/ОФ и ФЭ/ФХ у больных с тяжелой и терминальной стадией уремии. Как видно из таблицы, соотношения ХС/ОФ при ХПН явно уменьшается, что указывает на возрастание микровязкости за счет уменьшения содержания ХС.

Таким образом, у больных ХПН имеют место количественные и качественные изменения фосфолипидного состава мембран эритроцитов, которые происходят за счет внутренней перестройки, обусловленной изменениями внутриклеточных структур в условиях уремии. Выявленные изменения в зависимости от степени развития интоксикации могут служить серьезным показателем для оценки состояния больного и быть еще одним из звеньев в цепи развития уремии интоксикации.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Вельтищев Ю. Е., Юрьева Э. А., Воздвиженская Е. С. // Вопр. мед. химии. — 1987. — № 2. — С. 2—9.
2. Владимиров Ю. А. Биологические мембраны и мембрано-активные соединения. — Ташкент, 1985. — С. 19—22.
3. Грибанов Г. А. // Успехи соврем. биол. — 1981. — Т. 91, № 3(8). — С. 382—398.
4. Иванов А. С., Корват Р. Г., Мольнар А. А., Халилов Э. М. // Биофизика. — 1985. — Т. 30, № 2. — С. 269—272.
5. Карсаполов А. В. // Биохимия. — 1981. — Т. 44, № 4. — С. 691—698.
6. Кейтс М. Техника липидологии. — М., 1985.
7. Кожевников А. Д. // Семиотика и диагностика болезней почек / Под ред. С. И. Рябова. — Л., 1974. — С. 181—198.
8. Рябов С. И. Основы физиологии и патологии эритропоэза. — Л., 1971.

9. Смирнова Н. Н. Изменение содержания глицерофосфолипидов при диффузном гломерулонефрите у детей: Канд. дис. ... Л., 1974. — С. 230.
10. Тареев Е. М. Нефриты. — М., 1958.
11. Черницкий Е. А., Воробей А. В. Структура и функции эритроцитарных мембран. — Минск, 1981. — С. 100—104.
12. Ballon L. B., Cheung W. V. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1985. — Vol. 82, N 2. — P. 371—372.
13. Desfordes J. E., Dawson J. P. // Arch. intern. Med. — 1968. — Vol. 101. — P. 326—332.
14. Giovanetti S., Maggiore Q. // Lancet. — 1964. — Vol. 1. — P. 1000—1003.
15. Nye W. H. R., Waterhouse C. // J. clin. Invest. — 1961. — Vol. 40, N 7. — P. 1202—1207.
16. Ramsey R. B. // Biochem. Soc. Trans. — 1973. — Vol. 1, N 2. — P. 341—348.
17. Shinitsky M., Yuei J. // Chem. Phys. Lipids. — 1982. — Vol. 30. — P. 261—281.
18. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y., Vaseordin J. // J. Chromatogr. — 1975. — Vol. 114. — P. 129—141.

Поступила 03.02.92

#### PHOSPHOLIPID COMPOSITION OF ERYTHROCYTES IN PATIENTS WITH CHRONIC RENAL FAILURE

R. N. Akalaev, A. A. Abidov

Republican Centre, Medical School, Tashkent.

Qualitative and quantitative composition of lipid fractions was studied in erythrocytes of 221 patients (16-62 years old) in the terminal step of chronic renal failure. The following lipid fractions were studied: total phospholipids, monoglycerides, cholesterol, free fatty acids, diglycerides, triglycerides, methyl esters of fatty acids, cholesterol esters, lysophosphatidyl choline, phosphatidyl serine, lysophosphatidyl ethanolamine, sphingomyelin, phosphatidyl inositol, phosphatidyl choline, lysocardiophilin, phosphatidyl ethanolamine, cardiolipin, lysophosphatidic acid and phosphatidic acid. The alterations observed in the phospholipid composition of erythrocyte membranes appear to occur due to intracellular transformations related to specific metabolism in uremia. These alterations of phospholipid composition in erythrocyte membranes of patients with chronic renal failure, which were found to be intoxication-dependent, may be used in prognostic evaluation of patients' state under conditions of uremia development.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.36-002-022.7:578.891 [085.31:547.412.133

Л. Б. Заводник, П. И. Лукиенко, М. И. Бушма, А. Ю. Шока, В. М. Цыркунов

#### КОРРЕКЦИЯ ДИЭТИЛНИКОТИНАМИДОМ (КОРДИАМИНОМ) НАРУШЕНИЯ ФУНКЦИИ МОНООКСИГЕНАЗНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ТЕТРАХЛОРМЕТАНОВОМ И ВИРУСНОМ ГЕПАТИТАХ

Институт биохимии АН Беларуси, Гродно, Гродненский медицинский институт

Поражение печени хлорированными углеводородами, в частности тетрахлорметаном ( $\text{CCl}_4$ ), а также инфекционные гепатиты часто сопровождаются подавлением активности микросомальной цитохром Р-450-содержащей монооксигеназной системы (МОС) [3, 18], участвующей в метаболизме как эндогенных субстратов (стероидных гормонов, 25-кальциферола, желчных и жирных кислот), так и чужеродных веществ, в том числе и лекарственных [4, 14]. В генезе ингибирования монооксигеназы печени в этих условиях важная роль принадлежит активации свободнорадикальных процессов [1, 6], приводящих, в частности,

к деструкции мембран эндоплазматического ретикулума, с которым структурно и функционально связана эта ферментная система, а также к разрушению структуры самих ферментов [3].

Учитывая антирадикальные свойства диэтилникотинамида [2] и активирующее действие его на ферменты гидроксилирования у здоровых животных [5, 13], была предпринята попытка изучить влияние его на скорость восстановления нарушенной монооксигеназной функции печени при поражении печени  $\text{CCl}_4$  у животных и при вирусном гепатите у людей.

Методика. Исследования проведены на 100 беспородных крысах-самцах массой 170—200 г с поражением печени  $\text{CCl}_4$  и 27 больных вирусным гепатитом А средней степени тяжести (15 мужчин и 12 женщин в возрасте 18—33 года).

$\text{CCl}_4$  вводили крысам однократно в желудок в дозе 2,5 мл/кг (50 % раствор на вазелиновом масле). Через 12 ч после обработки  $\text{CCl}_4$  животным вводили под кожу 40 мг/кг диэтилникотинамида 2 раза в день в течение 4 дней. Через 24 ч после последней инъекции вещества животных декапитировали, печень перфузировали охлажденным 1,15 % раствором KCl и выделяли микросомальную фракцию методом дифференциального центрифугирования [11].

Активность функционирования МОС печени оценивали по содержанию в микросомах печени крыс цитохромов Р-450,  $b_5$  [20], скорости деалкилирования амидопирин [19] и гидроксилирования анилина [17], а также в условиях целого организма по антипириновому тесту [15], т. е. скорости гидроксилирования антипирина — АП (субстрата МОС), регистрируемой по интенсивности убыли его из крови [9]. АП вводили внутривенно в дозе 50 мг/кг. Забор крови и определение содержания АП в плазме производили через 0,5, 3, 6, 30, 90, 180 и 360 мин после введения тест-субстрата. На основании полученных данных рассчитывали скорость выведения, общий клиренс, площадь под фармакокинетической кривой и время полувыведения АП по однокамерной модели [10].

При обследовании больных вирусным гепатитом в клинических условиях одна группа пациентов получала традиционное лечение: диета № 5 и карсил по 2 таблетки 3 раза в день, другая — дополнительно к этому 7—10 мг/кг в сутки диэтилникотинамида (в виде кордиамина — 30 капель 3 раза в день). До и после 8 дней лечения у больных определяли активность гидроксилирующей функции печени по кинетике АП [9]. Тест-субстрат вводили внутрь в дозе 10 мг/кг в облатках и определяли его концентрацию через 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 36 и 48 ч. Расчет параметров фармакокинетики производили по однокамерной модели со всасыванием [10]. Контролем служила группа здоровых добровольцев (20 человек) примерно того же возраста и массы тела. О степени целостности плазматических мембран гепатоцитов судили по возрастанию в крови содержания аланинаминотрансферазы (АЛТ) [12], о структурных изменениях в липидном компоненте мембран эндоплазматического ретикулума — по величине гидрофобного взаимодействия микросом с 1-анилинонафталин-8-сульфонатом (АНС<sup>-</sup>), оп-



Таблица 1

Нарушение активности ферментов МОС, гидрофобных свойств микросом, проницаемости плазматических мембран клеток печени крыс и фармакокинетических параметров АП на 4-й день после отравления  $\text{CCl}_4$  (2,5 мг/кг внутривенно) и защитное действие диэтилнитроминамида (40 мг/кг подкожно 2 раза в день в течение 4 дней)

Показатель	Контроль	$\text{CCl}_4$	$\text{CCl}_4$ + диэтилнитроминамид
Содержание цитохрома Р-450, нмоль/мг	$0,42 \pm 0,04$	$0,27 \pm 0,04$ (67) *	$0,48 \pm 0,04$ (114) **
Содержание цитохрома $b_5$ , нмоль/мг	$0,40 \pm 0,03$	$0,27 \pm 0,03$ (69) *	$0,33 \pm 0,03$ (84)
р-Гидроксилирование анилина, нмоль АФ/мин/мг	$0,59 \pm 0,03$	$0,34 \pm 0,03$ (58) *	$0,40 \pm 0,03$ (67) *
N-деметилирование амидопирин, нмоль ФА/мин/мг	$6,68 \pm 0,76$	$4,10 \pm 0,36$ (60) *	$7,11 \pm 0,48$ (103) **
$I_{\text{АНС}}$ , отн. ед. на 0,25 мг белка	$10,66 \pm 0,20$	$8,49 \pm 0,82$ (79) *	$10,63 \pm 0,53$ (99) **
Скорость выведения АП, мг/ч	$0,54 \pm 0,04$	$0,39 \pm 0,03$ (79) *	$0,70 \pm 0,14$ (139) **
Общий клиренс АП, л/ч	$0,52 \pm 0,22$	$0,44 \pm 0,04$ (84) *	$0,78 \pm 0,13$ (151) **
Площадь под фармакокинетической кривой АП, г/мин·л <sup>-1</sup>	$5,86 \pm 0,33$	$6,91 \pm 0,59$ (118)	$4,18 \pm 0,70$ (70) **
Период полувыведения АП, ч	$1,62 \pm 0,11$	$1,68 \pm 0,11$ (104)	$1,14 \pm 0,22$ (67) **
Активность АЛТ, ммоль/ч·л	$1,45 \pm 0,11$	$2,64 \pm 0,29$ (161) *	$1,95 \pm 0,37$ (127) **

Примечание. АП (50 мг/кг) вводили внутривенно; АФ — парааминофенол, ФА — формальдегид. Здесь и в табл. 2 одна звездочка —  $p < 0,05$  по отношению к контролю (интактные животные), две —  $p < 0,05$  по отношению к  $\text{CCl}_4$ ; в скобках — изменения показателей (в %) по отношению к контролю.

ределяемого по параметрам флюоресценции зонда в присутствии мембран [7].

Результаты и обсуждение. Через 4 дня после введения крысам  $\text{CCl}_4$  в микросомах печени наблюдали снижение в сравнении с контролем содержания цитохромов Р-450,  $b_5$ , скорости р-гидроксилирования анилина и N-деметилирования амидопирин соответственно на 33, 31, 42 и 40 %. Наряду с этим обнаружено изменение структуры мембран, что приводило к снижению интенсивности флюоресценции зонда АНС<sup>-</sup>, связанного с мембранами, на 21 % и изменению числа центров связывания и константы ассоциации зонда с мембраной (табл. 1).

У животных, которым после обработки  $\text{CCl}_4$  вводили диэтилнитроминамид, содержание цитохромов Р-450 и  $b_5$  и активность амидопирин-N-деметилазы к этому сроку достигали нормального уровня. При этом параметры флюоресценции АНС<sup>-</sup> приближались к таковым контрольных животных.

Способность диэтилнитроминамида ускорять восстановление сниженной функции МОС при поражении печени  $\text{CCl}_4$  проявилась и в условиях целого организма. Если у нелеченых крыс на 4-е сутки после введения  $\text{CCl}_4$  скорость выведения АП

и его клиренс были снижены в сравнении с контролем на 21 и 16 %, то у животных, которым вводили диэтилнитроминамид, скорость выведения АП была выше в сравнении с нелечеными на 79 %, величина общего клиренса — на 77 %, а период полувыведения — ниже на 36 %. При этом активность АЛТ в сыворотке крови у нелеченых превышала контрольную на 61 %, а после лечения — лишь на 27 % ( $p < 0,05$ ; см. табл. 1).

У больных вирусным гепатитом А, в крови которых в сравнении со здоровыми активность АЛТ повышалась в 10 раз, клиренс АП был ниже на 39 %, период полувыведения удлинен на 22 % (табл. 2). После 8-дневного лечения карсилом уровень АЛТ снижался с 5,6 ммоль/ч·л (исходный) до 3,9 ммоль/ч·л (на 30 %), однако скорость элиминации АП имела лишь тенденцию к ускорению. При сочетанном применении карсила и диэтилнитроминамида наряду с более выраженным снижением активности АЛТ (на 52 %) наблюдали значительное ускорение восстановления гидроксилирующей функции печени. Скорость выведения АП при этом увеличивалась на 57 %, период полувыведения уменьшался на 44 %, а площадь под фармакокинетической кривой — на 41 %.

Представленные данные свидетельствуют о спо-

Таблица 2

Фармакокинетические параметры АП (слюна) и активность АЛТ (сыворотка) у больных вирусным гепатитом А средней тяжести до и после лечения карсилом (1 таблетка 3 раза в день) и сочетанием его с диэтилнитроминамидом (7—10 мг/кг в сутки, в виде кордиамина — 30 капель 3 раза в день) в течение 8 дней

Показатель	Здоровые	Гепатит А			
		до лечения	после лечения карсилом	до лечения	после лечения карсилом + диэтилнитроминамидом
Скорость выведения АП, мг/ч	$59,60 \pm 2,72$	$48,89 \pm 5,46$	$65,68 \pm 9,17$	$45,51 \pm 5,88$	$78,15 \pm 6,78$
Общий клиренс АП, л/ч	$9,22 \pm 1,66$	$5,68 \pm 0,77$ (61) *	$7,39 \pm 1,20$ (80)	$5,82 \pm 0,92$ (63) *	$7,37 \pm 0,85$ (80)
Площадь под фармакокинетической кривой АП, мг/ч·л <sup>-1</sup>	$142,6 \pm 6,0$	$214,2 \pm 30,7$ (150) *	$178,3 \pm 37,4$ (125)	$219,4 \pm 30,9$ (150) *	$129,4 \pm 18,0$ (91) **
Период полувыведения АП, ч	$12,93 \pm 0,68$	$15,79 \pm 0,84$ (122) *	$13,85 \pm 1,13$ (107)	$17,48 \pm 1,78$ (135) *	$9,82 \pm 0,96$ (76) **
Активность АЛТ, ммоль/ч·л	$0,55 \pm 0,10$	$5,61 \pm 0,07$ (1020) *	$3,88 \pm 0,37$ (705) **	$5,05 \pm 0,21$ (918) *	$2,39 \pm 0,33$ (439) **

Примечание. АП вводили внутрь по 10 мг/кг.

способности диэтилникотинамида (кордиамина) в дозах, эквивалентных терапевтическим, ускорять восстановление сниженной при поражении печени  $\text{CCl}_4$  и вирусном гепатите ксенобиотико-метаболической функции МОС печени при одновременном ускорении восстановления нарушения проницаемости клеточных оболочек и гидрофобных свойств мембран эндоплазматического ретикула гепатоцитов. Это дает основание рекомендовать его для включения в комплексную терапию гепатитов в качестве средства, активирующего гидроксигирующую функцию печени.

Исходя из РР-витаминных свойств диэтилникотинамида [16], предполагающих участие его в синтезе НАД, нуклеиновых кислот и в липидном обмене [8], можно предположить, что в механизме его активирующего действия на функцию монооксигеназной системы имеют место увеличение генерации косубстратов этой системы — НАДФН и НАДН (доноров электронов), а также оптимизация липидного микроокружения ферментов МОС в мембранах эндоплазматического ретикула, отчасти обусловленной его антиоксидантными свойствами.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Абакумов Г. З., Новицкий Г. К., Легонькова Л. Ф. // *Вопр. мед. химии.* — 1988. — № 6. — С. 30—33.
2. Абакумов Г. З., Легонькова Л. Ф., Заводник Л. Б. и др. // *Вестн АН БССР.* — 1990. — № 5. — С. 107—109.
3. Арчаков А. И. Микросомальное окисление. — М., 1975.
4. Арчаков А. И. Оксигеназы биологических мембран. — М., 1983.
5. Бушма М. И., Заводник Л. Б., Лукиенко П. И. // *Фармакол. и токсикол.* — 1989. — № 4. — С. 56—59.
6. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М., 1972.
7. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. — М., 1980. — С. 74—92.
8. Ефремов В. В. // *Витамины* / Под ред. М. И. Смирнова. — М., 1974. — С. 336—371.
9. Заводник Л. Б., Лукиенко П. И., Бушма М. И. // *Фармакол. и токсикол.* — 1989. — № 3. — С. 95—101.
10. Каркищенко Н. Н., Хоронько В. В. Основы клинической фармакологии. Фармакокинетики. — Ростов-н/Д., 1981.
11. Карузина И. И., Арчаков А. И. // *Современные методы в биохимии.* — М., 1977. — С. 49—63.
12. Колб В. Г., Камышников В. С. Справочник по клинической химии. — Минск, 1980.
13. Лукиенко П. И., Бушма М. И., Никитин В. С. // *Фармакол. и токсикол.* — 1973. — № 6. — С. 74—78.
14. Сергеев П. В. Краткий курс молекулярной фармакологии. — М., 1975.
15. Brodie B. B., Axelrod J., Soberman R., Levy B. B. // *J. biol. Chem.* — 1949. — Vol. 179, N 1. — P. 25—30.
16. Carter E. J. A., Carpenter K. J., Friedman M. // *Nutr. Rep. int.* — 1982. — Vol. 25, N 2. — P. 389—397.
17. Kato R., Gillette R. // *J. Pharmacol. exp. Ther.* — 1965. — Vol. 150. — P. 279—284.
18. Krausz J., Zylber-Katz E., Levy M. // *Int. J. clin. Pharmacol.* — 1980. — Vol. 18. — P. 253—257.
19. Nash T. // *Biochem. J.* — 1953. — Vol. 55. — P. 416—421.
20. Omura T., Sato T., Cooper D. Y. et al. // *Fed. Proc.* — 1965. — Vol. 24. — P. 1181—1187.

Поступила 18.05.92

#### IMPAIRMENTS OF THE MONOOXYGENASE SYSTEM IN $\text{CCl}_4$ - AND VIRUS-INDUCED HEPATITIDES; CORRECTION BY CORDIAMINE.

L. B. Zavadnik, P. I. Lukienko, M. I. Bushma, A. Yu. Shoka, V. M. Tsyurkunov

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

Content of cytochromes P-450 and  $b_5$  and the rate of oxidative dealkylation in liver microsomes as well as the antipyrine pharmacokinetics were normalized in rats with acute

$\text{CCl}_4$ -induced hepatitis after treatment with cordiamine (diethyl nicotinamide) at a dose of 40 mg, subcutaneously, 2 times daily within 4 days. Cordiamine (30 drops 3 times daily within 8 days) contributed to normalization of the hydroxylating reaction in liver tissue of patients with viral hepatitis A, estimated by the "antipyrine" test. The drug exhibited stabilizing effect on hydrophobic interactions in microsomal membranes; diethyl nicotinamide possessed antiradical and vitamin properties.

© Н. Б. Горбунова, В. Н. Калюнов, 1993

УДК 616.154:577.175.859]-092.9-07

Н. Б. Горбунова, В. Н. Калюнов

#### ИЗМЕРЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ МЫШЕЙ

Институт физиологии АН Беларуси, Минск

Классический нейротрофный агент фактор роста нервов (ФРН), традиционными мишенями которого считались периферические и некоторые центральные нейроны [6, 18, 26], оказался способным влиять через специализированные рецепторы на широкий круг клеток ненейронального типа [22, 27].

Изучение механизмов действия и динамических изменений содержания нейроростового белка в организме невозможно без определения его концентрации, прежде всего в крови. К сожалению, ничего не известно о роли сыворотки в транспорте ФРН, возможных его трансформациях в это время и сывороточных формах.

В настоящее время детектирование уровней ФРН осуществляется тремя группами методов. Одни из них основываются на стимуляции фактором нейритного выроста из дорсально-корешковых ганглиев цыплячьих эмбрионов (биотестирование) [17], другие — на взаимодействии с различными рецепторсодержащими структурами (радиорецепторные методы) [9], третьи — на иммунологических принципах (радиоиммунный, иммунорадиометрический, иммуноферментный анализы) [10, 12, 13, 15, 25, 27]. Биотестирование имеет ряд ограничений. Оно полуколичественно и не обладает высокой специфичностью. Радиорецепторным методом также присущи характерные недостатки. В основном они лимитируются низкой воспроизводимостью результатов. Поэтому наиболее перспективны иммунологические способы оценки, обладающие высокой чувствительностью и селективностью.

К настоящему моменту на основании общих принципов радиоиммунного (РИА) и иммунорадиометрического (ИРМА) анализа нами разработано несколько модификаций [4, 5, 7] для количественного анализа как комплексной (7S — ФРН), так и субъединичных форм нейроростового белка [6]. В данной статье представлены результаты апробации предложенных модификаций, а также изучения с помощью ИРМА биологически активной  $\beta$ -субъединицы (ИРМА $_{\beta}$ -ФРН) форм фактора, присутствующих в сыворотке мышей.

Методика. Эксперименты выполнены на 32 половозрелых самцах белых беспородных мышей массой 22—24 г. 7S — ФРН получали по методу,

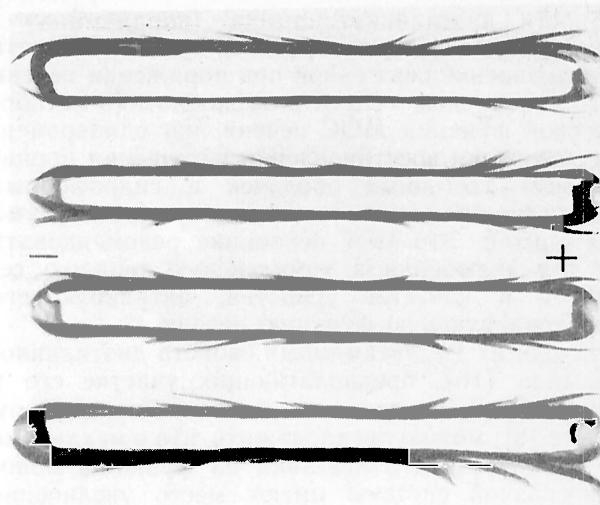
разработанному в лаборатории [1], а также путем рекомбинации субъединиц (р—7S—ФРН) [3], которые выделяли из комплексной формы по общепринятой методике [24]. Биологическую активность препаратов ФРН оценивали биотестированием [17], чистоту — изоэлектрическим фокусированием в полиакриламидном геле [1].

Сбор крови из подключичной впадины выполняли в условиях общего эфирного наркоза. С целью анализа форм ФРН в крови, кроме обычного способа получения, сыворотку дополнительно диализовали против 0,05М  $\text{CH}_3\text{COOH}$  pH 4,0. В другом варианте pH крови с момента сбора стабилизировался 0,5М буферным раствором бис-трис-HCl в пределах pH 7,0—7,5. Образцы сыворотки последовательно фракционировали методом ультрафильтрации на фильтрах XM-100 («Nuclepore», США) и PM-10 («Amicon», Голландия), а также (сыворотку, полученную обычным способом) на колонке (2,6×70 см) с сефадексом G-200 («Pharmacia», Швеция), которую калибровали с помощью набора MC-II («Serva», Германия). В полученных фракциях тестировалось содержание ФРН [7]. Иммуноэлектрофорез мышинной сыворотки проводили по инструкции фирмы (LKB, Швеция). Содержание 7S-,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ —ФРН в сыворотке крови мышей определяли с помощью разработанных нами методов [4, 5, 7].

Результаты и обсуждение. Разрабатывая оптимальный способ количественного определения ФРН в крови животных и человека, необходимо учитывать, что он представляет собой комплексный белок с мол. м. 140 кД, состоящий из двух  $\alpha$ -,  $\gamma$ - и одной димерной  $\beta$ -субъединицы, несущей биологическую активность [6]. Практически все работы [10, 12, 15, 25, 27] по детектированию нейростового протеина выполнены на основании предположения, что  $\beta$ -форма является единственной в крови, хотя это не имеет достаточного экспериментального обоснования. В ряде исследований постулирована [1, 9] и в модельных системах с использованием очищенных препаратов субъединиц показана [23] возможность существования промежуточных комплексов  $\alpha\gamma\beta$ ,  $\alpha\gamma_2\beta$ ,  $\gamma_2\beta$ ,  $\alpha_2\beta$ . Отсюда, вероятно, справедливо предположить, что в сыворотке мышей в нормальных условиях существует определенное динамическое равновесие между субъединичными, комплексной и промежуточными формами ФРН. Они, очевидно, представляют собой продукты ассоциации и диссоциации комплексного 7S—ФРН. Действительно, результаты проведенного нами иммуноэлектрофореза мышинной сыворотки, подтверждая это предположение, свидетельствуют о множественности форм сывороточного ФРН (см. рисунок), что согласуется со сведениями о сосредоточении значительной части сывороточного ФРН в высокомолекулярной области [20].

В табл. 1 представлены результаты детектирования уровней ФРН в сыворотке мышей разработанными нами РИА и ИРМА [4, 5, 7].

Использование нами в конкурентном РИА дополнительно очищенного от примесей  $\gamma$ -глобулиновой сывороточной фракции препарата комплексной формы фактора (р—7S—ФРН) в качестве стандарта и меченого лиганда [3, 4] позволило устранить некоторые погрешности его детектирования в биологическом материале. По некоторым



Иммунофорезграмма мышинной сыворотки, полученная с помощью Ас 7S — ФРН.

В лунки вносили сыворотку самцов мышей и проводили электрофорез в охлажденном геле агарозы при напряженности поля 10 В/см. Затем следовала иммунодиффузия фракций мышинной сыворотки с компонентами Ас 7S — ФРН.

сведениям [25], конкурентный РИА дает чрезвычайно высокие уровни ФРН в сывороточных пробах, что не подтверждалось в системе биотестирования и двухсайтового ИРМА. Позднее [26] было рекомендовано избегать применения методов, основанных на принципе конкуренции, для количественной оценки ФРН.

На наш взгляд, ИРМА имеет ряд преимуществ по сравнению с конкурентным. Во-первых, ФРН не йодировался, стало быть, нет опасности его повреждения, молекулы иммуноглобулинов крупнее и относительно стабильнее. Во-вторых, увеличение специфичности происходит из-за того, что антитела реагируют по двум антигенным участкам, повышая избирательность иммунологического определения, снижая, таким образом, возможность перекрестного реагирования с другими белками, поскольку существование иммуногенных примесей  $\gamma$ -глобулина и изоренина в препаратах ФРН продемонстрировано в ряде работ [8, 11].

Существующие относительно содержания ФРН в крови данные далеко не однозначны: в плазме самцов мышей оно составляет 20—30 нг/мл [12], в сыворотке — от 2 нг/мл [15] до 2 мкг/мл [13]. Другие исследователи вообще считают, что его концентрация здесь находится за пределами определения чувствительности современных методов [10]. Разногласия объясняются, очевидно, не только различием используемых методик, но и присутствием сывороточных компонентов, в частности  $\alpha_2$ -макроглобулина, связывающего  $\beta$ —ФРН [25]. Показано, что с ФРН могут взаимодей-

Таблица 1  
Содержание ФРН (в нг/мл) в сыворотке крови самцов мышей

Метод детектирования	n	$\bar{x} \pm S_x$
РИА <sub>7S</sub> — ФРН	6	120,0 ± 34,68
ИРМА <sub><math>\gamma</math></sub> — ФРН	6	5,75 ± 0,74
ИРМА <sub><math>\alpha</math></sub> — ФРН	8	4,96 ± 0,35
ИРМА <sub><math>\beta</math></sub> — ФРН	12	3,24 ± 0,22



Таблица 2

Содержание  $\beta$ -ФРН (в нг/мл) во фракциях, полученных после ультрафильтрации 3 мл сыворотки самцов мышей

рН сыворотки	Фракция	
	фильтр ХМ-100	фильтр РМ-100
8,3—8,6	217,01	163,62
7,0—7,5	267,01	173,16
4,0	111,88	973,51

ствовать компоненты кроличьей, крысиной, мышинной и человеческой сывороток [2, 14, 21, 25]. Сывороточные компоненты связывают  $^{125}\text{I}$ -ФРН с довольно высокой аффинностью ( $K_d = 10^{-7}$  М) и высокой емкостью (0,5 мкг/мл крысиной сыворотки [25]). Вероятно, не только  $\alpha_2$ -макроглобулин может реагировать с ФРН.

Следует отметить, что в разработанной нами двухсайтовой иммунорадиометрической системе [5] детектирование молекулы ФРН возможно было только по  $\alpha$ - и  $\gamma$ -составляющим формам (см. табл. 1). При использовании меченых антител к  $\beta$ -ФРН в качестве одной из составляющих «сэндвича» выявлено, что скорость счета в образцах сыворотки самцов мышей была ниже величины нулевого значения стандартной кривой. Вероятно, в данном случае возникали стерические препятствия для взаимодействия находящегося в сывороточных пробах  $\beta$ -ФРН с антисывороткой к 7S-ФРН (Ac 7S-ФРН), иммобилизованной на микрокристаллической целлюлозе.

Разработанными нами ИРМА $_{\beta\text{-ФРН}}$  [7] установлено, что в сыворотке самцов мышей содержится  $3,24 \pm 0,22$  нг/мл  $\beta$ -ФРН (см. табл. 1). Учитывая существование в сыворотке наряду с гетерогенными субъединицами, входящими в состав мультимерного белка, промежуточных ассоциатов [19, 23], проводили проверку возможности детектирования  $\beta$ -субъединицы, включенной в состав комплексной формы. Установлено, что практически вся  $\beta$ -форма открывается в составе 7S-ФРН. Таким образом, предлагаемая нами модификация ИРМА $_{\beta\text{-ФРН}}$  позволяет детектировать  $\beta$ -формы, находящиеся в сыворотке мышей.

Известно, что рН свежеприготовленной сыворотки находится в пределах 7,4—8,0, а после хранения при  $-20^\circ\text{C}$  и последующего размораживания происходит защелачивание (рН 8,3—8,6), что связано с нарушением функционирования карбонатной буферной системы в сывороточных пробах. В этих условиях очевидна диссоциация 7S-комплекса, стабильного в диапазоне рН 5,0—8,0, с образованием субъединиц и промежуточных форм. Из табл. 2 видно, что биологически активная  $\beta$ -субъединица после ультрафильтрации сосредоточивалась в основном в высокомолекулярной фракции как в случае сыворотки, полученной с контролируемым нейтральным, так и без стабилизации рН.

В результате хроматографирования сыворотки самцов мышей, полученной без стабилизации рН, обнаружено значительное количество  $\beta$ -ФРН в области свободного объема колонки, что свидетельствует о его ассоциации с высокомолекулярными компонентами сыворотки (табл. 3). Во второй фракции выявляется  $\beta$ -ФРН, находящийся, очевидно, в комплексном состоянии, а в третьей — свободная  $\beta$ -субъединица. Как следует

Таблица 3

Содержание  $\beta$ -ФРН во фракциях хроматографированной на G-200 3 мл сыворотки самцов мышей (в нг/мл)

рН сыворотки	Мол. м. фракции		
	выше 360 кД	360—67 кД	ниже 67 кД
8,3—8,6	323,12	80,21	327,95
4,0	—	103,75	550,84

из табл. 2 и 3, фракционирование методами ультрафильтрации и гель-хроматографии закисленных *in vitro* сывороток самцов приводило к перераспределению и высвобождению  $\beta$ -ФРН в низкомолекулярную область, хотя некоторая ее часть оставалась ассоциированной.

На первый взгляд, детектирование больших количеств  $\beta$ -форм в сывороточных фракциях кажется неожиданным, но на самом деле фракционирование, очевидно, ликвидировало помехи, привносимые присутствием в цельной сыворотке белков, связывающих фактор. Подобное явление зафиксировано при количественной оценке  $\beta$ -ФРН в синаптосомальных экстрактах [16].

Фракционирование сывороток самцов мышей без стабилизации рН и с измененным значением рН явилось адекватным методическим приемом, углубившим представления о сывороточных формах нейроростового протеина.

Таким образом, полученные нами результаты позволяют заключить, что выявленные различия в количественной оценке концентраций ФРН в крови мышей обусловлены использованием различных методов определения, взаимодействием  $\beta$ -ФРН с высокомолекулярными сывороточными белками, существованием в сыворотке мышей целой гаммы форм нейроростового белка от комплексной до субъединичных, включая промежуточные ассоциаты.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бурауски У. А., Гарбунова Н. Б., Калтуноу У. У. и др. // Вестн АН БССР. Сер. биол. наук. — 1984. — № 4. — С. 79—84.
2. Гарбунова Н. Б., Бурауски У. А. // Там же. — 1986. — № 2. — С. 85—87.
3. Гарбунова Н. Б., Лушчыцкая Н. И. // Там же. — 1989. — № 1. — С. 56—59.
4. Гарбунова Н. Б. // Там же. — 1990. — № 4. — С. 90—94.
5. Гарбунова Н. Б. // Там же. — 1991. — № 1. — С. 78—81.
6. Калюнов В. Н. Фактор роста нервной ткани. — Минск, 1984.
7. Лукашевич В. С., Гарбунова Н. Б., Марцев С. П. // Онтотенез. — 1988. — Т. 19, № 5. — С. 545.
8. Carstairs J. R., Edwards D. C., Pearce F. L. et al. // Europ. J. Biochem. — 1977. — Vol. 77. — P. 311—317.
9. Fabricant R. N., De Largo G. I., Todaro G. I. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1977. — Vol. 74. — P. 565—569.
10. Furukawa S., Kamo I., Furukawa Y., Akazawa S. // J. Neurochem. — 1983. — Vol. 40. — P. 734—744.
11. Guroff G., Montgomery P., Tolson N. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1980. — Vol. 77. — P. 4607—4609.
12. Hendry I. A. // Biochem. J. — 1972. — Vol. 128. — P. 1265—1272.
13. Johnson P. G., Gordon P., Kopin I. I. // J. Neurochem. — 1971. — Vol. 18. — P. 2355—2362.
14. Koop N., Atach R. W. // Fed. Proc. — 1987. — Vol. 46, N 6. — P. 1964.
15. Lakshmanan J. // J. Neurochem. — 1986. — Vol. 46, N 3. — P. 882—891.
16. Lakshmanan J., Weischel M. E., Tarris R., Fisher D. A. // Pediat. Res. — 1986. — Vol. 20, N 3. — P. 391—397.
17. Levi-Montalcini R., Angeletti P. U. // Physiol. Rev. — 1968. — Vol. 48, N 3. — P. 534—569.
18. Levi-Montalcini R. // EMBO J. — 1987. — Vol. 6, N 5. — P. 1145—1155.

19. Pantazis N. J., Jensen R. // *Molec. cell. Biochem.*— 1985.— Vol. 69.— P. 35—48.
20. Perez-Polo R., Du P., Westlund K. et al. // *Birth Defects.*— 1978.— Vol. 14, N 5.— P. 311—321.
21. Ronne H., Anundi H., Rask L., Peterson P. A. // *Biochem. biophys. Res. Commun.*— 1979.— Vol. 87, N 1.— P. 330—336.
22. Seidl K., Holstein A. F. // *Cell. Tiss. Res.*— 1990.— Vol. 261.— P. 549—554.
23. Silverman R. B., Bradshaw R. A. // *J. neurosci. Res.*— 1982.— Vol. 8.— P. 127—136.
24. Smith A. P., Varon S., Shooter E. E. // *Biochemistry.*— 1968.— Vol. 7, N 9.— P. 3259—3268.
25. Suda K., Barde Y. A., Thoenen H. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.*— 1978.— Vol. 75, N 8.— P. 4042—4046.
26. Thoenen H., Barde J. // *Physiol. Rev.*— 1980.— Vol. 60, N 4.— P. 1284—1335.
27. Weskamp G., Otten U. // *J. Neurochem.*— 1987.— Vol. 48, N 6.— P. 1779—1786.

Поступила 03.02.92

# DETERMINATION OF NERVE GROWTH FACTOR CONCENTRATION IN MOUSE BLOOD SERUM.

N. B. Gorbunova, V. N. Kalyunov

Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Byelorussian Republic, Minsk.

Different values of nerve growth factor (NGF) concentrations, estimated in mice blood, were obtained as a result of the following reasons: 1) use of various procedures for estimation, 2) interaction of  $\beta$ -NGF with high molecular blood serum proteins and 3) presence of a variety of the nerve growth proteins in mice blood: from complex to subunit forms of the protein including intermediate associations.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.831-008.939.15-39-02:616-008.922.1-008.64-036.11]-092.9-07

В. А. Терновой, И. В. Михайлов, В. М. Яковлев

## ВЛИЯНИЕ ОСТРОЙ ГИПОКСИИ НА ФОСФОЛИПИДНЫЙ СОСТАВ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ, МИКРОСОМАЛЬНЫХ И МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ МЕМБРАН МОЗГА И ПЕЧЕНИ КРЫС

Институт физиологии и экспериментальной патологии высокогорья АН Республики Кыргызстан, Бишкек

Известно, что гипоксия, в том числе и острая, проводит к активации перекисного окисления липидов и фосфолипаз в клеточных мембранах с последующей модификацией фосфолипидного и жирнокислотного состава, проницаемости, активности трансмембранных ферментов и др. [13, 16, 20]. Вместе с тем установлено, что устойчивость к гипоксии в высокой степени генетически детерминирована [6]. Однако неясно, реализуется ли генетически детерминированная устойчивость к гипоксии на уровне липидно-белковой структуры мембран. Судя по данным, полученным нами ранее, у крыс с различной устойчивостью к гипоксии различается липидная и термодинамическая организация эритроцитарных мембран [5].

Возможно, что локусами реализации генетически обусловленной устойчивости к гипоксии могут быть не только мембраны эритроцитов, ответственных за транспорт кислорода, но и плазматические мембраны клеток, непосредственно использующих кислород, а также мембраны митохондрий, где в результате сопряжения окисле-

ния и фосфорилирования происходит синтез макроэргов.

Чтобы проверить это предположение, мы использовали разделение подопытных крыс на низко- и высокоустойчивые группы с последующим изучением фосфолипидного состава в различных мембранах мозга и печени.

**Методика.** В опыте использованы крысы-самцы Вистар массой  $180 \pm 30$  г. Для разделения животных по признаку устойчивости к гипоксии использовали метод Kugimiya (1985): быстрый подъем (в течение 10 с) в барокамере на «высоту» 12 000 м. К низкоустойчивым относили крыс, выдерживающих экспозицию в барокамере менее 3 мин до второго агонального вдоха, к высокоустойчивым — выдерживающих ее более 9 мин. Животных декапитировали. Ткань печени и большие полушария головного мозга выделяли при  $4^\circ\text{C}$ . Печень перфузировали. Выделение микросомальных и плазматических мембран проводили по [3], митохондрий — по [11]. Фосфолипиды экстрагировали из мембранных структур и разделяли восходящей двумерной тонкослойной хроматографией [15]. Количество фосфолипидов определяли по неорганическому фосфору и выражали в процентах к суммарным фосфолипидам.

**Результаты и обсуждение.** Из таблицы видно, что через 2 нед после воздействия острой гипоксии (менее 3 мин и более 9 мин) во всех видах изучаемых мембран мозга и печени сохраняются следовые изменения фосфолипидного состава, имеющие определенную тканевую специфику и особенно ярко выраженные в плазматических и митохондриальных мембранах.

По сравнению с низкоустойчивыми к гипоксии животными (менее 3 мин) в группе высокоустойчивых крыс (более 9 мин) эти изменения более существенны. У них сохраняются признаки перекисной и фосфолипазной деградации фосфолипидов: снижение содержания фосфатидилхолина в митохондриях и фосфатидилэтаноламина в плазматических мембранах мозга, появление лизофосфатидилхолина в митохондриях и плазматических мембранах мозга и печени, а также изменение содержания сфингомиелина и фосфатидной кислоты в некоторых мембранах.

У низкоустойчивых крыс отмечены увеличение содержания фосфатидной кислоты, фосфатидинозитола в плазматических мембранах и микросомах печени, а также незначительные изменения содержания других классов фосфолипидов в мембранах.

Поскольку изменения фосфолипидной структуры бислоя мембран самым непосредственным образом влияют на его вязкость, проницаемость, трансдукцию внешних сигналов внутрь клетки и, следовательно, на ее функцию [1, 2], представляется возможным расценить полученные нами различия фосфолипидного состава мембран у низко- и высокоустойчивых крыс как различную липидную стратегию организации приспособления к гипоксии.

И действительно, у высокоустойчивых животных через 2 нед после экспозиции отмечаются признаки, характеризующие модификацию вязкости и проницаемости мембран: убыль легкоокисляемых фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина,

**Изменение фосфолипидного состава плазматических, микросомальных и митохондриальных мембран мозга и печени крыс через 2 нед после экспозиции к барокамерной гипоксии**

Мембраны	Фосфолипиды	Мозг			Печень		
		контроль	экспозиция к гипоксии		контроль	экспозиция к гипоксии	
			3 мин	9 мин		3 мин	9 мин
Плазматические	ФЭА	52,7±6,0	28,4±2,7***	27,3±2,4***	41,1±4,4	35,3±2,9	19,8±4,4**
	ФХ	44,0±12,0	16,9±0,5*	23,5±4,0	49,3±3,1	47,9±6,6	42,3±8,0
	лизоФХ	0,14±0,1	0	5,1±1,6***	0	0	4,3±4,3***
	ФС	32,1±7,0	20,9±2,3	15,1±0,9*	3,0±1,5	4,0±0,7	7,4±3,1
	лизоФС	0	0	0	0	0	4,8±2,3***
	СФМ	9,0±1,9	14,2±1,4*	12,1±2,7	4,1±0,6	1,3±0,07***	7,4±0,4***
	ФИ	7,2±3,5	12,4±3,6	10,7±2,6	3,5±0,5	12,2±3,8***	10,1±0,1***
Микросомальные	ФК	14,7±8,2	7,1±2,0	5,3±2,1	0	0	1,2±1,0***
	ФЭА	32,1±4,0	46,1±1,5**	39,1±9,2	29,4±3,6	31,5±1,8	26,0±0,2
	ФХ	37,6±2,2	37,7±5,5	28,1±3,9*	62,4±8,3	41,5±8,5*	64,8±2,4
	лизоФХ	1,9±1,9	0,8±0,3	0	0	0,22±0,2	0
	ФС	12,9±2,3	15,5±1,5	13,1±0,4	1,5±1,1	4,3±0,6*	5,2±0,1***
	СФМ	5,6±0,5	4,4±1,1	3,9±1,3	2,6±1,2	4,5±0,4	2,4±1,4
	ФИ	8,5±0,1	3,3±1,3	10,0±0,9	4,2±2,5	15,8±4,0*	2,0±0,1
Митохондриальные	ФК	1,9±1,0	0,9±0,4	2,9±1,1	0	2,1±1,9***	0
	ФЭА	33,3±7,5	27,9±5,3	32,7±0,3	30,7±4,0	35,7±6,8	24,3±2,3
	ФХ	38,9±3,2	40,5±7,7	30,2±3,2*	35,8±6,4	40,0±7,5	45,5±1,1
	лизоФХ	0	0	2,3±2,0***	0	0	1,4±1,0***
	ФС	13,9±4,0	14,7±2,8	14,2±2,1	8,6±0,3	5,6±1,0***	4,0±1,5**
	лизоФС	0	0	2,0±2,0***	0	0	2,2±2,0***
	СФМ	1,3±1,3	5,2±1,0	4,0±0,4*	2,9±0,4	2,4±0,4	3,3±0,7
	ФИ	7,5±1,2	7,8±1,5	5,8±1,1	16,1±0,6	14,7±2,7	10,2±4,3
	ДФГ	2,9±1,9	4,2±0,8	5,1±0,6*	3,4±0,7	3,2±0,5***	7,3±2,0*
	ФК	3,2±0,5	2,0±0,1***	3,7±1,3	2,4±0,1	1,6±0,3*	1,7±1,2

Примечание. ФЭА — фосфатидилэтаноламин, ФХ — фосфатидилхолин, лизоФХ — лизофосфатидилхолин, ФС — фосфатидилсерин, лизоФС — лизофосфатидилсерин, СФМ — сфингомиелин, ФИ — фосфатидилинозит, ФК — фосфатидная кислота, ДФГ — дифосфатидилглицерин. Данные представлены в процентах к общим фосфолипидам. Одна звездочка —  $p < 0,05$ , две —  $p < 0,01$ , три —  $p < 0,002$ .

замена их лизоформами, а также целесообразная при гипоксии замена фосфатидилхолина на сфингомиелин, который содержит более ненасыщенные жирные кислоты и подавляет активность АТФ-деаминаз [10, 21].

У низкоустойчивых крыс к этому времени сохраняются изменения фосфолипидного состава, характерные для организации липидного мессенджерного ответа и поддержания клеточных мембран и субклеточных структур в возбужденном состоянии: увеличение в мембранах источника вторичных мессенджеров — фосфатидилинозитола и кальциевого ионофора — фосфатидной кислоты [1, 8, 9]. Признаки активации мессенджерного ответа и возбужденного состояния мембран до некоторой степени подтверждают и объясняют известное положение о том, что низкоустойчивые к гипоксии организмы отличаются более высоким уровнем окислительно-восстановительных процессов в тканях [4, 7]. Возможно, менее выраженные следовые изменения фосфолипидного состава мембран у низкоустойчивых крыс по сравнению с высокоустойчивыми объясняются именно высокой интенсивностью обмена.

Однако не исключено, что у низкоустойчивых животных агональное состояние, вызванное только 3-минутной экспозицией к гипоксии, в большей мере связано с нарушением системного кровотока и в меньшей — с гипоксической деструкцией клеточных мембран в отличие от высокоустойчивых особей, которым понадобилось более 9 мин экспозиции для достижения того же эффекта. Во всяком случае, полученные данные свидетельствуют о глубоких и стойких изменениях структуры и функции клеточных и субклеточных

мембран при однократном кратковременном воздействии гипоксии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Введение в биомембранологию / Под ред. А. А. Болдырева. — М., 1990.
2. Кагава Я. Биомембраны: Пер. с япон. — М., 1985.
3. Кейтс М. Техника липидологии. — М., 1975.
4. Крапивин С. К., Дудченко А. И., Воронина Г. А., Лукьянова А. Г. // Фармакокинетика коррекции гипоксических состояний. — Гродно, 1991. — Ч. 1. — С. 18—19.
5. Михайлов И. В., Терновой В. А., Яковлев В. М. // Молекулярные и клеточные основы кислотно-основного и температурного гомеостаза. — Сыктывкар, 1991. — С. 74.
6. Серебровская Т. В., Липский Т. Ю. // Физиологические и клинические проблемы адаптации к гипоксии и гипертермии. — М., 1981. — Т. 2. — С. 104.
7. Старых Е. В., Торшин В. И., Шастут С. А., Северин А. Е. // Фармакологическая коррекция гипоксических состояний. — Гродно, 1991. — Ч. 3. — С. 383—384.
8. Элкон Д. Л. // В мире науки. — 1989. — № 9. — С. 36—42.
9. Berridge M. T. // Biochem. J. — 1983. — Vol. 212. — P. 473—482.
10. Bernhard D., Grujer W. // Biochim. biophys. Acta. — Vol. 11, N 2. — P. 369—372.
11. Blassen J. B., Mergner W. J., Costa M. // J. cell. Physiol. — 1989. — Vol. 141, N 1. — P. 43—59.
12. Crooke S. T., Mattern M., Serau H. M. et al. // Trends pharmacol. Sci. — 1986. — Vol. 10, N 3. — P. 103—107.
13. Fakhshi K., Motohatsu F., Shum S., Masakuniki K. // Brain Res. — 1989. — Vol. 482, N 1. — P. 109—121.
14. Froud R. J., Earl C. R. A., East S. M., Lee A. G. // Biochim. biophys. Acta. — 1986. — Vol. 860, N 2. — P. 354—360.
15. Horrocks L. A., Sun G. Y. // Research Methods in Neurochemistry / Eds N. Merks, R. Rodnight. — New York, 1972. — Vol. 1. — P. 223—231.
16. Huang H. M., Gilson G. E. // J. Neurochem. — 1989. — Vol. 52, N 3. — P. 830—835.
17. Kugimiya T., Suwa K., Inada Y. et al. // Tohoku J. exp. Med. — 1984. — Vol. 144. — P. 315—320.
18. Naderi S., Carruthers A., Melchir D. X. // Biochim. biophys. Acta. — 1989. — Vol. 985, N 2. — P. 173—181.



19. Pasa T. C., Barrabin H., Scofano H. M., Otero A. // *Arh. biol. technol.*— 1989.— Vol. 32, N 1.— P. 12.
20. Ternovoi V. A., Michailov I. V., Jakovlev V. M. // *International Society for Pathophysiology Constituents Congress: Abstracts.*— Moschow, 1991.— P. 262—263.
21. Wozniak M., Purzycka-Preis J., Kossowska E., Zydomo M. M. // *Acta biochim. pol.*— 1987.— Vol. 34.— P. 285—290.

Поступила 13.04.92

# EFFECT OF ACUTE HYPOXIA ON THE PHOSPHOLIPID COMPOSITION OF PLASMA, MICROSOMAL AND MITOCHONDRIAL MEMBRANES OF RAT BRAIN AND LIVER TISSUES.

V. A. Ternovoy, I. V. Mikhailov, V. M. Yakovlev

Institute of Physiology and Experimental Pathology of Highland, Academy of Sciences of the Kirghiz Republic, Bishkek.

Tissue-dependent alterations in composition of phospholipids, studied by means of thin-layer chromatography, were detected in plasma, microsomal and mitochondrial membranes of rat brain and liver tissues after influence of acute hypoxia in the altitude chamber at a "height" of 12,000 m 3-9 min. These alterations were maintained within 2 weeks after the acute hypoxia effect in all the membranes studied, while they were most distinct in plasma and mitochondrial membranes. In the group of hypoxia-stable rats the alterations in phospholipids were more pronounced as compared with the group of less stable animals.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 612.015.14

Е. И. Лизенко, Т. И. Регеранд, П. О. Рипатти, В. И. Петровский, В. С. Сидоров

## ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ЛЕЦИТИНА И ЭФИРОВ ХОЛЕСТЕРИНА ЛИПОПРОТЕИНОВ ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА, НЕКОТОРЫХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ И РЫБ

Институт биологии Карельского филиала РАН, Петрозаводск

В последние десятилетия пристальное внимание исследователей привлекает функциональная роль липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), способных выводить холестерин (ХС) из стенок кровеносных сосудов. По своим физическим параметрам, биохимическому составу и физиологическим функциям ЛПВП неоднородны. В организме человека и животных они представлены главным образом ЛПВП<sub>2</sub> и ЛПВП<sub>3</sub>, для которых характерно высокое содержание белка и фосфолипидов, в основном лецитина.

На поверхности ЛПВП с участием лецитин-холестеринацилтрансферазы (ЛХАТ) протекает одна из ключевых реакций холестеринного обмена, в процессе которой ХС снимается со стенок кровеносных сосудов одной из жирных кислот лецитина — ЛПВП<sub>3</sub>, а образующиеся при этом эфиры ХС (ЭХС) перемещаются в глубь липопротеиновой частицы. В результате перестановки эстерифицированного холестерина происходит образование ЛПВП<sub>2</sub>.

Белковый и липидный состав ЛПВП<sub>2</sub> и ЛПВП<sub>3</sub> особенно широко изучается сейчас у здоровых и больных людей в связи с широко распространенными атеросклеротическими нарушениями сосудистой системы. Значительно меньше встре-

чается работ, выполненных в сравнительном плане на различных животных.

Учитывая, что ЛХАТ-реакция происходит между двумя видами липидов (лецитином и ХС) ЛПВП, причем решающую роль играют жирные кислоты, нами проведены исследования жирнокислотного состава лецитина и ЭХС ЛПВП<sub>2</sub> и ЛПВП<sub>3</sub> у человека, млекопитающих и рыб. Работа выполнена с целью установления сходства и различия жирнокислотных спектров ЛПВП у здоровых людей и животных, предрасположенных (свинья) и мало предрасположенных (крыса) к атеросклерозу. Наим выбран произвольно как представитель современных костистых рыб, тем более что исследований в плане изучения его сосудистой системы в литературе не найдено.

**Методика.** В опытах использовали сыворотку крови здоровых людей (20 мужчин-доноров в возрасте 30—40 лет), 10 свиней (домашняя крупная белая породы), 10 крыс (лабораторная белая нелинейной породы) и 30 особей налима. Кровь у людей брали из локтевой вены натошак, у свиней — из шейной вены при забое, у крыс — пункцией в сердце при анестезии серным эфиром, у рыбы — из хвостовой вены. Для выделения липопротеинов использовали методику [9], позволившую в течение 2—3 ч получить 3 основные фракции липопротеинов: ЛПНП, ЛПВП<sub>2</sub> и ЛПВП<sub>3</sub>. Из 2 последних подклассов липопротеинов экстрагировали липиды [5] и разделяли их на тонкослойных пластинках в системах растворителей петролейный эфир — серный эфир — уксусная кислота (90:10:1 по объему) для разделения ЭХС и хлороформ — метанол — вода (65:25:4) для опытов с лецитином. Снятые вместе с силикагелем с пластинок пятна лецитина и ЭХС подвергали прямой переестерификации в абсолютном метаноле [3]. Полученные смеси метиловых эфиров жирных кислот анализировали газожидкостной хроматографией на хроматографе «Хром-41» в стеклянных набивных колонках с внутренним диаметром 3 мм и длиной 2,5 м, содержащих в качестве стационарной фазы Reoplex-400. Полученные пики идентифицировали с имеющимися чистыми эфирами жирных кислот, а также определяли эквивалентные длины цепей и сравнивали их с табличными данными [6, 7]. Относительное содержание индивидуальных жирных кислот рассчитывали по [4].

Для сравнительной характеристики жирнокислотного состава ЛПВП сыворотки крови человека, крысы, свиньи и рыбы полученные данные обработаны статистически.

**Результаты и обсуждение.** Для более удобной характеристики жирнокислотного состава ЛПВП<sub>2</sub> лецитина и ЭХС человека и животных приведены самые основные и наиболее показательные в функциональном отношении жирные кислоты (табл. 1, 2). Насыщенность лецитина у всех представителей составила 31—51 %, а ЭХС — 20—41 %, причем наиболее насыщенными в обоих липидах были кислоты рыбы и крысы. Пальмитиновая и стеариновая составили основную долю в сумме насыщенных жирных кислот. Замечено, что в ЭХС ЛПВП<sub>2</sub> человека, крысы и рыбы стеариновой кислоты содержалось в 2—3 раза меньше, чем у свиньи ( $p < 0,01$ ). Сравнительно низкое количество стеа-

Жирнокислотный состав ЛПВП<sub>2</sub> (в % к сумме) человека и животных

Показатели	Лецитин				ЭХС			
	человек (n=20)	свинья (n=10)	крыса (n=10)	рыба (n=30)	человек (n=20)	свинья (n=10)	крыса (n=10)	рыба (n=30)
Насыщенные:								
сумма	41,41±1,98	49,48±2,30	39,85±2,16	30,55±2,45	26,30±1,65	40,52±2,80	39,48±2,50	21,70±2,46
16:0	25,57±1,38	31,22±1,76	22,84±1,54	21,47±1,49	18,97±1,70	25,17±1,62	23,67±1,64	11,03±0,98
18:0	13,19±0,66	15,77±1,80	13,80±0,78	4,43±0,86	3,91±0,85	12,75±0,9	5,40±0,88	3,47±0,66
17:0	0,34±0,10	0,74±0,15	1,16±0,25	0,69±0,10	0,80±0,17	1,65±0,30	3,17±0,28	2,55±0,70
Моноеновые:								
сумма	17,16±1,63	20,00±1,94	18,28±2,67	19,80±2,70	22,26±1,50	31,82±1,65	19,68±0,98	10,44±0,90
16:1	0,76±0,13	0,99±0,11	0,94±0,23	1,35±0,41	2,46±0,35	2,27±0,70	1,78±0,50	0,61±0,12
18:1	15,44±0,94	18,52±0,98	15,60±0,89	16,22±0,85	18,82±1,08	24,69±0,26	15,84±0,84	7,48±0,72
17:1	0,19±0,08	0,0	0,56±0,06	0,19±0,09	0,26±0,08	0,0	1,00±0,05	0,23±0,06
Полиеновые:								
сумма	41,93±2,20	30,51±2,13	40,68±2,15	49,65±2,69	51,44±2,82	27,66±2,24	40,89±2,83	67,86±2,04
18:2 (n=6)	23,95±1,03	17,77±0,97	18,11±1,03	13,28±0,90	41,78±0,90	19,19±1,76	16,60±1,54	10,14±0,92
18:3 (n=6)	0,0	0,0	3,21±0,55	0,21±0,10	0,49±0,15	1,18±0,25	3,47±0,45	0,0
18:3 (n=3)	1,57±0,60	0,52±0,12	2,75±0,55	1,37±0,28	0,44±0,10	0,57±0,12	2,32±0,33	0,75±0,12
20:3 (n=6)	7,43±0,50	5,72±0,48	9,05±0,74	21,78±0,82	2,67±0,20	4,28±0,17	6,64±0,33	11,85±0,45
20:4 (n=6)	5,30±0,42	6,50±0,69	7,51±0,77	1,04±0,18	3,79±0,22	1,64±0,15	11,01±0,38	0,71±0,11
20:5 (n=3)	0,0	0,0	0,0	3,56±0,54	0,0	0,0	0,0	16,24±0,58
22:5 (n=3)	0,0	0,0	0,0	1,18±0,10	0,0	0,0	0,0	8,64±0,60
22:5 (n=6)	0,0	0,0	0,0	1,22±0,09	0,0	0,0	0,0	1,53±0,13
22:6 (n=3)	3,68±0,38	0,0	0,0	4,99±0,45	0,0	0,0	0,0	9,83±0,78

риновой кислоты было обнаружено в лецитине ЛПВП<sub>2</sub> рыбы. В ЛПВП<sub>2</sub> ЭХС свиньи достоверно увеличено содержание и пальмитиновой кислоты, особенно по сравнению с рыбой и человеком ( $p<0,05$ ).

Уровень моноеновых кислот в лецитине ЛПВП<sub>2</sub> всех представителей был сходным. Напротив, в ЭХС той же фракции они преобладали у свиньи ( $p<0,05$ ). У налима в ЭХС содержалось в 2—3 раза меньше моноеновых кислот, особенно за счет олеиновой, по сравнению с другими животными и человеком.

Сумма полиеновых жирных кислот в лецитине ЛПВП<sub>2</sub> составила 30—50 %, а в ЭХС — 28—68 %, причем самое низкое содержание их было у свиньи, а самое высокое — у рыбы ( $p<0,05$ ). В обоих липидах человека и свиньи преобладали линолевая, арахидоновая и эйкозатриеновая кислоты. У крысы отмечалось повышенное содержание линолевой, линоленовой, эйкозатриеновой и арахидоновой кислот. Лецитин и ЭХС ЛПВП<sub>2</sub> рыбы, кроме докозатриеновой и линолевой кислот, имели полиненасыщенные длинноцепочечные кислоты типа 20:5 ( $n=3$ ), 22:5 ( $n=3$ ) и 22:6 ( $n=3$ ).

Лецитин и ЭХС ЛПВП<sub>3</sub> были самыми насыщенными у человека и свиньи с более высоким уровнем в них пальмитиновой и стеариновой

кислот, особенно в лецитине ( $p<0,05$ ; см. табл. 2). Соотношение моноеновых жирных кислот в лецитине ЛПВП<sub>3</sub> всех представителей сходно с таковым в ЛПВП<sub>2</sub>. В ЭХС ЛПВП<sub>3</sub> свиньи отмечено преобладание моноеновых кислот за счет олеиновой по сравнению с другими животными и человеком ( $p<0,05$ ).

Меньше всего полиеновых жирных кислот было в лецитине и ЭХС ЛПВП<sub>3</sub> свиньи и человека ( $p<0,05$ ). Преобладающими у человека, свиньи и крысы были линолевая, арахидоновая и эйкозатриеновая кислоты, а у рыбы, кроме линолевой и эйкозатриеновой, был выше уровень длинноцепочечных жирных кислот типа 20:5 ( $n=3$ ), 22:5 ( $n=3$ ), 22:6 ( $n=3$ ). Отмечены различия в содержании полиеновых жирных кислот между ЛПВП<sub>2</sub> и ЛПВП<sub>3</sub>, особенно существенные в лецитине и ЭХС человека (в ЛПВП<sub>3</sub> полиеновых жирных кислот больше почти в 2 раза;  $p<0,05$ ).

У исследованных представителей в целом картина жирнокислотного состава лецитина и ЭХС ЛПВП<sub>2</sub> и ЛПВП<sub>3</sub> выглядела неоднозначно. Общая ненасыщенность в обоих липидах человека и свиньи была ниже (около 50 %), чем у крысы (65 %) и рыбы (70 %). Самый высокий процент пальмитиновой и более низкое количество длинно-

Таблица 2

Жирнокислотный состав ЛПВП<sub>3</sub> (в % к сумме) человека и животных

Показатели	Лецитин				ЭХС			
	человек (n=20)	свинья (n=10)	крыса (n=10)	рыба (n=30)	человек (n=20)	свинья (n=10)	крыса (n=10)	рыба (n=30)
Насыщенные:								
сумма	48,03±3,00	49,07±2,63	32,25±2,80	24,49±2,36	46,0±2,94	42,77±2,80	34,52±1,81	31,97±1,54
16:0	30,70±1,94	25,23±2,00	20,72±1,70	15,19±1,89	21,0±1,98	18,11±2,00	21,38±2,00	19,42±1,68
18:0	13,28±1,69	21,57±0,94	10,85±1,55	5,75±0,77	5,64±0,98	5,88±0,71	6,15±0,90	5,44±0,89
17:0	1,72±0,11	0,66±0,10	0,78±0,14	1,11±0,10	5,49±0,25	6,49±0,27	2,18±0,18	1,59±0,17
Моноеновые:								
сумма	29,26±2,10	23,15±2,31	23,23±2,28	26,56±2,46	18,76±2,14	34,37±3,06	18,35±2,15	24,62±1,93
16:1	2,39±0,14	1,31±0,15	2,02±0,10	1,21±0,10	0,89±0,10	5,58±0,30	2,13±0,28	3,15±0,43
18:1	23,47±0,48	21,12±0,68	19,83±0,80	23,74±0,95	16,65±0,64	23,08±0,71	13,65±0,56	19,12±0,90
17:1	1,29±0,42	0,20±0,10	0,90±0,10	0,29±0,10	0,71±0,13	0,84±0,11	0,90±0,17	1,30±0,20
Полиеновые:								
сумма	22,71±1,59	27,78±1,64	44,52±2,17	48,49±2,93	35,24±2,11	22,86±1,63	47,13±2,14	41,40±2,61
18:2 (n=6)	13,70±0,83	10,87±0,76	19,70±0,92	8,12±0,58	22,46±0,80	9,43±0,71	24,50±0,64	12,69±0,60
18:3 (n=6)	0,0	0,0	5,54±0,35	0,36±0,10	0,0	3,73±0,50	2,58±0,20	0,0
18:3 (n=3)	2,07±0,10	0,96±0,11	2,35±0,14	3,26±0,22	0,17±0,09	3,26±0,55	2,80±0,30	1,24±0,33
20:3 (n=6)	0,0	3,06±0,41	6,61±0,72	14,01±0,64	3,70±0,40	6,35±0,25	6,23±0,52	7,69±0,49
20:4 (n=6)	5,13±0,68	9,62±0,89	8,15±0,80	0,76±0,12	3,21±0,38	0,0	9,21±0,54	2,35±0,30
20:5 (n=3)	0,0	0,0	0,0	3,56±0,32	0,0	0,0	0,0	1,68±0,20
22:5 (n=3)	0,0	1,47±0,11	0,0	10,02±0,85	0,19±0,08	0,0	0,0	6,41±0,53
22:5 (n=6)	0,0	0,0	0,0	1,60±0,18	0,47±0,10	0,0	0,0	0,0
22:6 (n=3)	0,0	0,84±0,08	0,0	0,0	0,22±0,09	0,0	0,0	6,67±0,48

цепочечных полиеновых кислот содержалось у человека и свиньи. Общий уровень линолевой кислоты в ЛПВП<sub>3</sub> у человека был в 2 раза выше, чем у свиньи, но ниже, чем у крысы. Однако в ЛПВП<sub>2</sub>, особенно в ЭХС, линолевая кислота у человека составляла очень высокий процент — 41,78. При невысоком общем количестве линолевой кислоты в ЛПВП рыбы преобладающими были полиненасыщенные длинноцепочечные жирные кислоты.

Исходя из данных литературы по жирнокислотному составу липопротеинов здоровых и больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями людей, полученные нами результаты можно интерпретировать следующим образом. Известно, что этерификация ХС происходит в основном за счет ненасыщенной жирной кислоты из положения С-2 лецитина ЛПВП<sub>3</sub>, причем с большей скоростью катализируется перенос на ХС линолевой кислоты [2]. Замечено также, что даже без ишемической болезни сердца (ИБС) у мужчин с низким содержанием ХС в ЛПВП снижен процент линолевой и арахидоновой кислот, а у больных ИБС увеличен уровень насыщенных, моноеновых и снижено содержание полиеновых, особенно длинноцепочечных, жирных кислот [1, 2].

Перечисленные факты свидетельствуют о том, что для более эффективного снятия ХС с интимы стенок кровеносных сосудов человека нужен не только высокий уровень линолевой кислоты в ЛПВП, но и другие длинноцепочечные жирные кислоты, которые создают более высокую жидкость мембраны липопротеиновых частиц для реакции с ЛХАТ.

Полученные нами данные дают основание утверждать, что наиболее благоприятный общий фон жирных кислот в ЛПВП характерен для крыс и рыб. У первых в лецитине при высоком содержании ненасыщенных жирных кислот в целом преобладают линолевая и арахидоновая кислоты, которые могут быть использованы для переэтерификации ХС. У рыб же очень высокая ненасыщенность лецитина и ЭХС, причем, кроме линолевой кислоты, у них содержится высокий процент полиеновых длинноцепочечных (эйкозапентаеновой, докозапентаеновой, докозагексаеновой) кислот. Отмечено, что в фосфолипидах и ЭХС ЛПВП сардины ненасыщенность жирнокислотного состава составила 70 %, причем 40 % из них приходилось на долю докозагексаеновой кислоты [8]. Не исключено, что у рыб реакция ЛХАТ протекает с использованием не только линолевой, но и длинноцепочечных жирных кислот из положения С-2 лецитина.

Жирнокислотный состав ЛПВП человека в нашем эксперименте был сравнительно благоприятным, судя по высокому уровню холестерин-линолеата в ЭХС ЛПВП<sub>2</sub> и ЛПВП<sub>3</sub>, что свидетельствовало об эффективности реакции с ЛХАТ. Однако общая ненасыщенность и процент линолевой кислоты лецитина ЛПВП<sub>3</sub> был намного ниже, чем у крысы.

Более неблагоприятная картина по сравнению с другими представителями отмечена в ЛПВП свиньи (высокая общая ненасыщенность жирных кислот, преобладание в лецитине пальмитиновой и стеариновой кислот, низкая концентрация линолевой кислоты в лецитине ЛПВП<sub>3</sub>).

Сравнение жирнокислотного состава лецитина и ЭХС двух классов ЛПВП показало значительные количественные различия как между ЛПВП<sub>2</sub> и ЛПВП<sub>3</sub> у одного и того же представителя (особенно по полиеновым и моноеновым кислотам у человека), так и в каждом классе липопротеинов между различными представителями. Однозначного объяснения этому факту нет. Как установлено в настоящее время у человека, формирование фракций ЛПВП происходит различными путями, причем ЛПВП<sub>3</sub> синтезируются гепатоцитами печени и энтероцитами тонкой кишки, откуда они поступают в кровяное русло, а образование ЛПВП<sub>2</sub> тесно связано не только с активностью ЛХАТ, но и активностью липопротеидлипазы, гидролизующей триацилглицерин липопротеинов очень низкой плотности. Последние в конечном счете переходят на липопротеины низкой плотности и ЛПВП<sub>2</sub>. В настоящее время делается предположение, что образование ЛПВП<sub>2</sub> связано с метаболизмом системы липопротеинов в целом. Даже у человека при наиболее полной его изученности различные пути синтеза и формирования ЛПВП<sub>2</sub> и ЛПВП<sub>3</sub> еще полностью не раскрыты. Можно только предполагать, что несколько различное образование у него двух фракций ЛПВП приводит к неодинаковому набору в них насыщенных, моноеновых и полиеновых жирных кислот. Пока трудно оценить, насколько сходен процесс формирования ЛПВП у изученных нами животных и человека и как это сказывается на синтезе жирных кислот в обеих фракциях. Нужно отметить тот факт, что жирнокислотный спектр как лецитина, так и ЭХС у обоих типов ЛПВП существенно различается, причем характер различий явно видоспецифичен. Это может свидетельствовать о значительном различии процессов обмена жирных кислот между липопротеинами у разных видов животных и человека.

Более углубленное и последовательное исследование жирнокислотного состава ЛПВП у различных животных может дать сведения о происходящих в организме изменениях не только общего содержания ЛПВП, наличия в них определенного уровня ХС и лецитина, но и о жирнокислотных радикалах, осуществляющих снятие ХС с плазматических мембран клеток кровеносных сосудов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Анрекаръ С. Г. // Бюл. Всесоюз. кардиол. науч. центра.— 1981.— № 1.— С. 26—42.
2. Герасимова Е. Н., Перова Н. В. // Вопр. мед. химии.— 1985.— № 1.— С. 32—40.
3. Цыганов Э. П. // Лаб. дело.— 1971.— № 9.— С. 490—493.
4. Bartlett J. C., Iverson J. L. // J. Ass. Offic. analyt. Chem.— 1966.— Vol. 37, N 1.— P. 21—27.
5. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. H. // J. biol. Chem.— 1957.— Vol. 226.— P. 497—509.
6. Jamieson G. R. // J. chromatogr. Sci.— 1975.— Vol. 13.— P. 491—497.
7. Jamieson G. R., Reid E. H. // J. Chromatogr.— 1969.— Vol. 42.— P. 304—310.
8. Lee R. F., Puppione D. L. // Biochim. biophys. Acta.— 1972.— Vol. 270.— P. 272—278.
9. Lewis J. C., Miller G. J., Burstein M. et al. // J. Lipid Res.— 1982.— Vol. 23.— P. 1206—1223.



## МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.153.298-074:543.544

А. И. Резвухин, И. Ю. Шалаурова, И. А. Потапова, И. А. Алябьева

### ХРОМАТОМАСС - СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СВОБОДНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Институт терапии СО РАМН, Институт биоорганической химии СО РАН, Новосибирск

При анализе свободных жирных кислот возникают трудности, связанные с низким содержанием и относительной неустойчивостью свободных жирных кислот сыворотки крови, особенно полиненасыщенных [4]. Применение газожидкостной хроматографии для анализа свободных жирных кислот обычно сводится к переводу их в более летучие метиловые эфиры [2, 5]. Таким образом, на первой стадии исследователи сталкиваются с проблемой выбора метилирующего агента, с тем чтобы метилирование было исчерпывающим и чтобы другие липидные компоненты сыворотки не претерпевали серьезных изменений (переэтерификация, гидролиз), которые могут исказить результаты.

Из известных метилирующих агентов наиболее предпочтительным является смесь метанол — ацетилхлорид (50:1) [3], причем метилирование свободных жирных кислот сыворотки крови проходит за 45 мин при комнатной температуре и практически не затрагивает других липидных компонентов: триглицеридов, эфиров холестерина, фосфатидилхолинов и сфингомиелина. Мы решили воспользоваться предлагаемой методикой, адаптировав ее к нашим лабораторным условиям.

Методика. В качестве стандартов для определения хроматографических пиков нами были использованы следующие жирные кислоты и соответственно их метиловые эфиры: насыщенные: лауриновая ( $C_{12:0}$ ), пентадекановая ( $C_{15:0}$ ), пальмитиновая ( $C_{16:0}$ ), маргаритовая ( $C_{17:0}$ ), стеариновая ( $C_{18:0}$ ), нонадекановая ( $C_{19:0}$ ) и ненасыщенные: олеиновая ( $C_{18:1}$ ), линоленовая ( $C_{18:3}$ ), эруковая ( $C_{22:1}$ ) и смесь эруковой и тетракозановой ( $C_{22:1} + C_{24:0}$ ). При идентификации эйкозапентаеновой ( $C_{20:5}$ ) и докозагексаеновой ( $C_{22:6}$ ) кислот был использован жир скумбрии дальневосточной как источник этих жирных кислот. Ацетилхлорид (марки ч.) и метанол (ч. д. а.) использовали без дополнительной очистки. Опреде-

ление свободных жирных кислот проводили по следующей методике. К 5 мл метилирующей смеси метанол — ацетилхлорид (50:1) добавляли 0,3 мл сыворотки крови. Тщательно перемешивали на водяной бане при 25 °C в течение 45 мин. Останавливали реакцию метилирования, медленно добавляя 3 мл 6 % раствора  $K_2CO_3$  (или  $Na_2CO_3$ ), экстрагировали 0,3 мл гексана, перемешивали и центрифугировали при 3000 об/мин 10 мин. Осторожно отбирали гексановый слой и концентрировали его продувкой над поверхностью струей азота до 30 мкл. 1—3 мкл этого раствора использовали для введения в инжектор газового хроматографа 5890А фирмы «Хьюлетт-Паккард». В качестве детектора был использован масс-селективный приемник, позволяющий получать масс-спектры детектируемых хроматографических пиков. Последующий анализ масс-спектров с использованием поисковой системы (банк данных  $\approx 50\,000$  соединений) позволял идентифицировать хроматографические пики. Газ-носитель — гелий. Колонка «Ultra-2» капиллярная с фазой, состоящей из 5 % дифенил- и 95 % диметилполисилоксана ( $12\,m \times 0,2\,mm \times 0,33\,mkm$ ). Инжектор с разделением потока. Скорость потока гелия 5 мл/мин. Температурный режим колонки формировался следующим образом: после первоначального изотермического режима (3 мин) при 70 °C температура колонки поднималась до 170 °C со скоростью 20 °C в минуту с выдержкой при этой температуре 2 мин. Затем температура программировалась до 220 °C со скоростью 10 °C в минуту и после выдержки в течение 2 мин вновь поднималась до 260 °C со скоростью 5 °C в минуту. На заключительной стадии после задержки в 2 мин температура колонки поднималась до 290 °C со скоростью 5 °C в минуту. Охлаждение колонки не контролировали. Общее время получения хроматограммы 35 мин.

Результаты и обсуждение. Перед анализом содержания жирных кислот сыворотки крови мы провели полный хроматомасс-спектрометрический анализ стандартных смесей свободных жирных кислот и их метиловых эфиров, имеющих в нашем распоряжении, убедились в том, что как свободные жирные кислоты, так и их метиловые эфиры можно полностью идентифицировать на колонке «Ultra-2», и подтвердили отнесение хроматографических пиков при полном масс-спектрометрическом анализе с использованием банка данных по жирным кислотам.

На рис. 1 приведена хроматограмма метило-

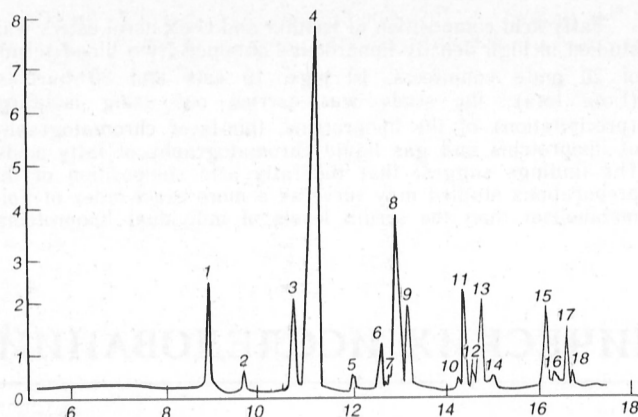


Рис. 1. Хроматограмма метиловых эфиров свободных жирных кислот скумбрии дальневосточной.

Здесь и на рис. 2: по оси абсцисс — время, мин, 1 — тетрадекановая 14:0; 2 — пентадекановая 15:0; 3 — гексадекановая 16:0; 4 — гексадекановая 16:1; 5 — гексадекановая 17:0; 6 — октадекатриеновая 18:3; 7 — октадекадиеновая 18:2; 8 — октадекановая 18:1; 9 — октадекановая 18:0; 10 — эйкозатетраеновая 20:4; 11 — эйкозатриеновая 20:3; 12 — эйкозеновая 20:1; 13 — эйкозеновая 20:0; 14 — докозатетраеновая 22:4; 15 — докозатриеновая 22:3; 16 — докозатриеновая 22:5; 17 — докозеновая 22:1; 18 — докозеновая 22:0.

вых эфиров неэстерифицированных жирных кислот образца рыбьего жира (скумбрии дальневосточной) с известным набором жирных кислот. Используя стандарты жирных кислот, а также данные библиотеки масс-спектров, нам удалось надежно идентифицировать следующие пики в порядке возрастания времени удержания:  $C_{14:0}$  (8,483),  $C_{15:0}$  (9,608),  $C_{16:1}$  (10,692),  $C_{16:0}$  (11,031),  $C_{17:0}$  (11,976),  $C_{18:3}$  (12,634),  $C_{18:2}$  (12,709),  $C_{18:1}$  (12,900),  $C_{18:0}$  (13,091),  $C_{20:4}$  (14,318),  $C_{20:5}$  (14,431),  $C_{20:1}$  (14,717),  $C_{20:0}$  (14,945),  $C_{22:6}$  (16,061),  $C_{22:5}$  (16,156),  $C_{22:1}$  (16,422),  $C_{22:0}$  (16,654),  $C_{24:1}$  (18,190).

Аналогичная картина наблюдалась для стандартной смеси свободных жирных кислот на той же колонке, за исключением того, что разделение компонентов было недостаточно четким из-за широких хроматографических пиков.

Поскольку, на наш взгляд, методика метилирования свободных жирных кислот [3] разработана не до конца, в частности неизвестным ос-

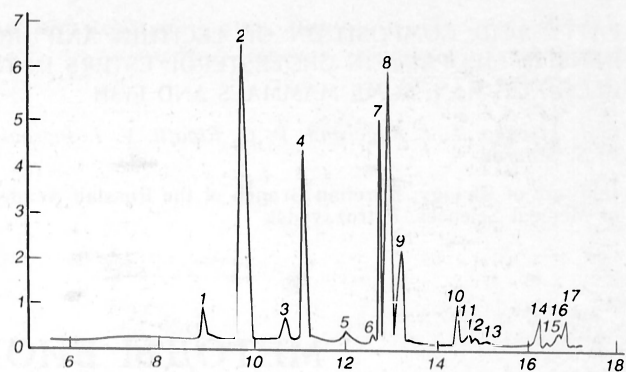


Рис. 2. Хроматограмма метиловых эфиров свободных жирных кислот сыворотки крови человека.

1 — тетрадекановая 14:0; 2 — пентадекановая 15:0 (стандарт); 3 — гексадекановая 16:1; 4 — гексадекановая 16:0; 5 — гексадекановая 17:0; 6 — октадекатриеновая 18:3; 7 — октадекадиеновая 18:2; 8 — октадекановая 18:1; 9 — октадекановая 18:0; 10 — эйкозатетраеновая 20:4; 11 — эйкозатриеновая 20:3; 12 — эйкозеновая 20:1; 13 — эйкозеновая 20:0; 14 — докозатетраеновая 22:4; 15 — докозатриеновая 22:5; 16 — докозеновая 22:1; 17 — докозеновая 22:0.

тается вопрос о сроках хранения метилированных продуктов, мы постарались видоизменить методику, варьируя количество сыворотки, метилирующего агента и гексана, а также проводя высушивание образцов на заключительной стадии в струе инертного газа (азота) и хранили при  $-20^\circ\text{C}$  в холодильнике. Наши эксперименты показали, что наиболее приемлемым количеством сыворотки крови является 300 мкл, метилирующего агента — 5 мл (метанол — ацетилхлорид, 50:1), гексана для экстракции — 300 мкл. При этом срок хранения высушенных в токе азота продуктов метилирования при  $-20^\circ\text{C}$  составляет не менее 1 мес.

На рис. 2 приведена характерная хроматограмма файла метиловых эфиров неэстерифицированных жирных кислот сыворотки крови здорового человека. Времена удержания, а также отнесения хроматографических пиков приведены в табл. 1, из которой видно, что разброс экспериментальных времен удержания характеризуется низкой дисперсией. Это позволяет надежно предсказывать по временам удержания наличие опре-

Таблица 1

Типичные времена удержания метиловых эфиров жирных кислот при выбранных экспериментальных условиях

Статистические показатели	Кислота								
	$C_{14:0}$	$C_{15:0}$	$C_{16:1}$	$C_{16:0}$	$C_{17:0}$	$C_{18:3}$	$C_{18:2}$	$C_{18:1}$	$C_{18:0}$
<i>M</i>	8,483	9,608	10,692	11,031	11,976	12,634	12,709	12,900	13,091
<i>m</i>	0,01	0,16	0,02	0,01	0,07	0,01	0,02	0,02	0,02
$\delta$	0,03	0,53	0,07	0,04	0,26	0,01	0,09	0,09	0,09
<i>cv</i>	0,35	5,51	0,65	0,36	2,23	0,08	0,71	0,69	0,68
<i>n</i>	9	11	15	21	14	2	20	21	19

Продолжение

Статистические показатели	Кислота							
	$C_{20:4}$	$C_{20:3}$	$C_{20:1}$	$C_{20:0}$	$C_{22:6}$	$C_{22:5}$	$C_{22:1}$	$C_{22:0}$
<i>M</i>	14,318	14,565	14,717	14,945	16,061	16,156	16,422	16,654
<i>m</i>	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02	0,3	0,01	0,02
$\delta$	0,119	0,068	0,03	0,08	0,08	0,9	0,04	0,08
<i>cv</i>	0,83	0,46	0,20	0,53	0,49	5,57	0,24	0,48
<i>n</i>	18	7	9	16	18	9	15	18

$$cv = \frac{\delta}{M} \cdot 100\%; m = \frac{\delta}{\sqrt{n}}; \delta = m \cdot \sqrt{n}.$$

Концентрация (в мкг/мл) метиловых эфиров незэтерифицированных жирных кислот сыворотки крови мужчин 40—49 лет

Показатель	Кислота														
	C <sub>16:1</sub>	C <sub>16:0</sub>	C <sub>17:0</sub>	C <sub>18:2</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18:0</sub>	C <sub>20:4</sub>	C <sub>20:3</sub>	C <sub>20:2</sub>	C <sub>20:1</sub>	C <sub>20:0</sub>	C <sub>22:6</sub>	C <sub>22:5</sub>	C <sub>22:1</sub>	C <sub>22:0</sub>
<i>n</i>	21	20	10	19	17	20	19	14	5	5	11	20	10	5	20
<i>M</i>	9,94	65,38	3,72	68,71	79,23	30,95	9,70	3,60	2,79	1,80	2,30	5,41	1,93	2,58	6,21
<i>m</i>	1,65	8,39	1,26	7,12	6,82	6,32	1,07	0,87	1,34	1,15	0,43	0,95	0,84	0,62	1,44

Примечание. *M* — среднее значение, *m* — ошибка репрезентативности, *n* — число наблюдений.

деленных метиловых эфиров жирных кислот при выбранных условиях получения хроматограмм (температурный режим, скорость потока гелия и т. д.), а также чувствительности детектора.

Количественная обработка файлов проведена нами на основании имеющейся в компьютере программы «Report». В качестве внутреннего стандарта использовали метиловый эфир пентадекановой кислоты (C<sub>15:0</sub>), так как в сыворотке человека C<sub>15:0</sub> практически отсутствует.

Внутренний стандарт в виде пентадекановой кислоты добавляли в сыворотку крови перед началом метилирования из расчета 100 мкл раствора стандарта в метаноле на каждую пробу. Концентрация раствора внутреннего стандарта 227 мкг/мл.

В табл. 2 представлены концентрации метиловых эфиров свободных жирных кислот в сыворотке крови здоровых мужчин 40—49 лет, рассчитанные с помощью внутреннего стандарта. Видно, что наиболее высокие концентрации имеют олеиновая (C<sub>18:1</sub>), линолевая (C<sub>18:2</sub>) и пальмитиновая (C<sub>16:0</sub>) кислоты. Особый интерес представляют данные о содержании метиловых эфиров полиненасыщенных жирных кислот, поскольку из анализа их величин, например, могут быть получены сведения о соотношении семейств п6 и п3 полиненасыщенных жирных кислот (*n* — число углеродных атомов, отделяющих двойную связь от метильной группы). Отметим, что соотношение п6/п3=7—8 считается оптимальным

[1] и характерно для здоровых людей. В нашем случае п6/п3=7,43.

В заключение можно указать, что использование масс-селективного детектора позволило установить ряд особенностей масс-спектров метиловых эфиров жирных кислот. В табл. 3 приведены данные об основных осколочных и молекулярных ионах, характерных для масс-спектров метиловых эфиров жирных кислот. Видно, что набор осколочных ионов для насыщенных жирных кислот резко отличается от набора для ненасыщенных, причем в ряду последних он варьирует в зависимости от количества двойных связей. Это обстоятельство может быть дополнительно использовано при идентификации получаемых хроматографических пиков только на основании осколочных ионов при электронном ударе.

Таким образом, газохроматографический анализ метиловых эфиров свободных жирных кислот по модифицированной методике позволил установить полный набор свободных жирных кислот сыворотки крови. Определены средние времена удержания хроматографических пиков и средние концентрации метиловых эфиров жирных кислот. Проведенный масс-спектрометрический анализ метиловых эфиров полиненасыщенных жирных кислот показал, что каждый хроматографический пик может быть дополнительно описан характерным масс-спектром, что является подтверждением идентификации метиловых эфиров свободных жирных кислот.

Таблица 3

Основные массы, характерные для спектров метиловых эфиров жирных кислот сыворотки крови человека

Кислота	Массы метиловых эфиров, Да				
C <sub>14:0</sub>	74	87	143	199	242
C <sub>15:0</sub>	74	143	227	256	
C <sub>16:2</sub>	67	157	266		
C <sub>16:1</sub>	55	110	123	236	268
C <sub>16:0</sub>	74	87	143	270	
C <sub>17:0</sub>	74	87	143	185	241 284
C <sub>18:3</sub>	41	79	106	119	135 150 292
C <sub>18:2</sub>	67	81	109	123	150 294
C <sub>18:1</sub>	41	55	69	83	109 111 152 264 296
C <sub>18:0</sub>	74	87	129	143	222 255 298
C <sub>20:5</sub>	41	79	91	133	316
C <sub>20:4</sub>	41	79	106	119	332
C <sub>20:3</sub>	41	67	107	320	
C <sub>20:2</sub>	67	109	322		
C <sub>20:1</sub>	55	69	111	324	
C <sub>20:0</sub>	74	143	326		
C <sub>22:6</sub>	40	55	67	79	91 93 105 119 342
C <sub>22:5</sub>	41	79	91	105	119 344
C <sub>22:2</sub>	67	109	350		
C <sub>22:1</sub>	43	55	69	11	123 352
C <sub>22:0</sub>	74	87	143	255	354
C <sub>24:0</sub>	74	143	283	382	

## ЛИТЕРАТУРА

1. Левачев М. М. // Всесоюзный симпозиум по биохимии липидов, 2-й: Тезисы докладов.— Алма-Ата, 1987.— С. 10.
2. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G. // J. biol. Chem.— 1957.— Vol. 226.— P. 497—509.
3. Lepage G., Roy C. C. // J. Lipid. Res.— 1988.— Vol. 29.— P. 227—235.
4. Salo M. K., Gey F., Nikkari T. // J. Vitam. Nutr. Res.— 1986.— Vol. 56.— P. 231—239.
5. Tserng K. J., Kliegman R. M., Miettinen E. L., Kalhan S. // J. Lipid. Res.— 1981.— Vol. 22.— P. 852—858.

Поступила 04.07.92

## ESTIMATION OF FREE FATTY ACIDS IN BLOOD SERUM BY MEANS OF CHROMATOMASS-SPECTROMETRIC PROCEDURE.

A. I. Rezvukhin, I. Yu. Shalaurova, I. A. Potapova, I. A. Alyabyeva

Institute of Therapy, Siberian Branch of the Academy of Medical Sciences of the Russian Federation, Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Branch of the Academy of Sciences of the Russian Federation, Novosibirsk.

Complete analysis of blood serum free fatty acids was carried out after methylation of the acids in the mixture containing methanol-acetyl chloride 50:1 and subsequent evalua-



tion of their methyl esters using a gas chromatography analyser. Standard mixtures of free fatty acids and their methyl esters were analyzed before study of blood serum free fatty acids; composition of fish-liver oil (Far Eastern mackerel), containing definite fatty acids was also studied. Combination of gas chromatography and mass spectrometry enabled to identify all the free fatty acids and to detect their main characteristics (time of retention, typical mass spectrum).

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.151.16-074:543.544

С. Э. Рабинович, Л. В. Платонова, Т. Г. Дюжева

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛИКОЗИЛИРОВАННОГО ГЕМОГЛОБИНА МЕТОДОМ АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ НА БОРФЕНИЛАГАРОЗЕ

Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова

Гликозилированный гемоглобин ( $Hb A_1$ ) представляет собой продукт посттрансляционного неферментативного взаимодействия редуцирующих сахаров с аминокруппами аминокислотных остатков  $\beta$ -цепей нативного гемоглобина ( $Hb$ ) с образованием кетоаминной связи. Эта реакция протекает через начальный этап образования между аминокруппой белка и альдегидной группой гексозы основания Шиффа или альдимины, который вследствие перегруппировки Амадори превращается в стабильную кетоаминную форму [8, 16]. Как показали исследования,  $Hb A_1$  не является однородным, а состоит из трех фракций:  $Hb A_{1a}$ ,  $Hb A_{1b}$  и  $Hb A_{1c}$  [23], из которых последняя является преобладающей, составляя в норме 4–6 % от общего  $Hb$  [15], и представляет собой наибольший интерес в клинической практике.

Величина  $Hb A_{1c}$  является показателем уровня гликемии у больных сахарным диабетом и может быть использована для оценки их клинического состояния, компенсации или декомпенсации течения заболевания, нарушения толерантности к глюкозе и патологических изменений углеводного обмена [5]. Это объясняется тем фактом, что величина  $Hb A_{1c}$  представляет собой интегральный показатель уровня гликемии, отражая ее длительный устойчивый характер, определяемый временем полужизни эритроцита (120 дней) и не подверженный резким колебаниям в течение короткого промежутка времени, характерным для уровня глюкозы в крови [5]. Оценивая степень клинической тяжести диабета, величина  $Hb A_{1c}$  может отражать общий уровень гликозилирования белков организма, которые вносят свой вклад в развитие ряда ангиопатий [2]. Показана хорошая корреляция между содержанием  $Hb A_{1c}$  в эритроцитах и утолщением почечных гломерулярных базальных мембран [17], что является результатом гликозилирования входящих в их состав белков, а также с уровнем гликозилирования белков плазмы крови [19]. Повышение величины  $Hb A_{1c}$  имеет место у больных при кистозном фиброзе [22], различных гематологических заболеваниях [9], хронической почечной недостаточности [7].

В связи с клинической важностью оценки уровня  $Hb A_{1c}$  особое значение приобретает методика его определения. В настоящее время из-

вестны методы определения данного показателя, основанные на принципах хроматографии (ионообменной — ИОХ, жидкостной под высоким давлением, аффинной), электрофореза, изоэлектрофокусирования (ИЭФ), иммунохимии, колориметрии кетосахаров после гидролиза их кетоаминной связи с  $Hb$  [5].

Наиболее распространенным методом определения  $Hb A_{1c}$  является ИОХ на катионообменнике «Bio—Rex 70» [25]. Недостатками данного метода являются большая зависимость элюции  $Hb A_{1c}$  от температуры, ионной силы элюирующего буфера и практически однократное использование самого катионообменника. Хорошие результаты, по данным литературы, дают методы высокоэффективной жидкостной хроматографии [6] и ИЭФ [24], однако для их выполнения необходима специальная аппаратура, не всегда имеющаяся в распоряжении исследователей или клинической лаборатории. Радиоиммунологический метод [18] достаточно трудоемок и не обладает высокой специфичностью [5], поскольку может давать перекрестные реакции с различными, в том числе ацетилированными, формами  $Hb$ .

Колориметрический метод идентификации сахаров при образовании ими комплекса с тиобарбитуровой кислотой после кислотного гидролиза кетоаминной связи [3, 13] отличается достаточной простотой и хорошо коррелирует с методом ИОХ [1]. Однако данный метод не является специфичным, так как конечный результат может быть искажен наличием в пробе крови свободных редуцирующих сахаров и других гликозилированных белков, например альбумина плазмы [5].

Анализ существующих методик показывает, что проблема разработки простого эффективного специфического метода определения данного показателя остается все еще достаточно актуальной.

Описанный в литературе метод определения  $Hb A_{1c}$  с помощью аффинной хроматографии [21], основанный на способности углеводных остатков взаимодействовать с борной кислотой [12], не получил широкого распространения в исследовательской и клинической практике [5]. Однако, на наш взгляд, он может представлять удобный, хорошо воспроизводимый и специфичный метод. Целью представленной работы является описание метода определения  $Hb A_{1c}$  с помощью аффинной хроматографии при использовании в качестве сорбента борфенилагарозы.

**Методика.** В работе использовали борфенилагарозу («Кемотекс», Эстония), представляющую собой суспензию геля (размер гранул 50–150 мкм) с содержанием борфенильных групп 40–66 мкмоль/мл, очищенный препарат  $Hb A_{1c}$  («Sigma», США), тритон X-100 («Merck», Германия), диагностический набор для определения  $Hb A_{1c}$  («Boehringer», Австрия); остальные использованные реактивы отечественного производства.

Использовали эритроциты больных инсулинзависимым сахарным диабетом различной тяжести, сопровождающимся в большинстве случаев ангиопатическими осложнениями и лабильным течением, а также доноров.

Эритроциты получали из венозной гепаринизированной крови, взятой натощак. После осаждения эритроцитов с помощью центрифугирования (3000 об/мин в течение 15 мин) их отмывали физиологическим раствором и подвергали гемолизу в 0,1 % растворе тритона X-100, для чего к 0,9 мл гемолизирующего раствора добавляли 0,1 мл отмывтой эритроцитной массы и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Полученный гемолизат использовали для определения содержания  $Hb A_{1c}$ .

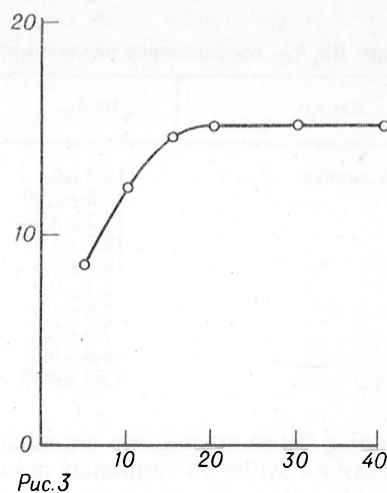
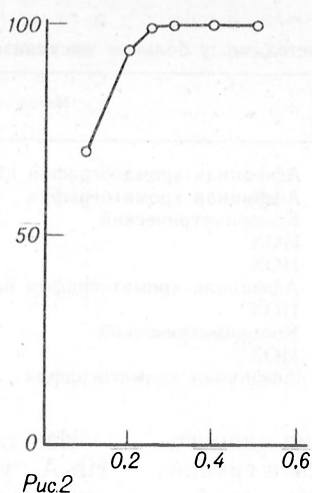
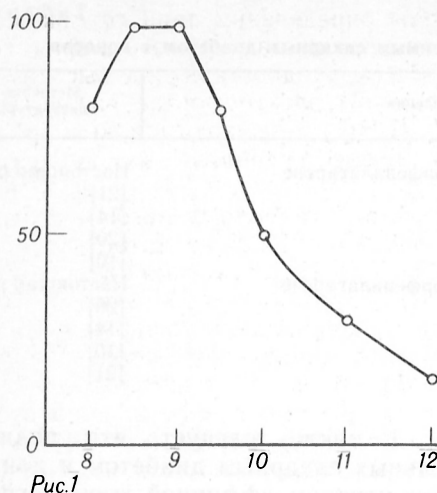


Рис. 1. Сорбция Hb A<sub>1c</sub> на борфенилагарозе в зависимости от pH сорбирующего буфера.

По оси абсцисс — величина pH сорбирующего буфера; по оси ординат — величина Hb A<sub>1c</sub>.

Рис. 2. Элюция Hb A<sub>1c</sub> с борфенилагарозы в зависимости от концентрации сорбитола в элюирующем буфере (0,1 М трис-HCl pH 8,5).

По оси абсцисс — концентрация сорбитола в элюирующем буфере, М; по оси ординат — доля элюированного с борфенилагарозы Hb A<sub>1c</sub> относительно количества Hb A<sub>1c</sub>, нанесенного на колонку с сорбентом, %.

Рис. 3. Содержание Hb A<sub>1c</sub> в зависимости от соотношения объемов сорбента и гемолизата эритроцитов больного инсулинозависимым сахарным диабетом.

По оси абсцисс — отношение объема сорбента к объему нанесенного на колонку гемолизата эритроцитов; по оси ординат — содержание Hb A<sub>1c</sub>, %.

Количественное определение Hb A<sub>1c</sub> проводили методом колоночной аффинной хроматографии на борфенилагарозе. Колонку с сорбентом (объемом 1 мл) уравнивали 0,1 М ацетатным буфером pH 8,75, содержащим 0,1 М MgCl<sub>2</sub> (сорбирующий буфер). В колонку вносили 0,05 мл раствора гемолизата эритроцитов, затем добавляли 0,1 мл сорбирующего буфера, промывали этим же раствором в количестве 15,0 мл. Сорбированный на борфенилагарозе Hb A<sub>1c</sub> элюировали 5 мл 0,1 М трис-HCl-буфером pH 8,5, содержащем 0,3 М сорбитол (элюирующий буфер). Величину оптической плотности полученных фракций общего Hb и Hb A<sub>1c</sub> измеряли против дистиллированной воды при длине волны 415 нм, характеризующей максимальную оптическую плотность гема [23]. Содержание Hb A<sub>1c</sub> определяли по следующей формуле:

$$\text{Hb A}_{1c}, \% = \frac{\Delta A_2}{3 \cdot \Delta A_1 + \Delta A_2} \times 100,$$

где  $\Delta A_2$  — оптическая плотность фракции Hb A<sub>1c</sub> (объем 5 мл);  $\Delta A_1$  — оптическая плотность фракции общего Hb (объем 15 мл).

Регенерацию борфенилагарозы осуществляли 0,1 н. HCl (5 мл), после чего колонку с сорбентом (1 мл) промывали 10 мл 0,001 н. HCl и хранили в этом растворе при 4°C.

Определение содержания Hb A<sub>1c</sub> методом ИОХ на «Bio-Rex 70» проводили, используя диагностический набор фирмы «Boehringer» (Австрия). Отработку условий сорбции и элюции Hb A<sub>1c</sub> на борфенилагарозе проводили, используя стандартный препарат Hb A<sub>1c</sub>.

Коэффициент корреляции ( $r$ ) между значениями Hb A<sub>1c</sub>, полученными методами аффинной хроматографии и ИОХ, рассчитывали по формуле Пирсона [4].

**Результаты и обсуждение.** Исследование pH-зависимости адсорбции Hb A<sub>1c</sub> на борфенилагарозе показало (рис. 1), что данный процесс в значительной степени зависит от pH сорбирующего буфера, достигая своего максимального значения в довольно узком интервале значений этого показателя (pH 8,5—9,0). В дальнейшем сорбцию Hb A<sub>1c</sub> осуществляли при pH 8,75.

Известно, что ряд спиртов, в частности сорбитол [12, 21], способствует разрушению комплекса

гликозилированных белков с производными борной кислоты. Как следует из рис. 2, элюция Hb A<sub>1c</sub> с борфенилагарозы в присутствии сорбитола зависит от концентрации этого вещества. Полная элюция Hb A<sub>1c</sub> наступает в пределах концентраций сорбитола 0,25—0,5 М в элюирующем буфере.

При подборе условий для определения Hb A<sub>1c</sub> методом аффинной хроматографии нами было проведено исследование зависимости данной величины от количества наносимого на борфенилагарозу гемолизата эритроцитов в связи с возможным влиянием емкости сорбента на величину сорбции Hb A<sub>1c</sub>. Как видно из рис. 3, максимальное значение Hb A<sub>1c</sub> определяли при соотношении объема сорбента к объему гемолизата, равном 20—40. Снижение этого отношения, т. е. увеличение объема гемолизата, приводило к снижению величины Hb A<sub>1c</sub>, что, вероятно, связано с неполным связыванием Hb A<sub>1c</sub> с борфенилагарозой. В дальнейшем при определении Hb A<sub>1c</sub> методом аффинной хроматографии мы остановились на соотношении объема сорбента к объему гемолизата, равном 20, и наносили на колонку с борфенилагарозой объемом 1 мл гемолизат в количестве 0,05 мл. При нанесении этого количества образца гемолизата эритроцитов на колонку полное удаление несорбированного общего Hb достигали при промывании сорбента 15 мл сорбирующего буфера, а полной элюции сорбированной фракции Hb A<sub>1c</sub> — 5 мл элюирующего буфера. В обоих случаях контроль за этими процессами осуществляли по исчезновению поглощения вытекающей из колонки жидкости при 415 нм против дистиллированной воды.

Используя установленные оптимальные условия сорбции и элюции Hb A<sub>1c</sub> при применении борфенилагарозы в качестве сорбирующего мате-

Содержание Hb A<sub>1c</sub>, определенное различными методами, у больных инсулинзависимым сахарным диабетом и доноров

Диагноз	Hb A <sub>1c</sub> , %	Метод определения	Источник литературы
Сахарный диабет	12,3±0,4	Аффинная хроматография на борфенилагарозе	Настоящая работа
	15,5±2,96	Аффинная хроматография	[21]
	13,2±2,3	Колориметрический	[14]
	12,5±5,5	ИОХ	[20]
	10,8±0,3	ИОХ	[10]
Доноры	5,4±0,2	Аффинная хроматография на борфенилагарозе	Настоящая работа
	7,5±1,5	ИОХ	[20]
	7,0±0,9	Колориметрический	[14]
	6,6±0,3	ИОХ	[10]
	7,65±0,49	Аффинная хроматография	[21]

риала, нами было проведено определение данного показателя в группе 20 здоровых доноров и группе 56 больных инсулинзависимым сахарным диабетом с длительностью заболевания от 3 до 18 лет на фоне генерализованной микроангиопатии. Полученные результаты представлены в табл. 1. Величины Hb A<sub>1c</sub>, определенные предлагаемым методом аффинной хроматографии у здоровых доноров и больных инсулинзависимым сахарным диабетом, соответствуют данным литературы по определению Hb A<sub>1c</sub> другими методами. Среди обследованной нами группы больных максимальные значения Hb A<sub>1c</sub> получены колориметрическим методом у больных с тяжелой формой течения диабета [3]. Из представленных результатов видно, что величина Hb A<sub>1c</sub>, полученная методом аффинной хроматографии на борфенилагарозе, более чем в 2 раза превышает данный показатель у доноров. Этот факт согласуется с данными литературы, свидетельствующими о 2—3-кратном превышении содержания Hb A<sub>1c</sub> у больных сахарным диабетом по сравнению с контролем [1, 25].

Таблица 2

Содержание Hb A<sub>1c</sub>, определенное методами аффинной хроматографии на борфенилагарозе и ИОХ на «Bio-Rex 70», у больных инсулинзависимым сахарным диабетом и доноров

Обследуемый	Hb A <sub>1c</sub> , %	
	аффинная хроматография	ИОХ
<b>Больные сахарным диабетом</b>		
П.	9,9	10,3
Ч.	11,8	11,0
М.	12,8	12,4
Д.	10,6	10,9
Я.	15,1	15,5
Г.	11,2	10,5
К.	16,7	16,2
З.	8,2	8,6
В.	9,5	10,0
Н.	14,8	13,9
Л.	7,3	8,1
И.	11,0	11,3
Е.	11,0	10,3
Ж.	13,8	15,1
С.	15,6	14,8
<b>Доноры</b>		
А.	5,3	6,0
Б.	5,7	6,4
В.	4,3	4,9
Г.	4,6	5,2
Д.	5,6	6,1

Из табл. 1 также следует, что величины Hb A<sub>1c</sub> у больных сахарным диабетом и доноров, определенные методом аффинной хроматографии в работе [21], несколько превышают таковое, полученное нами с использованием борфенилагарозы. Это может быть связано с сорбцией на борфенилагарозе CL6B, используемой в вышеуказанной работе в качестве сорбента [21], лабильных альдиминовых фракций Hb A<sub>1c</sub>, элюируемых вместе с кетоаминной фракцией Hb A<sub>1c</sub> сорбитолом. В пользу этого предположения свидетельствует факт наличия множественных полос различных форм Hb A<sub>1</sub>, обнаруженных в элюируемой сорбитолом фракции с борфенилсефарозы CL6B методом ИЭФ [21]. Доказательство отсутствия связывания лабильных фракций Hb A<sub>1</sub> с борфенилагарозой в разработанных нами условиях приведено ниже после сравнительного анализа результатов определения Hb A<sub>1c</sub> методами аффинной хроматографии на борфенилагарозе и ИОХ на «Bio-Rex 70».

В табл. 2 представлены результаты, свидетельствующие о хорошем совпадении величины Hb A<sub>1c</sub>, определенных двумя разными методами у больных диабетом и доноров ( $r=0,98$ ). В свою очередь, значения Hb A<sub>1c</sub>, определенные методом ИОХ на «Bio-Rex 70», по данным литературы, наиболее достоверно коррелируют с таковыми, полученными другими методами ( $r=0,97—0,98$ ) [1]. Хорошая корреляция представленных нами данных может быть объяснена тем фактом, что методом ИОХ с использованием наборов фирмы «Boehringer» определяют только стабильную кетоаминную форму Hb A<sub>1c</sub>, поскольку в состав гемолизирующего раствора входит вещество, элиминирующее лабильные альдиминовые фракции Hb A<sub>1c</sub>. Можно предположить, что эти лабильные фракции в нашем исследовании не связываются с борфенилагарозой в отличие от кетоаминной формы Hb A<sub>1c</sub>.

Для подтверждения этого предположения нами было проведено сравнительное определение величины Hb A<sub>1c</sub> у одного из больных инсулинзависимым сахарным диабетом методом аффинной хроматографии до и после диализа гемолизата эритроцитов против дистиллированной воды для диссоциации альдиминовой связи в лабильных фракциях Hb A<sub>1c</sub> [11]. Одновременно провели определение Hb A<sub>1c</sub> в том же гемолизате эритроцитов после его выдерживания в течение 20 ч при комнатной температуре. В этих условиях возрастает вероятность образования дополнительной альдиминовой связи между свободными аминогруппами Hb и альдегидной группой эндогенных



Таблица 3

Содержание Hb A<sub>1c</sub> при различных условиях обработки гемолизата эритроцитов больного инсулинзависимым сахарным диабетом

Условия обработки гемолизата эритроцитов	Hb A <sub>1c</sub> , %
Без обработки	9,4
После диализа	9,5
Через 20 ч инкубации при комнатной температуре	9,7

Примечание. Диализ гемолизата эритроцитов проводили против 1000-кратного объема дистиллированной воды в течение 20 ч при комнатной температуре.

гексоз [11, 16]. Как видно из табл. 3, полученные значения Hb A<sub>1c</sub> практически не отличаются друг от друга, что указывает на отсутствие взаимодействия лабильных альдиминовых форм Hb A<sub>1c</sub> с борфенилагарозой в наших условиях.

Специфичность метода аффинной хроматографии наряду с избирательной сорбцией кетоаминной фракции Hb A<sub>1c</sub> на борфенилагарозе определяется еще и спектрофотометрической детекцией гема, имеющего максимальную величину оптической плотности при длине волны 415 нм [23]. Это обстоятельство позволяет избежать искажения результатов анализа за счет присутствия других гликозилированных белков эритроцитов или плазмы крови.

Таким образом, проведенное исследование позволило предложить достаточно удобный, хорошо воспроизводимый и специфичный метод определения Hb A<sub>1c</sub>, который может быть рекомендован для широкого использования в исследовательской и клинической практике. Величина Hb A<sub>1c</sub>, определенная данным методом, не изменяется при хранении отмойной эритроцитарной массы при -20 °C в течение месяца. Установлено также, что одна порция сорбента (1 мл), применяемая при описанных в статье условиях, может быть использована по крайней мере для 30 определений Hb A<sub>1c</sub>.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гриншпун М. Н., Галенок В. А., Мазовецкий А. Г., Диккер В. У. // Лаб. дело.— 1988.— № 2.— С. 51—54.
2. Ефимов А. С. Диабетические ангиопатии.— М., 1989.
3. Карпова Е. А., Городецкий В. К. // Вопр. мед. химии.— 1989.— Т. 35, № 1.— С. 122—127.
4. Славин М. Б. Методы системного анализа в медицинских исследованиях.— М., 1989.— С. 15—20.
5. Горосян Ф. Г., Титов В. Н., Мазовецкий А. Г., Завадский П. С. // Лаб. дело.— 1988.— № 8.— С. 3—8.

6. Bise B., Wieland H. // J. Chromatogr.— 1988.— Vol. 434, N 1.— P. 95—111.
7. Boer M. J., Miedema K., Casparie A. F. // Diabetologia.— 1980.— Vol. 18.— P. 437—440.
8. Bunn H. F., Haney D. N., Gabbay K. H. et al. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1975.— Vol. 67, N 1.— P. 103—109.
9. Bunn H. F., Haney D. N., Kamin S. et al. // J. clin. Invest.— 1976.— Vol. 58.— P. 820—824.
10. Chon J., Robinson C. A., Siegel A. // Clin. Chem.— 1978.— Vol. 24, N 10.— P. 1708—1710.
11. Drabkin D. L. // Arch. Biochem.— 1949.— Vol. 29.— P. 224—231.
12. Duncan R. E., Gilham P. T. // Analyt. Biochem.— 1975.— Vol. 66.— P. 532—539.
13. Fluckiger R., Winterhalter K. H. // FEBS Lett.— 1976.— Vol. 71.— P. 356—360.
14. Gabbay K. H., Hostly K., Breslow J. L. // J. clin. endocr.— 1977.— Vol. 44, N 5.— P. 59—65.
15. Gonen B., Rubenstein A. H. // Diabetologia.— 1979.— Vol. 15, N 1.— P. 1—8.
16. Holmquist W. R., Schroeder W. A. // Biochemistry.— 1966.— Vol. 5.— P. 2489—2503.
17. Jackson R. L., Esterly J. A., Guthrie R. A. et al. // J. A. M. A.— 1982.— Vol. 246.— P. 2143—2147.
18. Javid J., Pettis P. K., Koenig R. J., Cerami A. // Brit. J. Haemat.— 1978.— Vol. 38.— P. 329—337.
19. Kennedy A. L., Kandel T. W., Marimee T. J. // Diabetes.— 1979.— Vol. 28.— P. 1005—1010.
20. Kynoch P. A. M., Lehmann H. // Lancet.— 1977.— Vol. 2.— P. 16.
21. Mallia A. K., Hermanson G. T., Krohn R. I. et al. // Analyt. Lett.— 1981.— Vol. 14, N B8.— P. 649—661.
22. Paulsen E. J., Koury M. // Diabetes.— 1976.— Vol. 26.— P. 890—896.
23. Schnek A. G., Schroeder W. A. // J. Amer. chem. Soc.— 1961.— Vol. 83, N 6.— P. 1472—1478.
24. Schoos R., Sogoos-Barlette S., Lambotte C. // Clin. chim. Acta.— 1978.— Vol. 86, N 1.— P. 61—65.
25. Trivelli L. A., Raanney H. M., Lai H. T. // New Engl. J. Med.— 1971.— Vol. 284.— P. 353—357.

Поступила 14.11.91

#### ESTIMATION OF GLYCOSYLATED HEMOGLOBIN BY MEANS OF AFFINITY CHROMATOGRAPHY ON BORON PHENYLARGAROSE.

S. E. Rabinovich, L. V. Platonova, T. G. Dyuzheva

I. M. Sechenov Medical Academy, Moscow.

When Hb A<sub>1c</sub> was estimated by affinity chromatography where boron phenylargarose was used as a sorbent, the highest rate of Hb A<sub>1c</sub> binding with the sorbent was detected at pH 8.5–9.0 while the maximal elution of the protein occurred at 0.3–0.5 M concentration of sorbitol used as an eluent. Content of Hb A<sub>1c</sub>, estimated in 56 patients with insulin-dependent diabetes mellitus, constituted  $12.3 \pm 0.4$  %, while in 20 healthy volunteers it was equal to  $5.4 \pm 0.2$  %, which are consistent with the literature data obtained by other methods. At the same time, the data of Hb A<sub>1c</sub> estimation by means of affinity chromatography correlated exactly with the results of ion exchange chromatography ( $r=0.98$ ), thus corroborating the validity of the procedure used. Only the stable ketoamine fraction of Hb A<sub>1c</sub> was found to interact with boron phenylargarose.

УДК 616-008.9:92 Коровкин

**БОРИС ФЕДОРОВИЧ КОРОВКИН** (к 70-летию со дня рождения)



Борис Федорович Коровкин — видный ученый, специалист в области общей и клинической биохимии. Он родился 1 мая 1923 г. В 1946 г. окончил лечебный факультет Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова, а в 1953 г. — факультет усовершенствования этой же академии по специальности «биологическая химия». До августа 1983 г. служил в Вооруженных Силах СССР, последняя его должность — начальник кафедры биологической химии Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова. С сентября 1983 г. по январь 1989 г. Б. Ф. Коровкин был директором Института медицинской энзимологии АМН СССР, с января 1989 г. он руководитель лаборатории энзимологии экстремальных состоя-

ний Института биологической и медицинской химии РАМН.

Основные направления научной деятельности Б. Ф. Коровкина — клиническая энзимология, биохимия и патохимия мышц, биохимия экстремальных состояний. Им опубликовано свыше 200 научных работ, среди которых 5 монографий, 7 руководств и учебник «Биологическая химия» (в соавторстве с Т. Т. Березовым) для медицинских институтов. В монографиях «Ферменты в диагностике инфаркта миокарда» и «Введение в клиническую энзимологию» им впервые в отечественной литературе было рассмотрено диагностическое значение диагностических программ. За монографию «Биохимия мышц» (в соавторстве) Б. Ф. Коровкин был удостоен именной премии В. С. Гулевича. Руководство «Биохимические исследования в клинике» (в соавторстве) отмечено дипломом министра здравоохранения СССР, а 2-е издание данного руководства удостоено премии им. С. П. Боткина. В 1992 г. учебник «Биологическая химия» (2-е издание) переведен на английский язык (издательство «Мир»).

Борис Федорович ведет активную научно-организационную работу. Под его руководством и при его консультациях выполнено и защищено свыше 30 кандидатских и докторских диссертаций. В настоящее время в руководимой им лаборатории интенсивно исследуется роль системы фруктозо-2,6-бисфосфата в регуляции метаболизма клетки в норме и при патологии.

Широкая общественность знает Б. Ф. Коровкина не только как ученого, но и как способного популизатора науки, прочитавшего большое количество лекций и докладов. Он активный сторонник развития международного научного сотрудничества, президент союза научных обществ клинической лабораторной диагностики.

В тяжелые для Родины годы Великой Отечественной войны ученый был среди ее защитников. Многогранная деятельность Б. Ф. Коровкина, ученого и организатора, его труд отмечен государственными наградами: орденом Красной Звезды, орденом Отечественной войны II степени, медалями.

Редакционная коллегия журнала «Вопросы медицинской химии» поздравляет Бориса Федоровича Коровкина с юбилеем и желает ему здоровья и долгих лет плодотворной научной деятельности.

## СОДЕРЖАНИЕ

### Обзоры

- Соловьев Д. А. Тромбиноподобные ферменты змеиных ядов 3  
Орлов Е. Н., Антипов Е. М., Николаев Н. Н. Некоторые аспекты получения стероидных профилей мочи . . . . . 7

### Оригинальные статьи

- Седлакова А., Коллар И., Ондрейкова М., Рыникова А., Роздобудькова В., Питкова С. Влияние ролитетрациклина на уровень неэтерифицированных жирных кислот, фосфоли-

## CONTENTS

### Review

- Solov'ev, D. A. Thrombin-like enzymes from snake venoms 3  
Orlov, E. N., Antipov, E. M., Nikolaev, N. N. Some problems in the development of urine steroid profiles 7

### Original Papers

- Sedlakova, A., Kollar, J., Ondreykova, M., Rynikova, A., Rozdobudkova, V., Pitkova, S. Influence of rolytetracycline on content of unesterified fatty acids, phospholipids