

ТОМ 40

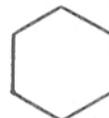
ВЫПУСК 1

ЯНВАРЬ — ФЕВРАЛЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

# ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



---

## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

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

---

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

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

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



© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616.155.33-008.922.1-07

Н. К. Зенков, М. И. Душкин, Г. Ю. Любимов,  
Е. Б. Меньщикова**ИЗМЕНЕНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА МАКРОФАГОВ ПРИ ТРАНСФОРМАЦИИ В ПЕНИСТЫЕ КЛЕТКИ**

Институт общей патологии и экологии человека, Новосибирск

Появление в интима артерий перегруженных эстерифицированным холестерином пенистых клеток преимущественно моноцитарно-макрофагального происхождения является одним из характерных признаков развития атеросклероза [7, 10, 11, 22]. Накопление холестерина и его окисленных производных в макрофагах приводит к изменению их функциональных свойств, таких как окислительный метаболизм, фагоцитоз, хемотаксис и биосинтез цитокинов [17, 20]. Изучению окислительного метаболизма, связанного со способностью клеток к развитию дыхательного, или метаболического, «взрыва» и наработке активированных кислородных метаболитов (АКМ:  $O_2$ ,  $H_2O_2$ ,  $HO$ ,  $OCI^-$  и др.) уделяется особое внимание в исследованиях последних лет. С одной стороны, это связано с тем, что образованию АКМ отводится ведущая роль в поражении эндотелиальных клеток и нарушении проницаемости сосудов при атеросклерозе [16]. С другой стороны, радикальные окислительные процессы с участием АКМ играют главную роль в окислительной модификации липопротеидов низкой плотности (ЛНП), инициирующих развитие этого заболевания [11, 22].

Имеются данные, что в условиях гиперхолестеринемии у кроликов наблюдается усиление наработки АКМ альвеолярными макрофагами [19], в то же время метаболическая активность циркулирующих в крови гранулоцитов снижена [12]. Определенная неоднозначность радикальных окислительных процессов наблюдается у больных атеросклерозом, что проявляется в угнетении активности процессов перекисного окисления липидов в сыворотке [2] и их усилении в интима и меди пораженных сосудов [3], увеличении метаболической активности выделенных гранулоцитов крови, которая в присутствии сыворотки снижается [13].

Культивирование *in vitro* макрофагов в присутствии ацетилированных липопротеидов является удобной экспериментальной моделью изучения их трансформации в пенистые клетки [7, 10]. В настоящей работе с помощью хемилюминесценции (ХЛ) проведено изучение состояния окислительного метаболизма перитонеальных макрофагов мышей при их трансформации в пенистые клетки.

Методика. В работе использованы мышгибриды  $F_1$  (СВА $\times$ С57В1/6) из питомника РАМН «Столбовая» массой 16—18 г. Для получения перитонеальных макрофагов мышам внутрибрюшин-

но вводили по 1 мл 6 % тиогликолевого бульона. Через 3 сут брюшную полость мышей промывали охлажденной средой 199, клетки дважды отмывали и ресуспендировали в концентрации  $2 \cdot 10^6$  клеток/мл в среде RPMI-1640 производства НПО «Вектор» с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и 15 мкг/мл гентамицина. Суспензии клеток разливали по 2 мл в пластиковые чашки диаметром 40 мм, после 1 ч инкубации не прикрепившиеся клетки удалялись двукратным промыванием средой, к полученному монослою макрофагов добавляли 2 мл культуральной среды, не содержащей (контроль) либо содержащей (опыт) 50 мкг/мл ацетилированных ЛНП (ацетил-ЛНП), и культивировали при 37 °С и 95 % влажности в атмосфере 5 %  $CO_2$  в течение 24 и 48 ч [4].

Ацетил-ЛНП получали из липопротеидов низкой плотности (1,019—1,055 г/мл), выделенных ультрацентрифугированием из плазмы доноров, посредством ацетилирования с уксусным ангидридом [1, 9].

Включение  $^{14}C$ -олеата в эфиры холестерина макрофагов определяли по описанному ранее методу [1]: макрофаги инкубировали в среде RPMI-1640, содержащей 0,2 % бычий сывороточный альбумин (БСА), 2 мМ L-глутатиона, 0,2 мМ связанного с БСА  $^{14}C$ -олеата, 50 мкг/мл ацетил-ЛНП и 50 мкг/мл свободного холестерина в течение 4 ч, после чего промывали и экстрагировали липиды смесью гексан — изопропанол в объемном соотношении 3:2. Эфиры холестерина разделяли с помощью тонкослойной хроматографии на силикагеле Н и радиоактивность подсчитывали в толуольном сцинтилляторе в жидкостном сцинтилляционном счетчике «Mark-3» («Tracor Analytical», США). Результаты выражали в найомолях эстерифицированного олеата на 1 мг белка.

Содержание свободного холестерина и общего холестерина в макрофагах определяли энзиматическим методом, адаптированным для клеточных культур [15], с помощью реактивов фирмы «Boehringer Mannheim» (Германия).

Таблица 1

Содержание холестерина и его эфиров и включение  $^{14}C$ -олеата в макрофагах при инкубации с ацетил-ЛНП низкой плотности ( $n=6$ )

Условия инкубации	Время инкубации, ч	Содержание холестерина, мкг на 1 мг клеточного белка		Включение $^{14}C$ -олеата в эфиры холестерина в течение 4 ч инкубации, нмоль
		свободный холестерин	эфиры холестерина	
Контроль	24	16,94 $\pm$ 0,32	0,52 $\pm$ 0,06	4,56 $\pm$ 0,063
Ацетил-ЛНП, 50 мкг/мл	24	25,87 $\pm$ 1,33*	38,12 $\pm$ 2,63*	56,41 $\pm$ 4,35*
Контроль	48	18,24 $\pm$ 0,38	0,44 $\pm$ 0,05	3,62 $\pm$ 0,07
Ацетил-ЛНП, 50 мкг/мл	48	33,27 $\pm$ 1,49*	55,61 $\pm$ 5,71*	48,31 $\pm$ 3,31*

Примечание. Здесь и в табл. 2 звездочка —  $p < 0,001$  относительно контроля.

Интенсивность ХЛ макрофагов при их инкубации с ацетил-ЛП ( $n=5$ )

Условия инкубации	Время инкубации, ч	ХЛ с люминолом		ХЛ с люцигенином	
		спонтанная, имп	индуцированная, имп · 10 <sup>3</sup>	спонтанная, имп	индуцированная, имп · 10 <sup>3</sup>
Контроль	24	397 ± 28	71,2 ± 3,2	1991 ± 271	340,5 ± 9,7
Ацетил-ЛНП, 50 мкг/мл	24	186 ± 20*	73,2 ± 6,0	1600 ± 440	328,8 ± 15,6
Контроль	48	321 ± 37	33,3 ± 1,7	4825 ± 654	186,5 ± 8,9
Ацетил-ЛНП, 50 мкг/мл	48	23 ± 9*	34,6 ± 3,5	152 ± 65*	168,2 ± 5,6

Концентрацию клеточного белка определяли после экстракции липидов из макрофагов методом Лоури.

ХЛ измеряли на хемилюминометре «Фотон» производства СОПКТБ СО ВАСХНИЛ по методу [4]. Для этого пластиковые чашки с монослоем клеток дважды промывали раствором Хенкса без фенолового красного, добавляли 2 мл этого раствора и помещали в термостатированную при 37 °С ячейку хемилюминометра. После 5 мин термостатирования в чашки добавляли 0,5 мл 10<sup>-3</sup> М раствора люминола ("Serva") или люцигенина ("Reanal") и в течение 3 мин регистрировали спонтанную ХЛ. Затем макрофаги стимулировали добавлением 0,2 мл суспензии (20 мг/мл) зимозана (Олайнский завод биопрепаратов), опсонизированного сывороткой мышей. После добавления стимулятора регистрировали интенсивность ХЛ до наступления максимума свечения.

Результаты и обсуждение. Культивирование макрофагов в течение 24 ч с ацетил-ЛНП приводило к значительному внутриклеточному накоплению холестерина и его эфиров и повышению скорости включения <sup>14</sup>C-олеата в эфиры холестерина в 12,4 раза по сравнению с контрольными клетками. Таким образом, уже через 24 ч инкубации макрофагов с модифицированными ЛНП клетки имели типичные биохимические признаки, характерные для пенистых клеток [9, 10]. Дальнейшая инкубация макрофагов с ацетил-ЛНП (48 ч) не сопровождалась увеличением скорости образования эфиров холестерина, однако приводила к еще большему повышению содержания свободного и эстерифицированного холестерина (табл. 1).

Анализ ХЛ макрофагов показал, что культивирование макрофагов с ацетил-ЛНП приводило к существенному снижению спонтанной ХЛ как с люминолом, так и с люцигенином по сравнению с контрольными значениями, полученными для клеток, среда культивирования которых не содержала ацетил-ЛНП (табл. 2). Механизм возникновения спонтанной ХЛ в настоящее время до конца не изучен; по имеющимся данным, выработка АКМ и ХЛ в покоящихся фагоцитах являются результатом митохондриального окисления [14]. Выявленное снижение интенсивности спонтанной ХЛ макрофагов в процессе культивирования с ацетил-ЛНП указывает на изменение энергетических механизмов клетки, вероятно, связанных с интенсивным использованием АТФ в процессе реэстерификации холестерина в пенистых клетках [9]. В результате такого изменения должно происходить угнетение АТФ-зависимых функциональных процессов, таких как хемотаксис и хе-

макрофагов и моноцитов в интима артерий при атерогенезе.

Сравнение индуцированной зимозаном ХЛ в присутствии люминола и люцигенина показало, что ацетил-ЛНП не влияет ни на динамику хемилюминесцентного ответа, ни на его интенсивность, хотя сам процесс культивирования приводил к двукратному снижению интенсивности ХЛ как в контроле, так и в опыте. Данный факт предвещает интерес в плане изучения механизмов метаболической активности фагоцитов. Действительно, в основе возникновения ХЛ лежат окислительные реакции с участием O<sub>2</sub> (ХЛ с люцигенином) и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, НОСl, O<sub>2</sub> (ХЛ с люминолом) [4]. Нарботка АКМ является конечным этапом каскада метаболических перестроек клеток и служит чувствительным показателем их функционального состояния [5]. В этом плане удивителен факт, что столь значительные изменения в макрофагах, которые ярко проявляются как биохимически, так и морфологически (липидные включения в цитоплазме клеток), не сказываются на развитии метаболического «взрыва». Этот факт позволяет утверждать, что внутриклеточное накопление ацетил-ЛНП в макрофагах не влияет на активность ферментов гексозомонофосфатного шунта, ответственных за восстановление НАДФ<sup>+</sup> при развитии дыхательного «взрыва» [5], на состояние мембран специфических гранул и цитоплазматической мембраны, на которых происходит сборка НАДФН-оксидазного комплекса при стимуляции клеток [8], существенно не изменяет внутриклеточную концентрацию Ca<sup>2+</sup> и метаболизм инозитолов, включающихся в процесс активации НАДФН-оксидазы [5, 23].

Выявленный дисбаланс процессов выработки АКМ и современные представления о механизмах антиоксидантной защиты позволяют предположить, что внутриклеточное накопление модифицированных ЛНП приводит к снижению спонтанной генерации АКМ клетками атеросклеротической бляшки и как следствие к снижению уровня ферментативных антиоксидантов (супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы), прямо зависящего от концентрации прооксидантов [6, 21]. Одновременно фагоцитирующие клетки, присутствующие в атеросклеротической бляшке, сохраняют способность к развитию дыхательного «взрыва», которая может реализовываться при взаимодействии фагоцитов с иммунными комплексами, компонентами активированного компонента, медиаторами воспаления, эндотоксинами [5]. Такая активация макрофагов (пенистых клеток) на фоне ослабленной антиоксидантной защиты может вызывать окислительное поражение как самих клеток атеросклеротической бляшки, так и

клеток эндотелия; в последующем в этот процесс включаются гранулоциты, обладающие еще большим окислительным потенциалом, чем макрофаги [13]. Вескими подтверждениями выдвинутой гипотезы являются, с одной стороны, выявленные факты снижения содержания ферментативных антиоксидантов в интиме и меди пораженных участков аорты людей, страдавших коронарным атеросклерозом [3], а с другой — множественность факторов риска развития атеросклеротического процесса [18].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Душкин М. И., Иванова М. В. // Биохимия.— 1991.— Т. 56, № 5.— С. 812—819.
2. Журавлев А. И. // Биохемилюминесценция.— М., 1983.— С. 3—30.
3. Ланкин В. Э., Вихерт А. М., Косых В. А. и др. // Бюл. экспер. биол.— 1982.— № 9.— С. 48—50.
4. Любимов Г. Ю., Зенков Н. К., Вольский П. Н., Козлов В. А. // Иммунология.— 1992.— № 1.— С. 40—43.
5. Маянский А. Н., Маянский Д. П. Очерки о нейтрофиле и макрофаге.— Новосибирск, 1989.
6. Меерсон Ф. З., Архипенко Ю. В., Рожницкая И. Н. и др. // Бюл. экспер. биол.— 1992.— № 7.— С. 14—15.
7. Репин В. С. // Успехи соврем. биол.— 1990.— Т. 109, № 1.— С. 120—129.
8. Ambruso D. R., Bolsher B. G. J. M., Stockman P. M. et al. // J. biol. Chem.— 1990.— Vol. 265, N 2.— P. 924—930.
9. Brown M. S., Ho Y. K., Goldstein J. L. // Ibid.— 1980.— Vol. 255, № 19.— P. 9344—9352.
10. Brown M. S., Goldstein J. L. // Annu. Rev. Biochem.— 1983.— Vol. 52.— P. 223—261.
11. Brown M. S., Goldstein J. L. // Nature.— 1990.— Vol. 343.— P. 508—509.
12. Cardillo P., De Sole P., Savi L., Mores N. // Acta med. rom.— 1987.— Vol. 25.— P. 447—454.
13. De Sole P., Savi L., Cardillo C., Lippa S. // Ibid.— 1985.— Vol. 23, № 2.— P. 170—175.
14. Esterline R. L., Trush M. A. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1989.— Vol. 159, № 2.— P. 584—591.
15. Gamble W., Vaghan M., Kruth H. S., Avigan J. // J. Lipid. Res.— 1978.— Vol. 19, № 9.— P. 1068—1072.
16. Halliwell B. // Free Radical Res. Commun.— 1989.— Vol. 5, № 6.— P. 315—318.
17. Hietler H., Luu B., Moog C., Bischoff P. // Activ. biol. oysterols.— 1988.— Vol. 166.— P. 23—46.
18. Libby P., Hansson G. K. // Lab. Invest.— 1991.— Vol. 64.— P. 5—15.
19. Linke S., Heinle H. // Exp. Cell. Biol.— 1989.— Vol. 57, № 2.— P. 105.
20. Moog C., Li Y. H., Waltzinger C. et al. // Immunology.— 1990.— Vol. 70.— P. 344—350.
21. Sies H. // Amer. J. Med.— 1991.— Vol. 91, Suppl. 3C.— P. 31S—38S.
22. Steinberg D., Parthasarathy S., Carew T. E. et al. // New Engl. J. Med.— 1989.— Vol. 320.— P. 915—920.
23. Winterbourn C. C. // Oxygen Radicals: Systemic Events and Disease Processes.— Basel, 1990.— P. 31—70.

Поступила 02.04.93

#### ALTERATIONS OF OXIDATIVE METABOLISM IN MACROPHAGES DURING THEIR TRANSFORMATION INTO FOAMY CELLS.

N. K. Zenkov, M. I. Dushkin, G. Yu. Lyubimov, E. B. Menschikova

Institute of Human General Pathology and Ecology, Novosibirsk.

Oxidative metabolism of murine peritoneal macrophages was studied after cultivation in a mixture containing acetylated low density lipoproteins within 24 and 48 hr using luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence. Chemiluminescence of foamy cells, induced by opsonized zymosan, was not distinctly altered as compared with native macrophages; at the same time, the rate of both lucigenin- and luminol-dependent spontaneous chemiluminescence was distinctly decreased. The imbalance of the oxidative reactions observed enables the authors to propose the antioxidative mechanism of atherosclerotic lesion.

А. В. Полевщиков, П. Г. Назаров

#### ТАФТСИНОПОДОБНЫЕ ПЕПТИДЫ ИЗ МОЛЕКУЛЫ С-РЕАКТИВНОГО БЕЛКА КАК МОДУЛЯТОРЫ ПРОЛИФЕРАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ

НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург

Неспецифические и иммунные защитные механизмы составляют две неразрывно связанные части единой защитной реакции. Важная роль во взаимодействии этих элементов системы поддержания антигенного гомеостаза принадлежит С-реактивному белку (СРБ), концентрация которого в сыворотке крови возрастает в 1000—2000 раз в первые 24—48 ч воспалительной реакции [2, 3, 5]. Иммуноцитотропные эффекты СРБ связаны с изменением конформации [3, 9] и ограниченным протеолизом его молекул в фагосомах нейтрофилов, ферменты которых могут выселять пептидные фрагменты, обладающие разнонаправленными влияниями на клетки [7, 8]. В каждой субъединице СРБ, являющегося гомопентамером, содержится 3 последовательности (см. рисунок), родственные известному своими иммуномодулирующими свойствами тетрапептиду тафтсину (Тре-Лиз-Про-Арг). Ранее показано, что стимулирующее влияние белка на окислительный взрыв в нейтрофилах и моноцитах, их фагоцитарную активность, продукцию интерлейкина-1 (ИЛ) и миграционную активность может быть связано с этими тетрапептидами молекулы СРБ [3, 6, 7]. В связи с этим целью настоящей работы было изучение влияния тафтсиноподобных пептидов из молекулы СРБ на пролиферацию лимфоцитов периферической крови человека при стимуляции различными митогенами и без нее.

**Методика.** Мононуклеары периферической крови человека выделяли из свежей гепаринизированной донорской крови путем центрифугирования на градиенте плотности фиколл-верографин по методу [4]. Выделенные и отмытые от растворимых примесей мононуклеары освобождали от избытка моноцитов сорбцией на покрытой желатином пластиковой поверхности при 37 °С во влажной атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub> в течение 1 ч. Среди неприлипших клеток лимфоциты составляли не менее 95 %. Клетки переводили в среду RPMI-1640 («Flow», Великобритания), обогащенную 10 % эмбриональной телячьей сывороткой (НИИ вакцин и сывороток, Санкт-Петербург), 1 % (по объему) 5 % раствора L-глутамин (Московский институт полиомиелита и вирусных энцефалитов) и 80 мкг на 1 мл генгамицина. Концентрацию живых клеток устанавливали равной 1·10<sup>6</sup> в 1 мл полной культуральной среды. Клетки вносили в 96-луночный плоскостонный планшет («Linbo», Великобритания) в объеме 200 мкл.

Клетки стимулировали оптимальными концентрациями Т-клеточного митогена фетогемоглютина (ФГА-II) («Difco», США, 2,5 мкг/мл) или В-клеточного митогена лаконоса (МЛ) («Serga», Германия, 2 мкг/мл), а в параллельные культуры вносили 20 мкл забуференного фосфа-

10
20
30

Z T D M S R K A F V F P K E S D T S Y V S L K A P L T K P L

40
50
60

K A F T V C L H F Y T E L S S T R G Y S I F S Y A T K R Q D

70
80
90

N E I L I F W S K D I G Y S F T V G G S E I L F E V P E V T

100
110
120

V A P V H I C T S W E S A S G I V E F W V D G K P R V R K S

130
140
150

L K K G Y T V G A E A S I I L G Q E Q D S F G G N F E G S Q

160
170
180

S L V G D I G N V N M W D F V L S P D E I N T I Y L G G P F

190
200
206

S P N V L N W R A L K Y E V Q G E V F T K P Q L W P

Первичная структура СРБ человека (по [7]).

Рамкой обозначены участки, имеющие гомологию с тафтсином Тре-Лиз-Про-Арг. Z — пирролидонкарбоновая кислота.

тами 0,15 М раствора NaCl pH 7,2 (забуференный физиологический раствор — ЗФР). К стимулированным лимфоцитам добавляли переменные концентрации пептидов либо ЗФР в объеме 20 мкл.

Тафтсин и его аналоги из молекулы СРБ (см. рисунок) были синтезированы по нашему заказу НПО «Вектор» (Новосибирск). Тафтсиноподобные пептиды [(Лей<sup>4</sup>)-тафтсин в положении 27—30, (Гли<sup>1</sup>)-тафтсин в положении 113—116 и (Глн<sup>4</sup>)-тафтсин в положении 200—203] вносили в конечных концентрациях  $2 \cdot 10^{-5}$ ,  $2 \cdot 10^{-6}$  и  $2 \cdot 10^{-7}$  М. На каждое разведение пептидов и в контролях отводили по 3 параллельные культуры.

Инкубацию проводили в CO<sub>2</sub>-инкубаторе ("Flow", Великобритания) при 37 °С во влажной атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub> в течение 72 ч. На последние 18 ч культивирования в каждую культуру вносили 37 кБк <sup>3</sup>H-тимидина (НПО «Изотоп») в объеме 20 мкл. Фиксацию и радиометрический учет результатов проводили по общепринятой методике, результат выражали числом импульсов в минуту. Статистическую обработку результатов проводили на микрокалькуляторе МК-52 по программам, разработанным [1].

Результаты и обсуждение. Полученные результаты позволяют говорить об иммуномедиаторном характере действия пептидов на лимфоциты периферической крови человека на различных стадиях клеточного цикла. В описании результатов мы были вынуждены отказаться от выведения средних значений по каждой группе результатов из-за значительных индивидуальных различий между донорами в чувствительности к ФГА (пределы колебаний показателя в группе составили 2524—30 297 имп/мин) и МЛ (4676—22 309 имп/мин). Поэтому главным способом анализа полученных результатов мы избрали изменение относительно контроля (в процентах) и критерий  $\chi^2$ .

Зависимость эффекта пептидов от их концентрации и присутствия митогена в среде отражена в табл. 1. Из приведенных данных видно, что все

пептиды подавляют пролиферацию нестимулированных лимфоцитов, оказывают некоторое стимулирующее действие при совместном влиянии с МЛ и более заметное — при сочетании с ФГА. Тафтсин наиболее эффективен при индуцированной ФГА реакции бласттрансформации (РБТЛ) в концентрации  $2 \cdot 10^{-6}$  М, (Глн<sup>4</sup>)-тафтсин активен в данной модели при концентрации  $2 \cdot 10^{-5}$  М, в то время как (Лей<sup>4</sup>)- и (Гли<sup>1</sup>)-тафтсины — в более низких концентрациях —  $2 \cdot (10^{-6}—10^{-7})$  М. При стимуляции РБТЛ В-клеточным МЛ заметным стимулирующим влиянием обладает лишь (Глн<sup>4</sup>)-тафтсин, а тафтсин и (Лей<sup>4</sup>)-тафтсин оказывают незначительное стимулирующее действие в концентрации  $2 \cdot 10^{-6}$  М.

Существенным дополнением приведенным результатам является распределение обследованных доноров по характеру влияния пептида. При этом эффекты различных концентраций каждого пептида объединили в одну группу. За отсутствие эффекта приняли попадание точки среднего в интервал  $\bar{x} \pm 2s$  относительно контроля, которым служило внесение ЗФР, за стимуляцию — превышение уровня  $\bar{x} + 2s$ , за подавление — снижение уровня включения <sup>3</sup>H-тимидина лимфоцитами донора ниже  $\bar{x} \pm 2s$ .

В табл. 2 приведены результаты влияния различных пептидов на нестимулированные и стимулированные лимфоциты. В графе 1 приведены результаты влияния пептидов на нестимулированные, находящиеся в глубокой G<sub>0</sub>-фазе клеточного цикла лимфоциты. Только в случае тафтсина число случаев стимуляции примерно совпадает с числом случаев подавления и общая динамика указывает на отсутствие выраженного эффекта этого тетрапептида на покоящиеся лимфоциты. При этом в эффектах аналогов тафтсина из молекулы СРБ тенденция к подавлению пролиферации преобладает над стимулирующими свойствами. Наиболее четко это проявляется в случае (Лей<sup>4</sup>)-тафтсина, понижающего уровень включения <sup>3</sup>H-тимидина в 48 % случаев. Однако в целом ука-

Таблица 1

Изменение уровня включения <sup>3</sup>H-тимидина лимфоцитами под действием различных концентраций тафтсиноподобных пептидов (в % относительно контроля)

Пептид и его концентрация, М	Лимфоциты		
	нестимулированные	стимулированные ФГА	стимулированные МЛ
Тафтсин:			
2·10 <sup>-5</sup>	-19,5	+21,1	-3,5
2·10 <sup>-6</sup>	-21,9	+31,0*	+12,4
2·10 <sup>-7</sup>	-23,0	+13,8	-6,6
(Глн <sup>4</sup> )-тафтсин:			
2·10 <sup>-5</sup>	-17,9	+33,4*	+24,2*
2·10 <sup>-6</sup>	-29,0	+21,1*	+6,3
2·10 <sup>-7</sup>	-35,1*	+22,2*	+8,9
(Лей <sup>4</sup> )-тафтсин:			
2·10 <sup>-5</sup>	-32,8*	+7,0	+1,1
2·10 <sup>-6</sup>	-37,8*	+23,9	+16,9
2·10 <sup>-7</sup>	-25,7	+29,5*	+0,5
(Гли <sup>1</sup> )-тафтсин:			
2·10 <sup>-5</sup>	-28,1	+12,0	-2,2
2·10 <sup>-6</sup>	-40,8*	-7,0	-10,5
2·10 <sup>-7</sup>	-42,9*	+21,9*	-11,2

Примечание. Число наблюдений по каждой точке равно 21; за 100 % приняты данные, полученные при внесении в культуру 20 мкл ЗФР; знак — означает подавление, знак + стимуляцию. Звездочка — различия с контролем достоверны при  $p < 0,05$ .

занные тетрапептиды не оказывают заметного влияния на продвижение лимфоцитов по клеточному циклу.

Характер влияния пептидов изменяется при стимуляции лимфоцитов Т- или В-митогенами, которая сопровождается переходом в G<sub>1</sub>-фазу клеточного цикла. Результаты совместного действия пептидов и Т-митогена ФГА приведены в графе 2 табл. 2. Смена характера влияния пептидов подтверждается критерием  $\chi^2$ , где в поле 2×3 сравнили эффекты пептидов в присутствии митогена и без него. В каждом случае критерий  $\chi^2_{1-2}$  указывает на достоверные изменения в характере действия пептидов при внесении митогена. Наиболее четко стимулирующее влияние проявляется у тафтсина и (Глн<sup>4</sup>)-тафтсина, обеспечивающих прирост включения тимидина лимфоцитами в 52

и 48 % случаев соответственно. Хотя сочетанный стимулирующий эффект (Лей<sup>4</sup>)- и (Гли<sup>1</sup>)-тафтсинов выражен слабее, ни один из изученных тетрапептидов не оказывает супрессорного действия на индуцированную ФГА пролиферацию лимфоцитов.

При активации лимфоцитов МЛ, который обладает преимущественно В-клеточным характером действия, наблюдается различие между пептидами в направлении действия (см. табл. 2, графа 3). Способность к стимуляции пролиферации сохраняют (Глн<sup>4</sup>)- и (Лей<sup>4</sup>)-тафтсины, хотя в случае (Глн<sup>4</sup>)-тафтсина эта способность выражена сильнее. Вывод о стимулирующих свойствах подтверждается критерием  $\chi^2$ , указывающим на различия в действии (Глн<sup>4</sup>)- и (Лей<sup>4</sup>)-тафтсинов на стимулированные и нестимулированные МЛ клетки ( $\chi^2_{1-3} < 0,01$ ) и отсутствие различий в случае стимуляции ФГА и МЛ ( $\chi^2_{2-3} > 0,05$ ).

Напротив, эффекты тафтсина и (Гли<sup>1</sup>)-тафтсина в случае стимуляции МЛ совпадают с влиянием пептидов на интактные клетки ( $\chi^2_{1-3} > 0,05$ ), но достоверно отличаются от их совместного действия с ФГА ( $\chi^2_{2-3} < 0,05$ ). Если для тафтсина можно говорить об отсутствии направленного действия при стимуляции МЛ, то в эффекте (Гли<sup>1</sup>)-тафтсина преобладает супрессорная направленность.

Из полученных результатов следует, что одной из форм участия нейтрофильных гранулоцитов в иммунных взаимодействиях является частичный протеолиз белков острой фазы (на примере СРБ) в фагосомах клетки, сопровождающийся выщеплением иммуноактивных пептидов. Ранее мы сообщали о стимулирующем действии рассматриваемых пептидов из молекулы СРБ на фагоцитарную активность нейтрофилов и моноцитов [6]. Другие пептиды, выщепляемые нейтрофилами (положения 77—82, 83—90, 201—206), могут оказывать выраженное ингибирующее действие в отношении аэробного метаболизма фагоцитов, миграции нейтрофилов, внутриклеточного транспорта Ca<sup>2+</sup> [9]. Таким образом, влияние нейтрофилов на ход защитных реакций может осуществляться не только путем

Таблица 2

Влияние тафтсиноподобных пептидов на включение <sup>3</sup>H-тимидина лимфоцитами при митогенной стимуляции и без нее (число случаев)

Пептид и характер его эффекта	Лимфоциты			$\chi^2$	p
	нестимулированные (1)	стимулированные ФГА (2)	стимулированные МЛ (3)		
Тафтсин:					
стимуляция	5	11	6	(1—2)=8,25	<0,05
отсутствие эффекта	10	10	11	(1—3)=0,54	≥0,05
подавление	6	0	4	(2—3)=5,52	≥0,05
(Глн <sup>4</sup> )-тафтсин:					
стимуляция	2	10	10	(1—2)=7,52	<0,05
отсутствие эффекта	13	8	10	(1—3)=9,30	<0,01
подавление	6	3	1	(2—3)=1,22	>0,05
(Лей <sup>4</sup> )-тафтсин:					
стимуляция	0	9	7	(1—2)=11,56	<0,01
отсутствие эффекта	11	7	11	(1—3)=10,78	<0,01
подавление	10	5	3	(2—3)=1,64	>0,05
(Гли <sup>1</sup> )-тафтсин:					
стимуляция	1	9	2	(1—2)=8,42	<0,05
отсутствие эффекта	15	9	10	(1—3)=2,48	>0,05
подавление	5	3	9	(2—3)=7,51	<0,05

Примечание. В скобках в графе  $\chi^2$  даны группы сравнения, для p группы сравнения те же, что для  $\chi^2$ .

выделения различных биологически активных веществ, синтезируемых самими нейтрофилами, но и за счет изменения набора высвобождаемых в процессе протеолиза пептидов.

Исследованные тафтсиноподобные пептиды из молекулы СРБ [(Гли<sup>1</sup>)-, (Лей<sup>4</sup>)- и (Глн<sup>4</sup>)-тафтсины] способствовали усилению пролиферации стимулированных митогеном лимфоцитов периферической крови человека и не обладали собственным митогенным эффектом в отношении интактных клеток. При этом (Глн<sup>4</sup>)- и (Лей<sup>4</sup>)-тафтсины оказывали комитогенное действие совместно как с Т-, так и с В-клеточными митогенами, в то время как (Гли<sup>1</sup>)-тафтсин из молекулы СРБ и тафтсин из 3-го константного домена тяжелой цепи IgG человека способствовали пролиферации лимфоцитов лишь при совместном действии с Т-митогеном ФГА. (Гли<sup>1</sup>)-тафтсин угнетал пролиферацию стимулированных В-клеточным МЛ лимфоцитов.

Остается открытым вопрос о механизме влияния тафтсиноподобных пептидов. Представляется более вероятным прямое действие пептидов на лимфоциты, но, хотя суспензия мононуклеаров была обеднена по адгезирующим клеткам, нельзя исключить влияние пептидов через активацию мононуклеарных фагоцитов и продукцию ими медиаторов. Однако различия в действии пептидов в сочетании с Т- или В-митогенами подтверждают точку зрения о прямом влиянии пептидов на лимфоциты и позволяют предположить, что (Глн<sup>4</sup>)- и (Лей<sup>4</sup>)-тафтсины стимулируют Т-хелперы к продукции ИЛ-2 или ИЛ-4, что зависит от тропности митогена, а (Гли<sup>1</sup>)-тафтсин и тафтсин — только к продукции ИЛ-2. Однако эта гипотеза требует прямых экспериментальных доказательств.

Потребность тафтсиноподобных пептидов во втором митогенном стимуле подкрепляет оценку характера их действия как иммуномедиаторную. Описанный механизм кооперации острофазных сывороточных компонентов, фагоцитов и иммунокомпетентных клеток, вероятно, является одним из самых древних и примитивных и, хотя уступает медиаторам семейства интерлейкинов в эффективности, может составить важный резерв системы иммунитета и одну из форм взаимодействия специфических и неспецифических защитных реакций. Приведенные в данной публикации и полученные ранее результаты [6] указывают на актуальность углубленного иммунофармакологического изучения тафтсиноподобных пептидов из молекулы СРБ и комплексной оценки их эффектов *in vitro*.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Иванов Ю. И., Погорелюк О. Н. Статистическая обработка результатов медико-биологических исследований на микрокалькуляторах по программам. — М., 1990.
2. Назаров П. Г., Софронов Б. Н. // Иммунология. — 1986. — № 4. — С. 12—18.
3. Полевицкий А. В. Иммуноцитотропные эффекты С-реактивного белка: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — СПб., 1992.
4. Вфутт А. // Scand. J. clin. Lab. Invest. — 1968. — Vol. 21, Suppl. — P. 97.
5. Hokata Y., Nakamura R. M. // J. Clin. Lab. Anal. — 1987. — Vol. 1, N 1. — P. 15—27.
6. Polevshchikov A. V., Nazarov P. G. // Rehabilitation of Immune System. — Tschaltubo, 1992. — P. 61.

7. Robey F. A., Ohura K., Futak S. et al. // J. Biol. Chem. — 1987. — Vol. 262, N 15. — P. 7053—7057.
8. Shephard E. G., Anderson R., Rosen O. et al. // J. Immunol. — 1990. — Vol. 14, N 5. — P. 1469—1477.
9. Tseng J., Mortensen R. F. // Exp. Cell Res. — 1989. — Vol. 180, N 2. — P. 303—313.

Поступила 28.11.92

#### TUFTSIN-LIKE PEPTIDES FROM C-REACTIVE PROTEIN AS MODULATORS OF LYMPHOCYTE PROLIFERATION.

A. V. Polevshchikov, P. G. Nazarov

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

Influence of synthetic peptides from human C-reactive protein (CRP) on proliferation of intact and mitogen-stimulated peripheral blood lymphocytes was studied. Effect of the tetrapeptides from CRP was similar to that of tuftsin Thr-Lys-Pro-Arg. All the peptides studied did not increase the <sup>3</sup>H-thymidine incorporation into the resting lymphocytes but accelerated it after mitogen stimulation. The peptides efficiency depended on T- or B-specificity of mitogens.

© А. Е. МЕДВЕДЕВ, 1994

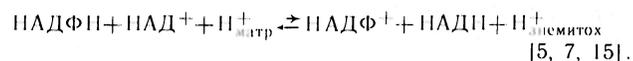
УДК 577.152.161'1042:577.175.522'154

А. Е. Медведев

#### ВЛИЯНИЕ АДРЕНАЛИНА НА АКТИВНОСТЬ И ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ ПОДВИЖНОСТЬ ТРАНСГИДРОГЕНАЗЫ ВО ВНУТРЕННЕЙ МЕМБРАНЕ МИТОХОНДРИЙ

ИИИ биологической и медицинской химии РАМН, Москва

Митохондриальная трансгидрогеназа (КФ 1.6.1.1) — интегральный белок внутренней мембраны, катализирующий реакцию обратимого переноса гидрид-иона, сопряженную с трансмембранным переносом протонов:



Катехоламины через β-адренорецепторы цАМФ-зависимым путем стимулируют трансгидрогеназу [1, 10]. Сохранение активации после разрушения митохондрий детергентом свидетельствует об изменении каталитических свойств трансгидрогеназы, однако сами механизмы увеличения активности фермента остаются неясными [1, 10]. Много может прояснить изучение функционирования трансгидрогеназы во внутренней мембране митохондрий. Недавно установлено, что модификация парахлормеркурибензоатом периферических сульфгидрильных групп, расположенных на внешней поверхности внутренней мембраны, оказывает более сильное повреждающее действие на трансгидрогеназу из активированных адреналином митохондрий [2]. Цистеин восстанавливал активность трансгидрогеназы в контроле и в значительной мере прирост активности, вызванный адреналином [2].

Хорошо известно, что субстраты реакции индуцируют различные конформационные состояния фермента во внутренней мембране митохондрий [7, 15]. Это было доказано на основании неодинаковой чувствительности трансгидрогеназы в присутствии НАДН и НАДФН к таким ингибиторным воздействиям, как ограниченный про-

Таблица 1

Влияние адреналина на активность трансгидрогеназы печени, нмоль/мин на 1 мг белка

Фракция, в которой измеряли активность трансгидрогеназы	Группа животных		p
	контроль	адреналин	
Лизат митохондрий	12,1±0,5	16,3±0,7	<0,001
Лизат, полученный после обработки митохондрий гипотоническим шоком	17,0±1,4	22,3±1,0	<0,01
Субмитохондриальные частицы из митохондрий	31,6±1,6	41,2±2,6	<0,01
Субмитохондриальные частицы из митопластов	36,9±2,0	54,2±2,2	<0,001

Примечание. Лизис митохондрий раствором тритона X=100 (1%) и гипотонический шок проводили, как описано ранее [2]. В каждой серии по 5—10 опытов.

теолиз, термическая инактивация [6, 7, 15]. Известно также, что субстраты реакции оказывают влияние и на ингибирование трансгидрогеназы N,N-дициклогексилкарбодиимидом (ДЦКД) [5, 12, 13]. Использование аналогичного подхода представлялось полезным при изучении механизма активации трансгидрогеназы катехоламинами. Как следует из полученных результатов, увеличение функциональной подвижности фермента во внутренней мембране, обусловленное, возможно, изменением состояния и(или) состава липидного компонента митохондрий является наиболее приемлемым объяснением увеличенной активности трансгидрогеназы при стимуляции катехоламинами.

Методика. В работе использовали никотинамидные коферменты, глюкозо-6-фосфат, ингибитор трипсина из сои («Reanal», Венгрия), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу («Fluke», Швейцария), ДЦКД («Fegak», Германия), дигитонин («Merck», Германия), трис («Sigma», США). Остальные реактивы были отечественного производства максимальной доступной чистоты.

Работа выполнена на 85 крысах Вистар обоего пола массой 200—250 г. Животных наркотизировали внутрибрюшинной инъекцией тиопенталнатрия (50 мг/кг). Гидрогартрат адреналина (1 мг/кг) вводили подкожно за 20—22 мин до декапитации. Митохондрии и митопласты (митохондрии, лишённые с помощью дигитонина внешней мембраны и межмембранного пространства) изолировали в среде, содержащей 0,25 М сахарозу, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ трис-HCl-буфер pH 7,5, и после ультразвуковой обработки с использованием охлаждающей смеси лед — соль выделяли субмитохондриальные частицы [11]. «Вывернутую» ориентацию внутренней мембраны митохондрий в субмитохондриальных частицах определяли по процентному соотношению их дыхания на сукцинате без и с цитохромом C [11]. В наших экспериментах она составила 93% для частиц из митохондрий и 95% для частиц из митопластов.

Обработку субмитохондриальных частиц (0,4—0,5 мг белка) трипсином (10 мкг, 3 мин), термическим воздействием (53 °С, 5 мин) проводили, как описано [6]. ДЦКД (150 мМ) первоначально растворяли в диметилсульфоксиде, инкубируя с субмитохондриальными частицами в конечной концентрации 150 мкМ [13] и 300 мкМ [12]. Активность трансгидрогеназы измеряли спектрофо-

тометрически [14]. Среда измерения (конечный объем 3 мл) содержала 0,25 М сахарозу, 50 мМ трис-ацетат pH 7,5, 3 мМ цианид калия, 250 мкМ НАДФН, 500 мкМ НАД<sup>+</sup>, 10 мМ глюкозо-6-фосфат, 3 мМ хлорид магния, 0,5 ед. глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и субмитохондриальные частицы (0,4—0,5 мг белка). Белок определяли биуретовым методом с бычьим сывороточным альбумином в качестве стандарта [8]. Серии экспериментов сравнивали между собой, используя критерий t Стьюдента для связанных и несвязанных выборок. Различия считали значимыми при p ≤ 0,05.

Результаты и обсуждение. Инъекция адреналина крысам увеличивает активность трансгидрогеназы. Активация фермента обнаруживается как в солюбилизованных митохондриях, так и в субмитохондриальных частицах, полученных после ультразвуковой обработки митохондрий или митопластов (табл. 1). Влияние адреналина на трансгидрогеназу полностью сохраняется по мере освобождения от белков матрикса (при гипотоническом шоке или после ультразвуковой обработки митохондрий с последующим осаждением мембран), а также при удалении внешней мембраны с межмембранным пространством при обработке митохондрий дигитонином. Это, очевидно, свидетельствует в пользу того, что активация трансгидрогеназы обусловлена именно изменением свойств самой внутренней мембраны митохондрий.

Термическая обработка субмитохондриальных частиц, стимулированных адреналином, вызывает более выраженную инактивацию трансгидрогеназы по сравнению с контролем (табл. 2), что сопровождается исчезновением эффекта адреналина. НАДФН существенно защищает трансгидрогеназу от термоинактивации и частично сохраняет прирост активности, вызванный адреналином. НАД<sup>+</sup> в соответствии с данными [6] мало влияет на термостабильность трансгидрогеназы. Присутствие ионов магния несколько повышает устойчивость фермента к термической обработке,

Таблица 2

Влияние инъекции адреналина животным на термическую инактивацию трансгидрогеназы в присутствии НАД<sup>+</sup> и НАДФН

Группа животных	Активность трансгидрогеназы после обработки субмитохондриальных частиц			
	24—26 °С, 5 мин	53 °С, 5 мин		
		без добавок	+НАД <sup>+</sup> 200 мкМ	+НАДФН 200 мкМ
	Без MgCl <sub>2</sub>			
Контроль	100±7	10±2	9±2	79±4
Адреналин	161±8	11±2	6±3	109±7
p	<0,001	>0,8	>0,4	<0,01
	С 1 мМ MgCl <sub>2</sub>			
Контроль	102±1	25±6	16±5	85±5
Адреналин	156±9	34±10	30±7	117±9
p	<0,001	>0,4	>0,1	<0,02

Примечание. Результаты представлены в процентах. За 100% принята активность фермента в контроле, инкубированном без добавок при 24—26 °С. Субстраты реакции и MgCl<sub>2</sub> на активность трансгидрогеназы не влияли. Приведены средние значения из 7 опытов. Здесь и в табл. 3 использованы субмитохондриальные частицы, полученные из митопластов.

Таблица 3

Влияние инъекции адреналина животным на инактивацию трансгидрогеназы трипсином в присутствии НАД<sup>+</sup> и НАДФН

Группа животных	Активность трансгидрогеназы после инкубации субмитохондриальных частиц			
	без трипсина	с трипсином		
		без добавок	+НАД <sup>+</sup> 200 мкМ	+НАДФН 200 мкМ
<b>Без MgCl<sub>2</sub></b>				
Контроль	100±7	77±6	91±5	68±7
Адреналин	156±8	89±8	118±8	80±14
<i>p</i>	<0,001	>0,2	<0,01	>0,4
<b>С 1 мМ MgCl<sub>2</sub></b>				
Контроль	101±1	69±7	83±3	44±7
Адреналин	158±7	86±8	100±8	59±10
<i>p</i>	<0,001	>0,1	<0,1	>0,2

Примечание. Результаты представлены в процентах. За 100 % принята активность трансгидрогеназы в контроле, инкубированном без трипсина: 37,8±2,6 нмоль/мин на 1 мг белка. Субстраты реакции, MgCl<sub>2</sub>, а также трипсин в присутствии ингибитора на активность трансгидрогеназы не влияли. Приведены средние значения из 6 опытов.

но не сохраняет проявления гормональной активации. НАД<sup>+</sup> не влияет, а НАДФН в той же мере, что и без ионов магния, защищает трансгидрогеназу от термической инактивации, частично сохраняя и эффект адреналина. Полученные результаты согласуются с представлениями о том, что именно связывание НАДФН с молекулой фермента способно индуцировать термостабильную конформацию трансгидрогеназы в мембране [6]. При этом, как следует из табл. 2, термостабильность трансгидрогеназы в активированных адреналином субмитохондриальных частицах изменяется под действием НАДФН в большей степени, чем в контроле.

Инкубация субмитохондриальных частиц с трипсином в соответствии с данными [6] ингибирует трансгидрогеназу (табл. 3). Вследствие большей инактивации фермента в субмитохондриальных частицах, полученных после введения адреналина, эффект последнего на трансгидрогеназу исчезает (см. табл. 3). НАДФН не влияет, а НАД<sup>+</sup> практически полностью защищает фермент от трипсина в контрольных субмитохондриальных частицах, частично сохраняя и активацию фермента адреналином (см. табл. 3). Добавление ионов магния в среду инкубации субмитохондриальных частиц само по себе не влияет на ингибирование трансгидрогеназы трипсином. При этом НАДФН усиливал протеолитическую инактивацию фермента, а НАД<sup>+</sup> уже не защищал трансгидрогеназу. Во всех случаях действие трипсина в присутствии ионов магния сопровождалось исчезновением активации трансгидрогеназы адреналином. Некоторые различия с данными [6] в способности субстратов влиять на чувствительность к протеолизу могут быть обусловлены неодинаковым воздействием на конформационное состояние трансгидрогеназы липидного окружения, обеспечивающего положение фермента в мембране [15].

Активность трансгидрогеназы, как и других ферментов, вовлеченных в трансмембранный перенос протонов, высокочувствительна к ингибиро-

ванию ДЦКД [5, 7, 12, 13, 15]. Инкубация в течение 60 мин субмитохондриальных частиц с 300 мкМ ДЦКД вызывает сильное ингибирование трансгидрогеназы в контроле и при введении адреналина до одинакового конечного уровня (табл. 4). НАД<sup>+</sup> существенно защищает фермент от инактивации, но не сохраняет эффект адреналина. В этих условиях инкубации НАДФН не влиял на инактивацию трансгидрогеназы. При уменьшении вдвое концентрации ДЦКД и времени инкубации было обнаружено, что НАДФН усиливает ингибирование трансгидрогеназы (что согласуется с данными [12]), но преимущественно в субмитохондриальных частицах, активированных адреналином. С учетом известной дискуссии о месте действия на молекулу трансгидрогеназы ДЦКД [12, 13] приведенные результаты свидетельствуют в пользу того, что модификация фермента (а следовательно, и транслокация протонов) в субмитохондриальных частицах происходит вне активного центра. Кроме того, усиление НАДФН ингибирования трансгидрогеназы вместе с неспособностью НАД<sup>+</sup> сохранять вызванный адреналином прирост активности, очевидно, отражает увеличение доступности трансгидрогеназы в активированных адреналином субмитохондриальных частицах к модификации ДЦКД.

Таким образом, два разных химических воздействия трипсином (гидролизующим пептидные связи, образованные карбоксильными группами лизина и аргинина) и ДЦКД (реагирующим со свободными карбоксильными группами аминокислот) [4] сильнее инактивируют трансгидрогеназу в стимулированных адреналином субмитохондриальных частицах, т. е. в ходе влияния катехоламинов на митохондрии трансгидрогеназа становится более доступна ингибиторам как с внешней [2], так и с внутренней стороны внутренней мембраны. Принимая во внимание, что индуцированное НАДФН конформационное изменение молекулы фермента более выражено при действии адреналина, есть основания полагать, что сама активация трансгидрогеназы катехоламинами обусловлена увеличением ее подвижности во внутренней мембране митохондрий.

Активность трансгидрогеназы во внутренней мембране митохондрий или при встраивании

Таблица 4

Влияние инъекции адреналина животным на ингибирование активности трансгидрогеназы (в нмоль/мин на 1 мг белка) ДЦКД в присутствии НАД<sup>+</sup> и НАДФН

Время инкубации, мин	Добавка в среду инкубации	Группа животных		<i>p</i>
		контроль	адреналин	
0	—	20,7±2,0	27,2±2,0	<0,05
60	—	19,2±1,7	25,9±1,9	<0,02
60	300 мкМ ДЦКД	2,7±0,4	2,5±0,3	>0,7
60	300 мкМ ДЦКД + +3 мМ НАД <sup>+</sup>	13,2±0,9	15,7±1,9	>0,2
60	300 мкМ ДЦКД + +3 мМ НАДФН	3,7±0,6	2,5±0,5	>0,1
30	—	21,8±1,9	28,4±2,1	<0,05
30	150 мкМ ДЦКД	7,2±0,5	13,5±0,9	<0,001
30	150 мкМ ДЦКД + +3 мМ НАДФН	6,6±0,4	4,8±0,6	<0,05

Примечание. Приведены средние значения из 6—10 опытов. В экспериментах использовали субмитохондриальные частицы, полученные после ультразвуковой обработки митохондрий.

очищенного фермента в липосомы во многом определяется состоянием и составом липидного компонента [7, 15]. Есть данные, что действие глюкогона — другого гормона, влияющего на функции митохондрий цАМФ-зависимым путем, по-видимому, связано с изменением активности митохондриальных фосфолипаз и(или) перекисного окисления липидов [9]. Местный анестетик лидокаин, прямо или косвенно влияющий на эти процессы, при инкубации с митохондриями предупреждает активацию трансгидрогеназы цАМФ [2, 3]. К тому же нами было показано, что глюкогон, подобно катехоламинам, повышает активность трансгидрогеназы [1]. С учетом приведенных данных увеличение подвижности трансгидрогеназы во внутренней мембране при действии катехоламинов на митохондрии может быть объяснено изменением состояния и(или) состава липидного компонента митохондрий. Последнее позволяет предположить, что направленное модифицирование липидного компонента биомембран (в том числе и митохондриальных) диетой или лекарственными препаратами может ограничить при необходимости избыточную реакцию окислительного метаболизма на шок, гипоксию и другие виды стресса. Недавно было показано, что предварительная инъекция крысам мембранотропных препаратов лидокаина и аминазина предупреждает цАМФ-зависимую стимуляцию окислительных ферментов митохондрий (в том числе и трансгидрогеназы) [3].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Медведев А. Е., Труфанова Л. В., Кулинский В. И.* // Биохимия.— 1986.— Т. 51, № 7.— С. 1165—1173.
2. *Медведев А. Е.* // Биол. мембраны.— 1987.— Т. 4, № 4.— С. 426—431.
3. *Медведев А. Е.* // Вопр. мед. химии.— 1990.— № 6.— С. 74—76.
4. *Овчинников Ю. А.* Биоорганическая химия.— М., 1987.— С. 40—150.
5. *Скучачев В. П.* Энергетика биологических мембран.— М., 1989.— С. 243—247.
6. *Blazyk J., Lam D., Fisher R.* // Biochemistry.— 1976.— Vol. 15, N 13.— P. 2843—2848.
7. *Fisher R. R., Earle S.* // The Pyridine Nucleotide Coenzymes / Eds. J. Everse, B. Andersson, K. You.— New York, 1982.— P. 280—324.
8. *Gornall A. G., Bardawill C. D., David M. M.* // J. biol. Chem.— 1949.— Vol. 177.— P. 751—768.
9. *Halestrap A. P.* // Biochim. biophys. Acta.— 1987.— Vol. 927, N 1.— P. 280—290.
10. *Kulinsky V. I., Trufanova L. V., Medvedev A. E.* // FEBS Lett.— 1984.— Vol. 177, N 1.— P. 143—145.
11. *Pedersen P., Greenawalt J. B., Reynafarje B.* et al. // Meth. cell. Biol.— 1978.— Vol. 20.— P. 411—481.
12. *Pennington R., Fisher R.* // J. biol. Chem.— 1981.— Vol. 256, N 17.— P. 8963—8969.
13. *Phelps D., Hafeji Y.* // Ibid.— N 5.— P. 817—821.
14. *Rydstrom J.* // Meth. Enzymol.— 1979.— Vol. 55.— P. 261—275.
15. *Rydstrom J., Persson B., Carlner E.* // Pyridine Nucleotide Coenzymes. Chem. biochem. med. Aspects.— New York, 1987.— Pt B.— P. 433—460.

Поступила 16.02.93

THE INFLUENCE OF ADRENALINE ON THE ACTIVITY AND FUNCTIONAL MOBILITY OF TRANSHYDROGENASE IN INNER MITOCHONDRIAL MEMBRANE.

A. E. Medvedev

Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow.

Adrenaline injection to rats increased activity of liver mitochondrial transhydrogenase. Transhydrogenase in the adrenaline activated submitochondrial particles showed increased sensitivity to thermal and proteolytic inactivations as well as to inhibition by dicyclohexyl carbodiimide. Substrates of the reaction  $\text{NAD}^+$  and  $\text{NADPH}$ , which induce different conformational changes of the enzyme molecule in membranes, altered to a greater extent the sensitivity to these treatments of transhydrogenase in the adrenaline activated submitochondrial particles as compared with controls. Activation of transhydrogenase by catecholamines appears to occur due to increase of the enzyme molecule mobility in the inner mitochondrial membrane.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 615.272.014.425:577.164.181.015.4.07

*Н. М. Сторожок, А. Я. Друлле, Я. Я. Логин, Я. Я. Дрегерис, Е. Б. Бурлакова, Н. Г. Храпова*

### ЭФФЕКТЫ СИНЕРГИЗМА ПРИ СОВМЕСТНОМ АНТИОКСИДАНТНОМ ДЕЙСТВИИ ФОСФАТИДИЛХОЛИНА С ПРИРОДНЫМИ И СИНТЕТИЧЕСКИМИ ХИНОНАМИ

Тюменский медицинский институт, Латвийский университет, Рига, Институт химической физики АН России, Москва

В последние годы сложилось представление о том, что биоантиоксиданты наиболее эффективны в составе природных систем, компоненты которых как синергисты окисления существенно усиливают влияние действующего начала. В связи с этим возрос интерес к изучению эффектов синергизма в действии основного природного антиоксиданта (АО)  $\alpha$ -токоферола (ТФ) с аскорбиновой кислотой [9, 15], аминокислотами [8], фосфолипидами [10—13]. Немногочисленные работы в этом направлении показывают возможность значительного усиления ингибирующего действия АО, перспективность практического применения синергических смесей ТФ с указанными веществами.

Вместе с тем изучение проявлений синергизма в настоящее время касается в основном гомологов ТФ. Сведения о синергических эффектах композиций каких-либо других природных АО с водо- или липорастворимыми соединениями биологической природы в литературе отсутствуют. В этом плане определенный интерес представляет изучение синергизма с фосфолипидами как важнейшими компонентами биологических мембран природных и синтетических хинонов, обладающих широким спектром биологического действия [4, 5], невысокой токсичностью и проявляющих антирадикальную активность по отношению к пероксидным [2, 3, 6], алкильным [7] радикалам.

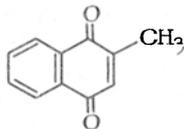
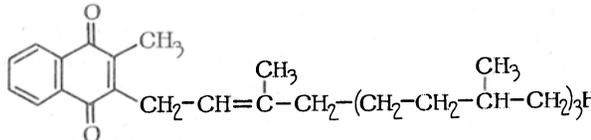
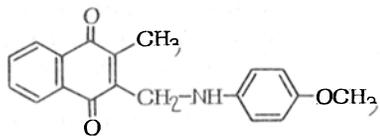
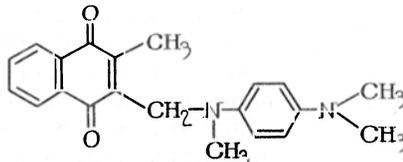
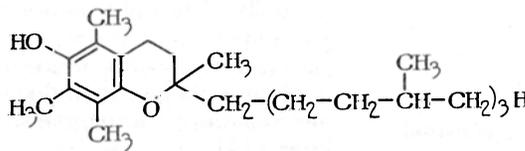
В настоящей работе изучены эффекты синергизма при совместном антиоксидантном действии смесей яичного фосфатидилхолина (ФХ) с природными и синтетическими хинонами: витамином  $\text{K}_1$  (филлохиноном), менадиолем, рядом новых биологически активных веществ — аналогов витамина  $\text{K}$  —  $\text{N}$ -производных 2-метил-3-аминометил-1,4-нафтохинона, представляемых в качестве перспективных мембранопротекторов [4, 7].

**Методика.** В работе изучали процессы ингибированного окисления модельного субстрата (метилолеата) в присутствии индивидуальных

природных и синтетических хинонов и их смесей с фосфолипидами в сравниваемых условиях эксперимента. Опыты проводили при 60 °С, в качестве инициатора использовали азобисизобутиронитрил, скорость иницирования составляла  $4 \cdot 10^{-8} \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$ . За кинетикой процесса следили по поглощению кислорода в установках типа Варбурга. Определяли периоды индукции ( $\tau$ ) окисления метилолеата в опытах с индивидуальным веществом ( $\tau_1$ ) и его смесью с ФХ ( $\tau_2$ ). Превышение периодов индукции в присутствии смеси веществ по сравнению с их действием порознь свидетельствовало о эффекте синергизма, который в абсолютном отношении выражался формулой:  $\Delta\tau = \tau_2 - \tau_1$  или относительной величиной  $\tau_2/\tau_1$  (в %). Определяли максимальную скорость окисления по наклону кинетической кривой после выхода ее из периода индукции.

Субстратом окисления служил метилолеат Львовского химико-фармацевтического завода, дважды перегнанный под вакуумом при остаточном давлении 5—15 мм рт. ст. В работе использовали витамин К<sub>1</sub> (филлохинон), ТФ фирмы «Serva» (США), менадион, полученный десульфированием викасола, азотсодержащие производные 1,4-нафтохинона, синтезированные в Латвийском университете, условно обозначенные как автокомплексы (АК-40, АК-49), которые среди других ранее изученных соединений этого ряда зарекомендовали себя как наиболее активные АО [5]. Формулы исследуемых соединений приведены в таблице.

**Кинетические параметры эффекта синергизма природных и синтетических хинонов с ФХ ( $C_{\text{ФХ}} = 4 \cdot 10^{-3} \text{ М}$ ,  $C_{\text{АО}} = 8 \cdot 10^{-5} \text{ М}$ ,  $W_i = 4 \cdot 10^{-8} \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$ ,  $T = 60 \text{ °С}$ )**

№ п/п	Соединение	Брутто-формула	Период индукции, мин		$\Delta\tau_{\text{син}}$ , мин	$\Delta\tau/\tau_0 \cdot 100$ , %
			без синергиста	с синергистом		
1	Менадион		37	107	70	190
2	Витамин К <sub>1</sub> (филлохинон)		18	50	30	170
3	АК-40		52	116	74	120
4	АК-49		55	130	75	240
5	ТФ		36	80	44	120

Результаты и обсуждение. На рис. 1 приведены кинетические кривые поглощения кислорода метилолеатом в присутствии индивидуальных витаминов К<sub>1</sub>, его синтетического аналога 2-метил-3-аминометил-1,4-нафтохинона (АК-40) и смесей указанных веществ с яичным ФХ. При сопоставлении периодов индукции указанных кривых видно, что равные добавки АО в присутствии ФХ более эффективны, чем в экспериментах, где ингибиторы действуют порознь. При этом показано, что сам ФХ не тормозит окисления. Следовательно, приращение значений периодов индукции связано с эффектом синергизма, проявляющегося при совместном действии смесей ФХ с исследуемыми нафтохинонами. Количественно величина синергизма для разных соединений может существенно различаться (см. таблицу). Наибольший синергический эффект установлен для смесей ФХ с АК-49, действие которых выше по сравнению с таковым индивидуального АО в 2,4 раза (см. таблицу).

Были получены данные об изменении величины синергизма в зависимости от концентрации каждого из компонентов смеси. Для N-производных 1,4-нафтохинона в литературе описаны экстремальные зависимости ингибирующего действия от концентрации индивидуального АО, которые являются характерными для соединений данного класса. Исследования были проведены в области достаточно низких добавок, где ингибирующее действие АО прямо пропорционально его концентрации ( $0-1,2$ )  $\cdot 10^{-3} \text{ М}$ . Для смесей, содер-

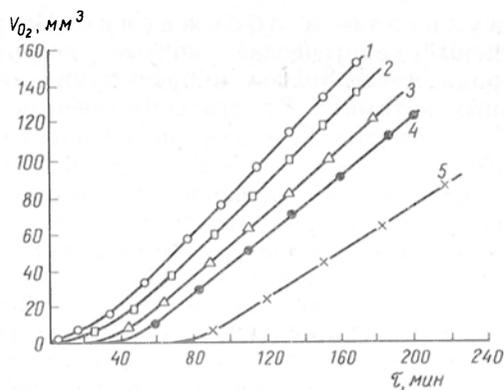


Рис. 1. Кинетические кривые поглощения кислорода метилолеатом (1) в присутствии  $8 \cdot 10^{-5}$  М витамина  $K_1$  (2); смеси  $8 \cdot 10^{-5}$  М витамина  $K_1 + 8 \cdot 10^{-3}$  М ФХ (3);  $8 \cdot 10^{-5}$  М АК-40 (4); смеси  $8 \cdot 10^{-5}$  М АК-40 +  $2 \cdot 10^{-3}$  М ФХ (5).

$W_i = 4 \cdot 10^{-8}$  М·с<sup>-1</sup>,  $T = 60^\circ\text{C}$ .

жащих равные количества ФХ ( $2 \cdot 10^{-3}$  М), было показано, что синергический эффект прямо пропорционален концентрации разных АО (рис. 2). Установлено, что одинакового ингибирующего эффекта в случае применения синергиста (ФХ) можно достичь при более низких концентрациях АО (в 2—4 раза; см. рис. 2). Это особенно важно для соединений, используемых в медицине и фармации, поскольку имеется возможность существенно снизить концентрации ингибитора окисления и уменьшить последствия как токсического воздействия АО, так и других побочных проявлений его активности.

Была исследована также зависимость изменений величины эффекта от концентрации фосфолипидов в смеси. Указанная зависимость приведена на рис. 3. Как видно из рис. 3, характер кривых для всех исследуемых нафтохинонов однотипен. В области низких концентраций  $[(0-2,5) \times 10^{-3}$  М] зависимость прямо пропорциональна, затем с ростом концентрации достигается экстремум и далее прироста периодов индукции с увеличением количества ФХ в смеси практически не происходит. Абсолютные значения наибольшего синергического эффекта ( $\Delta\tau_{\text{max}}$ ), проявляющегося

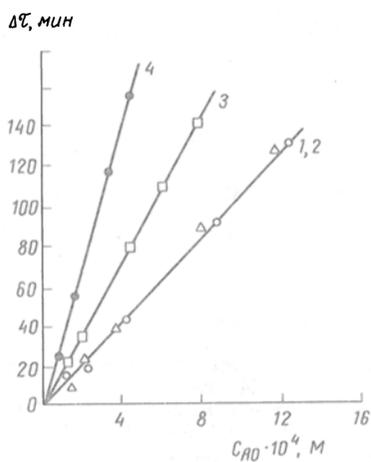


Рис. 2. Зависимость изменений величины синергизма от концентрации антиоксиданта:

1 — АК-40; 2 — АК-49; 3 — АК-40 + ФХ ( $2 \cdot 10^{-3}$  М); 4 — АК-49 + ФХ ( $2 \cdot 10^{-3}$  М).  $W_i = 4 \cdot 10^{-8}$  М·с<sup>-1</sup>.

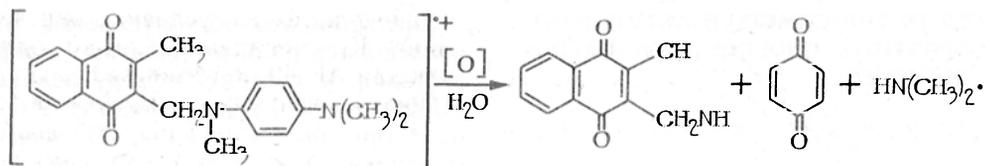
в одних и тех же условиях окисления, для витамина  $K_1$ , менадиона, АК-40 одинаковы, тогда как для АК-49 по сравнению с указанными соединениями величина эффекта в 2 раза выше (см. рис. 3). Концентрации большинства АО, при которых достигается максимум кривых (см. рис. 3), различаются несущественно, исключение вновь составляет АК-49, для которого в тех же условиях положение максимума соответствует меньшей концентрации ингибитора.

Следует отметить, что зависимость, аналогичная описанной выше, была установлена не только для смесей ФХ с нафтохинонами, но и для ТФ с синергистами разной природы: яичным ФХ, фосфатидилэтаноламином, дипальмитоилфосфатидилхолином, ацетилхолином [7]. На том основании, что закономерность изменений величины синергизма от концентрации фосфолипидов воспроизводится как для фенола (ТФ), так и для нафтохинонов разного строения, можно сделать вывод, что характер кривых не связан с природой АО, а определяется, по-видимому, свойствами синергистов окисления. Однако, как видно из таблицы, природа АО может оказывать определенное влияние на количественные параметры этой зависимости. Так, сравнение АК-40 и АК-49 показало, что характер зависимости остается прежним, но  $S_{\text{max}}$  в случае последнего смещается в область меньших концентраций, а величина предельной эффективности смеси увеличивается в 2 раза.

По-видимому, особое отношение АК-49 к синергисту (ФХ) связано с некоторыми особенностями его химического строения. Поэтому весьма важен анализ взаимосвязи между строением соединения и величиной эффекта синергизма. Для этого целесообразно сравнить между собой действие двух наиболее близких по своему строению соединений: АК-49 и АК-40, что позволит вычлнить те фрагменты структуры АК-49, которые определяют его исключительность. Следует отметить, что в опытах порознь действие этих двух соединений близко между собой, тогда как в присутствии ФХ их эффективность различается вдвое (см. рис. 2).

Из сопоставления химических формул двух соединений (см. таблицу) видно, что наиболее значимым различием в структуре АК-40 и АК-49 является наличие в пара-положении бензольного кольца заместителей разной природы — соответственно метокси- и диметиламиногрупп. Более высокий синергический эффект у АК-49, возможно, связан с присутствием третичной аминогруппы.

Известно, что действие АО усиливается в присутствии алифатических аминов [9], выполняющих роль синергистов окисления. Считается, что они могут разлагать пероксиды нерадикальным путем [9]. В химической же структуре АК-49 присутствует фрагмент ароматического амина. Однако, согласно механизму, предложенному для объяснения ингибирующей активности N-производных 1,4-нафтохинона, в процессе свободно-радикального окисления происходит образование катион-радикала, подвергающегося далее окислению и элиминированию с образованием синергической смеси алифатического амина и двух хинонов [14]:



Ранее было показано, что активность фосфолипидов как синергистов окисления связана с присутствием в их химической структуре аминогруппы и остатков фосфорной кислоты, действующих в процессе окисления взаимозависимо [1]. Очевидно, при использовании смесей АК-49 с ФХ образуется достаточно сложная смесь, в процессе окисления которой и фосфолипид, и продукты превращения АО выполняют роль синергистов. Именно благодаря особенностям своего строения АК-49 в присутствии фосфолипидов вдвое эффективнее других исследуемых нафтохинонов.

Была изучена зависимость изменений такого кинетического параметра, как скорость окисления в отсутствие и в присутствии вещества-синергиста. Показано, что индивидуальные АО не влияют на величину максимальной скорости окисления в широком диапазоне концентраций. Введение малых концентраций фосфолипида в окисляющую систему приводит к резкому уменьшению скорости окисления, значение которой затем достигает определенного, достаточно низкого уровня и с введением больших количеств более не изменяется (см. рис. 3). В целом кривые изменений величины скорости окисления и периодов индукции от концентрации ФХ в смеси антибатны друг другу.

Установленные взаимосвязи между концентрациями компонентов синергической смеси и основными кинетическими параметрами окисления липидных субстратов позволяют выбирать оптимальные соотношения между концентрациями составляющих синергической смеси для достижения в их присутствии максимального ингибирующего эффекта.

Поскольку в большинстве случаев на практике решение проблемы хранения связано со стабилизацией окисления пищевых жиров и липидсодержащих фармпрепаратов, исходно содержащих природные ингибиторы (ТФ), то представляет ин-

терес изучение совместного действия данного АО с исследуемыми нафтохинонами.

Для этого сравнивали антиоксидантное действие витаминов К<sub>1</sub>, АК-40, АК-49 в отдельности и действие бинарных смесей указанных веществ с ТФ. Было показано, что периоды индукции при действии смеси представляют собой простую сумму значений периодов индукции, определяемых порознь для каждого из ее составляющих в той же концентрации. Следовательно, ингибирующее действие индивидуальных компонентов аддитивно, антагонизм или синергизм между ТФ, природными хинонами и их синтетическими аналогами отсутствуют. Мы считали необходимым сравнить между собой величину эффектов синергизма смесей ФХ с ингибиторами разной природы: ТФ, витамином К<sub>1</sub>, менадионом, АК-40 и АК-49 как наиболее эффективными в ряду исследуемых нафтохинонов. Результаты приведены в таблице, из которой видно, что абсолютные значения синергического эффекта ФХ с витамином К<sub>1</sub>, менадионом, АК-40 сопоставимы не только между собой, но и со смесью ФХ с витамином Е, что расширяет выбор АО в случае практического использования исследуемого эффекта. Смесей ФХ с АК-49 в 2 раза эффективнее, чем аналогичные смеси с ТФ. С учетом того, что синтетические аналоги 1,4-нафтохинона обладают умеренной токсичностью, очевидна перспективность дальнейшего изучения синтетических аналогов витамина К<sub>1</sub> с целью внедрения их в медицинскую и фармацевтическую практику.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Антоновский В. Л. Органические перекисные инициаторы.— М., 1972.
2. Бурлакова Е. Б., Храпова Н. Г. // Успехи химии.— 1985.— Т. 54, № 9.— С. 1540—1558.
3. Бурлакова Е. Б., Сторожок Н. М., Храпова Н. Г. // Биол. мембраны.— 1990.— Т. 7, № 6.— С. 612—618.
4. Друлле А. Я., Логин Я. Я., Дрегерис Я. Я. // Изв. ЛН Латв. ССР.— 1989.— № 3.— С. 358—361.
5. Казуш Э. Я., Друлле А. Я., Тирзит Г. Д. и др. // Там же.— С. 373—376.
6. Наумов В. В., Храпова Н. Г. // Биофизика.— 1985.— Т. 30, № 1.— С. 5—9.
7. Рогинский В. А. Фенольные антиоксиданты.— М., 1988.—
8. Achmad M. N., El-Hakim S., Shehata A. Y. // J. Amer. Oil chem. Soc.— 1983.— Vol. 60, N 4.— P. 837—840.
9. Barclay L. R. G., Locke S. J., MacNeil J. M. // Canad. J. Chem.— 1983.— Vol. 61, N 6.— P. 288—290.
10. Hildebrandt D. H., Terao J., Kito M. // J. Amer. Oil chem. Soc.— 1984.— Vol. 61, N 3.— P. 552—555.
11. Hudson B. J., Mahgoub S. E. // J. Sci. Food Agricult.— 1981.— Vol. 32, N 2.— P. 208—210.
12. Hudson B. J., Chavani M. // Lebens. Wiss. Technol.— 1984.— Bd 17.— S. 24—28.
13. Ishikawa Y., Sugiama K. // J. Amer. Oil chem. Soc.— 1984.— Vol. 61, N 5.— P. 950—954.
14. Maruthamuthu P., Venkatasubramanian L., Dhamalingam P. // J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1.— 1986.— P. 359—363.
15. Niki K., Saito T., Kamiya Y. // Chem. Lett.— 1983.— N 5.— P. 631—632.

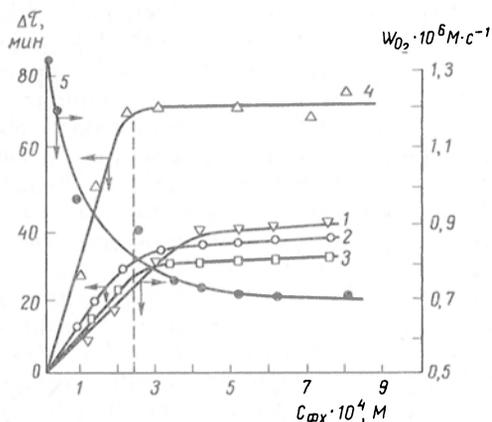


Рис. 3. Зависимость изменений величины синергизма (1, 2, 3, 4), скорости окисления (5) (АК-40) от концентрации фосфолипидов в смесях с равными концентрациями ( $8 \cdot 10^{-5}$  М) АО:

1 — менадиона; 2 — АК-40; 3 — витамина К<sub>1</sub>; 4 — АК-49.

Поступила 24.01.92

## SYNERGIC EFFECTS IN THE COMBINED ANTIOXIDANT ACTION OF PHOSPHATIDYL CHOLINE WITH NATIVE AND ARTIFICIAL QUINONES.

*N. M. Storozhok, A. Ya. Drulle, Ya. Ya. Login, Ya. Ya. Dregeris, E. B. Burlakova, N. G. Khrapova*

Medical Institute, Tyumen; Latvian University, Riga, Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow.

The combined action of ovarian phosphatidylcholine and phylloquinone (vitamin  $K_1$ ), menadione, artificial analogues of vitamin  $K_1$  — N-derivatives of 2-methyl-3-aminomethyl-1,4-naphthoquinone (AK-40, AK-49) recommended as promising membrane protectors was studied. Synergic effects were detected in the antioxidant action of the quinones studied and phosphatidylcholine; AK-40 was the most effective in the presence of phosphatidylcholine. The synergic effect correlated with the concentrations of the antioxidants. Alterations in the synergism, which depended on phosphatidylcholine concentrations, were similar for all the inhibitors studied: the effect was proportionally increased with the elevation of phosphatidylcholine concentrations in the mixture up to  $2.5 \cdot 10^{-3}$  M and then the synergic effect was unaltered during the further increase in phosphatidylcholine content.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616-008.939.6-092.9-07:616.155.33-008.1]-02:615.275.4]-07

*Л. Е. Панин, И. Ф. Усынин, М. В. Горячева*

## АКТИВАЦИЯ БИОСИНТЕЗА БЕЛКА В ОРГАНАХ И ТКАНЯХ КРЫС ПРИ СТИМУЛЯЦИИ СИСТЕМЫ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ФАГОЦИТОВ ПРОДИГИОЗАНОМ

Институт биохимии СО РАМН, Новосибирск

В настоящее время можно считать доказанным, что эпителиально-мезенхимные взаимодействия являются необходимым условием для нормального морфогенеза тканей в период пренатального онтогенеза. При этом мезенхиме придается решающая роль в развитии ранних эпителиальных зачатков различных органов [6, 8]. Имеются факты [2, 5], позволяющие предполагать, что подобные межклеточные взаимодействия сохраняются и в постнатальный период и они играют важную роль в регуляции функциональной активности органов и тканей.

Паренхима в различных органах и тканях организма представлена эпителиальными клетками энтодермального происхождения. Строма имеет мезенхимное происхождение и состоит из клеток соединительной ткани: фибробластов, плазмочитов, перицитов, макрофагов, тучных и эндотелиальных клеток. В рамках стромально-паренхиматозных взаимодействий особый интерес представляют тканево-специфические (резидентные) макрофаги. Обладая способностью при действии различных раздражителей выделять в окружающую их среду цитокины, лизосомальные ферменты, простагландины, белки с комплементарными свойствами и многие другие факторы, макрофаги могут оказывать значительное влияние на обмен и функциональное состояние других типов клеток. Показано участие макрофагов в регуляции эритропоэза, иммунного ответа, пролиферации фибробластов и эндотелия сосудов [7, 12]. Однако влияние макрофагов на метаболические процессы паренхимных элементов изучено очень плохо.

Учитывая это обстоятельство, мы попытались исследовать роль резидентных макрофагов, относящихся к системе мононуклеарных фагоцитов (СМФ), в регуляции биосинтеза белка в различных органах и тканях. В качестве экспериментального подхода для выяснения регуляторной роли макрофагов мы использовали стимуляцию СМФ продигиозаном — липополисахаридом (ЛПС) бактериального происхождения [1].

Методика. Работа выполнена на крысах-самках Вистар массой 180—200 г. Стимуляцию СМФ осуществляли с помощью продигиозана («Мосхимфармпрепарат»), который вводили в хвостовую вену крыс в дозе 0,25 мг/кг. Через 24 ч животных декапитировали под легким эфирным наркозом. Скорость биосинтеза белка оценивали по включению  $^{14}\text{C}$ -лейцина в общий белок тканей *in vivo*. Для этого за 2 ч до декапитации всем животным внутривенно вводили 1,9 мБк D,L- $^{14}\text{C}$ -лейцина в 1 мл физиологического раствора. Сразу после декапитации кусочки тканей (печень, почки, сердце, легкие, скелетные мышцы, головной мозг, надпочечники, тимус, селезенка) помещали на лед и затем замораживали при  $-20^\circ\text{C}$ . Костный мозг выдавливали 1 мл раствора Хенкса с помощью шприца из правой бедренной кости животного. Навески тканей массой 250 мг гомогенизировали в 2 мл фосфатного буфера на холоду при 3000 об/мин в течение 1 мин. Аликвоты гомогената объемом по 100 мкл брали для определения общего содержания белка [9] и параллельно наносили на фильтры FN-16, предварительно обработанные 0,1 М лейцином в 10 % растворе трихлоруксусной кислоты. Для удаления липидов, нуклеиновых кислот и не связанного с белками  $^{14}\text{C}$ -лейцина фильтры с нанесенным на них материалом обрабатывали по методу [10]. Счет радиоактивности вели в жидкостном сцинтилляционном счетчике «Magk III» в присутствии толуольного сцинтиллятора. Скорость биосинтеза белка выражали в импульсах за 1 мин на 1 мг белка.

Изолированные клетки печени получали ферментативным способом [4, 13]. Печень перфузировали сначала *in situ* в течение 5—10 мин раствором Хенкса без  $\text{Ca}^{2+}$ . Затем орган присоединяли к перфузионному аппарату и проводили рециркуляционную перфузию через печеночную вену в течение 30 мин раствором Кребса — Рингера pH 7,4 при  $37^\circ\text{C}$ , содержащим 0,05 % коллагеназы (тип I; «Sigma»). Последующие процедуры выполняли при  $4^\circ\text{C}$ . Ткань разрушали с помощью шпателя. Очистку гепатоцитов и непаренхимных клеток проводили с помощью дифференциального центрифугирования [11]. Гепатоциты осаждали при 50 g, а непаренхимные клетки — при 300 g. Подсчет клеток проводили в камере Горяева. Выход гепатоцитов из 1 г ткани печени составлял  $45 \cdot 10^6 \pm 3 \cdot 10^6$ , а непаренхимных клеток —  $20 \cdot 10^6 \pm 4 \cdot 10^6$ . При оценке жизнеспособности клеток 90 % гепатоцитов и 95 % непаренхимных клеток печени исключали трипановый синий. Анализ препаратов с помощью световой микроскопии показал, что взаимное загрязнение клеток не превышало 1 %.

Скорость биосинтеза белка в изолированных клетках печени определяли по методу [13]. Клетки ресуспендировали в 5 мл раствора

Таблица 1

Изменение скорости биосинтеза общего белка в органах и тканях крыс в разные сроки после стимуляции СМФ продигозаном ( $n=8$ )

Органы и ткани	Включение $^{14}\text{C}$ -лейцина в белок, имп/мин на 1 мг белка			
	контроль	время после стимуляции СМФ, ч		
		24	48	72
Печень	4061±348	5925±524*	5955±441*	3251±142*
Селезенка	2249±177	3591±258*	3962±294*	2476±103
Костный мозг	3467±113	4751±299*	4454±262*	4518±351*
Тимус	2932±394	4570±278*	4117±123*	3169±227
Надпочечники	3645±238	5854±266*	3032±191	4034±128
Легкие	2887±145	3514±241*	3310±216	2044±106*
Почки	3728±149	2889±153*	3827±153	2446±120*
Сердце	1385±69	1327±69	1464±96	1231±49
Мышцы	807±64	810±56	524±37*	453±35*
Головной мозг	1194±86	1265±103	962±46	868±31*

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

Кребса — Рингера из расчета 2—3 мг клеточного белка на 1 мл раствора и инкубировали в присутствии 185 кБк  $^{14}\text{C}$ -лейцина с удельной активностью 10 МБк/моль в течение 4 ч при 37 °С. В процессе инкубации часть клеток (по 0,5 мл) переносили на мембранные фильтры для определения связанной с белками радиоактивности. Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали с помощью критерия  $t$  Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Наиболее чувствительным к стимуляции СМФ оказался процесс биосинтеза белка в органах, богатых резидентными макрофагами. Так, в селезенке и тимусе в течение первых 2 сут после введения продигозана скорость биосинтеза белка была выше контрольной на 50—70 % (табл. 1). Стойкое повышение белоксинтетических процессов обнаружено также в костном мозгу, что, вероятно, связано с активацией пролиферации клеток моноцитарного ряда.

Через 24 ч после стимуляции СМФ продигозаном скорость включения  $^{14}\text{C}$ -лейцина в общий белок печени возрастала на 46 %. Эффект сохранялся в течение 2 сут. Через 72 ч после введения ЛПС этот показатель снижался по сравнению с контролем на 24 %, а по сравнению с фазой индукции — в 1,8 раза ( $p<0,5$ ; см. табл. 1). Подобные фазовые изменения выявлены в ткани легких и надпочечниках. Напротив, в почках стимуляция СМФ продигозаном приводила к снижению скорости биосинтеза белка (см. табл. 1).

В тканях, относительно бедных резидентными макрофагами, эффект стимуляции СМФ продигозаном был слабо выражен. В сердечной мышце в течение 3 сут скорость синтеза белка оставалась без изменений, а в скелетной мышце и головном мозгу наблюдалось снижение этого показателя на 2-е и 3-е сутки (см. табл. 1).

Обнаруженные фазовые изменения скорости биосинтеза белка, вероятно, связаны с фазовыми изменениями активности СМФ при стимуляции ее ЛПС. Фаза активации (через 24 ч) характеризуется генерализованным выбросом медиаторов межклеточных взаимоотношений, в том числе и тех, которые участвуют в индукции синтеза белка. Через 3 сут после стимуляции СМФ продигозаном макрофаги находятся в состоянии релаксации и временно выключаются из системы стромально-паренхиматозных связей.

Таблица 2

Влияние стимуляции СМФ продигозаном на скорость биосинтеза белка в гепатоцитах и непаренхимных клетках печени ( $n=5$ )

Продолжительность инкубации, мин	Включение $^{14}\text{C}$ -лейцина, $10^3$ имп/мин на 1 мг белка			
	гепатоциты		непаренхимные клетки	
	контроль	опыт	контроль	опыт
15	2,1±0,2	4,0±0,3*	3,1±0,3	3,1±0,3
30	3,1±0,2	6,3±0,3*	3,8±0,3	4,7±0,6
45	4,6±0,5	8,6±0,6*	5,0±0,3	5,7±0,8
60	6,7±0,4	11,4±1,0*	6,0±0,4	7,5±1,4
90	11,6±0,6	17,4±1,2*	7,7±0,6	9,0±1,7
120	14,3±0,9	23,1±1,4*	10,9±0,5	12,1±1,6
180	18,1±0,8	30,9±1,6*	15,3±0,9	18,4±1,8
240	26,3±1,3	42,3±1,2*	21,7±1,8	29,9±1,9*

При анализе полученных результатов, естественно, возникает вопрос о том, не является ли обнаруженная нами активация синтеза белка в тканях результатом активации этого процесса в самих резидентных макрофагах или в других стромальных элементах. Исследования, проведенные на изолированных клетках печени, показали, что через 24 ч после стимуляции СМФ продигозаном скорость биосинтеза белка возрастает только в гепатоцитах (паренхимных клетках). В непаренхимных (стромальных) клетках печени различий в скорости биосинтеза белка в контроле и опыте не выявлено. Только в конце 4-часовой инкубации обнаружен небольшой, хотя и достоверный, сдвиг в сторону ее повышения (табл. 2). Полученные результаты свидетельствуют о том, что стимуляция СМФ продигозаном через 24 ч индуцирует биосинтез белка преимущественно в паренхимных элементах органов.

Таким образом, показано регуляторное влияние СМФ на биосинтез белка практически во всех органах и тканях. В состоянии физиологического покоя животного, при котором проходили данные исследования, скорость биосинтеза белка отражает активность процессов физиологической (внутриклеточной) регенерации тканей [3]. При этом повышение скорости биосинтеза белка в условиях стимуляции СМФ наиболее выражено там, где более активно протекают процессы физиологической регенерации в данный момент времени. При стимуляции СМФ продигозаном максимально выраженная индукция биосинтеза белка наблюдается через 1 сут в 6 наиболее активных в метаболическом отношении органах: печени, легких, надпочечниках, селезенке, костном мозге, тимусе.

Известно, что макрофаги обладают удивительной способностью отличать нормально функционирующие клетки от клеток, претерпевающих дегенеративные изменения. Однако механизм участия их в регуляции регенераторных процессов остается пока неясным.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ермольева З. В., Вайсберг Г. Е. Стимуляция неспецифической резистентности организма и бактериальные полисахариды.— М., 1976.
2. Панин Л. Е., Соколова М. В., Усынин И. Ф. // Пат. физиол.— 1991.— № 1.— С. 20—22.
3. Саркисов Д. С. Очерки по структурным основам гомеостаза.— М., 1977.

4. Усынин И. Ф. Метод получения изолированных клеток печени // Новые методы научных исследований в клинической и экспериментальной медицине.— Новосибирск, 1980.— С. 96—98.
5. Cunha G. R., Bigsby R. M., Cooke P. S., Sugimura Y. // Cell Diff.— 1985.— N 17.— P. 137—148.
6. Grobstein C. // Nat. Cancer Inst. Monogr.— 1976.— N 26.— P. 279—299.
7. Lasser A. // Hum. Path.— 1983.— Vol. 14.— P. 108—126.
8. Le Douarin N. M. // Med. Biol.— 1975.— Vol. 53.— P. 427—455.
9. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem.— 1951.— Vol. 193.— P. 1999—2006.
10. Mans R. J., Novelli G. D. // Arch. Biochem.— 1961.— Vol. 947.— P. 48—53.
11. Nilsson M., Berg T. // Biochim. biophys. Acta.— 1977.— Vol. 497.— P. 171—180.
12. Polverini P. J., Cotran R. S., Gimbrone M. A., Unanue E. R. // Nature.— 1977.— Vol. 269.— P. 1977.
13. Weigand K., Otto I., Schopf R. // Acta hepato-gastroent.— 1974.— Vol. 21.— P. 245—253.

Поступила 20.01.93

## ACTIVATION OF PROTEIN BIOSYNTHESIS IN RAT ORGANS AND TISSUES DURING STIMULATION OF THE MONONUCLEAR PHAGOCYTE SYSTEM BY PRODIGIOSAN.

L. E. Panin, I. F. Usynin, M. V. Goryacheva

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

As shown earlier, the mononuclear phagocyte system (MPS) plays an important role in regulation of protein synthesis in different rat tissues. *In vivo* stimulation of MPS by lipopolysaccharide from *Bacillus prodigiosum* caused a significant increase of protein synthesis in the liver, lungs, adrenal glands, thymus, spleen and bone marrow. The results obtained suggest that MPS is involved in the regulation of tissue regenerative process at the level of physiological state.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 615.214.32.015.2:615.835.12].015.4.07

И. А. Горошинская, Л. А. Немашкалова,  
А. А. Ходакова, И. В. Сорокина

## ВЛИЯНИЕ ПИРАЗИДОЛА НА СОДЕРЖАНИЕ МОНОАМИНОВ ПРИ ГИПОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ

НИИ биологии Ростовского-на-Дону университета

Важную роль в механизме патогенетических и адаптационных процессов, происходящих при гипоксии разной этиологии, играют изменения медиаторных систем, и прежде всего моноаминергических медиаторов. Имеющиеся в литературе данные по исследованию содержания катехоламинов и серотонина при гипоксии достаточно противоречивы [12, 13, 15—17]. Ранее нами установлены изменения в мозгу каталитических свойств моноаминоксидазы (МАО) типа А, являющейся основным ферментом обмена серотонина, а также обуславливающей инактивацию значительной части норадреналина и дофамина. При воздействии на животных гипоксии, соответствующей высоте 9000 м над уровнем моря в течение 1 и 3 ч, обнаружено снижение активности МАО типа А с субстратами серотонином и норадреналином, двукратное уменьшение сродства фермента к серотонину и изменение субстратной специфичности этой формы фермента, приобретающей способность дезаминировать диа-

мины, ГАМК, аминоксахара, в норме не являющиеся ее субстратами. При этом активность МАО типа Б, не участвующая в обмене серотонина и норадреналина, не изменяется в условиях гипоксии [2]. Показана роль МАО в механизме метаболических нарушений, происходящих при острых экстремальных воздействиях [1].

Обнаружение значительных изменений каталитических свойств МАО при гипоксии позволило предположить, что вещества, оказывающие специфическое влияние на МАО, могут изменять устойчивость организма к гипоксическому воздействию. В настоящее время нами изучается эффективность в качестве антигипоксического препарата пиразидола: 8-метил-2,3,3а,4,5,6-гексагидро-1Н-пиразин [3,2,1-j,k] карбазола гидрохлорида. Пиразидол, будучи обратимым избирательно действующим ингибитором МАО типа А, вызывает непродолжительное ингибирование этой формы фермента, препятствует изменению ее субстратной специфичности в условиях патологии, тормозит обратный захват моноаминов пресинаптическими нервными окончаниями и в то же время не дает побочных эффектов, свойственных необратимым ингибиторам МАО, хорошо переносится организмом и используется в фармакологической практике в качестве антидепрессанта с широким спектром терапевтического действия [7].

В данной работе исследовали содержание серотонина, 5-оксииндолуксусной кислоты (5-ОИУК), являющейся продуктом превращения серотонина по моноаминоксидазному пути, содержание дофамина и норадреналина в мозгу, а также серотонина и катехоламинов в крови при гипоксии и предварительном введении пиразидола. Кроме того, определяли уровень аскорбиновой кислоты в надпочечниках, который является показателем степени выраженности неспецифической стрессорной реакции.

**Методика.** Объектом исследования служили белые крысы-самцы массой 180—240 г. Моделирование гипобарической гипоксии осуществляли в проточной камере, снабженной щелочным поглотителем CO<sub>2</sub>. В камере создавали атмосферное давление 0,029 МПа, что соответствует «подъему» на высоту 9000 м. Время экспозиции 3 ч, скорость декомпрессии 0,005 МПа в 1 мин. Пиразидол вводили внутривентриально в дозе 25 мг на 1 кг массы трехкратно: 2 раза накануне опыта с интервалом между уколами 6 ч и в день опыта за 0,5 ч до помещения животных в камеру или за 3,5 ч до декапитации.

Содержание серотонина, 5-ОИУК, дофамина и норадреналина определяли по методу [4] на флюориметре «Hitachi 650-60». Содержание аскорбиновой кислоты в надпочечниках определяли титрованием по методу [6].

**Результаты и обсуждение.** Как видно из табл. 1, при гипоксии, соответствующей высоте 9000 м, наблюдается увеличение содержания моноаминов в мозгу крыс. Уровень серотонина увеличивается на 25 %, дофамина — на 19 %, норадреналина — на 33 %. Содержание 5-ОИУК снижается на 21 %. Снижение содержания 5-ОИУК свидетельствует об ингибировании моноаминоксидазного пути превращения серотонина и согласуется с обнаруженным нами при данном

Содержание моноаминов (в мкг/г) в мозгу крыс при гипоксии, соответствующей высоте 9000 м над уровнем моря в течение 3 ч, и введении пиразидола

Условия опыта	Серотонин	5-ОИУК	Дофамин	Норадреналин
Контроль	0,405±0,033 (9)	0,513±0,037 (10)	0,947±0,063 (10)	0,775±0,037 (10)
Гипоксия	0,507±0,010 (10)	0,406±0,037 (11)	1,129±0,059 (10)	1,029±0,112 (10)
<i>p</i>	<0,01	<0,05	<0,05	<0,05
Пиразидол	0,631±0,043 (10)	0,325±0,0555 (10)	0,986±0,103 (10)	0,801±0,055 (9)
<i>p</i>	<0,001	<0,05	>0,05	>0,05
Пиразидол+гипоксия	0,633±0,056 (12)	0,302±0,029 (12)	0,936±0,084 (12)	0,747±0,048 (12)
<i>p</i>	<0,01	<0,001	>0,05	>0,05
<i>p</i> <sub>1</sub>	<0,05	<0,05	>0,05	<0,05

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3 в скобках — число опытов, *p* — достоверность относительно контроля, *p*<sub>1</sub> — достоверность относительно гипоксии.

режиме гипоксии снижением активности МАО митохондрий мозга с субстратом серотином.

При введении пиразидола интактным животным содержание серотонина увеличивается на 56 %, содержание 5-ОИУК снижается на 37 %, уровень дофамина и норадреналина достоверно не изменяется. Увеличение содержания серотонина, сопровождаемое снижением содержания 5-ОИУК, обусловлено ингибированием МАО типа А пиразидолом. Согласно данным литературы, пиразидол оказывает более выраженное влияние на серотонинергическую систему по сравнению с адренергической [8, 10]. С этим может быть связано отсутствие изменения концентрации катехоламинов в мозгу при введении пиразидола интактным животным.

При действии гипоксии на фоне введения пиразидола все исследованные показатели достоверно не отличаются от таковых у интактных животных, которым вводили пиразидол. При этом введение пиразидола предотвращает увеличение содержания дофамина и норадреналина под влиянием гипоксии, уровень катехоламинов достоверно не отличается от контроля. Как и у интактных животных, введение пиразидола при гипоксии вызывает увеличение содержания серотонина и снижение содержания 5-ОИУК (на 56 и 41 % соответственно).

Увеличение содержания норадреналина и дофамина и снижение активности МАО обнаружены также при другом режиме острой барокамерной гипоксии — «высота» 6500 м в течение 6 ч [12]. При ишемии головного мозга крыс имеет место многократное увеличение внеклеточной концентрации дофамина. При этом предварительное введение ингибитора МАО паргилина повышало выживаемость животных [14].

Из табл. 2 видно, что при гипоксии, соответствующей подъему на высоту 9000 м в течение 3 ч, наблюдается достоверное снижение содержания дофамина в крови; содержание серотонина и норадреналина обнаруживает тенденцию к снижению. Введение пиразидола препятствует снижению содержания серотонина и катехоламинов в крови в условиях гипоксии.

Таким образом, при гипоксии нами обнаружено увеличение содержания серотонина, дофамина и

норадреналина в мозгу, обусловленное в значительной степени ингибированием МАО типа А, а также снижение содержания моноаминов в крови. Предварительное введение пиразидола оказывает нормализующее действие на содержание катехоламинов как в мозгу, так и в крови.

В табл. 3 представлены результаты исследования содержания аскорбиновой кислоты в надпочечниках. При гипоксии имеет место снижение содержания аскорбиновой кислоты в надпочечниках на 39 %. Введение пиразидола не оказывает влияния на содержание аскорбиновой кислоты у интактных животных и предотвращает ее снижение при гипоксии. У животных, подвергнутых действию гипоксии на фоне пиразидола, содержание аскорбиновой кислоты в надпочечниках достоверно не отличается от контроля.

Данные, полученные при исследовании содержания аскорбиновой кислоты в надпочечниках, свидетельствуют о стрессорном эффекте исследованного режима гипоксии и соответствуют результатам других авторов. Пиразидол оказывает выраженное антистрессорное действие. Ранее нами показано, что пиразидол повышает выживаемость животных при гипоксии и обладает мембранопротекторным эффектом.

Стресс-реакция связана с активацией гипо-

Таблица 2

Содержание моноаминов (в мкг/мл) в крови крыс при гипоксии, соответствующей высоте 9000 м над уровнем моря в течение 3 ч, и введении пиразидола

Условия опыта	Серотонин	Дофамин	Норадреналин
Контроль	0,421±0,026 (8)	0,327±0,034 (13)	0,460±0,040 (11)
Гипоксия	0,388±0,031 (13)	0,215±0,012 (14)	0,407±0,038 (10)
<i>p</i>	>0,05	<0,01	>0,05
Пиразидол	0,415±0,035 (12)	0,279±0,023 (16)	0,465±0,027 (16)
<i>p</i>	>0,05	>0,05	>0,05
Пиразидол+гипоксия	0,403±0,038 (11)	0,321±0,035 (15)	0,548±0,042 (15)
<i>p</i>	>0,05	>0,05	>0,05
<i>p</i> <sub>1</sub>	>0,05	<0,01	<0,001

Таблица 3

Содержание аскорбиновой кислоты (в мг/г) в надпочечниках крыс при гипоксии, соответствующей высоте 9000 м над уровнем моря в течение 3 ч, и введении пиразидола

Условия опыта	Аскорбиновая кислота
Контроль	3,560±0,124 (15)
Гипоксия	2,168±0,070 (16)
<i>p</i>	<0,001
Пиразидол	3,380±0,139 (11)
<i>p</i>	>0,05
Пиразидол+гипоксия	3,256±0,141 (20)
<i>p</i>	>0,05
<i>p</i> <sub>1</sub>	<0,001

таламо-гипофизарно-адренортикаральной и адренергической систем, рассматриваемых как стресс-реализующие системы организма [9]. Катехоламины, выходящие из адренергических терминалей и надпочечников, способствуют накоплению H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и стимуляции перекисного окисления липидов, т. е. развитию так называемого пероксидного стресса [5]. Серотонин, напротив, является медиатором одной из основных стресс-лимитирующих систем организма. Активация серотонинергической и связанной с ней опиоидергической систем ограничивает стресс-реакцию и предупреждает ее повреждающие эффекты [9]. Показано также прямое антиоксидантное действие серотонина [3, 11].

Обнаруженное нами повышение содержания серотонина более чем в полтора раза при введении пиразидола, имеющее место как у интактных животных, так и у подвергнутых действию гипоксии, позволяет предполагать важное значение серотонина в механизме защитного эффекта пиразидола при гипоксии. При этом у защищенных пиразидолом животных не наблюдается увеличения в условиях гипоксии содержания катехоламинов в мозгу и снижения уровня аскорбиновой кислоты в надпочечниках. Это свидетельствует об ограничении стресс-реакции, возможно, связанном с активацией серотонинергической системы. Таким образом, введение пиразидола можно рассматривать как способ активации серотонинергической стресс-лимитирующей системы.

Авторы выражают глубокую благодарность проф. В. З. Горкину за содействие в предоставлении для исследования препарата пиразидола, синтезированного во Всесоюзном научно-исследовательском химико-фармацевтическом институте под руководством В. И. Шведова, и за постоянный интерес к работе.

Финансирование исследований проводилось по гранту Б-41-7 Министерства науки, высшей школы и технической политики России.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Горошинская И. А. // Вопр. мед. химии.— 1989.— № 2.— С. 2—10.
2. Горошинская И. А., Рудик Г. М. // Физиол. журн. СССР.— 1987.— Т. 73, № 4.— С. 532—536.
3. Каган В. Е., Смирнов А. В., Савов В. М., Горкин В. З. // Вопр. мед. химии.— 1984.— № 1.— С. 112—118.
4. Каган В. М., Печева И. В. // Лаб. дело.— 1979.— № 5.— С. 301—303.

5. Колесниченко Л. С., Кулинский В. И. // Физиол. журн. СССР.— 1990.— Т. 76, № 10.— С. 1418—1425.
6. Кушманова О. Д., Ивченко Г. М. Руководство к практическим занятиям по биологической химии.— М., 1974.— С. 94—99.
7. Машковский М. Д. Лекарственные средства. Т. 1.— М., 1985.— С. 90—103.
8. Машковский М. Д., Горкин В. З., Андреева Н. И. и др. // Фармакол. и токсикол.— 1975.— № 5.— С. 531—536.
9. Меерсон Ф. З., Пшеничкова М. Г. Стресс-лимитирующие системы организма и новые принципы профилактической кардиологии (Обзор. информ. Медицина и здравоохранение. Серия: Проблемы кардиологии. Вып. 3).— М., 1989.
10. Паршин В. А., Головина С. М., Андреева Н. И. // Бюл. exper. биол.— 1987.— № 8.— С. 178—180.
11. Сергеев П. В., Сейфила Р. Д., Дунаев В. Г., Руднев Ю. П. // Там же.— 1976.— № 2.— С. 169—171.
12. Шатемирова К. К., Минько Ю. В., Зеленичкова В. А. // Косм. биол.— 1989.— № 2.— С. 89—91.
13. Cheymol J. / Arch. Un. med. Balkan.— 1983.— Vol. 21, N 1—2.— P. 120—125.
14. Damsma G., Boisvert D. P., Mudrick L. A. et al. // J. Neurochem.— 1990.— Vol. 54, N 3.— P. 801—808.
15. Lust W. D., Arai H., Yasumoto Y. et al. // Cerebral Energy Metabolism and Metabolic Encephalopathy / Ed. D. W. McCandless.— New York, 1985.— P. 79—117.
16. Olson E. B., Vidruk E. H., McCrimmon D. R., Dempsey J. A. // Resp. Physiol.— 1983.— Vol. 54, N 1.— P. 79—96.
17. Phebus Lee A., Clemrns J. A. // Life Sci.— 1989.— Vol. 44, N 19.— P. 1335—1342.

Поступила 08.07.92

#### EFFECT OF PYRAZIDOL ON CONTENT OF MONOAMINES IN HYPOBARIC HYPOXIA.

I. A. Goroshinskaya, L. A. Nemashkalova, A. A. Khodakova, I. V. Sorokina

Institute of Biology, University, Rostov-on-Don.

Increase of serotonin content and decrease in 5-hydroxyindolyl acetic acid (5-HIAA) were observed under hypoxic conditions (9,000 m, 3 hrs) which correlated with inhibition of monoamine oxidase A. Administration of the monoamine oxidase inhibitor pyrazidol caused the more pronounced increase of serotonin levels and decrease of 5-HIAA in control animals as well as in hypoxic animals. The catecholamines increased in hypoxia, pretreatment with pyrazidol prevented this increase. Preliminary administration of pyrazidol also increased the content of blood catecholamines, which reduced in hypoxia. Pyrazidol exhibited the antistress effect as the drug inhibited a decrease in adrenal ascorbic acid levels in hypoxic conditions.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 615.246.2.03:616.153.922-034

Ю. М. Лопухин, И. П. Андрианова,  
В. Е. Рыженков, Н. А. Самойлова,  
А. М. Чистякова, Ю. В. Фролова, И. А. Ямсков,  
В. И. Сергиенко, Я. И. Лапук

#### ЭНТЕРОСОРБЕНТ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМ ХЛОРИДОМ ТРИМЕТИЛАМИНОЭТАНОЛА. I. ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Институт физико-химической медицины Минздрава России, Москва, НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Институт пищевых веществ РАН, Москва

Известно, что одним из главных факторов риска развития атеросклероза являются дислипотеинемии (ДЛП) атерогенного характера [3, 9]. Фармакотерапия атерогенных ДЛП направлена

на нормализацию нарушенного обмена липидов и липопротеинов (ЛП), и в первую очередь на снижение содержания холестерина (ХС) и атерогенных ЛП в плазме крови. Наряду с применением гиполипидемических средств системного действия, в частности ингибирующих биосинтез ХС, эффективно и использование соединений, не всасывающихся в кровоток и в то же время способствующих удалению избытка ХС в результате энтеросорбции последнего и (или) желчных кислот. Эффективно применение высокомолекулярных желчных секвестрантов коlestипола и коlestирамина [7]. Эти энтеросорбенты представляют собой нерастворимые аниониты: коlestипол — сополимер тетраэтиленпентамина и эпихлоргидрина, коlestирамин — сополимер хлорида триметиламиностирола с дивинилбензолом. В качестве энтеросорбентов используют и природные полимеры. Описано применение в качестве гиполипидемических веществ неспецифических сорбентов — углей и пищевых волокон [5]. Следует, однако, отметить, что длительный прием больших количеств твердых, нерастворимых полимеров часто приводит к нарушениям функций кишечника [4]. В связи с этим в настоящее время проводятся исследования по созданию водорастворимых энтеросорбентов. Так, в опытах на крысах с индуцированной гиперхолестеринемией отмечено выраженное гиполипидемическое действие при использовании энтеросорбентов, содержащих стероидные гликозиды [1]. В этом плане представляют также интерес хорошо зарекомендовавшие себя в опытах *in vitro* и на собаках два катионных полимера: поли-[(диметилимино)триметиленхлорид] и поли-(диаллилдиметиламмоний хлорид) [11].

В настоящей работе приведены данные, касающиеся исследования гиполипидемических свойств нового водорастворимого энтеросорбента — полимерсвязанного хлорида триметиламиноэтанола — в сравнении с наиболее широко применяемым производимым за рубежом препаратом коlestирамином.

**Методика.** Изучен водорастворимый энтеросорбент, представляющий собой высокомолекулярное аффинное соединение, содержащее лиганд с четвертичным атомом азота (соединение 1). Сорбент получали иммобилизацией хлорида триметиламиноэтанола на синтетическом полимере

регулярного строения. Содержание специфического лиганда определяли после гидролиза полимера 5,6 н. соляной кислотой в течение 3 ч (110 °С) или 0,2 н. гидроксидом натрия в тех же условиях с использованием аналитических методов: с фосфорномолибденовой кислотой [15], перйодидом калия [6] или высокоэффективной жидкостной хроматографией [10]. Во всех случаях содержание лиганда с кватернизованным амином было 200—250 мг на 1 г сорбента. Контроль за возможной примесью хлорида триметиламиноэтанола проводили с помощью тонкослойной хроматографии на пластинках фирмы "Merck" (Германия) в системе хлороформ — *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (2:3:1:3) с последующим проявлением реактивом Драгендорфа. В ПМР-спектре обнаруживали сигнал N-метильных протонов  $\delta$  3,00 м. д. Спектры ПМР снимали на спектрометре "Tesla BS 467 A" (Чехо-Словакия). Элементный анализ и данные ИК-спектроскопии подтверждали структуру полимера. Наличие лиганда, содержащего четвертичный атом азота и ковалентно связанного с матрицей полимера, подтверждалось способностью сорбента в опытах *in vitro* образовывать нерастворимые полиэлектролитные комплексы с сульфополисахаридами и поликарбоновыми кислотами. Мол. м. сорбента составляла 45 000—55 000 Д (метод ультрацентрифугирования).

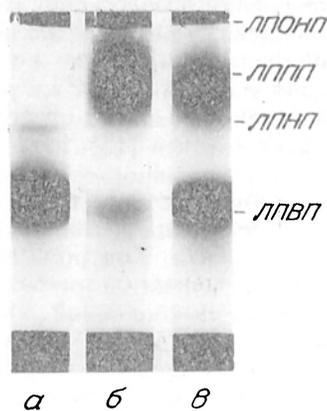
Острую токсичность соединения 1 определяли на мышках-самцах массой 18—20 г. Было установлено, что ЛД<sub>50</sub> для этого соединения составляла более 10 г/кг (введение больших доз было затруднено).

Гиполипидемическое действие полученного соединения изучали в опытах на 50 крысах-самцах массой 210—230 г с индуцированной гиперлипидемией (экспериментальной ДЛП), которую вызывали путем введения в стандартный рацион животных 2,5 % ХС, 0,12 % метилтиоурацила и 30 % прогретого подсолнечного масла в течение 14 дней. Животные были разделены на 5 групп: 1-я — интактные крысы; 2-я — получавшие гиперхолестеринемическую диету (ГХС диету); 3-я — получавшие ГХС диету и соединение 1 в дозе 250 мг/кг через зонд перорально; 4-я — получавшие ГХС диету и препарат сравнения коlestирамин в дозе 250 мг/кг, суспендированный в 2 %

**Влияние соединения 1 и коlestирамина на содержание липидов в сыворотке крови и печени крыс с индуцированной гиперхолестеринемией**

Группа животных	Липиды сыворотки крови, ммоль/л		Липиды печени, мг/г	
	ХС	ТГ	ХС	ТГ
1. Интактные (5)	1,37±0,05	0,72±0,12	2,93±0,26	10,40±0,60
2. Получавшие ГХС диету (12)	4,21±0,47	0,30±0,04	41,60±1,17	37,20±4,80
3. Получавшие ГХС диету и соединение 1 250 мг/кг (11)	3,00±0,10	0,24±0,02	32,90±1,40	36,40±5,80
4. Получавшие ГХС диету и коlestирамин 250 мг/кг (11)	4,16±0,25	0,25±0,03	40,00±2,65	42,60±3,10
5. Получавшие ГХС диету и коlestирамин 2,5 г/кг (11)	2,99±0,28	0,20±0,03	32,50±1,29	35,10±4,50
<i>p</i> <sub>1-2</sub>	<0,001	<0,01	<0,001	<0,001
<i>p</i> <sub>2-3</sub>	<0,05	нд	<0,001	нд
<i>p</i> <sub>2-4</sub>	нд	нд	нд	нд
<i>p</i> <sub>2-5</sub>	<0,05	нд	<0,001	нд

Примечание. В скобках — число животных, нд — недостоверно.



Разделение ЛП сыворотки крови крыс при ультрацентрифугировании в градиенте плотности бромистого калия.

а — интактные животные; б — животные, получавшие ГХС диету 14 дней; в — животные, получавшие ГХС диету и соединение I (250 мкг/кг) перорально. ЛПОНП — липопротеиды очень низкой плотности ( $d=1,006$  г/мл); ЛПНП — липопротеиды промежуточной плотности ( $d=1,006-1,03$  г/мл); ЛПВП — липопротеиды высокой плотности ( $d=1,03-1,063$  г/мл); ЛПНП — липопротеиды низкой плотности ( $d=1,03-1,063$  г/мл); ЛПВП — липопротеиды высокой плотности ( $d=1,063-1,21$  г/мл).

крахмальном геле, также через зонд; 5-я — получавшие ГХС диету и холестирамин в дозе 2,5 г/кг, смешанный с диетой. Последняя группа животных была выделена в связи с тем, что, судя по данным литературы [12], наиболее выраженное гипохолестеринемическое действие холестирамин оказывает в эксперименте в дозе 2,5—5 г/кг.

По окончании опыта животных декапитировали после 14—18 ч голодания, собирали кровь и брали печень. В сыворотке крови определяли содержание ХС и триглицеридов (ТГ) на автоанализаторе АА-11 фирмы «Техникон» (США); ХС в печени определяли по [8], ТГ в печени — по [13]. Спектр ЛП сыворотки крови изучали методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности растворов бромистого калия предварительно окрашенной сыворотки крови [14]. Полученные данные обрабатывали статистически, используя критерий  $t$  Стьюдента [2].

Результаты и обсуждение. Как следует из приведенной таблицы, в условиях гиперхолестеринемии, развивающейся у крыс на данном рационе, введение соединения I снизило повышенный уровень ХС в сыворотке крови крыс на 29% и уменьшило накопление ХС в печени на 22%. Препарат сравнения холестирамин, примененный также в дозе 250 мг/кг, оказался неэффективным. Использование холестирамина в дозе, в 10 раз большей (2,5 г/кг), оказало гипохолестеринемическое действие, сравнимое с действием соединения I в дозе 250 мг/кг. Синтезированный энтеросорбент вызывал также снижение содержания ТГ крови на 20%.

Изучение спектра ЛП сыворотки крови крыс, получавших ГХС диету и соединение I, показало, что применение последнего оказало благоприятное влияние на нарушенный ГХС диетой метаболизм ЛП. Так, из рисунка видно, что введение соединения I снизило интенсивность и ширину полосы, соответствующей расположению ЛП промежуточной плотности, преобладающих у крыс, находящихся на атерогенном рационе, и привело к увеличению интенсивности полосы, соответствующей расположению антиатерогенных ЛП высокой плотности. Следовательно, гипохолестерине-

мическое действие соединения I проявилось и на спектре ЛП сыворотки крови крыс с экспериментальной ДЛП.

Таким образом, в результате проведенных исследований показано, что синтезированный энтеросорбент с ковалентно иммобилизованным хлоридом триметиламиноэтанола по гиполипидемическим свойствам превосходит широко используемый в медицинской практике зарубежный желчный секвестрант холестирамин.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Андрианова И. П., Рыженков В. Е., Лапук Я. И. и др. // *Вопр. мед. химии.*— 1986.— № 2.— С. 80—82.
2. Бельский М. Л. *Элементы количественной оценки фармакологического эффекта.*— 2-е изд.— Л., 1963.
3. Климов А. Н., Рыженков В. Е. // *Клиническая фармакология* / Под ред. В. В. Закусова.— М., 1978.— С. 380—392.
4. Климов А. Н., Никольцева Н. Г. *Липопротеиды, дислипидозы и атеросклероз.*— Л., 1984.
5. *Энтеросорбция* / Под ред. Н. А. Белякова.— Л., 1991.
6. Appleton H. D., La Du B. N., Loy B. B. et al. // *J. biol. Chem.*— 1953.— Vol. 205, N 2.— P. 803—813.
7. Ast M., Frishman W. // *J. clin. Pharmacol.*— 1990.— Vol. 30.— P. 99—106.
8. Bragdon G. // *Lipids and the Steroids Hormons in Clinical Medicine.*— Philadelphia, 1960.— Vol. 2.— P. 7—8.
9. Expert Panel Report of the National Cholesterol Education Program // *Arch. intern. Med.*— 1988.— Vol. 148.— P. 36—69.
10. Heen E., Hagenmaier H., Rennen J. // *J. Chromatogr.*— 1991.— Vol. 537, N 1—2.— P. 514—519.
11. Kuron G., Grier N., Huff J. W. // *Atherosclerosis.*— 1980.— Vol. 37, N 3.— P. 353—360.
12. Maxwell R., Nawroski J., Untendorf P. // *Ibid.*— 1983.— Vol. 48.— P. 195—203.
13. Neri B., Frings S. // *Clin. Chem.*— 1973.— Vol. 10.— P. 1201—1202.
14. Terpstra H., Woodward G., Sanchez-Muniz F. // *Analyt. Biochem.*— 1981.— Vol. 111.— P. 149—157.
15. Wheedon L. W., Collins F. D. // *Biochem. J.*— 1959.— Vol. 70, N 1.— P. 43—45.

Поступила 10.09.92

#### THE ENTEROSORBENT CONTAINING IMMOBILIZED TRIMETHYLAMINE ETHANOL CHLORIDE. I. HYPOLIPIDEMIC PROPERTIES.

Yu. M. Lopukhin, I. P. Andrianova, V. E. Ryzenkov, N. A. Samoilova, A. M. Chislyakova, Yu. V. Frolova, I. A. Yamskov, V. I. Sergienko, Ya. I. Lapuk

Institute of Physicochemical Medicine, Ministry of Public Health of the Russian Federation; Institute of Food Stuffs, Academy of Sciences of the Russian Federation, Moscow; Institute of Experimental Medicine, Academy of Medical Sciences of the Russian Federation, St. Petersburg.

Hypolipidemic properties of the synthesized enterosorbent, water soluble polymer containing covalently immobilized trimethylamine ethanol chloride, were studied. Content of cholesterol in blood was decreased by 29% and accumulation of cholesterol in liver tissue — by 22% after oral administration of the enterosorbent at a dose of 250 mg/kg into rats with hypercholesterolemia. Cholestyramine exhibited the similar effect only at a dose of 2.5 g/kg. Except for the hypocholesterolemic effect, the enterosorbent altered also the lipoprotein spectrum in rat blood serum.

А. А. Булатов, Т. А. Осипова, А. Л. Григорьян,  
В. П. Федотов

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ИММУНОСОРБЦИИ ГОРМОНА РОСТА ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ И ЖИДКОСТЕЙ ЧЕЛОВЕКА

Институт экспериментальной эндокринологии Всероссийского эндокринологического научного центра РАМН, Москва

Благодаря уникальной способности моноклональных антител (МКА) избирательно распознавать отдельные молекулы и даже эпитопы в антигенной структуре молекул оказалось возможным эффективное выделение биологически активных веществ из самых сложных смесей. В литературе появляются сообщения об успешном применении МКА, иммобилизованных на твердой фазе, для очистки гипофизарных белковых гормонов [10, 13].

Большой научный и практический интерес вызывает изучение гипофизарного гормона роста человека благодаря широте спектра его биологического действия, видовой специфичности и существованию природных молекулярных вариантов. Однако традиционные хроматографические методы выделения гормона роста многоступенчаты и трудоемки, что осложняет его всестороннее исследование в биологических тканях и жидкостях человека. Принципиально новые возможности может дать использование для этих целей метода иммуносорбции на иммобилизованных МКА.

Цель настоящей работы состояла в создании специфичного иммуносорбента на основе МКА против гормона роста человека и исследовании возможностей его применения для выделения и изучения гормона роста из биологических тканей и жидкостей человека.

**Методика.** В работе использовали МКА, полученные и изученные ранее во Всероссийском эндокринологическом центре РАМН и НИИ морфологии человека РАМН [3]. Препарат МКА для приготовления иммуносорбента получали из асцитной жидкости мышей линии BALB/c высаливанием сульфатом аммония с последующей ионообменной хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе DEAE-52 («Wathman», Англия). Очищенные МКА при помощи бромциановой сшивки ковалентно иммобилизовали на сефарозе 4В (8 мг антител на 1 мл сорбента) по стандартной схеме, рекомендованной фирмой «Pharmacia» (Швеция) с небольшой модификацией: вместо бикарбонатного буфера рН 8,8 использовали 0,05 М натрий-калий фосфатный буфер рН 7,8.

Для характеристики иммуносорбента и подбора оптимальных условий сорбции и элюции использовали очищенный препарат гормона роста, полученный из экстракта гипофизов людей [14]. Исходным материалом для иммуносорбции гормона служили высушенная ацетоном ткань гипофизов людей после экстракции из нее гликопротеиновых гормонов [14], сыворотка крови

и моча людей с акромегалией, а также экстракт свежезамороженной ткани плаценты женщин.

Для экстракции гормона роста из ацетонированной ткани гипофизов (2 г) высушенную ткань суспендировали в 40 мл (20 объемов) охлажденной дистиллированной воды, оставляли на 1 ч при 4 °С, затем добавляли 2 мл 1 н. NaOH, через 5 мин доводили рН до 10,5 и оставляли на ночь при перемешивании. По окончании экстракции рН смеси доводили до 7,0 4 н HCl. Ткань отделяли центрифугированием при 4000 об/мин в течение 30 мин. Надосадочную жидкость фильтровали на бюхнеровской воронке. В результате было получено 50 мл надосадочной жидкости, которую использовали для выделения гормона роста с помощью иммуносорбента.

Для экстракции гормона роста из плаценты человека 500 г замороженной ткани гомогенизировали в 1500 мл 0,1 М натрий-бикарбонатного буфера рН 9,5, встряхивали на качалке при 4 °С в течение 2 ч и центрифугировали в течение 1 ч при 3000 об/мин. К супернатанту при перемешивании добавляли сухой сульфат аммония до 25 % насыщения. Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием в течение 1 ч при 5500 об/мин. К прозрачному супернатанту добавляли сухой сульфат аммония до 55 % насыщения. Сформировавшийся через 24 ч при 4 °С осадок собирали центрифугированием (режим прежний) и суспендировали в 0,1 М натрий-бикарбонатном буфере. После диализа против 0,09 М натрий-бикарбонатного буфера раствор лиофилизировали. Перед нанесением на колонку, заполненную иммуносорбентом, лиофилизированный продукт растворяли в 100 мл 10 мМ натрий-фосфатного буфера рН 7,4. Сыворотку крови (1—3 мл) перед нанесением на иммуноаффинную колонку разбавляли в 3 раза 0,15 М NaCl. Концентрирование гормона из мочи с помощью иммуносорбента проводили после диализа мочи (80—200 мл) при 4 °С против 10 мМ натрий-фосфатного буфера в течение 48 ч со сменой буферного раствора через 24 ч.

Таблица 1

Аминокислотный состав (в остатках на 1 моль) гидролизата гормона роста, выделенного из гипофиза иммуноаффинной хроматографией

Аминокислота	Гидролизат	Теоретический состав*
Asp	20,6	20,0
Thr	9,8	10,0
Ser	19,2	18,0
Glu	27,4	27,0
Pro	7,7	8,0
Gly	10,2	8,0
Ala	7,9	7,0
<sup>1</sup> / <sub>2</sub> Cys	—	4,0
Val	7,4	7,0
Met	3,3	3,0
ILeu	6,5	8,0
Leu	25,7	27,0
Tyr	6,5	8,0
Phe	12,5	13,0
Hys	3,6	3,0
Lys	9,8	9,0
Arg	9,8	10,0
Trp	—	1,0

\* Согласно первичной структуре [12].

Для изоляции гормона роста хроматографическую колонку (1×5 см) заполняли иммуносорбентом, медленно пропускали подготовленные экстракты, сыворотку или мочу (со скоростью 4 мл/ч) и промывали 10 мМ натрий-фосфатным буфером рН 7,4, в случае мочи еще и 1,5 М NaCl. Связавшийся материал элюировали 1 М (рН 7,4) или 3 М (рН 4,0) роданидом аммония.

Материал, элюированный с иммуносорбента после диализа против 10 мМ натрий-фосфатного буфера рН 7,4 при 4 °С в течение 48 ч, анализировали методом электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия в полиакриламидном геле с окраской белков кумасси [11] и в системе радиоиммуноблоттинга. Радиоиммуноблоттинг проводили, как описано [16], осуществляя перенос белков на нитроцеллюлозный фильтр после разделения электрофорезом в 15 % геле в присутствии додецилсульфата натрия с восстановлением (в присутствии β-меркаптоэтанола) и без него. Для выявления иммунореактивных компонентов нитроцеллюлозный фильтр обрабатывали моноспецифической кроличьей антисывороткой к гормону роста человека, а затем белком А, меченным <sup>125</sup>I.

Иммунологическую активность препарата гормона роста, выделенного из гипофизов, оценивали с помощью радиоиммунологической системы, разработанной в лаборатории на основе высокоочищенного гормона и моноспецифической антисыворотки [2]. Биологическую активность препарата гормона изучали в тибиа-тесте на гипофизэктомированных крысах [9]. Аминокислотный анализ проводили после гидролиза проб в 5,7 н.

HCl при 110 °С в течение 24 ч в автоматическом аминокислотном анализаторе «Биотроник-7000» (Германия). N-концевые аминокислоты белков в полученных препаратах анализировали по реакции с дансилхлоридом с последующей идентификацией дансильированных аминокислот хроматографией на полиамидных пластинках [17].

Результаты и обсуждение. В результате иммобилизации МКА на сефарозе 4 В, активированной бромцианом, был получен иммуносорбент, эффективно связывающий гормон роста человека. С помощью высокоочищенного гормона роста, выделенного методом [14], установлено, что связывающая способность приготовленного иммуносорбента составляла 0,6 мг на 1 мл геля сорбента. Это достаточная емкость для эффективного выделения белков из сложных смесей. При десорбции высокоочищенного гормона роста, адсорбированного на колонке, 3 М роданидом аммония элюировали не менее 90 % гормона. Таким образом, приготовленный сорбент был вполне пригоден для выделения гормона роста из экстракта ткани гипофизов.

При выделении гормона роста из гипофизов с помощью иммуносорбента материал экстракта ткани гипофизов, связавшийся с иммобилизованными на сефарозе МКА, десорбировали с колонки 3 М роданидом аммония. После обессоливания на сефадексе G-25 он был охарактеризован по аминокислотному составу и N-концевой аминокислоте. Как видно из табл. 1, аминокислотный состав препарата гормона роста, элюированного с иммуноаффинной колонки, был близок к теорети-

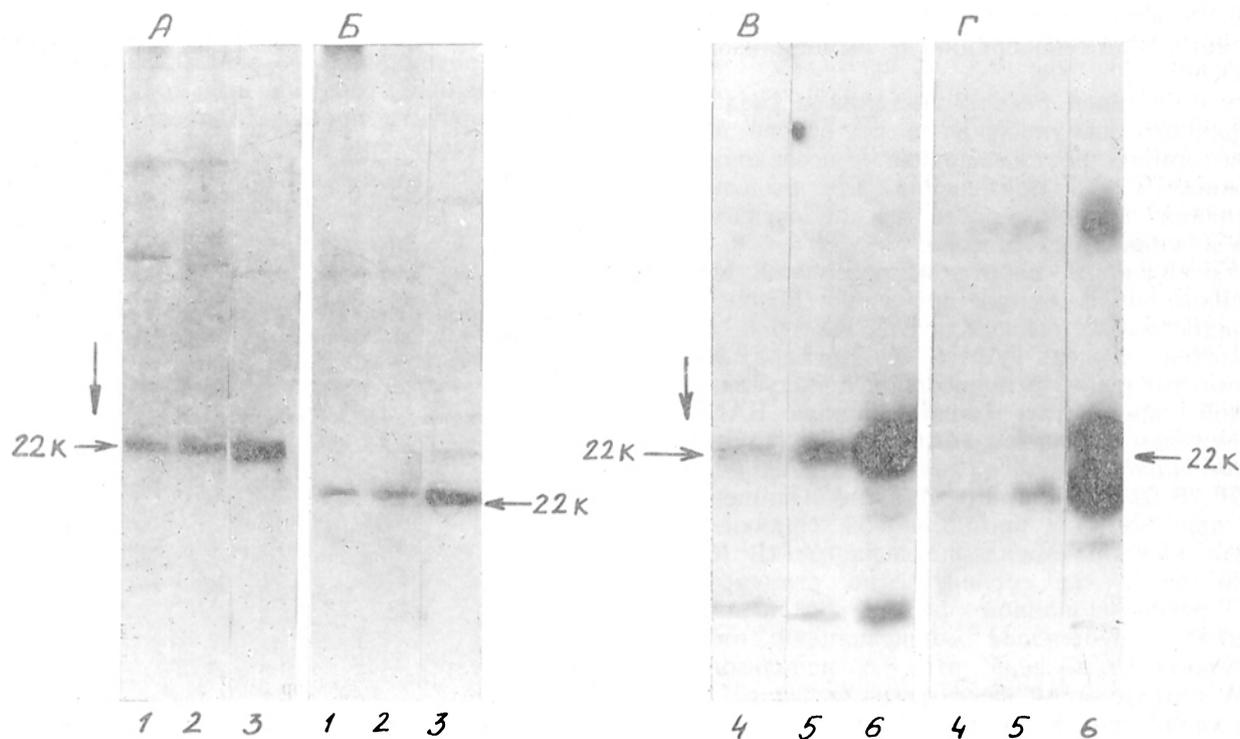


Рис. 1. Электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (а, б) и радиоиммуноблоттинг (в, г) препаратов гормона роста.

а, в — редуцирующие условия; б, г — нередуцирующие условия. 1 — гипофизарный гормон роста, выделенный по методу [14] и дополнительно подвергнутый иммуноаффинной хроматографии; 2 — гипофизарный гормон роста, выделенный иммуноаффинной хроматографией (элюция 3 М роданидом аммония); 3 — гипофизарный гормон роста, выделенный по методу [14]; 4 — гормон роста, выделенный из экстракта плаценты иммуноаффинной хроматографией; 5 — гипофизарный гормон роста, выделенный иммуноаффинной хроматографией (элюция 3 М роданидом аммония); 6 — гипофизарный гормон роста, выделенный по методу [14]. Здесь и на рис. 3 и 4 стрелкой показано направление движения белков при электрофорезе.

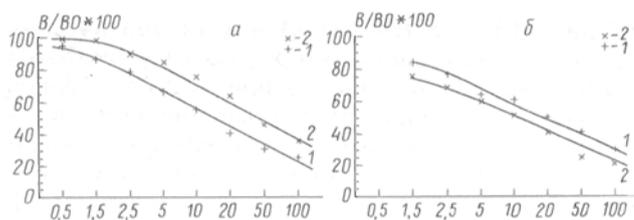


Рис. 2. Сравнение иммунологической активности препаратов гормона роста.

По осям абсцисс — активность гормона роста, нг/мл; по осям ординат — а: 1 — гормон роста, выделенный по методу [14]; 2 — гормон роста после элюции с иммуносорбента 3 М роданидом аммония; б: 1 — гормон роста, выделенный по методу [14]; 2 — гормон роста после элюции с иммуносорбента 1 М роданидом аммония.

ческому составу гормона роста человека. Белок был гомогенен по N-концевой аминокислоте (фенилаланин). Выход гормона роста после обессоливания на сефадексе G-25 из 2 г ацетонированных гипофизов составил 5,4 мг.

Следует заметить, что, поскольку гипофизарный гормон роста человека отличается наличием множественных форм при электрофорезе в полиакриламидном геле, препараты гормона, очищенные традиционными хроматографическими методами, обычно выявляются в виде одного доминирующего компонента с мол. м. 22 кДа и 2—3 дополнительных компонентов [1, 6].

Дальнейшая характеристика гормона роста, снятого с аффинной колонки, в электрофорезе с додецилсульфатом натрия (окраска белка кумасси; рис. 1, а, б) и в системе радиоиммуноблоттинга (рис. 1, в, г) свидетельствует о соответствии его электрофоретических компонентов компонентом высокоочищенного гормона роста, выделенного хроматографическими методами и взятого в качестве референтного препарата.

При испытании в радиоиммунологической системе препарат гормона роста, выделенный с помощью иммуноаффинной хроматографии, проявлял достаточно высокую иммунологическую активность (рис. 2, а). Изучение биологической активности гормона роста в тибиа-тесте на гипофизэктомированных крысах (табл. 2) свидетельствуют, что препарат обладал свойственной данному гормону ростовой активностью. Вместе с тем обращало на себя внимание, что его активность после элюции 3 М роданидом аммония была несколько ниже иммунологической и биологической активности препарата гормона, полученного по традиционной методике [14]. Возможно, это является результатом отрицательного воздействия высокой концентрации роданида аммония.

Результаты испытания биологической и иммунологической активности препарата гормона роста, элюированного не 3 М, а 1 М роданидом аммония, свидетельствуют в пользу этого предположения. Как видно из табл. 2, гормон, элюированный с иммуносорбента 1 М роданидом аммония, и гормон, полученный методом [14], в дозе 20 мкг в равной степени стимулируют увеличение ширины эпифизарной пластинки тибиа у гипофизэктомированных крыс. Результаты, представленные на рис. 2, б, свидетельствуют об отсутствии у этих препаратов существенных различий и в иммунологической активности. Следует отметить, что в условиях десорбции 1 М роданидом

аммония эффективность элюции гормона роста оставалась высокой и составляла 40—60 %.

Доказательство существования природных молекулярных вариантов гормона роста человека в последнее время выдвигает на первый план принципиально новую проблему поиска, идентификации и исследования роли форм гормона роста в гормональной регуляции и развитии патологических состояний. В связи с этим особый интерес представляло исследование возможности использования иммуносорбции на МКА для концентрирования гормона роста и его форм из биологических жидкостей и тканей, где его содержание очень низкое. Важной особенностью МКА, на основе которых был создан иммуносорбент, является наличие высокой специфичности по отношению к гормону роста человека. По нашим данным [3], эти МКА не дают перекрестной реакции с такими близкородственными антигенами, как пролактин и плацентарный лактоген человека.

С помощью полученного иммуносорбента было проведено концентрирование гормона роста из сыворотки крови больных с акромегалией (содержание гормона роста в сыворотке 43—100 нг/мл). Материал, снятый с колонки 1 М роданидом аммония, анализировали электрофорезом в полиакриламидном геле в сочетании с радиоиммуноблоттингом. В качестве референтного препарата использовали гормон роста, выделенный по методу [14].

Результаты радиоиммуноблоттинга представлены на рис. 3. Как видно, в сыворотке крови присутствует иммунореактивный компонент, по электрофоретической подвижности соответствующий основной секретируемой гипофизом 22К-форме гормона роста, что согласуется с данными [5].

По крайней мере в одной из исследуемых сывороток, где на радиоавтографе зоны реакции были наиболее четкими, иммуноблоттингом в нередуцирующих условиях (см. рис. 3, 1), кроме компонента с мол. м. 22 кДа, отчетливо проявляются иммунореактивные компоненты с мол. м. около 25 и 15 кДа. В то же время в восстановляющих условиях (см. рис. 3, 5) иммунореактивный компонент с мол. м. 25 кДа не выявляется, но при этом хорошо выраженные зоны

Таблица 2

Ростстимулирующая активность гормона роста, выделенного иммуноаффинной хроматографией, в тибиа-тесте на гипофизэктомированных крысах

Препарат	Доза, мкг*	Число животных	Ширина эпифизарной пластинки тибиа, мкм
Контроль — 0,9 % раствор NaCl	—	10	171 ± 7,8
Гормон роста 1	20	8	210 ± 6,9
Гормон роста 3	20	8	210 ± 7,4
Контроль — 0,9 % раствор NaCl	—	10	165 ± 5,5
Гормон роста 1	20	10	210 ± 5,4
	60	8	260 ± 7,4
Гормон роста 2	20	9	191 ± 5,4
	60	8	220 ± 6,3

Примечание. Звездочка — общая доза препаратов, вводимая в течение 4 дней. Гормон роста 1 выделен по методу [14], гормон роста 2 элюирован с иммуносорбента 3 М роданидом аммония, гормон роста 3 элюирован с иммуносорбента 1 М роданидом аммония.

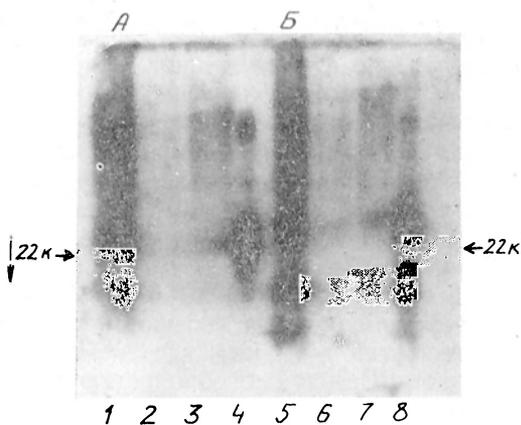


Рис. 3. Радиоиммуноблоттинг иммунореактивного гормона роста из сыворотки крови человека.

*a* — нередуцирующие условия; *b* — редуцирующие условия. 1, 8 — гипофизарный гормон роста; 1, 2, 3, 5, 6, 7 — сыворотка крови отдельных больных. Здесь и на рис. 4 визуализация зон реакции  $^{125}\text{I}$ -белком А.

реакции проявляются в диапазоне мол. м. 12—15 и 6—8 кДа.

Известно, что дополнительные электрофоретические компоненты гормона роста человека могут включать 20К-вариант как результат альтернативного сплайсинга мРНК гормона и варианты, являющиеся результатом его посттрансляционных изменений: димеризации, олигомеризации, ограниченного специфического протеолиза с образованием двухцепочечной формы гормона, состоящей из 2 фрагментов (1—134 и 141 или 147—199), связанных дисульфидным мостиком [1, 15].

Таким образом, появление в сыворотке крови в восстанавливающих условиях иммунореактивных компонентов с более низкой мол. м. (12—15 и 6—8 кДа), коррелирующее с исчезновением 25К-компонента, может являться результатом разрыва дисульфидной связи в такой двухцепочечной форме гормона роста.

По имеющимся в литературе данным [4, 8], иммунореактивный гормон роста в моче составляет лишь незначительную часть определяемого гормона в циркулирующей крови. Анализ гормона роста, секретируемого с мочой, требует использования сверхвысокочувствительных методов. Использование иммуносорбента на МКА позволило нам сконцентрировать гормон роста из небольших количеств мочи больных с акромегалией. На рис. 4 показаны результаты радиоиммуноблоттинга материала, снятого с иммуноаффинной колонки 1 М роданидом аммония. С помощью той же поликлональной антисыворотки, что и в случае анализа сыворотки крови, в моче удалось выявить компонент с подвижностью 22К гормона роста, а также 2 иммунореактивных компонента с мол. м. 12—15 и 6—8 кДа. В одном из образцов мочи отмечена слабая реакция поликлональной антисыворотки с компонентом, несколько опережающим по подвижности 22К-форму. Эта молекулярная форма может представлять собой 20К-вариант гормона. Наличие в моче тех же, что и в сыворотке крови, иммунореактивных фракций позволяет предположить, что циркулирующие в крови формы гормона роста могут выделяться в определенном количестве почками в моче в неизменном виде.

Установлено [7], что плацента человека является местом синтеза структурного варианта гормона роста (плацентарный гормон роста), сохраняющего способность взаимодействовать с антителами к гипофизарному гормону. Из-за крайне низкого содержания плацентарного гормона роста наряду с высоким содержанием структурно-родственного ему плацентарного лактогена анализ гормона роста плаценты представляет особую методическую сложность. Имея в виду высокую специфичность используемых в работе МКА, была предпринята попытка применить приготовленный на их основе иммуносорбент для адсорбции плацентарного гормона роста из экстракта ткани плаценты женщин. Для максимальной десорбции связавшегося материала использовали 3 М роданид аммония рН 4,0. Результаты электрофореза и радиоиммуноблоттинга полученного материала представлены на рис. 1, в, г. Видно, что как в редуцирующих (см. рис. 1, в, 4), так и в нередуцирующих (см. рис. 1, г, 4) условиях хорошо выявляется иммунореактивная фракция с мол. м. около 22 кДа.

Таким образом, на основе МКА, высокоспецифичных по отношению к гормону роста человека, создан иммуносорбент, который может применяться для выделения и изучения гормона роста и его иммунореактивных форм из биологических жидкостей и тканей. С помощью иммуносорбции на МКА и последующего электрофореза в полиакриламидном геле в сочетании с радиоиммуноблоттингом показано существование в циркулирующей крови и моче, помимо интактного гормона роста с мол. м. 22 кДа, также его протеолитически модифицированных форм.

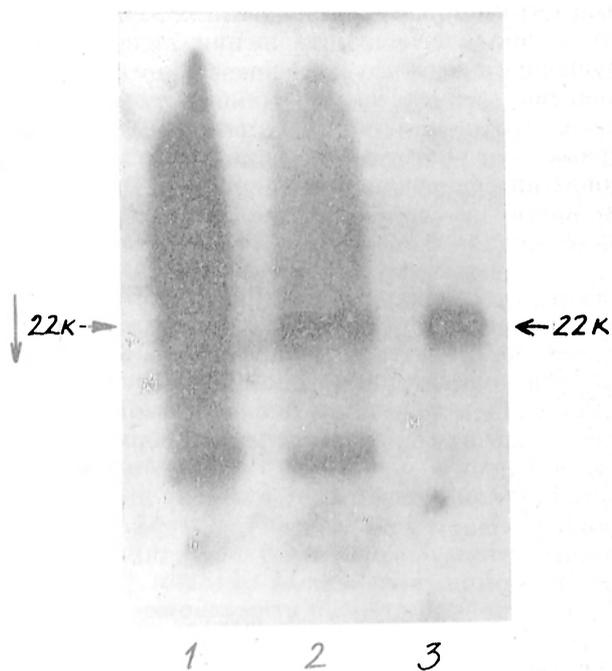


Рис. 4. Радиоиммуноблоттинг (электрофорез в редуцирующих условиях) иммунореактивного гормона роста из мочи человека. 1, 2 — моча больных с акромегалией; 3 — гипофизарный гормон роста.

1. Булатов А. А. // Пробл. эндокринологии.— 1990.— № 4.— С. 30—35.
2. Булатов А. А., Елизарова Г. П., Осипова Т. А., Киселева А. Г. // Гормон роста человека.— Пущино, 1988.— С. 64—69.
3. Осипова Т. А., Фидлер Р., Григорьян А. Л. и др. // Бюл. экпер. биол.— 1989.— № 11.— С. 593—596.
4. Baumann G., Abramson E. C. // J. clin. Endocr. Metab.— 1983.— Vol. 56.— P. 305—311.
5. Baumann G., Mac Carl J. G., Amburn K. // Ibid.— P. 178—185.
6. Chrambach A., Yadley R. A., Ben David M., Rodbard D. // Ibid.— 1973.— Vol. 36.— P. 178—185.
7. Frankenne F., Rentier-Delrue F., Scippo M. L. et al. // Ibid.— 1987.— Vol. 64.— P. 635—640.
8. Girard J., Erb T., Pampalona A. et al. // Horm. Res.— 1987.— Vol. 28.— P. 71—80.
9. Greenspan F. S., Li C. H., Simpson E., Evans H. M. // Endocrinology.— 1949.— Vol. 45.— P. 455—463.
10. Jondottir J., Scoog Bo., Ekre H-P. T. et al. // Molec. Cell. Endocr.— 1986.— Vol. 46.— P. 131—135.
11. Laemly U. K. // Ibid.— 1970.— Vol. 227.— P. 680—685.
12. Li C. H., Dixon J. // Arch. Biochem.— 1971.— Vol. 146.— P. 233—236.
13. Lock A. J., Denderen J., Aarden A. // Endocrinology.— 1988.— Vol. 122.— P. 319—324.
14. Sairam M. K., Chretien M., Li C. H. // J. clin. Endocr. Metab.— 1978.— Vol. 47.— P. 1002—1008.
15. Singh R. N. P., Seavey B. I., Rice V. P. et al. // Endocrinology.— 1974.— Vol. — P. 883—889.
16. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1979.— Vol. 76.— P. 4350—4354.
17. Woods K. R., Wang K. T. // Biochim. biophys. Acta.— 1967.— Vol. 133.— P. 455—463.

Поступила 29.01.92

#### USE OF MONOCLONAL ANTIBODIES IN IMMUNOSORPTION OF GROWTH HORMONE FROM HUMAN BIOLOGICAL TISSUES AND FLUIDS

A. A. Bulatov, T. A. Osipova, A. L. Grigoryan, V. P. Fedotov

Institute of Experimental Endocrinology, All-Russian Endocrinologic Research Centre, Academy of Medical Sciences of the Russian Federation, Moscow.

An immunosorbent with high binding capacity was developed using monoclonal antibodies specific to human growth hormone. Potential activity of the sorbent was studied in isolation of growth hormone from biological tissues and fluids. The immunosorbent enabled one to isolate the biologically and immunologically active growth hormone with high purity from the hypophyseal extract using only one step of purification. As shown by affinity chromatography and subsequent electrophoresis in polyacrylamide gel combined with radioimmunoblotting, together with predominant form of growth hormone, also intact and secreted from hypophysis, two-chain form of the hormone arising after proteolysis and large immunoreactive hormone fragments were detected in human circulation. These derivatives of the hormone may be also excreted with urine in unaltered form.

Е. А. Козырева, К. И. Жордания, Л. С. Басалык, А. В. Васильев

#### ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ КАТЕПСИНА В В ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЯХ ЯИЧНИКОВ

Онкологический научный центр РАМН, Москва

В последние годы увеличивается число исследований, в которых получены данные о том, что протеолитические ферменты играют важную роль при злокачественном росте, инвазии и метастазировании раковых клеток [7, 8]. Существует предположение, что катепсин В (Кат В) принимает участие в метастазировании рака яичников, так как катепсин В-подобный фермент, выделенный из клеток рака яичников человека, способен разрушать ламинин — один из основных компонентов базальной мембраны клеток [9]. Имеются доказательства прогностической ценности определения активности и концентрации некоторых лизосомальных протеиназ в злокачественных опухолях. Например, было показано, что высокая концентрация лизосомального Кат Д в опухолях первичных больных раком молочной железы является прогностически неблагоприятным признаком при отсутствии метастазов в регионарные лимфатические узлы [3, 4, 11]. По данным других авторов [10], высокая активность Кат В и Кат Л в опухолях больных раком толстой кишки при снижении активности ингибиторов цистеиновых протеиназ свидетельствует о раннем прогрессировании и плохом прогнозе заболевания.

В связи с тем что сообщений о прогностической значимости лизосомальных протеиназ при раке яичников нет, целью исследования явилось определение возможности использования активности Кат В, Кат Л и Кат Д в качестве прогностических факторов у больных злокачественными новообразованиями яичников.

**Методика.** Клинико-лабораторное обследование проведено у 60 первичных больных раком яичников I—IV стадии, из которых у 38 характер течения заболевания был прослежен на протяжении 1 года после операции. В качестве контроля были исследованы опухоли 19 больных доброкачественными опухолями яичников.

Активность лизосомальных Кат В, Кат Л и Кат Д определяли в гомогенатах опухолей, приготовленных по методу [2]. Материал получен во время операций и хранился при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Активность Кат В и Кат Л определяли спектрофлуориметрическими методами [1], субстраты — N-бензоил-DL-аргинин-нафтиламид («Serva», Германия) и CBZ-phe-arg-7-amido-methyl-coumarin («Sigma», США) соответственно. Активность Кат Д определяли спектрофотометрически [1, 3], субстрат — гемоглобин («Sigma», США).

Статистическая обработка полученных данных проведена с использованием программы «Statgraphic statistic».

**Результаты и обсуждение.** Изучение активности лизосомальных протеиназ в опухолях больных злокачественными и доброкачественными

Т а б л и ц а 1

Активность катепсинов в злокачественных и доброкачественных опухолях яичников и в тканях неизмененных яичников ( $X \pm m$ )

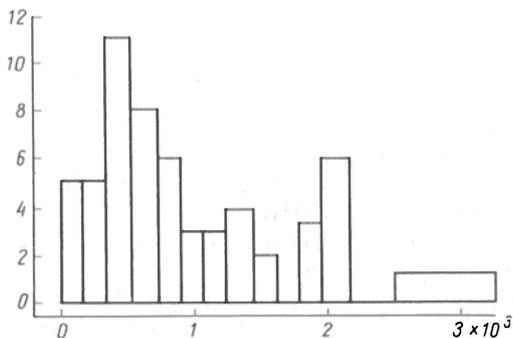
Исследуемый материал	Кат В	Кат L	Кат D,
	пмоль/мин на 1 мг белка		пмоль/мин на 1 мг белка
Злокачественные опухоли ( $n=60$ )	983,0 $\pm$ 99,3*	271,2 $\pm$ 32,0*	44,8 $\pm$ 4,1**
Доброкачественные опухоли ( $n=19$ )	53,0 $\pm$ 9,3	29,0 $\pm$ 4,3	28,6 $\pm$ 9,2
Неизмененные яичники ( $n=19$ )	76,7 $\pm$ 3,4	64,3 $\pm$ 8,1	34,7 $\pm$ 2,7

Примечание. Одна звездочка — различия статистически значимы относительно доброкачественных опухолей и неизмененных яичников, две — различия статистически значимы относительно доброкачественных опухолей.

новообразованиями яичников показало, что активность Кат В и Кат L повышается в 18,5 и 9 раз ( $p < 0,001$ ) соответственно в злокачественных опухолях по сравнению с доброкачественными. В то же время активность Кат D в злокачественных опухолях была только в 1,5 раза выше ( $p < 0,05$ ), чем в доброкачественных (табл. 1).

В нашем исследовании были выявлены выраженные индивидуальные колебания активности протеиназ в злокачественных опухолях яичников (для Кат В от 100,0 до 2901,0 пмоль/мин на 1 мг, для Кат L от 12,0 до 980,0 пмоль/мин на 1 мг белка, для Кат D от 12,4 до 166,0 нмоль/мин на 1 мг белка). Подобные различия в активности ферментов скорее всего связаны с тем, что опухоли на момент исследования находились на разных стадиях опухолей прогрессии.

В связи с тем что в злокачественных опухолях яичников обнаружено более выраженное повышение активности Кат В по сравнению с Кат L и Кат D при наличии указанных индивидуальных колебаний, нами был определен критический уровень активности этого фермента, полученный при статистической обработке данных, равный медиане и составивший  $723,5 \pm 100,0$  пмоль/мин на 1 мг белка (см. рисунок). В зависимости от критического уровня активности Кат В в опухолях больные раком яичников были разделены на 2 группы: 1-я — с низкой активностью Кат В (ниже критического уровня) и 2-я — с высокой активностью Кат В (выше критического уровня), при этом число больных в группах было одинаковым и равным 30.



Распределение больных раком яичников в зависимости от уровня активности Кат В в опухолях.

По оси абсцисс — активность Кат В, пмоль/мин на 1 мг белка; по оси ординат — число больных.

Для выяснения зависимости между уровнем активности Кат В в опухолях и характером развития опухолевого процесса у больных раком яичников было проведено сравнительное изучение некоторых биологических особенностей злокачественных опухолей у больных выделенных нами групп (табл. 2). Обнаружено, что у больных 2-й группы более часто выявлялись опухоли с низкой степенью дифференцировки клеток (25 %) и III—IV стадия заболевания (82 %), чем у больных 1-й группы. Кроме того, у больных 2-й группы во время операции чаще выявлялось метастатическое поражение брюшины (87 %), большого сальника (88 %), капсулы печени (82 %) и петель кишечника (30 %), чем у больных 1-й группы (67, 60, 18 и 6,6 % соответственно). Таким образом, у больных раком яичников с высокой активностью Кат В в опухолях процесс метастазирования протекал более активно, чем у больных с низкой активностью этого фермента в опухолях. Поэтому можно полагать, что высокая активность Кат В отражает повышенную инвазивную и метастатическую способность клеток рака яичников.

Анализ частоты выявления ранних рецидивов (в течение 1-го года после операции) у больных раком яичников 2 групп показал, что среди больных 1-й группы рецидивы были обнаружены у 6, у 24 их не было (у 14 больных период наблюдения был меньше 1 года). Среди больных 2-й группы рецидивы наблюдались у 19 женщин, у 11 их не было (у 8 больных период наблюдения был меньше 1 года). Таким образом, у больных 2-й группы ранние рецидивы рака яичников возникали в 2 раза чаще (86 %), чем у больных 1-й группы (40 %).

Изучение активности Кат В, Кат L и Кат D в опухолях 38 больных раком яичников со сроком наблюдения 1 год после операции показало, что в опухолях больных, у которых были выявлены рецидивы, активность Кат В была в 2,4 раза выше ( $p < 0,01$ ), активность Кат L — в 2,2 раза выше, чем у больных без рецидивов за указанный период (табл. 3).

Т а б л и ц а 2

Сравнение особенностей развития опухолевого процесса у больных раком яичников с низкой (1-я группа) и высокой (2-я группа) активностью Кат В (в %) в опухолях

Характеристика опухолевого процесса	1-я группа ( $n=30$ )	2-я группа ( $n=30$ )
I—II стадия	27	13
Степень дифференцировки клеток:		
высокая	54	30
умеренная	34	44
низкая	12	26
Гистологический тип опухоли:		
серозная ЦАК	70	66,7
муцинозная ЦАК	7	20
эндометриоидная ЦАК	10	13,3
другие	13	10
Метастазы:		
в большой сальник	60	83
в брюшину	67	87
в капсулу печени	18	28
в брыжейку кишки	66	30
Ранние рецидивы	40	86

Примечание. ЦАК — цистаденокарцинома.

Активность катепсина в злокачественных опухолях больных раком яичников с прослеженным течением заболевания ( $\bar{X} \pm m$ )

Группа больных	Кат В	Кат L	Кат D
	пмоль/мин на 1 мг белка		
Больные с рецидивом (n=25)	1420,0±102,2*	321,0±49,6*	56,8±8,7
Больные в ремиссии (n=13)	591,6±110,0	142,0±38,5	46,7±8,5

Примечание. Звездочка —  $p < 0,01$ .

Исследование частоты повышения активности протеиназ в опухолях больных с рецидивами рака яичников относительно величины активности каждого фермента  $\bar{X} \pm Z$ , рассчитанной для злокачественных опухолей больных без рецидивов и составившей для Кат В и Кат L 1357,0 и 458,8 пмоль/мин на 1 мг белка, показано, что у больных с рецидивами частота повышения активности Кат В оказалась самой высокой — 56 % — по сравнению с таковой Кат L (32 %) и Кат D (16 %).

Суммируя полученные данные, можно сказать, что Кат В является достаточно чувствительным показателем раннего прогрессирования рака яичников у больных после операции.

Высокая активность цистеиновых протеиназ, и особенно Кат В, в злокачественных опухолях яичников, которые рецидивировали в течение 1-го года после начала лечения, скорее всего связана с повышенной инвазивной способностью раковых клеток этих опухолей, в которых происходили усиленный синтез и накопление протеолитических ферментов лизосом, предшествующий или их секреции во внеклеточное пространство, или их участию во внутрилизосомном переваривании внеклеточного матрикса, попадающего в раковые клетки путем фагоцитоза в процессе опухолевой инвазии. Можно полагать, что, исследуя активность протеиназ в опухолях, которые рано рецидивировали, мы застали их на этапе подготовки к активному метастазированию и инвазии и высокая активность Кат В в момент операции являлась проявлением метастатического фенотипа раковых клеток.

Таким образом, представленные данные позволяют заключить, что высокая активность Кат В в злокачественных опухолях яичников — выше установленного критического уровня, равного  $723,5 \pm 100,0$  пмоль/мин на 1 мг белка, коррелирует с неблагоприятным течением заболевания — появлением рецидивов рака яичников в течение 1-го года после операции. Определение активности лизосомального Кат В в злокачественных опухолях яичников может иметь важное значение для прогноза течения заболевания у оперированных больных и выявления среди них пациентов с повышенным риском раннего рецидивирования.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Васильев А. В., Капелевич Е. А., Тугельян В. А. // Вопр. мед. химии.— 1983.— Т. 29.— С. 127—130.
2. Козырева Е. А., Бассалык Л. С., Жордания К. И., Васильев А. В. // Там же.— 1991.— № 4.— С. 21—23.
3. Баррет А. Дж., Хиг М. Ф. // Лизосомы. Методы исследования. Под ред. Дж. Дингла: Пер. с англ.— М., 1980.— С. 24—28.

4. Brouillet J. P., Theillet C., Maudelonde T. et al. // Europ. J. Clin.— 1990.— Vol. 26, N 4.— P. 437—441.
5. Henry J. A., McCarthy A. Z., Angus B. et al. // Cancer.— 1990.— Vol. 65, N 10.— P. 265—271.
6. Kirshke H., Langer J., Wideranders B. et al. // Europ. J. Biochem.— 1977.— Vol. 74.— P. 293—301.
7. Liotta L. A. // Cancer Growth Progr.— 1988.— Vol. 3.— P. 58—71.
8. Rozhin I., Waade R. L., Honn K. V., Sloane B. F. // Biochem. Biophys. Res. Commun.— 1989.— Vol. 164, N 1.— P. 556—561.
9. Sloane B. F., Day M., Lah T. et al. // Amer. Ass. Cancer Res. Proceedings Annual.— 1986.— Vol. 27.— P. 64—68.
10. Sheahan K., Shuja S., Murnane M. J. // Cancer Res.— 1989.— Vol. 49, N 14.— P. 3809—3814.
11. Tandon A. K., Clark G. M., Chamness G. C. et al. // N. Engl. J. Med.— 1990.— Vol. 322, N 5.— P. 297—302.

Поступила 28.04.93

## PROGNOSTIC VALUE OF CATHEPSIN B ACTIVITY ESTIMATION IN MALIGNANT OVARIAN TUMORS.

E. A. Kozyreva, K. I. Zhordania, L. S. Bassalyk, A. V. Vasiliev

All-Russian Cancer Research Centre, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow.

Malignant tumors derived from 60 patients with primary ovarian cancer were assayed for lysosomal cysteine proteinases — cathepsins B and L (Cat B, Cat L) and lysosomal aspartyl proteinase — cathepsin D (Cat D) as compared with benign ovarian tumors in controls. Malignant ovarian tumors exhibited significantly increased Cat B and Cat L activity (18.5- and 9-fold, respectively,  $p < 0.001$ ) and moderately increased Cat D activity (1.5-fold,  $p < 0.01$ ) as compared with those of benign tumors. The data obtained indicate that malignant ovarian tumors with a high Cat B activity (higher than the critical level of  $723.5 \pm 100.0$  Opmol/min. mg protein) proved to be more malignant in nature (low cell differentiated tumors predominated with early metastases spreading and relapses). Retrospective analysis of the disease development in 38 patients with ovarian tumors revealed that patients with early relapses (within the first year after surgery) demonstrated higher Cat B activity in tumors as compared with both the critical level and with that of patients without relapses; in the latter group the increase was found to be 2.4-fold ( $p < 0.01$ ). The rate of Cat B activity increases proved to be 56 % and 8 % in patients with and without relapses, respectively. Therefore, evaluation of the critical level of Cat B activity in patients with primary ovarian cancer may be employed for prognostic purposes.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616.155.392-07:616.153.1

В. А. Егорова, М. Н. Блинов, К. М. Абдулкадыров

## ПОЛИАДЕНИЛАТПОЛИМЕРАЗА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ ГЕМОБЛАСТОЗАМИ

НИИ гематологии и переливания крови, Санкт-Петербург

Поли-А-последовательности м-РНК и ее предшественников синтезируются с помощью полиаденилатполимеразы (ПАП), которая катализирует реакцию  $n\text{ATP} \rightarrow (\text{AMP})_n + n\text{PPi}$ .

К настоящему времени показано, что ПАП присутствует как в нормальных, так и неопластических тканях [6, 7]. Известно, что ПАП находится в ядрах, цитоплазме, микросомах и митохондриях клеток, причем существует несколько форм этого фермента и функции каждой из них неизвестны [15]. Источник сывороточного энзима пока не установлен. Вероятно, измененные или делящиеся

**Активность ПАП в сыворотке крови больных гемобластозами**

Обследованные	Активность ПАП, нмоль АМФ за 1 ч на 1 мг белка	
Здоровые	114,72±17,26	(38,59—195,26)
Больные ОЛ	390,52±43,99	(317,43—490,69)
<i>p</i>	<0,01	
Больные ХМЛ, в развернутой стадии	119,46±23,69	(77,83—169,88)
<i>p</i>	>0,05	
Больные ХМЛ, бластный криз	881,90±101,86	(609,81—1032,15)
<i>p</i>	<0,01	
Больные РА	194,92±20,64	(60,59—309,98)
<i>p</i>	<0,01	
Больные РАИБ	897,46±68,02	(654,82—961,08)
<i>p</i>	<0,01	

Примечание. РА — рефрактерная анемия, РАИБ — рефрактерная анемия с избытком бластов. В скобках — пределы колебаний.

клетки высвобождают этот фермент, который затем появляется в крови.

Помимо хорошо изученной роли ПАП в противовирусной активности интерферона [9], недавно опубликованные исследования свидетельствуют о возможном участии этого фермента в механизмах, контролирующих клеточную пролиферацию и дифференциацию [2, 3]. Согласно данным ряда авторов [4, 5, 7], ПАП, ответственная за полиаденилирование м-РНК, может играть роль в регуляции экспрессии генов. В процессе дифференциации изменяется активность энзимов, участвующих в постскрипционных модификациях м-РНК, и в частности ПАП. Имеет место корреляция между изменением уровня энзимов метаболизма поли-А и профилем полиаденилирования м-РНК и ее стабильностью [8]. Так, на клеточных линиях показано, что АТР-индуцированная дифференцировка лейкемических клеток человека коррелирует с уменьшением активности ПАП и что ее активность изменяется в зависимости от созревания лейкозных клеток [11—13]. Изучение активности ПАП в клетках быстрорастущей гепатомы Moggis 3924А показало, что активность фермента в клетках увеличена по сравнению с контролем, а эксперименты, проведенные на частично гепатэктомированных животных и крысах с трансплантированными гепатомами, свидетельствуют о том, что повышение активности ПАП в сыворотке крови может быть связано с быстрой клеточной пролиферацией или началом малигнизации.

Недавно появились единичные работы [14, 16] по изучению активности ПАП в клетках крови при гемобластозах. Однако практически ничего не известно об активности этого фермента в сыворотке крови при указанных заболеваниях.

Целью настоящей работы явилось изучение активности ПАП в сыворотке крови при остром лейкозе (ОЛ), хроническом миелолейкозе (ХМЛ) и миелодиспластическом синдроме (МДС).

**Методика.** Исследование проведено на сыворотках доноров (20 человек), больных ОЛ (10 человек), ХМЛ (10 человек) и МДС (20 человек). Для измерения активности ПАП использовали радиоизотопный метод. Стандартная проба (120 мкл) содержала 0,05 М трис рН 8,0, 0,035 М КС1, 0,0006 М МпС1<sub>2</sub>, 22,5 мкг поли-А, 0,0005 М динитротриол, 0,000375 М АТФ, 1,5 мкк <sup>3</sup>Н-АТФ и 10 мкл сыворотки. Инкубацию проводили в

течение 1 ч при 37 °С. Затем аликвоты в объеме 80 мкл перенесли на фильтры ДЕ-81 (диаметр 2,5 см, которые затем промывали 5 % раствором двузамещенного фосфата натрия, дистиллированной водой и высушивали. Радиоактивность измеряли в счетчике фирмы «Rac Beta». Активность фермента (единицы) выражали в пикомолях АМФ, включенной в поли-А, в течение 1 ч в расчете на 1 мг белка. Белок в сыворотке крови определяли методом [10].

**Результаты и обсуждение.** Результаты определения активности ПАП в сыворотке крови здоровых людей и больных гемобластозами представлены в таблице.

Как показали проведенные исследования, активность ПАП в сыворотке крови здоровых людей оказалась равной 114,72±17,26 ед. (пределы колебаний 38,59—195,26 ед.).

При изучении активности ПАП в сыворотке крови больных гемобластозами было обнаружено, что при некоторых формах гемобластозов наблюдается изменение активности этого фермента в сторону повышения по сравнению с таковой в норме. В частности, у больных ОЛ наблюдалось повышение активности ПАП в среднем почти в 3 раза.

Активность ПАП в сыворотке крови больных ХМЛ различалась в зависимости от стадии заболевания. Если в развернутой стадии заболевания активность ПАП практически не отличалась от нормы и была в среднем равна 119,46±23,69 ед. (пределы колебаний 77,83—169,88 ед.), то при бластном кризе активность этого фермента достигала 881,90±101,86 ед., причем интересно отметить, что повышение активности ПАП в сыворотке крови больных ХМЛ отмечалось еще до явных клинико-гематологических признаков бластного криза.

Наши данные согласуются с результатами, опубликованными ранее [16] об активности ПАП в клетках крови при разных стадиях ХМЛ. Было показано, что активность этого фермента значительно увеличена в клетках крови при бластном кризе ХМЛ.

Таким образом, определение активности ПАП в сыворотке крови может быть использовано для ранней диагностики бластного криза ХМЛ.

При определении активности ПАП в сыворотке крови больных МДС было показано, что наиболее выраженные изменения активности этого фермента обнаружены у больных РАИБ. Так, если у больных с РА без бластемии активность ПАП в сыворотке крови в среднем была равна 194,92±±20,64 ед., то в сыворотке крови больных РАИБ она превышала норму почти в 5 раз и составляла 897,46±68,02 ед.

Таким образом, при МДС по мере прогрессирования заболевания наблюдается также повышение активности сывороточной ПАП.

Интересно отметить близкую по величине активность энзима в сыворотке крови больных РАИБ и бластным кризом ХМЛ. Ранее нами было обнаружено, что при этих заболеваниях в сыворотке появляются и низкомолекулярные ДНК-связывающие белки, отсутствующие при ХМЛ и ОЛ [1].

Высказывается гипотеза, что как ДНК-связывающие белки, так и ПАП могут играть роль в репрограммировании стволовых клеток в комми-

тированные. Сходство изменений этих параметров при бластном кризе ХМЛ и РАИБ позволяет предположить близость патогенетических механизмов, обуславливающих лейкозную трансформацию при данных заболеваниях и затрагивающих в качестве клетки-мишени наиболее молодые кроветворные клетки.

В целом полученные в работе данные свидетельствуют о том, что при лейкозной трансформации по мере прогрессирования процесса активность ПАП повышается не только в белых клетках крови, но и в сыворотке, что делает весьма перспективным использование сывороточной ПАП в качестве маркера динамики течения гемобластозов и МДС.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Егорова В. А., Блинов М. И. // Всесоюзный съезд гематологов и трансфузиологов, 3-й — 1991. — Т. 1. — С. 136—137.
2. Berger S. L., Birkenmeier C. S. // Biochim. biophys. Acta. — 1979. — Vol. 562. — P. 80—91.
3. Berger S. L., Cooper H. L. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1975. — Vol. 72. — P. 3873—3877.
4. Bernd A., Balke E., Muller W. E. // Mech. Ageing Develop. — 1982. — Vol. 19. — P. 361—377.
5. Brawerman G. // Crit. Rev. Biochem. — 1981. — Vol. 10, N 1. — P. 10—14.
6. Edmonds M. // The Enzymes. — 1982. — P. 217.
7. Jacob S., Rose K. // Meth. Cancer Res. — 1978. — Vol. 14. — P. 191—241.
8. Kecskemethy N., Schater K. P. // Europ. J. Biochem. — 1982. — Vol. 126. — P. 573—582.
9. Leanderson T., Nordfjell R. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1982. — Vol. 107, N 2. — P. 511—517.
10. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
11. Muller W. E., Schroder H. C., Arendes J. // Europ. J. Biochem. — 1977. — Vol. 76. — P. 531—538.
12. Pangalis G., Tragas T., Papanatasiou C. J. // Acta haemat. — 1985. — Vol. 74. — P. 31—35.
13. Perez S., Trangas T., Kokkinopoulos D. // J. nat. Cancer Inst. — 1985. — Vol. 78. — P. 407—409.
14. Trangas T., Courtlis N., Pangalis G. A. // Cancer Res. — 1984. — Vol. 44. — P. 3961—3963.
15. Rose R. M., Jacob S. T. // Cancer Bull. — 1980. — Vol. 32, N 2. — P. 60—61.
16. Ryuhei Sasaki, Jun Minowada // Leuk. Res. — 1990. — Vol. 14, N 3. — P. 273—278.

Поступила 29.03.93

#### POLYADENYLATE POLYMERASE IN BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH HEMOBLASTOSES.

V. A. Egorova, M. N. Blinov, K. M. Abdulkadyrov

Institute of Hematology and Blood Transfusion, St. Petersburg.

Activity of polyadenylate polymerase was studied in blood serum of patients with some forms of leukemia. In acute form of leukemia, the activity of the polymerase was increased 3-fold in blood serum as compared with normal state. Under conditions of chronic myeloleukemia the enzymatic activity was altered depending on the disease step with increase in leukemia development and reached the maximal values in blast crisis. The maximal enzymatic activity was found in myelodysplastic syndrome in patients with refractory anemia and excess of blasts.

Л. И. Филановская, А. В. Того, Е. Г. Щербакова, М. Н. Блинов

#### АКТИВНОСТЬ ТИМИДИНКИНАЗЫ В ЛЕЙКОЦИТАХ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОЛЕЙКОЗОМ В РАЗЛИЧНЫЕ ПЕРИОДЫ ЗАБОЛЕВАНИЯ

НИИ гематологии и переливания крови, Санкт-Петербург

Изучение ферментов в злокачественных и лейкозных клетках играет важную роль в понимании событий, происходящих на уровне генома при неопластическом росте. Кроме того, энзиматический анализ при гематологических и онкологических заболеваниях зачастую дает возможность определить стадию заболевания и степень его агрессивности раньше появления клинико-морфологических признаков, позволяет проводить более тонкую, чем цитоморфологические методы, диагностику варианта заболевания и др.

В последнее время выявлен новый энзиматический маркер, весьма полезный для мониторинга некоторых гематологических [11, 14] и опухолевых [9, 18] заболеваний, — фермент тимидинкиназа (ТК). Он осуществляет альтернативный процесс синтеза тимидилата, без которого невозможен синтез ДНК. Активность ТК коррелирует со скоростью синтеза ДНК [13], зависит от фазы клеточного цикла [8] и изменяется в процессе дифференцировки [12]. В нормальных покоящихся  $G_1$ — $G_0$ -клетках ТК представлена молекулярной формой, обозначаемой как изозим ТК [2]. В S-фазных и активно пролиферирующих клетках высокая активность ТК определяется изозимом ТК 1 [4, 7]. Показано существование ТК и в виде других молекулярных форм [15].

Установлено, что при гематологических заболеваниях информативен тест на сывороточную ТК, тогда как значимость внутриклеточного фермента как биохимического маркера остается практически неизвестной.

Задачей настоящей работы было изучение активности ТК и состава ее изозимов в незрелых и зрелых лейкоцитах на различных стадиях хронического миелолейкоза (ХМЛ) и определение маркерной ценности фермента при этом заболевании.

Методика. Работа проведена на клетках крови больных ХМЛ, обследованных при постановке диагноза (первичные — 15 больных), при длительности заболевания 0,5—8 лет (23 больных) и в период бластного криза — БК (26 больных). Выделение лимфоцитов и гранулоцитов из крови доноров, фракции зрелых и дозревающих лейкоцитов, а также бластов из крови больных ХМЛ проводили с помощью традиционных методов центрифугирования на фиколе с плотностью 1065, 1076 и 1118 г на 1 л суспензии клеток из плазменного отстоя крови [1].

Клеточную природу БК ХМЛ идентифицировали как цитохимически, так и с помощью анализа в бластах маркерных ферментов АДА и ПНФ [3]. Активность ТК определяли по методу [16]. Соотношение изоформ ТК—ТК 1 и ТК 2 — в лейко-

цитах устанавливали на основании различий в субстратной специфичности их к АТФ и ЦТФ [10] и различий молекулярных свойств этих изоформ, позволяющих разделить их на колонке с ДЭАЭ-сефадексом А-50 [6].

Активность ТК изучали в клеточных лизатах и выражали в пикомолях продукта реакции, образованного  $10^6$  клеток за 1 ч. Результаты обработаны статистически по методу Стьюдента — Фишера.

Результаты и обсуждение. Полученные нами ранее данные об активности ферментов обмена пуриновых нуклеотидов в лейкозных клетках [2], а также представленные здесь результаты изучения активности фермента обмена пиримидинов — ТК в лейкоцитах больных ХМЛ — подтверждают концепцию о том, что злокачественный рост изменяет энзиматическую программу внутриклеточного метаболизма нуклеотидов.

Согласно данным табл. 1, активность ТК в незрелых лейкоцитах 15 первичных больных ХМЛ составляет в среднем  $6,8 \pm 1,1$  ед., что более чем в 3 раза превышает активность фермента в зрелых гранулоцитах доноров ( $2,0 \pm 0,3$  ед.). Однако у 5 больных активность ТК в незрелых лейкоцитах не отличалась (1,4—4,0 ед.) от таковой в зрелых гранулоцитах. Хотя активность ТК в незрелых лейкоцитах первичных больных ХМЛ и невысока, она, как видно из представленных результатов, на  $2/3$  определяется изоформой ТК 1, т. е. формой фермента, характерной для зародышевых и активно делящихся клеток [6].

Как видно из табл. 1, активность ТК в зрелых лейкоцитах первичных больных ХМЛ ( $2,5 \pm$

$\pm 0,4$  ед.) сравнима с таковой в гранулоцитах доноров и определяется, как и в последних, изоформой ТК 2, свойственным покоящимся, не пролиферирующим клеткам.

Результаты, полученные при исследовании лейкоцитов 23 больных ХМЛ в стабильной фазе с различным сроком заболевания, показывают, что активность ТК в популяции незрелых клеток заметно варьирует. Из табл. 1 видно, что прослеживается зависимость активности ТК в лейкоцитах от длительности ХМЛ. Так, 7 из 8 случаев заболевания, когда ХМЛ был диагностирован за 0,5—1,5 года до момента обследования, активность ТК в лейкоцитах (0,8—6,1 ед.) была сходна с таковой у первичных больных, тогда как у остальных 15 пациентов, страдающих ХМЛ в течение 2,5—8 лет, она была значительно выше (11,3—41,4 ед.). У этих последних больных доля изоформы ТК 1 в общей активности ТК в незрелых лейкоцитах составляет, как видно из табл. 1, 85 %, тогда как в лейкоцитах больных с меньшим сроком заболевания — 66 %. Это подтверждает тот факт, что возрастание активности ТК определяется индукцией фермента, имеющего свойства зародышевых клеток [7].

Рассмотренные данные позволяют заключить, что активность ТК в незрелых лейкоцитах больных ХМЛ, как превышающая таковую в зрелых гранулоцитах, так и не отличающаяся от нее, связана с изоформой ТК 1. Известно, что активность ТК подвергается изменениям в течение клеточного цикла: она минимальна в  $G_0$ -фазе покоя и наиболее высока в S-фазе синтеза ДНК [13]. Поэтому различия в активности ТК в лейкоз-

Т а б л и ц а 1

Активность ТК в лейкоцитах больных ХМЛ в период стабильной фазы заболевания

Обследованные	Дозревающие лейкоциты			Зрелые лейкоциты		
	общая активность ТК, усл. ед.	ТК 1, %	ТК 2, %	общая активность ТК, усл. ед.	ТК 1, %	ТК 2, %
Здоровые (n=8)				$2,0 \pm 0,3$ (0,8—4,1)		
Первичные больные ХМЛ (n=15)	$6,8 \pm 1,1$	$66 \pm 5$	$34 \pm 5$	$2,5 \pm 0,4$	$38 \pm 12$	$62 \pm 12$
Больные ХМЛ в стадии обострения, срок заболевания 0,5—1,5 года	4,4	70	30	1,5	20	80
	2,3	50	50	0,8	20	80
	5,4	88	22			
	1,9	70	30	1,1	20	80
	0,8	20	80	0,8	20	80
	11,3	85	15	10,3	50	50
	3,8	60	40	0,6	0,0	100
	5,5	85	15			
	6,1	70	30	2,2	0,0	100
	Среднее . . . . .	$4,4 \pm 0,8$	$66 \pm 6$	$34 \pm 6$	$2,5 \pm 0,4$	$20 \pm 5$
Больные ХМЛ в стадии обострения, срок заболевания 2,5—8 лет	23	72	28	1,1	45	55
	34,5	91	9	12,2	0,0	100
	37	85	15	3,7	75	25
	15,5	84	16	2,3	30	70
	26,7			4,4		
	14,2	80	20	6	80	20
	11,7	85	15	8,7	80	20
	12,1	90	10	5,7	40	60
	17	90	10	2,2	30	70
	23	95	5	3,5	50	50
	29,8	91	9	2,2	0,0	100
	23	87	13	18	0,0	100
	25	75	25	4,1	20	80
Среднее . . . . .	$23,8 \pm 2,5$	$85 \pm 4$	$15 \pm 2$	$5,5 \pm 1,1$	$35 \pm 8$	$65 \pm 8$

Таблица 2

## Активность ТК и состав ее изозимов в бластах при БК ХМЛ

Объект исследования	Общая активность ТК, пмоль/10 <sup>9</sup> кл/г	ТК I	ТК 2
Бласты больных с мие- лоидным БК ХМЛ	145	94	6
	123	95	5
	112	95	5
	64	96	4
	482	96	4
	68	98	2
	270	93	7
	72	85	15
	180	90	10
	103	93	7
	110	94	6
	163	96	4
	162	93	7
	84	93	7
	79	93	7
Среднее . . . . .	147,8±23,7	93±0,7	7±0,7
Бласты больных с лим- фоидным БК ХМЛ	42	84	16
	30	54	46
	15	90	10
	9,8	40	60
	12,4	50	50
	10	80	20
	33,7	93	7
	24,3	67	33
	7,0	70	30
	32,6	75	25
	7,0	75	25
	47,6	72	28
Среднее . . . . .	24,2±5,0	69±4,7	31±4,7
Клетки К-562	1048—5177		
Тимус	38—125		
Селезенка	7,8—12,6		
Лимфоциты перифери- ческой крови	3,3—11,3		

ных клетках, выявленные у больных ХМЛ, могут определяться составом лейкоцитов по фазам клеточного цикла. Можно предположить, что незрелые лейкоциты первичных больных ХМЛ с высокой активностью ТК находятся в G<sub>1</sub>—G<sub>0</sub>-фазе. В то же время повышенная активность ТК у больных с обострением ХМЛ, возможно, связана с появлением в составе пула S-фазных клеток или в предсинтетической фазе.

Корреляция продолжительности заболевания у больных ХМЛ с повышением уровня активности ТК в лейкоцитах указывает на информативность ее в качестве теста для оценки прогрессирования заболевания.

Нами были обследованы также 26 больных ХМЛ с БК. На основании биохимических критериев — активности АДА и ПНФ в бластах и их соотношения [3] — у 14 из них был установлен миелоидный вариант БК, который подтвержден цитохимическим анализом пунктатов костного мозга от 5 больных. Из данных табл. 2 видно, что средний уровень активности ТК в бластах при миелоидном БК ХМЛ (147±23,7 ед.) во много раз превышает таковой в дозревающих лейкоцитах стабильной фазы ХМЛ (15,9±2,5 ед.). Высокая активность ТК, по данным литературы, является отличительной особенностью различных лейкозных миелоидных клеточных линий [17].

Как можно заметить, имеет место значительное варьирование активности ТК в миелобластах у обследованных больных. Сопоставление их с содержанием лейкоцитов и бластов в перифери-

ческой крови больных с миелоидным БК ХМЛ выявило положительную корреляцию более высокого среднего уровня активности ТК (204 ед.) при высоком лейкоцитозе (107—160·10<sup>9</sup> кл/л) и бластозе (62—91 %) по сравнению с ее активностью (126 ед.) при меньшем числе лейкоцитов (8,4—80·10<sup>9</sup> кл/л) и бластов (8,5—48 %) в периферической крови. Однако в каждом конкретном случае БК ХМЛ четкой прямой корреляции этих показателей не прослеживается. Величина активности ТК в областях определяется, очевидно, функцией ряда факторов: интенсивностью метаболизма нуклеотидов линии бластов каждого конкретного больного, распределением бластного пула по фазам клеточного цикла, особенностями регуляции синтеза и деградации белка-фермента ТК в бластах [5].

У остальных 12 обследованных больных с БК ХМЛ бласты имели показатели АДА и ПНФ, сравнимые с теми, которые обнаруживаются при остром лимфобластном лейкозе и хроническом лимфобластном лейкозе [2]. Цитохимическое исследование пунктатов костного мозга 10 больных констатировало лимфоидный бластный криз у 9 больных и миелоидный — у 1 больного. Изучение в бластах этих больных активности ТК свидетельствует, что она в среднем в 6 раз ниже (24,2±5,0 ед.), чем при миелоидном БК, а у 4 больных не превышает таковую в лимфоцитах здоровых людей (3,3—11,3 ед.).

Эти данные позволяют предположить, что при лимфоидном БК ХМЛ бласты представлены G<sub>1</sub>—G<sub>0</sub>-клетками. Возможно также, что для лимфобластов синтез тимидилата, осуществляемый ТК, значительно менее важен, чем для бластов миелоидной природы.

Из табл. 2 видно, что в бластах больных с лимфоидным БК ХМЛ ТК представлена изозимом ТК I (69 %) в меньшей степени, чем при миелоидном, и это коррелирует с различиями в общей активности фермента в клетках.

Из сказанного выше следует, что обнаружение в бластах при БК ХМЛ высокой активности ТК является свидетельством их миелоидной природы. Такой вывод подкрепляется также нашими данными о высокой активности ТК (1048—5177 ед.) в клетках миелоидной линии К-562, происходящей из бластных клеток больных с БК ХМЛ, по сравнению с таковой в лимфоидных клетках из тимуса (38—125 ед.) и селезенки (7,8—12,6 ед.).

При сравнении активности ТК в миелоидных клетках К-562, бластах при миелоидном ТК ХМЛ и незрелых лейкоцитах больных в стационарной фазе ХМЛ становится очевидным факт снижения активности фермента в ходе дифференцировки. Различия в активности ТК в лейкоцитах первичных больных ХМЛ и обследованных при обострении заболевания наводят на мысль, что течение лейкозного процесса при ХМЛ сопряжено с вовлечением в образование лейкозного пула менее дифференцированных клеток.

Мы обнаружили, что активность ТК при ХМЛ коррелирует с продолжительностью заболевания. Поэтому повышенная активность фермента в незрелых лейкоцитах больных при минимальном содержании бластов является, по-видимому, показателем прогрессирования заболевания или его злокачественности.

*Е. В. Шутов, В. Л. Доценко, В. М. Ермоленко,  
Г. А. Яровая*

## НАРУШЕНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ КАЛЛИКРЕИН-КИНИНОВОЙ СИСТЕМЫ ПЛАЗМЫ КРОВИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ И ВО ВРЕМЯ ГЕМОДИАЛИЗА

Центральный институт усовершенствования врачей Минздрава России, Москва

В последние годы важную роль в патогенезе заболеваний почек и развитии почечной недостаточности отводят состоянию протеолитических систем плазмы крови: калликреин-кининовой (ККС), фибринолитической, свертывающей, ренин-ангиотензиновой, системе комплемента [1, 7, 10, 14]. Особое место среди них занимает ККС, так как калликреин является ключевым ферментом в регуляции не только тонуса сосудов и проницаемости капилляров, но и уровня активности ферментов свертывания, фибринолиза, комплемента [5].

Функционирование ККС тесно связано с гранулоцитами крови. Так, калликреин вызывает хемотаксис и индуцирует агрегацию нейтрофилов [17, 20], усиливает кислородный метаболизм в гранулоцитах [12], способствует освобождению протеиназ из них (эластазы, катепсина G и др.) [22]. Высвобождающиеся из примированных гранулоцитов протеиназы оказывают специфическое действие на протеолитические системы крови. В частности, мембранная аргининпротеиназа активирует фактор Хагемана, который в свою очередь является активатором калликреина [23].

Появление в плазме крови больных лейкоцитарного фермента эластазы, обладающего широкой субстратной специфичностью, приводит к гидролизу калликреина, активного фактора Хагемана и их предшественников [23], фибриногена, антитромбина III (АТIII) [19], компонентов комплемента [16]. Кроме того, эластаза повреждает базальную мембрану клубочков почек, разрушая коллаген IV типа, эластин, фибронектин, протеогликаны [8, 15, 21], способствуя, таким образом, развитию почечной патологии.

Значительное влияние на активность протеолитических систем плазмы крови и их взаимодействие с лейкоцитарными факторами при хронической почечной недостаточности (ХПН) может оказывать процедура гемодиализа (ГД).

Задачей настоящей работы явилось изучение состояния ККС и ее возможностей по регуляции свертывания и фибринолиза при ХПН и во время ГД.

Оценку состояния ККС проводили при одновременной оценке эластазоподобной активности плазмы крови, ее антитриптического потенциала и уровня АТIII как основного регулятора процесса тромбогенеза.

Методика. Обследованы 2 группы больных с ХПН, развившейся вследствие хронического гломерулонефрита. 1-я группа состояла из 17 больных (8 мужчин и 9 женщин, средний возраст

Результаты показывают, что в созревающих лейкоцитах, миелоидных и лимфоидных бластах больных ХМЛ ТК экспрессирована главным образом в виде фекального изоэстаза ТК I. Различия в активности ТК и четкие разграничения пределов ее варьирования в бластах больных с БК ХМЛ с миелоидной и лимфоидной картиной активности АДА и ПНФ, продемонстрированные в работе, указывают на то, что ТК, как и ферменты деградации пуринов, является энзиматическим маркером клеточного типа БК.

### ЛИТЕРАТУРА

1. *Новиков Д. К., Новоикова В. И.* Клеточные методы иммунодиагностики.— Минск, 1979.
2. *Филановская Л. И., Того А. В., Блинов М. П.* // Экспер. онкол.— 1989.— № 4.— С. 59—63.
3. *Филановская Л. И., Того А. В., Щербакова Е. Г.* и др. // Вопр. онкол.— 1990.— № 9.— С. 1053—1058.
4. *Adler R., McAuslan B. R.* // Cell.— 1974.— Vol. 2, N 2.— P. 113—117.
5. *Bello L. J.* // Exp. Cell Res.— 1974.— Vol. 89.— P. 263—274.
6. *Bourtouraull M., Javre J. L., Gayet G.* et al. // J. Chromatogr.— 1986.— Vol. 380.— P. 133—139.
7. *Coloma J., Castell J. V.* // Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.— 1984.— Bd 365.— S. 457—462.
8. *Coppock D. L., Pardee A. B.* // J. C. Biol.— 1985.— Vol. 101, N 5 (2)— P. 79.
9. *Deub U., Allolio B., Kaulen D.* et al. // Tumor Diagn. Ther.— 1987.— Bd 8, N 2.— S. 69—74.
10. *Ellims P. H., Gan T. Eng, Medley G.* et al. // Blood.— 1981.— Vol. 58, N 5.— P. 926—930.
11. *Gronowitz J. S., Hagberg H., Kallander C. F. R.* et al. // Brit. J. Cancer.— 1983.— Vol. 47, N 4.— P. 487—495.
12. *Hashimoto Y., Shiotani T., Fujita I.* et al. // Leuk. Res.— 1989.— Vol. 13, N 12.— P. 1123—1129.
13. *Kil S.* // Molec. Cell. Biochem.— 1976.— Vol. 11, N 3.— P. 161—182.
14. *Luoni R., Ucci G., Riccardi A.* et al. // Haematologica.— 1988.— Vol. 73, N 1.— P. 31—35.
15. *Munch-Petersen B., Tyrsted G.* // Leuk. Res.— 1986.— Vol. 10, N 6.— P. 637—645.
16. *Stuart P. H., Ito M., Stewart Ch.* et al. // Molec. Cell. Biol.— 1985.— Vol. 5, N 6.— P. 1490—1497.
17. *Takeda E., Hirose M., Kuroda Y.* et al. // Gann.— 1984.— Vol. 75, N 9.— P. 816—823.
18. *Yusa T., Yamaguchi Y., Ohwada H.* et al. // Cancer Res.— 1988.— Vol. 48, N 17.— P. 5001—5006.

Поступила 24.03.92

### ACTIVITY OF LEUKOCYTIC THYMIDINE KINASE IN PATIENTS WITH CHRONIC MYELOLEUKEMIA IN ITS DIFFERENT PERIODS

*L. I. Filanovskaya, A. V. Togo, E. G. Scherbakova, M. N. Blinov*

Institute of Hematology and Blood Transfusion, St. Petersburg.

The level of thymidine kinase activity in the premature leukocytes of patients with chronic myeloleukemia during the stable phase was shown to serve as a measure of the disease development. Considerable variations in thymidine kinase activity in blast cells in myeloid and lymphoid blast crises demonstrated that analysis of the enzyme activity might be used in the biochemical diagnosis of blast crisis in chronic myeloleukemia simultaneously with the enzymes of purine metabolism — ADA and PNP. During cell differentiation, the activity of thymidine kinase was decreased and in the myeloid cells the enzymatic activity was much higher of that in lymphoid cells as shown by investigations using blast cells of patients with blast crisis in chronic myeloleukemia, cells K-562, thymocytes, spleen and peripheric blood lymphocytes. Isozyme thymidine kinase I was mainly responsible for the rate of enzymatic activity in premature leukocytes of patients with chronic myeloleukemia regardless of the disease stage.

45±3,5 года) с повышением содержания креатинина до 800—1500 мкмоль/л, получавших консервативную терапию, 2-я группа — из 30 больных (16 мужчин и 14 женщин, средний возраст 44,2±3,0 года) с терминальной стадией ХПН, находящихся на хроническом ГД в течение 1—5 лет. Пациенты получали ГД 3 раза в неделю по 4 ч. Процедуру ГД проводили с использованием купрофановой мембраны. Кровь для исследования брали в течение ГД 3 раза: до начала, в середине и в конце процедуры. Контролем служили 15 здоровых доноров.

Функциональное состояние гранулоцитов оценивали с помощью спонтанного НСТ (нитросиний тетразолий) теста [11].

Эластазоподобную активность плазмы крови определяли по скорости расщепления N-бутоксикарбонил-L-аланил-4-нитрофенилового эфира (N-BOC-Ala-Опр, «Serva», Германия). Для этого в пробу, содержащую 0,03 мл плазмы крови, вносили 2,85 мл 0,1 М калий-фосфатного буфера рН 6,5 и 0,1 мл 1·10<sup>-2</sup> М субстрата, растворенного в ацетонитриле.

Общую активность трипсиноподобных сериновых протеиназ оценивали по скорости гидролиза N-бензоил-L-аргинин-этилового эфира (БАЭЭ, «Reanal», Венгрия), как это описано в работе [3].

Активность калликрейна и прекаликрейна определяли в плазме крови хроматографическим методом [4] и выражали в миллиединицах на 1 мл, где 1 мЕ/мл соответствовала количеству фермента, расщепляющего 1 нмоль субстрата за 1 мин.

Активность ингибиторов плазменных протеиназ: α<sub>1</sub>-протеиназного ингибитора (α<sub>1</sub>-ПИ) и α<sub>2</sub>-макроглобулина (α<sub>2</sub>-М) измеряли унифицированным энзиматическим методом [2] и выражали в ингибиторных единицах, что соответствовало количеству ингибиторов, подавляющему 1 Е активности ферментов.

Содержание АТIII определяли кинетическим путем с использованием наборов фирмы «Behring» (Германия).

Результаты и обсуждение. Результаты определения активности исследуемых протеиназ плазмы и клеток крови, а также их ингибиторов у больных с ХПН и на фоне ГД (в междуализный период) представлены в таблице.

Эти данные свидетельствуют о том, что при ХПН почти в 2 раза по сравнению с нормой увеличивается активность основной плазменной кининогеназы — калликрейна. При этом уровень его предшественника, прекаликрейна, снижается более чем в 3 раза, что указывает на активацию

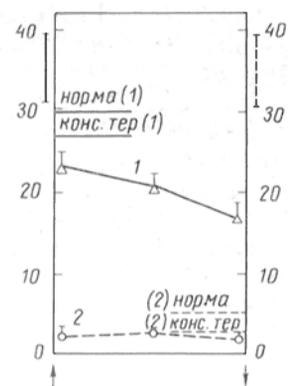
**Активность калликрейна, уровень его предшественника и плазменных ингибиторов, суммарная БАЭЭ-эстеразная и эластазоподобная активность в плазме крови больных с ХПН и на фоне ГД (в междуализный период)**

Исследуемый показатель	Здоровые доноры	1-я группа (консервативная терапия)	2-я группа (ГД)
Калликреин, мЕ/мл	34,0±4,2	63,2±7,6*	25,9±4,8*
Прекаликреин, мЕ/мл	382±8,2	117,8±21,2*	195,3±13,1*
БАЭЭ-эстеразная активность, мЕ/мл	340±20	464±43,2*	265,8±18,5*
Эластазоподобная активность, Е/мл	0,150±0,020	0,340±0,018*	0,260±0,020*
АТ-III, %	100±20	103,1±18,7	103,1±18,7
α <sub>1</sub> -ПИ, ИЕ/мл	29,9±1,2	26,6±3,2	23,0±2,0*
α <sub>2</sub> -М, ИЕ/мл	1,9±0,1	3,4±0,3*	3,2±0,2*

Примечание. Звездочка — p<0,05 относительно контрольной группы.

Рис. 1. Активность (в мЕ/мл) калликрейна (1) и содержание прекаликрейна (2) в плазме крови больных с ХПН, находящихся на ГД.

Здесь и на рис. 2—4 стрелками обозначены начало и конец процедуры.



ККС. Если проанализировать эти результаты непосредственно в величинах ферментативной активности, то оказывается, что снижение содержания прекаликрейна при ХПН по сравнению с нормой на 264 мЕ/мл приводит к увеличению активности калликрейна только на 29 мЕ/мл. Увеличение активности калликрейна сопровождается повышением общей БАЭЭ-эстеразной активности плазмы крови, что может свидетельствовать об увеличении суммарной активности плазменных сериновых протеиназ, в том числе протеиназ свертывания и фибринолиза [9].

Увеличение активности ККС при ХПН происходит на фоне значительного (более чем в 2 раза) повышения эластазоподобной активности плазмы крови. Эта активность может являться следствием активации полиморфноядерных лейкоцитов и процессов освобождения гранулярных протеиназ, в том числе лейкоцитарной эластазы непосредственно в плазму крови. В пользу данного предположения свидетельствуют результаты НСТ-теста: у больных количество активированных лейкоцитов, содержащих диформаза, увеличивается с 30—40 до 60—70 %.

При ХПН почти не изменяется эффективная активность α<sub>1</sub>-ПИ, тогда как уровень α<sub>2</sub>-М снижается на 25 % контроля.

Перевод больных на ГД резко изменяет картину протеолитической активности плазмы крови в междуализный период: снижается до нормальных величин активность калликрейна; при этом несколько повышается количество предшественника, оставаясь тем не менее ниже нормального уровня на 187 мЕ/мл; на фоне низкого уровня прекаликрейна и низкой активности калликрейна резко снижается общая БАЭЭ-эстеразная активность плазмы крови (на 200 мЕ/мл по сравнению с таковой при ХПН и на 75 мЕ/мл по сравнению с контролем).

Снижение уровня плазменного протеолиза происходит при некотором снижении и эластазоподобной активности, которая, однако, остается выше нормы на 110 мЕ/мл.

Такое снижение эластазоподобной активности в плазме крови больных с ХПН, находящихся на хроническом ГД, могло бы расцениваться как результат снижения активности лейкоцитов и сокращения дегрануляционных процессов в нейтрофилах и рассматриваться как следствие определенного оздоравливающего воздействия ГД. Действительно, при ГД в плазме крови уменьшается концентрация так называемых уремических токсинов, в частности паратгормона, вызываю-

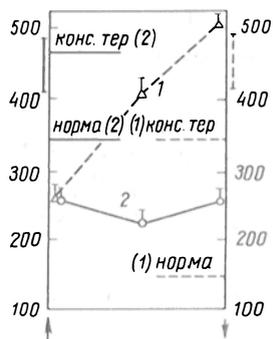


Рис. 2. Эластазоподобная (1) и БАЭЭ-эстеразная (2) активность (в мЕ/мл) в плазме крови больных с ХПН, находящихся на ГД.

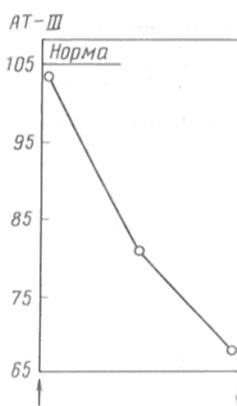


Рис. 4. Активность АТIII (в %) в плазме крови больных с ХПН во время ГД.

шего активацию лейкоцитов и освобождение эластазы [18].

Однако другие показатели ингибиторного потенциала не только не свидетельствуют о нормализации процессов регуляции свертывания и фибринолиза при переходе к ГД, но и несут информацию о признаках возможного истощения ККС. Наиболее значимым признаком такого истощения является низкий уровень прекалликреина при отсутствии повышения уровня калликреина.

Для выяснения причин появления признаков истощения ККС, а также резкого снижения суммарной активности сериновых протеиназ плазмы крови у больных, находящихся на хроническом ГД, мы предприняли изучение активности названных выше ферментов, а также уровня прекалликреина и основных ингибиторов плазмы крови ( $\alpha_1$ -ПИ,  $\alpha_2$ -М и АТIII) непосредственно в ходе диализа.

На рис. 1 представлены результаты такой работы. Как видно из положения кривых на рис. 2, единственной ферментной активностью, непрерывно растущей в ходе диализа, является эластазоподобная активность. Ее величина возрастает до 500 мЕ/мл, что превышает нормальное значение на 350 мЕ/мл. Количество прекалликреина в ходе диализа снижается еще на 50 мЕ/мл, а активность калликреина практически не возрастает (см. рис. 1).

Как известно, основным ингибитором лейкоцитарной эластазы является  $\alpha_1$ -ПИ [6]. Его активность при ГД имеет тенденцию к снижению, что, вероятнее всего, отражает его использование при комплексообразовании с эластазой (рис. 3). Таким образом, уровень антипротеолитического потенциала снижается при одновременном уменьшении суммарной активности ферментов свертывания и фибринолиза (БАЭЭ-эстеразная активность), низкой активности калликреина и значительно сниженном уровне прекалликреина. Соче-

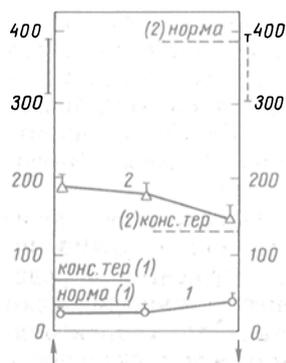


Рис. 3. Активность (в ИЕ/мл)  $\alpha_1$ -ИП (1) и  $\alpha_2$ -М (2) в плазме крови больных с ХПН, находящихся на ГД.

танное снижение названных выше показателей сопровождается резким повышением активности эластазы, что, очевидно, и следует рассматривать как основную причину такого положения, поскольку эластаза является мощным деструктивным ферментом [19, 23].

Непродуктивное, вызванное разрушающим действием эластазы истощение ККС при ГД сопровождается, как можно видеть из рис. 4, значительным снижением уровня АТIII и может свидетельствовать о высоком риске тромботических состояний.

Как известно, увеличение активности калликреина приводит к активации как свертывающей, так и фибринолитической системы плазмы крови, однако уровень фибринолиза при высокой активности калликреина активируется в большей мере [13]. Снижение содержания прекалликреина и неизменный уровень калликреина могут приводить к превалированию свертывающего звена в регуляции агрегатного состояния крови [13]. Усилению свертывающей тенденции при ГД может, по всей вероятности, способствовать и нарушение регуляторных возможностей ингибитора тромбина — АТIII, уменьшающего свою активность более чем на 30 %.

Итак, результаты наших исследований показывают, что у больных 1-й группы (с ХПН, получавших консервативную терапию) при намечающейся тенденции к активации и дегрануляции лейкоцитов и уменьшении резервных возможностей антипротеолитического потенциала сохраняется способность ККС к продуктивной активации с предпочтительным влиянием на фибринолитическое плечо регулируемого равновесия.

При ГД под действием эластазы, в большом количестве выбрасываемой активирующимися лейкоцитами [14], происходит непродуктивное истощение ККС при значительном снижении суммарного БАЭЭ-эстеразного потенциала, антипротеолитической активности и уровня АТIII. Низкая активность калликреина при значительном потреблении (или разрушении) АТIII неизбежно приведет к усилению тромботического плеча и высокой опасности тромбозов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Каюков И. Г., Кучер А. Г. // Урол. и нефрол. — 1991. — № 1. — С. 51—54.
2. Наргикова В. Ф., Пасхина Т. С. // Вопр. мед. химии. — 1979. — № 4. — С. 494—499.
3. Современные методы в биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича. — М., 1968. — С. 237—241.

4. Пасхина Т. С., Кринская А. В. // Вопр. мед. химии.— 1974.— № 6.— С. 660—663.
5. Пасхина Т. С. // Вестн. АМН СССР.— 1988.— № 9.— С. 50—55.
6. Adeyemi E. O., Hodson H. J. // Scand. J. clin. Lab. Invest.— 1990.— Vol. 50, N 4.— P. 433—440.
7. Cumming A. D., Jeffrey S., Lambic A. T., Robson J. S. // Nephron.— 1989.— Vol. 51, № 2.— P. 185—191.
8. Davies M., Barret A., Travis J. et al. // Clin. Sci. molec. Med.— 1978.— Vol. 54.— P. 233—240.
9. Fisher C. F., Schmaer A. H., Addonizio P., Colman R. W. // Blood.— 1982.— Vol. 59.— P. 959—966.
10. Fritz H., Fink E., Trashcil E. // Fed. Proc.— 1979.— Vol. 38.— P. 2753—2759.
11. Gifford R. H., Malawista S. E. // J. Lab. clin. Med.— 1970.— Vol. 75, № 3.— P. 2753—2759.
12. Goetzl E. J., Austern K. F. // J. clin. Invest.— 1974.— Vol. 53.— P. 591—599.
13. Goldsmith G. H., Saito H., Ratnoff O. D. // Ibid.— 1978.— Vol. 62.— P. 54—60.
14. Heidland A., Horl W. H., Neller N. et al. // Kidney int.— 1983.— Vol. 24, Suppl. 16.— P. 27—36.
15. Johnson R. J., Conser W. G., Alpers C. E. et al. // J. exp. Med.— 1988.— Vol. 168.— P. 1169—1174.
16. Johnson V., Ohlsson K., Olsson S. // Scand. J. Immunol.— 1976.— Vol. 5.— P. 421—426.
17. Kaplan A. P., Kay A. B., Austern K. F. // J. exp. Med.— 1978.— Vol. 135.— P. 81—97.
18. Massry S. G., Shaefer R. M., Teshner M. et al. // Kidney int.— 1989.— Vol. 36.— P. 881—890.
19. Ohlsson K., Olsson J. // Europ. J. Biochem.— 1974.— Vol. 42.— P. 519—527.
20. Shapira M., Despland E., Scott C. F. et al. // J. clin. Invest.— 1982.— Vol. 69, N 5.— P. 1199—1202.
21. Vissers M., Winterbourn C., Hunt J. // Biochim. biophys. Acta.— 1984.— Vol. 804.— P. 154.
22. Wachtfogel G. T., Kucich U., James H. L. et al. // J. clin. Invest.— 1983.— Vol. 72, № 5.— P. 1672—1678.
23. Yarovaya G. A., Dotsenko V. L., Neshkova E. A. // International Symposium on Proteinase Inhibitor and Biological Control, 3-rd.— Brdo, 1991.— P. 55.

Поступила 25.12.92

#### IMPAIRMENTS OF REGULATORY FUNCTIONS OF THE BLOOD PLASMA KALLIKREIN-KININ SYSTEM IN CHRONIC RENAL FAILURE AND DURING HEMODIALYSIS.

E. V. Shutov, V. L., Dotsenko, V. M. Yermolenko, G. A. Yarovaya  
Central Institute for Postgraduate Training of Physicians,  
Moscow.

Activation of the kallikrein-kinin system was detected in chronic renal failure treated by routine therapy. In blood plasma of the patients with chronic renal failure, kallikrein was activated from 34.2 to 63.2 mU/ml, while activity of prekallikrein was decreased from 382.0 to 117.8 mU/ml; BAEE-esterase and elastase-like activities simultaneously increased from  $340 \pm 20$  to  $464 \pm 43$  mU/ml and from  $150 \pm 20$  to  $340 \pm 18$  mU/ml, respectively. In the patients on hemodialysis during the interdialysis period, there were reductions of BAEE-esterase and kallikrein activities to  $265.8 \pm 18.5$  and  $25.9$  ml/ml, respectively; and the content of prekallikrein remained decreased. During hemodialysis the elastase-like activity was markedly increased up to 501 mU/ml due to leukocyte activation. The findings suggest that during hemodialysis, due to leukocytic elastase, there is a possible occurrence of thromboses as a result of a potential depletion of the kallikrein-kinin system and decreased blood antiproteolytic potential, including antithrombin III.

© Г. Н. ПОНОМАРЕНКО, 1994

УДК 616.153.1:577.152.34+616.154:577.175.85]-02:615.844]-07

Г. Н. Пономаренко

#### ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ КОМПОНЕНТОВ КАЛЛИКРЕИН-КИНИНОВОЙ СИСТЕМЫ ПРИ НИЗКОЧАСТОТНЫХ АКУСТИЧЕСКИХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург

Действие низкочастотных акустических колебаний на биообъекты сопровождается изменениями соматовисцеральной чувствительности организма [4, 9]. Существенная роль в этих процессах принадлежит системам, обуславливающим состояние микрогемодинамики и сосудистой проницаемости. Их изменения приводят к снижению кровотока и нарушению трофики структур, окружающих механорецепторы. В литературе имеются указания на участие в механизмах реализации эффектов низкочастотных акустических колебаний системы перекисного окисления липидов [6] и ряда биологически активных веществ [8]. Наряду с ними к числу таких систем относится и калликреин-кининовая система (ККС), функциональная роль которой в формировании биологических эффектов низкочастотных акустических колебаний не изучена.

Целью работы явилось исследование состояния ККС плазмы крови при низкочастотных акустических воздействиях.

Методика. Опыты проведены на 48 безлинейных белых крысах-самцах массой 180—220 г. Животных помещали в экранированную звукозаглушенную камеру малого объема. Акустическую стимуляцию производили тональными сигналами частотой 33, 63 и 100 Гц с плотностью потока энергии (ППЭ) 1 и 250 мВт/м<sup>2</sup>. Характеристики акустического поля в камере оценивали при помощи комплекса измерительной аппаратуры модели 3360 фирмы «Grüel-Kjerg» (Дания). Продолжительность воздействия стимулами с фиксированными частотой и ППЭ 15 мин.

Исследование состояния ККС проводили с использованием низкомолекулярного субстрата N-бензоил-L-аргинин этилового эфира (БАЭЭ). Прекалликреин и калликреин плазмы крови отделяли от остальных компонентов ККС и других трипсиноподобных ферментов путем фильтрации через анионный обменник (ДЭАЭ-сефадекс А-50). Активность этих веществ определяли спектрофотометрическим методом по скорости гидролиза БАЭЭ в фильтрате [2]. Одна миллиэстеразная единица (мЕ) активности соответствовала такому количеству фермента в 1 мл плазмы крови, которое катализирует гидролиз БАЭЭ в стандартных условиях с освобождением 1 нмоль N-бензоил-L-аргинина за 1 мин.

Антитрипсиновую емкость плазмы крови оценивали по уровню  $\alpha_1$ -антитрипсина и  $\alpha_2$ -макроглобулина. Активности этих ферментов определяли унифицированным спектрофотометрическим методом [7], который основан для  $\alpha_1$ -антитрипсина на торможении БАЭЭ-эстеразной активности

Активность ККС у крыс при низкочастотных акустических воздействиях

Параметры воздействия		Прекалликреин	Калликреин	$\alpha_1$ -Антитрипсин	$\alpha_2$ -Макроглобулин	Общий белок плазмы, мг·мл <sup>-1</sup>	Кининаза, мЕ·мл·10 <sup>-3</sup>
частота сигнала, Гц	ППЭ, мВт·м <sup>-2</sup>	мЕ·мл <sup>-1</sup>		ИЕ·мл <sup>-1</sup>			
Контроль		165±26	22±2	27,7±2,4	4,2±0,8	54,5±1,9	102±4
33	1	143±16*	33±2	31,2±1,7	4,2±1,8*	58,4±1,6	118±4
63	1	145±21*	44±2	32,9±2,4	3,0±1,7*	54,2±1,9*	145±8
63	250	128±18	48±2	30,7±1,6	3,0±1,3*	54,3±1,8*	128±4
100	1	136±18*	30±3	28,6±1,5*	3,6±1,2*	56,3±1,4*	119±8
100	250	136±16*	33±2	29,8±2,7*	4,3±1,6*	60,0±1,6	118±5

Примечание. Звездочка — отличия от контроля недостоверны ( $p > 0,05$ ).

экзогенного трипсина плазмы, а для  $\alpha_2$ -макроглобулина на определении БАЭЭ-эстеразной активности комплексов макроглобулина с трипсином, устойчивых к действию соевого ингибитора трипсина. Одна условная ингибиторная единица (ИЕ) соответствовала такому количеству ингибитора, присутствовавшего в 1 мл плазмы, который тормозил (для  $\alpha_1$ -антитрипсина) или связывал (для  $\alpha_2$ -макроглобулина) расщепление трипсином 1 мкмоль БАЭЭ за 1 мин.

Общий белок плазмы крови определяли спектрофотометрическим методом [5]. Активность кининазы (карбоксипептидазы N) исследовали спектрофотометрическим методом [3]. В качестве субстрата использовали гиппурил-L-лизин. 1 мЕ активности соответствовала такому количеству фермента в 1 мл плазмы, которое расщепляло субстрат гиппурил-L-лизин с освобождением 1 нмоль гиппуриновой кислоты за 1 мин. Контролем при исследовании компонентов ККС служила плазма крови 8 интактных крыс.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием критерия *t* Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Результаты исследования содержания компонентов ККС при низкочастотных акустических воздействиях представлены в таблице. Они свидетельствуют о том, что акустические стимулы вызывают у крыс активное образование калликреина из его неактивного предшественника — прекалликреина. Это подтверждается достоверным снижением содержания прекалликреина и увеличением уровня калликреина у всех групп подопытных животных, подвергавшихся акустическим воздействиям различной интенсивности. Следовательно, низкочастотные акустические колебания активировали эндопротеазы плазмы, обладающие серинэстеразной активностью. Повышение эндопротеазной активности может приводить к изменениям сосудистой проницаемости и функциональных свойств механорецепторов.

Возросший протеолитический потенциал сериновых протеиназ компенсировался увеличением антипротеазной активности. Уровень  $\alpha_1$ -антитрипсина значимо увеличивался, тогда как активность  $\alpha_2$ -макроглобулина изменялась незначительно, а в ряде случаев даже снижалась. Такое уменьшение активности поливалентного ингибитора эндопротеиназ могло быть связано с образованием неактивного комплекса  $\alpha_2$ -макроглобулин — протеаза [1]. Вместе с тем дефицит макроглобулинов не приводил к существенному

изменению соотношения эндопротеиназа — ингибитор. Увеличение антигрипсической емкости плазмы уравнивалось повышением содержания протеиназ. Сочетанные изменения ККС и антипротеазных систем позволяют рассматривать выявленные эффекты низкочастотных акустических колебаний как результат неспецифической активации эндопротеиназ.

Увеличение ППЭ акустических стимулов приводило также к пропорциональному изменению содержания прекалликреина и калликреина. Тем не менее в отличие от дозозависимого характера изменений калликреинов пропорционального повышения антитрипсической активности плазмы крови не выявлено. Учитывая более выраженные изменения локального кровотока при увеличении интенсивности механического раздражителя, данные о повышении активности сериновых протеиназ в определенной мере подтверждают результаты исследований микроциркуляторного русла, полученные ранее [4].

Участие брадикинина и других активных кининов в реализации эффектов низкочастотных акустических колебаний подтверждают и достоверные изменения кининазной активности плазмы крови. Уровень кининазы повышался у всех групп животных, подвергнутых акустическому воздействию. Такое повышение активности ферментов гидролиза кининов имеет, по-видимому, компенсаторный характер и развивается в ответ на активацию ККС.

Компоненты ККС оказались чувствительным фактором низкочастотных акустических воздействий. Выявленные изменения их содержания зарегистрированы при потоках акустической энергии, соизмеримых с энергией акустических колебаний в окружающей среде. Вместе с тем акустические стимулы такой интенсивности не вызывали значимых изменений содержания белка. Следовательно, другие неспецифические к данному фактору системы, такие, как белоксинтезирующая, оказались менее чувствительными.

Действие низкочастотных акустических колебаний на биологические объекты вызывает нарушение равновесия между активирующими и ингибиторными процессами в ККС. Происходит повышение активности калликреинов и снижение уровня их ингибиторов. Активация ККС приводит также к повышению уровня кинингидролизующих ферментов. Направленность и характер изменений содержания компонентов ККС свидетельствуют о возможном участии брадикинина в изменениях соматосенсорной чувствительности

организма. Нарушение процессов соматосенсорного восприятия лежит в основе формирования реакций организма в низкочастотном акустическом поле и, вероятно, играет существенную роль в патогенезе шумовой и вибрационной болезней.

Определение компонентов ККС может иметь важное значение в обследовании лиц, подвергающихся воздействию данным фактором окружающей среды, и служит хорошим информационным критерием его эффективности. Показатели активности ККС, по-видимому, могут быть использованы для разработки допустимых уровней ППЭ низкочастотных акустических колебаний.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Веремеенко К. Н., Голобородько О. П., Кизим А. И. Протеолиз в норме и при патологии.— Киев, 1988.
2. Доценко В. Л., Саяпин В. Н., Пешкова Е. А. и др. // Бюл. экпер. биол.— 1982.— № 8.— С. 717—720.
3. Елисеева Ю. Е., Орехович В. Н., Павлихина Л. В. // Вопр. мед. химии.— 1976.— № 1.— С. 81—89.
4. Карпова Н. И., Малышев Э. Н. Низкочастотные акустические колебания на производстве.— М., 1981.
5. Кочетов А. М. // Практическое руководство по энзимологии.— М., 1980.— С. 242—243.
6. Мелкоян М. М. // Вопр. мед. химии.— 1989.— № 4.— С. 12—16.
7. Нартикова В. Я., Пасхина Т. С. // Там же.— 1979.— № 4.— С. 434—439.
8. Свидовый В. И. // Гиг. и сан.— 1987.— № 3.— С. 88—89.
9. Gavreau V. // Nature.— 1968.— № 3401.— Р. 336—344.

Поступила 13.05.92

#### EFFECT OF LOW-FREQUENCY ACOUSTIC SIGNALS ON COMPONENTS OF THE KALLIKREIN-KININ SYSTEM.

G. N. Ponomarenko

S. M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg.

Content of components of the kallikrein-kinin system was studied in the plasma of rats treated with low frequency acoustic signals. Low frequency acoustic treatment caused an increase in the rate of kallikrein formation from its inactive precursor prekallikrein, whose content was decreased; antiprotease activity was increased in the plasma mainly due to activation of  $\alpha_1$ -antitrypsin. At the same time, activation of the kallikrein-kinin system led to a compensatory increase in the activity of kininase. The findings suggest that the kallikrein-kinin system is involved in the formation of the body's responses in the low-frequency acoustic field.

© В. Е. ПОТАПЕНКО, Л. К. ШАТАЕВА, 1994

УДК 615.355:577.152.429.042].015.4.612.461.268].07

В. Е. Потепенко, Л. К. Шатаева

#### ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ УРОКИНАЗЫ НА ЭФФЕКТИВНУЮ ФИБРИНОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ МОЧИ ЛЮДЕЙ

Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург

Фибринолитическая система организма человека представляет собой часть противосвертывающей системы, обеспечивающей сохранение жидкого состояния крови в сосудистом русле. Среди группы прямых активаторов плазминогена наиболее важным является урокиназа (УК), впервые обнаруженная в моче [1, 4]. В послед-

ствии фермент был идентифицирован в некоторых тканях млекопитающих [6, 7], а также выделен из культур клеточных линий различных тканей [10, 13, 14].

В связи с возрастающей распространенностью сердечно-сосудистых и других заболеваний, сопровождающихся тромбозами [4], вновь усилился интерес к УК как к ферменту, растворяющему тромб *in vivo* [5].

Подавляющее большинство методов получения УК [11, 12] основывается на переработке мочи людей. В настоящее время поиски наиболее технологичных и производительных методов получения УК продолжаются, однако ни в одной работе не проводится тщательный и обоснованный подбор доноров по такому фактору, как фибринолитическая активность. Выявление групп доноров (определенного пола, возраста, физиологического состояния) с различными уровнями фибринолитической активности представляет как общепатологический интерес с точки зрения особенностей функционирования фибринолитической системы, так и практическое значение, заключающееся в повышении выхода активности выделяемого фермента.

Методика. В качестве исходного сырья использовали утренние порции мочи различных донорских групп: мужчин и женщин разного возраста. Выделение УК и ее ингибиторов проводили по методу [9], основанному на осаждении в разных изoeлектрических точках фермента и ингибиторов. Выделение УК с помощью ионообменной хроматографии (УК<sub>ио</sub>) на специфическом биосорбенте проводили по способу [1, 2]. Активность УК определяли методом Аструпа [8] на фибрин-агаровых пленках, модифицированных в отношении приготвления пленок. Для получения пленок использовали человеческий фибриноген (содержащий плазминоген) и человеческий тромбин (не содержащий плазминогена) производства 3-й станции переливания крови Санкт-Петербурга. В качестве стандарта использовали препарат стрептокиназы стрептоказу. Активность выражали в единицах стрептокиназы в 1 мл (ед. стр/мл).

Результаты и обсуждение. В табл. 1 представлены средние значения фибринолитической активности мочи у различных групп доноров в зависимости от значений рН. Видно, что при физиологических значениях рН мочи в интервале 5,0—6,0 наибольшая активность наблюдается в донорских группах 1 и 4. При понижении рН до 4,8—4,9 происходит уменьшение фибринолитической активности у всех исследованных донорских групп. Возрастание рН и приближение к рН-оптимуму действия фермента

Таблица 1

Средние значения фибринолитической активности в моче у различных групп доноров в зависимости от рН

Группа доноров	Пол доноров	Возраст доноров, годы	Средние значения фибринолитической активности, ед. стр/мл		
			рН 4,8	рН 5,0—6,0	рН 8,6—8,8
1	М.	1—6	15 700	46 400	68 700
2	М.	19—21	5 200	22 700	46 400
3	Ж.	25—35	3 100	17 800	54 600
4	Ж.	50—60	15 700	60 000	110 000

Таблица 2

Изменение фибринолитической активности при смешивании мочи доноров различных групп

Группа доноров	Соотношение объемов при смешивании	Сохранение активности, %		
		pH 4,8	pH 5,0—6,0	pH 8,6—8,8
1+3	1:1	73	82	100
1+4	1:1	77	78	68
3+4	1:1	72	78	80

приводит к увеличению значений фибринолитической активности во всех группах доноров.

При смешивании мочи доноров различных групп (табл. 2) во всех случаях сохранение суммарной активности составляет около 70—80 %. В случае смешивания мочи групп доноров 1 и 3 при щелочных значениях pH эффект ингибирования отсутствует.

Наблюдаемый эффект ингибирования, по-видимому, может быть обусловлен количественным и (или) качественным разнообразием ингибирующих компонентов в моче. В связи с наблюдаемым эффектом ингибирования в моче различных донорских групп представляет интерес выделить фракцию ингибиторов и проанализировать ее влияние на фибринолитическую активность УК, выделенной различными способами [1, 2, 9]. Такие исследования были проведены на кислотных фракциях ингибиторов доноров различных групп. Как видно из табл. 3, при выбранном соотношении объемов УК и ингибиторов ингибиторы группы 1 не оказывают влияния на УК, выделенную из донорских групп 3 и 4 по способу [9], однако ингибируют УК<sub>ио</sub>, полученную по способу [1, 2], на 65 %. Ингибиторы, выделенные от доноров группы 3, одинаково ингибируют УК доноров групп 1 и 4 — на 12 %, тогда как УК<sub>ио</sub> ингибируется ими на 75 %. Ингибирующий эффект группы 4 по отношению к УК доноров групп 1 и 3 составляет 85 и 74 % соответственно, тогда как по отношению к УК<sub>ио</sub> при выбранных условиях ингибирования не наблюдается.

Последнее обстоятельство, по нашему мнению, имеет большое значение. Отсутствие ингибирующего эффекта на УК, выделенную с помощью специфического сорбента, в возрастной группе, относящейся к группе риска по сердечно-сосудистым заболеваниям, позволяет предположить высокую эффективность фермента, полученного именно этим способом. Так, под действием УК<sub>ио</sub> наблюдается ускоренный лизис тромба, сформированного *in vitro* в крови здоровых доноров.

Таблица 3

Изменение фибринолитической активности УК, выделенной различными способами, при инкубировании с ингибиторами различных донорских групп в объемном соотношении УК:ингибиторы, равном 4:1

Группы доноров	Сохранение активности, %			
	способ выделения УК [9]			способ выделения УК [1, 2] УК <sub>ио</sub>
	УК группы 1	УК группы 3	УК группы 4	
1	—	100	100	35
3	88	—	88	35
4	15	26	—	100

В целом же проведенное исследование свидетельствует о различных функциональных состояниях фибринолитической системы человека в группах здоровых доноров, дифференцированных по возрасту и полу. Вероятно, существуют и другие генетические и физиологические параметры, влияющие на уровень фибринолитической активности человека. Все это убеждает в необходимости проведения скрининга исходного сырья с целью выделения наиболее перспективной группы доноров для получения тромболитического фермента различными способами [1—3, 9].

## ЛИТЕРАТУРА

1. А. с. 584034. Способ выделения фермента тромболитического действия / Самсонов Г. В., Кольцова С. В., Шатаева Л. К. и др. // Открытия.— 1977.— № 54 (46).— С. 60.
2. Кольцова С. В., Шатаева Л. К., Сухарева Т. Ф. и др. // Вопр. мед. химии.— 1981.— № 5.— С. 623—626.
3. Кратасюк Г. А., Якубов Л. З., Синицын В. В. и др. // Биополимеры и клетка.— 1989.— Т. 5, № 3.— С. 95—102.
4. Мазаев А. В., Торчилин В. П. // Бюл. Всесоюз. кардиол. науч. центра.— 1986.— № 2.— С. 3—7.
5. Фибринолиз. Современные фундаментальные и клинические концепции.— М., 1982.
6. Albrechtsen O. K. // Acta physiol. scand.— 1957.— Vol. 39, N 2—3.— P. 284—289.
7. Albrechtsen O. K. // Brit. J. Haemat.— 1957.— Vol. 3, N 3.— P. 284—291.
8. Astrup T., Mullertz S. // Arch. Biochem.— 1952.— Vol. 40, N 2.— P. 346—351.
9. Yamamoto S. // Fibrinolysis in Health and Disease.— 1971.— P. 73—78.
10. Kuchinski C. S., Fletcher A. D., Sherry S. // J. clin. Invest.— 1968.— Vol. 47, N 6.— P. 1238—1253.
11. Pat. 60.166.621 JP. Purification of Urokinase / Kondo M., Narita S., Morimoto K. et al. // Chem. Abstr.— 1986.— Vol. 104.— N 203099.
12. Pat. 63.102.679 JP. Recovery of Urokinase from Urine with Ultra Filtration Membrane / Senoo S., Nakahara H., Hamakake R. et al. // Chem. Abstr.— 1990.— Vol. 112.— N 94602.
13. Rijken D. C., Collen D. // J. biol. Chem.— 1981.— Vol. 256, N 13.— P. 7033—7041.
14. Williams J. R. // Brit. J. exp. Path.— 1951.— Vol. 32, N 6.— P. 530—537.

Поступила 20.04.92

## EFFECT OF UROKINASE INHIBITORS ON EFFECTIVE FIBRINOLYTIC ACTIVITY IN HUMAN URINE.

V. E. Potapenko, L. K. Shataeva

Institute of High Molecular Substances, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg.

The levels of fibrinolytic activity of human urine as a source of the thrombolytic enzyme urokinase in various volunteers differing in sex and age. The fibrinolytic activity was distinctly altered after mixing of urine obtained from various donor groups as a result of varying quantitative and qualitative contents of urokinase inhibitors in individual volunteers. The specific biological activity of urokinase was studied in the presence of various inhibitors. Prescreening of the initial raw material (urine) should be made to isolate the most effective samples of the thrombolytic enzyme urokinase.

Т. В. Бершова, Г. Ф. Гордеева, Е. М. Васильева,  
Л. А. Бокерия, Р. А. Нам, Н. В. Данилова,  
В. И. Сербин

## НАРУШЕНИЯ МЕМБРАННЫХ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ КАЛЬЦИЕВОГО ГОМЕОСТАЗА ПРИ АРИТМИЯХ СЕРДЦА У ДЕТЕЙ

НИИ педиатрии РАМН, НИИ сердечно-сосудистой хирургии им. А. Н. Бакулева РАМН, Москва

Особое внимание в последние годы привлекает изучение взаимосвязи изменений вне- и внутриклеточного метаболизма при нарушениях ритма сердца (НРС). Анализ отдельных сторон патогенеза аритмий, основанный на исследовании гормонального статуса и влияния его на ферментативную активность и проницаемость миокардиальной клетки, позволил внести определенную ясность в понимание сущности этого патологического состояния, однако в целом проблемы не решил. Остаются невыясненными, в частности, вопросы о возможном влиянии мембранодестабилизирующих процессов и системы простаноидов на регуляцию кальциевого гомеостаза в клетке.

Для изучения нарушений клеточной активности с учетом роли биомембран в генезе НРС нами проведены исследования состояния процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активности ферментов антиоксидантной защиты (ФАЗ) в эритроцитах, уровня кальмодулина (КМ) и ионизированного кальция ( $Ca^{2+}$ ) в эритроцитах и ткани миокарда больных с НРС, фосфолипидного состава, уровня общего холестерина (Х) и активности ионтранспортирующих ферментов ( $Ca^{2+}$ — $Mg^{2+}$ - и  $Na^{+}$ — $K^{+}$ -АТФаз) в мембранах эритроцитов, а также уровня простаглицина ( $PGI_2$ ) и тромбоксана ( $TXB_2$ ) в плазме крови детей с аритмиями на фоне антиаритмической терапии.

**Методика.** Указанные биохимические исследования проведены у 125 детей в возрасте 3—14 лет с эктопическими видами аритмий:

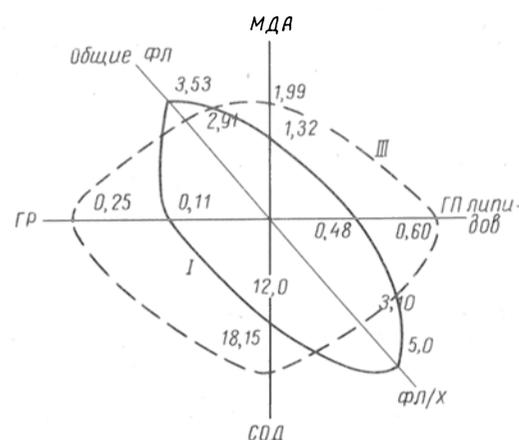
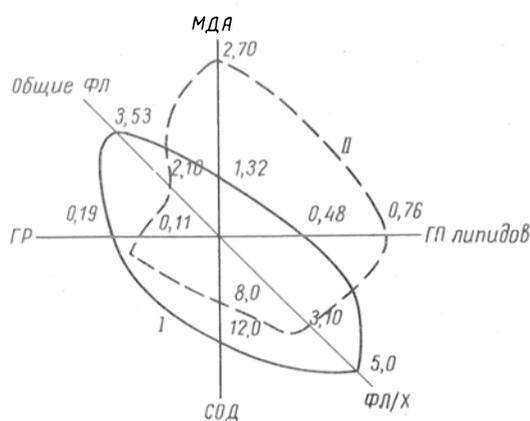


Рис. 1. Изменение показателей процессов ПОЛ, активности ФАЗ и фосфолипидов в эритроцитах детей с аритмиями.

I — группа здоровых детей; II — группа детей с аллоритмиями; III — группа детей с экстрасистолией. Здесь и на рис. 2 концентрация МДА — в нмоль на  $10^6$  эритроцитов, ГП липидов — в отн. ед. на  $1$  мл эритроцитов, общих ФЛ — в г/л, ГР — в ед. на  $10^6$  эритроцитов, СОД — в ед. на  $10^6$  эритроцитов.

экстрасистолией, пароксизмальной и непароксизмальной тахикардией. Контрольную группу составили 27 здоровых детей того же возраста. Содержание КМ и  $Ca^{2+}$  измеряли также в ткани ушка предсердия больных с НРС, удаленного во время ультразвуковой деструкции очага эктопического возбуждения. Ткань для исследования забирали после торакотомии до проведения основного этапа операции. Уровень малонового диальдегида (МДА) определяли по реакции взаимодействия тиобарбитуровой кислоты с МДА, концентрацию гидроперекисей (ГП) липидов оценивали по УФ-спектру поглощения раствора липидов в метанол-гексане с коэффициентом молярной экстинкции  $2,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}/\text{cm}^{-1}$ . Активность супероксиддисмутазы (СОД) оценивали по восстановлению нигротетразоля синего из окисленного состояния под действием супероксидного радикала, активность глутатионредуктазы (ГР) — по количеству восстановленного глутатиона с использованием в качестве восстановленного эквивалента НАДФН<sub>2</sub>. Активность  $Ca^{2+}$ — $Mg^{2+}$ - и  $Na^{+}$ — $K^{+}$ -АТФаз определяли по увеличению количества неорганического фосфора. Измерения проводили на спектрофотометре СФ-26. Содержание простаглицина и тромбоксана устанавливали по уровню 6-кето- $PGF_{1\alpha}$  и  $TXB_2$  соответственно с помощью наборов реактивов фирмы «Amersham» (Англия). Концентрацию общих фосфолипидов (ФЛ) определяли с помощью наборов реактивов фирмы «Lachema» (Чехо-Словакия), спектр ФЛ — методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Силуфол» (Чехо-Словакия), уровень Х — ферментативным методом с использованием реактивов фирмы «Boeinger Mannheim». Измерение  $Ca^{2+}$  проводили с помощью ионселективных электродов на анализаторе « $Ca^{2+}$ -643» («Ciba-Corning», Англия), содержание КМ — радиоизотопным методом с использованием наборов реактивов фирмы «Amersham».

**Результаты и обсуждение.** В результате проведенного корреляционного анализа полученных данных выявлена тесная взаимосвязь содержания  $Ca^{2+}$  и КМ с изменениями фосфолипидного спектра биомембран и интенсивности

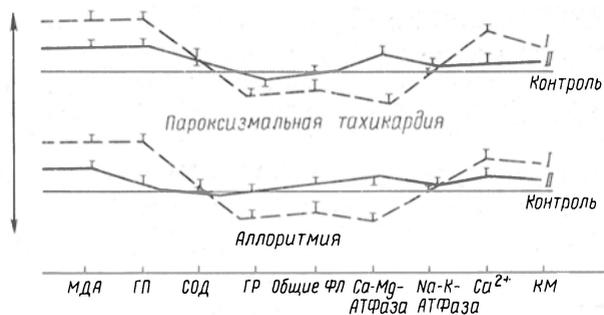


Рис. 2. Влияние переменного магнитного поля на динамику биохимических показателей у детей с эктопическими видами НРС.

I — группа детей до лечения; II — группа детей с положительным результатом лечения. Активность Са—Мг- и Na—К-АТФазы выражена в мкмоль неорганического фосфора на 1 мг белка за 1 г, уровень КМ — в нг на 1 мг белка.

процессов ПОЛ. Отмечено достоверное ( $p < 0,05$ ) повышение общего внутриклеточного кальциевого пула и увеличение более чем в 1,8 раза концентрации КМ в эритроцитах по сравнению с группой здоровых детей. Указанные сдвиги в системе КМ—Са<sup>2+</sup> наиболее выражены у детей с аллоритмиями (би- и тригеминией) и с частыми приступами пароксизмальной тахикардии. У этих больных отмечено значительное повышение уровня Са<sup>2+</sup> и КМ в ткани ушка предсердия по сравнению с таковым у больных с экстрасистолией. Однонаправленные сдвиги в содержании КМ и Са<sup>2+</sup> в эритроцитах и ткани миокарда больных с НРС указывают на общность биохимических механизмов в реализации патологического процесса как в отдельных клетках, так и в тканевых структурах органа-мишени.

Изучение показателей липидного состава в мембранах эритроцитов выявило снижение содержания основного субстрата ПОЛ—фосфатидилэтанолamina— и холинсодержащих ФЛ, а также увеличение содержания лизофосфатидов и кардиолипина на фоне снижения уровня общих ФЛ. Отмечено снижение соотношения ФЛ/Х как за счет уменьшения уровня ФЛ, так и за счет увеличения концентрации Х.

Интенсификация свободнорадикального окисления характеризуется выраженным приростом содержания молекулярных продуктов перекисидации липидов — ГП и МДА — в мембранах красных клеток крови (рис. 1). Активация процессов ПОЛ наиболее выражена у детей с аллоритмиями и стойкой формой непароксизмальной тахикардии. Выявленные сдвиги в системе ПОЛ у большинства детей сопровождались снижением активности ФАЗ, что может указывать на недостаточность резервных возможностей антиоксидантных функций и играть роль в реализации повторно возникающих сдвигов в метаболической системе клеток. Вместе с тем незначительное усиление свободнорадикального окисления на фоне повышения активности ФАЗ обнаружено у детей с экстрасистолиями длительностью до 1 года, что свидетельствует о способности антиоксидантной системы осуществлять контроль за образованием активных форм кислорода и поддержанием ПОЛ на стационарном уровне.

Повреждающее действие активации процессов ПОЛ на фосфолипидный состав клеточных

мембран подтверждается обнаруженной у детей с НРС отрицательной корреляционной связью между содержанием в мембранах эритроцитов МДА и ГП, с одной стороны, и уровнем в них ФЛ — с другой ( $r_1 = -0,72$ ,  $r_2 = -0,84$  соответственно).

Выявлена также обратная зависимость внутриклеточной концентрации Са<sup>2+</sup> от активности Са<sup>2+</sup>—Мг<sup>2+</sup>-АТФазы в эритроцитах. Установлено, что у детей с экстрасистолией и пароксизмальной тахикардией активность этого фермента снижена в 2,2 и 2,3 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с таковой у здоровых детей. Наибольшее уменьшение активности фермента (в 3,3 раза;  $p < 0,05$ ) отмечено при парасистолии. Активность Na<sup>+</sup>—К<sup>+</sup>-АТФазы у детей с НРС в среднем снижена только на 10 % от ее значения у здоровых детей.

Получены данные о существенном повышении содержания ПГ<sub>2</sub> и ТКБ<sub>2</sub> в плазме крови детей с эктопическими аритмиями. Выявлено, что динамика содержания эндогенных простагландинов в значительной мере определяется видом и характером течения аритмии. Так, уровень ПГ<sub>2</sub> в плазме крови больных с непароксизмальной тахикардией повышен в 3,4 раза ( $p < 0,001$ ), а ТКБ<sub>2</sub> — в 2,7 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с этими показателями в группе здоровых детей. У больных с частыми приступами пароксизмальной тахикардии уровень ТКБ<sub>2</sub> был ниже у детей с редкими пароксизмами.

У 83 % обследуемых детей на фоне применения физиотерапевтических методов лечения (синусоидальные токи переменного магнитного поля) отмечено улучшение клинического состояния, сопровождающееся в большинстве случаев нормализацией изучавшихся биохимических показателей (рис. 2), что подтверждает важную роль указанных биорегуляторов в патогенезе нарушений сердечного ритма.

Совокупность полученных результатов служит основой для гипотезы о том, что эктопические расстройства сердечного ритма являются своеобразной формой мембранной патологии, в результате которой возникают условия для формирования патологических взаимосвязей. Среди причин, обуславливающих сдвиги в процессах клеточного метаболизма у больных с аритмией, следует отметить влияние повышенных концентраций катехоламинов на цитомембрану [4, 14].

Последние, являясь источником свободных форм кислорода, способствуют активации процессов свободнорадикального окисления липидов, лабильности лизосом, освобождению большого количества фосфолипидов и образованию лизофосфатидов. Не исключено, что обнаруженное нами у детей с НРС накопление лизофосфатидов в свою очередь ведет к уменьшению уровня АТФ в миокарде, что сопровождается нарушением сопряжения возбуждения с сокращением [2, 8].

Изменения параметров системы электрохимического сопряжения у таких больных возможны также в результате повышения уровня Са<sup>2+</sup>. Интенсификация процессов ПОЛ и накопление МДА и ГП в клетке увеличивают проницаемость для Са<sup>2+</sup>, снижают активность мембранно-связанных Са<sup>2+</sup>-транспортирующих ферментов, что изменяет плотность потока Са<sup>2+</sup> в миоплазму

и из нее, в результате чего происходит его накопление [7, 9]. Возможно, при этом свободный  $\text{Ca}^{2+}$  образует преципитаты в цитозоле клетки, что в свою очередь способствует появлению дополнительных эктопических очагов, круговой циркуляции волны возбуждения с возвратом импульса и возникновению экстрасистолии по типу «entry» [5].

Кроме того, обнаруженное нами у детей с НРС снижение активности  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФазы способствует увеличению содержания  $\text{Na}$  и уменьшению уровня  $\text{K}$  в клетке, изменению ее биоэлектрической активности, что сопровождается падением потенциала покоя, уменьшением скорости и длительности потенциала действия [10, 13]. Указанные нарушения мембранного потенциала резко снижают проводимость и способствуют возникновению экстрасистолии [11]. При этом выявленное нами повышение уровня эндогенных простаноидов у детей с эктопическими нарушениями ритма сердца, возможно, оказывает антиаритмическое действие, связанное с повышением проницаемости миокардиальных клеток для калия [1, 15].

Известно, что действие вторичных внутриклеточных посредников является согласованным в отношении их взаимной регуляции [3, 12]. Так, избыток  $\text{Ca}^{2+}$  в клетке ведет к повышенному образованию КМ, который реализует свое влияние через специфические протеинкиназы, а также посредством увеличения максимальной активности  $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$ -АТФазы и сродства этого фермента к  $\text{Ca}^{2+}$  [6]. Отмеченное у детей с НРС повышение внутриклеточного уровня КМ можно рассматривать как компенсаторный механизм, направленный на снижение содержания  $\text{Ca}^{2+}$  в клетке и уменьшение повреждающих эффектов миокарда.

Таким образом, аритмии сердца сопровождаются структурными и функциональными изменениями цитомембран, в результате которых возникают метаболические повреждения, приводящие к нарушению клеточного кальциевого гомеостаза и изменению электрической стабильности миокарда. Вне- и внутриклеточное взаимодействие универсальных регуляторов метаболизма является основой интегральной деятельности миокардиальных клеток, которая в патологических условиях может носить адаптивный характер.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гиоргадзе М. Л., Панченко Е. П., Грацианский Н. А., Масенко В. А. // Кардиология.— 1991.— № 8.— С. 7—11.
2. Карагезин К. Г., Овсянин Л. М., Адоиц К. Г. // Вопр. мед. химии.— 1990.— № 2.— С. 10—13.
3. Орлов С. П., Покудин Н. И. // Биохимия.— 1985.— Т. 50, № 12.— С. 2056—2062.
4. Ульяновский Л. С. // Физиол. журн. СССР.— 1990.— Т. 76, № 10.— С. 1273—1279.
5. Boutros G. S., Goung W. B., Restivo M. et al. // Europ. Heart J.— 1991.— Vol. 12, Suppl.— P. 42.
6. Cavires J. D. // J. Physiol. (Lond.)— 1986.— Vol. 377.— P. 85.
7. Coldhaber J. I., Parker J. M., Weiss J. M. // Ibid.— 1991.— Vol. 443.— P. 376—386.
8. Harsanov M. V., Magaldadze V. A., Sukoyan G. et al. // J. appl. Cardiol.— 1990.— Vol. 5, N 6.— P. 467—476.
9. Langer G. A., Rich T. L. // J. molec. cell. Cardiol.— 1989.— Vol. 21, Suppl. 2.— P. 177.
10. Lin B., Wang L. C. H., Belke D. D. // Cell. Calcium.— 1991.— Vol. 12, N 1.— P. 11—18.

11. Linker N. I., Ward D. E. // Clin. Cardiol.— 1990.— Vol. 13, N 12.— P. 873—876.
12. Means D. R., Lagace I. L., Guerriero V., Chafouleas J. G. // J. cell. Biochem.— 1982.— Vol. 20, N 4.— P. 317—330.
13. Quaegebeur I. M., Schonten V. I. A., Ter Keurs H. E. D. I. // J. Physiol. (Lond.)— 1986.— Vol. 377.— P. 119.
14. Tandrouyen F. T., Muntz K. H., Buja L. M., Willerson J. T. // Circulation.— 1990.— Vol. 82, N 3.— Suppl.— P. 30—37.
15. Wennmalm A., Nowak J., Bjuro Th. // Ibid.— N 5.— P. 1737—1743.

Поступила 11.12.92

#### IMPAIRMENTS IN MEMBRANE-RELATED REGULATION OF CALCIUM HOMEOSTASIS IN CHILDREN WITH CARDIAC ARRHYTHMIAS

T. V. Bershova, G. F. Gordeeva, E. M. Vasilyeva, L. A. Bokeriya, R. A. Nam, N. V. Danilova, V. I. Serbin

Institute of Pediatrics, A. N. Bakulev Institute of Cardiovascular Surgery, Academy of Medical Sciences of the Russian Federation, Moscow

Importance of calmodulin and  $\text{Ca}^{2+}$  in membranes of erythrocytes and myocardium was studied in children with ectopic forms of cardiac arrhythmia — extrasystole, paroxysmal and nonparoxysmal tachycardia. Activation of lipid peroxidation and shifts in cytomembrane phospholipid spectrum were shown to be involved in impairments of calcium homeostasis regulation, which is responsible for control of electro-mechanical parameters and may be related to deterioration of myocardial electrophysiological properties.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.248-07:616.153.915

М. В. Лизенко, В. И. Петровский, Т. В. Котенко, Т. И. Регеранд

#### ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИПИДНОГО СОСТАВА АТЕРОГЕННЫХ И АНТИАТЕРОГЕННЫХ ЛИПОПРОТЕИДОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Петрозаводский университет

Многие исследователи считают, что липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП) и липопротеины низкой плотности (ЛПНП) обеспечивают органы и ткани триацилглицеринами (ТАГ) и холестерином (ХС), а липопротеины высокой плотности (ЛПВП) переносят ХС с клеточных мембран (в том числе и интимы сосудов) в печень. ЛПНП, транспортирующие ХС к клеткам и стенкам кровеносных сосудов, характеризуются как атерогенные, а ЛПВП — антиатерогенные.

Данные о липидном составе сыворотки крови при заболеваниях органов дыхания (хронические и острые бронхиты, специфические легочные процессы) часто противоречивы. Практически не представлен полный липидный состав различных липопротеинов при бронхиальной астме (БА), хотя распространенность и тяжесть этого заболевания дают все основания для более детального его исследования.

Методика. Исследование содержания липидов в липопротеинах сыворотки крови проводили у 25 здоровых доноров, которые служили контролем, и у 40 больных инфекционнозависимой БА. Кровь брали натощак из локтевой

Липидный состав ЛПВП<sub>2</sub> (в мг/дл)

Показатели	Контроль	Больные БА
Общие липиды	177,8±2,9	140,3±4,7
ТАГ	19,9±1,0	14±1,8
ХЛ	14,2±0,8	13,6±1,3
ЭХЛ	55,2±1,2	47,6±2,7
Суммарный ХЛ	69,4±1,3	61,2±2,8
ФЛ	88,5±2,3	65,1±2,5
лизолецитин	2,3±0,1	3,0±0,2
сфингомиелин	15,1±0,4	14,0±0,5
лецитин	59,6±1,5	40,9±1,4
фосфатидилэтноламин	6,7±0,3	4,6±0,5
фосфатидная кислота	4,8±0,3	2,6±0,6
Лецитин/лизолецитин	25,9	13,6
Лецитин/сфингомиелин	3,9	2,9
Лецитин/ХЛ	4,2	3,0

вены в центрифужные пробирки, оставляли в термостате при 37 °С на 1 ч, после чего центрифугировали в течение 15—20 мин при 3000 об/мин. Для того чтобы получить ЛПНП, к свежеприготовленной сыворотке (минимальное количество около 5 мл) приливали из расчета на 1 мл 0,04 мл гепарина и 0,06 мл 28 % CoSO<sub>4</sub>, тщательно перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 20 мин. После этого раствор подвергали ультрацентрифугированию на рефрижераторной центрифуге К-24 при 3500 об/мин и 4 °С в течение 1 ч. Надосадочную жидкость сливали в другие центрифужные пробирки, осадок с ЛПНП заливали смесью хлороформ—метанола (2:1) и оставляли на холоду до анализа. Для осаждения ЛПВП<sub>2</sub> к полученной после центрифугирования надосадочной жидкости (супернатант) прибавляли 0,2 мл раствора декстрансульфата с мол. м. 12 000 D в 0,15 M NaCl из расчета 5 мг декстрансульфата в конечной концентрации на 1 мл сыворотки. Содержимое тщательно встряхивали и оставляли на 20 мин при комнатной температуре, после чего подвергали центрифугированию при тех же условиях, что и для ЛПНП, только в течение 30 мин. Полученные осадки ЛПВП<sub>2</sub> заливали смесью хлороформ—метанола (2:1), размешивали, переносили в пеициллиновые баночки и хранили их до анализа на холоду. После осаждения ЛПНП и ЛПВП<sub>2</sub> в супернатанте оставались в основном ЛПВП<sub>3</sub> и ЛПОВП. Содержание последних в сыворотке считается незначительным. К супернатанту в объеме, вдвое превышающем объем супернатанта, добавляли смесь хлороформ—метанола (2:1) и оставляли в холодильнике до анализа. Более подробное и детальное описание методики выделения липопротеинов изложено в [8, 14]. Липиды из полученных фракций липопротеинов экстрагировали по [13] и разделяли их с помощью тонкослойной хроматографии на пластинках «Силуфол» в различных системах растворителей. Для разделения общих липидов была использована смесь петролейный эфир—серный эфир—уксусная кислота (90:10:1), для разделения фосфолипидов (ФЛ) — хлороформ—метанол—вода (65:25:4). Снятые с пластинок отдельные пятна липидов исследовали спектрофотометрическими методами [7].

Таблица 1

Липидный состав ЛПНП (в мг/дл)

Показатели	Контроль	Больные БА
Общие липиды	420±8,1	447,5±10,0
ТАГ	103,3±3,2	100,7±3,7
ХЛ	41,2±1,9	54,4±2,5
ЭХЛ	144,9±4,3	188,4±6,1
Суммарный ХЛ	186,1±5,5	242,8±7,0
ФЛ	130,6±3,7	104±4,6
лизолецитин	3,5±0,3	5±0,4
сфингомиелин	31,7±0,9	30,5±1,2
лецитин	77,4±2,0	59,6±4,1
фосфатидилэтноламин	10,6±0,6	6,7±1,6
фосфатидная кислота	7,4±0,4	2,2±0,8
Лецитин/лизолецитин	22,1	11,9
Лецитин/сфингомиелин	2,4	1,9
Лецитин/ХЛ	1,9	1,1
Холестериновый коэффициент	1,9±0,08	2,1±0,1

Результаты и обсуждение. Общее количество липидов в ЛПНП у доноров и больных не имело достоверных различий, хотя у последних отмечена тенденция к некоторому его повышению. Достоверные различия проявились в содержании ФЛ, особенно лецитина, концентрация которого была снижена, а содержание лизолецитина, свободного и особенно эстерифицированного ХС повышено у больных БА ( $p < 0,05$ ; табл. 1). ЛПНП, которые формируются в сыворотке крови под действием на ЛПНП липопротеинлипазы, имели одинаковый качественный состав, особенно за счет ФЛ (лецитина, лизолецитина, фосфатидной кислоты) и ХС, количественный состав у доноров и больных. Липидный состав ЛПНП больных БА был сходен с таковым липопротеинов при сердечно-сосудистых заболеваниях. Надо отметить, что увеличение содержания ХС в ЛПНП было обнаружено у больных с обострением хронической неспецифической пневмонии легких [6]. В ЛПНП больных БА достоверно повышено содержание лизолецитина ( $p < 0,05$ ), представляющего собой метаболит, который возникает из лецитина при повышенной фосфолипазной активности, а также в процессе прохождения в сыворотке крови реакции с участием лецитинхолестеринацилтрансферазы (ЛХАТ). Более высокий уровень лизосоединений четко заметен при отношении показателя лецитина к лизолецитину, который был почти в 2 раза ниже в ЛПНП больных. Кроме того, у больных снижено также отношение лецитина к сфингомиелину и ХЛ, что существенно изменяет структуру липидов ЛПНП, особенно за счет снижения содержания основного компонента — лецитина.

Довольно глубокие изменения обнаружены и в спектре липидов ЛПВП больных, особенно в подфракции ЛПВП<sub>2</sub> (табл. 2). Содержание в них общих липидов достоверно снижено ( $p < 0,05$ ), в основном за счет лецитина, фосфатидилэтноламина и фосфатидной кислоты, тогда как содержание свободного и эстерифицированного ХС имеет тенденцию к снижению. Аналогично ЛПНП в ЛПВП<sub>2</sub> больных снижено отношение лецитина к лизолецитину (в 2 раза), лецитина к сфингомиелину и ХС.

Во фракции ЛПВП<sub>3</sub> достоверные различия проявились в содержании эфиров холестерина

(ЭХС) и ТАГ, причем концентрация ЭХС была выше у больных, а ТАГ — у доноров ( $p < 0,05$ ; табл. 3). Содержание ФЛ, в частности лецитина, фосфатидилэтаноламина и сфингомиелина, не различалось у доноров и больных, за исключением более высокого уровня лизолецитина и более низкого — фосфатидной кислоты ( $p < 0,05$ ) у больных, однако отношение содержания лецитина к лизолецитину было в 2 раза ниже, чем у доноров.

В липопротеинах сыворотки крови больных инфекционнозависимой БА возникают нарушения липидного состава, касающиеся изменения структурных липидов, особенно лецитина, концентрация которого достоверно снижена в ЛПНП и ЛПВП<sub>2</sub> ( $p < 0,05$ ). Это хорошо проявилось в более низком отношении содержания лецитина к лизолецитину во всех фракциях липопротеинов больных. Пониженный уровень лецитина в липопротеинах приводит к нарушению соотношения его содержания с другими мембранными липидами, а именно сфингомиелином и ХС, у больных. Кроме того, во всех группах липопротеинов больных снижено содержание и фосфатидной кислоты. Происходящие изменения могут быть связаны с более высокой степенью липолиза как в липопротеинах, так и в бронхолегочной ткани в связи с увеличением активности фосфолипазы А в условиях гипоксии. Имеются данные, что у пациентов с хроническими неспецифическими заболеваниями дыхательных путей в поверхностных сливах бронхов отмечено снижение содержания лецитина — одного из основных компонентов сурфактантной системы [4]. Как известно, главными компонентами этой системы являются дипальмитинлецитин и фосфатидная кислота. Более высокий уровень лизосоединений в ЛПВП<sub>3</sub> больных дает еще и основание говорить об увеличении активности у них ЛХАТ-реакции, метаболитом которой является лизолецитин. Кроме того, более высокая степень активности ЛХАТ подтверждается и достоверным ( $p < 0,05$ ) увеличением содержания ЭХС в ЛПНП и ЛПВП<sub>3</sub>.

Кроме структурных липидов, в патогенезе БА существенную роль играют и нарушения холестерина обмена, которые проявились в достоверных изменениях содержания ХС и ЭХС в липопротеинах больных. Так, в ЛПНП и ЛПВП<sub>3</sub> отмечено повышение уровня ХС, главным образом

за счет его эфиров. Одним из возможных объяснений этому может быть усиление процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), наблюдаемое при хронических неспецифических заболеваниях легких, и в частности при БА [1, 2]. На фоне активизации ПОЛ отмечается появление модифицированных липопротеинов, в основном ЛПНП [12], которые отличаются измененной аффинностью и могут плохо распознаваться рецепторами тканей и молекулами ферментов (например, липопротеинлипазой, эфиролестериновой гидролазой). Все это способствует снижению утилизации частиц и повышению их уровня в крови. Кроме того, снижение взаимодействия липопротеинлипазы с ЛПОНП приводит к снижению уровня ЛПВП<sub>2</sub> [9, 16].

Другим возможным объяснением биохимических изменений при БА может быть и такой фактор, как стресс, который является неспецифическим компонентом практически любого заболевания [10]. В этом случае липидный спектр может быть нарушен действием ансамбля гормонов, характерных для реакции стресса, тем более что основным источником для синтеза глюкокортикоидных гормонов (главный компонент гормонального ансамбля) является ХЛ. В такой ситуации собственного ХС надпочечников может быть недостаточно, что способствует повышению доставки ХС в надпочечники с ЛПНП [3], что ведет к повышению уровня ХС в ЛПНП. Происходящие одновременно с этим изменения (нарастание уровня ЛПВП<sub>3</sub> и ХС в них, снижение содержания ЛПВП<sub>2</sub>) могут быть вторичными.

Однако некоторые факты с позиции гипотезы первичного увеличения содержания общих липидов и ХС в ЛПНП трудно объяснить. При почти одинаковом количестве общих липидов в ЛПНП и ЛПВП<sub>3</sub> у доноров и больных при БА имеет место в основном нарастание содержания ЭХС не только в ЛПНП, но и в ЛПВП<sub>3</sub>, тогда как содержание общих липидов в ЛПВП<sub>2</sub> снижено. Кроме того, признав наличие только первичного увеличения фракции ЛПНП как ведущего звена липидных изменений, можно было бы ожидать нарастания риска развития атеросклероза у больных с хроническими неспецифическими заболеваниями легких, и в частности БА. Однако имеются работы, допускающие наличие снижения риска атеросклероза у данной группы больных. Проведенный нами расчет холестерина коэффициента:  $\frac{\text{Общий ХС} - \text{ХС ЛПВП}}{\text{ХС ЛПВП}}$  [5] по каждому

Таблица 3

Липидный состав ЛПВП<sub>3</sub> (в мг/дл)

Показатели	Контроль	Больные БА
Общие липиды	209,5±7,2	224,9±7,5
ТАГ	25,3±1,0	19,4±1,2
ХЛ	20,1±1,3	24,1±1,4
ЭХЛ	33,3±2,1	47,0±3,0
Суммарный ХЛ	53,4±2,2	71,1±3,5
ФЛ	130,8±5,1	134,4±4,9
лизолецитин	4,0±0,6	8,0±0,9
сфингомиелин	30,8±1,6	30,2±1,8
лецитин	78,9±3,2	80,7±3,1
фосфатидилэтаноламин	10,1±0,4	10,8±0,6
фосфатидная кислота	7,0±0,5	4,7±0,9
Лецитин/лизолецитин	19,7	10,1
Лецитин/сфингомиелин	2,6	2,7
Лецитин/ХЛ	3,9	3,4

больному показал отсутствие достоверных различий у них по сравнению с донорами (см. табл. 1). И хотя содержание суммарного ХС ЛПНП было достоверно выше у больных, количество его было достоверно более высоким и в ЛПВП<sub>3</sub>, что указывало на одинаковую нагрузку ХС атерогенных и антиатерогенных липопротеинов у больных и доноров.

Преимущественное увеличение содержания ЭХС в ЛПВП<sub>3</sub> позволяет предположить, что изменения именно в этой фракции могут быть первичными. Возможно, что при БА происходит усиление активности ЛХАТ и эфиролестеринпереносящих белков (ЭХПБ), что приводит к нарастанию уровня ЭХС во фракции ЛПНП за счет усилен-

ного переноса их из ЛПВП<sub>3</sub> [11, 15]. В этом случае ЭХС (в результате ЛХАТ-реакции), необходимые для формирования ЛПВП<sub>2</sub>, сбрасываются ЭХПБ на ЛПНП. Возможно, что при БА, с одной стороны, увеличивается снятие ХС со стенок кровеносных сосудов и тканей (увеличение роли ЛПВП<sub>3</sub>), а с другой стороны, усиливается шунт ХС на ЛПНП (как на заведомо атерогенную фракцию), в значительной степени минуя ЛПВП<sub>2</sub> как фракцию, выводящую ХС из цикла кровь—ткань (в печень). Это приводит к тому, что ХС в больших, чем обычно, количествах находится в цикле кровь—ткань и любое смещение в этой системе может как повысить, так и понизить риск атеросклероза, дав преимущество атерогенной или антиатерогенной фракции, тем более что в литературе существуют противоположные точки зрения на роль хронических неспецифических заболеваний легких в развитии атеросклероза.

Таким образом, при патогенезе БА происходят существенные изменения состава липидов липопротеинов сыворотки крови. Они выражаются в нарушении спектра структурных липидов, особенно за счет снижения содержания лецитина в ЛПНП и ЛПВП<sub>2</sub>, фосфатидной кислоты в ЛПНП и ЛПВП (обеих фракций), которые являются основными составляющими сурфактантной системы дыхательных путей и фосфатидилэтаноламина. При этом изменяется соотношение всех мембранных компонентов (лецитина к лизолецитину, лецитина к сфингомиелину и ХС) и возрастает концентрация лизолецитина. Кроме того, нарушаются и обмен ХС, перераспределение ЭХС между различными липопротеинами, что приводит к возрастанию содержания суммарного ХС в ЛПНП и ЛПВП<sub>3</sub>, однако показатель холестерина коэффициента остается при этом в тех же пределах, что и у доноров.

Причинами нарушений могут быть функциональные и дистрофические изменения в паренхиматозных клетках печени, продуцирующих ЛПВП, ЛХАТ, ЭХПБ, апо-В, изменение нейрогуморальной регуляции обмена липидов в липопротеинах, особенно в стрессовой ситуации, а также усиление липолитических процессов в выстилающих тканях легких в связи с активацией фосфолипазы А.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Аматуни В. Г., Каранзин К. Т., Сафарян М. Д. // Тер. арх.— 1980.— № 3.— С. 96—100.
- Варшквичене З. З., Шаткаускас Б. А., Черняускене Р. Ч. // НИИ физиологии и патологии сердечно-сосудистой системы.— Каунас, 1988.— С. 38—41.
- Голиков П. П. Рецепторные механизмы глюкокортикоидного эффекта.— М., 1988.
- Демидов О. А., Демидова Е. А., Лаврентьева А. А. // Механизмы адаптации организма и профилактика преобладающей заболеваемости в зоне строительства БАМ.— Чита, 1984.— С. 40—42.
- Климов А. П. Биохимия липидов и их роль в обмене веществ.— М., 1981.
- Колб В. Г., Камышкин В. С. // Лаб. дело.— 1984.— № 9.— С. 537—540.
- Петровский В. И., Регоранд Т. И., Лизенко Е. И. // Там же.— 1989.— № 6.— С. 339—341.
- Регоранд Т. И., Лизенко Е. И., Петровский В. И., Сидоров В. С. // Там же.— 1990.— № 4.— С. 48—52.
- Творогова М. Г., Кантарфессян И. Г., Неговская А. В., Титов В. Н. // Там же.— 1982.— № 4.— С. 22—25.
- Тигранян Р. А. Стресс и его значение для организма.— М., 1988.
- Торховская Т. И., Халимов Э. М. // Вопр. мед. химии.— 1988.— № 1.— С. 2—12.
- Формазюк В. Е., Осис Ю. Г., Деев А. И. и др. // Биохимия.— 1983.— Т. 48, № 2.— С. 331—339.
- Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. // J. biol. Chem.— 1957.— Vol. 226.— P. 497—509.
- Lewis J. G., Miller G. J., Barstein M. et al. // J. Lipid Res.— 1982.— Vol. 23, N 8.— P. 1206—1223.
- Sparks D. L., Pritchard P. H. // Ibid.— 1989.— Vol. 30, N 10.— P. 1491—1498.
- Taskiran M. R. Horm. metab. Res. Suppl. Ser.— 1988.— N 19.— P. 53—57.

Поступила 18.02.92

#### LIPID COMPOSITION OF ATHEROGENIC AND ANTI-ATHEROGENIC LIPOPROTEINS FROM BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA

M. V. Lizenko, V. I. Petrowsky, T. V. Kolenko, T. I. Regerand  
Medical Faculty, State University, Petrozavodsk

Complete lipid composition was estimated in both atherogenic lipoproteins of low density (LDL) and in antiatherogenic lipoproteins of high density HDL<sub>2</sub> and HDL<sub>3</sub> subfractions isolated from blood serum of 25 healthy volunteers and of 40 patients with bronchial asthma; ultracentrifugation, thin-layer chromatography and spectrophotometry were used in experiments. Development of bronchial asthma was accompanied by distinct impairments in the spectrum of structure containing lipids especially due to decrease in content of lecithin in LDL and HDL<sub>2</sub>, of phosphatidic acid in LDL and in the HDL fractions; both these lipids are main constituents of the surfactant system in the respiratory tract. Besides, metabolism of cholesterol was also impaired, while cholesterol esters were redistributed between various lipoproteins, thus total cholesterol was increased in LDL and HDL<sub>3</sub>; however, cholesterol coefficient in the patients maintained within the same limits as compared with that of donors.

© Ю. Н. СИДЕЛЬНИКОВ, Г. Г. ОБУХОВА, 1994

УДК 616.61-002.151-07:616.153.466

Ю. Н. Сидельников, Г. Г. Обухова

#### НАРУШЕНИЕ БАЛАНСА АМИНОКИСЛОТ У БОЛЬНЫХ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКОЙ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ

Хабаровский медицинский институт

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) является наиболее распространенной природно-очаговой инфекцией на территории Российской Федерации. Известно, что для ГЛПС характерно нарушение всех видов обмена веществ, но наибольшее количество публикаций посвящено изучению азотистого обмена у больных с этим тяжелым заболеванием. Эти нарушения характеризуются гипо- и диспротеинемией, протеинурией, нарастанием в крови уровней мочевины, креатинина и других компонентов остаточного азота. Причины этих нарушений связывают с патологией почек, печени, распадом белков в организме больного [4, 5].

Одним из наиболее ранних нарушений азотистого обмена при гипо- и диспротеинемии является снижение интенсивности процессов дезаминирования, трансаминирования и биосинтеза аминокислот. Следствиями этих нарушений являются

гипераминоацидемия и экскреция аминокислот с мочой.

Имеется немало сообщений о нарушениях обмена аминокислот при инфекционных заболеваниях, при острой и хронической почечной недостаточности, обусловленной различными причинами [2, 6—8, 11]. Однако в доступной литературе мы не встретили сообщений об обмене аминокислот у больных ГЛПС. Интерес к изучению баланса аминокислот у этой группы больных обусловлен тем, что в клинической картине заболевания на первое место выходит патология почек, которая является модифицирующим фактором обмена тех веществ, уровень которых в организме зависит от фильтрации, секреции и реабсорбции в почках.

**Методика.** Обследовали 20 больных со среднетяжелым течением ГЛПС, в основном молодых мужчин в возрасте от 20 до 40 лет. В течение болезни выделяли 4 основных периода [4]: I — лихорадочный, II — ранней апирексии, III — ранней реконвалесценции, IV — поздней реконвалесценции. В работе использовали автоматический анализатор аминокислот ААА-881 фирмы «Ково» (Чехо-Словакия). Для стандартизации показателей взятие крови производили натощак в утренние часы. Все больные получали одинаковое питание (стол № 46) и лечение (дезинтоксикационная и анальгетическая терапия). Содержание аминокислот в крови и суточной моче определяли у 11 доноров (контрольная группа). Обследование больных и доноров проводили в течение одного сезона (ноябрь—декабрь). Содержание аминокислот в крови доноров составило (в мг/л): цис —  $8,92 \pm 2,48$ , орн —  $7,66 \pm 1,67$ , лиз —  $5,61 \pm 0,89$ , гис —  $13,9 \pm 2,89$ , асп —  $5,7 \pm 1,15$ , арг —  $11,95 \pm 3,47$ , сер —  $6,06 \pm 1,49$ , гли —  $8,99 \pm 2,3$ , глу —  $4,66 \pm 1,27$ , тре —  $7,06 \pm 1,15$ , ала —  $11,59 \pm 2,96$ , тир —  $4,93 \pm 0,83$ , мет —  $2,51 \pm 0,13$ , вал —  $1,44 \pm 0,42$ , фен —  $3,24 \pm 0,80$ , лей —  $2,88 \pm 0,54$ . Экскреция аминокислот с мочой у доноров была равна (в мг/сут): цис —  $7,68 \pm 0,86$ , орн —  $3,89 \pm 0,72$ , лиз —  $7,37 \pm 1,36$ , гис —  $18,51 \pm 2,53$ , арг —  $7,59 \pm 0,99$ , сер —  $5,86 \pm 0,47$ , гли —  $11,94 \pm 1,48$ , глу —  $9,48 \pm 1,19$ , тре —  $14,35 \pm 2,48$ , ала —  $11,16 \pm 1,53$ , тир —  $3,62 \pm 0,72$ , мет —  $1,61 \pm 0,25$ , вал —  $0,81 \pm 0,15$ , лей —  $2,17 \pm 0,46$ .

Спектр аминокислот определен техническими возможностями анализатора. Как в контрольной группе, так и у больных после обработки мочи по предлагаемой фирмой-изготовителем методике в ней не определялись фенилаланин и аспарагиновая кислота.

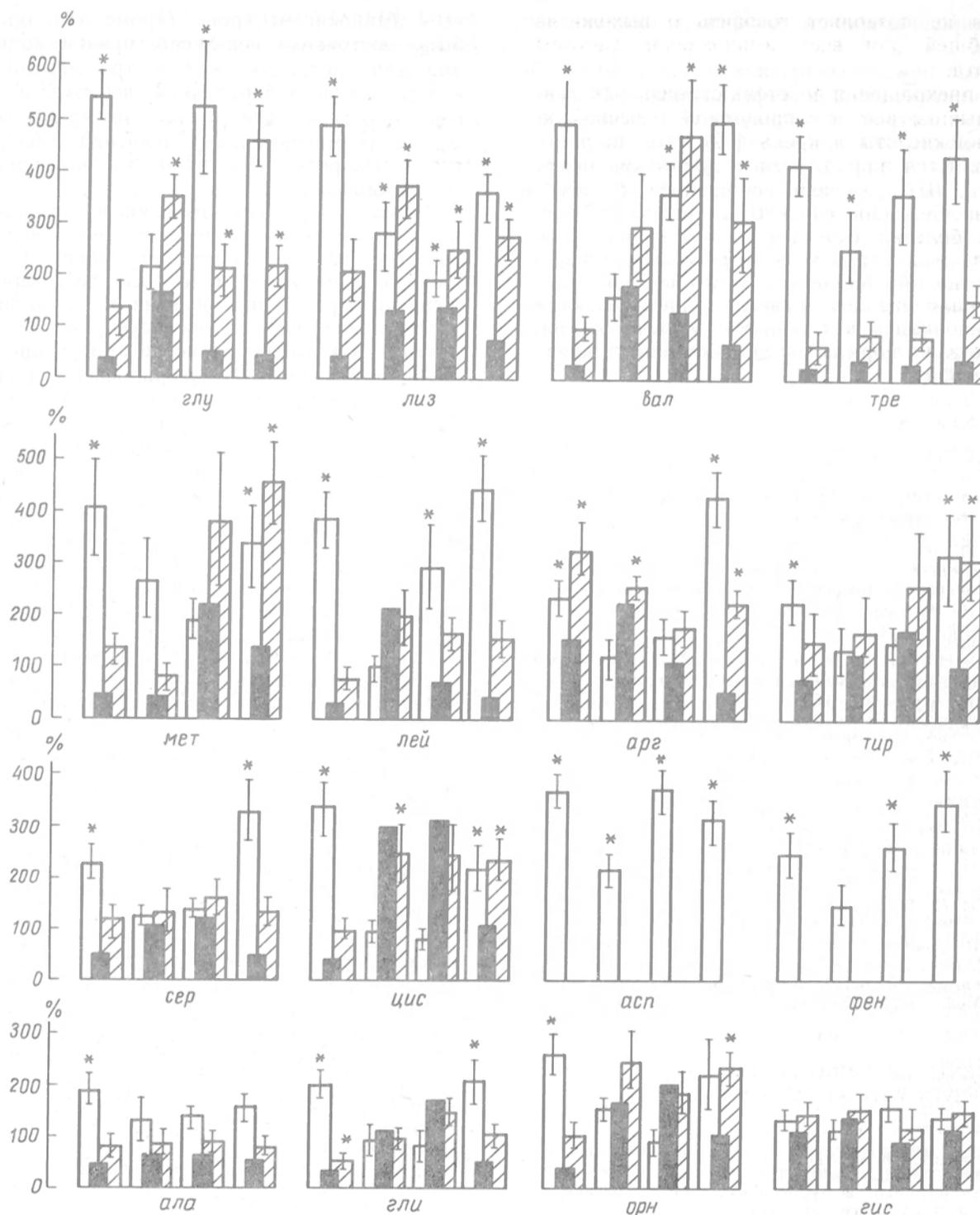
**Результаты и обсуждение.** Как видно из рисунка, динамика большинства аминокислот крови в разгаре болезни (I и II периоды) была одинаковой: достоверная значительная гипераминоацидемия в лихорадочном периоде сменялась снижением уровня аминокислот до показателей контрольной группы в периоде ранней апирексии, кроме асп, лиз и тре, содержание которых в сыворотке было больше, чем в контроле. В периоде ранней реконвалесценции концентрация в крови глу, асп, лей, вал, тре, фен опять повышалась, уровень остальных аминокислот оставался на прежних цифрах. В периоде поздней реконвалесценции содержание почти

всех аминокислот крови (кроме ала, орн, гис) было достоверно повышено, причем концентрации гли, асп, глу, вал и тре приближались к таковым в лихорадочном периоде, а уровни сер, тир, лей, фен и арг за время болезни достигали максимальных значений. Содержание гис в сыворотке не нарушалось на всем протяжении болезни.

Экскреция разных аминокислот с мочой не была одинаковой. Выделение аминокислот лей, тре, гис, ала и сер не нарушалось. Содержание гли в суточной моче было достоверно снижено в первые дни болезни с нормализацией этого показателя в последующем. Выделение других аминокислот зависело от функционального состояния почек. В лихорадочном периоде при сохраненной фильтрации и обратном транспорте была увеличена в 3 раза экскреция арг, отмечена тенденция к усиленному выделению аминокислот лиз, глу и тир. В состоянии апирексии на фоне олигурии значительно — в 3,5 раза — увеличено содержание в суточной моче лиз и глу, в 2,5 раза — цис, сохранялась повышенная экскреция арг, отмечена тенденция к усиленному выделению вал и орн. В периоде ранней реконвалесценции на фоне полиурии возрастало выведение мет, тир, вал, уменьшалось (хотя и оставалось достоверно выше контроля) содержание в суточной моче лиз и глу, имела тенденцию к нормализации экскреция арг, орн и цис. Несмотря на восстановление функций почек в периоде поздней реконвалесценции, продолжали усиленно выделяться из организма аминокислоты лиз, вал, арг, глу и цис (их уровни были повышены и в предшествующие периоды), увеличивалась экскреция мет, орн и тир, концентрация которых ранее достоверно не отличалась от показателей в контрольной группе.

Клиренс большинства аминокислот в лихорадочном периоде снижался (кроме арг — он имел тенденцию к повышению и гис — он не менялся). В периоде ранней апирексии наблюдалась выраженная обратная зависимость между клиренсом и содержанием аминокислот в крови и прямой между клиренсом и суточным выделением аминокислот с мочой. Незначительные изменения клиренса не сопровождалось серьезными нарушениями содержания таких аминокислот в крови и моче, как тир, сер, ала, гли, гис. В периоде ранней реконвалесценции на фоне полиурии наблюдались три тенденции выделения аминокислот: клиренс был в пределах нормы — арг, сер, ала, гис (что не сопровождалось достоверным нарушением экскреции и содержания аминокислот в крови); клиренс снижался — глу, тре, лей (что способствовало гипераминоацидемии); клиренс был повышен — вал, мет, тир, цис, гли и орн (что сопровождалось тенденцией к гипераминоацидурии). В периоде поздней реконвалесценции клиренс таких аминокислот как цис, тир, орн, нормализовался, оставался низким — у глу, тре, лей, ала или снижался ниже контроля — у лиз, вал, арг, сер, гли.

Таким образом, результаты наших исследований свидетельствуют о нарушениях баланса свободных аминокислот у больных ГЛПС. Эти нарушения обусловлены комплексом причин. Моби-



Динамика аминокислотемии (светлые столбики), аминокислотурии (штрихованные) и клиренса аминокислот (темные) у больных ГЛПС в течение болезни (I—IV периоды) в процентах от контроля (100 %); звездочка —  $p < 0,05$ .

лизация компенсаторных механизмов в начале болезни сопровождается повышением уровня аминокислот в крови, при этом аминокислоты и жиры становятся предпочтительно окисляемыми субстратами для покрытия увеличенных энергетических затрат [13]. Важнейшую роль в мобилизации белка периферических тканей, особенно мышц, с поступлением в кровь аминокислот играют глюкокортикостероиды и катехоламины [10], уровень которых у больных ГЛПС значительно повышен [1, 9].

В разгаре ГЛПС и в периоде ранней реконвалесценции в клинической картине заболевания на первом месте находятся нарушения функции почек. Известно, что обратный транспорт аминокислот в проксимальных канальцах протекает с поглощением кислорода и блокируется соединениями, подавляющими окислительное фосфорилирование [3]. Гистологическая гипоксия тканей у больных ГЛПС [9], очевидно, является одной из причин нарушения реабсорбции отдельных аминокислот, так как дизамино-

ацидурия не позволяет говорить о выходе из строя общей для всех аминокислот системы транспорта.

После прекращения действия стрессорных факторов, мышцы все еще продолжают высвобождать аминокислоты в кровь [12], что, по-видимому, является причиной гипераминоацидемии у больных ГЛПС в периоде поздней реконвалесценции. Снижение клиренса аминокислот в первые дни болезни (когда почки еще не вышли из строя) и в периоде поздней реконвалесценции (когда большинство почечных функций уже нормализовалось) позволяет рассматривать гипераминоацидемию как полезную реакцию, направленную на нормализацию нарушенных функций организма.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Быстровский В. Ф. // Клини. мед.— 1990.— № 7.— С. 86—88.
2. Денисов С. И., Савина М. И., Кутафина Е. К., Кушелев А. Р. // Педиатрия.— 1989.— № 7.— С. 112.
3. Игнатова М. С., Вельтищев Ю. Е. Детская нефрология.— Л., 1989.
4. Ковальский Г. С. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом: Вопросы патогенеза, клиники, диагностики и лечения: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.— Свердловск, 1970.
5. Константинов А. А. Биохимические изменения и иммунохимические сдвиги в организме при геморрагической лихорадке с почечным синдромом: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.— Л., 1963.
6. Печипоренко Н. А., Печедов Л. И., Климович И. И. // Урол. и нефрол.— 1990.— № 5.— С. 17—20.
7. Попов Д. Т. // Педиатрия.— 1976.— № 4.— С. 31—33.
8. Резник С. Р. // Журн. микробиол.— 1980.— № 10.— С. 10—13.
9. Сидельников Ю. И., Анисимова И. И. // Тер. арх.— 1991.— № 11.— С. 68—70.
10. Теппермен Дж., Теппермен Х. Физиология обмена веществ и эндокринной системы: Пер. с англ.— М., 1989.
11. Терехов Н. Т., Левченко И. В., Липкан Г. И. // Врач. дело.— 1982.— № 11.— С. 12—16.
12. Felig P., Saudek C. // Amer. J. Med.— 1976.— Vol. 60.— P. 117.
13. Giovanni J., Chiarta C., Boldrini G. et al. // Crit. Care Med.— 1988.— Vol. 16, N 7.— P. 667—670.

Поступила 08.04.93

#### IMPAIRMENTS OF AMINO ACID BALANCE IN HEMORRHAGIC FEVER WITH RENAL SYNDROME.

Yu. N. Sidelnikov, G. G. Obukhova

Medical Institute, Khabarovsk

Changes in amino acids in blood, daily urine as well as amino acid clearance were studied in 20 patients with moderate hemorrhagic fever and renal syndrome. The amino acid balance was impaired and the degree of impairment depended on the type of an amino acid and the duration of a disease. Dysaminoacidemia at the peak of the disease is associated with excretion and reverse transport of some amino acids. It is suggested that hyperaminoacidemia of early and late periods of the disease is compensatory.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616-008.93:577.164.16]-008.64-07:616.153.1:577.152.143]-092.9

Н. Н. Гесслер, Н. В. Алексеева, В. Я. Быховский

#### ИЗМЕНЕНИЕ ОБМЕНА ТРИПТАМИНА ПРИ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ВИТАМИНА В<sub>12</sub>

Институт биохимии им. А. И. Баха Российской АН, Москва

Недостаточность витамина В<sub>12</sub> в организме может возникать при исключении из рациона продуктов животного происхождения (вегетарианство), при нарушении всасывания кобаламинов вследствие заболеваний желудочно-кишечного тракта различной этиологии, а также генетических, сопровождающихся нарушением метаболизма кобаламинов [2].

Нередко при недостаточности витамина В<sub>12</sub> отмечают развитие таких патологических процессов в центральной нервной системе (ЦНС), как невралгия, повышенная утомляемость, ослабление умственной деятельности и снижение работоспособности, связанное с возрастными изменениями [7]. Многие из перечисленных симптомов могут развиваться на фоне субнормального уровня кобаламинов, в то время как нарушений функций кроветворения еще не наблюдается. Так, авторы [12] обследовали 300 пациентов с содержанием кобаламинов в сыворотке крови ниже нормы. В 28 % случаев отмечены нейропсихические нарушения даже при отсутствии анемии и/или макроцитоза. Другими авторами [11] было показано, что старческое слабоумие в 4—5 раз чаще наблюдается у больных с пониженным содержанием кобаламинов в крови. Была также отмечена корреляция между уровнем кобаламинов в сыворотке крови и активностью моноаминоксидазы (МАО) в тромбоцитах.

МАО ответственна за катаболизм аминов, в том числе биогенных аминов — нейромедиаторов. В настоящее время не вызывает сомнений определенная роль нарушений активности МАО и как следствие этого изменений метаболизма нейромедиаторов в развитии таких патологических процессов, как болезнь Паркинсона, мигрень, депрессивные состояния, возрастные изменения мозга при старении [1, 5]. При этих нарушениях ЦНС отмечено изменение экскреции триптамина [10, 13], катаболизм которого также осуществляется МАО. На фоне введения ингибиторов МАО наблюдалось увеличение экскреции триптамина [4] и повышение его уровня в мозге [13] и в печени [10].

Мы исследовали экскрецию триптамина до нагрузки триптофаном (его предшественником) и после нее при недостаточности витамина В<sub>12</sub> для выявления возможного изменения метаболизма биогенных аминов на уровне целого организма.

Методика. Работа проводилась на крысах линии Вистар. Для создания авитаминоза В<sub>12</sub> животных содержали на горохово-крупяной диете без добавления продуктов животного происхождения с момента отъема от матерей. Контрольные животные получали витамин В<sub>12</sub> с водой (1 мг/л). Сбор суточной мочи проводили в специальных клетках, помещая по 3 крысы в каждую.

**Суточная экскреция триптамина и метилмалоновой кислоты в норме и при недостаточности витамина В<sub>12</sub> у крыс**

Группа животных	Суточная экскреция триптамина, мкг на 1 кг массы животного		Суточная экскреция метилмалоновой кислоты, мг на 1 мг креатинина
	до нагрузки триптофаном	после нагрузки триптофаном	
<b>Возраст 2,5—3 мес</b>			
Контроль (n=9)	3,5±0,5	41,0±3,0	0,9±0,35
Авитаминоз В <sub>12</sub> (n=24)	3,8±0,6	21,0±6,7	6,2±2,1
		p<0,01	p<0,5
<b>Возраст 5—6 мес</b>			
Контроль (n=9)	3,7±0,47	11,1±3,1	0,7±0,28
Авитаминоз В <sub>12</sub> (n=9)	5,7±1,9	6,7±1,2	5,1±0,8
	p>0,5	p>0,5	p<0,01
Выход из авитаминоза В <sub>12</sub> (n=6)	5,0±1,4	10,0±4,0	2,5±0,3
	p>0,5	p>0,5	p<0,01 по сравнению с контролем
			p<0,05 по сравнению с авитаминозом В <sub>12</sub>

О развитии авитаминоза В<sub>12</sub> судили по экскреции метилмалоновой кислоты, содержание которой определяли колориметрически [9] и выражали в миллиграммах на 1 мг креатинина. Креатинин определяли пикратным методом [9].

Изменение метаболизма триптамина оценивали по схеме, предложенной В. И. Кулинским [3], по изменению экскреции триптамина в ответ на введение триптофана. Триптофан вводили перорально в дозе 10 мг на 100 г массы животного. Триптамин определяли флуориметрически в суточной моче нонгармановым методом до и после нагрузки триптофаном [4].

Результаты и обсуждение. Содержание крыс на горохово-крупяной диете без дополнительного внесения витамина В<sub>12</sub> приводило к увеличению экскреции метилмалоновой кислоты в 6—7 раз по сравнению с таковой в контроле, что свидетельствовало о развитии у них авитаминоза В<sub>12</sub>.

Результаты определения суточной экскреции триптамина представлены в таблице. Как видно из представленных данных, у крыс в возрасте 2,5—3 мес недостаточность витамина В<sub>12</sub> практически не влияла на уровень фоновой экскреции триптамина, однако при нагрузке триптофаном возрастание суточной экскреции было в 2 раза ниже, чем в контроле. У крыс более старшего возраста (5—6 мес) наряду с уменьшением прироста экскреции триптамина в ответ на введение триптофана отмечена тенденция к увеличению фоновой экскреции триптамина. Выход из состояния авитаминоза В<sub>12</sub> сопровождался уменьшением содержания метилмалоновой кислоты в моче, нормализацией ответа организма на введение триптофана, в то время как фоновая экскреция триптамина оставалась увеличенной.

Уровень триптамина в организме определяется активностью триптофандекарбоксилазы, катализирующей его синтез, и активностью MAO, обеспечивающей дальнейший его метаболизм. Фоновая экскреция триптамина определяется активностью обеих ферментных систем, тогда как реакция организма на нагрузку триптофаном характеризует главным образом состояние процессов биосинтеза [4]. В соответствии со схемой, предложенной В. И. Кулинским [3], полученные результаты можно интерпретировать следующим образом: так как уровень фоновой

экскреции триптамина у животных с авитаминозом В<sub>12</sub> нормальный или повышенный (см. таблицу), а прирост экскреции триптамина в ответ на введение триптофана ниже, чем у контрольных животных, то следует предположить снижение интенсивности биосинтеза триптамина при уменьшении активности ферментов катаболизма, т. е. MAO.

Как видно из данных, приведенных в таблице, при выходе из состояния авитаминоза В<sub>12</sub> в первую очередь нормализуется ответная реакция на введение триптофана, т. е. биосинтез триптамина, тогда как активность MAO остается сниженной (фоновая экскреция выше нормы).

В настоящее время установлено наличие двух форм MAO: А и Б, отличающихся субстратной специфичностью, чувствительностью к ингибиторам и распределением по тканям и органам [1]. Регуляция синтеза этих форм также различна, так как они кодируются разными генами [6]. Ранее было показано, что при дефиците витамина В<sub>12</sub> наблюдается увеличение активности тромбозитарной MAO [11], представленной в основном Б-формой [5]. Метаболизм триптамина осуществляется в основном А-формой [8], поэтому полученные нами данные об изменении этого метаболизма косвенно свидетельствуют о снижении активности MAO А-формы при недостаточности витамина В<sub>12</sub>. Различная направленность изменения активности А- и Б-форм MAO при авитаминозе В<sub>12</sub> может быть связана с различием их функций в организме.

Таким образом, недостаточность витамина В<sub>12</sub> в организме сопровождается изменением активности обеих форм MAO и нарушением метаболизма триптамина. Как отмечено выше, изменение экскреции триптамина наблюдается при ряде заболеваний ЦНС, в развитии которых определенную роль играет изменение активности MAO [5, 10]. Возможно, развитие нейропсихических заболеваний при недостаточности витамина В<sub>12</sub> связано с изменением метаболизма нейромедиаторов, являющихся по своей природе биогенными аминами.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Бурчинский С. Г., Кузнецова С. М. // Вопр. мед. химии.— 1988.— № 4.— С. 2—9.
2. Канопкайте С. И., Рачкус Ю. А. Биохимические и медицинские аспекты кобаламинов (витаминов группы В<sub>12</sub>).— Вильнюс, 1991.
3. Кулинский В. И. // Лаб. дело.— 1979.— № 11.— С. 676—679.
4. Кулинский В. И., Кононова Л. И., Саворенко И. С. // Вопр. мед. химии.— 1979.— № 4.— С. 387—392.
5. Москвитина Т. А. // Вестн. АМН.— 1991.— № 10.— С. 33—36.
6. Bach A. W., Lan N. C., Johnson D. L. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1988.— Vol. 85, N 13.— P. 4934—4938.
7. Lindenbaum J., Heaton E. B., Savage D. G. et al. // New Engl. J. Med.— 1988.— Vol. 318, N 26.— P. 1720—1728.
8. Neff N. H., Jang H.-Y., Goridis C., Bialek D. // Advanc. Biochem. Psychopharmacol.— 1974.— Vol. 11.— P. 51—58.
9. Oace S. M., Abbott J. M. // J. Nutr.— 1992.— Vol. 102, N 1.— P. 17—26.
10. Philips S. R., Durden D. A., Boulton A. A. // Canad. J. Biochem.— 1974.— Vol. 52, N 6.— P. 447—451.
11. Regland B., Gottfries C., Oreland L. // Europ. Arch. Psychiat. clin. Neurosci.— 1991.— Vol. 240, N 4—5.— P. 288—290.

12. *Stabler S. P., Allen R. H., Savage D. G., Lindenbaum Y.* // *Blood.*— 1990.— Vol. 76, N 5.— P. 871—881.  
 13. *Tabakoff B., Moses F., Philips S. R., Boulton A. A.* // *Experientia (Basel).*— 1977.— Vol. 33, № 3.— P. 380—381.

Поступила 16.03.93

## CHANGES IN TRYPTAMINE METABOLISM IN VITAMIN B<sub>12</sub> DEFICIENCY

*N. N. Gessler, N. V. Alexeeva, V. Ya. Bykhovskiy*

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow.

The metabolism of tryptamine was studied in rats in health and in vitamin B<sub>12</sub> deficiency. Excretion of cobalamine with urine before and after loading with tryptamine was studied. Daily excretion of tryptamine with urine in vitamin B<sub>12</sub>-deficient animals was normal or slightly increased. At the same time, the increase in tryptamine excretion with urine in response to tryptophan administration was 2-fold lower in vitamin B<sub>12</sub>-deficient rats as compared with controls. These data may be interpreted to occur due to a decrease in the rate of tryptamine metabolism in vitamin B<sub>12</sub> deficiency in rats. Impairments in metabolism of biogenic amines appear to be involved in the development of neurological diseases accompanied by vitamin B<sub>12</sub> deficiency.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616.831-008.939.6 + 616.831-008.939.15]-02:612.015.349]-092.9-07

*Г. А. Грибанов, Е. Б. Бурлакова, Г. В. Архипова, Д. В. Ильяшенко*

## ЛИПИДЫ СИНАПТИЧЕСКИХ МЕМБРАН ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ АУТОЛИЗЕ

Тверской университет, Институт химической физики им. Н. И. Семенова РАН, Москва

Известно, что липиды мозга проявляют различную степень устойчивости к аутолизу в зависимости от состояния организма. Так, в ранних работах отмечена сравнительно высокая устойчивость липидного компонента головного мозга в ходе длительного аутолиза [16]. Тем не менее в отдельных работах по изучению липидного состава мозговой ткани и ее некоторых ультраструктур на ранних стадиях ишемии, в ходе клинической смерти, а также при ряде патологических состояний наблюдалась значительная лабильность отдельных липидных компонентов, главным образом фосфолипидов (ФЛ) и неэстерифицированных жирных кислот [7, 9, 12, 14, 18]. Одновременно происходило изменение физико-химических параметров липидов: вязкости, окисляемости и др. [1, 10, 13].

Вместе с тем следует отметить, что в этих и других работах использовали различные модели экспериментов и изучали лишь разные по длительности (ранние и поздние) сроки аутолитических процессов. Более того, как правило, исследовали недостаточно полный состав липидов и изучение вели в основном на уровне целого мозга.

В связи с вышесказанным представляет определенный теоретический и практический интерес изучение посмертных процессов в различные сроки инкубации (1, 24 ч) в мембранных структурах мозга. Это связано и с установленной недавно важной ролью липидов синаптических

мембран в передаче и хранении информации на основе способности жидкокристаллической структуры липидов мембран нейронов переходить в процессе получения информации в новые мезофазные состояния [1]. Выбор указанных сроков аутолиза был обусловлен также попыткой подойти к изучению на уровне биомембран мозга сложных пограничных состояний организма и найти сходные и различные черты в изменении состава липидов синаптических мембран в ранние (1 ч) и более поздние (24 ч) сроки инкубации, когда происходит достаточно сильное разрушение синаптических структур.

**Методика.** В работе использовали безлинейных белых крыс-самцов массой 150—200 г, содержащихся на стандартном рационе. Умерщвление животных, гомогенизацию тканей мозга и выделение синапсов проводили по методике Е. Де Робертиса в модификации Р. И. Глсбова и Г. Н. Крыжановского [2, 15]. Для выделения достаточного количества синаптических мембран использовали головной мозг (без мозжечка) 6 крыс. Полученные суспензии синаптических мембран инкубировали в термостате при 37 °С в течение 1 и 24 ч в среде выделения (0,32 М сахароза, 0,05 М трис-НСl-буфер, 0,001 М ЭДТА рН 7,4). Определение содержания общего белка проводили по методу Лоури [17]. Фракционирование общих липидов и ФЛ осуществляли методами одномерной микротонкослойной хроматографии на силикагеле с последующим анализом количественного состава отдельных липидных фракций, описанными ранее [3, 5, 13]. Результаты обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента [8].

**Результаты и их обсуждение.** Исходное содержание общих липидов в синаптических мембранах головного мозга крыс составило  $958,0 \pm 53,0$  мкг на 1 мл суспензии, общих фосфолипидов (Р лип.) —  $3,8 \pm 0,3$  мкг на 1 мл суспензии и общего белка —  $1725,0 \pm 100,0$  мкг на 1 мл суспензии. В течение 1 ч аутолиза отмечалась тенденция к снижению количества общих липидов (на 11%), общего белка (на 6%); достоверно снижалось содержание ФЛ (на 22% от исходных значений). К 24 ч наблюдалось дальнейшее значительное и достоверное уменьшение содержания общих липидов (на 40%), ФЛ (на 52%), а также общего белка (на 17% от исходных значений).

Таким образом, в ходе посмертного аутолиза в синаптических мембранах наибольшей деградации подвергались ФЛ и в меньшей степени — белковый компонент.

Результаты исследований липидного состава синаптических мембран головного мозга крыс при аутолизе представлены на рис. 1 и 2.

Как видно из рис. 1, через 1 ч инкубации относительное содержание ФЛ составило 70% от исходного уровня; одновременно с этим резко (в 3 раза и более) возрастала доля свободных жирных кислот (СЖК) и триацилглицеринов (ТГ). Вместе с тем отмечены противоположные по характеру изменения содержания холестерина (Х) и его эфиров (ЭХ). При этом относительное содержание свободного Х снижалось (с 31 до 23% от суммы фракций), а ЭХ — увеличивалось с 11 до 15%.

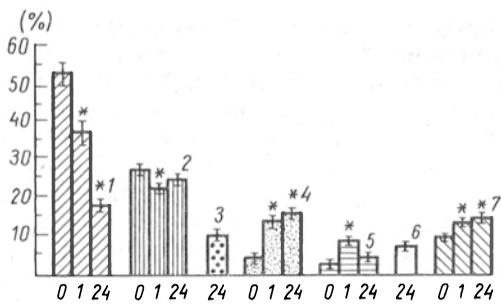


Рис. 1

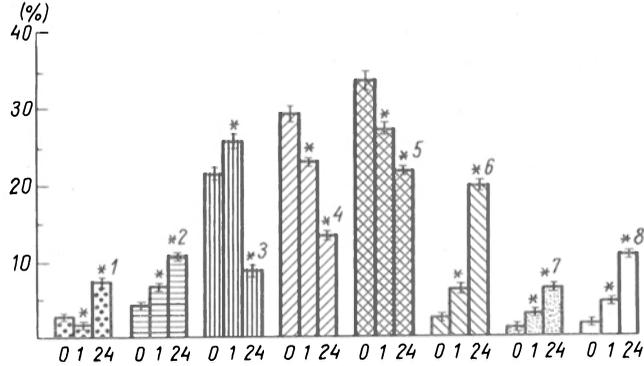


Рис. 2

Рис. 1. Изменение соотношения отдельных фракций липидов синаптических мембран головного мозга крыс при аутолизе.

Здесь и на рис. 2: по оси абсцисс — срок инкубации, ч; по оси ординат — % от суммы фракций.

1 — ЛФЛ; 2 — Х; 3 — ДГ; 4 — СЖК; 5 — ТГ; 6 — неидентифицированная фракция; 7 — ЭХ. Звездочка — достоверные различия с контролем (нулевые столбцы;  $p < 0,05$ ;  $n = 5-6$ ).

Рис. 2. Изменение соотношения отдельных фракций ФЛ синаптических мембран головного мозга крыс при аутолизе.

1 — ГЛФ; 2 — ЛФЛ; 3 — ФС+СФМ; 4 — ФХ; 5 — ФЭЛ; 6 — ФК+ПГФ; 7 — ФИ; 8 — неидентифицированная фракция. Звездочка — достоверные различия с контролем (нулевые столбцы;  $p < 0,05$ ;  $n = 5-6$ ).

Более длительная инкубация (24 ч) приводила к дальнейшему еще более резкому снижению относительного содержания ФЛ (до 35 % от исходных значений), количество же Х и ЭХ практически оставалось без изменений. Несколько уменьшалась концентрация ТГ, а доля СЖК продолжала медленно нарастать. Отмечено появление диацилглицеринов (ДГ) и неидентифицированной фракции.

Как показано на рис. 2, при инкубации суспензии синаптических мембран в среде выделения в течение 1 ч выявлялось незначительное, но достоверное увеличение содержания лизофосфолипидов (ЛФЛ), фосфатидилсеринов+сфингомиелинов (ФС+СФМ). Вместе с тем концентрация фосфатидилинозитов (ФИ) возрастала в 2 раза, а фосфатидных кислот+полиглицерофосфатидов (ФК+ПГФ) — более чем в 2 раза. Для фосфатидилэтаноламинов (ФЭА) и фосфатидилхолинов (ФХ), основных фосфолипидных компонентов синаптических мембран, характерным было снижение их количества (на 24—25 % для каждой фракции).

Дальнейшая инкубация синаптических структур в течение 24 ч сопровождалась резким (в 3 раза) уменьшением количества ФС+СФМ, а также ФХ, составивших немногим более 15 % от суммы фракций, тогда как относительное содержание ФЭА снижалось не столь существенно и составило около 70 % от исходного уровня. В то же

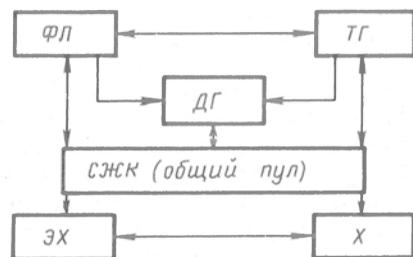
время отмечалось значительное (в 2 раза) возрастание продуктов гидролиза ФЛ (ЛФЛ и глицерофосфатов — ГЛФ) и особенно резкое — ФК+ПГФ (до 23 % от суммы фракций). Выявлено также нарастание содержания ФИ (до 6 % от суммы фракций).

Интересно отметить, что содержание Х, ЭХ, ТГ в синаптических мембранах изменяется главным образом через 1 ч аутолиза, а к 24 ч остается практически на том же уровне или возвращается к исходному. В отличие от нейтральных липидов для фосфолипидного компонента синаптических мембран отмечены наиболее существенные изменения через 24 ч инкубации. Это показывает, что в ранние сроки аутолиза деградация ФЛ выражена еще слабо, а к 24 ч наблюдаются их существенные перестройки. Вместе с тем, как следует из данных литературы [1, 2, 13], даже небольшие колебания фосфолипидного компонента мембран могут приводить к значительному изменению их заряда, а также других физико-химических свойств и как следствие функционально-регуляторных характеристик синаптических мембран в результате изменения в них липид-липидных и липид-белковых взаимодействий.

Следует отметить, что в синаптических мембранах головного мозга крыс как на различных сроках аутолиза, так и при старении [11] увеличивается содержание ЛФЛ, ФС и ФИ, а также значительно возрастает доля ФК. Эти данные свидетельствуют о возможном проявлении в ходе старения и при посмертном аутолизе некоторого сходства в механизмах деградации фосфолипидного компонента синаптических мембран головного мозга крыс.

Таким образом, липидный компонент синаптических мембран в процессе посмертного аутолиза *in vitro* проявляет значительную лабильность и изменяется неоднотипно в зависимости от этапов аутолиза, при этом часть липидных фракций претерпевает колебательные перестройки (Х, ТГ, ГЛФ, ФС+СФМ).

В настоящее время известна важная роль в деградации липидов как гидролитических механизмов их распада, так и ряда трансацилазных механизмов биотрансформации отдельных классов липидов при аутолизе [4, 5]. Анализ приведенных результатов позволяет представить следующую схему возможных метаболических взаимоотношений отдельных липидных фракций при аутолизе синаптических мембран:



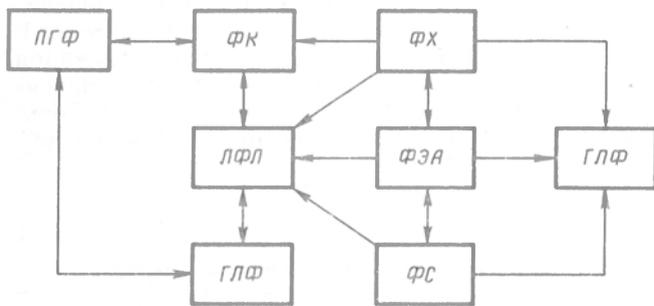
Однако на отдельных сроках аутолиза степень выраженности этих отношений различна.

Обращает на себя внимание факт накопления на ранних сроках ТГ. Это может быть связано с

рядом причин. Судя по данным литературы [4, 5], развивающееся при аутолизе кислородное голодание ультраструктур может способствовать снижению гидролиза ТГ и ДГ и увеличению их количества с измененным жирнокислотным составом. Не исключается также возможность возрастания содержания ТГ в результате реакций трансацилирования с участием ГЛФ, жирных кислот [5]. Гистохимический анализ четко подтверждает образование в деформирующейся нервной ткани гранул ТГ [6]. Однако на поздних сроках аутолиза (24 ч) отмечается снижение количества ТГ и накопление продуктов их распада — ДГ.

Выявленные изменения фосфолипидного компонента показывают, что уже в ранние сроки аутолиза в синаптических мембранах активизируются гидролазные механизмы распада ФЛ. Эти процессы сопровождаются повышением содержания продуктов деградации ФЛ — ЛФЛ, ГЛФ и СЖК. Очевидно, основной причиной здесь является возрастание в ходе аутолиза активности соответствующих эндогенных фосфолипаз типа А<sub>1</sub>—А<sub>2</sub>, С. В поздние сроки данные процессы протекают еще более выражено, особенно в отношении ФХ, ФС+СФМ и частично ФЭА. Вместе с тем отмеченное к 1-му часу аутолиза увеличение содержания ФС+СФМ и параллельное снижение количества ФЭА может быть связано с образованием реципрокной пары: ФС↔ФЭА. Наблюдаемое к 1-му часу инкубации снижение доли ГЛФ и повышение содержания ФК+ПГФ позволяет предположить возможность использования ГЛФ для реакций образования ФК и ПГФ [4]. Резкое повышение доли ФК+ПГФ на поздних сроках инкубации может свидетельствовать о вероятном повышении активности в синаптических мембранах в ходе аутолиза фосфолипазы D.

Это позволяет считать, что фосфолипидный компонент мембран синапсов головного мозга крыс в ходе их аутолиза может характеризоваться следующими взаимопревращениями:



В данной схеме не рассматриваются пути превращений СФМ и ФИ. Подробный анализ возможных метаболических взаимоотношений этих и других ФЛ в обычных условиях и в динамике аутолиза некоторых органов, тканей и их ультраструктур приведен в работах [4, 5].

Суммируя представленные данные, можно сделать вывод о том, что деградация липидов в аутолизирующихся синаптических мембранах головного мозга крыс имеет сложный характер, зависит от сроков аутолиза и происходит на основе не только гидролитических, но и трансаци-

лазных и иных механизмов биотрансформации липидного компонента.

С учетом того что изменения фосфолипидного состава синаптических структур играют важную роль в информационных процессах [1], такой экспериментальный подход в совокупности с биофизическими методами оценки фазово-структурного состояния биомембран может быть использован как один из возможных вариантов дальнейшего изучения механизмов хранения, извлечения и главным образом посмертной потери информации в результате активации аутолитических процессов, а также для понимания молекулярных механизмов развития смерти мозга.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бурлакова Е. Б. // Исследование памяти.— М., 1990.— С. 145—153.
2. Глебов Р. И., Крыжановский Г. П. Функциональная биохимия синапсов.— М., 1978.
3. Грибанов Г. А., Сергеев С. А. // Лаб. дело.— 1975.— № 6.— С. 652—655.
4. Грибанов Г. А. // Успехи соврем. биол.— 1979.— Т. 87.— № 1.— С. 16—32.
5. Грибанов Г. А. Исследования биохимических превращений липидов биологических структур при аутолизе: Дис. ... д-ра биол. наук.— Калинин, 1986.
6. Манина А. А. // Ультраструктура и цитохимия нервной системы.— М., 1978.— С. 104—107.
7. Неговский В. А., Гурвич А. М., Золотокрылина Е. С. // Постреанимационная болезнь.— М., 1987.— С. 155—159.
8. Плохинский Н. А. Алгоритмы биометрии.— М., 1980.
9. Путилина Ф. Е., Осадчая Л. М., Брагина Г. А. // Структура и энергетика нервной системы.— Л., 1986.— С. 149—155.
10. Семченко В. В., Полуэктов Л. В., Конвай В. Д. // Бюл. экпер. биол.— 1983.— № 7.— С. 12—14.
11. Старение мозга / Под ред. В. В. Фролькиса.— Л., 1991.— С. 65—66.
12. Таранова И. П. Липиды центральной нервной системы при повреждающих воздействиях.— Л., 1988.
13. Чернявская Л. И., Архипова Г. В., Бурлакова Е. Б. // Нейрохимия.— 1989.— Т. 8, № 2.— С. 249—257.
14. Bazan N. C., Rodriguerde Tured E. // Advanc. Neurol.— 1980.— Vol. 28.— P. 197—205.
15. De Robertis E. // Drug Receptor.— London, 1973.— P. 257—272.
16. Lindlar F. // Z. klin. Chem. Klin. Biochem.— 1967.— Bd 5, N 5.— S. 251—253.
17. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem.— 1951.— Vol. 193, N 1.— P. 265—275.
18. Webster G., Thompson R. // Nature.— 1965.— Vol. 498.— P. 74—75.

Поступила 18.02.93

#### LIPIDS OF RAT BRAIN SYNAPTIC MEMBRANES IN AUTOLYSIS.

G. A. Gribanov, E. B. Burlakova, G. V. Arkhipova, D. V. Ilyashenko

State University, Tver; N. N. Semenov Institute of Chemical Physics, Academy of Sciences of the Russian Federation, Moscow.

Content of total lipids, phospholipids and total protein was decreased in rat brain synaptic membranes during autolysis within 1 h and 24 hrs at 37° in the medium used for isolation of the membranes. Within early steps of autolysis (1 h), total lipids and phospholipids were only slightly altered, while a decrease in the concentrations of phosphatidyl cholines, phosphatidyl ethanolamines and cholesterol was found simultaneously increased in relation to the content of lysophospholipids, phosphatidyl serines+sphingomyelins, cholesterol esters, triacylglycerols and free fatty acids. Within later periods of autolysis (24 hrs) the further dissimilar decrease was observed in relative content of phosphatidyl cholines, phosphatidyl ethanolamines, phosphatidyl serines+sphingomyelins with synchronous increase in the level of glycerophosphates, lysophospholipids, phosphatidic acid+polyglycerophosphatides,

cholesterol esters; occurrence of diacylglycerols was detected. Possible mechanisms (involving hydrolase, transacylase reactions) of alterations observed in lipids from synaptic membranes during autolysis are discussed. Modern experimental technique appears to be useful in order to gain insight into molecular mechanisms of brain death and the postmortal loss of information.

© М. Т. ГЕНГИН, А. Н. ВЕРНИГОРА, 1994

УДК 616.432-008.931-02: [613.863 + 615.31:547.262-092.9-07

М. Т. Генгин, А. Н. Вернигора

## ВЛИЯНИЕ ЭМОЦИОНАЛЬНО-БОЛЕВОГО СТРЕССА И ЭТАНОЛА НА КАРБОКСИПЕПТИДАЗО-Н-ПОДОБНУЮ АКТИВНОСТЬ В ГИПОФИЗЕ И СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС

Пензенский педагогический институт им. В. Г. Белинского

Стресс и этанол активируют гипоталамо-гипофизарную систему [2, 7], что приводит к усилению биосинтеза и выброса в кровь стресс-пептидов гипофиза [1, 3, 5, 7, 13]. В процессинге адренокортикотропина и  $\beta$ -эндорфина в гипофизе участвуют карбоксипептидаза Н (КФ 3.4.17.10) [10], которая отщепляет остатки аргинина и лизина с С-конца пропептидов [4]. Известно, что карбоксипептидаза Н выделяется из секреторных везикул гипофиза вместе с биологически активными пептидами [12], но ее дальнейшая судьба неясна.

Мы исследовали карбоксипептидазо-Н-подобную активность при эмоционально-болевоом стрессе и действии этанола в гипофизе и сыворотке крови.

Методика. Опыты проводили на самцах белых беспородных крыс массой 250—300 г. В работе использовали 10 групп животных: 1-я — интактные; крыс 2, 3, 4, 5 и 6-й групп подвергали в течение 2 ч через каждые 10 с в беспорядочном режиме воздействию одного из трех факторов длительностью 1 с: вспышки света, звука силой 100 дБ, электрокожного раздражения пороговой силы (однократный эмоционально-болевоый стресс). Животных забивали непосредственно перед воздействием и через 6, 18, 36 и 72 ч после его окончания соответственно. Крыс 7-й группы в течение 30 сут 1 раз в сутки подвергали воздействию однократного эмоционально-

болевого стресса (хронический эмоционально-болевоый стресс). Животным 8-й и 9-й групп вводили внутривенно 20 % раствор этанола, приготовленный на физиологическом растворе, в дозе 4 г на 1 кг массы тела. Крыс 8-й группы забивали через 6 ч после введения этанола, крыс 9-й — через 18 ч. Крысам 10-й группы в течение 30 сут в качестве единственного источника жидкости давали 15 % раствор этанола (хроническое потребление этанола).

Животных декапитировали, иссекали гипофиз и собирали кровь. Кровь выдерживали 30 мин при 37 °С, затем центрифугировали 10 мин при 1000 g и использовали в опыте. Гипофиз гомогенизировали в 50 мМ натрийацетатном буфере рН 5,6 (1:2000).

Карбоксипептидазо-Н-подобную активность в гипофизе и сыворотке определяли по методу Fricker и Snyder [9] по освобождению дансил — фен — лей из дансил — фен — лей — арг при рН 5,6 как  $\text{Co}^{2+}$ -активируемую активность. Содержание белка определяли по Лоури [11]. Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием *t*-критерия Стьюдента [6].

Результаты и обсуждение. Однократный эмоционально-болевоый стресс вызывал длительное повышение карбоксипептидазо-Н-подобной активности и в гипофизе, и в сыворотке животных (табл. 1), что хорошо коррелирует с данными литературы о длительных изменениях содержания стресс-пептидов в гипофизе и сыворотке после воздействия стресса [5]. Однако в гипофизе повышение активности достигало почти максимальной величины непосредственно после окончания стрессового воздействия и сохранялось примерно на одном уровне в течение 18 ч, а затем медленно снижалось до нормы. В сыворотке же в первые 6 ч после окончания воздействия повышение ферментативной активности было незначительным и достигало максимальной величины только через 18—36 ч после окончания воздействия, затем активность фермента снижалась до нормы.

По-видимому, такой характер изменения карбоксипептидазо-Н-подобной активности в гипофизе и сыворотке крыс связан с особенностями ее участия в функционировании стресс-пептидов в гипофизе и крови. Если в гипофизе карбоксипептидаза Н, вероятно, участвует в заключительной стадии синтеза — процессинге кортикотропи-

Таблица 1

Влияние эмоционально-болевого стресса на карбоксипептидазо-Н-подобную активность в гипофизе и сыворотке животных

Группа животных	Гипофиз			Сыворотка		
	1	2	%	1	2	%
Норма (1-я)	1,7±0,1	15,6±1,1		9,12±0,72	0,126±0,010	
Однократный стресс:						
0 ч (2-я)	2,6±0,2***	23,6±1,8	153	10,87±0,44*	0,150±0,006	119
6 ч (3-я)	2,8±0,2***	25,5±1,8	165	10,57±0,11*	0,146±0,002	116
18 ч (4-я)	2,7±0,1***	24,5±0,9	159	13,58±0,73***	0,188±0,010	149
36 ч (5-я)	2,4±0,1***	21,8±0,9	141	13,41±0,69***	0,185±0,010	147
72 ч (6-я)	2,2±0,2**	20,0±1,8	129	11,33±0,88**	0,157±0,012	124
Хронический стресс (7-я)	2,3±0,2***,++	20,9±0,9	135	7,14±0,49***,+++	0,099±0,007	78

Примечание. Здесь и в табл. 2 активность в наномолях дансил — фен — лей, образовавшегося за 1 мин инкубации на 1 мг ткани (гипофиз) или 1 мл сыворотки (1) и на 1 мг белка (2);  $M \pm m$ ;  $n=6-7$ ; одна звездочка —  $p < 0,05$ , две —  $p < 0,01$ , три —  $p < 0,001$ ; звездочка и крестик —  $p$  по отношению к норме и 18 ч после воздействия однократного эмоционально-болевого стресса соответственно.

## Влияние этанола на карбоксипептидазо-Н-подобную активность в гипофизе и сыворотке

Группа животных	Гипофиз			Сыворотка		
	1	2	%	1	2	%
Норма (1-я)	1,7±0,1	15,6±1,1		9,12±0,72	0,126±0,010	
Этанол, 4 г на 1 кг массы, 6 ч (8-я)	2,0±0,1*	18,2±0,9	118	7,85±0,45**	0,108±0,006	86
Этанол, 4 г на 1 кг массы, 18 ч (9-я)	4,6±0,2***	41,8±1,8	271	10,55±0,42*	0,146±0,006	116
Хроническое потребление этанола (10-я)	2,0±0,1*,***	18,2±0,9	118	9,70±0,64	0,138±0,009	106

на и β-эндорфина [10, 12, 15], то в сыворотке фермент, очевидно, участвует в модификации, инактивации и деградации этих пептидов [15]. По-видимому, повышение активности карбоксипептидазы Н в гипофизе непосредственно после воздействия стрессорного фактора связано с необходимостью восстановления исходного уровня кортикотропина и β-эндорфина, содержание которых в гипофизе снижается в связи с выбросом в кровь при стрессе [5] и, следовательно, с необходимостью усиления биосинтеза их из предшественников.

При хроническом эмоционально-болевым стрессе у животных карбоксипептидазо-Н-подобная активность в гипофизе по сравнению с нормой была повышенной, а в сыворотке пониженной (см. табл. 1). В свете представлений об адаптации интересно сравнение активности фермента при хроническом и однократном эмоционально-болевым стрессах. Так как при хроническом эмоционально-болевым стрессе животных забивали через 18 ч после последнего воздействия, то представляется правомерным сравнение активности при хроническом эмоционально-болевым стрессе с активностью через 18 ч после однократного эмоционально-болевого стресса. И в гипофизе, и в сыворотке карбоксипептидазо-Н-подобная активность при хроническом эмоционально-болевым стрессе была достоверно ниже, чем при однократном воздействии.

Через 6 ч после введения этанола крысам в дозе 4 г на 1 кг массы в гипофизе наблюдалось некоторое повышение активности карбоксипептидазы Н, а в сыворотке — снижение ферментативной активности по сравнению с нормой (табл. 2). Через 18 ч после введения этанола повышение карбоксипептидазо-Н-подобной активности наблюдалось и в гипофизе, и в сыворотке, однако в гипофизе повышение активности было более выражено (на 171%), чем в сыворотке (на 16%).

При хроническом потреблении этанола активность карбоксипептидазы Н в гипофизе была несколько выше, чем в норме, но существенно ниже, чем через 18 ч после однократного введения этанола. В сыворотке при хроническом потреблении этанола достоверных отличий активности от нормы не наблюдалось.

Следует отметить, что эмоционально-болевым стресс и этанол оказывали сходное влияние на активность карбоксипептидазы Н в гипофизе животных, что хорошо согласуется с представлениями об активирующем влиянии этанола и стресса на синтез и секрецию стресс-пептидов [1, 2, 13]. Однако в сыворотке наблюдались некоторые различия во влиянии стресса и этанола на карбоксипептидазо-Н-подобную активность. Неясно, связаны ли изменения карбокси-

пептидазо-Н-подобной активности в сыворотке с изменениями содержания стресс-пептидов при стрессе и алкогольной интоксикации или же с общей активацией протеолиза при этих воздействиях [8, 14].

Обращает на себя внимание тот факт, что динамика изменения карбоксипептидазо-Н-подобной активности в сыворотке крови крыс после однократного эмоционально-болевого стресса не совпадает с динамикой изменения содержания стресс-пептидов [5, 13], что должно было бы иметь место при их совместной секреции из гипофиза в кровь [12]. В сыворотке присутствует карбоксипептидаза N, которая имеет нейтральный оптимум рН, но сохраняет около 50% активности при рН 5,6 [16]. Возможно, что изменения активности в сыворотке не связаны с секрецией карбоксипептидазы Н из гипофиза в кровь, а обусловлены изменениями активности карбоксипептидазы N.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Буров Ю. В., Ведерникова Н. П. Нейрохимия и фармакология алкоголизма. — М., 1985.
2. Ведерникова Н. П. // Нейропсихофармакология и биологические аспекты алкоголизма / Под ред. Ю. В. Бурова. — М., 1983. — С. 18—19.
3. Ведерникова Н. П., Борисова И. П., Орехов С. П. // Бюл. экспер. биол. — 1989. — № 4. — С. 456—458.
4. Григорьянц О. О., Гомазков О. А. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 3. — С. 15—20.
5. Лишманов Ю. Б., Трифонова Ж. В., Цибин А. П. и др. // Бюл. экспер. биол. — 1987. — № 4. — С. 422—424.
6. Ойвин И. А. // Пат. физиол. — 1960. — № 4. — С. 76—85.
7. Панин Л. Е. Биохимические механизмы стресса. — Новосибирск, 1983.
8. Якушев В. С., Давыдов З. В., Бушueva В. В. // Укр. биохим. журн. — 1985. — Т. 57, № 2. — С. 15—18.
9. Fricker L. D., Snyder S. H. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1982. — Vol. 79. — P. 3886—3890.
10. Hook V. Y. H., Loh Y. P. // Ibid. — 1984. — Vol. 81. — P. 2776—2780.
11. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265—275.
12. Mains R. E., Eipper B. // Endocrinology. — 1984. — Vol. 115, N 5. — P. 1683—1690.
13. Makara G. B., Palkovits M., Szentagothai J. // Selye's Guide to Stress Research / Ed. H. Selye. — New York, 1980. — P. 280—337.
14. Poso A. R., Hirsimaki P. // Biochem. J. — 1991. — Vol 273. — P. 149—152.
15. Skidgel R. A., Jonson A. R., Erdos E. G. // Biochem. Pharmacol. — 1984. — Vol. 33, N 21. — P. 3471—3478.
16. Skidgel R. A. // Trends pharmacol. Sci. — 1988. — Vol. 9, N 8. — P. 299—304.

Поступила 03.03.92

## INFLUENCE OF EMOTIONAL PAIN STRESS AND ETHANOL ON THE CARBOXYPEPTIDASE H-LIKE ACTIVITY IN RAT PITUITARY GLAND AND BLOOD SERUM.

M. T. Gengin, A. N. Vernigora

V. G. Belinsky Pedagogic Institute, Penza.

Emotional-painful stress and alcohol intoxication activated carboxypeptidase H in the rat pituitary gland. The enzymatic activity was lower in chronic emotional-painful stress and alcohol consumption than that of their single exposure, but higher than that in control rats. In blood serum carboxypeptidase H-like activity was increased after the single emotional-painful stress, while it decreased in chronic stress. Ethanol affected the enzymatic activity in blood serum less significantly than in the pituitary gland.

© А. Н. ВЕРНИГОРА, М. Т. ГЕНГИН, 1994

УДК 616.831-008.931-02:[547.262+613.863]-092.9

*А. Н. Вернигора, М. Т. Генгин*

## **ВЛИЯНИЕ ЭТАНОЛА НА АКТИВНОСТЬ РАСТВОРИМОЙ И МЕМБРАННО-СВЯЗАННОЙ КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ Н В ОТДЕЛАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ**

Пензенский педагогический институт им. В. Г. Белинского

Известно, что этанол ослабляет некоторые физиологические проявления стресса [3]. Предполагают, что в реализацию стресс-протективного действия этанола вовлекается опиоидергическая система [1, 5]. В генез опиоидных пептидов на конечной стадии процессинга вовлекается карбоксипептидаза Н — экзопептидаза, отщепляющая остатки аргинина и лизина с С-конца пропептидов с образованием биологически активных пептидов [6]. Известны две формы карбоксипептидазы Н [11] — растворимая и мембранно-связанная, которые, по предположению ряда авторов [2, 7], могут различаться и по функциям. На сегодня, однако, остается неясной роль этих форм в реализации стрессовых реакций.

В задачу настоящего исследования входило изучение влияния этанола на активность карбоксипептидазы Н (КФ 3.4.17.10) в растворимой и мембранной фракциях различных отделов головного мозга крыс при иммобилизационном стрессе.

**Методика.** Опыты проводили на безлинейных крысах-самцах массой 250—300 г. Животных разделили на 6 групп. 1-я группа — интактные животные, крыс 2, 4 и 6-й групп иммобилизовали в положении на животе в течение 6 ч, животным 1-й и 6-й групп перед иммобилизацией вводили внутривентриально 20 % раствор этанола, приготовленный на физиологическом растворе в дозе 1 и 4 г на 1 кг массы соответственно, животным 3-й и 5-й групп вводили внутривентриально этанол в дозе 1 и 4 г на 1 кг массы соответственно.

Крыс декапитировали, извлекали головной мозг и расчленили его на отделы. Растворимую и мембранную фракции получали центрифугированием гомогената ткани мозга, приготовленного на 50 мМ натрий-ацетатном буфере рН 5,6 в течение 60 мин при 30 000 г и 4 °С [11].

Активность карбоксипептидазы Н определяли по методу [8] по отщеплению аргинина от дансил-фен-лей-арг при рН 5,6 как  $\text{Co}^{2+}$ -активируемую активность. Белок определяли по Лоури [10]. Полученные данные обрабатывали статистически [4].

**Результаты и обсуждение.** При иммобилизации животных наблюдались попытки осво-

бодиться, постукивание по столу вызывало вокализацию. Предварительное введение этанола в дозе как 1 г/кг, так и 4 г/кг предотвращало проявление этих признаков.

При иммобилизационном стрессе наблюдалось повышение активности карбоксипептидазы Н в растворимой и мембранной фракциях гипоталамуса и гипокампа и снижение активности в растворимой фракции гипофиза и стриатума (см. таблицу).

Введение этанола в дозе 1 г/кг вызывало повышение активности растворимой и мембранно-связанной форм в гипофизе, гипоталамусе и гипокампе. В среднем мозгу повышалась активность только мембранно-связанной формы, в стриатуме при повышении активности мембранно-связанной формы снижалась активность растворимой.

При совместном воздействии этанола в дозе 1 г/кг и иммобилизационного стресса в гипофизе, гипоталамусе, гипокампе и сером веществе активность фермента не отличалась от его активности только при введении этанола. В среднем мозгу активность карбоксипептидазы Н в растворимой фракции была выше, чем при иммобилизационном стрессе, но несколько ниже, чем при введении этанола и в норме, в мембранной фракции — выше, чем при стрессе и в норме, но ниже, чем при введении этанола. В растворимой фракции стриатума активность фермента была выше, чем при раздельном воздействии этанола и стресса, и не отличалась от активности в норме. В мембранной фракции стриатума активность не отличалась от таковой только при введении этанола, т. е. в среднем мозгу и растворимой фракции стриатума при совместном воздействии стресса и этанола в дозе 1 г/кг наблюдалась тенденция к взаимной компенсации их влияния на активность карбоксипептидазы Н.

Введение этанола в дозе 4 г/кг вызывало повышение активности фермента в гипоталамусе, мембранной фракции среднего мозга, гипокампа и серого вещества и растворимой фракции гипофиза. В мембранной фракции гипофиза и растворимой фракции среднего мозга, стриатума, гипокампа и серого вещества активность карбоксипептидазы Н снижалась.

При совместном воздействии иммобилизационного стресса и этанола в дозе 4 г/кг в растворимой и мембранной фракциях гипофиза и гипокампа, растворимой фракции гипоталамуса, среднего мозга и серого вещества и мембранной фракции стриатума наблюдалась тенденция к взаимной компенсации влияния этанола и иммобилизационного стресса на активность фермента. Так, в гипофизе при совместном воздействии этанола в дозе 4 г/кг и иммобилизационного стресса в растворимой фракции активность фермента была несколько выше, чем при стрессе, ниже, чем при введении этанола, но достоверно не отличалась от нормы; активность мембранно-связанной формы была выше, чем при раздельном воздействии этанола и стресса, но достоверно не отличалась от нормы. В гипокампе активность растворимой формы фермента была выше, чем при введении этанола, ниже, чем при иммобилизационном стрессе, и достоверно не отличалась от нормы; активность мембранно-связанной формы была выше, чем в норме и при стрессе, но ниже, чем

Влияние этанола на активность растворимой (Р) и мембранно-связанной (М) форм карбоксипептидазы Н при иммобилизационном стрессе [в нМ дансил-фен-лей, освободившегося за 1 мин инкубации, на 1 мг ткани (1) и на 1 мг белка (2); n=6—7]

Группа животных	Форма карбоксипептидазы Н	Гипофиз		Гипоталамус		Средний мозг	
		1	2	1	2	1	2
Норма	Р	0,30±0,03	9,3±0,9	0,0087±0,0006	1,18±0,08	0,0118±0,0006	1,30±0,07
	М	0,46±0,04	8,9±0,9	0,055±0,007	0,77±0,10	0,051±0,003	0,65±0,04
Стресс	Р	0,23±0,04*	7,2±1,3	0,0151±0,0006***	2,04±0,08	0,0089±0,0022	0,98±0,24
	М	0,40±0,08	7,7±1,5	0,061±0,003*	0,86±0,04	0,055±0,003	0,71±0,04
Этанол, 1 г/кг	Р	0,42±0,04***	13,1±1,3	0,0138±0,0019***	1,86±0,26	0,0116±0,0004	1,27±0,04
	М	0,71±0,10**	13,6±1,9	0,105±0,013***	1,48±0,18	0,092±0,007***	1,18±0,09
Стресс+этанол, 1 г/кг	Р	0,39±0,04***××	12,2±1,3	0,0129±0,0011***×	1,74±0,15	0,0095±0,0013**×	1,04±0,14 <sup>+</sup>
	М	0,73±0,07***×××	14,0±1,3	0,100±0,008***×××	1,41±0,11	0,075±0,004***×××	0,96±0,05 <sup>+</sup> +
Этанол, 4 г/кг	Р	0,36±0,03**	11,3±0,9	0,0096±0,0004*	1,30±0,05	0,0076±0,0005***	0,84±0,05
	М	0,39±0,04*	7,5±0,8	0,065±0,002**	0,92±0,03	0,061±0,005**	0,78±0,06
Стресс+этанол, 1 г/кг	Р	0,28±0,05×××	8,8±1,6 <sup>+</sup>	0,0108±0,0003***××	1,46±0,04 <sup>++</sup>	0,0112±0,0003××	1,23±0,03 <sup>+++</sup>
	М	0,52±0,05×	10,0±1,0 <sup>++</sup>	0,068±0,004*	0,96±0,06	0,067±0,006***×	0,86±0,08

Продолжение

Группа животных	Форма карбоксипептидазы Н	Стриатум		Гиппокамп		Серое вещество	
		1	2	1	2	1	2
Норма	Р	0,0110±0,0008	1,55±0,11	0,0167±0,0013	2,11±0,17	0,0100±0,0003	1,06±0,03
	М	0,050±0,004	0,64±0,05	0,067±0,006	0,89±0,08	0,034±0,003	0,47±0,04
Стресс	Р	0,0081±0,0007***	1,14±0,10	0,0214±0,0018**	2,71±0,23	0,0095±0,0013	1,01±0,14
	М	0,051±0,003	0,65±0,04	0,082±0,007**	1,08±0,09	0,034±0,003	0,47±0,04
Этанол, 1 г/кг	Р	0,0092±0,0011*	1,30±0,15	0,0196±0,0022*	2,48±0,28	0,0100±0,0011	1,06±0,12
	М	0,072±0,009**	0,92±0,12	0,115±0,003**	1,51±0,04	0,043±0,003***	0,60±0,04
Стресс+этанол, 1 г/кг	Р	0,0118±0,0011**	1,06±0,15 <sup>+</sup>	0,0209±0,0012***	2,65±0,15	0,0093±0,0006	0,99±0,06
	М	0,079±0,004***×××	1,01±0,05	0,124±0,008***×××	1,63±0,11	0,043±0,003***×××	0,60±0,04
Этанол, 4 г/кг	Р	0,0063±0,0003***	0,89±0,04	0,0122±0,0016**	1,54±0,20	0,0061±0,0004***	0,65±0,04
	М	0,068±0,010**	0,87±0,13	0,088±0,005***	1,10±0,07	0,045±0,002***	0,62±0,03
Стресс+этанол, 1 г/кг	Р	0,0086±0,0014*	1,21±0,20 <sup>+</sup>	0,0186±0,0011×	2,35±0,14 <sup>++</sup>	0,0101±0,0006	1,07±0,06 <sup>+++</sup>
	М	0,045±0,005	0,58±0,06 <sup>+</sup>	0,102±0,007***×	1,34±0,09 <sup>+</sup>	0,039±0,004	0,54±0,06

Примечание. Одна звездочка (крестик, плюс) —  $p < 0,05$ , две —  $p < 0,01$ , три —  $p < 0,001$ ; звездочка, крестик, плюс —  $p$  по отношению к норме, иммобилизационному стрессу и введению этанола соответственно.

при введении этанола. В растворимой фракции гипоталамуса активность карбоксипептидазы Н была выше, чем в норме и при введении этанола, но ниже, чем при иммобилизационном стрессе, среднего мозга — выше, чем при раздельном воздействии этанола и стресса, и не отличалась от нормы, серого вещества — выше, чем при введении этанола, и не отличалась от активности в норме и при стрессе. Активность мембранно-связанной формы в стриатуме была ниже, чем при воздействии этанола, но не отличалась от активности в норме и при стрессе.

Интересно, что при введении перед иммобилизацией этанола в дозе 4 г/кг тенденция к блокированию изменений активности карбоксипептидазы Н наблюдается в большем числе отделов, чем при введении этанола в дозе 1 г/кг. Вероятно, стресс-протективное действие этанола зависит от его дозы.

При совместном воздействии этанола в дозе 1 г/кг и иммобилизационного стресса тенденция к блокированию изменений активности фермента наблюдается в среднем мозгу и стриатуме — отделах, в которых этанол в дозе 1 г/кг блокирует изменения энкефалинергической системы при иммобилизационном стрессе [5]. Данный факт позволяет предположить, что этанол оказывает стресс-протективное действие путем блокирования изменений активности карбоксипептидазы Н, что, вероятно, может являться одним из лимитирующих факторов энкефалинергической системы. Следовательно, представляется вероятным вовлечение карбоксипептидазы Н в стресс-протективное действие этанола.

Заслуживает внимания тот факт, что совместное воздействие этанола и иммобилизационного стресса в некоторых отделах головного мозга ока-

зывает несколько различное влияние на активность растворимой и мембранно-связанной форм фермента. Так, при введении перед иммобилизацией этанола в дозе 1 г/кг в среднем мозгу активность растворимой формы фермента была ниже, а мембранно-связанной — выше, чем в норме, в стриатуме активность растворимой формы не отличалась от активности в норме, тогда как активность мембранно-связанной формы была выше. При предварительном введении этанола в дозе 4 г/кг в среднем мозгу и гиппокампе активность растворимой формы не отличалась от активности в норме, а активность мембранно-связанной формы была выше нормы. При этом в стриатуме активность мембранно-связанной формы не отличалась от активности в норме, а активность растворимой формы была ниже нормы.

Некоторые авторами высказывается предположение о том, что растворимая и мембранно-связанная формы карбоксипептидазы Н в одних и тех же структурах могут участвовать в процессинге различных нейропептидов [4]. Вероятно, подобный характер изменения активности растворимой и мембранно-связанной форм связан с особенностями изменения содержания нейропептидов, в процессинге которых они участвуют. Что касается механизмов, обеспечивающих изменения активности растворимой и мембранно-связанной форм карбоксипептидазы Н, то они могут быть различными в зависимости от характера воздействия. Так, возможно, что различное влияние совместного воздействия этанола и иммобилизационного стресса на активность растворимой и мембранно-связанной форм связано с мембранотропным эффектом этанола [1]. Известно, что мембранно-связанная форма обладает более низкой активностью в расчете на молекулу фер-

мента, чем растворимая [7]. Однако неясно, связано ли это с наличием в мембранно-связанной форме дополнительной «якорной» аминокислотной последовательности [9] или с ингибированием ее какими-то компонентами мембран. В последнем случае нарушение этанолом упорядоченной структуры мембран [1] могло бы приводить к изменению активности мембранно-связанной формы, не влияя при этом на растворимую форму фермента.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Буров Ю. В., Ведерникова Н. П. Нейрохимия и фармакология алкоголизма.— М., 1985.
2. Гомазков О. А., Григорьянц О. О. // Успехи соврем. биол.— 1989.— Т. 108, № 1 (4).— С. 109—124.
3. Кампов-Полевой А. Б. // Фармакология экспериментального алкоголизма / Под ред. Ю. В. Букова.— М., 1982.— С. 130—135.
4. Ойвин И. А. // Пат. физиол.— 1960.— № 4.— С. 76—85.
5. Юхананов Р. Ю., Рожанец В. В., Майский А. И. // Бюл. exper. биол.— 1989.— № 10.— С. 455—457.
6. Fricker L. D. // Trends Neurosci.— 1985.— Vol. 8, N 5.— P. 210—214.
7. Fricker L. D. // J. Cell. Biochem.— 1988.— Vol. 38, N 4.— P. 279—289.

8. Fricker L. D., Snyder S. H. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1982.— Vol. 79.— P. 3886—3890.
9. Fricker L. D., Evans C. H. J., Esch E. S., Herbert E. // Nature.— 1986.— Vol. 323.— P. 461—464.
10. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem.— 1951.— Vol. 193, N 1.— P. 265—275.
11. Supattapone S., Fricker L. D., Snyder S. H. // J. Neurochem.— 1984.— Vol. 42, N 4.— P. 1017—1023.

Поступила 03.03.92

#### EFFECT OF ETHANOL ON ACTIVITY OF SOLUBLE AND MEMBRANE-BOUND CARBOXYPEPTIDASE H OF RAT BRAIN REGIONS IN IMMOBILIZATION STRESS.

A. N. Vernigora, M. T. Gengin

V. G. Belinsky Pedagogic Institute, Penza.

The activity of carboxypeptidase H was inhibited dissimilarly in some brain regions of rats after combined effects of ethanol and immobilization stress. This dissimilar effect of ethanol and stress on activity of soluble and membrane-bound carboxypeptidases was detected in the midbrain, hippocampus, and striatum. The role of carboxypeptidase H in the stress-protective effect of ethanol is discussed.

## МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.153.922-074:543.544

А. И. Резвухин, Е. В. Березовская,  
И. Ю. Шалаурова

### ХРОМАТОМАСС - СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОКИСЛЕННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХОЛЕСТЕРОЛА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Институт терапии СО РАМН, Новосибирск

В ранее опубликованных работах было показано, что в регуляции обмена холестерина важную роль играют окисленные производные холестерина [10]. Оксипроизводные холестерина присутствуют во всех содержащих холестерин образцах, как в продуктах питания, так и в тканях крови человека и животных [9]. Что касается продуктов питания, то наличие оксипроизводных холестерина может быть обусловлено автоокислением холестерина. Решающую роль в окислении холестерина в тканях и крови играют процессы перекисного окисления липидов и ферментативное окисление холестерина с участием цитохром Р-450-зависимых оксигеназ [3].

К настоящему времени получены экспериментальные доказательства, что механизмы регуляции холестеринного обмена в печени связаны с повышением уровня окисленных производных холестерина в клетках [4—6, 8].

Наиболее активное воздействие на холестериногенез оказывают следующие производные холестерина: 7 $\beta$ -оксихолестерол, 7-кетохолестерол, 25-оксихолестерол, 3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -холестантриол, 26-оксихолестерол [4, 5]. Образование таких промежуточных продуктов, как 7 $\alpha$ -оксихолестерол, 25-

и 26-оксихолестерол, происходит в процессе трансформации холестерина в желчные кислоты [1].

Содержание окисленных производных холестерина в сыворотке крови чрезвычайно мало. В данной работе описан новый метод определения ряда окисленных производных холестерина, основанный на селективном мониторинге осколочных ионов в масс-спектрометрии с применением газовой хроматографии. Использование последней на современных капиллярных колонках позволило разделить сложную смесь окисленных производных холестерина на компоненты, не прибегая к обычной в этом случае процедуре получения их триметилсилиловых эфиров [2].

Определены условия записи хроматограмм и масс-спектров, а также их основные характеристики, времена удержания, массовые единицы осколочных ионов и молекулярные ионы.

**Методика.** В работе использованы следующие реактивы: 60 % водный раствор КОН, КСI (х. ч.); растворители: этилацетат, этанол, гексан, гептан, изопропанол (все марки ч. д. а.), хлороформ без дополнительной перегонки, силикагель («Мегск»), стандарты окисленных производных холестерина («Sigma»): 25-оксихолестерол, 7-кетохолестерол, 7- $\beta$ -оксихолестерол.

Для экстракции оксихолестеролов из сыворотки крови к 1 мл сыворотки добавляли 2,5 мл свежеприготовленного раствора, состоящего из 60 % водного раствора КОН и 96 % этанола в соотношении 5:95, встряхивали 1 мин, смесь инкубировали при 55 °С 45 мин, охлаждали до комнатной температуры, затем добавляли 1,5 мл дистиллированной воды и 2 г твердого

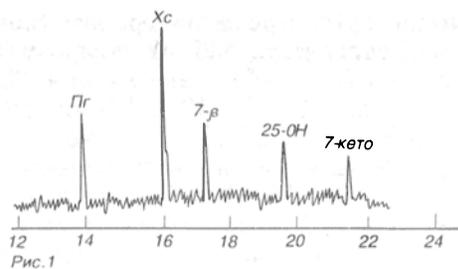


Рис. 1

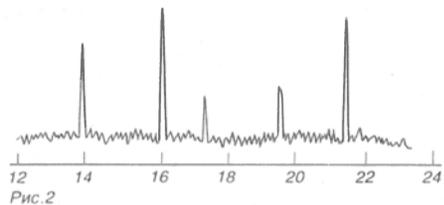


Рис. 2

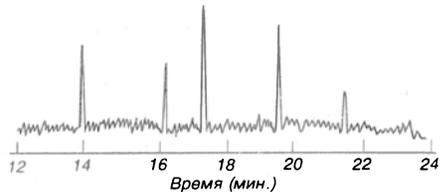


Рис. 3

Рис. 1. Характерная хроматограмма образца экстракта оксипроизводных холестерина из сыворотки крови человека при гиперхолестеринемии.

Пр — прогестерон, внутренний стандарт; Хс — холестерол; 7-β — 7-β-оксихолестерол; 25-ОН — 25-оксихолестерол; 7-кето — 7-кетохолестерол.

Рис. 2. Идентификация 7-кетохолестерола путем добавления стандарта.

Рис. 3. Идентификация 7-β- и 25-оксихолестерола путем добавления соответствующих стандартов.

КС1, встряхивали 3 мин, добавляли 5 мл гексана, после чего центрифугировали 2 мин при 550 g. Гексановый слой отделяли и переносили в другую пробирку, где выпаривали под струей азота при 60 °С.

Отделение смеси оксихолестерола от холестерола осуществляли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) [7]. Использовали силикагель G, систему растворителей этилацетат-гептан в объемном соотношении 1:1.

Оксихолестеролы экстрагировали из силикагеля смесью гептан—изопропанол (1:1) дважды: сначала добавляли 4 мл растворителя, встряхивали 3 мин, центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин, повторяли экстракцию, добавляя 2,5 мл смесь гептан—изопропанол. Образец высушивали в токе инертного газа при 60 °С.

При газохроматографическом и масс-спектрометрическом исследовании использовали газовый хроматограф «Hewlett Packard» 5890А с масс-селективным детектором HP5971. Условия записи хроматограммы: температура колонки начальная 180 °С, конечная 280 °С. Скорость подъема температуры 10 °С в минуту. Охлаждение колонки не контролировали. Газ-носитель — гелий. Колонка HP-5 капиллярная с фазой, состоящей из поперечно сшитого 5 % фенилметилсиликона. Инжектор без разделения потока. Скорость потока гелия 5 мл/мин.

Регистрацию хроматограмм проводили с выборкой молекулярных масс, характерных для смесей исследуемых оксихолестеролов. Сравнение масс-спектров последних показывает, что наибо-

лее характерными осколочными ионами являются следующие: 43, 55, 57, 69, 81, 83, 95, 107, 119, 121, 133, 155, 143, 145, 159, 161. Из них для 25-оксихолестерола характерными являются подчеркнутые массы.

В отдельном эксперименте при выбранных условиях записи хроматограмм были исследованы смеси стандартов оксихолестеролов, имеющихся в нашем распоряжении. Были определены времена удержания этих стандартов: холестерол — 16,594 мин; 7-β-оксихолестерол — 17,707 мин; 25-оксихолестерол — 19,788 мин; 7-кетохолестерол — 21,344 мин. По пику при 16,594 контролировали количество холестерола.

Результаты и обсуждение. Поиск и идентификацию искомым компонентом в образцах липидных экстрактов сыворотки проводили с помощью компьютерной программы с использованием поисковой системы с базой данных около 50 000 соединений. Во всех образцах определены хроматографические пики, принадлежащие производным холестерола: 7-β-оксихолестерол, 7-кетохолестерол, 25-оксихолестерол. Идентификация была подтверждена добавлением соответствующих стандартов оксипроизводных холестерина.

На рис. 1 приведена характерная хроматограмма образца экстракта оксипроизводных холестерола из сыворотки крови. Несмотря на широкие сигналы, видно хорошее разделение хроматографических пиков. Это позволяет надеяться, что может быть проведена количественная оценка компонентов.

Масс-спектры исследованных оксихолестеролов оказались близки, различаясь главным образом по интенсивности осколочных ионов, что не позволяет непосредственно идентифицировать хроматографические пики с помощью поисковой системы по масс-спектрам. Однако, выбрав наиболее характерные осколочные ионы, мы запрограммировали их в компьютер, и последующая запись хроматограмм позволила, во-первых, существенно увеличить соотношение сигнал/шум, а во-вторых, путем добавок стандартов убедиться в достоверности отнесений хроматографических пиков (рис. 2 и 3).

Таким образом, в настоящей работе проведена идентификация окисленных производных холестерола: 7-β-оксихолестерола, 7-кетохолестерола, 25-оксихолестерола. Других производных нами не выявлено. Не исключено, что дальнейшая работа, направленная на выяснение роли окисленных производных холестерола в процессе атерогенеза, приведет к появлению новых данных о других производных.

Представляется интересным изучить связь некоторых оксипроизводных холестерола в сыворотке крови с показателями холестеринового обмена у здоровых лиц и больных атеросклерозом.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Bascoul J., Gore C. et al. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1990. — Vol. 1044, N 3. — P. 357—360.
2. Koopman R. J., van der Molen J. C., Walthers B. G. // *J. Chromatogr.* — 1987. — Vol. 116. — P. 1—13.
3. Kummerow F. A. *Autooxidation in Food and Biological Systems* / Ed. M. G. Simic, M. Karel. — New York, 1980. — P. 237.

4. Miao E., Wilson S. R. et al. // *Biochem. J.*— 1988.— Vol. 255, N 3.— P. 1049—1052.
5. Morin R. J., Peng S. K. // *Ann. clin. Lab. Sci.*— 1989.— Vol. 19, N 9.— P. 225—237.
6. Morin R. J., Peng S. K. // *Lipids.*— 1989.— Vol. 24, N 3.— P. 217.
7. Peng S. K., Phyllips G. A., Xia G. Z., Morin R. J. // *Atherosclerosis.*— 1987.— Vol. 64, N 1.— P. 1—6.
8. Saucier S. E., Kandutsch A. A., Ganoen A. K. et al. // *J. biol. Chem.*— 1989.— Vol. 264.— P. 6863.
9. Smith L. L., Johnson B. H. // *Free Radiol. Biol. Med.*— 1989.— Vol. 7, N 3.— P. 285—332.
10. Taylor F. R., Kandutsch A. A. // *Sterol and Steroid Hormone Mechanisms of Actions* / Eds R. Kumar, T. Spelsberg.— Boston, 1987.— P. 113.

Поступила 25.09.92

## CHROMATOMASS-SPECTROMETRIC ESTIMATION OF OXIDIZED DERIVATIVES OF CHOLESTEROL IN BLOOD SERUM

A. I. Rezvukhin, E. V. Berezovskaya, I. Yu. Shalaurova

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

Content of several oxidized forms of cholesterol was studied in blood serum of patients with hypercholesterolemia using chromatato-mass-spectrometry. The hydroxycholesterols detected were identified as 7- $\beta$ -hydroxycholesterol, 25-hydroxycholesterol, 7-ketocholesterol in the presence of standard substances added. Main patterns of gas chromatographic and mass spectrometric analyses of these substances are described.

## НЕКРОЛОГ

УДК 612:92 Кудряшов

### ПАМЯТИ КУДРЯШОВА Б. А.



2 июня 1993 г. ушел из жизни выдающийся ученый-физиолог, заслуженный деятель науки РСФСР, дважды лауреат Ломоносовской премии, дважды лауреат Государственной премии СССР (1951 и 1977 гг.), профессор доктор биологических наук Борис Александрович Кудряшов. В течение 66 лет его научно-педагогическая деятельность была связана с Московским государственным университетом (МГУ), из них 22 года он заведовал кафедрой физиологии человека и животных и 44 года возглавлял созданную им лабораторию физиологии и биохимии свертывания крови. Б. А. Кудряшов — автор трех открытий (дипломы СССР № 22, 223, 386), более 30 изобретений, свыше 350 научных трудов, 5 монографий, 20 внедрений в клиническую практику. В стенах МГУ он создал научную школу в области физиологии и биохимии свертывания крови, подготовил 40 кандидатов наук и 19 докторов наук.

Научная деятельность Б. А. Кудряшова началась с 1927 г., когда безграничное стремление к познанию и любовь к науке привели воспитанника Казанского университета в столичный университет. Здесь на биологическом факультете Борис Александрович успешно заканчивает аспирантуру, а затем и докторантуру. С 1938 г. Б. А. Кудряшов — профессор биологического факультета МГУ. Многие годы он возглавлял Институт зоологии и зоологическое отделение того же факультета. С МГУ неразрывно связана более чем полувековая плодотворная научная и педагогическая деятельность Бориса Александровича Кудряшова, идеями которого создана новая глава в физиологии — учение о регуляции жидкого состояния крови и ее свертывания, получившая широкое признание как в нашей стране, так и за рубежом.

С 1936 г. исследования Б. А. Кудряшова и его сотрудников были посвящены изучению физиологии и биохимии свертывания крови. В годы Великой Отечественной войны Борисом Александровичем был разработан метод промышленного производства кровоостанавливающего препарата тромбина, нашедшего широкое и успешное применение в полевых госпиталях. Б. А. Кудряшов принимал непосредственное и активное участие во внедрении тромбина на разных участках фронта.

С открытием в 1958 г. Б. А. Кудряшовым и его сотрудниками физиологической противосвертывающей системы (диплом на открытие № 22) произошли значительные изменения в ранее существовавших теоретических представлениях о гемостазе, что оказало положительное влияние на медицинские исследования и клиническую практику. Установлено, что необходимое физиологическое состояние крови в организме человека и теплокровных животных поддерживается рефлекторно-гуморальной системой. Повышение в крови концентрации тромбина вызывает рефлекторную защитную реакцию противосвертывающей системы, обеспечивающую выброс в кровь активаторов профибринолизина и гепариноподобных веществ).

Открытие противосвертывающей системы организма позволило разработать принципиально новую научную диалектическую теорию регуляции жидкого состояния крови и ее свертывания,