

Том 40

выпуск 4

ИЮЛЬ — АВГУСТ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. А. ТУТЕЛЬЯН (зам. редактора), А. И. АРЧАКОВ, И. П. АШМАРИН, Т. Т. БЕРЕЗОВ,
Ю. В. БУКИН, А. В. ВАСИЛЬЕВ, Е. Н. ГЕРАСИМОВА, В. З. ГОРКИН, А. Д. ДУРНЕВ,
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. ПРОМЫС-
ЛОВ, 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)



Л. А. Тиунов, В. В. Соколовский, Е. В. Костюшов
(Санкт-Петербург)

БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ ТОКСИЧЕСКОГО ОТЕКА ЛЕГКИХ ПРИ ДЕЙ- СТВИИ ДИОКСИДА АЗОТА

В последние годы с возрастающей интенсивностью происходит загрязнение окружающей среды ксенобиотиками техногенного происхождения. К числу таких загрязнителей относится диоксид азота, источниками которого являются выхлопные газы автотранспорта, тепловые электростанции, многочисленные химические предприятия [22]. Особую опасность этот токсикант приобретает в экстремальных условиях при химических катастрофах, сопровождающихся тяжелыми поражениями людей и их гибелью. Например, известны массовые отравления диоксидами азота в Кливленде и Нанте, когда число погибших от токсического отека легких, вызванного NO_2 , составило 125 человек [38]. В связи с этим весьма актуальной проблемой становится исследование биохимических механизмов токсического отека легких как основы для изыскания эффективных средств профилактики и терапии отравлений. Согласно современной классификации токсического отека легких [11, 31], учитывающей патогенетические и клинические особенности его развития, токсический отек легких, вызванный диоксидом азота, может быть отнесен к комбинированному типу, при котором поражение капиллярно-альвеолярной мембраны сочетается с гемодинамическими расстройствами. Соответственно и биохимический механизм острого токсического отека легких, вызванного диоксидом азота, включает два ведущих патогенетических звена. Одно из них — деструктивные изменения альвеолярно-капиллярной мембраны, подвергающейся прямому воздействию токсического фактора, второе — гемодинамические расстройства, обусловленные рефлекторным влиянием агента на сосуды малого круга, а также усиленным образованием вазоактивных соединений.

По-видимому, поступление диоксида азота в органы дыхания приводит вначале к блокированию региональной системы антиоксидантной защиты легких, что создает благоприятные условия для последующего лавинообразного развития ряда патохимических процессов.

Диоксид азота, молекула которого содержит неспаренный электрон (NO_2^\cdot) и является свободнорадикальной, обладает свойствами сильного окислителя [15, 42]. Кроме того, взаимодействие NO_2 с молекулами воды в тканях организма сопровождается образованием свободных радикалов гидроксила HO^\cdot .

Как известно, ловушками свободных радикалов и нитрозирующих агентов в живой клетке являются низкомолекулярные тиолы и аскорбиновая кислота [25, 37, 42, 49] — функционально важные компоненты неферментного звена физиологической антиоксидантной системы (АОС) [6, 19]. Обнаруженное в работе [16] раннее, опережающее развитие отека исчезновение небелковых тиолов (главным образом восстановленного глутатиона) в легочной ткани и резкое снижение содержания в ней аскорбиновой кислоты и α -токоферола, ингибирование ряда антиперекисных и других ферментов АОС [10, 16, 21], свидетельствуют о ее инактивации диоксидом азота. Эти данные позже неоднократно подтверждались в различных вариантах опытов с диоксидом азота. Так, при ингаляции NO_2 в среднесмертельных концентрациях в легких белых крыс отмечалось значительное снижение уровня восстановленного глутатиона и аскорбиновой кислоты. При этом снижалась активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ), глутатионредуктазы (ГР), глутатионпероксидазы (ГПО) и каталазы (Кат) уже в первые часы после воздействия яда. Особенно значительно уменьшалась активность Г-6-ФДГ. Предварительная активация АОС, вызывавшая увеличение в легких содержания восстановленного глутатиона, аскорбиновой кислоты и активацию Г-6-ФДГ, ГР, Кат и ГПО, приводила к повышению устойчивости экспериментальных животных к токсическому действию диоксида азота [14]. Аналогичные данные были получены в работе [44], в которой было показано, что при действии NO_2 в легочной ткани снижается уровень восстановленного глутатиона и уменьшается активность ГР и ГПО. Учитывая тесную функциональную связь в системе антиоксидантной защиты между восстановленным глутатионом и аскорбиновой кислотой [5], между аскорбиновой кислотой и α -токоферолом [39], между восстановленным глутатионом и α -токоферолом [32], по-видимому, можно считать, что действие NO_2 , приводящее к развитию токсического отека легких, сопровождается недостаточностью не какого-то одного компонента АОС, а вызывает срыв всей системы.

В этих условиях субстратами свободнорадикального окисления становятся белки и липиды легочной ткани [19, 47]. В этой связи речь может идти о белках и липидах липопротеиновой основы мембранных структур клеток альвеолярного эпителия и эндотелия капилляров и о белках базальной мембраны.

Окислительная модификация белковых молекул сопровождается изменением их конформационного состояния, нарушением белок-липидного взаимодействия и деструкцией липопротеиновых комплексов, что может служить одной из непосредственных причин повышения проницаемости клеточной мембраны [1, 27, 30, 41, 46]. Эта возможность четко прослеживается в результатах

опытов на эритроцитах, которые служат адекватной моделью клеточной мембраны [8]. Так, например, сильное мембранотоксическое действие диоксида азота, обусловленное свободнорадикальным состоянием молекулы, выявлено при сравнительном исследовании интенсивности гемолиза, вызываемого молекулярной и ионной формами NO_2 [18]. Снижение гемолитической стойкости эритроцитов обнаружено при острой интоксикации диоксидом азота, сопровождающейся развитием отека легких [13].

С другой стороны, получила широкую известность способность свободных радикалов инициировать процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ), который при достаточной интенсивности может разрушать липопротеиновые структуры клеточной мембраны в результате первичной окислительной модификации их липидных компонентов [1, 3, 4].

Есть все основания полагать, что столь сильный окислитель, как диоксид азота, взаимодействует одновременно с белковым и липидным компонентами легочной мембраны.

В механизме остроого отека легких, вызываемого диоксидом азота, вероятно, определенное место занимает и возможность ПОЛ сурфактанта — липидной пленки, выстилающей поверхность альвеол, разрушение которой ведет к транссудации в альвеолы [12, 23].

Рассматривая роль различных факторов, ограничивающих действие свободных радикалов и прооксидантов на легочную ткань, выделяют 4 защитных барьера: антиоксидантную активность трахеобронхиальной слизи, содержащей гликопротеины, разрушающие H_2O_2 и инактивирующие гидроксильные радикалы; антиоксидантную активность сурфактанта, содержащего супероксиддисмутазу (СОД), ГПО и ГР; антиоксидантную активность клеточных мембран, включающую белковые и небелковые тиолы, холестерин, токоферол, ферменты АОС. При этом структурированность фосфолипидов в мембранах регулирует перекисное окисление, затрудняя доставку его активаторов к субстратам; антиоксидантную активность клетки, определяющуюся стационарным соотношением свободных радикалов и состоянием АОС [20].

Следует иметь в виду и возможную патогенетическую роль активации протеолиза, обусловленного способностью диоксида азота вызывать разрушение лизосомальной мембраны и высвобождение группы катепсинов [43]. Значение активации протеолиза подтверждается данными о возможности использовать ингибиторы протеолитических ферментов для купирования токсического отека легких, вызванного NO_2 [7].

Одной из причин гемодинамических расстройств, вызывающих или ускоряющих развитие острого токсического отека легких, является мощный поток афферентной импульсации с многочисленных рецепторных зон, локализованных в стенках бронхов, альвеол и артериальных сосудов. Раздражение рецепторов приводит к нарушению регуляции ритма и амплитуды дыхания, появлению защитных дыхательных рефлексов, вызывает рефлекторные изменения тонуса кровеносных сосудов [17].

Работами многих авторов установлена зависи-

мость функции чувствительных нервных окончаний от состояния энзимохимических процессов, обеспечивающих энергией формирование нервного импульса [17]. Воздействие на рецептор веществ — ингибиторов ферментов приводит либо к возникновению чрезмерной импульсации, либо к полному ее выключению, т. е. вызывает извращение или выпадение функции рецептора.

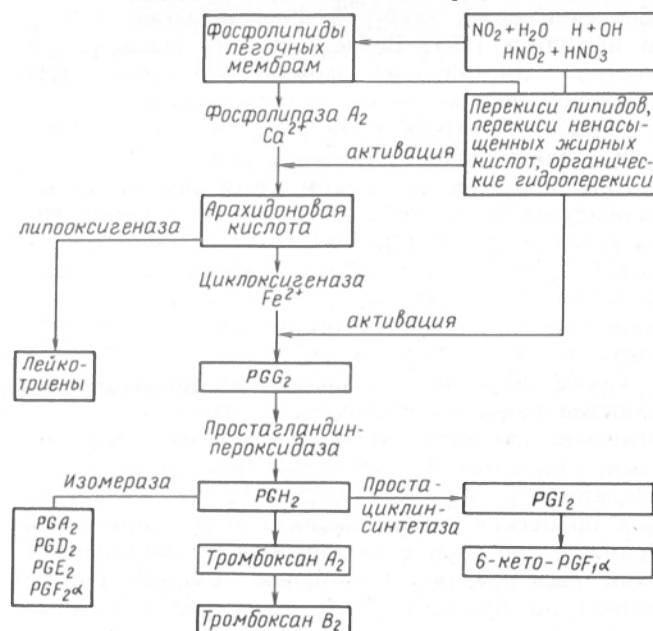
Ингибирование диоксидом азота ферментов, катализирующих в легочной ткани отдельные этапы углеводного обмена, наблюдающееся уже в начальной фазе отека [16], позволяет рассматривать этот факт как аргумент в пользу предположения о нейрорефлекторном действии диоксида азота на сосудистую систему.

Таким образом, в основе биохимического механизма развития токсического отека легких при действии диоксида азота лежат подавление систем, ответственных за антиоксидантную защиту, усиление свободнорадикальных процессов, активация процессов перекисидации с поражением мембранных структур и последующие гемодинамические расстройства. Специально следует остановиться на процессе ПОЛ, внимание к которым особенно возросло в последние годы. Усиление ПОЛ в легких при действии NO_2 отмечено уже в раннюю фазу интоксикации. Причем степень усиления ПОЛ коррелировала со степенью подавления активности ферментов АОС [44]. Усиление ПОЛ в легких при действии NO_2 показано на разных видах животных по критериям содержания малонового диальдегида, диеновых конъюгатов, оснований Шиффа и увеличению концентрации короткоцепочечных углеводов в выдыхаемом воздухе [10, 14, 21].

Усиление в легочной ткани процессов перекисидации вызывает, с одной стороны, деструкцию капиллярно-альвеолярной мембраны, а с другой — является триггерным механизмом, включающим образование вазоактивных веществ. Перекисидация ненасыщенных жирных кислот фосфолипидов приводит к удалению их из липидной фазы мембран, что ведет к изменению липидного состава, микровязкости и нарушению липидно-белкового взаимодействия. Такие нарушения мембранных структур сопровождаются возникновением липид-липидных и липид-белковых сшивок, что приводит к изменению физико-химических свойств липидного матрикса, снижению его текучести, повышению ригидности, изменению ориентации жирнокислотных остатков фосфолипидов, повышению ионной проницаемости мембран. Изменения мембранных структур вызывают нарушения передачи сигналов с адренорецепторов. При этом уменьшается прирост цАМФ в ответ на стимуляцию β -адренорецепторов, что ведет к искажению передачи информации от внеклеточных регуляторов к внутриклеточным эффекторным системам [20].

В специальных исследованиях показано, что индукция ПОЛ при токсических воздействиях на легкие сочетается с нарушением дыхания митохондрий, блокированием сульфгидрильных групп, угнетением мембранно-связанных легочных ферментов, нарушением биосинтеза фосфолипидов и белков, морфологическими изменениями тканей [50]. Кроме того, повышение уровня перекисей липидов на фоне подавления АОС ведет к стимуляции биосинтеза простагландинов и других ва-

Схема образования вазоактивных веществ в легких при действии диоксида азота [45]



зоактивных соединений [36]. В основе этого лежит способность перекисей активировать фосфолипазу A_2 .

Активированная перекисями фосфолипаза A_2 в присутствии ионов кальция ускоряет высвобождение арахидоновой кислоты из фосфолипидов. Таким образом, включается арахидоновый механизм, суть которого сводится к превращению из арахидоната под влиянием циклооксигеназы в присутствии ионов железа простагландина PGG_2 . Одновременно под влиянием липооксигеназы из арахидоновой кислоты идет образование лейкотриенов.

Простагландин PGG_2 под влиянием соответствующей пероксидазы превращается в простагландин PGH_2 . Из последнего при участии изомераз образуются PGA_2 , PGD_2 , PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$. Кроме того, из PGH_2 под влиянием простаглицинсинтетазы образуются PGI_2 и затем 6-кето- $PGF_{1\alpha}$. Наконец, PGH_2 под влиянием тромбоксансинтетазы служит источником генерации тромбоксана A_2 и тромбоксана B_2 [45]. Таким образом, образование серии вазоактивных соединений приводит к выраженным гемодинамическим нарушениям в легких, которые усиливают транссудацию жидкости в интерстиций, а затем и в альвеолы через поврежденные NO_2 капиллярно-альвеолярные мембраны. Приведена схема функционирования арахидонового механизма.

Другой системой, поставляющей вазоактивные вещества в легкие при развитии токсического отека, является кининовая система. Предполагается, что включение кининовой системы происходит либо за счет непосредственного действия токсиканта, либо за счет влияния избытка катехоламинов, выброс которых сопровождается интоксикацией диоксидом азота [9]. При этом происходит превращение прокаликреина путем протеолиза в калликреин.

Калликреин представляет собой группу протеолитических ферментов, известных так же как киниогеназы, присутствующих в жидкостях и тканях

организма [34]. Эти ферменты воздействуют на кининоген — белок, входящий в состав глобулиновой фракции, что приводит к образованию из кининогена вазоактивных кининов. К их числу относится нонапептид — брадикинин и лизилбрадикинин или каллидин.

Каллидин под влиянием фермента аминопептидазы может переходить в брадикинин. Кинины повышают проницаемость капилляров, вызывают увеличение кровенаполнения легких, стимулируют выделение антидиуретического гормона, вызывают задержку жидкости в тканях и усиливают развитие отека легких [9].

Инактивация кининов осуществляется карбокси-пептидазой (кининазой). Ингибирование киназ приводит к увеличению уровня кининов и понижению артериального давления [33]. Принципиально важным фактом является способность брадикинина и каллидина активировать фосфолипазу A_2 [35] и тем самым усиливать образование арахидоновой кислоты, а в последующем простагландинов и тромбоксанов, вызывая интенсификацию гемодинамических нарушений в легких при отравлениях диоксидом азота. Кроме того, в специальных опытах показано, что брадикинин активирует циклооксигеназу и стимулирует образование в эпителиальных клетках легких из арахидоновой кислоты PGE_2 и $PGF_{2\alpha}$ [29]. Таким образом, кининовая система образует с арахидоновым каскадом единый цикл, в котором генерируются вазоактивные соединения.

В нормально функционирующих легких концентрация простагландинов и тромбоксанов сбалансирована.

Воздействие диоксида азота вызывает нарушение баланса этих эндогенных регуляторов, что приводит к гемодинамическим изменениям в легких, развитию микротромбозов, бронхоспазма, осложняющих и ускоряющих наступление токсического отека легких [21].

Повышение уровня и нарушение баланса вазоактивных веществ в легких при действии диоксида азота обусловлены не только стимуляцией их продукции, но и нарушениями метаболических превращений этих соединений.

Биотрансформация простагландинов, тромбоксанов, лейкотриенов и простаглицлинов обеспечивается цитохромом P-450, который играет главную роль в метаболизме не только ксенобиотиков, но и целого ряда эндогенных соединений стероидов, полиненасыщенных жирных кислот, простанов [2]. Цитохром P-450 обеспечивает (наряду с липооксигеназой и циклооксигеназой) метаболизм арахидоновой кислоты и продуктов ее превращения, катализируя реакции ее аллильного окисления, эпоксилирования и ω -гидроксилирования. В эпоксилировании и ω -гидроксилировании участвуют множественные формы цитохрома P-450, регулирующие тем самым метаболические пути арахидоновой кислоты [28]. Эта регулирующая роль цитохрома P-450 при интоксикации диоксидом азота нарушается. Цитохром P-450 относится к мембранно-связанным ферментам. Поэтому, деструктивные изменения биомембран при действии диоксида азота, распространяющиеся и на внутриклеточные образования, в том числе на эндоплазматическую сеть, приводят к угнетению активности цитохрома P-450 [40]. Кроме того,

в литературе рассматривается вопрос о возможности подавления активности цитохрома Р-450 за счет прямого взаимодействия NO₂ с ферментом и образования неактивной формы нитрозил-цитохрома Р-450 [24]. Под воздействием диоксида азота подавление активности цитохрома Р-450 отмечено не только в легких, но и в печени [48].

О роли цитохрома Р-450 в механизме токсического действия диоксида азота свидетельствуют также данные о защитном эффекте индуктора цитохрома Р-450 β-нафтофлавона при воздействии NO₂. В опытах на мышах показано, что индуктор цитохрома Р-450 β-нафтофлавон способствовал развитию устойчивости животных к действию диоксида азота. У защищенных β-нафтофлавоном животных уровень цитохрома Р-450 был выше, чем в контрольной группе, степень выраженности отека легких и ПОЛ была меньше [26].

В то же время в легочной ткани активность СОД, ГПО и ГР существенно не увеличивались. Интересно, что повышение устойчивости к токсическому действию диоксида азота отмечалось у тех линий мышей, которые генетически были способны к индукции цитохрома Р-450 [26]. Таким образом, в биохимическом механизме развития токсического отека легких, вызванного диоксидом азота, можно выделить по крайней мере два момента. Это, во-первых, повреждение капиллярно-альвеолярной мембраны, наступающее вследствие активации свободнорадикальных процессов, недостаточности АОС, активации ПОЛ, лизосомальных ферментов, структурно-функциональных нарушений белковых и липидных компонентов биомембран. Во-вторых, это усиление образования вазоактивных веществ, нарушение их баланса вследствие изменений функционирования арахидонового каскада и подавления процессов биотрансформации простагнандов в цитохром Р-450-зависимых реакциях. Развивающиеся при этом гемодинамические нарушения усугубляют повреждение капиллярно-альвеолярных мембран и ускоряют развитие отека легких.

Анализ биохимических механизмов развития токсического отека легких при отравлениях NO₂ позволяет наметить перспективные пути поиска новых лекарственных средств, повышающих устойчивость организма к токсическому действию диоксида азота.

ЛИТЕРАТУРА

- Абрамова Ж. И., Оксенгендлер Г. И. Человек и противокислительные вещества.— Л., 1985.
- Арчаков А. И. Микросомальное окисление.— М., 1975.
- Бурлакова Е. Б., Губарева А. Е., Архипова Г. В., Рогинский В. А. // *Вопр. мед. химии.*— 1992.— № 2.— С. 17—20.
- Воскресенский О. Н. // Структура, биосинтез и превращение липидов в организме животного и человека.— Л., 1972.— С. 36—37.
- Воскресенский О. Н. // Адаптация и адаптогены.— Владивосток, 1977.— С. 91—96.
- Воскресенский О. Н., Жутая И. А., Бабырев В. Н., Бездерный Ю. В. // *Вопр. мед. химии.*— 1982.— № 1.— С. 14—27.
- Галкин Б. И., Баранов В. А., Тиунов Л. А. и др. // *Фармакология: Состояние и перспективы.*— Харьков, 1990.— С. 63—64.
- Голиков С. Н., Санюцкий И. В., Тиунов Л. А. Общие механизмы токсического действия.— Л., 1986.
- Зверев М. И., Анистиди М. Я. Токсический отек легких.— Кишинев, 1981.
- Кропотов А. В., Челонин В. П., Кропотова И. В. // *Фармакологическая коррекция гипоксических состояний.*— Гродно, 1991.— Ч. 3.— С. 432—433.
- Могош Г. Острые отравления.— Бухарест, 1984.
- Нестерова Е. Н., Заварзина Г. А., Кобозев Г. В., Маврин В. К. // Структура, биосинтез и превращение липидов в организме животного и человека.— Л., 1972.— С. 111—112.
- Петушков Н. М., Тиунов Л. А. // Кислородный режим организма и механизмы его обеспечения.— Барнаул, 1974.— Ч. 3.— С. 45—46.
- Преображенская Т. Н. Сравнительная оценка состояния антиоксидантной системы легких после ингаляционного воздействия диоксидом азота и хлором: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— СПб., 1992.
- Сиенко М., Плейн Р., Хестер Р. Структурная неорганическая химия.— М., 1968.
- Соколовская Т. М. // Тиоловые соединения в биохимических механизмах патологических процессов.— Л., 1979.— С. 13—18.
- Соколовский В. В. Гистохимические исследования в токсикологии. Л., 1971.
- Соколовский В. В., Соколовская Т. М., Шубина Л. Н. // *Фармакол. и токсикол.*— 1974.— № 1.— С. 35—39.
- Соколовский В. В. // *Вопр. мед. химии.*— 1988.— № 6.— С. 2—11.
- Сыромятникова Н. В., Гончарова В. А., Котенко Т. В. Метаболическая активность легких.— Л., 1987.
- Тиунов Л. А., Головенко Н. Я., Галкин Б. Н., Баранов В. А. // *Успехи соврем. биол.*— 1991.— Т. 111, № 5.— С. 738—750.
- Уорк К., Уорнер С. Загрязнение воздуха: Источники и контроль.— М., 1980.
- Хышмяктуев Б. С., Иванов В. Н., Жуц М. З. // *Вопр. мед. химии.*— 1991.— № 1.— С. 79—82.
- Arillo A., Mensi P., Pirozzi G. // *Toxicol. Lett.*— 1984.— Vol. 21.— P. 369.
- Armstrong D., Buchanan J. // *Photochem. Photobiol.*— 1978.— Vol. 28, N 45.— P. 743—755.
- Azoulay D., Mansour H., Moreau J., Lachia L. // *Toxicol. appl. Pharmacol.*— 1988.— Vol. 93, N 2.— P. 220—230.
- Bellomo G., Mirabelli F., Richelmi P., Finardi G. // *Hum. Toxicol.*— 1989.— Vol. 8, N 2.— P. 89.
- Capdevila I., Falk J., Estabrook R. // *FASEB J.*— 1992.— Vol. 6, N 2.— P. 731—736.
- Churchill L., Chilton F., Baseom R. et al. // *Amer. Rev. resp. Dis.*— 1989.— Vol. 140, N 2.— P. 449—459.
- Deuticke B. // *Stud. Biophys.*— 1989.— Vol. 134, N 1—2.— P. 99—104.
- Diller W. // *Atemwegs-Lungenkr.*— 1984.— Bd 10, N 5.— S. 215—218.
- Di Mascio P., Murphy M., Sies H. // *Amer. J. clin. Nutr.*— 1991.— Vol. 53, N 2.— Suppl.— P. 194s—200s.
- Erdos E. // *Fed. Proc.*— 1979.— Vol. 38.— P. 2751—2752.
- Fritz H., Fink E., Truscheit E. // *Ibid.*— P. 2753—2759.
- Haberland C., McConn R. // *Ibid.*— P. 2760—2767.
- Hemler M., Coon H., Land W. // *Arch. Biochem.*— 1979.— Vol. 193.— P. 340—345.
- Lake B., Harris R., Phillips J., Gangolli Sh. // *Toxicol. appl. Pharmacol.*— 1981.— Vol. 60, N 2.— P. 229—240.
- Larcan A., Lambert H., Meyer-Bisch C. // *Catastrophes Toxiques.*— Paris, 1988.— P. 13—29.
- McCay P. // *Ann. Rev. Nutr.*— 1985.— Vol. 5, N 1.— P. 23—40.
- Mochitate K., Kaya K., Miuru T., Kubota K. // *Environ. Res.*— 1984.— Vol. 33, N 1.— P. 17—28.
- Robinson J. // *Nature.*— 1966.— Vol. 212, N 5058.— P. 199—200.
- Rowlings Y., Gause E. // *Arch. intern. Med.*— 1971.— Vol. 128, N 1.— P. 94—100.
- Rynbrandt D., Kleinerman J. // *Arch. environ. Hlth.*— 1977.— Vol. 32, N 4.— P. 165—172.
- Sagai M., Schinose T. // *Environ. Hlth Perspect.*— 1987.— Vol. 73.— P. 179—189.
- Sayevitz J., Traystman R., Adkinson F. // *Anesthesiology.*— 1985.— Vol. 63, N 3.— P. 634—642.
- Shyder L., Fortier N. // *Biochim. biophys. Acta.*— 1988.— Vol. 937, N 2.— P. 229—240.
- Slater T. // *Amer. J. clin. Nutr.*— 1991.— Vol. 53, N 1.— Suppl.— P. 394s—396s.
- Takopo T., Miyazaki Y. // *Toxicology.*— 1984.— Vol. 33, N 3—4.— P. 239—244.
- Williams D. // *Food Cosmet. Toxicol.*— 1978.— Vol. 16, N 4.— P. 365—367.
- Witschi H. // *Fed. Proc.*— 1977.— Vol. 36, N 5.— P. 1631—1634.

Поступила 12.05.93

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994
УДК 616.36-018.1-008.939.6-092.9-07

Л. Е. Панин, И. Ф. Усынин, А. В. Харьковский,
О. М. Трубицына

РОЛЬ КЛЕТОК КУПФЕРА В РЕГУЛЯЦИИ БИОСИНТЕЗА БЕЛКА В ГЕПАТОЦИТАХ

Институт биохимии Сибирского отделения РАМН, Новосибирск

В печеночном синусоиде клетки Купфера (КК) занимают ключевые позиции. Они находятся на поверхности эндотелия капилляров и через соответствующие отверстия (фенестры) в эндотелиоцитах могут вступать в непосредственный контакт с гепатоцитами [1]. Это ставит вопрос о возможном существовании функциональных связей между КК и гепатоцитами. Уже описана преемственность между ними в обмене гормонов, гемоглобина, ферритина [10, 12, 16, 18] и других соединений. Однако эта проблема сегодня изучена крайне недостаточно.

Ранее нами было показано, что между непаренхимными клетками (НПК) печени и гепатоцитами существуют сложные взаимодействия, связанные с регуляцией экспрессии генов в последних. Оказалось, что при стимуляции системы мононуклеарных фагоцитов (СМФ), к которой относятся и КК, зимозаном, продигозаном и декстрансульфатом в печени значительно повышается скорость биосинтеза белка [6], причем данный процесс наиболее ярко выражен в гепатоцитах [4]. Механизм обнаруженного нами взаимодействия до конца не выяснен.

В связи с этим в данной работе предпринята попытка выяснить роль КК в развитии этого эффекта и раскрыть условия, приводящие к его реализации.

Методика. Работа выполнена на крысах-самках линий Вистар массой 180—200 г. Клетки печени изолировали после рециркулирующей перфузии органа 0,03 % раствором коллагеназы (тип 1, «Sigma», США) по методу [17] с некоторыми изменениями [8]. Из 1 г печени выделяли $(38 \pm 3) \cdot 10^6$ гепатоцитов и $(40 \pm 3) \cdot 10^6$ НПК. Более 85 % гепатоцитов и более 95 % НПК исключали трипановый синий. Очищенные эндотелиальные клетки и резидентные макрофаги (КК) получали с помощью противоточного центрифугирования в элютриаторном роторе JE-6 при 2500 об/мин на центрифуге J2-21 («Beckman», США).

Для приготовления первичной культуры гепатоциты разводили средой Игла МЕМ с НЕРЕС (НПО «Вектор»), содержащей 10 % эмбриональной сыворотки телят, 100 ЕД/мл пенициллина и 0,1 мг/мл стрептомицина. Полученную суспензию наносили на 24-луночный планшет («Linbro», США). Плотность культуры составляла 700 клеток на 1 мм². Инкубацию проводили в CO₂-инкубаторе (ГПИ-1, С-Петербург) при 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5 % CO₂. Через 2 ч в

культуре меняли среду, сыворотку и антибиотики. Первичную культуру НПК готовили аналогичным способом. Плотность культуры в планшете составляла 7000 клеток на 1 мм². В случае приготовления сокультуры соотношение гепатоцитов и НПК составляло 1:10. Через сутки инкубационную среду заменяли на свежую.

Для определения скорости биосинтеза белка в культуре использовали ¹⁴С-лейцин с удельной радиоактивностью 8880 мБк/ммоль. Последний добавляли в таком количестве, чтобы его конечная концентрация составляла 1 мкКи на 1 мл культуральной среды. Продолжительность инкубации 2 ч. Реакцию останавливали с помощью 0,2 NaOH. Содержимое лунки переносили на фильтры FN-16 диаметром 2 см. Удаление нуклеиновых кислот, липидов и избытка меченого лейцина осуществляли по методу [14, 15]. Радиоактивность образцов измеряли в толуольном сцинтилляторе на счетчике «Mark III» (США). Скорость счета выражали в количестве импульсов в 1 мин на лунку.

Для изучения регуляторных эффектов в среду инкубации добавляли продигозан (7,5 мкг), гидрокортизон (10 мкмоль) и липопроотеины высокой плотности (ЛПВП) (100 мкг) на 1 мл культуральной среды. Липопроотеины выделяли путем изоплотностного ультрацентрифугирования в растворе KBr [11]. Йодирование ЛПВП осуществляли по методу [9]. Связывание ¹²⁵I-ЛПВП гепатоцитами, КК и эндотелиоцитами изучали как у intactных животных, так и у животных после введения продигозана спустя 24 и 48 ч. Препарат готовили на физиологическом растворе и вводили внутривенно в дозе 0,25 мг на 1 кг массы животного. Данный препарат относится к группе липополисахаридов, получен из *V. prodigiosum* и является мощным стимулятором СМФ. Инкубацию клеток с мечеными липопроотеинами осуществляли в течение суток при 0 °С. Радиоактивность проб измеряли на счетчике «Мультимат-30» (Франция). Белок определяли по Лоури [13].

Достоверность полученных результатов оценивали с помощью критерия *t* Стьюдента.

Таблица 1

Влияние НПК, выделенных из печени intactных и стимулированных продигозаном крыс, на скорость биосинтеза белка в сокультуре гепатоцитов и НПК

Объект исследования	Скорость включения ¹⁴ С-лейцина в белок, имп/мин на 1 лунку
1. Гепатоциты (7)	17 200 ± 1 190
2. НПК intactных животных (7)	5 960 ± 350
3. НПК стимулированных крыс (4)	8 690 ± 1 290
4. Гепатоциты + НПК intactных животных (13)	23 640 ± 1 990
5. Гепатоциты + НПК стимулированных животных (7)	33 950 ± 3 270*

Примечание. В скобках — число измерений. Звездочка — $p < 0,05$ по отношению к группе без стимуляции НПК.

Таблица 2

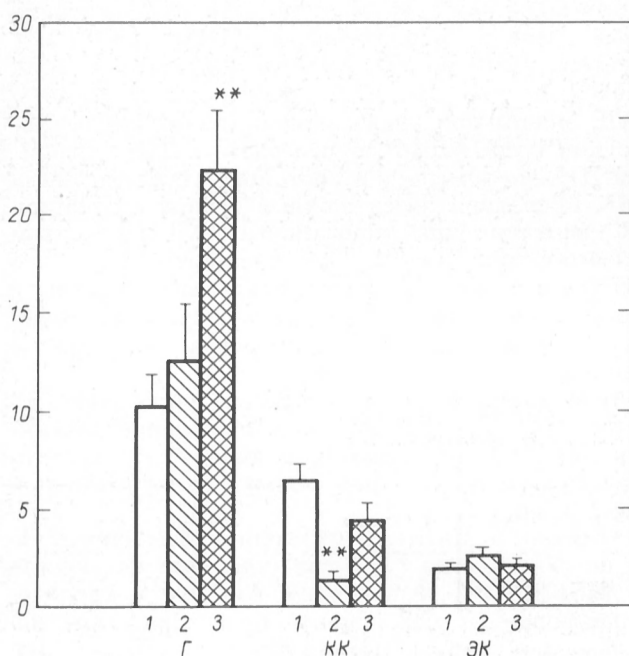
Влияние культуральной среды НПК, инкубированных 24 ч с ЛПВП, гидрокортизоном и продигозаном, на биосинтез белка в культуре гепатоцитов (в имп/мин на 1 лунку)

Условия культивирования	Культура гепатоцитов	
	среда MEM (контроль)	инкубационная среда НПК (опыт)
Без добавок	19 790±1 190	18 610±1 790
Продигозан	18 490±1 190	17 740±1 530
Гидрокортизон	17 750±1 460	14 780±980
ЛПВП	17 890±1 410	16 470±680
ЛПВП, гидрокортизон, продигозан	18 810±1 950	33 940±5 210*

Примечание. В контроле в каждом случае 8, в опыте 9 измерений. Звездочка — $p < 0,05$ по отношению к соответствующему контролю.

Результаты и обсуждение. В предыдущих исследованиях нами было показано, что скорость биосинтеза белка в гепатоцитах и НПК печени в расчете на 1 мг белка практически одинакова [4]. Однако в пересчете на 1 клетку содержание белка в гепатоцитах значительно выше. Это связано с тем, что размеры гепатоцитов существенно больше, чем НПК. Именно поэтому скорость включения ^{14}C -лейцина в общий белок гепатоцитов в расчете на 1 лунку оказалась выше, чем в НПК (табл. 1). Стимуляция животных продигозаном спустя 24 ч после введения препарата достоверно не увеличивала скорость биосинтеза белка в НПК. Можно говорить только о тенденции к увеличению, тогда как в гепатоцитах скорость биосинтеза возрастала вдвое [4].

В сокультуре гепатоцитов и НПК интактных животных скорость биосинтеза белка по сравнению с культурой гепатоцитов увеличивалась незначительно. Однако в сокультуре гепатоцитов и НПК стимулированных животных скорость биосинтеза белка существенно повышалась по сравнению с



Влияние стимуляции СМФ продигозаном на связывание ^{125}I -ЛПВП с гепатоцитами (Г), купферовскими (КК) и эндотелиальными клетками (ЭК).

По оси абсцисс — количество связанных с клетками ^{125}I -ЛПВП, нг на 10^6 клеток. 1 — контроль, 2 — стимуляция 24 ч; 3 — стимуляция 72 ч.

предыдущим состоянием и культурой гепатоцитов. Это указывает на важную роль НПК печени в регуляции экспрессии генов в гепатоцитах. Группы 2, 3 и 4, 5 абсолютно идентичны и отличаются только функциональным состоянием НПК.

Ранее нами было показано, что при стимуляции СМФ продигозаном *in vivo* резидентные макрофаги активно поглощали из крови ЛПВП и глюкокортикоиды [3]. Оказалось, что при добавлении обоих соединений к переживающим срезам печени крыс резко усиливается включение ^3H -уридина в РНК и ^{14}C -лейцина в белок ткани [2]. Этот эффект мы назвали кооперативным, так как он не воспроизводился полностью ни одним из испытанных соединений в отдельности [2]. Полученные результаты были воспроизведены нами в данной работе в другом варианте.

Оказалось, что в первичной культуре гепатоцитов никакие добавки не изменяли скорость включения ^{14}C -лейцина в белок (табл. 2). Если инкубационную среду в культуре гепатоцитов заменяли на инкубационную среду НПК, полученную в результате культивирования их с различными добавками, то скорость включения ^{14}C -лейцина в белок увеличивалась практически вдвое только в том случае, когда в качестве добавок использовали ЛПВП, гидрокортизон и продигозан вместе. Предыдущие исследования свидетельствуют о том, что продигозан в аналогичных опытах не является абсолютно необходимым [5].

Таким образом, кооперативный эффект ЛПВП и глюкокортикоидов лежит в основе усиления экспрессии генов в гепатоцитах в условиях стимуляции СМФ липополисахаридами.

Ключевую роль КК в данном механизме удалось показать в опытах по связыванию ^{125}I -ЛПВП, изолированными клетками печени (см. рисунок). Оказалось, что спустя 24 ч после стимуляции СМФ продигозаном *in vivo* связывание ^{125}I -ЛПВП гепатоцитами увеличивалось в 1,2 раза, через 72 ч — в 2,2 раза. Обратная ситуация выявлена в КК. Через 24 ч ЛПВП-связывающая способность снижалась в 4,5 раза. Через 72 ч она восстанавливалась, но не достигала исходного уровня. В эндотелиальных клетках связывающая способность практически не изменялась. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в условиях стимуляции СМФ продигозаном КК активно поглощают ЛПВП с помощью рецепторно опосредованного эндоцитоза.

Таким образом, в кооперативном эффекте ЛПВП и глюкокортикоидов первым звеном следует считать активное поглощение КК обоих соединений. При этом усиление экспрессии генов в гепатоцитах связано, вероятно, с апопротеином А1 (АпоА-1), присутствие которого впервые обнаружено нами в транскрипционно активном хроматине и ядерном матриксе гепатоцитов крыс [7]. Показано также, что содержание АпоА-1 в ядрах печени повышается под влиянием продигозана.

ЛИТЕРАТУРА

1. Майнский Д. Н., Виссе Э., Декер К. Новые рубежи гепатологии.— Новосибирск, 1992.— С. 264.
2. Панин Л. Е. // Вопр. мед. химии.— 1987.— № 5.— С. 96—102.
3. Панин Л. Е., Маянская Н. Н. Лизосомы: роль в адаптации и восстановлении.— Новосибирск, 1987.— С. 200.
4. Панин Л. Е., Соколова М. В., Усынин И. Ф. // Цитология.— 1990.— № 5.— С. 528—531.

5. Панин Л. Е., Свечникова И. Г., Маянская Н. Н. // *Вопр. мед. химии.*— 1990.— № 3.— С. 60—62.
6. Панин Л. Е., Соколова М. В., Усынин И. Ф. // *Пат. физиол.*— 1991.— № 1.— С. 20—22.
7. Панин Л. Е., Поляков Л. М., Усынин И. Ф. и др. // *Биополимеры и клетки.*— 1992.— № 2.— С. 44—49.
8. Усынин И. Ф. // *Новые методы научных исследований в клинической и экспериментальной медицине.*— Новосибирск, 1980.— С. 96—98.
9. Bilheimer D. W., Eisenberg S., Levy R. I. // *Biochim. biophys. Acta.*— 1972.— Vol. 260.— P. 212—221.
10. Droehnans P., Wanson J., Mosselmans R. // *J. Cell Biol.*— 1975.— Vol. 66.— P. 1—22.
11. Hatch F., Lees R. // *Advanc. Lipid Res.*— 1968.— Vol. 654.— P. 2—68.
12. Kondo H., Saito K., Grasso J., Aisen P. // *Hepatology.*— 1988.— Vol. 8.— P. 32—38.
13. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. // *J. biol. Chem.*— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
14. Mans R. J., Novelli G. D. // *Biochem. biophys. Res. Commun.*— 1960.— Vol. 3.— P. 540—543.
15. Mans R. J., Novelli G. D. // *Arch. Biochem.*— 1961.— Vol. 94.— P. 48—53.
16. Sawyer N. G., Oliver J. T., Troop R. S. // *Steroids.*— 1963.— Vol. 2.— P. 213—227.
17. Seglen P. // *Methods of Cell Biology.*— New York, 1988.— Vol. 13.— P. 30—83.
18. Tavassoli M., Kishimoto T., Soda R. et al. // *Exp. Cell. Res.*— 1986.— Vol. 165.— P. 369—379.

Поступила 18.05.93

ROLE OF KUPFFER CELLS IN REGULATION OF PROTEIN SYNTHESIS IN HEPATOCYTES

L. E. Panin, I. F. Usynin, A. V. Kharkovsky, O. M. Trubitsina

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

Importance of nonparenchymal liver cells for regulation of protein synthesis in hepatocytes was studied using liver cell culture and co-culture. The rate of protein synthesis was increased in hepatocytes during simultaneous cultivation of these cells with nonparenchymal elements. Activation of protein synthesis was distinctly higher in hepatocytes co-cultivated with nonparenchymal liver cells isolated from liver tissue of rats stimulated by bacterial lipopolysaccharide. Similar results were obtained after cultivation of hepatocytes in the conditioned medium containing nonparenchymal liver cells treated with lipopolysaccharide, high density lipoproteine (HDL) and hydrocortisone. The data obtained suggest that nonparenchymal liver cells, especially Kupffer cells, contributed to regulation of protein synthesis in hepatocytes. The cooperative effect of HDL and glucocorticoids in stimulation of the mononuclear phagocytes system appears to be mainly responsible for augmented expression of genes in hepatocytes.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 615.31:547.495.41.015.4:616.361.076.9

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

ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ РЕПАРАЦИИ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК, ВЫЗВАННЫХ N-МЕТИЛ-N-НИТРОЗОМОЧЕВИНОЙ В УСЛОВИЯХ АКТИВИРОВАННОГО БИОСИНТЕЗА НАД В ПЕЧЕНИ КРЫС

Со времени обнаружения взаимосвязи между поли-АДФ-рибозилированием и репарацией ДНК установлено, что при массовых повреждениях ДНК происходит значительное увеличение поли(АДФР) полимеразной активности, вследствие чего интенсивно снижается внутриклеточная концентрация НАД [5]. При этом происходит замедление или окончательная остановка процесса репарации. Достаточно большое число экспериментаторов пред-

полагают, что именно истощение содержания НАД является причиной гибели поврежденных клеток живого организма, поскольку, как показано рядом авторов, добавление никотинамида, основного предшественника биосинтеза НАД, в питательную среду клеток мышей L1210 и лимфоцитов человека перед облучением увеличивает уровень репаративного синтеза ДНК, предотвращая критическое состояние клеток [6, 9].

Повышение количества НАД в клетке сопровождается активацией процесса построения полимера АДФ-рибозы [2], однако какую роль играет этот факт в процессе репарации, неизвестно. Некоторые исследователи считают, что поли-АДФ-рибоза может модифицировать структуру хроматина, повышая или снижая активность ферментов репарации, изменяя при этом эффективность процесса в целом. И хотя имеется множество доказательств положительного влияния поли-АДФ-рибозилирования на процесс восстановления ДНК в системе *in vitro* или интактных клетках [14, 16], определено, что некоторые ингибиторы поли(АДФР) полимеразы (среди которых имеются и предшественники НАД) способны повышать уровень синтеза ДНК [10]. Однако данные литературы по этому вопросу противоречивы [8, 13], и роль поли-АДФ-рибозилирования в процессе репарации до сих пор неясна.

Исходя из этого, в данной работе мы изучали изменение основных репаративных процессов и поли(АДФР) полимеразной активности в условиях активированного биосинтеза НАД в печени крыс при восстановлении ДНК от повреждений, индуцированных N-метил-N-нитрозомочевинной (МНМ).

Методика. Опыты проводили на белых крысах-самцах массой 120—150 г. Для стимуляции биосинтеза НАД крысам вводили внутривенно никотинамид из расчета 500 мг на 1 кг массы тела животного [3]. Контрольной группе таким же образом вводили физиологический раствор.

Для индукции повреждений ДНК измельченную ткань печени обрабатывали МНМ (100 мкг мутагена на 10 мл среды) и инкубировали в среде Хенкса 30 мин при 37 °С. Контроль за уровнем НАД, эндогенной нуклеазной активностью, активностями поли(АДФР) полимеразы и ДНК-зависимой-ДНК-полимеразы β , состоянием поврежденной ДНК проводили через каждые 5 мин инкубации.

Содержание синтезированного НАД определяли в гомогенатах печени по специфическому его восстановлению в реакции окисления этанола в ацетальдегид при участии дрожжевой алкогольдегидрогеназы [12]. Ядра получали по методу Пенниала [15].

Активность эндогенных нуклеаз определяли по методу [4], основываясь на соотношении экстинций при 260 нм кислоторастворимой и кислотонерастворимой фракций аликвот инкубационной смеси ядер.

Активность поли(АДФР) полимеразы определяли по связыванию ^{14}C -НАД (удельная активность 11 МБк/ммоль; «Amersham», Англия) с кислотонерастворимым материалом ядер. При этом использовали мембранные фильтры «Сынпор» с диаметром пор 0,4 мкм [17].

Для определения активности ДНК-зависимой-ДНК-полимеразы β полученные ядра ресуспендировали в буфере, который содержал 0,05 М трис-HCl pH 7,5, 15 мМ KCl, 8 мМ MgCl₂, 2 мМ ЭДТА,

Интенсивность поли-АДФ-рибозилирования при изменении содержания НАД в печени крыс в процессе восстановительной инкубации ткани печени после обработки МНМ ($n=5$)

Время инкубации, мин	Содержание НАД, нмоль на 1 г ткани		Активность поли(АДФР)полимеразы, нмоль · 10 ⁻⁹ в 1 мин на 1 мг белка	
	контроль	опыт	контроль	опыт
0 (без МНМ)	609 ± 99	2245 ± 100	2,456 ± 0,065	3,452 ± 0,036*
5	427 ± 51	761 ± 30	2,503 ± 0,027	3,228 ± 0,034*
10	425 ± 27	726 ± 18	2,381 ± 0,078	2,899 ± 0,056**
15	379 ± 48	570 ± 37	2,361 ± 0,030	2,663 ± 0,042**
20	362 ± 50	366 ± 39	1,724 ± 0,073	2,124 ± 0,021**
25	353 ± 9	326 ± 56	1,929 ± 0,055	2,838 ± 0,085**

Примечание. Здесь и в табл. 2: одна звездочка — $p < 0,001$, две — $p < 0,01$.

15 % глицерин, 0,1 мМ PMSF, 1 мМ дитиотреитол. Реакцию синтеза проводили по методу [6] при наличии в инкубационной среде 0,04 М гидрохлоридной кислоты, 0,015 мМ АТФ, 0,03 мМ ГТФ, 0,03 мМ ЦТФ, 0,03 мМ ТТФ и 0,03 мМ дезокси-(8-³H)-аденозин-5-трифосфата (удельная активность 910 МБк/моль). Радиоактивность подсчитывали на жидкостном сцинтилляционном счетчике SL-20 («Intertechnique», Франция).

Количество одонитевых фрагментов ДНК определяли с помощью хроматографии на гидроксиапатите. Клеточные лизаты наносили на колонку с гидроксиапатитом, уравнированную 0,01 М фосфатным буфером pH 6,8, отмывали 2 объемами 0,01 М и 4 объемами 0,06 М фосфатного буфера. Одонитевую ДНК элюировали 0,12 М фосфатным буфером, двунитевую — 0,48 М. В собранных фракциях определяли количество ДНК, которое выражали в процентном соотношении выхода одонитевой ДНК к общему выходу ДНК с гидроксиапатита [1]. Белок определяли по методу Бредфорда [7].

Результаты и обсуждение. В настоящее время доказана взаимосвязь процессов репарации повреждений ДНК и поли-АДФ-рибозилирования ядерных белков [18]. При недостатке в клетках НАД, субстрата поли-АДФ-рибозилирования, репарационные процессы нарушаются [11]. При исследовании механизма регуляции интенсивности репарации ДНК в животных клетках мы использовали ткань печени крыс с повышенным содержанием НАД, которое создавали путем стимуляции его биосинтеза никотинамидом. Через 3 ч после введения никотинамида внутрибрюшинно крыс декапитировали и измельченную ткань печени инкубировали в среде, содержащей МНМ. Таким образом, у подопытных животных содержание НАД в печени превышало контрольный уровень более чем в 3 раза (табл. 1, 2). Через 5 мин инкубации

после обработки мутагеном отмечается снижение содержания НАД в контроле на 33 %, а в ткани печени опытной группы — на 66 %. В печени животных опытной группы содержание НАД сохраняется значительно повышенным на протяжении 20 мин инкубации, а затем снижается до контрольного уровня, т. е. в клетках печени наблюдается изменение содержания НАД в соответствии с развитием репарационных процессов, а также освобождение клеток на протяжении первых 5 мин инкубации от избытка НАД, возможно, за счет его гликогидролазного расщепления.

Поскольку в данной постановке эксперимента не отмечено резкого повышения поли(АДФР)полимеразной активности ядер (см. табл. 1), вполне вероятно, что для прохождения репаративных процессов используется энергия гликозидной связи НАД или же при разрушении избытка НАД поли(АДФР)полимеразная активность частично ингибируется освобожденным никотинамидом.

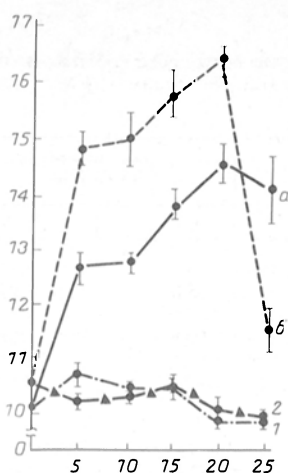
Об интенсивности и качестве процессов репарации ДНК в условиях эксперимента судили по количеству одонитевых фрагментов ДНК, нуклеазной активности ядер, а также изменению β-ДНК-полимеразной активности.

На рис. 1 показано изменение количества одонитевых фрагментов ДНК во время инкубации ткани печени при восстановлении повреждений, индуцированных МНМ, в контроле и на фоне активированного биосинтеза НАД. Как видно на рис. 1, в условиях повышенного по сравнению с контролем содержания НАД в печени крыс образование одонитевых фрагментов ДНК в начале периода восстановления проходит более интенсивно. Их количество возрастает к 20-й минуте инкубации, а затем снижается до начального уровня. В то же время в печени контрольной группы крыс происходит медленное накопление одонитевых фрагментов ДНК, которое достигает максимума к 20-й

Таблица 2

Интенсивность синтеза ДНК при изменении содержания НАД в печени крыс в процессе восстановительной инкубации ткани печени после обработки МНМ ($n=5$)

Время инкубации, мин	Содержание НАД, нмоль на 1 г ткани		Активность ДНК-зависимой-ДНК-полимеразы β, нмоль · 10 ⁻⁹ мин на 1 мг ДНК	
	контроль	опыт	контроль	опыт
0 (без МНМ)	609 ± 99	2245 ± 100	4,218 ± 0,300	11,186 ± 0,222*
5	427 ± 51	761 ± 30	24,206 ± 1,007	64,146 ± 0,830*
10	425 ± 27	726 ± 18	20,355 ± 0,932	31,358 ± 0,215**
15	379 ± 48	570 ± 37	19,805 ± 0,278	35,209 ± 2,100**
20	362 ± 50	366 ± 39	25,416 ± 1,325	38,326 ± 0,453**
25	353 ± 9	326 ± 56	21,822 ± 0,093	29,707 ± 0,951**



Количество одонитевых фрагментов ДНК в процессе восстановления повреждений, индуцированных МНМ, при инкубации ткани печени крыс в среде Хенкса при 37 °C в контроле (а) и на фоне активированного биосинтеза НАД (б).

По оси абсцисс — время инкубации, мин; по оси ординат — количество одонитевых фрагментов ДНК, % по отношению к общему количеству ДНК, элированного с гидроксипатита. Здесь и на рис. 2: 1 — контрольная группа, 2 — опытная группа (не обработанная мутагеном).

минуте инкубации. При этом уровень НАД в контрольной и опытной группах животных после 20 мин инкубации становится практически одинаковым. Таким образом, значительное повышение по сравнению с контролем содержания НАД на первых этапах инкубации в печени животных опытной группы сопровождается активацией процессов репарации, что приводит к снижению количества одонитевых фрагментов ДНК до исходного уровня.

Как известно, степень разрушения ДНК, вычисленная из процентного соотношения количества кислоторастворимой и кислотонерастворимой фракций ДНК ядер свидетельствует о нуклеазной активности (рис. 2). В условиях повышенного содержания НАД в печени через 5 мин инкубации происходит значительное (на 25 %) повышение количества кислоторастворимого материала ДНК в сравнении с контролем, что свидетельствует о дополнительной активации нуклеаз в этих условиях. Максимум нуклеазной активности ядер печени крыс

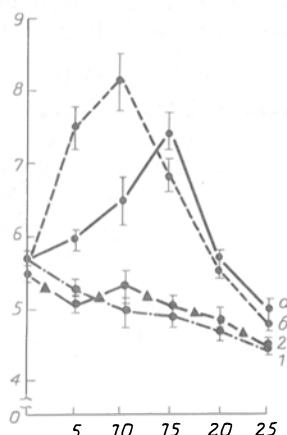


Рис. 2. Динамика изменения эндонуклеазной активности в процессе восстановления ДНК от повреждений, индуцированных МНМ, при инкубации ткани печени крыс контрольной группы (а) и с повышенным содержанием НАД (б) в среде Хенкса при 37 °C.

По оси абсцисс — время инкубации, мин; по оси ординат — % соотношения экстиций при 260 нм кислоторастворимой и кислотонерастворимой фракций ДНК, гидролизованной в условиях активации нуклеаз.

опытной группы наблюдается через 10 мин инкубации после обработки ткани МНМ, а затем происходит стремительное ее снижение к 25-й минуте инкубации. В отличие от этого в ядрах печени животных контрольной группы максимум нуклеазной активности наблюдается через 15 мин инкубации.

Об интенсивности этапа восстановительного синтеза ДНК в условиях повышенного содержания НАД в печени судили по активности ДНК-зависимой-ДНК-полимеразы β (см. табл. 2). В ядрах печени животных контрольной группы ДНК-полимеразная активность достигает максимального значения через 5 мин после обработки мутагеном и на протяжении всего периода инкубации превосходит свое начальное значение. Характерно, что на протяжении 5 мин после начала инкубации клетки печени удаляют избыток синтезированного НАД. При повышенном по сравнению с контролем содержании НАД в печени максимальное значение ДНК-полимеразной активности также достигается через 5 мин после обработки ткани мутагеном и на протяжении всего времени инкубации почти в 1,5 раза превышает активность фермента в контроле. Таким образом, в условиях повышенного содержания НАД в печени крыс наблюдается увеличение интенсивности репаративного синтеза ДНК по сравнению с контролем. Полученные нами данные свидетельствуют об активации процессов образования одонитевых фрагментов ДНК (эксцизии) и репаративного синтеза ДНК в условиях повышенного содержания НАД в печени крыс. Однако для выяснения регуляторной роли НАД в процессах репарации на уровне ткани необходимы дополнительные исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Засухина Г. Д., Бараинев Ю. И., Васильева И. М. и др. // Радиобиология. — 1982. — Т. 22, № 5. — С. 654—658.
2. Мулявко Н. А., Халмурадов А. Г. // Биохимия. — 1984. — Т. 49, № 10. — С. 1623—1627.
3. Халмурадов А. Г. О метаболизме никотиновой кислоты и 3-метилпиридина в тканях животных и его регуляции: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — Киев, 1974.
4. Ходарев Н. Н., Ворпун И. И., Дебов С. С. // Вопр. мед. химии. — 1981. — № 4. — С. 538—544.
5. Benjamin R. C., Gill D. M. // J. biol. Chem. — 1980. — Vol. 255. — P. 10508—10508.
6. Berger N. A., Sikorski G. W. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1980. — Vol. 95, N 1. — P. 67—72.
7. Bradford M. M. // Analyt. Biochem. — 1976. — Vol. 72. — P. 248—254.
8. Collins A. // Carcinogenesis. — 1985. — Vol. 6, N 7. — P. 1033—1036.
9. Durkacz B. W., Onidiji O., Cray D. A., Shall S. // Nature. — 1980. — Vol. 283. — P. 594—596.
10. Durkacz B. W., Irwin J., Shall S. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1981. — Vol. 101, N 4. — P. 1433—1441.
11. Gaal J. C., Pearson C. K. // Biochem. J. — 1985. — Vol. 230. — P. 1—18.
12. Kirchner J., Watson J., Chaykin S. // J. biol. Chem. — 1966. — Vol. 241, N 3. — P. 851—856.
13. Klocker H., Burtcher H. J., Auer B. et al. // Naturwissenschaften. — 1983. — Bd 70, N 2. — S. 93—94.
14. de Murcia G., Huletsky A., Poirier G. C. // Biochem. Cell Biol. — 1988. — Vol. 66, N 6. — P. 626—635.
15. Pennial R., Saunders J., Lin S. H. // Biochemistry (Wash.). — 1964. — Vol. 3, N 10. — P. 1454—1459.
16. Shall S. // Advanc. Radiat. Biol. — 1984. — Vol. 11. — P. 1—69.
17. Stone P. R., Lorimez W. S., Kidwell W. R. // Europ. J. Biochem. — 1977. — Vol. 81, N 1. — P. 9—18.
18. Ueda K., Hayashi O. // Ann. Rev. Biochem. — 1985. — Vol. 54. — P. 73—100.

Поступила 24.05.93

THE DYNAMICS OF DNA BREAKS REPAIR AFTER N-METHYL-N-NITROSE UREA TREATMENT CARRIED OUT IN SIMULTANEOUS STIMULATION OF NAD BIOSYNTHESIS IN RAT LIVER TISSUE

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

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

Dynamics of the DNA main reparative reactions was studied in rat liver tissue after N-methyl-N-nitrose urea treatment and simultaneous stimulation of NAD biosynthesis in order to evaluate the interrelationship between DNA repair and poly-ADP-ribosylation. Treatment of liver tissue with the mutagen was followed by the preparations incubation in Hanks solution within 30 min at 37°. During the initial steps of restoration an increase in amount of DNA breaks proved to occur in liver tissue of the experimental animals as compared with controls; these deteriorations were decreased down to initial level to the final steps of incubation, while content of breaks in single-strand DNA remained to be high in liver tissue of control animals. The intensive rate of DNA repair in rat liver tissue containing high level of NAD correlated with an increase in nuclear endonuclease and DNA-dependent-DNA- β -polymerase activities. At the same time, the activity of poly-ADP-ribosyl polymerase was only slightly altered during all the steps of the tissue repair studied.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 615.357:577.175.522].015.44.07

А. Е. Медведев, Л. В. Труфанова, В. И. Кулинский РОЛЬ ВНУТРЕННЕЙ МЕМБРАНЫ МИТОХОНДРИЙ В МЕХАНИЗМЕ АКТИВАЦИИ НАД-ИЗОЦИТРАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ КАТЕХОЛАМИНАМИ

НИИ биомедицинской химии РАМН, Москва, Красноярский медицинский институт, Иркутский медицинский институт

цАМФ-зависимая активация катехоламинами ключевого фермента цикла трикарбоновых кислот НАД-изоцитратдегидрогеназы (НАД-ИЦДГ; КФ 1.1.1.41) была обнаружена около 20 лет назад [4]. Получены данные в пользу важного значения этого механизма регуляции (в числе других окислительных функций митохондрий) для выживания организма при охлаждении [3]. Сохранение активности после солюбилизации митохондрий детергентом свидетельствует об изменении каталитических свойств самого фермента [14]. Гомогенная НАД-ИЦДГ не фосфорилируется различными препаратами цАМФ-зависимой протеинкиназы (включая митохондриальный) и не активируется при инкубации с ними [2]. Следовательно, вызванное катехоламинами и цАМФ увеличение активности НАД-ИЦДГ обусловлено не химической модификацией фермента, а является результатом действия иных регуляторных механизмов.

В последнее время накоплен значительный материал о регуляции ряда ферментов матрикса путем взаимодействия с внутренней мембраной митохондрий [5, 10, 22], об образовании надмолекулярных комплексов ферментов цикла трикарбоновых кислот, фиксированных на внутренней мембране [5, 10, 22]. Есть данные и о локализации НАД-ИЦДГ вблизи внутренней мембраны [15].

Целью настоящего исследования было изучение роли внутренней мембраны в механизме активации НАД-ИЦДГ катехоламинами.

Методика. Работа выполнена на 130 крысах линии Вистар обоего пола массой 200—250 г.

Таблица 1

Распределение активности НАД-ИЦДГ и белка при фракционировании митохондрий, подвергнутых ультразвуковой обработке

Фракции	Активность НАД-ИЦДГ		Количество белка во фракции, мг
	удельная	общая	
Озвученные митохондрии	$5,8 \pm 0,7$	$479,4 \pm 46,3$	$83,5 \pm 4,4$ (100 \pm 5)
Надосадов, 120 000g	$10,9 \pm 0,9$	$587,2 \pm 72,0$	$53,3 \pm 2,4$ (64 \pm 3)
СМЧ	0	0	$25,3 \pm 1,6$ (31 \pm 3)

Примечание. Удельная активность выражена в наномолях в 1 мин на 1 мг белка, общая — в наномолях в 1 мин. Значимость различий общей активности фермента в озвученных митохондриях и в надосадовой жидкости ($p < 0,05$) оценивали, используя критерий t Стьюдента для связанных выборок. Представлены средние значения из 5 опытов. В скобках — процент.

Животных наркотизировали внутривенной инъекцией тиопентал-натрия (50 мг/кг). Адреналин (5,5 мкмоль/кг) вводили подкожно за 10 или 20 мин до декапитации животных. Содержание цАМФ в печени определяли (после обработки жидким азотом) с помощью радиоиммунохимических наборов («Institute for research production and applications of radioisotopes», Чехо-Словакия). Митохондрии из печени выделяли методом дифференциального центрифугирования в среде, содержащей 0,25 М сахарозу, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ трис-HCl-буфер pH 7,5 [18], и однократно промывали в среде того же состава. При определении содержания цАМФ в митохондриях последние подвергали однократному замораживанию — оттаиванию и дополнительной очистке с использованием 0,05 % раствора дигитонина [18]. Выделение митопластов (митохондрий, лишенных внешней мембраны и межмембранного пространства) проводили путем обработки митохондрий дигитонином [18] с незначительными изменениями, описанными ранее [1]. Суспензию митохондрий или митопластов (концентрация белка 20 мг/мл) подвергали ультразвуковой обработке с использованием охлаждающей смеси лед/соль [18]. Неразрушенные органеллы осаждали при 18 000 g в течение 7 мин.

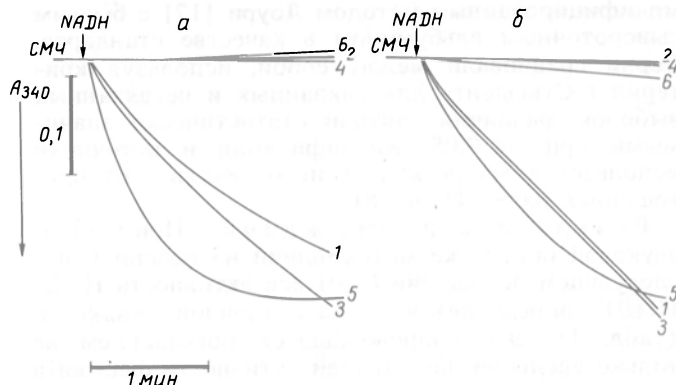


Рис. 1. Окисление НАДН в присутствии СМЧ, полученных после ультразвуковой обработки митохондрий (а) и митопластов (б).

Окисление НАДН регистрировали спектрофотометрически по уменьшению оптической плотности при 340 нм. 1 — 1 мг СМЧ, 0,1 мМ НАДН; 2 — то же в присутствии 3 мМ цианида; 3 — 1 мг СМЧ, 0,25 мМ НАДН; 4 — то же в присутствии 3 мМ цианида; 5 — 5 мг СМЧ, 0,1 мМ НАДН; 6 — то же в присутствии 3 мМ цианида.

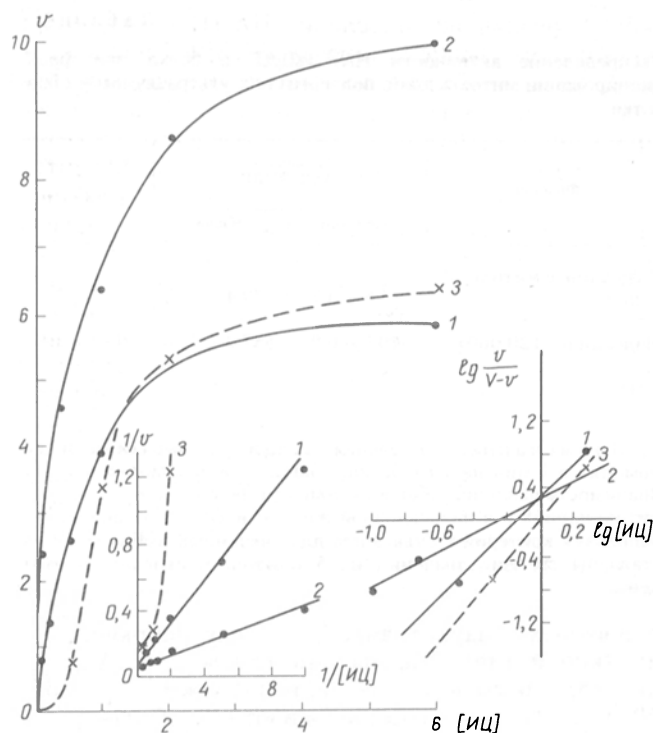


Рис. 2. Влияние фракционирования озвученных митохондрий и добавления СМЧ к надосадочной жидкости на зависимость скорости НАД-ИЦДГ-реакции от концентрации изоцитрата.

1 — озвученные митохондрии; 2 — надосадочная жидкость после осаждения СМЧ; 3 — добавление СМЧ к надосадочной жидкости (2 мг/мл).

Полученные таким образом озвученные митохондрии или митопласты центрифугировали для осаждения субмитохондриальных частиц (СМЧ): митохондрии — при 120 000 g, 70 мин, митопласты — при 144 000 g, 70 мин [18]. В ряде случаев для освобождения от матрикса митохондрии и митоласты подвергали процедуре осмотического шока [8]. Окисление НАДН в присутствии СМЧ определяли спектрофотометрически по убыли оптической плотности при 340 нм в 0,2 М калий-фосфатном буфере pH 7,4. Активность НАД-ИЦДГ регистрировали спектрофотометрически при 340 нм по накоплению НАДН [11]. Среда измерения содержала 0,2 М калий-фосфатный буфер pH 7,4, 8 мМ $MgCl_2$, 2 мМ НАД, 6 мМ изоцитрат, 3 мМ цианид калия. Белок определяли биуретовым методом [12] или модифицированным методом Лоури [17] с бычьим сывороточным альбумином в качестве стандарта. Серии сравнивали между собой, используя критерий *t* Стьюдента для связанных и несвязанных выборок, различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Квалификация и источники использованных реактивов не отличались от приведенных ранее [1, 6—8].

Результаты и обсуждение. При ультразвуковой обработке митохондрий из печени и последующем осаждении СМЧ вся активность НАД-ИЦДГ определяется в надосадочной жидкости (табл. 1). Это сопровождается повышением не только удельной, но и общей активности фермента ($+22 \pm 5\%$; $p < 0,05$), что нельзя объяснить простым освобождением от мембранных белков при центрифугировании. Распределение белка между надосадочной жидкостью и СМЧ соответствует данным, полученным в других лабораториях [22]. Очевидно, присутствие СМЧ в озвученных митохондриях оказывает ингибиторное влияние на

НАД-ИЦДГ, исчезающее при их осаждении. Добавление СМЧ из митохондрий к надосадочной жидкости ингибирует активность НАД-ИЦДГ; подобное воздействие оказывают и СМЧ, полученные после ультразвуковой обработки митоластов. При соотношении белка надосадочной жидкости и СМЧ 1:2 торможение активности фермента в обоих случаях составило -42 ± 3 и $-48 \pm 2\%$ соответственно ($p < 0,01$ в обоих случаях). Мембранные препараты, полученные после осмотического шока митохондрий и митоластов, не содержат активности ИЦДГ и при добавлении в тех же соотношениях к надосадочной жидкости не влияют на активность НАД-ИЦДГ (-4 ± 3 и $-2 \pm 3\%$ соответственно; $p > 0,5-0,8$). Ультразвуковая обработка митохондрий (но не осмотический шок) приводит к формированию вывернутых изнутри наружу СМЧ таким образом, что снаружи оказывается внутренняя поверхность внутренней мембраны [9, 18]. Вывернутую ориентацию внутренней мембраны в СМЧ оценивали по процентному соотношению их дыхания на сукцинате без и с цитохромом *c* [18]. В наших опытах она составила 93 и 95 % для СМЧ из митохондрий и митоластов соответственно. Кроме того, выделенные СМЧ характеризуются возможностью прямого измерения активности фермента внутренней мембраны НАДФ-трансгидрогеназы (КФ 1.6.1.1), каталитический центр которого обращен в матрикс [20]. Тритон X-100 не освобождает латентную активность этого фермента (соотношение активности НАДФ-трансгидрогеназы, измеренной без и с детергентом, составило 95 %), что служит хорошим критерием одинаковой ориентации молекул фермента в мембране [21] и поэтому ориентации самих мембран митохондрий. Таким образом, среди исследованных мембран, способностью ингибировать активность НАД-ИЦДГ обладает только внутренняя сторона внутренней мембраны. Важно отметить, что ингибиторное действие внутренней мембраны не обусловлено маскировкой активности фермента за счет окисления НАДН в дыхательной цепи (по накоплению которого судили об активности НАД-ИЦДГ). Об этом свидетельствует тот факт, что 3 мМ цианид, присутствующий в среде измерения, полностью предотвращает окисление НАДН в присутствии СМЧ (рис. 1). По видимому, наблюдаемые изменения активности НАД-ИЦДГ отражают специфическое взаимодействие с внутренней мембраной. Одним из важных следствий специфических взаимодействий принято считать изменение кинетических характеристик ферментов [10]. По нашим данным, фракционирование озвученных митохондрий и добавление СМЧ к надосадочной жидкости (при соотношении белка надосадочной жидкости и СМЧ 1:2) оказывают существенное влияние на кинетические свойства НАД-ИЦДГ (рис. 2), вызывая изменения V , K_m и коэффициента Хилла. Отметим, что различия кинетического поведения и кальциевой регуляции НАД-ИЦДГ были обнаружены и в перемализованных толуолом митохондриях из сердца крысы по сравнению с экстрактом митохондрий [19].

Таким образом, проведенные результаты свидетельствуют в пользу взаимодействия НАД-ИЦДГ с внутренней мембраной митохондрий, которое, помимо питания дыхательной цепи восстанови-

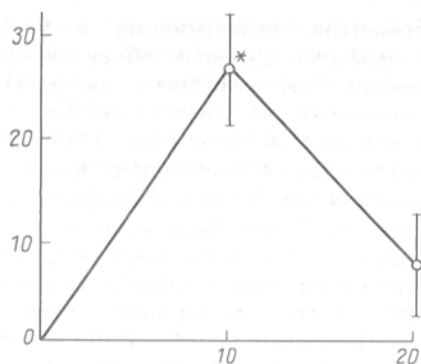


Рис. 3. Влияние адреналина на содержание цАМФ в печени крысы.

По оси абсцисс — время после инъекции, мин; по оси ординат — прирост уровня цАМФ по отношению к контролю, %. Контролем служили крысы, которым за 10 или 20 мин вводили дистиллированную воду. Звездочкой указана значимость различий ($p < 0,02$) по отношению к контролю.

тельными эквивалентами, имеет, очевидно, и регуляторное значение.

Инъекция адреналина крысам вызывает к 10-й минуте увеличение содержания цАМФ в печени ($p < 0,02$), которое к 20-й минуте практически снижается до уровня контроля (рис. 3). Содержание цАМФ в митохондриях, по данным 10 опытов, через 10 мин после инъекции адреналина ($0,76 \pm 0,11$ пмоль на 1 мг белка) значительно превышало контрольные значения ($0,30 \pm 0,06$ пмоль/мг; $p < 0,01$). Поскольку в этих экспериментах митохондрии подвергали замораживанию — оттаиванию (для освобождения от белков матрикса), указанные величины, возможно, характеризуют накопление цАМФ именно в мембранах митохондрий.

Инъекция адреналина крысам к 20-й минуте увеличивает активность НАД-ИЦДГ при измерении ее в озвученных митохондриях и митопластах (табл. 2). В параллельных экспериментах активация фермента обнаружена и в солюбилизованных 1 % раствором тритона X-100 митохондриях ($+22 \pm 4$ %; $p < 0,05$), что подтверждает наши предыдущие данные [4, 14]. Осаждение СМЧ приводит к исчезновению активации фермента: активность НАД-ИЦДГ в надосадочной жидкости в контроле и при инъекции адреналина крысам полностью совпадает. В СМЧ обнаружены активация НАДФ-трансгидрогеназы ($+30 \pm 8$ %; $p <$

$< 0,01$), увеличение окисления НАДН ($+44 \pm 9$ %; $p < 0,01$), окисление аскорбата + ТМФД под действием адреналина не изменяется, что согласуется с представлениями о том, что точка (или точки) приложения эффектов гормонов (глюкагона и катехоламинов) на функции дыхательной цепи митохондрий находится до комплекса IV [13]. Ранее было показано, что активация трансгидрогеназы катехоламинами сопровождается повышением ее чувствительности к ряду ингибиторных воздействий [6]. Все это, очевидно, свидетельствует об индуцированном инъекцией адреналина изменении свойств внутренней мембраны митохондрий.

Таким образом, увеличение каталитической активности НАД-ИЦДГ, наблюдаемое в озвученных митохондриях и митопластах, по-видимому, обусловлено изменением взаимодействия с внутренней мембраной, модифицированной в ходе стимуляции митохондрий катехоламинами. На основании представленного материала можно предположить, что вызванное адреналином изменение свойств внутренней мембраны ослабляет ингибирование НАД-ИЦДГ. Разница в ингибиторном влиянии в контроле и при стимуляции катехоламинами и расценивается как активация. В 6 экспериментах мы обнаружили, что СМЧ из митопластов печени активированных адреналином крыс, добавленные к матриксу, оказывают меньший (на 28 ± 10 %; $p \leq 0,05$) ингибиторный эффект по сравнению с СМЧ из митопластов печени intactных животных. Это служит доводом в пользу нашего предположения.

Следует отметить, что НАД-ИЦДГ не единственный фермент матрикса, для которого внутренняя мембрана является главным фактором, опосредующим изменение активности при срочной гормональной регуляции митохондрий. Ранее получены данные в пользу существенной роли внутренней мембраны в механизме активации глутаминазы глюкагоном [16], действие которого на функции митохондрий реализуется цАМФ-зависимым путем [13].

Полученные результаты позволяют наиболее просто объяснить предупреждение цАМФ-зависимой стимуляции ферментов внутренней мембраны и матрикса такими мембранотропными соединениями, как лидокаин и аминазин [7]. Именно влияние различных веществ (в том числе и лекарств) на мембраны митохондрий, по-видимому, определяет восприимчивость ферментных систем этих органелл к различным регуляторным воздействиям в норме и особенно при патологических состояниях.

Авторы благодарны И. А. Ольховскому за помощь в проведении полярографических экспериментов.

Таблица 2

Влияние адреналина на активность НАД-ИЦДГ, измеренную при фракционировании митохондрий и митопластов, подвергнутых ультразвуковой обработке

Объект исследования	Условия опыта	Активность НАД-ИЦДГ, измеренная	
		в озвученном препарате	в надосадке, 120 000 г
Митохондрии	Контроль	$6,2 \pm 0,4$ (13)	$10,3 \pm 1,0$ (5)
	Адреналин	$8,5 \pm 0,7$ (13)	$10,2 \pm 0,2$ (5)
	p	$< 0,01$	$> 0,9$
Митопласты	Контроль	$7,5 \pm 0,5$ (9)	$12,1 \pm 1,1$ (8)
	Адреналин	$9,1 \pm 0,5$ (9)	$12,8 \pm 1,3$ (8)
	p	$< 0,05$	$> 0,6$

Примечание. Активность выражена в наномолях в 1 мин на 1 мг белка. В скобках — число опытов.

ЛИТЕРАТУРА

- Кулинский В. И., Зобова Н. В. // Биохимия. — 1985. — Т. 50, № 9. — С. 1546—1552.
- Кулинский В. И., Колпакова Т. В. // Бюл. exper. биол. — 1984. — № 8. — С. 188—189.
- Кулинский В. И., Медведев А. Е., Куцевич А. К. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 5. — С. 84—88.
- Кулинский В. И., Труфанова Л. В. // Докл. АН СССР. — 1975. — Т. 224, № 6. — С. 1439—1441.
- Любарев А. Е., Курганов Б. И. // Молекулярные механизмы и регуляция энергетического обмена. — Пущино, 1987. — С. 55—66.

6. Медведев А. Е. // Биол. мембраны.— 1987.— Т. 4, № 4.— С. 426—431.
7. Медведев А. Е. // Вопр. мед. химии.— 1990.— № 6.— С. 74—76.
8. Медведев А. Е., Труфанова Л. В., Кулинский В. И. // Биохимия.— 1986.— Т. 51, № 7.— С. 1165—1173.
9. Скулачев В. П. Трансформация энергии в биомембранах.— М., 1972.— С. 23—75.
10. Фридрих П. Ферменты: четвертичная структура и надмолекулярные комплексы.— М., 1986.— С. 160—230.
11. Goebell H., Klingenberg M. // Biochem. Z.— 1964.— Bd 340, N 4.— S. 441—464.
12. Gornall A. G., Bardawill C. I., David M. M. // J. biol. Chem.— 1949.— Vol. 177.— P. 751—766.
13. Halestrap A. P., Armston A. E., Quinlan P. T., Whipps D. E. // Horm. Cell. Regulat.— 1983.— Vol. 7.— P. 185—200.
14. Kulinsky V. I., Trifanova L. V., Medvedev A. E. // FEBS Lett.— 1984.— Vol. 177, N 1.— P. 143—145.
15. Matlib M. A., O'Brien P. J. // Arch. Biochem.— 1975.— Vol. 167, N 1.— P. 193—202.
16. McGivan J. D., Bradford N. M. // Biochem. Soc. Trans.— 1985.— Vol. 13.— P. 737—738.
17. Ohnishi T., Barr J. K. // Analyt. Biochem.— 1978.— Vol. 86, N 1.— P. 193—200.
18. Pedersen P. L., Greenawalt J. W., Reynafarje B. et al. // Meth. Cell. Biol.— 1978.— Vol. 20.— P. 411—481.
19. Rutter G. A., Denton R. M. // Biochem. J.— 1988.— Vol. 252, N 1.— P. 181—189.
20. Rydstrom J. // Biochim. biophys. Acta.— 1977.— Vol. 463, N 2.— P. 155—184.
21. Rydstrom J. // J. biol. Chem.— 1979.— Vol. 254, N 17.— P. 8611—8619.
22. Srere P. // Organized Multienzyme Systems: Catalytic Properties.— New York, 1985.— P. 1—61.

Поступила 21.05.93

ROLE OF INNER MITOCHONDRIAL MEMBRANE IN CATECHOLAMINE-DEPENDENT ACTIVATION OF NAD-ISOCITRATE DEHYDROGENASE

A. E. Medvedev, L. V. Trufanova, V. I. Kulinsky

Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Medical School, Krasnoyarsk, Medical School, Irkutsk

After ultrasonic treatment of rat liver mitochondria and the following sedimentation of the submitochondrial particles all the NAD-isocitrate dehydrogenase (NAD-ICDH) activity detected occurred in the supernatant fraction. The structures of internal side of the inner mitochondrial membrane proved to regulate the NAD-ICDH activity. Administration of adrenaline into rats stimulated the NAD-ICDH activity by 20-40 % in mitochondria and mitoplasts measured after ultrasonic treatment. Activation of the enzyme was not observed in the supernatant fraction after sedimentation of submitochondrial particles. The data obtained suggest that inner mitochondrial membrane is a factors responsible for regulation of NAD-ICDH activity during cAMP-dependent stimulation of mitochondria by catecholamines.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616.154:577.175.61-092.9-074:543.544

К. В. Свечников, Т. В. Бусыгина, А. В. Осадчук

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕТАБОЛИЗМА СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ И АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ИХ СИНТЕЗА В КЛЕТКАХ ЛЕЙДИГА МЫШЕЙ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск

Изучение особенности продукции половых стероидов в органах и тканях различных видов животных и человека требует определения актив-

ности ферментов, участвующих в их синтезе. Одним из наиболее удобных объектов для изучения ферментов стероидогенеза являются клетки Лейдига — главное место синтеза половых стероидов в мужском организме [7]. В большинстве используемых в настоящее время методик по определению активности ферментов стероидогенеза после инкубации биологического материала с субстратами для последующего разделения стероидов используют тонкослойную хроматографию (ТСХ). Однако этот метод разделения гормонов достаточно трудоемок, требует больших затрат времени и реактивов. Кроме того, ТСХ половых стероидов часто не позволяет разделить за один прием некоторые из них. Так, например, этим методом можно добиться разделения 17 α -прогестерона и тестостерона только после предварительного ацетилирования последнего [6, 10]. В этой связи возник вопрос о возможности использования для разделения стероидных гормонов такого высокопроизводительного метода, как высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). В литературе имеется ряд работ по использованию ВЭЖХ для разделения половых стероидов, однако данные исследования ограничивались лишь количественным определением этих гормонов в органах и тканях [4, 5].

Важно отметить, что большинство исследователей при ВЭЖХ стероидов используют колонки полупрепаративного типа с большим расходом элюента [2, 8]. В доступной литературе мы не обнаружили работ, в которых бы использовался микроколоночный вариант ВЭЖХ половых стероидов, хотя он более экономичен и позволяет уменьшить расход элюентов в 10—20 раз.

В данной работе разработан метод микроколоночной ВЭЖХ половых стероидов по Δ^4 пути, а также исследованы метаболизм этих гормонов и активность ферментов их синтеза в клетках Лейдига двух линий мышей.

Методика. В работе использованы следующие радиоактивные стероиды: [7-(N)- 3 H] прегненолон, [1,2,6,7-(N)- 3 H] прогестерон, [7(N)- 3 H] 17 α -гидроксипрогестерон, [1,2,6,7-(N)- 3 H] андростендион, [4- 14 C] андростендион, [4- 14 C] прегненолон, [4- 14 C] прогестерон, [4- 14 C] 17 α -гидроксипрогестерон и [4]- 14 C] тестостерон (Санкт-Петербург). Перед использованием все препараты были повторно очищены с помощью ВЭЖХ. Чистота гормонов была выше 95 %.

Эксперименты проведены на двух инбредных линиях мышей — А/Не и РТ — в возрасте 3 мес, выращенных в виварии Института цитологии и генетики Сибирского отделения РАН. Животных умерщвляли посредством шейной дислокации, после чего в стерильных условиях выделяли семенники. Выделение клеток Лейдига проводили по методу [12]. Сущность метода заключалась в механическом вымывании клеток Лейдига струей среды Игла, после чего клетки фильтровали через нейлоновый фильтр (величина пор 90 мкм) и центрифугировали при 150 g в течение 5 мин при 20 °С. Клетки ресуспендировали в 2 мл среды Игла, предварительно насыщенной карбогеном (95 % O_2 и 5 % CO_2) и содержащей 0,1 % бычьего сывороточного альбумина (БСА). Очистку клеток Лейдига осуществляли в градиенте перколлы, который приго-

товляли, смешивая 6,5 частей среды Игла, содержащей 0,1 % БСА и 3,5 части перколлы. Нужную осмолярность раствора (340 mOS/kg H₂O) получали добавлением соответствующего количества NaCl. Полученный изотонический раствор перколлы в количестве 10 мл помещали в полиэтиленовые центрифужные пробирки и центрифугировали при 10 000 g в течение 60 мин при 4 °C на центрифуге К-24 с угловым ротором. 1 мл грубой суспензии клеток наслаивали на вершину градиента и центрифугировали при 800 g в течение 20 мин. Клетки Лейдига располагались диффузной полосой в области плотности 1,04—1,06 г/мл, тогда как разрушенные клетки и семенные каналы были сосредоточены в области плотности 1,025—1,035 г/мл, а агрегированные эритроциты располагались на дне пробирки. Клетки Лейдига отсасывали, разводили в 5 мл среды Игла с 0,1 % БСА и центрифугировали при 150 g в течение 5 мин. Осадок клеток повторно промывали в среде Игла — БСА и центрифугировали при 80 g в течение 5 мин.

Подсчет клеток Лейдига проводили в камере Горяева с использованием микроскопа с фазово-контрастной оптикой в среде Игла, содержащей феноловый красный (10 мг/л). Клетки Лейдига в этих условиях дифференцировали от других клеток семенника по их специфическому ярко-желтому свечению [9]. Число клеток Лейдига в суспензии после очистки составляло 70—75 % от общего числа клеток, что согласуется с данными литературы для этого способа очистки [3].

Для определения активности стероидных ферментов клетки Лейдига в количестве $1,25 \cdot 10^5$ кл/мл ($5 \cdot 10^4$ клеток в пробе) инкубировали с соответствующими мечеными и немечеными субстратами в течение 1 ч при 34 °C в атмосфере, содержащей карбоген. Активность 3β-гидроксистероиддегидрогеназы определяли путем измерения превращения [³H] прегненолона до [³H] прогестерона, [³H] 17α-гидроксипрогестерона, [³H] андростендиона и [³H] тестостерона. Инкубацию проводили в пробирках, содержащих [³H] прегненолон ($1,5 \cdot 10^5$ имп/мин) и 10 мкМ немеченого гормона.

17α-Гидроксилазную активность определяли, измеряя превращение [³H] прогестерона до [³H] 17α-гидроксипрогестерона, [³H] андростендиона и [³H] тестостерона. Пробирки для инкубации содержали [³H] прогестерон ($1 \cdot 10^5$ имп/мин) и 10 мкМ немеченого гормона.

Активность C₁₇₋₂₀-лиазы и 17-кетостероидредуктазы определяли по количеству образовавшихся продуктов реакции — [³H] андростендиона и [³H] тестостерона для первого фермента и [³H] тестостерона для второго фермента. Количество меченых и немеченых гормонов было таким же, как при измерении 17α-гидроксилазной активности. Активность ферментов выражали в наномолях на 10⁵ клеток за 1 ч. Концентрация немеченых гормонов 10 мкМ являлась насыщающей для всех исследованных ферментов [6].

Для того чтобы устранить возможное влияние радиолитической метки, параллельно с опытными пробами инкубации подвергали пустые пробы, не содержащие клеток.

По окончании инкубации ферментативные реакции останавливали добавлением 0,1 мл 3 M NaOH.

Для оценки потерь стероидов в пробирки приливали ¹⁴C-стероиды ($3 \cdot 10^3$ имп/мин), соответствующие продуктам реакции. Экстракцию гормонов проводили в пробирках, содержащих 3 мл этилацетата, после чего 2 мл супернатанта переносили в пробирки для выпаривания; сухой остаток стероидов растворяли в 30 мкл 54 % метанола, содержащего немеченые гормоны, выступающие в качестве свидетелей, и 10 мкл раствора хроматографировали.

Хроматографирование половых стероидов проводили на отечественном хроматографе «Милихром». В работе применяли микроколоники типа КАХ-2, 65·2 мм с сорбентом лихросорб RP-18 (Германия), размер частиц 5 мкм. В качестве подвижной фазы использовали 5-ступенчатый градиент, состоящий из 3 компонентов: метанола, ацетонитрила и воды. Соотношение компонентов в каждой ступени градиента по мере возрастания плотности было следующим: 1) 100 % метанол (300 мкл); 2) 80 % метанол (200 мкл); 3) 40,6:17,4:42 (400 мкл); 4) 42:14:44 (700 мкл); 5) 46:8:46 (850 мкл). Скорость потока элюента 100 мкл/мин. Детекцию гормонов проводили в 2-волновом режиме: 210 и 240 нм.

Гормоны по мере выхода из колонки собирали в виалы с диоксановым сцинтиллятором и подсчитывали радиоактивность на счетчике «Delta» (Швеция) по программе «двойная метка». Параллельно в отдельные виалы вносили меченые субстраты по ³H и ¹⁴C в тех же количествах, что и в опытные пробы. Эти гормоны выступали в качестве стандартов.

Расчет активности ферментов проводили в следующей последовательности:

1. Для каждой виалы, содержащей конкретный меченный по ³H и ¹⁴C метаболит, вычисляли полный счет по ³H по формуле

$$^3H_{\text{полн. пр}} = (^3H_{\text{сум. пр}} - K \cdot ^{14}C_{\text{пр}}) \cdot ^{14}C_{\text{станд}} \cdot \frac{1}{^{14}C_{\text{пр}}},$$

где ³H_{сум. пр} — суммарный (исходный) счет пробы по ³H (в имп/мин); ¹⁴C_{пр} — счет пробы по ¹⁴C (в имп/мин); K — коэффициент, показывающий, какая часть импульсов ¹⁴C попадает в ³H-канал. Для используемого счетчика — 0,19; ¹⁴C_{станд.} — счет стандарта соответствующего метаболита по ¹⁴C (в имп/мин).

2. Аналогичным способом вычисляли полный счет по ³H пустой пробы и рассчитывали скорректированный счет по ³H по формуле:

$$^3H_{\text{корр. пр}} = ^3H_{\text{полн. пр}} - ^3H_{\text{полн. п. пр}}$$

где ³H_{полн. пр.} — полный счет пробы по ³H (в имп/мин); ³H_{полн. п. пр.} — полный счет пустой пробы по ³H (в имп/мин).

3. Количество синтезированных клетками метаболитов определяли по формуле:

$$C = \frac{^3H_{\text{корр. пр}} \cdot 20}{^3H_{\text{станд.}}},$$

где ³H_{корр. пр.} — скорректированный счет пробы по ³H (в имп/мин); ³H_{станд.} — счет по ³H соответствующего субстрата (в имп/мин); 20 — коэффициент пересчета количества синтезируемых метаболитов в наномолях на 10⁵ клеток.

Активность ферментов выражали в виде суммы соответствующих продуктов реакции в наномолях на 10⁵ клеток за 1 ч.

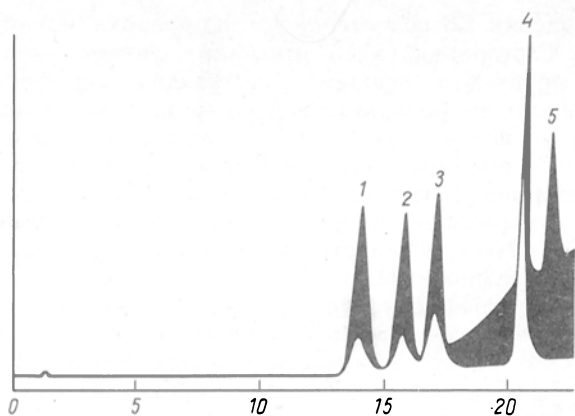


Рис. 1. Хроматограмма половых стероидов Δ^4 пути, полученная методом ВЭЖХ.

По оси абсцисс — время, мин; по оси ординат — поглощение при 240 и 210 нм. 1 — андростендион; 2 — тестостерон; 3 — 17α -прогестерон; 4 — прогестерон; 5 — прегненолон.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 представлена хроматограмма исследованных нами половых стероидов. Подобранные нами условия микроколоночной хроматографии (сорбент и градиентный состав подвижной фазы) позволили добиться практически полного разделения половых стероидов по Δ^4 пути биосинтеза тестостерона. Наиболее подвижным гормоном оказался андростендион, а наименее подвижным — прегненолон. Общее время хроматографии составляло около 23 мин. Выход гормонов после экстракции и хроматографирования составлял: $80,0 \pm 1,5\%$ ($n=72$) для андростендиона, $79,5 \pm 1,4\%$ ($n=96$) для тестостерона, $83,8 \pm 2,0\%$ ($n=48$) для 17α -прогестерона и $69,2 \pm 3,0\%$ ($n=36$) для прогестерона. Таким образом, разработанный нами метод, обеспечивающий четкое и быстрое разделение половых стероидов по Δ^4 пути, дает возможность изучить их метаболизм в клетках Лейдига, а также измерить активность ферментов, участвующих в синтезе тестостерона — конечного продукта этого пути.

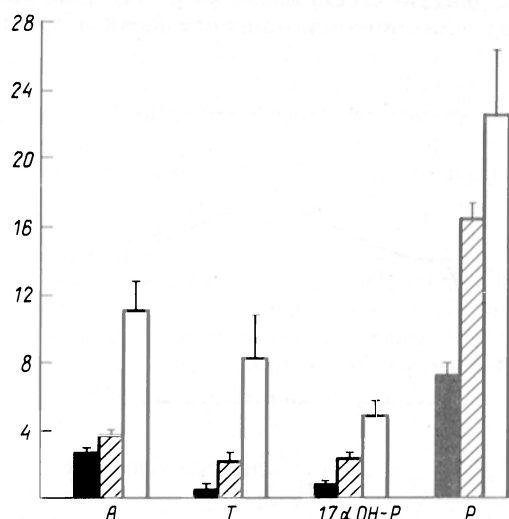


Рис. 2. Метаболизм $[^3\text{H}]$ прегненолона клетками Лейдига двух линий мышей — А/Не и РТ.

По оси ординат — общая радиоактивность в инкубационной среде, %. А — андростендион; Т — тестостерон; $17\alpha\text{ОН-Р}$ — 17α -прогестерон; Р — прогестерон; темные столбики — пустая проба; столбики с косой штриховкой — А/Не; светлые столбики — РТ.

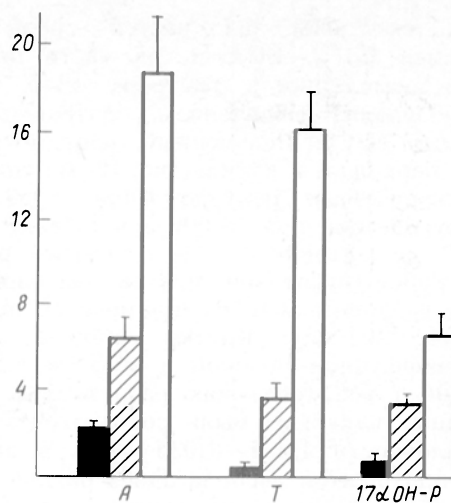


Рис. 3. Метаболизм $[^3\text{H}]$ прогестерона клетками Лейдига двух линий мышей — А/Не и РТ.

Обозначения те же, что на рис. 2.

На рис. 2 представлен метаболизм прегненолона клетками Лейдига двух линий мышей — А/Не и РТ. Параллельно с экспериментальными пробами меченые гормоны инкубировали в среде без клеток. Как видно из рис. 2—5, радиоактивность в пустых пробах была значительно ниже, чем в экспериментальных, для всех метаболитов обеих линий мышей. Значительное превышение радиоактивного счета в экспериментальных образцах, содержащих клетки Лейдига, по

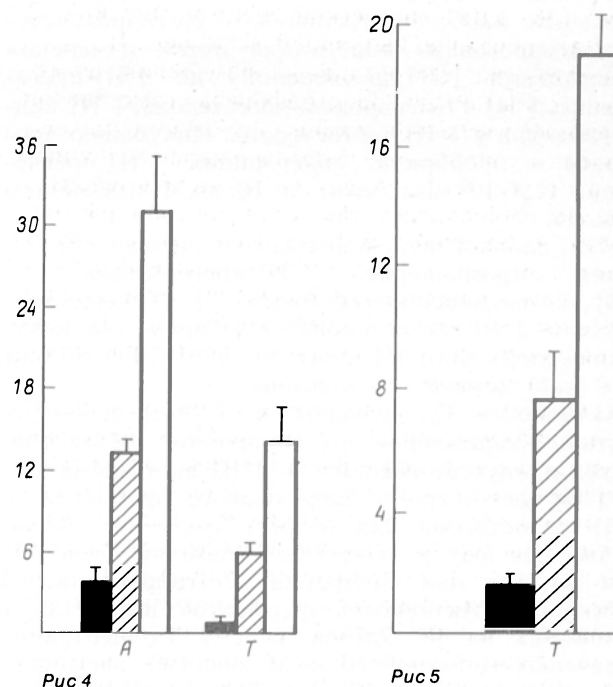


Рис. 4. Метаболизм $[^3\text{H}]17\alpha$ -прогестерона клетками Лейдига двух линий мышей А/Не и РТ.

Обозначения те же, что на рис. 2.

Рис. 5. Метаболизм $[^3\text{H}]$ андростендиона клетками Лейдига двух линий мышей А/Не и РТ.

Обозначения те же, что на рис. 2.

сравнению с пустой пробой позволило уверенно определять количество синтезированных ими стероидов. Клетки Лейдига мышей линии РТ оказались более активными по способности превращать прегненолон до тестостерона, чем клетки линии А/Не. У линии РТ также было установлено более высокое содержание метаболитов в цепи синтеза тестостерона по сравнению с А/Не, что указывало на повышенную активность фермента 3β -стероиддегидрогеназы. В наших экспериментах она составляла $7,30 \pm 1,19$ нмоль на 10^5 клеток за 1 ч у мышей линии РТ и $3,11 \pm 0,40$ нмоль на 10^5 клеток за 1 ч — у А/Не.

Межлинейные особенности метаболизма другого стероида — прогестерона, который являлся субстратом для 17α -гидроксилазы, были сходны с таковыми для прегненолона. Общая радиоактивность метаболитов прогестерона была существенно выше у мышей линии РТ по сравнению с А/Не (рис. 3). Соответственно различной была активность 17α -гидроксилазы: $9,77 \pm 1,52$ нмоль на 10^5 клеток за 1 ч у мышей линии РТ и $2,14 \pm 0,27$ нмоль на 10^5 клеток за 1 ч — у А/Не.

Общая направленность к более активному метаболизму стероидов клетками Лейдига линии РТ по сравнению с А/Не не изменялась и в случае инкубации клеток с 17α -прогестероном и андростендионом, являющихся субстратами для C_{17-20} -лиазы и кеторедуктазы (рис. 4, 5). Активность этих ферментов у мышей линии РТ была $10,56 \pm 2,13$ нмоль на 10^5 клеток за 1 ч для C_{17-20} -лиазы и $4,89 \pm 0,95$ нмоль на 10^5 клеток за 1 ч для кеторедуктазы, тогда как у мышей линии А/Не способность этих ферментов метаболизировать субстраты была значительно ниже: $2,97 \pm 0,42$ и $1,4 \pm 0,16$ нмоль на 10^5 клеток за 1 ч соответственно.

Эти результаты согласуются с полученными нами ранее данными о высокой способности клеток Лейдига мышей линии РТ продуцировать тестостерон при стимуляции их с различных звеньев аденилатциклазной системы по сравнению с другими линиями мышей [1].

Важно отметить, что работ по исследованию активности стероидных ферментов в клетках Лейдига мышей крайне мало. В доступной литературе мы обнаружили всего две работы, в которых на изолированных клетках Лейдига и в их культуре была измерена активность стероидных ферментов, причем значение активности ферментов, измеренной в нашей работе, совпадало с данными литературы [10, 11].

Таким образом, предложенная выше методика позволяет изучить как метаболизм половых стероидов, так и активность ферментов их синтеза при различных экспериментальных условиях. Разработанный нами метод микроколоночной ВЭЖХ половых стероидов дает возможность значительно сократить время и расход реактивов при хроматографировании стероидных гормонов, а также улучшить качество их разделения, что способствует получению более точных результатов.

Данная работа выполнена на средства, предоставленные ГНТГ «Геном человека».

ЛИТЕРАТУРА

1. Осадчук А. В., Свечников К. В. // Всесоюзный симпозиум «Биохимия рецепторных систем»: Тезисы докладов.— Таллинн, 1990.— С. 50—51.
2. Chong K. Y., Khoo T. H., Koo F. S. et al. // J. Liquid Chromatogr.— 1991.— Vol. 14, N 13.— P. 2445—2455.
3. Georgion M., Payne A. H. // Biol. Reprod.— 1987.— Vol. 37.— P. 335—341.
4. Malathi K., Gurpide E. // J. Steroid Biochem.— 1977.— Vol. 8.— P. 141—145.
5. O'Hare M. J., Nice E. C., Magee-Brown R., Bulman H. // J. Chromatogr.— 1976.— Vol. 125.— P. 357—367.
6. Quin P. G., Payne A. H. // J. biol. Chem.— 1985.— Vol. 260, N 4.— P. 2092—2099.
7. Rommerts F. F. G., Brinkman A. O. // Molec. Cell. Endocr.— 1981.— Vol. 21.— P. 15—28.
8. Satyaswaroop P. G., Lopez de la Osa E., Gurpide E. // Steroids.— 1977.— Vol. 30, N 1.— P. 139—145.
9. Schumacher M., Schafer G., Holstein A. F., Hilz H. // FEBS Lett.— 1978.— Vol. 91.— P. 333—338.
10. Sheela R. C. S., Payne A. H. // Endocrinology.— 1986.— Vol. 118, N 3.— P. 1222—1228.
11. Stalvey J. R. D., Payne A. H. // Ibid.— 1984.— Vol. 115, N 4.— P. 1500—1505.
12. Stoklosowa S. // Acta biol. Acad. Sci. hung.— 1982.— Vol. 33, N 4.— P. 367—379.

Поступила 08.02.93

METABOLISM OF STEROID HORMONES AND ACTIVITY OF SOME ENZYMES INVOLVED IN THEIR SYNTHESIS EVALUATED IN MOUSE LEYDIG CELLS BY MEANS OF HPLC

K. V. Svechnikov, T. V. Busygina, A. V. Osadchuk

Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk

A very effective procedure was developed for separation of sex hormones of the Δ^4 pathway using the micro-column technique of high performance liquid chromatography (HPLC). A five-step gradient containing methanol, acetonitrile and water was used as a mobile phase, while Lychrosorb RP-18 with particles of 5 μ m was used as a sorbent. Metabolism of steroid hormones and activity of 3β -steroid dehydrogenase, 17α -hydroxylase, C_{17-20} -lyase and 17 -ketosteroid reductase were studied in Leydig cells of two mouse strains PT and A/He. The higher rate of steroid metabolism and of the enzymatic activity was detected in the mouse cells of PT strain as compared with those of A/He strain.

© М. Г. ЕФИМОВА, 1994

УДК 617.735-007.17-055.5/.7-092.9-07:616.831.31-008.931-02:546.72

М. Г. Ефимова

О РОЛИ ИОНА ЖЕЛЕЗА В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ АЛЬДОЗОРЕДУКТАЗЫ В КОРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА И СЕТЧАТКЕ ЗДОРОВЫХ КРЫС И КРЫС С НАСЛЕДСТВЕННОЙ ДЕГЕНЕРАЦИЕЙ СЕТЧАТКИ

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

Ранее нами было показано, что у крыс, страдающих наследственной дегенерацией сетчатки (линия Campbell), в ранний период постнатального развития имеет место (по сравнению со здоровыми животными) сходство ряда метаболических нарушений в сетчатке и коре головного мозга. Эти нарушения затрагивали некоторые ферменты (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, альдозоредуктаза — AP), а также проявлялись при изучении процесса перекисного окисления липидов, форсированного системой железо+аскорбат [3, 4]. При исследовании возможных причин повышенной

Ткань	Линия крыс	Активность АР, нмоль НАДФ на 1 мг белка за 1 мин		
		частично очищенный препарат	+30 мкМ $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	+1 мМ десферала
Кора мозга	Wistar	$3,34 \pm 0,30$	$5,08 \pm 0,62^*$	$1,27 \pm 0,23^*$
	Campbell	$2,25 \pm 0,31$	$2,57 \pm 0,25$	$1,72 \pm 0,23$
Сетчатка	Wistar	$7,23 \pm 0,51$	$11,42 \pm 0,98^*$	—
	Campbell	$3,40 \pm 0,41$	$3,12 \pm 0,29$	—

Примечание. Звездочка — различия достоверны при $p \leq 0,05$; число животных в каждом опыте равно 6.

скорости последнего в микросомальной фракции коры мозга больных животных оказалось, что содержание и окислительно-восстановительный статус иона железа, связанного с негемовыми группами микросомальных белков, резко изменены (снижено общее содержание, соотношение $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ увеличено в 10 раз по сравнению с нормой). Что касается АР, то активность этого фермента у больных крыс оказалась существенно меньше, чем у здоровых как в сетчатке, так и в коре мозга, начиная с ранних стадий постнатального развития. Следует специально отметить, что в настоящее время крайне мало известно о физиологической роли АР и путях ее регуляции [2, 7]. Многократно показана роль этого фермента при развитии катаракт [5, 8], которые часто сопутствуют деструкции фоторецепторов, имеющей место при наследственной дегенерации сетчатки. В связи с вышеизложенным представлялось целесообразным попытаться выяснить, влияют ли на активность АР здоровых и больных животных ионы железа и его хелаторы, вносимые экзогенно, а также ионы железа, входящие в состав микросомальной мембраны.

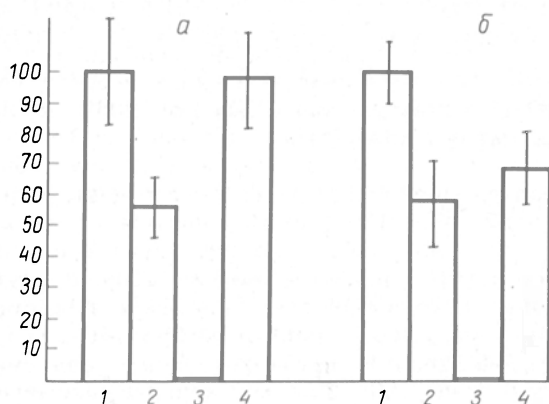
Методика. Работа выполнена на 20-дневных крысах линии Campbell, страдающих наследственной дегенерацией сетчатки. В качестве контроля использовали крыс линии Wistar. Животных декапитировали, энуклеированные глаза вскрывали на холоду, отделяли сетчатку. Мозг извлекали из черепной коробки, отмывали от крови в охлажденном 0,9 % растворе KCl, удаляли сосудистую

оболочку и препарировали кору. Активность АР определяли по методу [6] в постмитохондриальном супернатанте и в частично очищенной фракции, полученной из постмитохондриального супернатанта после высаливания балластных белков, как описано нами ранее [4]. Ферментативную активность измеряли также в цитозольной и мембранной фракциях коры мозга крыс, которые получали после центрифугирования постмитохондриального супернатанта в течение 1,5 ч при 100 000 g. Статистическую обработку результатов экспериментов проводили по методу Стьюдента [11].

Результаты и обсуждение. В таблице приведены данные по влиянию иона железа на активность АР, выделенной из коры мозга и сетчатки здоровых и больных крыс. Из данных таблицы видно, что АР из коры мозга и сетчатки здоровых животных активируется на 50—60 % при добавлении сравнительно низких концентраций $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$. Активность фермента, выделенного из указанных тканей больных животных, достоверно не изменялась при внесении экзогенного железа.

При изучении влияния, оказываемого высоко-специфическим природным хелатором железа десфералом, было установлено, что добавление этого соединения к частично очищенной фракции АР из коры мозга здоровых животных вызывало резкое снижение активности фермента (в 2,7 раза), а у больных крыс эффект десферала был значительно менее выражен и статистически недостоверен. На основании данных таблицы можно предполагать участие иона железа в регуляции активности АР в тканях здоровых животных. Остается, однако, неясным, с какими компонентами клетки (белками, нуклеотидами, жирными кислотами) связаны эти функционально активные ионы в условиях *in vivo*.

Учитывая ранее полученные нами данные [3] о недостатке железа в микросомах коры мозга больных крыс, определенный интерес представляло выяснение вопроса о возможной роли железа, связанного с микросомальными мембранами, в регуляции активности цитозольного фермента АР. Для этого был проведен ряд следующих экспериментов: у здоровых и больных крыс измеряли активность фермента в постмитохондриальном супернатанте (в этом случае без предварительного высаливания балластных белков), цитозольной и мембранной фракциях коры мозга (см. рисунок). Очевидно, что активность АР в постмитохондриальном супернатанте выше, чем в цитозоле; в мембранной фракции активности АР не обнаружено как у здоровых, так и у больных крыс. При объединении цитозольной и мембранной фракций в слу-



Активность АР в постмитохондриальном супернатанте, цитозоле и фракции микросомальных мембран из коры мозга крыс линий Wistar (а) и Campbell (б).

1 — постмитохондриальный супернатант; 2 — цитозоль; 3 — мембранная фракция; 4 — объединение фракций 2+3. По оси ординат — активность АР (в %), за 100 % принят уровень активности фермента в постмитохондриальном супернатанте как в случае крыс линии Wistar, так и в случае крыс линии Campbell.

чае здоровых крыс активность АР восстанавливалась, в случае больных — нет.

Совокупность этих данных позволяет полагать, что в клетках изученных тканей здоровых крыс имеются мембранные модуляторы активности АР, возможно, содержащие в своем составе негемовое железо. В случае больных крыс, у которых, согласно нашим предыдущим данным, содержание негемового железа микросом снижено, добавление мембран не приводило к полному восстановлению активности АР. Дальнейшее выяснение вопросов о роли иона железа в регуляции активности АР и причинах различий в регуляции активности фермента у больных крыс является предметом дальнейшего изучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бельский Л. М. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. — Рига, 1959.
2. Вартанов С. С., Павлов А. Р., Ярополов А. И. // Биохимия. — 1992. — Т. 57. — С. 323—341.
3. Ефимова М. Г., Этингер Р. Н. // Укр. биохим. журн. — 1992. — Т. 64. — С. 66—71.
4. Шушак Н. Д., Рычкова М. П., Ефимова М. Г. // Журн. эволюц. биохимии. — 1992. — Т. 29. — С. 346—354.
5. Garland D. // Exp. Eye Res. — 1990. — Vol. 50. — P. 677—682.
6. Herrmann R. K., Kador P. P., Kinoshita J. H. // Ibid. — 1983. — Vol. 37. — P. 467—474.
7. Heyningen R. E. // Ibid. — 1990. — Vol. 50. — P. 575—582.
8. Kinoshita J. H. // Ibid. — P. 567—573.

Поступила 08.02.93

THE ROLE OF FERRUM ION IN REGULATION OF ALDOSE REDUCTASE ACTIVITY IN RAT BRAIN CORTEX AND RETINA IN HEALTH AND IN HEREDITARY RETINA DEGENERATION.

M. G. Efimova

I. M. Sechenov Institute of Evolutional Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St Petersburg.

Effects of ferrum ions, native ferrum chelator desferal and of microsomal membranes containing different amount of nonhem ferrum on activity of aldose reductase were studied in the enzyme preparations isolated from brain cortex and sometimes from retina of healthy rats and of the animals with hereditary degeneration of retina. In the healthy animals activity of aldose reductase was distinctly increased in the presence of ferrum ions and of microsomal membranes; desferal inhibited drastically the enzyme activity. At the same time, these agents did not affect the aldose reductase activity in the preparations isolated from the animals with hereditary degeneration of retina.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 615.214.32:547.759.51-02:615.835.12

И. А. Горошинская, А. Ю. Виноградов, А. И. Лукаш

ВЛИЯНИЕ ПИРАЗИДОЛА НА СОДЕРЖАНИЕ МОЛЕКУЛ СРЕДНЕЙ МАССЫ ПРИ РАЗНЫХ РЕЖИМАХ ГИПОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ

НИИ биологии Ростовского университета

В последнее время исследователи уделяют все большее внимание изучению свойств и функций молекул средней массы, или средних молекул (СМ). К ним относятся главным образом продукты катаболизма белков с мол. м. 300—5000 Д, определяемые в биологических жидкостях организма (плазма, кровь, лимфа, спинномозговая

жидкость, моча). Состав СМ чрезвычайно разнообразен, кроме пептидных компонентов, пул СМ включает в себя производные глюконовой кислоты и олигоспиртов, кинины, энкефалины, фрагменты коллагена, серотонин и др. [11]. СМ обладают отчетливо выраженной биологической активностью: ингибируют ряд ферментных систем, влияют на ионную проницаемость биомембран, связывают жизненно важные белки [9, 10]. Показано их накопление в биологических средах организма при многих заболеваниях, сопровождающихся развитием эндогенной интоксикации, в том числе при почечной и печеночной недостаточности, ожоговой интоксикации и др. [1, 10]. Предполагается, что СМ могут играть адаптивно-протекторную роль при стрессах различной этиологии. Установлен выраженный антиоксидантный эффект некоторых фракций СМ, проявляемый ими как в опытах *in vitro*, так, и в еще большей степени, в опытах *in vivo*. При этом антиоксидительная активность (АОА) СМ, выделенных из крови животных, находящихся в условиях патологического состояния (ожог), в несколько раз превосходит АОА интактных животных [1, 2].

В настоящей работе нами исследовано влияние пиразидола (8-метил-2,3,4,5,6-гексагидро-1Н пиразино [3,2,1-j, К] карбазола гидрохлорид) на содержание СМ в плазме крови крыс, подвергнутых разным режимам гипобарической гипоксии. Ранее нами показаны протекторное действие пиразидола при острой однократной гипоксии [6] и его адаптивный эффект при периодической гипоксии. Пиразидол является обратимым ингибитором моноаминоксидазы (МАО) типа А, играющей важную роль в ответной реакции организма на экстремальные воздействия [4]. Исследование механизма, антигипоксического действия пиразидола представляет интерес как с теоретической точки зрения, так и для разработки надежных методов повышения устойчивости организма к неблагоприятным факторам среды. Мы предположили возможность существования взаимосвязи между защитным эффектом пиразидола и содержанием СМ в крови.

Методика. Объектом исследования служили белые безлинейные крысы-самцы массой 170—230 г. Моделирование гипобарической гипоксии осуществляли в проточной камере, снабженной щелочным поглотителем CO_2 . Исследовали три режима гипоксии: однократное гипоксическое воздействие, соответствующее высоте 9000 м над уровнем моря (0,029 МПа O_2) в течение 3 ч; воздействие гипоксии, соответствующей высоте 5000 м над уровнем моря (0,054 МПа O_2) в течение 3 дней с предварительным подъемом животных на условную высоту 2000 и 4000 м; адаптацию к гипоксии, которая по общепринятой модели периодической адаптации осуществлялась 5-часовым подъемом животных на высоту 4000 м (0,063 МПа O_2) в течение 40 дней с предварительным подъемом на высоту 1000, 2000, 3000 м. Скорость декомпрессии составляла 0,005 МПа в 1 мин. Пиразидол вводили животным внутривенно в дозе 25 мг на 1 кг массы тела. При однократной гипоксии осуществляли трехкратное введение пиразидола: 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 декапита-

Содержание СМ в плазме крови крыс при разных режимах гипоксии и введении пиразидола

Условия опыта	Контроль	Гипоксия	Введение пиразидола	Введение пиразидола + гипоксия
Гипоксия 9000 м, 3 ч:				
E ₂₅₄	0,218±0,010 (8)	0,235±0,008 (12)	0,417±0,036* (7)	0,534±0,024* (11)
E ₂₈₀	0,258±0,016 (9)	0,280±0,012 (10)	0,219±0,028* (7)	0,296±0,014* (13)
коэффициент К	1,16±0,05 (9)	1,19±0,026 (10)	0,71±0,04 (7)	0,56±0,034* (13)
Троекратная гипоксия 5000 м, 4 ч:				
E ₂₅₄	0,218±0,010 (9)	0,245±0,004*** (5)	0,385±0,026* (6)	0,423±0,035* (5)
E ₂₈₀	0,259±0,016 (9)	0,266±0,011 (5)	0,339±0,013** (6)	0,325±0,009* (5)
коэффициент К	1,16±0,05 (9)	1,09±0,05 (5)	0,89±0,04* (6)	0,78±0,05** (5)

Примечание. Одна звездочка — $p < 0,001$, две — $p < 0,01$, три — $p < 0,05$, четыре — $0,05 < p < 0,1$. Здесь и в табл. 2 и 3 в скобках — число опытов.

ции. При многократной периодической гипоксии пиразидол вводили накануне первого подъема и затем ежедневно за 0,5 ч до каждого подъема. В качестве контроля использовали животных, которым каждый раз вводили бидистиллированную воду, и животных, которым вводили пиразидол. Крысам, которых подвергали действию гипоксии без введения пиразидола, также вводили воду.

Содержание в плазме крови крыс СМ оценивали спектрофотометрическим методом [3]. Определение вели при двух длинах волн: 280 и 254 нм, что позволяло оценивать содержание в крови как пептидных, так и непептидных компонентов СМ. При длине волны 280 нм находится максимум поглощения ароматических аминокислот, входящих главным образом в состав пептидов. После очистки образца от белков величина E₂₈₀ зависит от содержания в нем среднемолекулярных пептидов (СМП). Величина же E₂₅₄ не зависит от содержания в образце ароматических аминокислот, и, следовательно, СМП и может определяться либо содержанием неароматических аминокислот [11], либо свободных нуклеотидов [7]. Рассчитывали также коэффициент К или индекс распределения — соотношение E₂₈₀/E₂₅₄, что позволяло судить о том, какие из компонентов общей фракции СМ в крови — пептидные или непептидные — испытывают большие изменения при различных состояниях организма.

Результаты и обсуждение. Как видно из табл. 1, трехкратное введение пиразидола как интактным животным, так и животным, подвергнутым воздействию гипоксии, соответствующей высоте 9000 м над уровнем моря в течение 3 ч, приводит к увеличению непептидного компонента СМ. E₂₅₄ при введении пиразидола интактным животным увеличивается на 90 %, а при введении пиразидола с последующей гипоксией — на 145 %. При этом пептидный компонент СМ не претерпевает существенных изменений, намечается лишь тенденция к увеличению E₂₈₀ при введении пиразидола перед поднятием на высоту 9000 м. На большую чувствительность непептидного компонента к действию пиразидола указывает снижение коэффициента К на 39 % при введении пиразидола интактным животным и на 52 % — животным, подвергнутым гипоксии.

Несколько иная картина обнаружена при исследовании действия пиразидола при многократной гипоксии. В этой серии пиразидол вводили в течение 6 сут по 1 разу ежедневно как интактным животным, так и животным, подвергнутым гипоксии, соответствующей высоте 5000 м, 4 ч в течение 3 дней с предварительным подъемом на высоту 2000 и 4000 м. Из табл. 1 видно, что введение пиразидола повышало содержание как непептидного, так и пептидного компонента СМ. E₂₅₄ увеличивается при введении пиразидола интактным животным на 77 %, на фоне гипоксии — на 94 %, E₂₈₀ увеличивается у интактных животных на 31 %, у животных с последующей гипоксией — на 25 %. Коэффициент К снижался при введении пиразидола интактным животным на 23 %, гипоксическим животным — на 33 %.

Таким образом, и при острой однократной гипоксии, и при многократной гипоксии введение пиразидола оказывает более выраженное действие на содержание непептидного компонента СМ. Для достоверного увеличения содержания пептидного компонента СМ, т. е. СМП, необходимо более длительное введение пиразидола. В обеих сериях введение пиразидола влияло в большей степени на увеличение содержания непептидного компонента СМ у животных, подвергнутых экстремальному воздействию, по сравнению с интактными.

Как видно из табл. 2, увеличение содержания СМ наблюдается также у животных, адаптированных к гипоксии (40 воздействий, 4000 м над уровнем моря, 5 ч). В этой группе животных

Таблица 2

Содержание СМ в плазме крови крыс при адаптации к гипоксии (40-кратное воздействие, 4000 м, 5 ч)

Условия опыта	E ₂₅₄	E ₂₈₀	Коэффициент К
Контроль	0,204±0,011 (9)	0,164±0,013 (7)	0,78±0,03 (7)
Адаптация к гипоксии	0,305±0,005 (12)	0,243±0,007 (12)	0,80±0,02 (12)
p	<0,001	<0,001	<0,05

Таблица 3

Содержание СМ в плазме крови крыс при многократном введении пиразидола

Условия опыта	E ₂₅₄	E ₂₈₀	Коэффициент К
13-Кратное введение воды	0,293±0,005 (8)	0,309±0,006 (8)	1,06±0,02 (8)
13-Кратное введение пиразидола	0,540±0,028 (7)	0,400±0,011 (8)	0,72±0,02 (8)
p	<0,001	<0,001	<0,001

имеет место одинаковое увеличение содержания как непептидного, так и пептидного компонента пула СМ. E₂₅₄ увеличивается на 50 %, E₂₈₀ — на 48 %. О равномерном увеличении составляющих СМ у адаптированных животных свидетельствует также и отсутствие изменений у них коэффициента К.

В проведенных нами на тех же животных исследованиях активности МАО и содержания моноаминов установлено, что введение пиразидола при 10-кратной гипоксии (5000 м над уровнем моря, 4 ч) вызывает изменения, сходные с наблюдаемыми у адаптированных животных. В обоих случаях отмечаются умеренное снижение активности МАО типа А и нормализация субстратной специфичности фермента, изменяющейся при острой гипоксии. Введение пиразидола препятствует снижению содержания моноаминов в гипоталамусе и надпочечниках, имеющему место при 10-кратном гипоксическом воздействии. В надпочечниках содержание норадреналина у защищенных пиразидолом животных почти вдвое превосходит уровень у незащищенных и достоверно выше, чем в контроле. Это свидетельствует об увеличении под влиянием пиразидола физиологической мощности симпатико-адреналовой системы, что характерно для адаптации к стрессу [8]. Обнаружение адаптивного действия пиразидола при его многократном введении при периодической гипоксии обусловило интерес к исследованию динамики СМ при многократном введении пиразидола. Как видно из табл. 3, при 13-кратном введении пиразидола (имеющем место при 10-кратной гипоксии) содержание непептидного компонента СМ увеличивается на 84 %, содержание пептидного компонента — на 29 %, а коэффициент К снижается на 32 %.

Проведенные нами исследования спектра поглощения растворов пиразидола в диапазоне длин волн 254—280 нм показали, что пиразидол имеет максимум поглощения при 274 нм, при длине же волны 254 нм его собственный вклад в общую экстинкцию образца можно считать незначительным; следовательно, присутствием пиразидола в исследуемом образце можно пренебречь.

Механизм влияния пиразидола на разные компоненты пула СМ может быть различным. Значительный вклад в увеличение содержания непептидной части СМ вносит скорее всего повышение содержания серотонина. Пиразидол, являясь ингибитором МАО типа А, тормозит дезаминирование серотонина, что ведет к увеличению его уровня в тканях. Проведенные нами исследования показали, что введение пиразидола увеличивает содержание серотонина в мозге при однократной гипоксии (9000 м, 3 ч) на 56 %, при трехкратной гипоксии (5000 м, 4 ч) — на 28 %, при

10-кратной гипоксии (5000 м, 4 ч) — на 40 %. Влияние пиразидола на СМП требует дальнейшего изучения. Не исключено существование взаимосвязи между обнаруженным АОА пиразидола [5] и АОА отдельных фракций СМП [1].

Таким образом, представленные в работе данные подтверждают адаптивный характер действия пиразидола при его многократном введении в условиях гипоксии. Обнаруженный нами более выраженный прирост СМ под влиянием пиразидола у подвергнутых гипоксии животных по сравнению с интактными наряду с данными литературы о более сильной АОА СМ, выделенных у животных, находящихся в условиях патологических состояний [1], позволяет предположить, что СМ являются эндокринными регуляторами уровня перекисного окисления липидов в тканях, экстремальных случаях, и тем самым могут непосредственно влиять на устойчивость организма к экстремальным воздействиям.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вальдман Б. М., Волчегорский И. А., Пужевский А. С. и др. // *Вопр. мед. химии.* — 1991. — № 1. — С. 23—26.
2. Волчегорский И. А., Вальдман Б. М., Скобелева Н. А. и др. // *Там же.* — № 2. — С. 28—33.
3. Габриэлян Н. И., Липатова В. И. // *Лаб. дело.* — 1984. — № 3. — С. 138—140.
4. Горошинская И. А. // *Вопр. мед. химии.* — 1989. — № 2. — С. 2—10.
5. Горошинская И. А., Цветненко Е. З., Дмитриев В. В., Ходакова А. А. // *Биофизика.* — 1990. — Т. 35, № 5. — С. 885—886.
6. Горошинская И. А., Немашкалова Л. А., Ходакова А. А., Шерстнев К. Б. // *Бюл. exper. биол.* — 1992. — № 9. — С. 268—269.
7. Копытова Т. В., Добротина Н. А., Боровков Н. Н., Четверкина О. В. // *Лаб. дело.* — 1991. — № 10. — С. 18—20.
8. Меерсон Ф. З., Пшенникова М. Г. *Стресс-лимитирующие системы организма и новые принципы профилактической кардиологии.* — М., 1989.
9. Салихова Н. Н., Ахмеджанов Р. М., Мухамедиева Ш. Г., Сахибов А. Д. // *Лаб. дело.* — 1989. — № 3. — С. 48—52.
10. Тупикова З. Н. // *Вопр. мед. химии.* — 1983. — № 3. — С. 108—111.
11. Чаленко В. В. // *Пат. физиол.* — 1991. — № 4. — С. 13—14.

Поступила 08.04.93

EFFECT OF PYRAZIDOL ON CONTENT OF MIDDLE MASS MOLECULES IN BLOOD PLASMA OF RATS UNDER VARIOUS CONDITIONS OF HYPOBARIC HYPOXIA

I. A. Goroshinskaya, A. Yu. Vinogradov, A. I. Lukash
Institute of Biology, State University, Rostov-on-Don

Content of middle mass molecules (MMM) was studied in blood plasma of rats treated with pyrazidol, the known inhibitor of monoamine oxidase of the A type. A distinct increase in the MMM nonpeptide component was detected both in intact animals and in the rats kept under hypoxic conditions (9,000 m, 3 hrs) after three administrations of pyrazidol. Under conditions of intermittent hypoxia a higher increase of the nonpeptide component as well as an increase of the MMM peptide component were detected. The MMM blood fraction was also elevated in the animals adapted to hypoxia. A possible role of the MMM fraction in the pyrazidol-produced adaptation effect during hypoxia is discussed.

К. Аманов, М. Мамадиев, М. А. Хужамбердиев,
В. З. Горкин

ОСОБЕННОСТИ БИОХИМИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПАРАКВАТА НА ПРОЦЕССЫ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ДЕЗАМИНИРОВАНИЯ БИОГЕННЫХ АМИНОВ И ДРУГИХ АЗОТИСТЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Андижанский медицинский институт, Республика Узбекистан,
НИИ биомедицинской химии РАМН, Москва

Паракват (1,1-диметил-4,4'-бипиридилий дихлорид) используют в народном хозяйстве в качестве гербицида и дефолианта для уничтожения сорных растений и травы. Производные бипиридия токсичны для млекопитающих [8]. Относительно небольшая доза (3—4 г) параквата, попадающая в желудок случайно или вводимая умышленно, может стать причиной смертельного отравления человека. Паракват быстро всасывается из желудочно-кишечного тракта, проникает в кровоток и поражает клетки паренхиматозных органов, прежде всего и преимущественно легких и почек.

По современным представлениям [16, 23, 25], молекулы параквата, обладая свойствами окислителя, присоединяют электроны и превращаются в свободные радикалы, а молекулы таких биохимических компонентов клетки, как НАДФН или ксантин, при участии НАДФН-цитохром С-редуктазы [25], НАДФН-цитохром Р-450-редуктазы [16] или ксантиноксидазы [23], подвергаются окислению. Свободные радикалы параквата в свою очередь подвергаются окислению, взаимодействуя с молекулярным кислородом, который, присоединяя электроны, превращается в активные формы кислорода, весьма токсичные для биологических макромолекул (белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды, липиды) [22].

Установлено, что паракват в микросомальных фракциях легких и головного мозга стимулировал образование веществ, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой [21]. Среди этих веществ количественно преобладающим является малоновый диальдегид (МДА) — один из продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Таким образом, при интоксикации паракватом и родственными ему бипиридилиевыми соединениями в клетках организма млекопитающих создается ситуация окислительного стресса [11]. Подобное явление развивается в тканях головного мозга при интоксикации другим производным пиридина — 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином, который при участии моноаминоксидазы (МАО) типа В превращается в организме в нейротоксин 1-метил-4-фенилпиридин [14].

Среди последствий стимуляции паракватом ПОЛ в биомембранах клеток оказались предотвращаемые антиоксидантами явления выхода из клеток во внеклеточную среду лактатдегидрогеназы и катионов K^+ [26], а также феномены изменений свойств липидзависимых мембранно-связанных ферментов [22]. К числу таких ферментов относятся флавинодерживающие МАО (КФ 1.4.3.4), катализирующие одну из наиболее важных, ключе-

вых биохимических превращений биогенных аминов и других азотистых оснований — реакцию ферментативного окислительного дезаминирования аминов [18].

В задачу настоящей работы входила характеристика ферментативных реакций дезаминирования биогенных аминов и других азотистых оснований при экспериментальной интоксикации паракватом.

Методика. В опытах использовали безлинейных белых крыс-самцов массой 180—220 г. Водные (1,25 или 5 %) растворы параквата ежедневно вводили животным в желудок при помощи эластичного зонда. Получаемые животными дозы параквата составляли 25, 5 или 1 мг на 1 кг массы тела. После введения параквата в дозе 25 мг/кг все 8 крыс погибли в течение 3 дней, при дозе 5 мг/кг все 12 крыс погибли в течение 5 дней. После снижения дозы параквата до 1 мг/кг все 11 крыс были живы к 10-му дню эксперимента (к 20-му дню погибли 2 крысы). В большинстве опытов мы вводили водные растворы параквата (1 мг на 1 кг массы тела) ежедневно в течение 10 дней. После введения параквата через 2 дня у животных снижались аппетит, общая активность, появлялась одышка. Крысы забивали, вызывая у них воздушную эмболию. При вскрытии обнаруживали отек легких, кровоизлияния в тканях легких и головного мозга.

Митохондриальные фракции выделяли методом дифференциального центрифугирования (как описано ранее [12]) 10 % гомогенатов легких, почек, печени, сердца или головного мозга крыс в 0,25 М сахарозе. Для осаждения ядерных фракций гомогенаты центрифугировали (3000 g, 10 мин) в центрифуге ЦУМ-1. Полученную надосадочную жидкость в опытах с гомогенатами легких, почек, печени или головного мозга повторно центрифугировали (12 000 g, 15 мин) в центрифуге ЦВР-1. В аналогичных опытах с гомогенатами сердца на этом этапе использовали иной режим центрифугирования — 14 000 g, 20 мин. Осадки, содержащие митохондриальные фракции, подвергали осмотическому лизису в гипотоническом фосфатном буфере pH 7,4 для удаления балластных белков. Митохондриальные фракции суспендировали в стеклянном гомогенизаторе.

Содержание белка в митохондриальных фракциях определяли колориметрическим методом [24] с реактивом Фолина. Для построения калибровочной кривой в качестве стандарта использовали кристаллический сывороточный альбумин быка.

Для исследования скорости дезаминирования азотистых соединений в пробы (конечный объем 1,8 мл) вносили по 2—3 мг белка митохондрией, суспендированных в 0,1 М фосфатном буфере pH 7,4, и один из субстратов в следующих предварительно подобранных экспериментально конечных оптимальных концентрациях (в мМ): серотонина креатинин-сульфат — 5, тирамин \times HCl — 3, бензиламин \cdot HCl — 10, тирамин \cdot HCl — 5, глюкозамин \cdot HCl — 10, γ -аминомасляная кислота (ГАМК) — 10, путресцин \cdot 2 HCl — 5, L-лизин \times HCl — 10. Пробы инкубировали при 37 °C в атмосфере кислорода в течение 45 мин. После окончания инкубации пробы фиксировали добавлением 50 % трихлоруксусной кислоты (конечная концентрация 5 %). Образующийся осадок отде-

ляли центрифугированием и отбрасывали, а в надосадочной жидкости определяли количество аммиака, освобождаемого в ходе инкубации митохондрий с аминами, методом изотермической отгонки с последующей нессерлизацией, как описано ранее [12]. В течение 45 мин инкубации количество освобождаемого аммиака во всех случаях было прямо пропорционально длительности инкубации.

Об интенсивности процессов ПОЛ судили, определяя содержание одного из продуктов этих процессов — МДА — в митохондриальных фракциях легких, почек, печени, сердца и головного мозга крыс на основе реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой, как описано ранее [10].

Для характеристики динамики ПОЛ в митохондриальных фракциях различных органов равные объемы суспензии (по 1,5 мл) вносили в стеклянные колбочки, добавляли аскорбат (конечная концентрация 0,025 мМ) и инкубировали в аэробных условиях при 37 °С в течение 10, 20, 30, 40, 50 или 60 мин. Реакцию прекращали добавлением 17 % раствора трихлоруксусной кислоты (конечная концентрация 5 %). Образующийся осадок отделяли центрифугированием (4000 г, 10 мин). К 1 объему центрифугата прибавляли 2 объема 0,5 % водного раствора 2-тиобарбитуровой кислоты и в течение 10 мин пробы инкубировали на кипящей водяной бане. Затем пробы охлаждали до комнатной температуры. Оптическую плотность образовавшегося розового раствора измеряли при 532 нм на спектрофотометре СФ-16. По результатам анализа строили кинетические кривые зависимости оптической плотности от длительности инкубации [7].

Экспериментальный материал обработан статистически. Представлены средние арифметические величины (M) и их средние ошибки (m). Статистическая достоверность различий между средними арифметическими определена по критерию Фишера — Стьюдента при $p < 0,05$. При оценке статистической достоверности различий между группами наблюдений по качественным показателям пользовались рассчитанными по точному методу Фишера таблицами готовых результатов сравнения двух групп любой численности (до 20) [2].

В работе использованы серотонина креатинин-

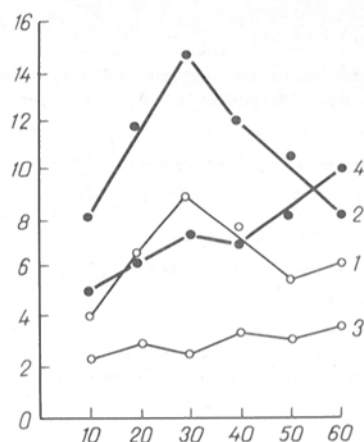


Рис. 1. Накопление веществ, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой, в митохондриальных фракциях гомогенатов легких (1 и 2) и головного мозга (3 и 4) в норме (1 и 3) и при интоксикации паракватом (2 и 4).

По оси абсцисс — длительность инкубации, мин; по оси ординат — содержание веществ, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой, нмоль МДА на 1 мг белка. Исследования проведены на 10-й день после введения внутрь параквата в дозе 1 мг/кг массы тела.

сульфат («Реанал», Венгрия), тирамин·HCl («Серва», Германия), бензиламин·HCl (отечественный), триптамин·HCl («Серва», Германия), глюкозамин·HCl («Сигма», США), ГАМК («Кальбайокем», США), путресцин·2 HCl («Серва», Германия), L-лизин·HCl («Реанал», Венгрия), 2-тиобарбитуровая кислота («Кох-Лайт», Англия), кристаллический сывороточный альбумин быка («Кох-Лайт», Англия); дилудин (2,6-диметил-3,5-диэтоксикарбонил-1,4-дигидропиридин) был синтезирован в лаборатории проф. Г. Я. Дубура (Институт органического синтеза АН Латвии, Рига). Аскорбиновая кислота, тиосульфат натрия (30 % ампулированный раствор), трихлоруксусная кислота — химически чистые вещества отечественного производства. Паракват любезно предоставлен проф. Н. А. Лошадкиным (Академия химической защиты, Москва), за что приносим ему глубокую благодарность.

Результаты и обсуждение. В условиях нашего эксперимента интоксикация паракватом вызывала стимуляцию ПОЛ у подопытных животных. В митохондриальных фракциях гомогенатов

Таблица 1

Обратимость стимуляции накопления соединений, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (МДА), в митохондриальных фракциях гомогенатов легких крыс

Группа крыс	Длительность инкубации, мин					
	10	20	30	40	50	60
Интактные	3,8±0,5 (9)	7,1±0,8 (9)	9,1±0,8 (9)	7,4±0,6 (9)	5,4±0,7 (9)	5,9±0,9 (9)
Паракват	7,9±1,1* ² (7)	11,7±1,1* (7)	14,6±1,3* ² (7)	12,0±1,8* ⁵ (7)	10,4±1,2* ⁵ (7)	8,5±0,9* ⁴ (7)
Паракват+дилудин (40 мг/кг)	6,5±0,9* (7)	8,9±0,8 (7)	9,7±0,6 (7)	7,5±0,4 (7)	8,2±0,5* ² (7)	8,2±0,5* ⁵ (7)
Паракват+аскорбат (100 мг/кг)	5,7±0,5* ⁵ (6)	8,4±0,9 (6)	11,2±0,8* ⁴ (6)	9,0±0,9 (6)	8,0±1,0* ⁵ (6)	7,9±0,7 (6)
Паракват+тиосульфат натрия (500 мг/кг)	5,0±0,5 (5)	9,0±0,9 (5)	12,1±1,8 (5)	10,4±1,0* ⁵ (5)	9,1±0,7* ³ (5)	9,5±1,0 (5)

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3 представлены средние арифметические ± средние ошибки средних арифметических, в скобках — число животных. Исследования проведены на 10-й день эксперимента. Различия статистически достоверны между интактными и подопытными животными: одна звездочка — $p < 0,001$, две — $p < 0,002$, три — $p < 0,01$, четыре — $p < 0,05$, пять — $p < 0,02$.

Дезаминирование азотистых соединений (в мкмоль аммиака на 1 мг белка за 45 мин) при их инкубации с митохондриальными фракциями гомогенатов легких крыс

Группа крыс	Серотонин	Триптамин	Бензиламин	Тирамин	Глюкозамин	ГАМК	Путресцин	Лизин
Интактные	0,16±0,01 (7)	0,13±0,02 (7)	0,15±0,01 (7)	0,18±0,02 (7)	0,07±0,01 (7)	0,13±0,01 (7)	0 (7)	0 (7)
Паракват:								
10-й день	0,10±0,01* (11)	0,09±0,01* ³ (11)	0,09±0,01* (11)	0,15±0,01 (11)	0,16±0,03* ² (11)	0,33±0,03* (11)	0,11±0,01 (11)	0,10±0,02 (11)
20-й день	0,11±0,01* (10)	0,08±0,01* ³ (10)	0,10±0,01* ³ (10)	0,15±0,01 (10)	0,15±0,01* (10)	0,41±0,03* (10)	0,13±0,01 (10)	0,11±0,01 (10)

Примечание. Паракват вводили в дозе 1 мг на 1 кг массы тела. Различия статистически достоверны между интактными и подопытными животными: одна звездочка — $p<0,001$, две — $p<0,01$, три — $p<0,05$.

легких, головного мозга, сердца, печени и почек крыс при интоксикации паракватом (на 10-й день после введения внутрь параквата в дозе 1 мг на 1 кг массы тела) содержалось примерно в 2 раза больше МДА, чем в соответствующих контрольных пробах. Определенные различия (в зависимости от органа) были отмечены при исследовании динамики накопления МДА в ходе аскорбат-зависимого ПОЛ в митохондриальных фракциях гомогенатов легких, головного мозга (рис. 1), а также сердца, печени и почек (на рис. 1 не показано), но во всех случаях статистически достоверным было превышение содержания МДА в тканях, полученных от подопытных животных, по сравнению с контрольными.

В наших условиях интоксикация паракватом протекала, как это описано другими авторами [21]. Исходя из представлений о важном патогенетическом значении в механизме токсического действия параквата стимуляции ПОЛ [25], мы ожидали обнаружения при интоксикации паракватом нормализующего действия на накопление МДА в митохондриальных фракциях жизненно важных органов соединений, обладающих свойствами восстановителей. Для проверки этого предположения мы использовали антиоксидант дилудин и более доступные нуклеофильные соединения — аскорбат и тиосульфат натрия — в дозах и условиях, рекомендованных для нормализации нарушений азотистого и липидного метаболизма при экспериментальной гиперхолестеринемии и атеросклерозе [6, 12], при которых важное патогенетическое значение придать стимуляции ПОЛ.

Как следует из типичных примеров экспериментов (табл. 1), в митохондриальной фракции гомогената легких при введении крысам параквата в сочетании с дилудином, аскорбатом или тио-

сульфатом натрия в течение 10 дней нарушения накопления МДА в значительной мере нормализовались (по сравнению с крысами, которым вводили только паракват). Аналогичные данные были получены при соответствующих исследованиях митохондриальных фракций гомогенатов головного мозга, сердца, печени и почек (в табл. 1 эти данные не представлены; они сходны с данными, полученными в опытах с митохондриями легких). Результаты этих опытов показали принципиальную обратимость стимуляции ПОЛ при интоксикации паракватом, но выраженность наблюдаемых эффектов неодинакова и зависит от органа и примененного нуклеофильного реагента, а также от ряда других эндогенных факторов, которые не всегда удается контролировать.

Как было отмечено ранее, при ряде патологических состояний, сопровождающихся стимуляцией ПОЛ [18], в случаях экспериментальной интоксикации прооксидантом паракватом наблюдается нарушение реакций дезаминирования биогенных аминов и других азотистых соединений в жизненно важных органах подопытных крыс (легкие, головной мозг, сердце, печень, почки). Так, например, в митохондриальных фракциях легких при интоксикации паракватом (1 мг на 1 кг массы тела), как видно из табл. 2, дезаминирование серотонина на 10-й день эксперимента было снижено на 38 % ($p<0,001$), тирамина — на 17 % ($p<0,001$). Одновременно дезаминирование глюкозамина возрастало в 2,2 раза. Дезаминирование ГАМК было стимулировано в 2,5 раза по сравнению с интактными крысами. Если при инкубации с митохондриальными фракциями легких интактных крыс в присутствии путресцина или лизина не удавалось обнаружить признаки дезаминирования, то при интоксикации паракватом

Таблица 3

Нормализация нарушений дезаминирования азотистых соединений (в мкмоль аммиака на 1 мг белка за 45 мин) в митохондриальных фракциях гомогенатов легких крыс при отравлении паракватом (1 мг на 1 кг массы тела; на 10-й день)

Группа крыс	Серотонин	Триптамин	Бензиламин	Тирамин	Глюкозамин	ГАМК	Путресцин	Лизин
Интактные	0,16±0,01 (7)	0,13±0,02 (7)	0,15±0,01 (7)	0,18±0,02 (7)	0,07±0,01 (7)	0,13±0,01 (7)	0 (7)	0 (7)
Паракват	0,10±0,01* (11)	0,09±0,01* ² (11)	0,09±0,01* (11)	0,15±0,01* ³ (11)	0,16±0,03* (11)	0,33±0,03* (11)	0,11±0,01 (11)	0,10±0,02 (11)
Паракват+дилудин	0,15±0,01 (5)	0,12±0,01 (5)	0,14±0,02 (5)	0,17±0,01 (5)	0,12±0,01 (5)	0,18±0,01 (5)	0 (5)	0 (5)
Паракват + аскорбат	0,14±0,01 (7)	0,12±0,01 (7)	0,14±0,01 (7)	0,16±0,02 (7)	0,11±0,01 (7)	0,17±0,02 (7)	0 (7)	0 (7)
Паракват + тиосульфат	0,15±0,02 (5)	0,12±0,01 (5)	0,14±0,01 (5)	0,17±0,02 (5)	0,11±0,02 (5)	0,17±0,02 (5)	0 (5)	0 (5)

Примечание. Различия статистически достоверны между интактными и подопытными животными: одна звездочка — $p<0,001$, две — $p<0,02$, три — $p<0,05$. Здесь и в табл. 4 дозы дилудина, аскорбата и тиосульфата натрия указаны в табл. 1.

эта реакция происходила с большой интенсивностью, достигая величин, свойственных серотонин-деаминазной реакции в этом биологическом объекте (см. табл. 2).

Не только в опытах с митохондриальными фракциями легких, в первую очередь поражаемых при отравлениях производными бипиридия, но также в митохондриях головного мозга, сердца, печени или почек интоксикация паракватом во всех случаях приводила к снижению моноаминоксидазной активности (измеренной с серотонином, триптамином, бензиламином или тирамином в качестве субстрата). Одновременно отмечали усиление деаминарования глюкозамина или ГАМК и появление отсутствующих у интактных крыс свойств катализировать деаминарование лизина или путресцина. Эти данные свидетельствовали о возможности обратимого качественного модифицирования (трансформации) свойств MAO при интоксикации прооксидантом паракватом и обосновывали целесообразность исследования способов нормализации обнаруженных при отравлении паракватом нарушений процессов деаминарования моноаминов и других азотистых соединений при помощи антиоксиданта дилудина, а также аскорбата или нуклеофильного реагента тиосульфата натрия. Если бы при интоксикации паракватом происходила тривиальная необратимая инактивация MAO, то надеяться нормализовать нарушения реакций деаминарования азотистых соединений при помощи антиоксидантов или нуклеофильных реагентов не было никаких оснований. По нашим данным (табл. 3), после введения параквата в сочетании с дилудином, аскорбатом или тиосульфатом натрия не обнаруживало ни в одном случае свойство вызывать статистически достоверную стимуляцию деаминарования глюкозамина или ГАМК или появление реакций деаминарования путресцина или лизина.

Мы представляем результаты исследований митохондриальных фракций гомогенатов легких (см. табл. 1—3) как органа, поражаемого при интоксикации паракватом в первую очередь. В митохондриальных фракциях гомогенатов головного мозга, сердца, печени и почек крыс при экспериментальной интоксикации паракватом мы находи-

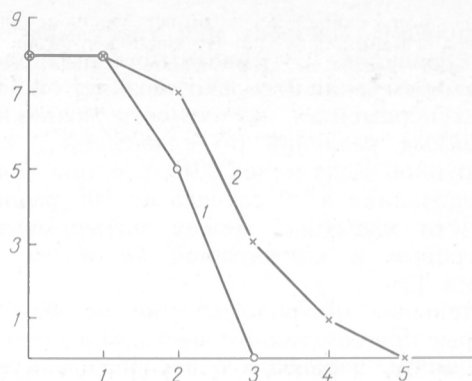


Рис. 2. Влияние аскорбата (100 мг/кг) на смертность крыс при отравлении паракватом (25 мг/кг).

По оси абсцисс — дни после интоксикации; по оси ординат — число выживших животных. 1 — паракват; 2 — паракват + аскорбат.

ли те же изменения, которые характерны для легких.

Возникает вопрос: имеют ли наблюдаемые нами обратимые, закономерные нарушения процессов деаминарования биогенных аминов и (или) других азотистых соединений какое-либо патогенетическое значение при экспериментальной интоксикации паракватом или же изучаемые нами нарушения реакций деаминарования лишь сопровождают развитие патологических процессов в органах? Если правильно первое предположение, то следовало бы ожидать, что устранение при помощи воздействия на животных, отравленных паракватом, антиоксидантов или нуклеофильных реагентов тех нарушений реакций деаминарования азотистых соединений, которые имеют место при данной интоксикации, мы должны наблюдать снижение или замедление смертности в соответствующих группах экспериментальных животных, а также при морфологических исследованиях органов этих животных можем ожидать обнаружения признаков нормализации структуры этих органов.

По нашим данным, имела место тенденция к увеличению продолжительности жизни отравленных паракватом крыс, которым вводили нуклеофильные реагенты. Так, например, при дозе 25 мг на 1 кг массы тела все 8 крыс погибли на 3-й день, но при сочетании этой дозы параквата с аскорбатом (100 мг/кг) гибель всех крыс отмечали лишь на 5-й день (рис. 2). При дозе параквата 5 мг/кг на 5-й день эксперимента было отмечено статистически достоверное различие в выживаемости отравленных паракватом крыс, которым

Таблица 4

Влияние на выживаемость крыс, отравленных паракватом, дилудина, аскорбата или тиосульфата натрия

Группа крыс	Паракват мг/кг	День экспе- римента	Число крыс			Вероятность случайных различий (по сравнению с группой 1 или 1')
			исход- ное	погибли	выжили	
1. Паракват	25	3	8	8	0	нд 0,025—0,011 0,025—0,011
2. Паракват+дилудин	25	3	9	7	2	
3. Паракват+аскорбат	25	3	8	5	3	
4. Паракват+тиосульфат	25	3	10	6	4	<0,01 <0,01 <0,01 <0,01
1.' Паракват	5	5	12	12	0	
2.' Паракват+дилудин	5	5	8	6	2	
3.' Паракват+аскорбат	5	5	8	5	3	
4.' Паракват+тиосульфат	5	5	10	7	3	

Примечание. нд — не доказана статистическая достоверность различий в выживаемости крыс в группе 2 по сравнению с группой 1.

вводили дилудин, аскорбат или тиосульфат натрия, по сравнению с животными контрольной группы, которым вводили только паракват (табл. 4). В этих экспериментах вероятность возникновения случайных различий по сравнению с контрольной группой была менее 0,01, т. е. при повторных исследованиях в 99 случаях из 100 различия в смертности животных между экспериментальными группами и контрольной не могли быть случайными [2].

Сравнительные морфологические исследования органов крыс при сочетанном введении им параквата с дилудином, параквата с аскорбатом или параквата с тиосульфатом натрия указали на существенное уменьшение морфологических изменений по сравнению с животными, которые подвергались воздействию только параквата. Так, в органах животных, которым вводили одновременно паракват с дилудином, паракват с аскорбатом, паракват с тиосульфатом натрия, не были обнаружены деструкция и некроз тканей, меньше были выражены изменения в клетках паренхиматозных органов и сосудистые нарушения. (Морфологическая часть работы была выполнена совместно с доцентом кафедры гистологии Андижанского медицинского института канд. мед. наук А. Г. Гаффаровым.)

Таким образом, используя в качестве субстратов реакции дезаминирования серотонин, триптамин, бензиламин и тирамин, мы установили ранее неизвестный факт снижения активности МАО в жизненно важных органах при интоксикации паракватом. Наши данные не согласуются с сообщением [15], согласно которому через 6 дней после введения параквата (доза и путь введения сопоставимы с использованными нами) не удавалось выявить изменения дезаминирования кинурамина в гомогенатах печени и мозга. Однако в течение 6 дней интоксикации изменения дезаминирования могли быть слабо выражены. В наших опытах эти изменения были отчетливо выражены на 10-й и, в особенности, 20-й дни интоксикации. Использование в качестве единственного субстрата МАО гомогенатов печени и мозга — кинурамина — может дать информацию, не идентичную [17, 18] полученной нами в системах с митохондриальными фракциями легких, сердца, мозга, печени и почек с применением субстратов МАО-А, МАО-Б и аминов, дезаминирование которых катализирует как МАО-А, так и МАО-Б. Наши данные о снижении активностей МАО при отравлении паракватом представляются более информативными и биологически достоверными, чем опубликованные в литературе сведения об отсутствии таких изменений.

Рассматривая вопрос о возможных причинах обнаруженных нами при интоксикации паракватом закономерных нарушений процессов дезаминирования биогенных аминов и других азотистых соединений, остановимся на уже описанных [18], но еще мало исследованных молекулярных свойствах МАО.

Химическое модифицирование активного центра ферментов или расположения функциональных групп в области каталитического центра может вызвать не только количественное изменение ферментативной активности (активацию или ингибирование), но также качественные изменения, что характерно для ряда ферментов, включая МАО [3].

Качественное модифицирование (трансформа-

ция) МАО было доказано в экспериментах с высокоочищенными препаратами этих ферментов из различных биологических источников [19]. Обратимые качественные изменения каталитических свойств МАО были инициированы частичным окислением их тиоловых групп в системах с окисленной олеиновой кислотой или другими окислителями. Такие химически модифицированные флавинсодержащие аминоксидазы (АО) приобретали свойство (которого не было до модифицирования!) катализировать дезаминирование диаминов (путресцин, кадаверин), ω -аминокислот (лизин, ГАМК), аминсахаров (глюкозамин), нуклеотидов (АМФ) и других многочисленных азотистых соединений, которые не являются субстратами МАО или вообще АО [3]. Структурные аналоги таких азотистых соединений избирательно блокировали дезаминирование этих соединений, катализируемое модифицированными МАО. Модифицирование свойств МАО, инициируемое окислением их тиоловых групп, не сопровождалось изменением четвертичной структуры или отделением флавинового кофермента от апофермента МАО [1]. Обязательным условием, определяющим возможность трансформации МАО, является наличие в их молекулах каталитически полноценных активных центров и свободных тиоловых групп; явления трансформации МАО удается предотвратить специфическими ингибиторами МАО или реагентами, блокирующими тиоловые группы [3].

Термин «трансформация» АО не подразумевает, что МАО фактически превращается в диаминоксидазу (ДАО) или наоборот. В действительности происходят обратимые модификации свойств АО. Так, модифицированные МАО приобретают новые свойства, напоминающие свойства ДАО, но при этом МАО не приобретают все свойства ДАО. В природе не встречаются ДАО, которые катализировали бы (подобно трансформированным МАО) гидролитическое дезаминирование АМФ или окислительное дезаминирование лизина, спермина и других азотистых соединений [3]. Таким образом, трансформированные МАО качественно отличаются не только от нативных МАО, но также от всех природных ДАО и АМФ-деаминаз [4].

В митохондриальных мембранах, где преимущественно локализованы МАО, трансформация МАО сопровождается стимуляцией ПОЛ. При помощи избирательных ингибиторов МАО-А и МАО-Б — хлоргилина и депренила — установлено, что только мембранно-связанные МАО-А претерпевают трансформацию при стимуляции ПОЛ в биомембранах [19].

В условиях целого организма трансформация МАО происходит [3, 18] при многочисленных патологических состояниях или интоксикациях, имеющих одно общее патогенетическое звено — накопление продуктов ПОЛ в тканях [5]. Трансформация МАО обнаружена при лучевых поражениях, в тканях животных-опухоленосителей, при гипервитаминозе D, экспериментальном туберкулезе, при отравлениях кислородом под высоким давлением, производными гидразина и замещенных аминов, при экспериментальной гиперхолестеринемии и атеросклерозе, стрессорных воздействиях на организм (охлаждение тела, черепно-мозговая травма [9], гипоксия [4, 13, 19]).

Наши экспериментальные данные позволяют

предположить, что при отравлении паракватом, когда в митохондриальных фракциях гомогенатов жизненно важных органов накапливался МДА, происходит качественное модифицирование (трансформация) МАО. Это позволит объяснить с единой точки зрения наши данные о нарушениях дезаминирования биогенных аминов и других азотистых соединений при интоксикации паракватом.

Доводом в пользу нашего предположения могло бы послужить предотвращение ингибитором МАО-А хлоргелином (но не депренилом!) дезаминирования глюкозамина, ГАМК, путресцина или лизина при интоксикации паракватом. Подобный эксперимент был осуществлен при гипербарической оксигенации [20]. Введение крысам хлоргелина до помещения животных в барокамеру, где их подвергали воздействию кислорода под повышенным давлением в течение 1 ч, предотвращало появление в митохондриях мозга глюкозамин-дезаминазной активности. Депренил не оказывал такого действия. Хлоргелин в большей мере, чем депренил, замедляет развитие судорог и повышает выживаемость крыс при гипероксии, что указывает на возможное патогенетическое значение трансформации МАО-А в развитии судорог при гипербарической оксигенации [3].

Для прямой проверки предположения о том, что при интоксикации паракватом нарушения дезаминирования аминов и других азотистых соединений можно объяснить на основе гипотезы об обратимом модифицировании МАО, необходимо получить высокоочищенные препараты этих ферментов из митохондриальных фракций гомогенатов жизненно важных органов интактных крыс и крыс, отравленных паракватом, с тем чтобы непосредственно сопоставить изменения их каталитических и физико-химических свойств. Такие исследования исключают альтернативные гипотезы (например, активацию дезаминирования азотистых соединений, не являющихся субстратами АО, при патологических состояниях или интоксикациях). Ранее [1] высокоочищенные препараты МАО из митохондриальных фракций мозга, в которых стимулировали аскорбатзависимое неэнзиматическое ПОЛ, сопоставляли с аналогичным ферментным препаратом из митохондрий, в которых ПОЛ не стимулировали. В этих ферментных препаратах при электрофорезе в полиакриламидном геле обнаружены одна количественно преобладающая и две минорные белковые фракции, катализирующие окисление триптамина или серотонина (но не гистамина или кадаверина!) с восстановлением нитротетразолия, тогда как все три белковые фракции аналогичного ферментного препарата, выделенного из митохондрий, в которых ПОЛ стимулировали, обнаруживали свойство катализировать окисление субстратов ДАО — гистамина и кадаверина — при частичном сохранении свойства катализировать окисление моноаминов — субстратов МАО. В дезаминировании субстратов ДАО участвуют те же молекулы МАО, которые катализируют дезаминирование моноаминов. Добавление гистамина в пробы, содержащие кадаверин и очищенный препарат МАО из митохондрий, в которых ПОЛ стимулировали, резко снижало количество выделяющегося при инкубации аммиака; при аналогичных условиях опыта серотонин не ингибировал дезаминирование кадаверина. Таким образом, гистамин и кадаверин, очевидно, связываются

с одними и теми же центрами, которые неидентичны каталитическим центрам, участвующим в дезаминировании серотонина.

Модифицирование свойств МАО, стимулирующее, в частности, дезаминирование АМФ (и многочисленных нуклеотидов, в молекулах которых имеется остаток АМФ) или аминоксахаров (глюкозамин, галактозамин), не только сопровождает развитие, но также имеет важное патогенетическое значение при ряде заболеваний [3]. Структурные аналоги АМФ (например, аденозин-3'-монофосфат) ингибируют дезаминирование при участии модифицированной МАО нуклеотидов (но не биогенных моноаминов) и оказывают благотворное влияние на животных-опухоленосителей и при лучевых поражениях. Избирательные ингибиторы МАО-А предотвращают в организме модифицирование свойств МАО. Ингибиторы свободнорадикальных реакций (например, производные дигидропиридина), блокируя ПОЛ, предотвращают модифицирование МАО в организме. Некоторые восстановители (например, тиосульфат натрия, изониазид) вызывают ретрансформацию химически модифицированных МАО в организме, что сопровождается определенными позитивными эффектами при ряде патологических состояний [19]. Полученные нами в настоящей работе данные позволяют отнести к числу этих патологических состояний экспериментальную интоксикацию паракватом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гаришвили Т. Г., Горкин В. З. // Сообщ. АН ГССР.— 1978.— Т. 89, № 1.— С. 185—188.
2. Генес В. С. // Таблицы достоверных различий между группами наблюдений по качественным показателям.— М., 1964.— С. 17.
3. Горкин В. З. Аминоксидазы и их значение в медицине.— М., 1981.
4. Горошинская И. А. // Биохимия.— 1992.— Т. 57, № 2.— С. 220—225.
5. Крыжановский Г. Н. // Пат. физиол.— 1990.— № 2.— С. 3—8.
6. Мамадиев М., Хужамбердиев М., Горкин В. З. // Вопр. мед. химии.— 1983.— № 2.— С. 83—89.
7. Овчинникова Л. Н., Горкин В. З. // Там же.— 1989.— № 5.— С. 86—90.
8. Паракват и дикват (Гигиенические критерии состояния окружающей среды 39).— М., 1989.— С. 12—96.
9. Промыслов М. Ш. Обмен веществ в мозге и его регуляция при черепно-мозговой травме.— М., 1984.— С. 88.
10. Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г. // Современные методы в биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича.— М., 1977.— С. 66—68.
11. Сутковой Д. А. // Журн. невропатол. и психиатр.— 1991.— № 12.— С. 43—46.
12. Хужамбердиев М., Мамадиев М., Горкин В. З. // Вопр. мед. химии.— 1981.— № 6.— С. 829—834.
13. Шатемирова К. К., Зеленицкова В. А., Минько Ю. В. // Косм. биол.— 1990.— № 2.— С. 54—56.
14. Adams J. D., Odunze L. // Biochem. Pharmacol.— 1991.— Vol. 41.— P. 1099—1105.
15. Bainova A., Zaprianov M., Kaloyanova-Simeonova F. // Arh. Hig. Rada.— 1979.— Vol. 30.— P. 531—535.
16. DeGray J. A., Ramakrishna Rao D., Mason R. P. // Arch. Biochem.— 1991.— Vol. 289.— P. 145—154.
17. Gorkin V. Z. // Experientia.— 1969.— Vol. 25.— P. 1142—1143.
18. Gorkin V. Z. Amine Oxidases in Clinical Research.— Oxford, 1983.
19. Gorkin V. Z. // Structure and Functions of Amine Oxidases / Ed. B. Mondovi.— Boca Raton, Florida, 1985.— P. 205—208.
20. Goroshinskaya I. A., Bronovitskaya Z. G., Gorkin V. Z. // Commun. Psychopharmacol.— 1977.— Vol. 1.— P. 39—47.
21. Hara S., Endo T., Kuriita F., Kano S. // J. Pharm. Pharmacol.— 1991.— Vol. 43.— P. 731—733.
22. Kagan V. E. Lipid Peroxidation in Biomembranes.— Boca Raton, Florida, 1988.

23. Kitazawa Y., Matsubara M., Takeyama M., Tanaka T. // Arch. Biochem.— 1991.— Vol. 288.— P. 220—224.
24. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem.— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
25. Tomita M. // Biochem. Pharmacol.— 1991.— Vol. 42.— P. 303—309.
26. Wolfgang G. H. I., Jolly R. A., Petry T. W. // Free Radic. Biol. Med.— 1991.— Vol. 10.— P. 403—411.

Поступила 23.03.93

PECULIARITIES OF THE BIOCHEMICAL EFFECTS OF PARAQUAT ON OXYDATIVE DEAMINATION OF BIOGENIC AMINES AND SOME OTHER NITROGENOUS COMPOUNDS.

K. Amanov, M. Mamadiev, M. A. Khuzhamberdiev, V. Z. Gorkin

Medical School, Andizhan, Republic of Uzbekistan, Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Intoxication of rats with the herbicide paraquat (1,1-dimethyl-4,4-bipyridilium dichloride) was accompanied by accumulation in lungs, brain, heart, liver or kidney of malonic dialdehyde (MDA) (the compounds reacting with 2-thiobarbituric acid), indicating that the intoxication stimulated lipid peroxidation (LPO) in biomembranes. Treatment of the intoxicated rats with the antioxidant diludin (2,6-dimethyl-3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydropyridine) or with the nucleophilic reagents sodium ascorbate or thiosulphate normalized the content of MDA in lungs, brain, heart, liver or kidney demonstrating the reversibility of the LPO stimulation caused by paraquat. On incubation of mitochondrial fractions of homogenates of lungs, brain, heart, liver or kidney of the intoxicated rats (as compared with the corresponding fractions from the intact animals) a decrease was noted in deamination of the substrates of monoamine oxidases serotonin, tryptamine, benzylamine, tyramine; at the same time, deamination of glucosamine and γ -aminobutyric acid was increased and deamination of putrescine and L-lysine appeared. These impairments in deamination of nitrogenous compounds caused by paraquat were reversible. All the impairments were normalized by the treatment of the experimental animals with the antioxidative and nucleophilic reagents; a decrease was noted in the rate of development of the lethal paraquat intoxication and appearance of morphological manifestations of normalization. The data obtained suggest that the reversible, qualitative modification ("transformation") of the monoamine oxidases of the type A might explain the peculiarities of the alterations in deamination of nitrogenous compounds in paraquat intoxication.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616.092:612.273.21-085.835.3-036.8-07:616.153.857

А. И. Лукаш, И. А. Горошинская, А. Ю. Виноградов

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ И НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ АЗОТИСТОГО КАТАБОЛИЗМА В ПЛАЗМЕ КРОВИ КРЫС ПРИ ГИПОКСИИ С ПОСЛЕДУЮЩЕЙ ГИПЕРОКСИЕЙ

НИИ биологии Ростовского государственного университета

Гипоксия с последующей реоксигенацией — кислородные режимы, с которыми сталкивается человеческий организм как в естественных (при различной патологии), так и в искусственных (при ГБО-терапии) условиях. Известно явление, называемое кислородным парадоксом или реоксигенационным синдромом, суть которого состоит в том, что реоксигенация после гипоксии не нормализует состояние организма, но, напротив, усугубляет начавшиеся патологические изменения. Описаны и возможные причины этого феномена: активация ксантиноксидазы, нейтрофилов, накопление восстановительных эквивалентов в дыхательной цепи митохондрий и микросомах с последующим образованием диоксида [3]. На протяжении ряда лет

в нашей лаборатории исследуются проявления кислородного парадокса в экспериментах на животных [11, 15].

Цель настоящей работы — изучение динамики продуктов азотистого (мочевина и мочевиная кислота) и белкового (среднемолекулярные пептиды — СМП) катаболизма с параллельным определением интенсивности свободнорадикальных процессов в плазме крови при сочетанном действии на животных острых режимов гипо- и гипероксии.

Методика. Исследование проводили на белых безлинейных крысах-самцах массой 120—140 г. В каждой экспериментальной серии животных делили на 4 группы: 1-я группа — контроль; 2-я — острая гипоксия; 3-я — острая гипоксия + острая гипероксия до стадии судорог; 4-я — острая гипероксия до судорог. Состояние острой гипоксии создавалось «подъемом» животных в барокамере на условную высоту 9000 м над уровнем моря и экспонированием в течение 3 ч. Сразу после «спуска» крыс 3-й группы реоксигенировали в режиме острой гипербарической гипероксии (экспозиция под давлением чистого кислорода 0,7 МПа). При наступлении первого генерализованного судорожного приступа (среднее время 56 мин) животных извлекали из барокамеры и декапитировали. В плазме крови определяли уровень Fe^{2+} -индуцированной хемилюминесценции (ХЛ) [8] и содержание продуктов азотистого катаболизма: мочевиной кислоты по методу [18], мочевины стандартным диацетилмонооксимным методом, а также СМП по методу [5], модифицированному нами согласно рекомендациям [13]. Кроме того, в образцах исследовали суммарную пероксидазную активность (СПА) [14], уровень внеэритроцитарного гемоглобина (ВЭГ) стандартным гемоглобинцианидным методом и молочной кислотой [16].

Результаты и обсуждение. Полученные результаты представлены в таблице. Последовательное воздействие острой гипоксии и острой гипероксии на 46 % отдаляло время наступления первого генерализованного судорожного приступа по сравнению с гипероксией без предшествующей гипоксии, что согласуется с данными, полученными в нашей лаборатории ранее при иных режимах гипоксии [11].

Уровень Fe^{2+} -индуцированной ХЛ во всех трех экспериментальных группах оказался достоверно ниже, чем в контроле: при острой гипоксии на 18 %, при острой гипоксии с последующей острой гипероксией на 14 %, при острой гипероксии на 16 %. Подобный феномен в той его части, которая касается острой гипоксии на стадии судорог, уже наблюдался ранее в нашей лаборатории для H_2O_2 -индуцированной ХЛ [9]. Анализ данных литературы позволяет сделать вывод, что снижение ХЛ характерно для острого стресса различной этиологии и соответствует стадии срочной компенсации после первичной активации свободнорадикальных процессов [1].

В связи с вышесказанным особое внимание обращает на себя динамика содержания в плазме биологически активных веществ, которые могут быть ответственны за подавление процессов образования свободных радикалов. Уровень мочевиной кислоты в 3-й и 4-й группах оказался значительно выше, чем в контроле (на 52 и 58 % соответ-

Показатель	Контроль	Острая гипоксия	Острая гипоксия + острая гипероксия	Острая гипероксия
Время до наступления судорог, мин	—	—	65,8 ± 3,20 (49)**	45,2 ± 2,17 (52)
Светосумма медленной вспышки ХЛ, усл. ед.	12,39 ± 0,52 (18)	10,14 ± 0,060 (10)*	10,70 ± 0,31 (35)*	10,44 ± 0,34 (35)*
Мочевая кислота, ммоль/л	0,096 ± 0,004 (21)	0,101 ± 0,004 (10)	0,146 ± 0,004 (33)*	0,152 ± 0,004 (32)*
Мочевина, ммоль/л СМП, усл. ед.	11,34 ± 0,51 (11)	11,04 ± 1,04 (8)	11,52 ± 0,41 (20)	11,94 ± 0,60 (16)
СПА, усл. ед. на 1 мл плазмы	6,03 ± 0,41 (20)	3,50 ± 0,54 (9)*	12,70 ± 0,89 (26)*	13,70 ± 1,44 (21)*
ВЭГ, мкмоль/л	5,59 ± 0,45 (9)	5,03 ± 0,68 (10)	8,08 ± 0,57 (19)*	8,81 ± 0,79 (12)*
Молочная кислота, ммоль/л	5,58 ± 0,93 (7)	6,55 ± 0,44 (9)	26,8 ± 2,32 (15)*	26,2 ± 1,92 (17)*

Примечание. Одна звездочка — достоверные различия по отношению к контролю, две — по отношению к острой гипероксии. В скобках — число опытов.

ственно), а содержание мочевины достоверно не изменилось ни в одной из экспериментальных групп. Подобная динамика уже наблюдалась в нашей лаборатории для обоих показателей в плазме крови [9]. Исследования последних лет привлекают все большее внимание к важной роли урата как внеклеточного антиоксиданта, в особенности в плазме крови [17]. Что же касается отсутствия заметных изменений в содержании другого признанного антиокислительного протектора — мочевины, то одно из допустимых объяснений заключается в перераспределении ее между плазмой крови и тканями, переходе значительной доли из свободного состояния в связанное [12].

Как видно из таблицы, уровень СМП в 3-й и 4-й группах был достоверно выше, чем в контроле, на 22 и 16 % соответственно. В литературе имеются разные точки зрения относительно роли накопления СМП в крови. Если в ранних работах уровень СМП рассматривается только как показатель эндогенной интоксикации организма [6], то в работах последних лет допускается уже возможная компенсаторная роль пептидемии при острых стрессах [2]. Так, описана неспецифическая антиокислительная активность некоторых фракций СМП, проявляемая ими через подавление перекисного окисления липидов в крови как *in vitro*, так и *in vivo* [2, 4].

СПА возрастала в 3-й и 4-й группах на 105 и 121 % соответственно, а во 2-й группе (острая гипоксия) снижалась на 42 % относительно контроля. Содержание ВЭГ увеличивалось в 3-й и 4-й группах на 43 и 56 % соответственно, а во 2-й группе достоверно не изменялось. Повышение СПА и увеличение содержания ВЭГ могут свидетельствовать о повышении проницаемости мембран эритроцитов для веществ внутриклеточного происхождения как после острой гипероксии, так и после острой гипоксии с последующей гипероксией; в совокупности оба эти показателя считаются интегральным параметром, отражающим тяжесть повреждения организма при стрессе [7].

Уровень лактата оказался выше контрольного как при сочетанном действии гипо- и гипероксии (на 379 %), так и при действии только острой гипероксии (на 369 %); в то же время при острой гипоксии никакого достоверного прироста не наблюдалось. Известно, что судорожные состояния

как разновидность интенсивной мышечной нагрузки приводят к резкому увеличению содержания молочной кислоты [10]; очевидно, это в полной мере относится и к судорогам при кислородной интоксикации в избранном нами режиме, тогда как гипоксия не проявила себя столь же мощным фактором накопления лактата.

В совокупности все исследованные показатели дают следующую картину изменений в плазме крови при острой гипоксии с последующей гипероксией на стадии судорог: на фоне подавления свободнорадикальных процессов, увеличения содержания молочной кислоты и выхода в плазму гемоглобина из поврежденных эритроцитов происходит последовательное повышение содержания продуктов белкового, а затем и азотистого катаболизма. Накопление этих катаболитов может занимать существенное место в ряде реакций срочной компенсации, развивающихся на ранних стадиях острого стресса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барабой В. А. // Успехи соврем. биол.— 1991.— Т. 3, № 6.— С. 923—931.
2. Вальдман Б. М., Волчегорский И. А., Пужевский А. С. и др. // Вопр. мед. химии.— 1991.— № 1.— С. 23—26.
3. Владимиров Ю. А., Азизова О. А., Деев А. И. и др. // Биохимика. Итоги науки и техники. Вып. 29.— М., 1991.— С. 172—185.
4. Волчегорский И. А., Вальдман Б. М., Скобелева Н. А. и др. // Вопр. мед. химии.— 1991.— № 2.— С. 28—33.
5. Габриэлян Н. И., Липатова В. И. // Лаб. дело.— 1984.— № 3.— С. 138—140.
6. Габриэлян Н. И., Дмитриев А. А. и др. // Анест. и реаниматол.— 1985.— № 1.— С. 36—38.
7. Горошинская И. А., Немашкалова Л. А., Ходакова А. А., Шерстнев К. Б. // Бюл. exper. биол.— 1992.— № 9.— С. 268—269.
8. Журавлев А. К., Шерстнев М. П. // Лаб. дело.— 1985.— № 10.— С. 586—587.
9. Кения М. В. Динамика свободнорадикальных процессов и продуктов азотистого катаболизма в тканях системы крови при гипоксии: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Ростов-н/Д., 1991.
10. Колб В. Г., Камышиников В. С. Справочник по клинической химии.— Минск, 1982.
11. Левин А. М. Металлсодержащие соединения и свободнорадикальные процессы в сыроворотке крови при изменениях кислородного режима организма: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Ростов-н/Д., 1988.
12. Николайчик В. В., Моин В. М. и др. // Лаб. дело.— 1991.— № 10.— С. 18—18.
13. Покровский А. А. Биохимические методы исследования в клинике.— М., 1969.

15. Садекова С. И. Влияние гипоксии и гипербарической оксигенации и их последовательного действия на микросомальное окисление и состояние мембран, микросом: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Ростов-н/Д., 1991.
16. Прохорова М. И., Тупикова З. Н. // Большой практикум по углеводному и липидному обмену.— Л., 1965.— С. 81—84.
17. Ames B. N., Catchort R., Schwiers E., Hochstein P. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1981.— Vol. 78, N 11.— P. 6858—6862.
18. Shu S. Y. // Canad. J. med. Technol.— 1978.— Vol. 40, N 5.— P. 154—158.

Поступила 16.02.93

CHEMILUMINESCENT ANALYSIS AND SOME PARAMETERS OF NITROGEN CATABOLISM IN BLOOD PLASMA UNDER HYPOXIC CONDITIONS AND SUBSEQUENT HYPEROXIA

A. I. Lukash, I. A. Goroshinskaya, A. Yu. Vinogradov

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

Different regimens of oxygenation were studied in rats: acute hypoxia (9.000 m, 3 hrs), acute hyperoxia (0.7 MPa O₂), which caused convulsions, and their simultaneous effects. Under these conditions the following parameters were evaluated: the rate of Fe²⁺-induced chemiluminescence, content of nitrogen and peptide catabolism products (urea, urates and middle molecule peptides) as well as total peroxidase activity, content of extraerythrocyte hemoglobin and lactic acid in blood plasma. Distinct inhibition of the chemiluminescence rate was found in all the three experimental groups studied; accumulation of uric acid, middle mass peptides, extraerythrocyte hemoglobin, lactic acid as well as an increase in the total peroxidase activity were observed in hyperoxia and in simultaneous effect of hypo- and hyperoxia; total peroxidase activity was decreased in rats with acute hypoxia. Accumulation of urates and middle mass peptides was considered according to these substances capacity to inhibit free radical oxidation *in vivo*.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616-001-031.13-07:616.153.1:577.152.314

Г. К. Абашева, А. А. Губко, Г. П. Петрусенко, О. Т. Прасмыцкий

АКТИВНОСТЬ НУКЛЕАЗ ПРИ МНОЖЕСТВЕННОЙ ТРАВМЕ

Минский медицинский институт

Работами многих авторов показано, что изучение активности нуклеаз при различных патологических состояниях может иметь прогностическое и диагностическое значение [3, 12]. Система тканевых нуклеаз катализирует деградационные превращения ДНК и РНК, участвует в трансляции, репарации нуклеиновых кислот и ассоциированных с ними процессах, вследствие чего играет главную роль в интеграции обмена веществ в клетке [6, 7]. Строение и функции нуклеаз довольно хорошо изучены, что делает их незаменимыми объектами для исследования влияния на организм различных физиологических и патологических воздействий [11].

Методика. Изучали активность 4 видов нуклеаз: ДНКазы I и II и РНКазы I и II — в сыворотке крови у больных с тяжелой механической множественной травмой. Исследования проведены у 25 пострадавших в возрасте 20—60 лет с благоприятным исходом травматической болезни в 1, 3, 5—6, 14 и 21-е сутки с момента получения травмы. В эти же периоды определяли содержание инсули-

на в плазме крови радиоиммунологическим методом [10]. Контролем служила сыворотка крови 11 доноров.

Активность ДНКазы I (КФ 3.1.4.5), действующей в щелочной зоне (рН 7,4), а также ДНКазы II (КФ 3.1.4.6), проявляющей максимум активности в кислой зоне (рН 5,4), определяли спектрофотометрически по накоплению продуктов дегградации ДНК [1]. В качестве субстрата использовали ДНК («Reanal») после предварительной очистки [1]. Активность щелочной РНКазы I (КФ 3.1.4.22) и кислой РНКазы II (КФ 3.1.4.23) исследовали методом [2]. Субстратом служила РНК («Sigma»), которую также очищали. Активность щелочных РНКазы и ДНКазы исследовали в трис-НСI-буфере рН 7,8 и 7,4 кислой РНКазы — в ацетатно-вероналовом буфере рН 6,0, кислой ДНКазы — в ацетатном буфере рН 5,4. Полученные результаты обрабатывали статистически [5].

Результаты и обсуждение. Анализируя результаты, приведенные в таблице, следует отметить, что в 1-е сутки после получения травмы незначительно увеличивается активность щелочной РНКазы, которая на 3-и сутки сменяется ее угнетением на 20 %, что статистически значимо. На 5-е сутки активность фермента возрастает, но ее превышение над контролем недостоверно, на 14-е сутки активность фермента достоверно возрастает и продолжает оставаться выше контрольных значений на 30 % к 21-му дню. Активность кислой РНКазы на первых этапах наблюдений изменяется волнообразно: в 1-е сутки с момента получения травмы незначительно увеличивается, затем снижается к 3-м суткам на 26 % ниже контрольных величин, к 5-м суткам возрастает до исходного уровня, к 14-м возрастает на 35 % и продолжает повышаться к 21-м суткам, превышая контрольные значения на 52 %.

Интересные данные получены при изучении другой группы ферментов — кислой и щелочной ДНКазы. Если кислая и щелочная РНКазы не претерпевала значительных изменений в 1-е сутки после получения травмы, то активность кислой ДНКазы достоверно увеличивалась в этот период на 22 %, а щелочной — на 19 %; на 3-и сутки активность щелочной ДНКазы незначительно понижается, а кислой ДНКазы снижается на 30 % и остается на 10 % ниже нормы. На 5—7-е сутки активность щелочной ДНКазы повышается на 28 %. На 14-е сутки активность щелочной ДНКазы снижается на 14 %, а кислой ДНКазы остается на том же уровне, на 10 % превышая контрольные значения, но это изменение статистически недостоверно. На 21-е сутки травматического периода активность щелочной ДНКазы остается без изменений, а кислой ДНКазы незначительно снижается, достоверно не отличаясь от нормы.

Таким образом, наиболее стабильной из изученных видов нуклеаз оказалась кислая ДНКазы, в то время как со стороны РНКазной системы отмечалась достаточно выраженная реакция в ответ на тяжелую множественную травму. Изменение активности нуклеаз в сыворотке крови больных в остром периоде травматической болезни имеет фазный характер; конкретизировать механизм этих изменений в настоящее время затруднительно. Из литературы известно, что характер и выражен-

Исследуемый показатель	Норма	Период после травмы, сут				
		1	2	3	4	5
Кислая РНКазы	0,61±0,06	0,66±0,07	0,51±0,04 <0,05	0,62±0,07	0,82±0,08 <0,02	0,92±0,11 <0,02
Щелочная РНКазы	0,32±0,01	0,33±0,02	0,26±0,009 <0,05	0,35±0,015	0,37±0,02 <0,05	0,41±0,03 <0,02
Кислая ДНКазы	0,11±0,009	0,134±0,01 <0,05	0,10±0,008	0,10±0,06	0,12±0,007	0,11±0,01
Щелочная ДНКазы	0,063±0,003	0,075±0,005 <0,05	0,069±0,006	0,081±0,007 <0,05	0,07±0,007	0,068±0,005
Инсулин	60,1±6,4	42,7±6,6 <0,02	30,5±4,5 <0,02	16,2±2,8 <0,001	46,9±4,7 <0,02	58,0±5,1

ность сдвигов активности нуклеаз зависят от состояния гормонального гомеостаза организма, поскольку его изменение введением кортикотропина, дексаметазона или инсулина вызывает либо стимуляцию, либо торможение активности изучавшихся ферментов [8]. Изолированное применение кортикотропина вызывает сравнительно умеренное увеличение активности всех 4 видов нуклеаз с преимущественным увеличением активности кислых форм ферментов, при комбинации с инсулином наблюдается суммационный эффект [9]. Считается, что инсулин видоизменяет проявления реакций нуклеазных систем в ответ на стресс [8]. В связи с изложенным представляло интерес проследить динамику изменения уровня инсулина в плазме крови больных при множественной травме. Анализ полученных данных показывает, что в 1-е сутки после получения травмы уровень инсулина в плазме крови составляет 70 % от нормы и продолжает снижаться до 27 % к 5—7-м суткам. Начиная с 14-го дня травматической болезни уровень инсулина возрастает и к 21-м суткам достигает контрольных значений.

Если проследить динамику изменения активности кислых нуклеаз в зависимости от содержания в крови инсулина, то можно обнаружить, что на 14—21-е сутки происходит увеличение активности кислых РНКазы и ДНКазы с увеличением в крови инсулина. Развивающиеся в остром периоде травматической болезни гормональные нарушения, и прежде всего в уровне инсулина, могут играть роль факторов, опосредующих изменения активности нуклеаз при тяжелых травмах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. — М., 1971. — С. 49.
2. Нечаева Г. А. // Укр. биохим. журн. — 1964. — Т. 36, № 4. — С. 607—614.
3. Новикова Н. В., Новгородцева Т. Н., Рыкова М. А., Эндакова Э. А. // Вопросы курортологии и физиотерапии. — Вильнюс, 1983. — С. 150—154.
4. Протасова Т. Н. Гормональная регуляция активности ферментов. — М., 1975.
5. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. — Минск, 1973.
6. Сим Э. Биохимия мембран. — М., 1985.
7. Татарская Р. И. // Молекул. биол. — 1976. — Т. 10, № 2. — С. 235—259.
8. Фомиченко К. В., Петрусенко Г. П. // Вестн АН БССР. Сер. бйял. наук. — 1984. — № 5. — С. 72—74.
9. Фомиченко К. В., Петрусенко Г. П. // Там же. — № 2. — С. 43—47.
10. Чащин В. Л., Морозов И. Н., Чейкина А. В. Инструкция по применению набора реактивов для определения инсули-

на в сыворотке крови человека с использованием инсулина, меченного 125 . — Минск, 1989.

11. Шанот В. С. Нуклеазы. — М., 1968.

12. Эндакова Н. А., Новгородцева Т. П. // Лаб. дело. — 1991. — № 8. — С. 16—19.

Поступила 15.06.93

ACTIVITY OF NUCLEASES IN BLOOD OF PATIENTS WITH MULTIPLE TRAUMA

G. K. Abasheva, A. A. Gubko, G. P. Petrusenko, O. T. Prasmytsky
Medical School, Minsk

Activities of acid and alkaline DNAses and RNAses as well as content of insulin were studied in blood of patients with severe mechanical trauma. Distinct alterations in activities of acid and alkaline DNAses were observed in the acute period of the disease and the activity was normalized within 14-21 days. The RNAase system exhibited the most pronounced response to the trauma, while activity of acid RNAase exceeded the normal level by 52 % within 21 days of the posttraumatic period. Activities of acid and alkaline RNAases were increased simultaneously with elevation of the insulin content in blood within 14-21 days of the disease. Thus, alterations in the nucleases activity proved to be a sensitive response of a body to mechanical trauma.

© А. Н. АРИПОВ, Н. М. АКБАРОВА, 1994

УДК 616.36-002.1-092.9-06:616.36-018.1-008.931-07

А. Н. Арипов, Н. М. Акбарова

ИЗМЕНЕНИЯ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНОЙ СИСТЕМЫ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ОСТРОМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ГЕПАТИТЕ И ПУТИ ИХ КОРРЕКЦИИ

Экспериментально-лабораторный отдел НИИ педиатрии Минздрава Республики Узбекистан

В настоящее время известно, что циклические нуклеотиды, важные клеточные регуляторы, выступают в качестве функционально-структурных единиц живой системы, взаимодействующих с внешней средой. Установлено, что модификация ферментов, участвующих в обмене циклических нуклеотидов, и изменения концентрации последних являются одной из ранних реакций, связанных с патологическим состоянием организма. цАМФ — универсальный посредник действия многих гормонов, нейротрансмиттеров и биологически активных соединений — контролирует многие метаболические процессы в различных тканях, в том числе и в печени. Имеются многочисленные сообщения

в литературе об участии цАМФ в реализации гормонального действия на различные показатели углеводно-липидного обмена [10, 11], синтеза белков [12], активность ферментов [16, 18], пролиферативную активность [9] и другие процессы. Исследование обмена циклического нуклеотида при различных заболеваниях печени дает возможность выяснить молекулярные механизмы, лежащие в основе их патогенеза, способствует разработке дополнительных клинико-лабораторных критериев оценки особенностей течения различных форм заболеваний.

В связи с вышеизложенным целью настоящей работы было изучение внутриклеточной концентрации цАМФ и активности аденилатциклазы (АЦ) — фермента, катализирующего образование нуклеотида в печени здоровых крыс и крыс с острым экспериментальным гепатитом. Была сделана попытка коррекции патологического состояния печени путем введения лекарственных препаратов (фосфолипидного препарата, экдистена, унитиола).

Методика. В работе использовали белых безлинейных крыс-самцов массой по 60—100 г. Острый экспериментальный гепатит вызывали однократным введением водного раствора алкалоида гелиотрина в дозе 30 мг на 100 г массы тела крысы. Выбор алкалоида гелиотрина, выделенного из *Heliotropium Lasioscarpum*, обусловлен тем, что он оказывает выраженное избирательное действие на клетки печени [8].

Определение активности АЦ проводили в грубой фракции плазматических мембран гепатоцитов по методу [17]. Инкубационная смесь (400 мкл) содержала следующие компоненты: трис-HCl pH 7,6 — 50 мМ, теofilлин — 10 мМ; $MgCl_2$ — 5 мМ; АТФ — 4 мМ; креатинфосфат — 10 мМ, 0,1 мг на 1 мл креатинфосфокиназы и 40—100 мкг белка мембран. Об активности фермента судили по количеству образовавшегося цАМФ и выражали ее в пикомолях в 1 мин на 1 мг белка. Содержание цАМФ определяли радиоиммунным методом с помощью специальных наборов фирмы «Amersham» (Cyclic AMP Assay Kit, Англия). Белок в пробах определяли по [15]. Радиоактивность проб подсчитывали на сцинтилляционном счетчике 1219 Rasbetta» (LKB).

Результаты и обсуждение. В таблице представлены результаты по изменению внутриклеточного содержания цАМФ в печени здоровых крыс, а также крыс с острым гепатитом и введением лекарственных препаратов. Из таблицы видно, что при остром гепатите происходит снижение концентрации циклического нуклеотида на 47 %, что согласуется с данными литературы [2], о снижении активности цАМФ при хроническом патологическом процессе в печени. При введении фосфатидилхолина, экдистена и унитиола полностью восстанавливается, а в случае фосфатидилхолина и унитиола значительно повышается внутриклеточный уровень нуклеотида.

Учитывая, что уровень цАМФ отражает баланс между активностью АЦ, катализирующей его образование, и фосфодиэстеразой, нарушающей цАМФ, мы в следующей серии экспериментов определяли активность АЦ в мембранных фракциях клеток печени крыс, находившихся в вышеуказанных условиях. Из представленных данных видно, что изменения активности АЦ вполне коррели-

Изменение активности АЦ и содержания цАМФ мембран печени крыс при остром гепатите (ОГ) и после лечения лекарственными препаратами

Варианты опыта	Активность АЦ, нмоль на 1 мг белка в 1 мин	Содержание цАМФ, пмоль на 1 г сырой ткани
Норма	26,05±2,1	1104±12
ОГ	12,76±1,3	590±17
ОГ+фосфатидилхолин	48,5±4,1	2003±34
ОГ+унитиол	44,3±1,9	1840±19
ОГ+экдистен	30,7±1,7	1720±23

руют с изменением внутриклеточного содержания цАМФ, т. е. обнаруживается подавление ферментативной активности при остром гепатите, введение лекарственных препаратов стимулирует АЦ.

Данные о подавлении активности АЦ и содержания цАМФ подтверждают существующую точку зрения о том, что ранним признаком печеночных дисфункций является ингибирование аденилатциклазной системы. Очевидно, это обусловлено нарушением либо рецепции гормонов, либо липидного состава плазматических мембран клеток печени. В пользу последнего предположения свидетельствуют имеющиеся в литературе данные о том, что при делипидизации мембран происходит частичная или полная потеря активности АЦ [13, 14]. Известно, что АЦ является ферментом липопротеидной природы, для нормальной функционирования которой необходима целостность липидного микроокружения. Установлено, что введение различных фосфолипидов, входящих в это микроокружение, может восстанавливать сниженную активность фермента [13].

Согласно имеющимся данным [1], при остром гелиотриновом гепатите происходит увеличение интенсивности процессов перекисного окисления липидов, изменение фосфолипидного и жирнокислотного состава мембран эндоплазматического ретикулума гепатоцитов, что приводит к их повреждению. Наибольшие изменения при острой гелиотриновой интоксикации наблюдаются в кислых и легкоокисляемых фосфолипидах.

С целью воздействия на поврежденное липидное микроокружение АЦ нами был использован фосфолипидный препарат, представляющий собой чистую фракцию фосфатидилхолина, выделенную из шрот семян хлопчатника с добавлением мягкого детергента растительного происхождения, обладающего антиоксидантными свойствами [3]. Препарат предназначен для лечения различных заболеваний печени, обусловленных повреждением фосфолипидного бислоя мембран гепатоцитов и связанных с ним ферментных систем. Введение данного препарата больным крысам стимулировало активность АЦ почти в 2 раза, тем самым оказывая положительное действие на течение болезни. Однако нельзя не учитывать и того, что при остром гелиотриновом гепатите происходит нарушение рецепции и тех гормонов, эффекты которых передаются через аденилатциклазную систему.

Среди изученных лекарственных препаратов экдистен оказывал менее выраженное стимулирующее действие на АЦ. Использованный анаболический препарат представляет собой природное соединение, получаемое из корней и соцветий ряда видов левзеи, и содержит экдистерон в

качестве действующего начала [7]. Этот препарат относится к фитоэкдистероидам, действие его подобно действию стероидных гормонов, которые регулируют метаболические процессы в клетке путем связывания со специфическими рецепторами, локализованными в цитоплазме [4], проникая свободно через плазматическую мембрану. Вероятно, этим объясняется незначительное действие экдистена на аденилатциклазную систему. Однако в литературе последних лет появились сведения о том, что экдистен обладает мембраностабилизирующим свойством [5].

С целью детоксикационной терапии мы использовали препарат унитиол — димеркаптопропансульфонат натрия, применяемый для лечения острых и хронических отравлений тиоловыми ядами, т. е. веществами, способными вступать во взаимодействие с сульфгидрильными группами ферментных белков и инактивировать их. Образова с токсичными веществами, находящимися в крови и тканях, нетоксичные комплексы, унитиол способствует выведению их с мочой и приводит к восстановлению функций ферментных систем организма [6].

Таким образом, на основании полученных данных можно предположить, что нарушения системы цАМФ в печени крыс играют важную роль в патогенезе острого гепатита. Вероятно, эти нарушения затрагивают и фосфодиэстеразу — фермент, участвующий в деградации цАМФ внутри клетки. Нельзя также не принимать во внимание изменения, которые должны произойти в системе цГМФ-антагонист цАМФ. Изучение роли этих показателей при остром гепатите и других заболеваниях печени является предметом наших дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абдуллаев Ш. У. Значение липидов в механизмах мембранной патологии при гепатитах: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Алма-Ата, 1989.

2. Горячева Т. В. // Всесоюзный съезд терапевтов, 18-й: Тезисы. — М., 1981. — Ч. 2. — С. 229—230.
3. Даминов Т. А., Арипов А. Н., Исмухамедов А. Ш. А. с. 4053104 СССР.
4. Есенбаева В. З. // Докл. АН УзССР. — 1989. — № 2. — С. 53—55.
5. Есенбаева В. З. Действие экдистерона на метаболизм фосфолипидов в сердечной и скелетных мышцах: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Ташкент, 1991.
6. Машковский М. Д. Лекарственные средства. — 10-е изд. — М., 1986. — Т. 2. — С. 119.
7. Ташмухамедова М. А., Алматов К. Т., Хушбакова З. А. и др. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 1. — С. 81—84.
8. Ханин М. Н. // Пат. физиол. — 1970. — № 4. — С. 60—63.
9. Armato U., Andreis P. G., Draghi E. // Life Sci. — 1981. — Vol. 29. — P. 2763—2769.
10. Epton G. H., Blackmore P. F., Refai M. F. et al. // Advanc. cycl. Nucl. Res. — 1981. — Vol. 14. — P. 491—505.
11. Hayden L. G., Copen S., Levin K., Margolis S. // Canad. J. Biochem. — 1983. — Vol. 61. — P. 207—213.
12. Klaipongpan A., Bloxam D. P., Akhtar M. // Biochem. J. — 1977. — Vol. 168. — P. 271—275.
13. Levey G. S., Skelton C. L., Epstein C. E. // J. clin. Invest. — 1969. — Vol. 48. — P. 2244—2250.
14. Levey G. S., Epstein C. E. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1973. — Vol. 33. — P. 990—995.
15. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
16. Spence G. T., Haars L., Edwards A. et al. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1980. — Vol. 349. — P. 99—110.
17. Sutherland E., Singhle R. // Biochim. biophys. Acta. — 1974. — Vol. 343. — P. 238—243.
18. Wicks W. D., Leichtling B. H., Wimalasena J., Kons J. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1980. — Vol. 349. — P. 195—209.

Поступила 25.05.93

ALTERATIONS IN THE ADENYLATE CYCLASE SYSTEM OF RAT LIVER CELLS IN ACUTE EXPERIMENTAL HEPATITIS AND CORRECTION OF THE IMPAIRMENT

A. N. Aripov, N. M. Akbarova

Institute of Pediatrics, Tashkent

Impairments of the cAMP system in rat liver tissue are of importance in pathogenesis of acute heliotrin hepatitis. Such drugs as phosphatidylcholine, ecdistene, unitiol promote the impaired lipid environment restoration which makes it possible to normalize the adenylate cyclase system and cyclic nucleotides functions.

КЛИНИКО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616.379-008.64-053.2-07:616-008.93:577.161/.169

В. М. Коденцова, О. А. Вржесинская, А. А. Сокольников, Е. В. Трофименко, Н. В. Блажеевич, Л. А. Харитончик, Л. С. Трофименко, В. И. Дронова, В. Б. Спиричев

ОБМЕН ВИТАМИНОВ У ДЕТЕЙ, БОЛЬНЫХ ИНСУЛИНЗАВИСИМЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ. ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОСТИ ЗАБОЛЕВАНИЯ, ЕГО ТЯЖЕСТИ И СТЕПЕНИ НАРУШЕНИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

Институт питания РАМН, ЦОЛИУВ, Москва

Одним из факторов, способствующих развитию сахарного диабета, является недостаточная обеспеченность организма витаминами [7]. Многие витамины выступают синергистами инсулина, оказывая гипогликемическое действие [1, 10].

У больных сахарным диабетом дефицит водорастворимых витаминов встречается чаще, чем у здоровых [9, 14]. Этим объясняется особое внимание к исследованию обмена витаминов при указанном заболевании. Однако результаты исследования витаминного статуса больших групп больных и здоровых людей, приведенные во многих работах [1, 7—9, 13—15], противоречивы. Так, описано как уменьшение, так и увеличение экскреции тиамина и рибофлавина при диабете по сравнению со здоровыми людьми [9, 13, 15]. Эти различия могут быть обусловлены как особенностями питания (строго контролируемая калорийность рациона), так и тяжестью заболевания.

В связи с этим в нашей работе предпринята попытка проследить у детей, больных инсулинзависимым сахарным диабетом, зависимость обмена витаминов С, В₁, В₂, В₆ и ниацина от длительности, тяжести заболевания, состояния углеводного, белкового и липидного метаболизма. С этой

целью был охарактеризован витаминный статус 35 детей обоего пола 9—13 лет, поступивших на лечение в эндокринологическое отделение детской городской клинической больницы № 1 Москвы. Для сравнения было проведено исследование витаминной обеспеченности у 31 здорового ребенка (контрольная группа).

Методика. Спорадический диабет был у 51,4 %, семейный — у 48,6 % детей. Наследственность по сахарному диабету была отягощена у 48,5 % пациентов. Давность заболевания составляла 3—8 нед у 40 % больных, от 1 года до 7 лет у 60 %. При поступлении декомпенсированная стадия зафиксирована у 77,2 % пациентов, среди них кетоацидоз встречался в 44,4 %, коматозное состояние — в 26,0 % случаев. Среди осложнений чаще всего отмечались микроангиопатии (45,7 %), неспецифические проявления наблюдались у 37,1 %, специфические — у 8,6 % детей. Из сопутствующих заболеваний наиболее распространенным был хронический тонзиллит — 37,1 %. Уровень гликемии колебался от 6,1 до 20 ммоль/л, глюкозурии — от 3 до 95 г/сут. В клинической картине заболевания наряду с основными классическими проявлениями сахарного диабета у 40,0 % детей отмечались выраженные липодистрофические изменения в виде липом.

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

Рибофлавин в моче и плазме определяли титрованием рибофлавинсвязывающим апопротеином [3], в эритроцитах люмифлавиновым методом [12], 4-пиридоксильную кислоту (4-ПК) [16], 1-метилникотинамид (1-МНА) — флуориметрическими методами [5], тиамин — тиохромным методом [11]. Аскорбиновую кислоту в плазме и моче определяли методом визуального титрования 2,6-дихлорфенолиндофенолом [11]. Концентрацию ни-

Таблица 1

Обеспеченность витаминами здоровых и больных детей

Исследуемый показатель	Норма	Здоровые	Больные
Витамин С: мг/дл плазмы	0,70 ± 1,20	0,58 ± 0,05 (28)	0,74 ± 0,07 (28)
экскреция, мкг/ч	>0,70	0,19 ± 0,03 (28)	2,29 ± 0,56* (28)
Витамин В ₁ : экскреция, мкг/ч	>11	13,7 ± 2,3 (28)	24,8 ± 3,4* (33)
Витамин В ₂ : рибофлавин, нг/мл	>130	145 ± 5 (8)	82 ± 6* (19)
экскреция, мкг/ч	>10	11,0 ± 1,6 (28)	81,7 ± 16,8* (33)
Витамин В ₆ : ПАЛФ, нг/мл	>8,0	7,9 ± 1,2 (9)	8,1 ± 1,1 (27)
экскреция 4-ПК, мкг/ч	50	42 ± 9 (11)	109 ± 34 (p ≤ 0,10) (33)
Ниацин: НАД+НАДФ, мкг/мл	40—80	44 ± 3 (12)	76 ± 4* (23)
экскреция 1-МНА, мкг/ч	>400	547 ± 115 (10)	346 ± 51 (33)

Примечание. Здесь и в табл. 2—6 в скобках — число детей. Звездочка — достоверное отличие (p ≤ 0,01) от показателей здоровых детей.

котинамидных коферментов (НАД+НАДФ) в эритроцитах измеряли флуоресцентным методом [5], пиридоксальфосфата (ПАЛФ) — методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [20]. Во всех флуоресцентных методах использовали соответствующий внутренний стандарт. Интенсивность флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре «Perkin Elmer MPF-43A» (Япония).

Результаты и обсуждение. У всех детей, больных сахарным диабетом, были выявлены микросимптомы полигиповитаминоза: сухость кожных покровов (у 89 %), обложенность языка налетом (у 57 %), трещины каймы губ (у 49 %), кровоточивость десен (у 31 %), раздражительность (у

Таблица 2

Обеспеченность витаминами детей в зависимости от давности заболевания сахарным диабетом

Исследуемый показатель	Давность заболевания				
	менее 1 мес	менее 1 года	2—3 года	3,5—5 лет	5,5—7 лет
Витамин С: мг/дл плазмы	0,7 ± 0,1 (5)	0,8 ± 0,2 (3)	0,8 ± 0,1 (2)	0,5 ± 0,1 (3)	—
экскреция, мкг/ч	2,1 ± 1,6 (6)	1,8 ± 0,1 (2)	1,2 ± 0,2 (2)	1,3 ± 0,7 (3)	2,8 ± 1,7 (3)
Витамин В ₁ : экскреция, мкг/ч	28,0 ± 17,0 (6)	15,0 ± 14,0 (3)	—	22,6 ± 11,4 (5)	19,0 ± 5,3 (4)
Витамин В ₂ : рибофлавин, нг/мл	70,0 ± 7,0 (2)	85,0 ± 7,0 (3)	80,1 ± 3,0 (2)	53,0 ± 5,6 (2)	83,3 ± 18,5 (3)
экскреция, мкг/ч	37,0 ± 8,7 (6)	63,0 ± 9,3* (3)	71,1 ± 35,6 (4)	71,0 ± 33,0 (5)	62,0 ± 4,7** (4)
Витамин В ₆ : ПАЛФ, нг/мл	11,2 ± 7,1 (4)	9,0 ± 1,2 (2)	5,7 ± 1,6 (4)	12,5 ± 0,5 (4)	4,2 ± 0,5 (3)
экскреция 4-ПК, мкг/ч	76,3 ± 22,0 (6)	123,0 ± 35,0 (3)	84,0 ± 35,8 (4)	89,0 ± 39,3 (5)	95,8 ± 37,5 (4)
Ниацин: НАД+НАДФ, мкг/мл	81 ± 30 (4)	71 ± 6 (3)	72 ± 7 (2)	80 ± 12 (3)	81 ± 16 (3)
экскреция 1-МНА, мкг/ч	169 ± 70 (6)	397 ± 135 (3)	235 ± 97 (4)	367 ± 151 (5)	246 ± 120 (4)

Примечание. Одна звездочка — отличие (p ≤ 0,1), две — достоверное отличие (p ≤ 0,05) от показателей детей, больных сахарным диабетом менее 1 мес.

Таблица 3

Обеспеченность витаминами детей, в зависимости от стадии сахарного диабета

Исследуемый показатель	Стадии заболевания			
	компенсация	декомпенсация без кетоза	кетоз	кома
Витамин С: мг/дл плазмы	0,5±0,3 (4)	0,5±0,2 (4)	0,6±0,1 (4)	0,7±0,3 (4)
экскреция, мкг/ч	2,2±0,9 (5)	2,7±0,7 (4)	0,9±0,4 (2)	2,8±2,0 (4)
Витамин В ₁ : экскреция, мкг/ч	16,6±5,6 (5)	20,2±8,9 (6)	19,0±7,0 (4)	33,5±8,1 (4)
Витамин В ₂ : рибофлавин, нг/мл ЭР	70,5±1,5 (2)	87,0±10,4 (4)	61,5±29,5 (2)	68,7±5,5 (3)
экскреция, мкг/ч	67,0±27,3 (5)	74,8±27,5 (6)	51,7±8,4 (4)	51,8±10,9 (4)
Витамин В ₆ : ПАЛФ, нг/мл	4,2±0,5 (4)	6,6±1,2 (5)	5,0±2,0 (4)	14,0±10,3 (3)
экскреция 4-ПК, мкг/ч	80,2±25,4 (5)	105,7±32,4 (6)	77,7±45,9 (4)	92,5±38,4 (4)
Ниацин: НАД+НАДФ, мкг/мл	76±12 (2)	79±7 (5)	98±20 (3)	58±12 (4)
экскреция 1-МНА, мкг/ч	367±120 (5)	443±125 (6)	174±54* (4)	141±38* (4)

Примечание. Звездочка — отличие ($p \leq 0,10$) от показателей детей с декомпенсированным сахарным диабетом без кетоза.

54 %). Все указанные выше симптомы обнаружены у 30 % детей, 3—4 симптома — у 60 %.

В табл. 1 представлены показатели обеспеченности витаминами здоровых и больных детей, обследованных в зимне-весенний период и не принимающих поливитаминных препаратов. Содержание аскорбиновой кислоты в плазме крови детей в среднем по группам практически не различается, при этом ее выведение у больных детей на порядок превышает экскрецию этого витамина у здоровых. По-видимому, это различие в значительной мере является отражением недостаточного содержания витамина С в рационе здоровых

детей. В полном соответствии с данными литературы [7, 8] выявлена повышенная по сравнению с контрольной группой экскреция тиамина с мочой у больных детей. Концентрация рибофлавина в эритроцитах у них снижена на 43 % по сравнению с уровнем, характерным для здоровых детей этого же возраста. При этом выведение рибофлавина с мочой повышено по сравнению с нормой в 3—7 раз, что согласуется с собственными результатами, полученными ранее [2], и данными литературы [17]. Обнаруживается тенденция к увеличению экскреции 4-ПК при одинаковом содержании ПАЛФ в плазме. Экскреция

Таблица 4

Обеспеченность витаминами детей, больных сахарным диабетом, в зависимости от наличия осложнений

Исследуемый показатель	Без осложнений	С осложнениями	Без липодистрофии	С липодистрофией
Витамин С: мг/дл плазмы	0,7±0,1 (8)	0,5±0,1 (9)	0,7±0,1 (10)	0,4±0,1* (7)
экскреция, мкг/ч	2,1±1,2 (8)	2,1±0,5 (8)	1,7±0,2 (11)	2,7±0,5 (6)
Витамин В ₁ : экскреция, мкг/ч	26,0±5,3 (8)	19,0±4,5 (8)	24,1±4,0 (10)	18,9±5,5 (10)
Витамин В ₂ : рибофлавин, нг/мл	74,2±5,5 (5)	74,5±9,4 (6)	67,0±6,8 (6)	83,0±7,4 (5)
экскреция, мкг/ч	45,2±7,8 (8)	71,1±14,3 (12)	52,6±14,4 (11)	64,8±17,1 (10)
Витамин В ₆ : ПАЛФ, нг/мл	9,7±3,8 (7)	4,6±0,8 (10)	8,5±3,0 (9)	4,8±0,9 (8)
экскреция 4-ПК, мкг/ч	83,0±19,0 (8)	92,0±13,3 (12)	76,2±14,5 (11)	98,0±20,8 (10)
Ниацин: экскреция 1-МНА, мкг/ч	169±71 (8)	360±47** (12)	233±53 (11)	373±77 (10)

Примечание. Одна звездочка — отличие ($p \leq 0,10$) от показателей детей без липодистрофии, две — достоверное отличие ($p \leq 0,05$) от показателей детей без осложнений.

Показатели белкового и липидного обмена и обеспеченность витаминами детей, страдающих сахарным диабетом

Исследуемый показатель	Общий белок плазмы, г/л		β-Липопротеины, г/дл		Холестерин, г/л	
	65—85	60—65	<35	35—58,5	>6,2	норма
Витамин С: мг/дл плазмы	0,6±0,1 (15)	—	0,7±0,1 (6)	0,5±0,1 (11)	0,4±0,1 (4)	0,6±0,1 (11)
экскреция, мкг/ч	1,9±0,7 (15)	3,5±0,4 (2)	1,9±0,6 (6)	2,2±0,9 (11)	0,5±0,1* (3)	2,4±0,8 (12)
Витамин В ₁ : экскреция, мкг/ч	21,5±3,0 (17)	29,0±16,0 (3)	21,0±6,0 (8)	22,0±4,0 (13)	12,0±6,0 (4)	24±3 (15)
Витамин В ₂ : рибофлавин, нг/мл плазмы	74±9 (10)	—	76±9 (3)	71±11 (8)	58±18 (3)	81±6 (8)
экскреция, мкг/ч	54±10 (17)	41±14 (3)	56±17 (8)	48±13 (13)	76±47 (4)	54±11 (15)
Витамин В ₆ : ПАЛФ, нг/мл	5,7±0,6 (13)	3,5±2,0 (2)	4,6±0,9 (8)	4,5±1,0 (8)	4,3±0,7 (4)	5,7±0,6 (12)
экскреция 4-ПК, мкг/ч	84±10 (17)	60±23 (3)	76±17 (8)	93±17 (13)	76±55 (4)	89±10 (13)
Ниацин: экскреция	217±39 (15)	285±114 (2)	304±74 (6)	324±65 (11)	314±209 (3)	296±42 (12)
1-МНА, мкг/ч						

Примечание. Звездочка — достоверное отличие ($p \leq 0,05$) от показателей детей с нормальным уровнем холестерина в крови.

1-МНА у больных детей снижена по сравнению с показателем здоровых детей и величиной, принятой в качестве нормы для нормальной обеспеченности ниацином. Однако это, по-видимому, не является следствием недостаточной обеспеченности ниацином, так как содержание коферментных форм этого витамина в эритроцитах находится в пределах нормы, а скорее отражает особенности метаболизма триптофана по пути, минуяшему образование НАД и 1-МНА, обнаруженному в экспериментах на крысах со стрептозотоциновым диабетом [6, 18, 19].

В табл. 2 представлены показатели обеспеченности детей витаминами в зависимости от давности заболевания сахарным диабетом. Следует отметить, что в отдельных группах количество обследованных детей невелико (3—6 человек), в связи с чем в ряде случаев различия не достигают достоверной значимости, однако даже эти данные позволяют сделать некоторые заключения.

Не выявлено различий в величинах экскреции 1-МНА, тиамин, 4-ПК и аскорбиновой кислоты по группам детей с различной давностью заболевания. Число детей со сниженной экскрецией 1-МНА во всех группах колеблется от 60 до 83 %, тиамин — от 17 до 60 %, 4-ПК — от 17 до 25 %, аскорбиновой кислоты — до 50 %. Не наблюдали также достоверных различий в содержании аскорбиновой кислоты и ПАЛФ в плазме крови и никотинамидных коферментов в эритроцитах. В литературе отмечена сниженная концентрация аскорбиновой кислоты в сыворотке крови взрослых больных со среднетяжелой и тяжелой формами сахарного диабета по сравнению со здоровыми людьми; предполагают, что одной из причин этого является недостаточное поступление витамина С с пищей [10]. Среднее содержание аскорбиновой кислоты в плазме обследованных нами детей, за исключением 3, болеющих более 3,5 лет, было в пределах нормы, что, по-видимому, отражает достаточное его содержание в рационе.

Экскреция рибофлавина с мочой возрастает по мере увеличения продолжительности заболевания, что проявляется в виде тенденции при увеличении срока заболевания до 1 года и приобретает достоверную значимость для детей, болеющих более 5 лет (см. табл. 2). Если среди детей с впервые выявленным сахарным диабетом у трети обследованных экскреция рибофлавина находится в пределах нормы, то у всех болеющих в течение 5—7 лет она была повышена. Минимальное отклонение от нормы наблюдается у детей с впервые выявленным сахарным диабетом (см. табл. 1, 2). Таким образом, при сахарном диабете происходит нарушение обмена рибофлавина, проявляющееся в его повышенном выведении с мочой и возрастающее с увеличением давности заболевания.

В соответствии с данными табл. 3 не обнаружено связи между показателями обмена витаминов С, В₁, В₂, В₆ и клиническим состоянием детей, в то же время просматривается наличие такой связи между экскрецией 1-МНА с мочой и течением заболевания. Если у детей в стадии компенсации и декомпенсации без кетоза сниженная по сравнению со здоровыми детьми его экскреция встречается у 40—50 %, то в состоянии комы и при ацидокетозе в 100 % случаев выведение этого метаболита в 2—2,5 раза снижено по сравнению с группой детей с компенсированным сахарным диабетом. Это наблюдение находится в соответствии с данными о том, что дефицит ниацина усугубляет течение сахарного диабета, а никотинамид является синергистом инсулина [1, 9].

Как следует из табл. 4, у детей с осложнениями обнаруживается тенденция ($p \leq 0,10$) к увеличению экскреции рибофлавина по сравнению с детьми с неосложненным течением диабета. Достоверных отличий параметров обмена витаминов В₁ и В₆ в зависимости от наличия или отсутствия осложнений не выявлено. Более высокая экскреция 1-МНА с мочой у детей с осложнениями, по-видимому, отражает более высокое поступление

Показатели углеводного обмена и обеспеченность витаминами детей, страдающих сахарным диабетом

Исследуемый показатель	Гликемия, ммоль/л			Глюкозурия, г/сут		
	9,00, 5,8—8,8 13,00 5,9—13,6	10,6—13,1 6,0—15,6	13,5—20,0 8,9—16,0	0—10	10—20	>20
Витамин С:						
мг/дл	0,6±0,2	0,5±0,2	0,9±0,1	0,7±0,1	0,7±0,4	0,5±0,2
плазмы	(6)	(3)	(4)	(4)	(6)	(3)
экскреция,	1,4±0,8	1,8±1,1	2,0±0,6	1,1±0,2	1,3±0,9	1,7±1,1
мкг/ч	(4)	(4)	(4)	(6)	(4)	(3)
Витамин В₁:						
экскреция,	22±6	20±6	16±7	18±5	23±8	25±5
мкг/ч	(6)	(5)	(5)	(6)	(7)	(4)
Витамин В₂:						
рибофлавин,	84±9	—	79±2	65±24	74±4	93±31
нг/мл плазмы	(5)		(3)	(3)	(4)	(2)
экскреция,	49,6±6,0	73±27	83±28	61±25	61±25	54±3
мкг/ч	(6)	(5)	(5)	(6)	(7)	(4)
Витамин В₆:						
ПАЛФ, нг/мл	5,4±1,2	3,5±0,5	6,8±1,8	5,6±1,4	6,2±1,1	4,3±0,9
	(5)	(4)	(4)	(5)	(6)	(2)
экскреция	106±22	74±29	98±39	68±14	101±30	91±20
4-ПК, мкг/ч	(6)	(5)	(5)	(6)	(7)	(4)
Ниацин:						
экскреция	239±100	278±96	386±152	344±85	305±113	142±15*
1-МНА, мкг/ч	(6)	(5)	(5)	(5)	(7)	(4)

Примечание. Звездочка — достоверное отличие ($p \leq 0,05$) от показателей детей с минимальной глюкозурией.

ниацина с рационом. В полном соответствии с представлениями о гипополипидемическом и гипохолестеринемическом эффектах аскорбиновой кислоты [10] содержание этого витамина в плазме крови у детей с липодистрофией имеет тенденцию к снижению по сравнению с больными без липодистрофии. Уменьшение экскреции витамина С с мочой, свидетельствующее о недостаточной обеспеченности организма этим витамином, у детей с повышенным содержанием холестерина в плазме крови достигает уровня достоверной значимости по сравнению с нормальным холестериновым обменом (табл. 5). У детей с повышенным уровнем холестерина в крови дефицит витаминов В₁, В₆ и С встречается в 1,5—7 раз чаще (50—100 %), чем у детей с нормальным содержанием холестерина (7—67 %).

В соответствии с данными табл. 5 средние по группам показатели обеспеченности витаминами не обнаруживают различий в зависимости от содержания в плазме общего белка и β -липопротеинов.

Анализ обмена витаминов в зависимости от состояния углеводного обмена выявил слабую зависимость между степенью гипергликемии и экскрецией рибофлавина: чем выше гликемия, тем больше в среднем по группе экскреция рибофлавина (табл. 6). Число детей с повышенной его экскрецией увеличивается с 80 % при уровне гликемии натощак 5,8—13,1 ммоль/л до 100 % при уровне 13,5—20,0 ммоль/л. Хотя средние по группе величины экскреции рибофлавина с мочой не обнаруживают зависимости от глюкозурии, число детей с повышенным его выведением возрастает с 67 % при суточной глюкозурии 0—10 г до 100 % при суточной глюкозурии более 20 г. У детей с суточной глюкозурией, превышающей 20 г, более чем в 2 раза снижена экскреция 1-МНА. В отношении других исследованных витаминов очевидных закономерностей не выявлено.

В целом, несмотря на крайнюю ограниченность наблюдений (количество детей в сравниваемых группах в ряде случаев невелико), сни-

жающую значимость достоверности, на основании полученных данных можно сделать следующие заключения. Нарушение обмена рибофлавина, проявляющееся в его повышенном выведении с мочой, прогрессирует с увеличением давности заболевания, обнаруживает прямую зависимость (в виде тенденции) с уровнем гликемии и глюкозурии и, таким образом, является характерным признаком инсулинзависимого сахарного диабета. У всех детей в состоянии комы, при ацидозе и при глюкозурии, превышающей 20 г/сут, при нормальном содержании никотинамидных коферментов в эритроцитах обнаруживается сниженная экскреция 1-МНА. У детей с повышенным уровнем холестерина дефицит витаминов В₁, В₆ и С встречается чаще (50—100 %), чем у детей с его нормальным уровнем (7—67 %). Полученные данные свидетельствуют о необходимости оптимального обеспечения детей витаминами группы В и С и разработки способов коррекции витаминной недостаточности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зелинский Б. А., Зелинский С. Ц., Гончаров Л. И., Вернигородский В. С. // Эндокринология. — Киев, 1981. — Вып. 11. — С. 19—22.
2. Коденцова В. М., Алексеева И. А., Спиричев В. Б. // Укр. биохим. журн. — 1992. — № 4. — С. 105—108.
3. Коденцова В. М., Вржесинская О. А., Алексеева И. А., Спиричев В. Б. // Вопр. мед. химии. — 1991. — № 5. — С. 76—79.
4. Коденцова В. М., Вржесинская О. А., Денисова С. Н. // Там же. — 1993. — № 4. — С. 27—31.
5. Коденцова В. М., Вржесинская О. А., Сокольников А. А. и др. // Вопр. питания. — 1992. — № 2. — С. 62—67.
6. Коденцова В. М., Садыкова Р. Е., Древалъ А. В. // Пробл. эндокринол. — 1992. — № 6. — С. 56—57.
7. Мойсеев А. Г., Кочурко С. Н., Балаклеевская В. Г. // Кокарбоксилаза и другие тиаминфосфаты. — Минск, 1974. — С. 172—197.
8. Павловский М. П., Томашевский Я. И., Томашевская А. Я., Сергиенко А. А. Изучение обмена тиамин (витамина В) и его коррекция у больных и угрожаемых по сахарному диабету: Метод. рекомендации. — Львов, 1982.
9. Подорожный П. Г., Березин П. К. // Актуальные проблемы

- физиологии, биохимии и патологии эндокринной системы.— М., 1972.— С. 375—392.
10. Спиричев В. Б., Рымаренко Т. В. // Клин. мед.— 1990.— № 2.— С. 24—30.
 11. Теоретические и клинические аспекты науки о питании.— Т. 8.— М., 1987.
 12. Чернышов В. Г. // Лаб. дело.— 1985.— № 3.— С. 171—173.
 13. Чобигько В. Г. // Труды Саратов. мед. ин-та.— 1984.— № 110/127.— С. 8—11.
 14. Davis R. E., Calder J. S., Curnow D. H. // Pathology.— 1976.— Vol. 8.— P. 151—156.
 15. Field J. B., Federman D. P., McDaniel E. // Diabetes.— 1957.— Vol. 6.— P. 508—514.
 16. Gregory Y. F., Kirk J. R. // Amer. J. clin. Nutr.— 1979.— Vol. 32.— P. 879—883.
 17. Reddy A. S., Frank O., Baker H. // Int. J. Vitam. Nutr. Res.— 1990.— Vol. 60.— P. 252—254.
 18. Sanada H., Miyazaki M., Takahashi T. // J. Nutr. Sci. Vitam.— 1980.— Vol. 26.— P. 449—459.
 19. Shibata K. // Agricult. biol. Chem.— 1987.— Vol. 51.— P. 811—816.
 20. Ubbink J. B., Serfontein W. J., De Villiers L. S. // J. Chromatogr.— 1986.— Vol. 375.— P. 399—404.

Поступила 10.06.93

METABOLISM OF SOME VITAMINS IN CHILDREN WITH INSULIN-DEPENDENT DIABETES MELLITUS: IMPORTANCE OF THE DISEASE DURATION, SEVERITY AND METABOLISM IMPAIRMENT

V. M. Kodentsova, O. A. Vrzhesinskaya, A. A. Sokolnikov, E. V. Trofimenko, N. V. Blazheevich, L. A. Kharitonchik, L. S. Trofimenko, V. I. Dronova, V. B. Spirichev

Institute of Nutrition, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Correlation between the state of vitamin metabolism and the impairments in carbohydrate, lipid and protein metabolism was studied in 35 children of 9—13 years of age with diabetes mellitus of various severity standing for up to 7 years. Deterioration of riboflavin metabolism in insulin-dependent diabetes mellitus, expressed as an increase of the vitamin excretion with urine, was augmented with prolongation of the disease duration; the deterioration was sometimes related to the value of glycemia and glucosuria, being the indicative symptom of the disease. In spite of some limitations in validity of experiments related to insufficient number of children in some groups, a decrease in excretion of 1-methyl nicotinamide with urine was detected in all the children with the comatose state, in acidoketosis and glucosuria (above 20 g/day), whereas normal content of nicotinamide coenzymes was found in erythrocytes. Deficiency in vitamins B₁, B₆ and C was observed more often (5—100 %) in children with elevated content of cholesterol as compared with 7—67 % of children exhibiting normal level of cholesterol. Optimization of vitamins B and C consumption in children as well as use of any means for correction of these vitamins deficiency are discussed.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616.379-008.64-053.2-07:616.153.915

Т. И. Туркина, Л. Ф. Марченко, К. Н. Тимофеев, Н. В. Овчинникова, А. А. Батулин

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭЛЕКТРОННОГО ПАРАМАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА В ОЦЕНКЕ ВЯЗКОСТИ ЛИПИДОВ КРОВИ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ У ДЕТЕЙ

Российский государственный медицинский университет, Москва, МГУ им. М. В. Ломоносова

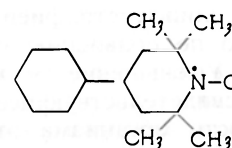
В многочисленных исследованиях, посвященных изучению патогенеза инсулинзависимого сахарного диабета (ИЗСД), значительная роль отводится нарушениям липидного обмена [3, 5—7]. Ряд вопросов, связанных с конформационными изменениями липидов в крови, требует дальнейшего изучения, в частности выяснения роли

физико-химических свойств и структуры липидов крови.

Одним из методов, позволяющих изучать свойства липидов, является метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), в частности метод спиновых зондов [1, 4]. При этом в исследуемые системы вводятся молекулы веществ, обладающих парамагнитными свойствами. Форма спектра ЭПР зонда зависит от состояния системы, что позволяет судить о свойствах микроокружения спинового зонда [1].

Перспективным методом оценки нарушения микроокружения является определение вязкости липидов в сыворотке крови с помощью нитроксильных зондов-радикалов. Учитывая теоретический интерес и практическую значимость исследований, нами было проведено измерение характеристик спектра зонда сыворотки крови у детей, больных ИЗСД.

Методика. Обследовано в динамике 34 ребенка в возрасте 7—15 лет, больных ИЗСД, находившихся на стационарном лечении. У 11 детей длительность диабета была до 1 года, у 16 — от 1 года до 3 лет, у 7 детей — более 3 лет. В состоянии диабетической кетоацидотической комы (ДКК) обследовано 16 детей, из них в ДКК I степени 9 детей, ДКК II степени 7 детей, в фазе клинικο-метаболической компенсации 18 детей. Контрольную группу составили 20 здоровых детей того же возраста.

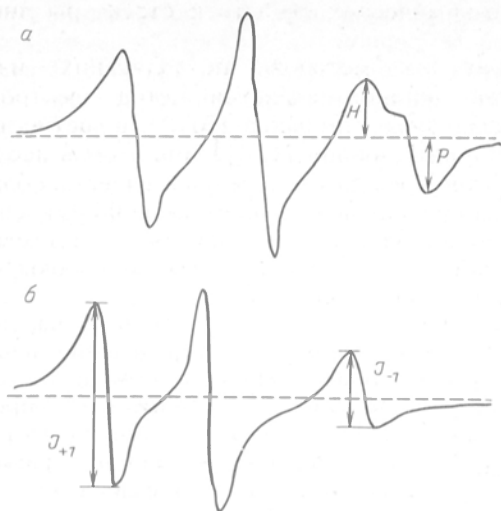


Нами был использован нитроксильный зонд-радикал, его структурная формула. Спектр ЭПР представлен на рисунке. Модельные эксперименты показали, что зонд обладает способностью неспецифического взаимодействия с липидами крови. Форма высокопольной линии спектра дает представление о локализации зонда в гидрофобной и полярной фазах. В присутствии ферроцианида калия происходит расширение сигнала от зонда в полярной фазе и наблюдается сигнал от зонда, находящегося в гидрофобной фазе и недоступного действию ферроцианида калия.

В качестве исследуемых параметров использовались отношения между величинами, характеризующими распределение зонда между полярной и гидрофобной фазой ($\frac{H}{H+p}=f$), а также между интенсивностями низкопольной (I_{+1}) и высокопольной (I_{-1}) компонентой спектра. По показателю f можно судить о плотности липидов, а по отношению $\frac{I_{+1}}{I_{-1}}$ — о микровязкости липидов.

Спектры ЭПР регистрировались на радиоспектрометре РЭ-1307. Соотношение объемов (в микролитрах) сыворотки крови и нитроксильного радикала 100:1. Концентрация этилового спирта в пробе составляла 0,1—0,2 %, конечная концентрация радикала — $5 \cdot 10^{-5}$ М.

Результаты и обсуждение. Полученные результаты представлены в таблице. У больных с ДКК I и II степени отмечается достоверное увеличение показателя микровязкости липидов сы-



Спектр ЭПР зонда.

a — без феррицианида калия; *б* — в присутствии феррицианида калия.

воротки крови ($p < 0,05$, $< 0,001$ соответственно) и показателя, характеризующего долю зонда в гидрофобной фазе, — f ($p < 0,001$) у больных с ДКК II степени по сравнению со здоровыми детьми.

В фазе клинко-метаболической компенсации у детей, поступивших в клинику с ДКК I степени, величина микровязкости липидов не изменяется ($p_{2-3} > 0,05$), у больных с ДКК II степени наблюдается понижение вязкости липидов ($p_{4-5} < 0,05$; см. таблицу).

При компенсации заболевания у детей, находившихся в состоянии ДКК I степени, изменений показателя f , характеризующего долю зонда

Спектральные характеристики спинного зонда в сыворотке крови у детей, больных сахарным диабетом

Группа детей	Показатель $\frac{I_{+1}}{I_{-1}}$	Показатель $\frac{H}{H+p} = f$
Здоровые (1)	$2,50 \pm 0,05$	$0,27 \pm 0,03$
Больные сахарным диабетом:		
ДКК I степени (2)	$2,69 \pm 0,07$	$0,28 \pm 0,04$
p_{1-2}	$< 0,05$	$> 0,05$
фаза компенсации у детей, поступивших в ДКК I степени (3)	$2,92 \pm 0,13$	$0,30 \pm 0,2$
p_{1-3}	$< 0,01$	$> 0,05$
p_{2-3}	$> 0,05$	$> 0,05$
ДКК II степени (4)	$3,69 \pm 0,23$	$0,49 \pm 0,04$
p_{1-4}	$< 0,001$	$< 0,001$
фаза компенсации у детей, поступивших в ДКК II степени (5)	$3,14 \pm 0,12$	$0,31 \pm 0,04$
p_{1-5}	$< 0,001$	$> 0,05$
p_{4-5}	$< 0,05$	$< 0,01$
Доза инсулина, ЕД/кг:		
до 1,0 (6)	$2,76 \pm 0,08$	$0,28 \pm 0,03$
более 1,0 (7)	$3,30 \pm 0,14$	$0,36 \pm 0,02$
p_{6-7}	$< 0,001$	$< 0,05$
Длительность инсулинотерапии, годы:		
до 1 (8)	$2,84 \pm 0,08$	$0,29 \pm 0,03$
от 1 до 3 (9)	$3,04 \pm 0,05$	$0,35 \pm 0,02$
более 3 (10)	$3,49 \pm 0,12$	$0,44 \pm 0,04$
p_{8-9}	$< 0,05$	$> 0,05$
p_{8-10}	$< 0,001$	$< 0,01$
p_{9-10}	$< 0,01$	$> 0,05$

в гидрофобной фазе, не происходит, а у детей с ДКК II степени отмечается достоверное снижение этого показателя ($p_{4-5} < 0,01$; см. таблицу).

Нами прослежена зависимость микровязкости липидов $\frac{I_{+1}}{I_{-1}}$ и показателя f от суточной дозы вводимого инсулина и длительности заболевания. Увеличение показателей отмечалось у детей, больных ИЗСД, получавших инсулин в дозе как до 1 ЕД ($p < 0,001$), так и свыше 1 ЕД ($p < 0,05$) на 1 кг массы тела.

Следует отметить, что с увеличением длительности заболевания происходило достоверное увеличение микровязкости липидов и показателя, характеризующего плотность ($p < 0,001$, $< 0,05$ соответственно).

По-видимому, значительное возрастание вязкости липидов объясняется глубокими метаболическими нарушениями у детей, больных ИЗСД, развитием синдрома липидной пероксидации [2, 8]. Так, у больных, поступивших в клинику в состоянии ДКК II степени, даже при небольшой длительности заболевания в фазе клинко-метаболической компенсации эти изменения менее выражены, чем при ДКК I степени с той же длительностью заболевания, что, вероятно, обусловлено применением относительно высоких доз инсулина, играющего стабилизирующую роль. При недостаточности инсулина создаются условия для избыточного накопления липидов в крови.

Таким образом, использование метода спинных зондов может не только помочь понять сущность заболевания на молекулярном уровне, но и служить методом диагностики осложнений диабета на ранних стадиях его развития.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вертц Дж., Болтон Дж. Теория и практические приложения метода ЭПР.— М., 1985.
2. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.— М., 1982.
3. Ефимов А. С., Науменко В. Г. // Пробл. эндокринол.— 1985.— № 1.— С. 6—9.
4. Кузнецов А. Н. Метод спинного зонда.— М., 1972.
5. Спесивцева В. Г., Голубятникова Г. А., Абылаев Ж. // Клин. мед.— 1980.— № 2.— С. 53—58.
6. Старосельцева Л. К., Косилова Е. С., Смурова Т. Ф. // Пробл. эндокринол.— 1986.— № 1.— С. 19—22.
7. Туркина Т. И., Марченко Л. Ф., Сапелькина Л. В. // Там же.— № 5.— С. 32—36.
8. McConnel H. M., Wright K., McFrandland B. G. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1972.— Vol. 47.— P. 273—281.

Поступила 29.06.93

EVALUATION OF BLOOD LIPIDS VISCOSITY IN CHILDREN WITH DIABETES MELLITUS BY MEANS OF ELECTRON PARAMAGNETIC RESONANCE

T. I. Turkina, L. F. Marchenko, K. N. Timofeev, N. V. Ovchinnikova, A. A. Baturin

M. V. Lomonosov State University, Moscow

Viscosity of blood serum lipids was studied in children with insulin-dependent diabetes involving nitroxyl containing probes-registered by means of radiospectrometer RE 1307. The following parameters were studied: the ratios between values exhibiting the probe distribution in polar and hydrophobic phases

$\frac{H}{H+p} = f$ as well as between content of low polar (I_{+1}) and high polar (I_{-1}) spectral components. The "f" value showed the state of lipid density and the ratio $\frac{I_{+1}}{I_{-1}}$ allowed to estimate the lipid microviscosity. 34 children of 7—15 years old with insulin-dependent diabetes were examined in dynamics of treat-

ment under stationary conditions. Distinct metabolic impairments and aggravation of the lipid peroxidation syndrome were mainly responsible for pronounced increase in lipid viscosity. The procedure of spin probes may contribute to study of diabetes pathogenesis as well as to serve as a diagnostic means in evaluation of the disease complications at early stages.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616.633.56-074

А. Г. Кобылянский, С. В. Кулагин, Е. Л. Насонов,
В. Г. Тищенко

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СВОБОДНОГО И СВЯЗАННОГО ФЕНОЛА В МОЧЕ ПРИ МАССОВОМ ОБСЛЕДОВАНИИ НАСЕЛЕНИЯ

Кардиологический научный центр РАМН, Москва, Научный центр молекулярной диагностики и лечения Минздрава РФ, Москва

В последние годы резко возрос интерес к количественной оценке содержания токсичных соединений и элементов в биологических жидкостях человека в норме и при различной патологии. Для решения такого рода задач применяется весь арсенал физико-химических и биологических методов. Несмотря на использование современных хроматографических, масс-спектрометрических и других прямых методов анализа токсичных соединений в моче, слюне и плазме крови человека, в токсикометрии продолжают применяться простые косвенные количественные и полуколичественные методы. Они позволяют с минимальными затратами времени и средств проводить первичное обследование больших контингентов населения и выявлять группы повышенного риска для более детального клинического и токсикометрического обследования [1, 6, 10]. Подробное описание одного из таких методов мы приводим в данном сообщении.

В ряде экспериментальных работ показано, что определение концентрации фенола в моче или плазме крови может быть использовано как диагностический признак ряда патологических состояний [6, 10, 18, 19]. Мы попытались адаптировать один из простых методов определения фенола для проведения массового и быстрого обследования населения, решая при этом следующие задачи: метод должен быть недорогим, количественным, для его постановки не должны использоваться дефицитные реактивы. На основании имеющихся в литературе сведений мы остановились на методе определения свободного фенола в щелочном растворе с помощью реактива Гиббса [11], поскольку в токсикометрической литературе имеется достаточно работ, выполненных с этим реактивом, что позволяет проводить сравнение полученных результатов.

В норме в моче содержатся следующие фенолы: фенол, р-крезол, катехол, резорцин, гидрохинон, гомокатехол, 2-метоксирезорцин, 3-метоксирезорцин [7, 22]. Фенол и р-крезол, которые в литературе называют летучими фенолами, в организме человека являются конечными продуктами метаболизма ароматических аминокислот фенилаланина и тирозина кишечной микрофлорой. Вместе с фенолом, поступающим с пищей, они всасываются в кровь и поступают в печень, где под-

вергаются детоксикации (конъюгирование с глюкуроновой и серной кислотами) и выводятся из организма с мочой [1, 6, 10, 18, 19]. Нарушение функций желудочно-кишечного тракта, печени и почек ведет к изменению уровня фенола в моче, соотношения между концентрациями фенола и р-крезола, а также между свободным и связанным (конъюгированным) фенолом. Нормальным считается соотношение фенола и р-крезола 1:4—1:15 [4]. При определении концентрации фенола в моче обычно измеряют как свободный, так и связанный фенол. С целью сокращения времени анализа иногда измеряют только общий (свободный + связанный) фенол.

Существует множество различных методов определения фенола в растворах [4—6, 9, 11, 12, 21, 22]. В токсикометрии получили распространение как прямые, так и косвенные методы: газохроматографические [4, 22], фотометрические [6, 18, 19], методы тонкослойной хроматографии (ТСХ), высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЖХ) [1, 10], ферментные [20]. При массовых обследованиях используют и полуколичественные методы с визуальной оценкой результатов, позволяющие тем не менее получать однозначные результаты [12]. Несомненно, что прямые методы определения фенола в моче с одновременным определением других метаболитов являются более адекватными [4, 17, 22], однако массовое обследование с их применением относительно дорого.

Определение фенола в моче или плазме крови состоит из двух этапов. На первом проводят экстракцию фенола из кислой водной фазы (мочи) в органическую (диэтиловый эфир, этилацетат, толуол, бензол, гексан [5]) или отделяют фенол перегонкой с водяным паром (метод дистилляции [19]). На втором выпаривают органическую фазу над щелочным бутером, в который переходит связанный фенол, детектируемый тем или иным методом. Для определения конъюгированного фенола конъюгаты предварительно подвергают кислотному гидролизу при 80—100 °С или же ферментативному гидролизу с помощью β -глюкуронидазы и арилсульфатаз; в этом случае время гидролиза с 10 мин увеличивается до 6—24 ч [22].

Для определения в растворе свободного фенола существует не менее 30 различных реакций [2, 7]. В большей части работ для определения используется реактив Гиббса (2,6-дибромхинон-4-хлоримид), который в щелочных условиях образует с фенолом конденсированный азокраситель, имеющий синюю окраску с максимумом поглощения при 620 нм. Окраска раствора развивается в течение 30—45 мин и стабильна в течение длительного времени.

Мы приводим детальное описание синтеза реактива Гиббса из наиболее доступных веществ, который может быть воспроизведен в любой химической лаборатории.

Методика. 1. Синтез реактива Гиббса [11]. Поскольку в реакции могут быть использованы два хинонхлоримида — 2,6-дибромхинон-4-хлоримид или 2,6-дихлорхинон-4-хлоримид, исходными соединениями в синтезе являются 2,6-дибром-4-аминофенол или 2,6-дихлор-4-аминофенол.

Холодные растворы в соляной кислоте соответствующего амина медленно приливают к охлаж-

денному раствору гипохлорита натрия (NaOCl). Оба раствора должны содержать кристаллы льда, чтобы реакция проходила при 0°C . Добавление аминифенола в реакционную смесь останавливают перед возникновением постоянного голубого или темно-коричневого окрашивания. Образующийся хинонхлоримид в виде ярко-желтого осадка отделяют на воронке Бюхнера, промывают небольшим количеством холодной воды и высушивают досуха. В сухом состоянии хинонхлоримиды стабильны длительное время.

Приготовление гипохлорита натрия. Растворяют 63 г NaOH в небольшом количестве воды, сильно охлаждают в морозильнике и помещают в ледяную баню. Далее реакционный сосуд с ледяной баней устанавливают на весы и начинают барботирование раствора газообразным хлором (из баллона или другого источника газообразного хлора), пока масса не увеличится на 10 г. (Следует обратить особое внимание при проведении этой реакции на строжайшее соблюдение техники безопасности.) Полученный раствор может быть использован для синтеза около 0,25 моль реактива Гиббса. Вместо гипохлорита можно использовать гипобромит натрия, который гораздо легче приготовить из-за большей доступности Br_2 и большей легкости проведения операций с ним вследствие его агрегатного состояния. При отсутствии исходных аминов для синтеза они могут быть легко синтезированы из 4-нитрофенола.

Синтез 2,6-дибром-4-аминофенола. В 5-литровой круглодонной колбе, снабженной механической мешалкой с жидкостным раствором, капельной воронкой и трубкой, соединенной с газовой ловушкой для отвода HBr , растворяют 278 г 4-нитрофенола в 830 мл ледяной уксусной кислоты. К этому раствору при комнатной температуре и работающей мешалке прибавляют по каплям в течение 3 ч раствор 750 г газообразного брома (240 мл, 4,7 моль) в 700 мл ледяной уксусной кислоты. После добавления всего брома реакционную смесь перемешивают еще 30 мин, а затем нагревают на водяной бане при 85°C для удаления избытка брома. С целью удаления остатков брома через смесь пропускают ток воздуха, после чего смесь становится желтой или коричневой. Смесь обрабатывают 1,1 л холодной воды, перемешивая до тех пор, пока вся масса не охладится, и оставляют на ночь на холоду. Светло-желтые кристаллы отделяют на воронке Бюхнера, сначала промывают 500 мл 50 % уксусной кислоты, а затем тщательно промывают водой. Продукт сушат при $40\text{--}60^\circ\text{C}$ или в вакуум-эксикаторе над NaOH . Выход 570—583 г (96—98 %). Продукт получается почти бесцветным, плавится с разложением при $138\text{--}140^\circ\text{C}$ [3]. Чистоту продукта контролируют методом ТСХ на пластинках «Kieselgel» («Merk») с применением растворителя бензол — этилацетат — гексан — метанол в соотношении 1:1:1:1. Исходная R_f равна 0,87, конечная R_f — 0,53—0,59.

Далее 29,7 г (0,1 моль) 2,6-дибром-4-нитрофенола растворяют в смеси 100 мл уксусной кислоты и 400 мл диоксана и добавляют 130 мл концентрированной соляной кислоты. К смеси при интенсивном перемешивании порциями по 2—3 г добавляют сплав никель — алюминий, следя за тем, чтобы смесь не нагревалась выше 50°C . Всего добавляют 17 г сплава. Окончание реакции контролируют методом ТСХ (предварительно нейтрали-

зуют пробу), извлекая оттуда смесь продуктов экстракцией этилацетатом из водной фазы. Защелачивание проводят только NaHCO_3 , чтобы избежать образования фенолята. После окончания реакции смесь фильтруют, промывают кристаллы на фильтре ацетоном 3 раза и фильтрат упаривают до возможно более полного удаления летучей фракции. Водный остаток экстрагируют бензолом для удаления непрореагировавшего 2,6-дибром-4-нитрофенола. Затем добавляют NaHCO_3 до полной нейтрализации и амин экстрагируют этилацетатом. Контроль проводят методом ТСХ полученного продукта в той же системе: начальная R_f равна 0,53—0,59, конечная R_f — 0,82.

Основание амина переводят в гидрохлорид любым стандартным способом (например, растворением в ацетоне и титрованием концентрированной соляной кислотой до выпадения белого осадка гидрохлорида).

2. Определение общего фенола в моче. 0,5 мл исследуемой мочи помещают в 15-миллилитровую стеклянную пробирку с притертой пробкой и добавляют 0,2 мл 42 % перхлорной кислоты. Пробирку помещают на 10 мин в кипящую воду для гидролиза конъюгатов фенола и затем быстро охлаждают водой до комнатной температуры. Добавляют 3 мл диэтилового эфира (предварительно двукратно очищенного NaOH : 100 мл эфира с 10 мл 1М NaOH энергично встряхивают в течение 5 мин и после разделения фаз спустя 20 мин отбирают верхний слой). Пробирку закрывают пробкой и 5 раз переворачивают для экстракции фенола в органическую фазу. Оставляют для разделения слоев на 20 мин [6, 12]. Далее стеклянную пипеткой отбирают половину эфирного слоя (пипетку предварительно охлаждают, смочив ее в чистом эфире и подождав, пока он испарится) и переносят его в коническую стеклянную пробирку, содержащую 1 мл боратного буфера (растворяют 35 г $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ в 850 мл дистиллированной воды, добавляют 150 мл абсолютного спирта и через 24 ч фильтруют). Эфир из пробирки выпаривают на водяной бане при 55°C . Процесс занимает около 20 мин. Далее 50—200 мкл этого раствора переносят в лунку 96-луночного планшета для иммунологических исследований и добавляют 150 мкл красящего реагента — реактива Гиббса (готовят разведением в 20 раз дистиллированной водой 1 % раствора реактива Гиббса в абсолютном спирте; исходный раствор можно хранить в холодильнике в посуде из темного стекла несколько месяцев). Спустя 30—60 мин планшет фотометрируют (фильтр 650 нм).

Чувствительность метода с применением для регистрации оптической плотности микроденситометра (микрофотометра) составляет 0,1 мкг фенола в лунке (или 1 мкг фенола в 0,5 мл мочи). Ее можно повысить в несколько раз, если измерение оптической плотности раствора проводить на спектрофотометре в кювете с увеличенной длиной оптического пути.

3. Определение в моче свободного фенола. Все операции выполняют так же, как и при определении общего фенола, за исключением стадии гидролиза, т. е. после добавления кислоты в образец мочи сразу добавляют эфир. Вместо перхлорной кислоты можно использовать серную [14], ортофосфорную [21] или соляную [3]. При исполь-

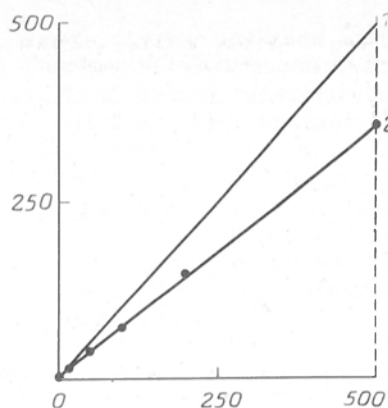


Рис. 1. Экстракция фенола диэтиловым эфиром из мочи в зависимости от количества добавленного фенола.

По оси абсцисс — количество добавленного фенола, мкг на 1 мл мочи (эндогенное содержание свободного фенола 1,6 мкг/мл); по оси ординат — количество экстрагированного фенола, мкг. 1 — теоретически возможное открытие, 2 — полученное в описываемых условиях.

зовании серной или фосфорной кислоты время гидролиза увеличивается до 1 ч [14].

4. *Контроль процесса экстракции фенола.* Для определения степени экстракции фенола в образцы мочи добавляют известное количество фенола. Далее все процедуры проводят по разделу 3 методики и определяют содержание фенола. Из графика зависимости определяемого фенола от количества добавленного устанавливают степень экстракции фенола в конкретных экспериментальных условиях (рис. 1). При высоких концентрациях фенола при определении в лунку следует добавлять $1/10$ — $1/100$ экстрагированного фенола, так как закон Ламберта — Бэра сохраняется в данном случае только до 2—2,5 мкг свободного фенола в лунке.

5. *Определение в моче креатинина.* Перед определением креатинина образцы мочи разбавляют дистиллированной водой в 20 раз. 20 мкл разбавленной мочи переносят в лунку 96-луночного планшета и добавляют красящий реагент (непосредственно перед измерением смешивают равные объемы 0,03М раствора пикриновой кислоты и 0,1М раствор NaOH). Спустя 20 с планшет фотометрируют, регистрируя оптическую плотность при 510 нм (A_1), через 2 мин проводят повторную регистрацию (A_2). Разница оптических плотностей $A_2 - A_1$ пропорциональна концентрации креатинина в образце.

Нормальная экскреция креатинина с мочой составляет 11—20 мкг на 1 кг массы в сутки для женщин и 14—26 мкг на 1 кг массы в сутки для мужчин. В качестве контроля обязательно определяют содержание креатинина в моче в группе практически здоровых людей, проживающих в данном регионе [21].

6. *Сбор и хранение образцов.* Мочу собирают в 1,5-миллилитровые полиэтиленовые пробирки с крышками, хранят и транспортируют при 0 °С. В течение 2 сут хранения при 0 °С уровень фенола в моче не меняется. Длительно образцы можно хранить в замороженном состоянии при —18 °С.

7. *Математическая обработка результатов.* В произвольно выбранной группе обследуемых концентрации различных метаболитов в моче могут различаться в 10—100 раз. Поэтому среднеарифметические значения уровней таких метаболитов не

являются информативными. В этих случаях используют среднегеометрические значения, которые вычисляют по формуле

$$x_{\text{геом}} = (x_1 \cdot x_2 \cdot x_3 \cdot \dots \cdot x_n)^{1/n}.$$

Среднегеометрическое — это значение, наиболее часто встречающееся в данной совокупности параметра. В токсикометрической литературе обычно приводят диапазон индивидуальных значений (минимальное — максимальное) и среднегеометрическое для всей совокупности.

Результаты и обсуждение. С помощью описанного выше метода мы провели определение уровня общего фенола в утренней моче 15 практически здоровых детей в возрасте 6—6,5 лет (старшая группа детского сада Москвы). Минимальное значение уровня фенола составило 2,5 мкг/мл, максимальное — 47 мкг/мл, среднегеометрическое значение — 9,5 мкг/мл. Мы не обнаружили в литературе данных об уровне фенола в моче детей этого возраста, поэтому полученное значение можно использовать как реперное.

В течение суток выведение фенола с мочой здоровым организмом происходит равномерно. Однако из-за задержек в мочевом пузыре по тем или иным причинам уровень фенола в порциях мочи несколько варьирует. Для учета консистенции мочи уровень фенола приводят к ее плотности [15] или к содержанию в моче креатинина [18, 19], который отражает уровень общего метаболизма и является диагностическим показателем.

При нарушении функций желудочно-кишечного тракта уровень фенола в моче повышается, превышая предельно допустимые индивидуальные значения. Например, при задержке стула в течение 3 дней уровень фенола в моче возрастает в несколько раз. На рис. 2 приведена зависимость экскреции фенола с мочой в течение нескольких дней у девочки 11 лет. Возвращение уровня фенола к норме происходит в течение нескольких часов после дефекации. В клинике высокий уровень фенола сопровождается появлением таких симптомов, как недомогание, головная боль, повышенная утомляемость. Естественно, что клиническая картина связана не только с высоким уровнем фенола. Очевидно, что нарушение функций желудочно-кишечного тракта ведет к по-

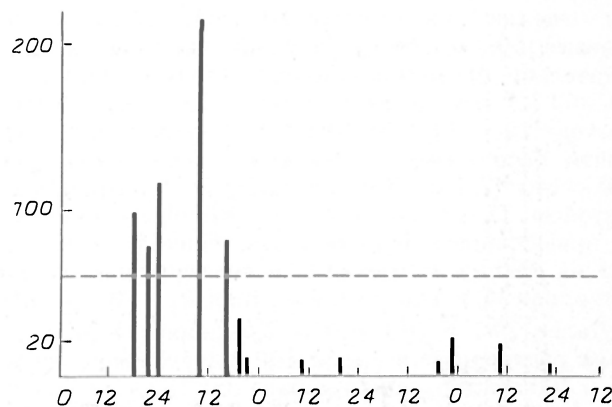


Рис. 2. Экскреция фенола с мочой у ребенка 11 лет после 3-дневной задержки стула.

По оси абсцисс — время, сут; по оси ординат — уровень фенола в моче, мкг/мл. Горизонтальная прерывистая линия — предельно допустимая концентрация фенола в моче в норме (среднегеометрическое значение).

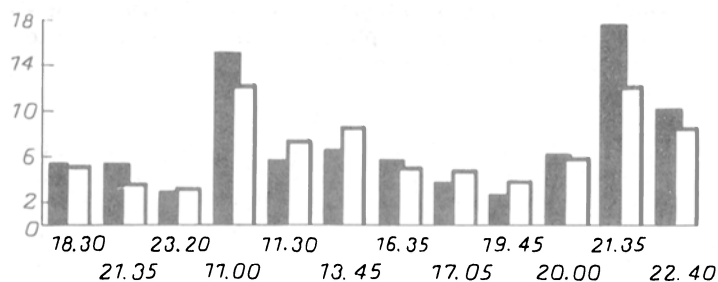


Рис. 3. Экскреция фенола с мочой у практически здорового подростка 12 лет в течение суток.

По оси абсцисс — время, ч; по оси ординат: темные столбики — уровень фенола, мкг на 1 мл мочи, светлые — уровень фенола, мг на 1 г креатинина.

вышению концентрации фенола и может искажать картину в случае исследования уровня фенола в моче в зависимости от внешних факторов. Однако задача таких исследований — выявление патологии — будет решена, так как позволит выявить и эндогенные нарушения, приводящие к повышению уровня фенола в моче.

На рис. 3 показано выделение фенола с мочой у практически здорового подростка 12 лет с учетом экскреции креатинина. Мы приводим этот результат для демонстрации диапазона колебаний уровня фенола в течение суток. Аналогичные зависимости выделения фенола от времени получены у всех обследованных здоровых детей (6 случаев).

В 1990 г. в г. Ноябрьске (Тюменская обл.) мы предприняли попытку определить содержание фенола в моче лиц, проживающих в сборно-щитовых домах (220 человек), и лиц, проживающих в кирпичных домах (14 человек).

В наше распоряжение были предоставлены образцы утренней мочи, одновременно собранной у 234 человек в возрасте от 1 года до 58 лет — жителей одного микрорайона г. Ноябрьска. Диапазон концентраций общего фенола в моче составил: минимальное значение — 1,5 мкг/мл, максимальное — 163 мкг/мл, среднегеометрическое — 16,7 мкг/мл. Достоверных различий между содержанием фенола в моче в зависимости от пола не выявлено. Содержание фенола

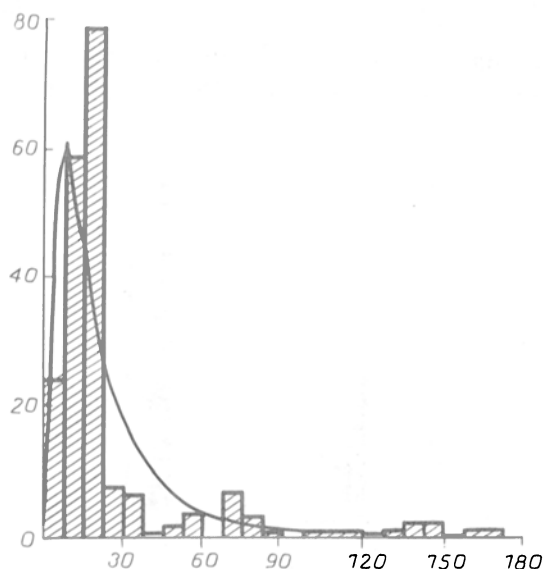


Рис. 4. Гистограмма распределения уровня общего фенола в моче у детей (54 человека) г. Ноябрьска.

По оси абсцисс — уровень общего фенола в моче, мкг/мл; по оси ординат — число обследованных с данной концентрацией фенола.

Содержание общего фенола в моче практически здоровых мужчин (36 человек) и женщин (30 человек)

Показатель	Мужчины	Женщины
Фенол, мкг на 1 мл мочи (среднегеометрическая)	26,1 (8,3—81,5)	25,2 (8,4—75,5)
Фенол в расчете на креатинин, мкг фенола на 1 мг креатинина (среднегеометрическая)	18,9 (6,0—60,1)	28,5 (11,3—71,4)

Примечание. Измерения проводили фотометрическим методом с реактивом Гиббса. В скобках — диапазон концентраций (минимальная — максимальная).

в пересчете на креатинин у женщин несколько выше, чем у мужчин, что подтверждает измерения, проведенные в работе [15]. Поскольку в работе [15] были сформированы более или менее однородные группы обследуемых, мы приводим здесь таблицу из работы [15] для облегчения сравнения получаемых результатов с нормой.

Среди группы детей (возраст 1—14 лет) содержание общего фенола, превышающее 50 мкг/мл, обнаружено у 11 (20,3 %). Из 130 человек взрослых превышение уровня фенола в моче обнаружено у 13 (10 %). У одной из обследованных (41 года) содержание общего фенола составило 10,3 мкг/мл, креатинина — 0,132 мг/мл, соотношение фенол/креатинин — 78 мкг фенола на 1 мг креатинина, что лежит выше верхней границы нормы. В данном случае в анамнезе больной зарегистрирован хронический пиелонефрит.

Среднегеометрическое содержание фенола в моче в группе из 54 детей г. Ноябрьска составило 19 мкг/мл (минимум 1,5 мкг/мл, максимум 150 мкг/мл — 1 ребенок), что в 2 раза выше, чем у детей Москвы (рис. 4). Этот факт может отражать, с одной стороны, региональные различия, а с другой — наличие в группе детей с аномальными концентрациями фенола. Нам кажется, что второе наиболее вероятно, поскольку превышение уровня фенола у детей встречается чаще, чем у взрослых (20,3 и 10 % соответственно). Несомненно, что данный факт требует дополнительного исследования, поскольку в северных районах страны велик контингент проживающих в сборно-щитовых домах.

Сравнение уровней содержания и диапазонов концентраций фенола у групп, проживающих в сборно-щитовых (206 человек) и кирпичных (14 человек) домах, дало следующие значения: средне-геометрическое значение — 16,7 и 24 мкг/мл, минимальное — 1,5 и 9,0 мкг/мл, максимальное — 168 и 140 мкг/мл соответственно, т. е. различия недостоверны. Аналогичный результат получен и для параметра содержания фенола относительно креатинина.

Мы приводим результаты (см. таблицу) из работы [15], в которой измерены уровни общего фенола в моче у практически здоровых мужчин (36 человек) и женщин (30 человек). С учетом ошибки метода определения фенола можно считать, что все показатели этих двух групп не различаются. Исключение составляет содержание фенола в расчете на креатинин (среднегеометрическое), так как экскреция креатинина с мочой у мужчин выше, чем у женщин: 1,7 и 1,0 г в сутки

соответственно. У лиц, занимающихся спортом, особенно тяжелыми видами, экскреция фенола выше приведенных значений на 20—40 %.

Методами газовой хроматографии с последующей масс-спектрометрией и ВЖХ получены следующие уровни общего фенола в моче у однородных групп (среднегеометрическое): 8,6 мкг/мл (32 человека, максимальное значение 94 мкг/мл [17]), 3,6 мкг/мл (34 человека, максимальное значение 18,4 мкг/мл [16]). Сравнение уровня общего фенола, измеренного методом газовой хроматографии и фотометрическим методом (по реакции с аминокантипирином), в одних и тех же образцах показало [8], что косвенный метод дает завышенное значение (28 человек): $5,3 \pm 2,0$ и $6,3 \pm 2,2$ мкг/мл соответственно. Несмотря на то что сравнение результатов, полученных косвенным (фотометрическим) и прямыми (газохроматографическим и ВЖХ) методами, по измерению общего фенола в моче разных групп людей, проживающих в разных географических условиях, употребляющих разную пищу (а с ней в среднем человек получает от 10 до 50 мг фенола), затруднено, можно отметить, что у практически здоровых людей диапазон концентраций общего фенола в норме лежит между 0,5 и 80 мкг/мл. Среднеквадратичные значения уровня, полученные фотометрическим методом с реактивом Гиббса, в 3—5 раз выше, чем полученные методами газовой хроматографии и ВЖХ, однако однозначно определить, с чем связаны эти различия, не представляется возможным. Одно из соображений состоит в том, что реактив Гиббса может образовывать азокраситель с р-крезолом, однако при нормальных соотношениях р-крезол — фенол, равных 5:14, в моче крезол в данном методе не реагирует с реактивом Гиббса. Реакция становится заметной, когда содержание р-крезола превышает таковое фенола в 50—100 раз. Тем не менее при определении уровня фенола в достаточно больших выборках можно принять среднегеометрическое значение уровня общего фенола в моче в норме равным 20—26 мкг/мл [12, 14, 15, 17, 18, 21, 22]. Кроме того, практически всегда имеется возможность сформировать контрольную группу обследуемых. Превышение этих значений для группы будет показателем отклонений от нормы.

В США Обществом государственных промышленных врачей-гигиенистов установлены биологические показатели экспозиции организма человека для ряда токсичных химических веществ. Измерение этих показателей позволяет санитарным врачам оценивать степень поражения организма путем измерения или неизмененного вещества, или его метаболитов в выдыхаемом воздухе, крови или моче.

Значение экспозиционного показателя представляет собой уровень вещества или его метаболита в моче, наблюдаемый у практически здоровых работников, которые в течение смены (рабочего дня) находились в условиях, когда в рабочей зоне токсичное вещество имело предельно допустимую концентрацию. Биологический показатель экспозиции для фенола в США установлен в 50 мкг на 1 мл мочи [13]. Это означает, что превышение этого уровня в образцах мочи, одновременно собранной у группы работающих в атмосфере, содержащей пары ароматических углеводородов, метаболитами которых яв-

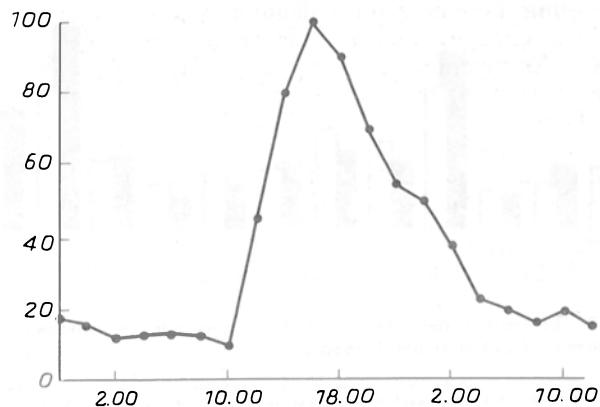


Рис. 5. Выведение общего фенола с мочой у здорового испытуемого, находящегося в течение 6 ч в атмосфере, содержащей 24,4 мг/м³ фенола.

Фенол поступал в организм только путем абсорбции через кожу. Время действия паров фенола с 9—16 ч [20]. По оси абсцисс — время суток; по оси ординат — выведение фенола, %.

ляется фенол, или в атмосфере, содержащей пары фенола, дает прямое указание на то, что в воздухе рабочей зоны концентрация токсичного вещества превышает предельно допустимую.

Биологический экспозиционный показатель для некоторых других вредных веществ в моче составляет: миндальная кислота (метаболит этилбензола) — 1,5 г на 1 г креатинина, 2,5-гександион (метаболит гексана) — 5 г/л, гиппуровая кислота (метаболит толуола) — 2,5 г на 1 г креатинина, р-нитрофенол (паратион) — 0,5 г/л [13].

В 1989 г. в Рангуне было проведено определение уровня общего фенола фотометрическим методом с реактивом Гиббса у двух групп — работников строительных специальностей и работников бензоаправочных станций. В конце рабочей недели среднегеометрические значения уровней общего фенола составили 21,5 мкг/мл (диапазон 16—17 мкг/мл — 100 человек) и 61,3 мкг/мл (диапазон 17—320 мкг/мл — 62 человека) соответственно [12]. Эти результаты позволили авторам однозначно сделать вывод о заведомом превышении в атмосфере станций предельно допустимых концентраций ароматических углеводородов.

Индивидуальные значения уровня общего фенола в норме могут достигать 80 мкг/мл. При оп-

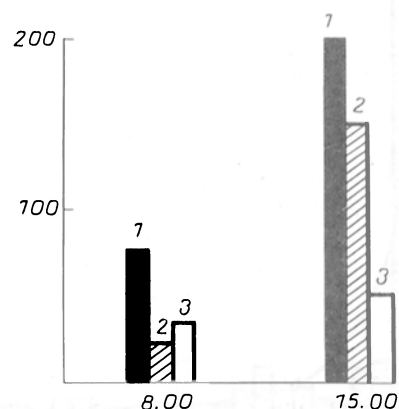


Рис. 6. Изменение уровня фенолов (в %) в моче (с 8.00 до 15.00 ч) в группе из 6 человек, работающих в атмосфере, содержащей от 7,8 до 9,6 мг/м³ фенола.

Время нахождения на рабочем месте с 8 до 12 ч и с 23 до 16 ч. По оси абсцисс — время суток; по оси ординат — уровень фенолов, %. 1 — общий фенол; 2 — конъюгированный фенол; 3 — свободный фенол [18].

ределении концентрации фенола у одного обследуемого следует иметь в виду именно это значение как предельно допустимое; в этом случае имеет смысл определение суточной кинетики экскреции фенола.

В ряде работ [6, 12, 15, 18, 19, 21] экспериментально показано, что практически 100 % поступившего через легкие и кожу фенола экскретируется в мочу в течение одного дня. В опытах на добровольцах установлено, что при вдыхании воздуха с парами фенола (5—20 мг/м) органы дыхания задерживают 70—80 % фенола. Кожа также способна адсорбировать фенол, но в меньшей степени, чем легкие. 90 % поступившего в организм фенола экскретируется в основном в виде конъюгатов с глюкуроновой и серной кислотами. Остальные 10 % превращаются главным образом в гидрохинон, экскретируемый также в виде конъюгатов [19]. Существуют расчеты для определения дозы фенола, поглощенного организмом человека:

$$D = CT(RV + S),$$

где D — поглощенная доза (в мг); C — концентрация фенола во вдыхаемом воздухе (в мг/м³); T — время экспозиции (в ч); R — относительное задерживание паров фенола в легких ($R=0,7$); V — легочная вентиляция (в м³/ч); S — коэффициент абсорбции кожей для фенола ($S=0,35$ м³/ч). При значении концентрации фенола в воздухе 5 мг/м³ и $V=0,8$ м³/ч (альвеолярный объем воздуха у человека массой 70 кг при отдыхе равен 0,3 м³/ч, при легкой работе — 1,2 м³/ч) поглощенная доза фенола составит 35 мг. Скорость экскреции фенола из организма равняется 4,4 мг/ч, что выше экскреции в норме (0,44 мг/ч) в 10 раз [19].

На рис. 5 показано выведение фенола с мочой у добровольца, находившегося в течение 6 ч в атмосфере, содержащей фенол, при его поступлении в организм через кожу. Результаты показывают относительно быструю экскрецию экзогенного фенола из организма ($k=0,2$ ч⁻¹). Следовательно, сбор образцов мочи для анализа должен производиться не позднее нескольких часов после прекращения поступления фенола в организм.

Измерением уровня общего фенола в некоторых случаях можно ограничиться, так как у практически здоровых людей при вдыхании паров фенола возрастает только уровень конъюгированного фенола, а не свободного (рис. 6). Это справедливо далеко не во всех случаях. Если нарушено функционирование печени, где происходит детоксикация фенола, повышение экскреции может быть обусловлено только свободным фенолом. Следует добавить, что при некоторых патологических состояниях, когда в почках возрастает активность β -глюкуронидазы и арилсульфатаз, в моче возрастает доля свободного фенола. Все эти данные следует иметь в виду при определении фенола в моче.

Определяя долю конъюгированного фенола (и соответственно свободного), можно получить дополнительные характеристики системы детоксикации. На рис. 6 показаны результаты, полученные в конце рабочей недели, т. е. после хронического воздействия фенола на людей, из которых следует, что, несмотря на нормальное содержа-

ние общего фенола, доля свободного фенола составляет 70—80 % от таковой общего фенола. В начале рабочей недели, т. е. после 2 дней отдыха, это соотношение имеет обратный характер. В данном случае эти результаты позволяют говорить о слабой работе системы детоксикации при низких уровнях в организме свободного фенола.

Мы получили предварительные данные о том, что при ряде патологических состояний наблюдается полное исчезновение конъюгированного фенола в моче. В других случаях наблюдается исчезновение свободного фенола.

Подробным описанием метода определения фенола в моче мы хотели помочь врачам санэпидстанций и врачам-гигиенистам на промышленных предприятиях в объективизации степени воздействия фенола и ароматических углеводородов на организм работающих во вредных условиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гадаскина И. Д., Филов В. А. Превращения и определение промышленных органических ядов в организме.— Л., 1971.
2. Коренман И. М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений.— М., 1975.
3. Синтезы органических препаратов.— М., 1951.— Т. 2.— С. 185.
4. Современные методы санитарно-гигиенического контроля.— Тарту, 1978.— С. 149—154.
5. Тейсингер Я. Химические методы исследования биологического материала в промышленной токсикологии.— М., 1959.
6. Фенол / Под ред. Н. Ф. Измерова.— М., 1984.
7. Харламович Г. Д., Чупрыкин Ю. В. Фенолы.— М., 1974.
8. Angerer J. // Int. Arch. occup. environ. Hlth.— 1979.— Vol. 43.— P. 63—67.
9. Balikova M., Kohlicek J. // J. Chromatogr.— 1989.— Vol. 497.— P. 159—167.
10. Flanagan R. E. et al. // Hum. Toxicol.— 1988.— Vol. 7.— P. 489—502.
11. Gibbs H. D. // J. biol. Chem.— 1927.— Vol. 72, N 1.— P. 649—663.
12. Hein R. et al. // Ann. occup. Hyg.— 1989.— Vol. 33, N 1.— P. 133—136.
13. Henderson R. F. et al. // Crit. Rev. Toxicol.— 1989.— Vol. 20, N 2.— P. 65—82.
14. Ikeda M., Ohtsuji H. // J. Biochem. (Tokyo).— 1969.— Vol. 55, N 3.— P. 231—243.
15. Ikeda M., Ohtsuji H. // Brit. J. industr. Med.— 1969.— Vol. 26.— P. 162—164.
16. Murray K. E., Adams R. F. // J. Chromatogr.— 1988.— Vol. 43, N 1.— P. 143—149.
17. Ogata M., Tguchi T. // Int. Arch. occup. environ. Hlth.— 1988.— Vol. 61, N 1—2.— P. 131—140.
18. Ohtsuji H., Ikeda M. // J. industr. Med.— 1972.— Vol. 29, N 1.— P. 70—73.
19. Piotrovski J. K. // Brit. J. industr. Med.— 1971.— Vol. 28, N 2.— P. 172—178.
20. Shiller J. G., Chen A. K., Liu C. C. // Analyt. Biochem.— 1978.— Vol. 85.— P. 25.
21. Tietz N. W. // Textbook of Clinical Chemistry.— Philadelphia, 1986.— P. 278—280.
22. Toshimitsu N., Kenji M. et al. // Clin. chim. Acta.— 1981.— Vol. 110.— P. 51—57.

Поступила 16.03.93

ESTIMATION OF FREE AND BOUND FORMS OF PHENOL IN HUMAN URINE DURING SCREENING

A. G. Kobylansky, S. V. Kulagin, E. L. Nasonov, V. G. Tishenkov

Cardiological Research Centre, Russian Academy of Medical Sciences, Research Centre of Molecular Diagnosis and Treatment, Ministry of Public Health of the Russian Federation, Moscow

Quantitative estimation of phenol content in human urine involving Gibbs reagent was described in detail; the procedure was

applied for screening test of people. The Gibbs reagent was synthesized from commonly available substances 2,6-dibromine-4-aminophenol and 4-nitrophenol. Estimation of total and bound forms of phenol was carried out in 0.5 ml of urine, while phenol conjugates were hydrolyzed by means of heating of urine samples containing 0.2 ml of 42 % perchloric acid in boiling water bath and the phenol released was extracted by 3.0 ml of diethyl ether. Sensitivity of the procedure was about 0.1 μg of phenol in a sample, when microphotometer, applied in immunological studies, was used for measurement of optic density in the plates holes. Content of total phenol was estimated in urine of 15 children of 6-6.5 years old from Moscow using the procedure developed and it constituted from 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ to 47.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, middle value was 9.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. In 47 children from Noyabrsk town these parameters constituted 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 19 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively; in adults — 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 168 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 167.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively. The upper limit of the phenol normal concentration in urine was proposed to be as 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in screening test of people. Content of phenol in urine should be measured within a day during individual examination.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616.74-018-02:615.849.11-07

*Н. В. Кондакова, С. В. Лисаковский, В. В. Сахарова,
О. А. Королева, В. А. Дубинская, С. С. Николаева*

ВЛИЯНИЕ ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ НА МЫШЕЧНУЮ ТКАНЬ ЧЕЛОВЕКА

Научно-исследовательская лаборатория биологических структур
Минздрава РФ, Москва

В настоящей работе продолжено исследование действия ионизирующей радиации на мягкие ткани человека. Ранее нами было показано, что облучение коллагеновых волокон ахилловых сухожилий в диапазоне доз до 5 кГр не вызывает достоверных изменений ряда биохимических и физико-химических показателей ткани. Увеличение доз до 25 кГр приводит к образованию в коллагене сухожилия молекулярных сшивок, стабилизирующих структуру биополимеров [5]. Данные по влиянию ионизирующего излучения на свойства мышечной ткани в литературе практически отсутствуют.

В данной работе ставилась задача изучить устойчивость мышечных белков в структуре ткани человека к действию γ -излучения, используя биохимические и физико-химические методы исследования.

Изучение действия радиации на ткани человека, помимо теоретического значения, представляется важным в научно-практическом плане, в частности в связи с проблемой трансплантации органов и тканей, для оценки возможных осложнений при радиотерапии, для понимания механизмов лучевых поражений.

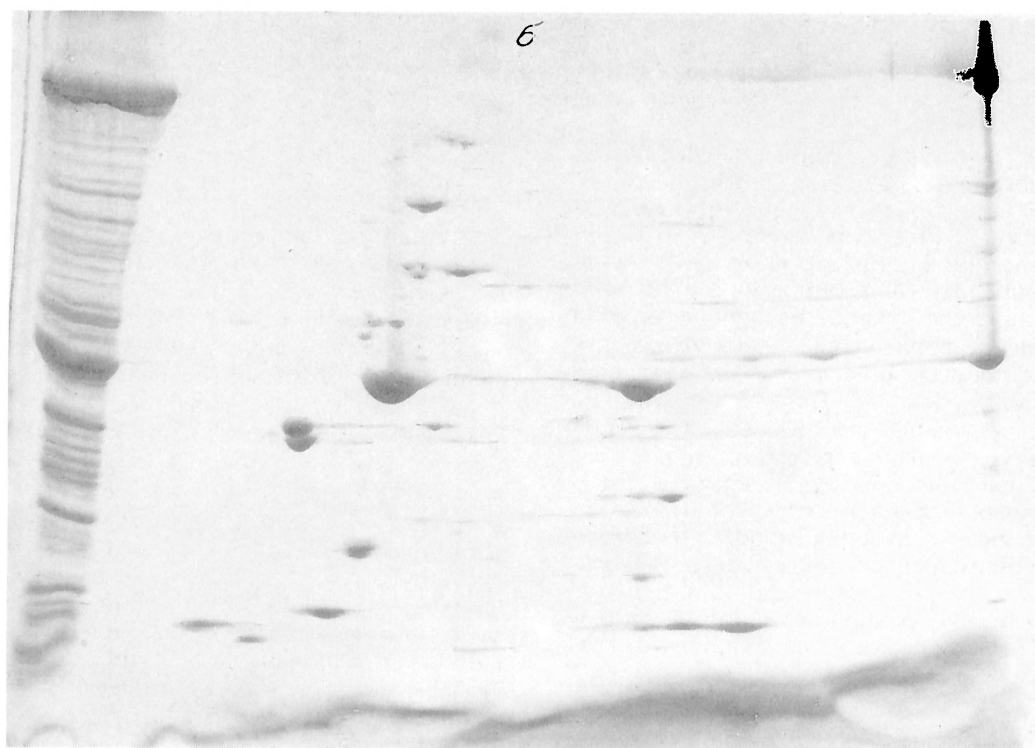
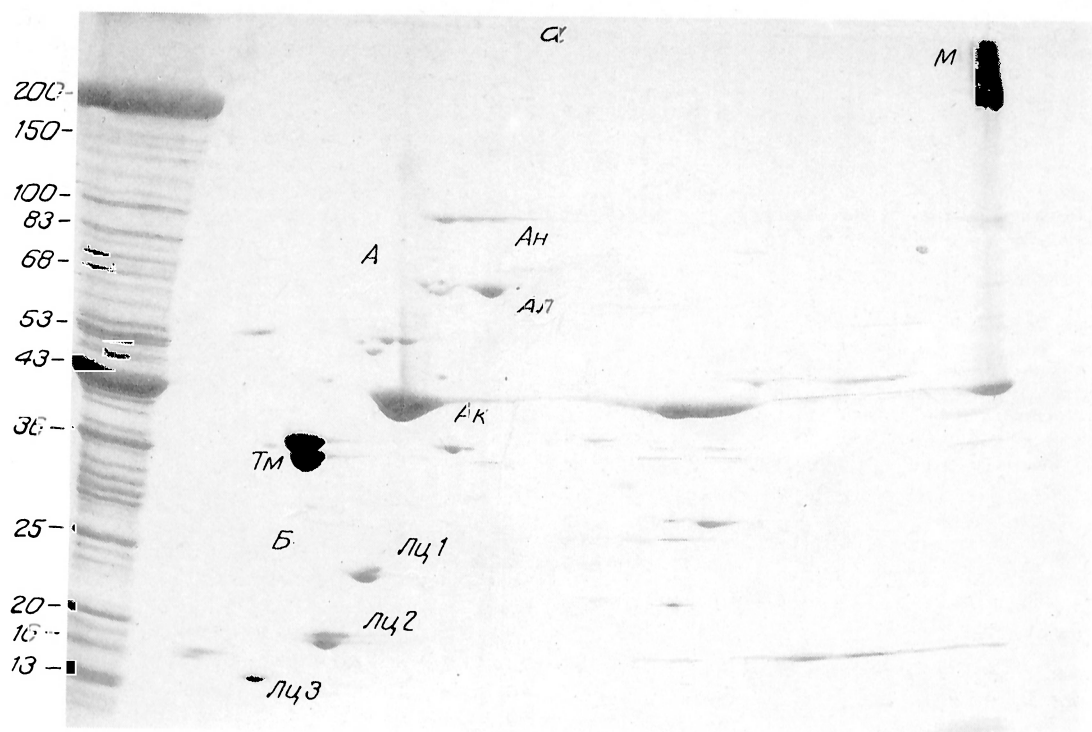
Методика. Объектом исследования служила четырехглавая мышца бедра мужчин в возрасте от 40 до 60 лет, полученная при аутопсии в пределах 20 ч после смерти от несчастных случаев. Образцы мышцы массой 1,5 г помещали в пробирки и облучали γ -квантами ^{60}Co . Диапазоны доз 10—100 Гр и 1—15 кГр, мощность дозы 0,03 и 1,5 Гр·с⁻¹ соответственно. В процессе транспортировки и облучения образцы ткани находились в условиях пониженной температуры (вода со льдом). Исследование облученной ткани проводили в тот же день. Двумерный электрофорез проводили по методу [11]. При этом использовали амфолины pH 5,0—7,0 и 3,5—10,0 (фир-

ма LKB, Швеция) и додецилсульфат (ДС) натрия, тритон X-100, β -меркаптоэтанол, агарозу, акриламид, метиленисакриламид, персульфат аммония, ТЕМЕД, мочевины фирмы «Serva» (Германия). Гомогенизацию образцов мышечной ткани для изоэлектрического фокусирования проводили в 10 объемах лизис-буфера 1 следующего состава: 2 % тритон X-100, 9,5 М мочевины, 2 % амфолины (смесь pH 5,0—7,0 и 3,5—10,0 в соотношении 4:1), 5 % β -меркаптоэтанол. Для разделения белков в первом направлении (изоэлектрофокусирование) применяли 4 % акриламидный гель, содержащий 2 % амфолинов (смесь pH 5,0—7,0 и 3,5—10,0 в соотношении 4:1), 2 % тритон X-100, 9 М мочевины. Преэлектрофорез проводили 1 ч при 200 В. Образцы наносили с катодного конца геля. Электрический режим электрофокусирования: первый час 200 В, далее 17 ч при 500 В.

После окончания фракционирования гели первого направления выдерживали в лизис-буфере 2 (0,125 М трис-HCl pH 6,8, 2 % ДС натрия, 5 % β -меркаптоэтанол, 10 % глицерин) в течение 20 мин при комнатной температуре и использовали для фракционирования белков во втором направлении, которое проводили по методу [10]. Для идентификации получаемых фракций и оценки их молекулярной массы в качестве маркерных белков использовали суммарный лизат мышцы сердца крысы по методу [7]; лизат наносили на расстоянии 1 см от края пластины. Пластины геля (160×160×1 мм) готовили с линейным градиентом концентрации акриламида 9—25 %. После окончания электрофореза гели окрашивали 0,1 % кумаси голубым R-250 в смеси 10 % уксусной кислоты и 20 % этанола.

В опытах с протеолизом работали с суммарным белком мышцы, который получали по следующей процедуре. Кусочек интактной или облученной ткани гомогенизировали в этаноле, после 30-минутного перемешивания гомогената на магнитной мешалке его центрифугировали при 6000 об/мин, осадок еще дважды обрабатывали этанолом, а затем 3 раза по 30 мин хлороформ-метанольной смесью (на 1 г ткани брали по 15 мл растворителя). Осадок белка высушивали на воздухе, а затем в эксикаторе над пятиокисью фосфора. Для протеолиза 10 мг сухого суммарного белка суспендировали в боратном буфере pH 7,5, добавляя трипсин (кристаллический, «Serva») или проназу (проназа Е — лиофилизированная очищенная протеиназа из *Strept. griseus*, «Serva»). Общий объем реакционной смеси 10 мл, соотношение фермент: субстрат 1:10 (по массе). Длительность инкубации при 37 °С с трипсином составляла 23 ч, с проназой — 16 и 1 ч. В последнем случае инкубацию фермент-субстратной смеси производили в водяном термостате со встряхиванием. По истечении указанных сроков смеси фильтровали, в фильтратах определяли свободные аминокислоты с помощью 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислоты (ТНБС) по методу [9]. ТНБС аналитической чистоты фирмы «Serva».

Степень протеолиза белка мышцы оценивали как отношение прироста свободных аминокислот в ферментативном гидролизате к общей концентрации аминокислотных остатков в исходном белке, полученной расчетным путем, исходя из навески образца, и выражали в процентах [12]. При расчетах вносили поправки на аминокислоты фермента и каж-



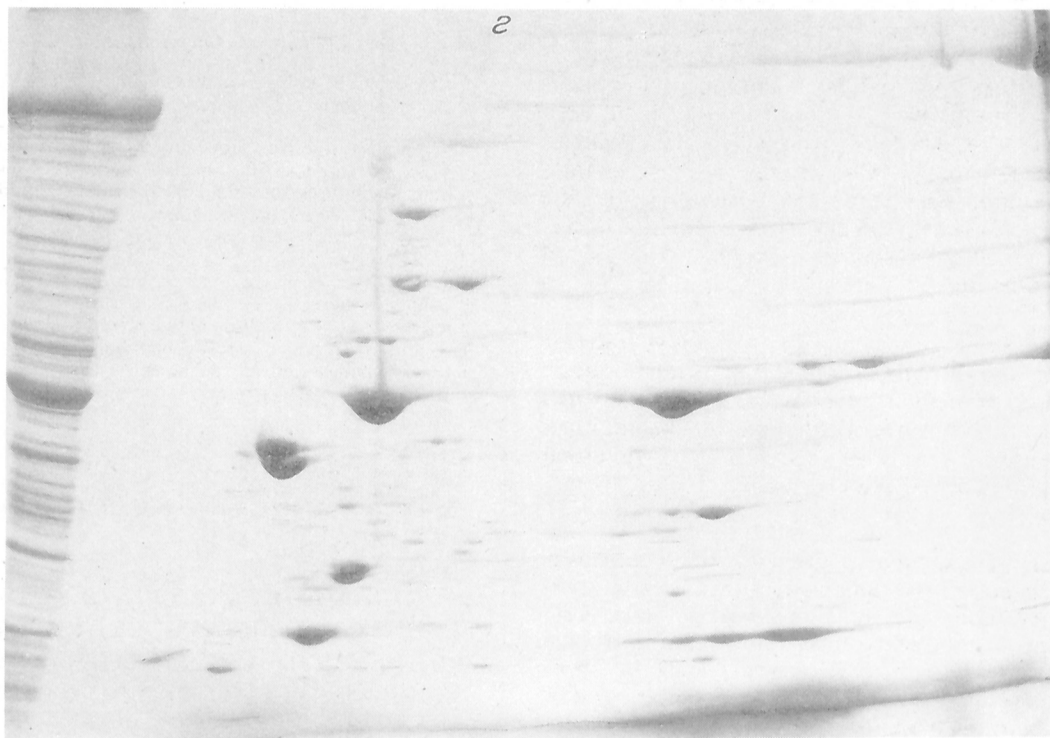
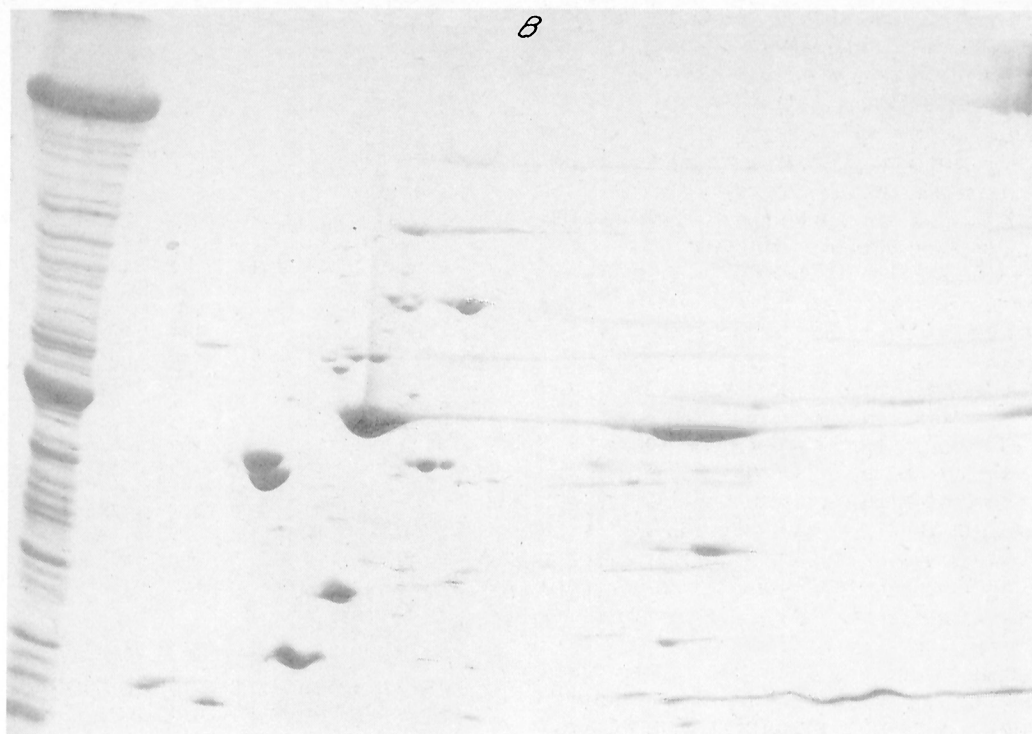
дого образца белка (без гидролиза). Соответствующие контроли давали также сведения о растворимости препаратов белка облученной и необлученной ткани в боратном буфере.

Содержание общего азота в этанольных и хлороформ-метанольных экстрактах в процессе получения суммарного белка определяли с помощью α -нафтола [8].

Упругоэластические свойства мышцы изучали при одноосном растяжении в области обратимых деформаций. Температуру и линейную величину гидротермического сокращения, а также модуль упругости определяли на термоэластодинамометре [6] в среде физиологического раствора. Модуль упругости рассчитывали по тангенсу угла наклона

изотермы растяжения. Суммарное влагосодержание определяли титриметрически с помощью реактива Фишера [1]. Для определения количества связанной воды из ткани дважды отжимали под давлением (500 атм) свободную воду; количество оставшейся (связанной) влаги определяли также с помощью реактива Фишера.

Результаты и обсуждение. Применение метода двумерного электрофореза позволяет эффективно решать задачу разделения белковых смесей, состоящих из нескольких сотен белков [11]. При этом фракционирование изучаемых белковых смесей происходит по двум параметрам: относительной изоэлектрической подвижности в первом направлении и величине M_r — во втором.



На рис. 1 представлены результаты фракционирования лизата скелетной мышцы человека. Сбоку на пластине в качестве маркеров Мг нанесен лизат сердца крысы, приготовленный для одномерного электрофореза. В интактной мышце определены тяжелая цепь миозина (мол. м. 200 кДа), С-белок (150 кДа), α -актинин (100 кДа), альбумин (68 кДа), актин (42,6 кДа), тропомиозин (36 кДа), легкие цепи миозина 1 (24,5 кДа), 2 (18 кДа), 3 (15 кДа), тропонин С (18 кДа). Кроме того, было установлено положение ряда мышечных белков на двумерной электрофореграмме: актина, тропомиозина, легких цепей миозина 1, 2, 3, тропонина С, что согласуется с результатами, полученными ранее [4].

Все обнаруженные фракции мышечных белков, взаимное расположение пятен не изменялись для образцов ткани, подвергнутых облучению в дозах до 100 Гр. При увеличении дозы облучения до 1 кГр отмечается появление серии пятен с Мг от 68 до 160 кДа с относительной электрофоретической подвижностью, близкой к актину (зона А на рис. 1). Высокое значение Мг ряда образующихся полипептидных фракций позволяет предполагать, что они являются продуктами деградации тяжелых цепей миозина. Тройное пятно с Мг 140—150 кДа, расположенное над актиновой фракцией, аналогично тому, что было обнаружено нами при аутолитическом изменении изолированных образцов мышечной ткани человека [4].

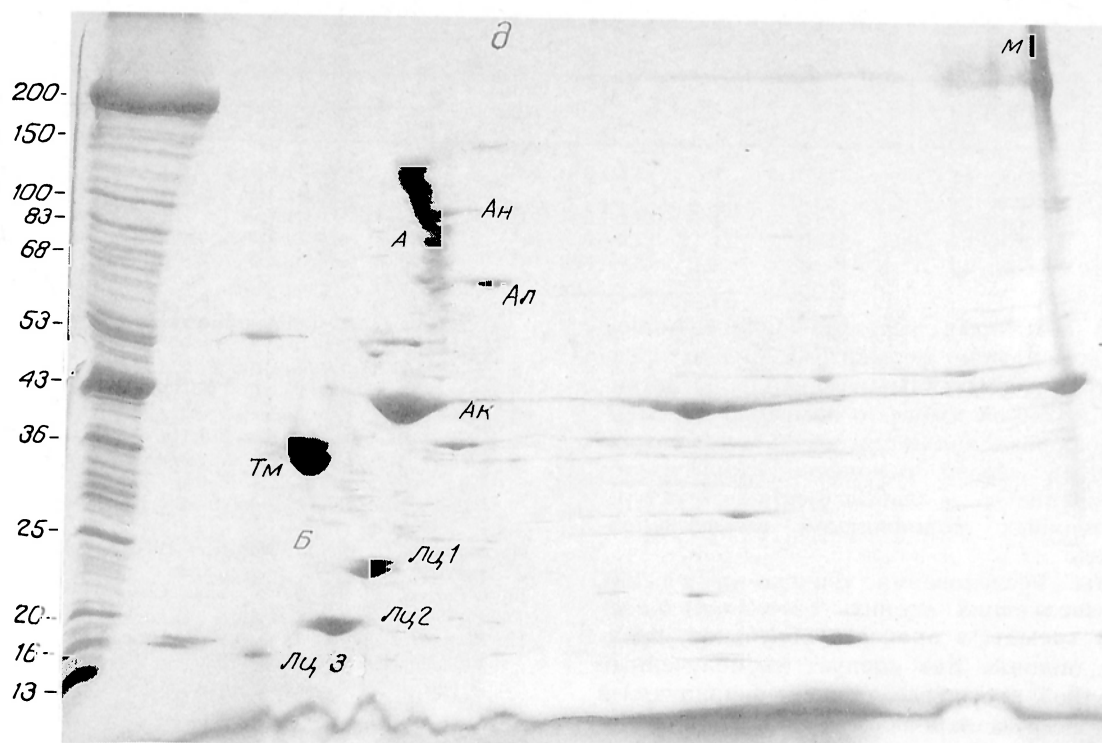


Рис. 1. Электрофореграммы гомогенатов мышечной ткани.

а — необлученный контроль; *б* — 0,01 кГр; *в* — 0,1 кГр; *г* — 1 кГр; *д* — 15 кГр. *М* — тяжелая цепь миозина (200 кДа); *Ан* — α -актинин (100 кДа); *Ал* — альбумин (68 кДа); *Ак* — актин (42,6 кДа); *Тм* — α - и β -тропомиозины (36 кДа); *Лц 1*, *Лц 2*, *Лц 3* — легкие цепи миозина (соответственно 24,5, 18, 15 кДа); *Тс* — тропонин С (18 кДа). С левого края фотографии указаны значения *Мг* основных маркерных линий лизата сердца крысы (в кДа); *а* и *б* — зоны появления новых фракций (см. текст).

Кроме высокомолекулярных продуктов деградации мышечной ткани, при облучении ионизирующей радиацией в высоких дозах отмечается появление ряда пятен, расположенных между тропомиозином (36 кДа) и легкой цепью миозина 2 (18 кДа), обозначенных зоной *Б* на рис. 1.

Несмотря на деструктивные изменения, выявляемые с помощью электрофореза гомогенатов облученной мышечной ткани, не было отмечено увеличения содержания азотсодержащих соединений, экстрагируемых органическими растворителями. Не наблюдалось также увеличения растворимости в боратном буфере (при 37 °С, инкубация в течение 23 ч) суммарных мышечных белков во всем диапазоне доз облучения. Эти данные свидетельствуют об отсутствии грубых деструктивных процессов в белковом компоненте при облучении мышечной ткани.

Ранее нами в модельных опытах было показано [2, 3], что чувствительность белка к действию протеиназ может быть использована для оценки его повреждения ионизирующей радиацией. Оказалось, что показатель чувствительности к протеолизу суммирует несколько видов повреждений белковой молекулы [3]. Так, трипсиновый протеолиз суммировал повреждения лизина и аргинина в соответствии со спецификой действия трипсина на пептидные связи, образованные с участием карбоксилатов этих аминокислот. В случае неспецифического расщепления проназой суммируемый спектр повреждений может быть шире. Чувствительность белковой молекулы к протеолизу должна снижаться также при образовании сшивок наряду с точковыми повреждениями.

На рис. 2 представлены результаты оценки состояния белка облученной мышцы по устойчи-

вости к действию экзогенных протеиназ. Не обнаружено во всем изученном диапазоне доз облучения изменения способности белка мышцы подвергаться исчерпывающему протеолизу как трипсином, так и проназой. Это свидетельствует о том, что не происходит в значительной степени радиационной модификации аминокислотных остатков в составе структурных белков мышечной ткани. Однако при проведении ограниченного (1-часового) проназного протеолиза отмечается тенденция к некоторому возрастанию (примерно на 20 %) степени, расщепления белка, что указывает, по-видимому, на увеличение при больших дозах облучения

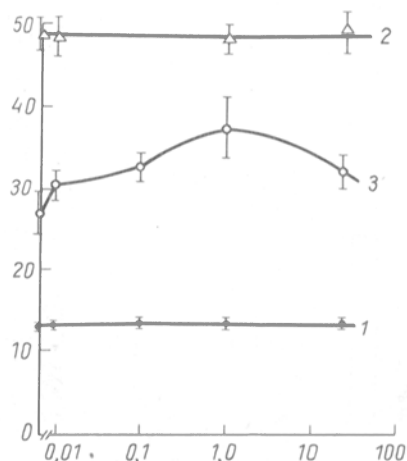


Рис. 2. Влияние ионизирующей радиации на интенсивность протеолиза суммарного белка мышечной ткани.

По оси абсцисс — доза облучения, кГр; по оси ординат — степень протеолиза, %. 1 и 2 — исчерпывающий протеолиз трипсином (23 ч) и проназой (16 ч) соответственно; 3 — ограниченный протеолиз проназой (1 ч).

Доза, кГр	Т, °С	L, %	Е, Па	W, %	
				общая	связанная
0	59,5±0,5	37±7	(3,4±0,3)·10 ⁵	78,3±0,7	17,4±1,1
0,01	—	—	—	78,5±1,2	17,6±0,7
0,1	59,0±0,5	31±2	(3,6±0,4)·10 ⁵	78,9±1,0	17,7±1,0
1,0	58,6±0,9	33±5	(2,9±0,3)·10 ⁵	78,1±1,2	17,6±0,8
15	57,5±0,5	40±3	(8,6±0,9)·10 ⁴	78,3±0,8	17,0±0,9

доступности некоторых участков полипептидной цепи для расщепления ферментом. Можно предположить, что деструктивные изменения, регистрируемые в облученной мышце с помощью двухмерного электрофореза, являются результатом разрывов пептидных связей основного структурного белка — миозина — в слабых местах структуры без существенных модификаций аминокислотных остатков.

Результаты исследования физико-химических свойств, позволяющих оценить состояние тканевого уровня мышцы в процессе облучения, представлены в таблице. Как следует из полученных данных, в результате действия ионизирующей радиации не было выявлено изменений гидротермических параметров и содержания общей и связанной воды в мышце. Однако при облучении в максимальной дозе (15 кГр) модуль упругости мышцы был снижен в 3 раза по сравнению с его величиной для нативного материала, что, очевидно, является результатом частичной деструкции биополимеров мышечной ткани.

Полученные результаты показывают существенную разницу в радиационном ответе мышечной и соединительной ткани человека. Так, облучение сухожилий в интервале доз 5—24 кГр [5] приводило к снижению количества общей и связанной воды (на 3—7 отн. %), увеличению гидротермического сокращения (на 2—3°) и величины модуля упругости (в 3—4 раза), появлению дополнительных полос исчерченности ультраструктуры коллагеновых фибрилл на электронных микрофотографиях. Эти изменения свидетельствовали о доминировании процессов структурирования за счет возникновения радиационных сшивок между функциональными группами боковых цепей молекул коллагена.

Таким образом, биополимеры в составе мышечной ткани не проявляют способности создавать радиационные сшивки в изученном диапазоне доз облучения. Однако с помощью высокочувствительного метода двухмерного электрофореза удается зарегистрировать деградационные процессы на молекулярном уровне, которые приводят к увеличению деформируемости образцов мышц.

ЛИТЕРАТУРА

1. Климова В. А. // Основные микрометоды анализа органических соединений. — М., 1975. — С. 170—196.
2. Кондакова Н. В., Рипа Н. В., Сахарова В. В. // Радиобиология. — 1988. — Т. 28, № 6. — С. 748—751.
3. Кондакова Н. В., Рипа Н. В., Кузнецова Н. В., Амирагова М. И. // Всесоюзный симпозиум «Молекулярно-клеточные механизмы хронического (внешнего и внутреннего) действия ионизирующих излучений на биологические системы», 1-й: Тезисы докладов. — Пушкино, 1990. — С. 60.
4. Лисаковский С. В., Володина Т. В., Козельцев В. Л. // Вопр. мед. химии. — 1988. — № 6. — С. 117—122.
5. Николаева С. С., Кондакова Н. В., Хорошков Ю. А.,

Королева О. А. // Радиобиология. — 1988. — Т. 28, № 4. — С. 483—488.

6. Пчелин В. А., Николаева С. С. // Высокомолек. соединения. — 1966. — № 1. — С. 136—140.
7. Anderson N. G., Anderson N. L. // Behring Inst. Mitt. — 1979. — Bd 63. — S. 169—210.
8. Glebo L. I., Ulkina Zh. I., Lognenko E. M. // Microchem. Acta. — 1975. — Vol. 2. — P. 641—648.
9. Habeeb A. F. // Analyt. Biochem. — 1966. — Vol. 14. — P. 326—336.
10. Laemmli U. K. // Nature. — 1970. — Vol. 227. — P. 680—685.
11. O'Farrell P. H. // J. biol. Chem. — 1975. — Vol. 250. — P. 4007—4021.
12. Romero J., Ryan D. S. // J. Agric. Food Chem. — 1978. — Vol. 26, N 4. — P. 784—788.

Поступила 02.06.93

EFFECT OF IONIZING RADIATION ON HUMAN MUSCLE TISSUE

N. V. Kondakova, S. V. Lisakovsky, V. V. Sakharova, O. A. Koroleva, V. A. Dubinskaya, S. S. Nikolaeva

Research Laboratory of Biological Structures, Ministry of Public Health of the Russian Federation, Moscow

The effect of ionizing radiation (γ -irradiation of ^{60}Co , doses from 10 Gy to 15 kGy) on human muscle tissue was studied using a biopsy material. Destructive alterations in muscle proteins were observed beginning from the dose of 1.0 kGy: appearance of new protein fractions with molecular mass 68-160 kDa and 18-36 kDa. Resistance of muscle proteins to the trypsin effect was unaltered, while the rate of pronase-induced hydrolysis was slightly increased, about 1.2-fold. Content of water and biomechanical properties of the tissue were unaltered, but the modulus of elasticity was decreased approximately 3-fold after treatment with maximal doses of the ionizing radiation used.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616.12-008.318-053.2-092:616.12-008.924.1

Т. В. Бершова, М. И. Баканов, Л. А. Бокерия, В. И. Сербин, Т. Н. Мамедова, И. Л. Михайлова

КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ КАЛЬЦИЕВОЙ РЕГУЛЯЦИИ СЕРДЕЧНОГО РИТМА У ДЕТЕЙ С ЭКТОПИЧЕСКИМИ АРИТМИЯМИ

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

При решении вопросов о молекулярных основах аритмий, метаболических нарушений образования и передачи импульса, играющих ключевую роль в изменениях автоматизма и возбудимости миокарда, в настоящее время значительное внимание уделяется аспектам внутриклеточной регуляции кальциевого гомеостаза. В ряде экспериментальных работ выявлена достаточно четкая корреляция между изменениями вне- и внутриклеточного баланса кальция и интенсивности электрофизиологических свойств миокарда [10, 14].

При этом широко обсуждаются данные о физиологическом влиянии внутриклеточного уровня кальция на состояние системы сопряжения возбуждения с сокращением, на мембранный потенциал действия кардиомиоцита [12, 13, 16]. Известно, что вариабельность внутриклеточного кальциевого пула определяется рядом причин, к числу которых могут быть отнесены структурное состояние цитомембран, особенности их функционирования, а также нарушения клеточного метаболизма кальция, связанные со сдвигами в системе вторичных внутриклеточных посредников [1, 15, 18]. С этой точки зрения особый интерес представляет изучение регуляции внутриклеточного кальциевого гомеостаза вторичными посредниками — кальмодулином (КМ) и продуктами гидролиза фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата — инозитолфосфатами (ИФ) — у детей с аритмиями, что может иметь важное значение не только для понимания общих закономерностей регуляции кальциевого метаболизма, но и для выяснения конкретных метаболических факторов возникновения и развития нарушений ритма сердца (НРС).

Методика. У 52 детей с эктопическими видами аритмий проведено изучение содержания ионизированного кальция (Ca^{2+}), КМ и суммарное определение ИФ, включающих ИФ₁, ИФ₂, ИФ₃, в эритроцитах.

В зависимости от преобладающих НРС дети были условно разделены на группы: 1-я группа — дети с экстрасистолической аритмией, у половины из них выявлена устойчивая желудочковая аллоритмия (типа би- и тригеминии); 2-я группа — дети с различными формами суправентрикулярной тахикардии (пароксизмальная и непароксизмальная постоянная форма); 3-я группа — дети с комбинированными нарушениями ритма, у которых различные виды суправентрикулярных аритмий сочетались с синдромом предвозбуждения желудочков (ПВЖ). Характер кардиальной патологии был неоднородным: у части детей отмечена аритмогенная дилатационная кардиомиопатия, у трети больных — гипертрофическая кардиомиопатия, реже встречался пролапс митрального клапана с регургитацией и без таковой. С целью дифференциальной диагностики аритмий для изучения механизмов НРС использовали электрокардиографический (в том числе холтеровское мониторирование) и эхокардиографический методы исследования. У 30 % обследуемых детей эктопические аритмии отличались неблагоприятным клиническим течением, что приводило к развитию синкопальных эпизодов и недостаточности кровообращения I—IIА стадии.

Измерения биохимических параметров проводили также в эритроцитах 17 здоровых детей и в

ткани ушка предсердия больных с НРС, удаленной во время ультразвуковой деструкции очага эктопического возбуждения. Ткань для исследования забирали после торакотомии до проведения основного этапа операции.

Уровень Ca^{2+} определяли с помощью ионселективных электродов на анализаторе фирмы «Ciba-Corning» (Англия), концентрацию КМ — радиоизотопным методом с использованием наборов реактивов фирмы «Amersham» (Англия). Интенсивность фосфоинозитидного обмена (ФИО) определяли радиоизотопным методом [11] с инкубацией тканей с ^3H -инозитолом (5 мКи/мл) в присутствии LiCl [9]. Измеряли базальную активность ФИО и чувствительность клеток к агонистам, изменяющим концентрацию внутриклеточного кальция (норадреналин — 10 и 100 мМ).

Результаты и обсуждение. Анализ проведенных клинико-биохимических исследований показал, что изменения в системе КМ — Ca^{2+} и активность ФИО находятся в тесной зависимости от клинического течения НРС (см. таблицу). Так, отмеченное у большинства детей с аритмиями увеличение уровня КМ и Ca^{2+} в эритроцитах наиболее выражено у больных с аллоритмиями и частыми приступами пароксизмальной тахикардии. У этих детей обнаружено значительное повышение уровня Ca^{2+} и КМ в ткани ушка предсердия по сравнению с таковым у больных с экстрасистолией. Указанные сдвиги в системе КМ — Ca^{2+} у детей с аритмиями сопровождались увеличением базального уровня ИФ в эритроцитах и ткани миокарда. Наибольшая степень интенсификации ФИО отмечена у детей с комбинированными НРС. Однонаправленность изменений в содержании КМ, Ca^{2+} и продуктов гидролиза фосфатидилинозитола в эритроцитах и ткани миокарда больных с аритмиями указывает на общность биохимических механизмов в реализации патологического процесса как в отдельных клетках, так и в тканевых структурах органа-мишени.

Выявлена связь базального содержания ИФ в эритроцитах и ткани миокарда с длительностью течения экстрасистолической аритмии. Максимальное накопление ИФ обнаружено у детей с экстрасистолией, страдающих аритмией не более 6 мес. Снижение содержания продуктов ФИО в эритроцитах отмечено у больных с длительно текущими экстрасистолиями (свыше 6 мес) по сравнению со здоровыми детьми. Показано, что в эритроцитах детей с выраженными признаками сердечной недостаточности уменьшение базального уровня ИФ сочетается со снижением клеточного кальциевого пула. Отмеченное у детей с угнетением сократительной функции миокарда повышение внутрикле-

Содержание вторичных клеточных посредников в эритроцитах и ткани миокарда детей с НРС

Группа обследованных	Эритроциты			Ткань миокарда		
	кальмодулин, нг на 1 мг белка	Ca^{2+} , мкмоль/л	суммарная фракция ИФ, имп/мин на 10^6 эритроцитов	кальмодулин, нг на 1 мг белка	Ca^{2+} , мкмоль на 1 г белка	суммарная фракция ИФ, имп/мин на 1 мг белка
Экстрасистолия	161±9,06* (11)	5,17±0,02* (11)	15,11±0,75* (11)	87,20±1,5 (5)	123,1±2,1 (5)	187±2,01 (5)
Аллоритмия	189±7,32* (9)	6,01±0,03* (16)	21,17±0,51* (9)	107,1±1,9 (4)	238,2±2,4 (4)	—
Суправентрикулярная тахикардия	148±9,33 (16)	4,72±0,01* (16)	23,85±0,93* (15)	99,10±2,1 (5)	215,9±2,3 (5)	203±1,98 (5)
Комбинированные НРС	168±4,13* (9)	5,98±0,03* (9)	25,98±1,00* (9)	93,40±1,7 (6)	244,82±3,1 (6)	245±3,4 (6)
НРС, осложненные сердечной недостаточностью	172±5,91* (3)	1,41±0,02* (8)	8,92±0,14* (8)	—	—	—
Здоровые дети	128±5,14 (15)	2,45±0,04 (17)	10,54±0,51 (15)	—	—	—

Примечание. В скобках — число детей. Звездочка — достоверность различий по сравнению с группой здоровых детей.

точного уровня КМ может играть важную роль в регуляторных механизмах, направленных на генерацию силы сердечных сокращений. При этом активации сокращения миофибрилл компенсаторно могут способствовать мобилизация гликолиза, ингибирование ресинтеза гликогена, увеличение потребления кислорода, что обеспечивается повышенной концентрацией КМ.

Для функциональной оценки значений фосфоинозитидного ответа использован норадреналин. Предынкубация интактных клеток миокарда с норадреналином приводила к повышению в них базального уровня ИФ и Ca^{2+} у детей с экстрасистолией, длительность существования которой не превышала полугод, у больных со стойкой непароксизмальной тахикардией, а также у детей, у которых наджелудочковые аритмии сочетались с синдромом ПЖ. Этот факт подтверждает высказанное в работе [17] предположение о том, что при НРС агонисты, действующие через h_1 -адренорецепторы, стимулируют гидролиз полифосфоинозитидов, повышение уровня ИФ₃ и увеличение сократимости. Не выявлено влияния норадреналина на активность фосфоинозитидного цикла у детей, у которых эктопические тахикардии осложнялись выраженной сердечной недостаточностью. Повидимому, у этих больных в состоянии недостаточного снабжения клеток кислородом гормональная регуляция ФИО кардиомиоцитов отличается от таковой в нормоксических условиях.

В регуляции клеточного кальциевого гомеостаза принимает участие большой спектр биологически активных соединений, реализующих свое влияние посредством многочисленных механизмов вне- и внутриклеточного воздействия. Мишенями действия таких соединений могут быть ионные каналы и насосы клеточных мембран. Обнаруженное нами у детей с НРС увеличение внутриклеточного кальциевого пула может явиться следствием изменения кальциевого потока в миоплазму и из нее. Можно предположить, что накопление Ca^{2+} в клетке обусловлено активацией входа катиона из внеклеточной среды за счет увеличения числа и времени открытия потенциал- и рецепторзависимых кальциевых каналов под действием высоких концентраций катехоламинов, отмеченных рядом авторов у таких больных [6, 7]. При этом синоатриальные отделы проводящей системы повреждаются в большей степени, чем сократительный аппарат, так как клетки синусового узла обладают низким потенциалом покоя, а входной ионный ток, ответственный за пик потенциала действия, является преимущественно кальциевым [4]. Вместе с тем в условиях гипоксии, неизбежно развивающейся при аритмиях сердца, отмечается функциональная недостаточность ионтранспортирующих ферментов (Ca^{2+} , Mg^{2+} - и Na^+ , K^+ -АТФаз), обусловленная системными дефектами клеточных мембран. Энергодефицитное нарушение функционирования Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы сопровождается снижением выхода Ca^{2+} из клетки [2]. Одновременно уменьшение активности Na^+ , K^+ -АТФазы приводит к потере клеткой K^+ , увеличению Na^+ и изменению ее биоэлектрической активности. Это выражается в падении потенциала покоя, уменьшении скорости и снижении вольтажа потенциала действия (ПД). Указанные изменения трансмембранного потенциала могут вызвать нарушения как генерации импульса (что приводит к изменениям автоматизма),

так и его проводимости. Изменчивость ионного потенциала является источником спонтанной генерации импульсов и возникновения триггерных ритмов, отличающихся от истинных автоматических ритмов тем, что повторные импульсы инициируются как автоматически, так и стимулирующим влиянием ПД [11].

Уменьшение скорости и длительность ПД, а также увеличение 4-й фазы деполяризации, обусловленное ионным дисбалансом, резко снижают проводимость и способствуют возникновению экстрасистол. Возможно при этом, что свободный Ca^{2+} образует преципитаты в цитозоле клетки, что в свою очередь ведет к появлению блоков проводимости и возникновению возвратных ритмов по типу reentry [8, 13], когда непрерывно генерируемый импульс циркулирует в одном направлении на ограниченном отрезке миокардиальной ткани. Не исключено также, что у детей с эктопическими аритмиями влияние катехоламинов на механическую активность миокарда определяется увеличением скорости поглощения Ca^{2+} саркоплазматическим ретикулом (СПР), что может способствовать укорочению систолы и учащению сердечных сокращений [1].

Известно, что в регуляции клеточного метаболизма на различных этапах проведения и усиления гормонального сигнала клетки и формирования ее ответной реакции большое значение имеет тесное взаимодействие вторичных посредников [5]. Так, выявленный у детей с НРС избыток Ca^{2+} в клетке приводит к повышенному образованию КМ, одним из механизмов действия которого, как известно, является увеличение максимальной активности Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы и сродства этого фермента к Ca^{2+} . Интенсификация ФИО, и в частности повышение уровня ИФ₃, индуцирующего высвобождение Ca^{2+} из СПР, могло бы способствовать нормализации процессов сокращения — расслабления и восстановлению параметров системы электромеханического сопряжения у таких больных. Кроме того, активация фосфоинозитидного цикла, вызванная увеличением концентрации Ca^{2+} в клетке, приводит к секреции во внутриклеточную среду простагличина и тромбоксана. Повышение уровня этих эндогенных простагоидов имеет антиаритмическое действие, связанное с повышением проницаемости миокардиальных клеток для калия. Указанные выше эффекты, обусловленные увеличением внутриклеточного уровня КМ и ИФ₃, можно рассматривать как компенсаторный механизм, направленный на снижение содержания Ca^{2+} в клетке и уменьшение степени повреждающих эффектов миокарда. Однако, по нашим данным, эти регуляторные механизмы клетки оказываются недостаточными.

Причиной значительного снижения уровня Ca^{2+} в клетке, а также уменьшения содержания продуктов гидролиза фосфоинозитидов у детей с НРС, осложненными сердечной недостаточностью, может быть длительная ишемия. Наблюдаемое при ишемии длительное увеличение уровня эндогенных катехоламинов вследствие локального их высвобождения может быть достаточным для того, чтобы вызвать десенситизацию β -адренергических рецепторов, что приводит, как известно, к снижению чувствительности аденилатциклазной системы. Эти изменения аденилатциклазного комплекса наруша-

ют процессы фосфорилирования ионных каналов, что замедляет поступление Ca^{2+} в кардиомиоцит. В условиях выраженного дефицита АТФ у детей с нарушениями кровообращения в значительной мере снижается скорость поглощения Ca^{2+} , что может привести к нарушению процесса активной релаксации миокарда, уменьшению растяжимости и депрессии сократительной функции [6]. Предполагается, что при ишемии ингибируется влияние Ca^{2+} -мобилизирующих гормонов на ФИО, что в свою очередь может приводить к снижению его активности [3].

Таким образом, как показали результаты наших исследований, генерация и проведение импульсов возбуждения осуществляются мембранами клеток и в значительной мере определяются уровнем внутриклеточного кальциевого пула. При этом совокупность молекулярных эффектов, составляющих основу аритмий, реализуется на уровне клеточных мембран и обусловлена взаимодействием внутриклеточных мессенджеров на разных этапах передачи гормонального сигнала. Взаимо моделирующее влияние Ca^{2+} и других вторичных посредников в реализации электрофизиологических свойств миокарда является основой интегральной деятельности миокардиальной клетки, которая в патологических условиях может носить адаптивный характер.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антипенко А. Е., Сви́дская Е. В., Диге Г. И., Красовская И. Е. // Биохимия. — 1989. — Т. 54, № 12. — С. 20—23.
2. Блю́дин Ю. А., Осадчий Л. К., Болдырев А. А. // Там же. — 1986. — Т. 51, № 9. — С. 1499—1505.
3. Буракова Л. Б., Мирзопаязова Т. Ю., Григорян Г. Ю., Ткачук В. А. // Бюл. exper. биол. — 1991. — № 5. — С. 464—466.
4. Меерсон Ф. З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. — М., 1984.
5. Орлов С. Н. Кальмодулин. — М., 1987.

6. Палеев Н. Р., Ковалева Л. И. // Вестн. АМН СССР. — 1988. — № 10. — С. 25—27.
7. Школьников М. А., Белокош Н. А., Белозеров Ю. М. и др. // Педиатрия. — 1988. — № 10. — С. 24—29.
8. Antoni H. // Z. Kardiol. — 1986. — Bd 75, Suppl. 15. — S. 1—8.
9. Brown E., Kendall D. A., Nahorski S. R. // J. Neurochem. — 1987. — Vol. 42. — P. 1379—1387.
10. Hallstrom S., Koidl B., Muller U. et al. // Amer. J. Physiol. — 1991. — Vol. 260, N 3. — Pt 2. — P. H869—H876.
11. Hoffman B. F., Rosen M. R. // Circulat. Res. — 1981. — Vol. 49. — P. 1—15.
12. Langer G. A., Rich T. L., Orner F. B. // J. mol. cell. Cardiol. — 1989. — Vol. 21, Suppl. 2. — P. 177.
13. Lee Hon-Chi, Clusin W. T. // Circulat. Res. — 1987. — Vol. 61, N 6. — P. 934—939.
14. Lin B., Wang L. C. H., Belche D. D. // Cell. Calcium. — 1991. — Vol. 12, N 1. — P. 11—18.
15. Scholz J., Troii U., Sanding P. // Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. — 1991. — Bd 343, Suppl. — S. 56.
16. Strasser R. H., Marquetant R., Kubber W. // Circulation. — 1990. — Vol. 82, N 3. — Suppl. — P. 23—29.
17. Schwitz W., Scholz H., Scholz Y., Stemrath M. // Europ. J. Pharmacol. — 1987. — Vol. 140. — P. 109.
18. Vtrehus Kirst, Anna Cattarina // Acta physiol. scand. — 1991. — Suppl. 599. — P. 81—91.

Поступила 24.03.93

CELL MECHANISMS INTENDED FOR Ca^{2+} -DEPENDENT REGULATION OF CARDIAC RHYTHM IN CHILDREN WITH ECTOPIC ARRHYTHMIA

T. V. Bershova, M. I. Bakanov, L. A. Bokeria, V. I. Serbin, T. N. Mamedova, I. L. Mikhaylova

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

Regulation of intracellular calcium homeostasis by means of secondary mediators calmodulin and 4,5-inositol phosphates (products of phosphatidyl inositol hydrolysis) was studied in children with ectopic forms of arrhythmias. Alterations in the system calmodulin- Ca^{2+} and the activity of phosphoinositide metabolism correlated highly with clinical manifestations of the arrhythmias. The data obtained suggest that a number of molecular mechanisms responsible for arrhythmias were realized in cell membranes and depended on a complex of intracellular messengers affected within various steps of the hormonal signal transmission.

МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 615.285.7.015.46.07

Ж. В. Самсонова, С. А. Еремин, А. М. Егоров

ПОЛЯРИЗАЦИОННЫЙ ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ НА ГЕРБИЦИДЫ КЛАССА СИМ-1,3,5-ТРИАЗИНОВ

Московский университет им. М. В. Ломоносова

В последнее время все большее внимание уделяется мониторингу окружающей среды в связи со сложной экологической обстановкой, поэтому актуальной является разработка надежных экспресс-методов контроля остаточных количеств загрязняющих веществ в продуктах питания, почве, водоемах и т. д. Одной из крупнейших групп гербицидов по масштабам мирового производства являются сим-1,3,5-триазины. Для аналитических определений сим-1,3,5-триазинов чаще всего прибега-

ют к помощи газожидкостной хроматографии [2], ВЭЖХ [7], ГХ/МС [13], тонкослойной хроматографии [10], а также колориметрических методов [5]. Несмотря на несомненные достоинства физико-химических методов, их незаменимость в тех случаях, когда необходимо строго идентифицировать искомое вещество, они имеют ряд недостатков (высокая трудоемкость, длительность подготовки проб и проведения анализа) и совершенно непригодны для оперативного контроля. Альтернативным подходом являются высокочувствительные и специфичные иммунохимические методы анализа, основанные на специфическом взаимодействии определяемого соединения и соответствующего антитела.

Методом иммуноферментного анализа (ИФА) определяют атразин, симазин, пропазин, тербутрин, прометрин и другие сим-1,3,5-триазины в экстрактах из почвы, пищевых продуктов и в пробах воды. Причем, как правило, специфичность опре-

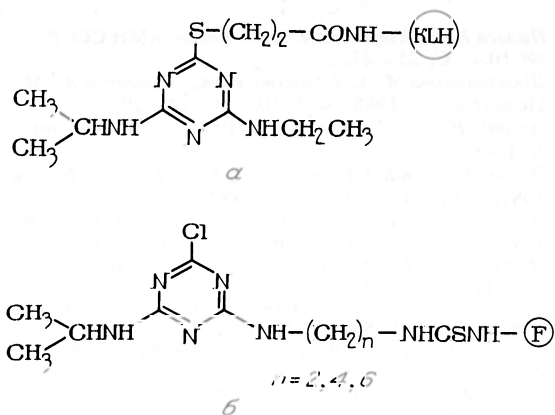


Рис. 1. Структура иммуногена (а) и трасера (б).

деления гербицидов класса сим-1,3,5-триазинов невелика и процент перекрестных реакций зависит от типа и качества антител. Так, даже применение моноклональных антител не позволяет избежать значительного процента перекрестных реакций. Тем не менее методом ИФА определяют эти гербициды с высокой чувствительностью и точностью. Ограничением применения метода ИФА для мониторинга окружающей среды является продолжительность постановки анализа (2—5 ч) и его трудоемкость [4, 5, 9].

Данная работа посвящена разработке экспресс-метода поляризационного флюороиммуноанализа (ПФИА) гербицидов класса сим-1,3,5-триазинов, и в частности такого часто и широко используемого гербицида, как атразин (рис. 1). Принцип ПФИА основан на конкуренции определяемого антигена и антигена, меченного флюоресцентной меткой (трасера), за ограниченное количество центров связывания антитела и измерении поляризации флюоресценции реакционной смеси [1, 6, 12, 13]. В поляризации флюоресценции важную роль играют форма и размер флюоресцеинсодержащих молекул, особенно при контроле реакции антиген — антитело. Так, поляризация флюоресценции маленькой молекулы антигена, меченной флюоресцентной меткой, в растворе мала, а при образовании иммунного комплекса с большой молекулой антитела поляризация флюоресценции значительно возрастает. Чем выше концентрация определяемого антигена в пробе, тем в большей степени меченый антиген в реакционной смеси будет в свободном состоянии и меньше значение поляризации флюоресценции. Данный метод является гомогенным и позволяет определять концентрацию антигена в течение нескольких минут. К преимуществам ПФИА следует также отнести простоту выполнения анализа, точность, хорошую воспроизводимость результатов, стабильность калибровочной кривой.

Методика. Для проведения синтеза и разработки анализа использовали химические реактивы отечественного (марки о. ч. и х. ч.) и импортного (фирма «Sigma») производства.

Для проведения анализа использовали боратный буфер (950 мг $N_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ и 1 г NaN_3 растворили в 1 л дистиллированной воды pH 7,5—8,0).

Стандартные растворы гербицидов класса сим-1,3,5-триазинов готовили путем разбавления исходного раствора гербицида в абсолютном этаноле (1 мг/мл) до конечных концентраций 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 нг/мл.

При разработке анализа использовали поликлональную антисыворотку овцы с наибольшим титром антител, полученную против белкового конъюгата производного атразина с KLH (см. рис. 1). Определение титра антисыворотки проводили методом поляризации флюоресценции: в 10 кювет стандартной карусели последовательно разливали по 500 мкл буферов, далее в 1-ю кювету добавляли 10 мкл цельной сыворотки и 490 мкл буфера, что обеспечивало начальное разведение антисыворотки 1:100. Приготовленный в 1-й кювете раствор раститровывали по 500 мкл до 9-й кюветы. Во все 10 кювет разливали по 500 мкл раствора антигена, меченного флюоресцеином (10 нмоль/л), и проводили измерение поляризации флюоресценции по программе «Photo Check» на TDx-анализаторе («Abbott», США).

Синтез трасера (меченного флюоресцеином атразина). К раствору 6 мг (30 мкмоль) дихлоратразина в 0,2 мл диметилформамида добавили 4 мг (8 мкмоль) этилендиаминфлюоресцеинтиокарбамата (или бутилендиаминфлюоресцеинтиокарбамата, гексилендиаминфлюоресцеинтиокарбамата). Полученный раствор перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре, добавляли 100 мкл триэтиламина и оставляли на ночь при 4 °С. Реакционную смесь хроматографировали в системе хлороформ — этанол (4:1) на пластинках формата 150×150 мм («Silufol», Чехия). Собирали с пластинки основную желтую полосу с $R_f = 0,74$ (или 0,5, 0,6 соответственно) и экстрагировали полученный атразин, меченный флюоресцеином, в 2 мл метанола. Раствор разбавляли боратным буфером до концентрации 10 нмоль/л и использовали в анализе.

В стеклянную кювету к 50 мкл анализируемой пробы или стандартного раствора добавляли 500 мкл раствора атразина, меченного флюоресцеином (10 нмоль/л), и 500 мкл раствора антисыворотки в рабочем разведении. В стандартную карусель прибора загружали 10 кювет с реакционной смесью в объеме 1 мл и проводили измерение поляризации флюоресценции. Время анализа 10 образцов — около 7 мин.

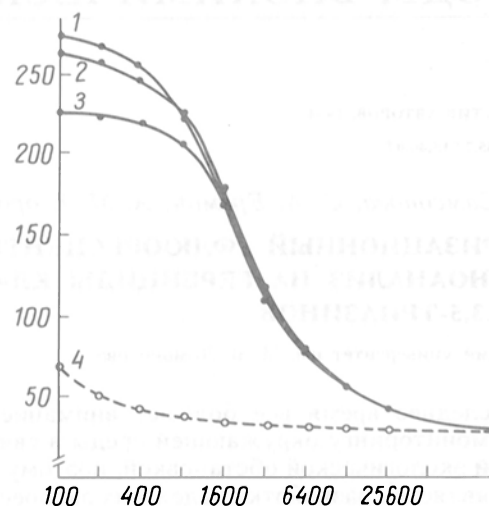


Рис. 2. Кривые титрования поликлональной сыворотки овцы против атразина и нормальной неиммунной сыворотки овцы (4) с трасерами, имеющими различную длину химической ножки.

Здесь и на рис. 2: по оси абсцисс — разведение антисыворотки; по оси ординат — поляризация флюоресценции, мР. Количество метильных группировок в химической ножке трасера: 2 (1), 4 (2), 6 (3).

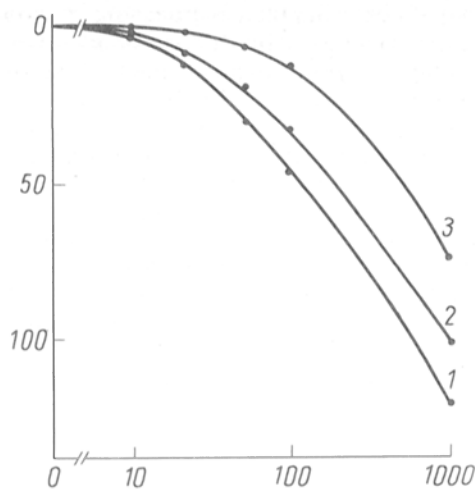


Рис. 3. Влияние длины химической ножки трасера на калибровочные кривые для ПФИА атразина.

Здесь и на рис. 4: по оси абсцисс — концентрация атразина, $\mu\text{г/мл}$; по оси ординат — уменьшение поляризации флуоресценции от уровня нулевого стандарта, mP .

Результаты и обсуждение. Разработка высокочувствительного анализа в первую очередь зависит от качества используемой антисыворотки, поэтому первым этапом работы стал скрининг поликлональных антисывороток овцы, полученных против белкового конъюгата производного атразина с KLN (см. рис. 1). Титр выбранной антисыворотки при 50 % связывания составил 1:2000 (рис. 2).

Большое влияние на чувствительность и специфичность анализа оказывает также структура применяемых трасеров и длина химической ножки между определяемым соединением и флуоресцентной меткой [3]. Было исследовано влияние структуры химической ножки негомолгичных трасеров на чувствительность анализа. На рис. 1 приведена структура синтезированных трасеров. Как видно из рис. 2, в области малых разведений антисыворотки (при большой концентрации антигена) наблюдается следующая закономерность: чем меньше длина химической ножки, тем выше значение поляризации флуоресценции, т. е. при использовании трасера с короткой ножкой (в данном

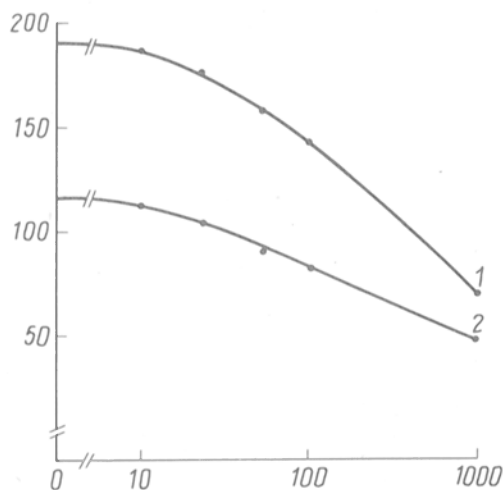


Рис. 4. Влияние степени разведения антисыворотки на калибровочные кривые для ПФИА атразина.

Разведение антисыворотки: 1:1000 (1), 1:2000 (2).

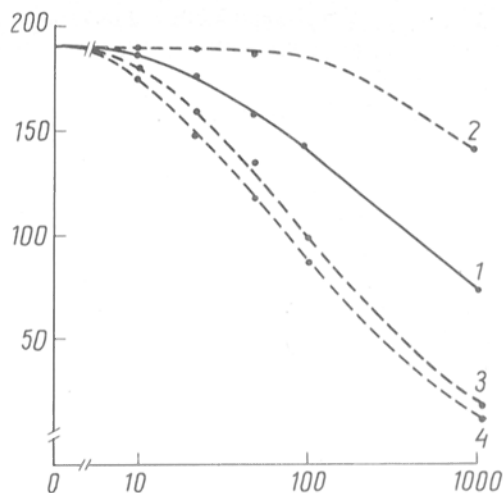


Рис. 5. Калибровочная кривая для ПФИА атразина (1) и перекрестная реакция с симазинном (2), аметрином (3) и прометрином (4).

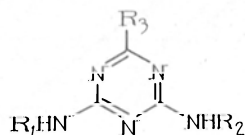
По оси абсцисс — концентрация гербицида, $\mu\text{г/мл}$; по оси ординат — поляризация флуоресценции, mP .

случае количество метильных групп в ножке равно 2) структура образующегося комплекса меченый антиген — антитело более жесткая, малоподвижная и, следовательно, значение поляризации флуоресценции выше, чем при использовании трасеров с более длинной ножкой (количество метильных групп в ножке равно 4 и 6). При разведении антисыворотки более чем 1:1000 длина химической ножки не влияет на значение поляризации флуоресценции и кривые титрования антисыворотки с различными трасерами практически совпадают.

При построении калибровочных кривых с использованием синтезированных трасеров было обнаружено, что наиболее чувствительный анализ обеспечивает применение трасера с самой короткой химической ножкой (рис. 3). В иммунохимической системе при конкуренции определяемого антигена и антигена, меченного флуоресцентной меткой, за ограниченное количество центров связывания антитела равновесие будет сдвигаться в сторону образования комплекса определяемый антиген — антитело тем больше, чем легче будет происходить диссоциация комплекса меченый антиген — антитело. Очевидно, что при использовании трасера с короткой химической ножкой из-за пространственных затруднений и электростатического отталкивания флуоресцентной метки заряженными группами антигенсвязывающего центра антитела диссоциация будет происходить легче и анализ будет более чувствительным. Чем больше длина химической ножки, тем прочнее антитело связывается с антигеном, меченным флуоресцентной меткой, и анализ менее чувствителен.

При проведении оптимизации метода определения атразина варьировали степень разведения антисыворотки, объем образца, время проведения анализа и концентрацию трасера. На рис. 4 приведены калибровочные кривые определения атразина при различных разведениях антисыворотки. По мере разведения антисыворотки тангенс угла наклона прямого участка калибровочной кривой уменьшается, поэтому для дальнейших исследований было выбрано разведение антисыворотки 1:1000. С увеличением объема анализируемого образца пропорционально увеличивается и чувстви-

Структура и перекрестные реакции (в %) гербицидов класса сим-1,3,5-триазинов при определении атразина методом ПФИА



Соединение	R ₁	R ₂	R ₃	Перекрестные реакции при концентрации 450 нг/мл
Прометрин	iPr	iPr	SMe	560
Аметрин	Et	iPr	SMe	450
Пропазин	iPr	iPr	Cl	150
Атразин	Et	iPr	Cl	100
Тербутрин	Et	tBu	SMe	<10
Симазин	Et	Et	Cl	<1
Тербутилазин	Et	tBu	Cl	<1

Примечание. Me — CH₃; Et — CH₂CH₃; iPr — CH(CH₃)₂; tBu — C(CH₃)₃.

тельность анализа. Использование 50 мкл образца для анализа обеспечивало достаточную чувствительность и широкий диапазон определяемых концентраций атразина. Разработанный метод анализа гомогенный, равновесие в системе устанавливается практически сразу при смешении реагентов.

Выполнив 10 повторных измерений нулевого стандарта и используя метод расчета Родбарда [8] при 95 % уровне достоверности, было найдено, что минимальная определяемая концентрация атразина составила 6 нг/мл. Объем образца для анализа составляет 50 мкл, и поэтому методом ПФИА можно определить 0,3 нг гербицида в пробе.

Для оценки воспроизводимости результатов анализа было проведено исследование 3 контрольных образцов, содержащих 10, 100 и 1000 нг/мл атразина в 4—10 повторах в 1 анализе. Средние значения концентраций гербицида, найденные по калибровочной кривой, составили 9,2, 105 и 990 нг на 1 мл атразина с коэффициентами вариации 8,1, 4,5 и 1,7 % соответственно. Коэффициент вариации концентраций тех же образцов стандартных растворов по результатам 3 анализов в разные дни был равен 5,6, 3,9 и 2,5 % соответственно.

Определяя специфичность анализа, мы исследовали перекрестные реакции с различными гербицидами класса сим-1,3,5-триазинов (см. таблицу). Как видно из рис. 5, анализ наиболее специфичен к аметрину и прометрину (процент перекрестного реагирования равен 450 и 560 соответственно), структура которых (тиоатом в положении 2 триазинового кольца) гомологична иммуногену. Значительный процент перекрестного реагирования для этих гербицидов объясняется, по-видимому, не только гомологичностью структуры, но и применением негомологичного трасера для анализа (так как вытеснение негомологичного трасера из комплекса меченый антиген — анти-тело немеченый антигеном происходит легче, чем при применении гомологичного трасера). Для такого также широко применяемого гербицида, как симазин, процент перекрестного реагирования составил менее 1. Очевидно, что атразин можно

достоверно количественно определять в присутствии симазина и тербутрина. Перекрестных реакций с гербицидами класса арилоксиалкилкарбоновых кислот (2,4-Д, 2,4,5-Т и др.) не наблюдалось.

Итак, разработанный метод ПФИА чрезвычайно прост (для проведения анализа требуются только растворы антисыворотки, трасера и анализируемая проба или стандартный раствор), быстр и надежен. Он может быть использован для массового экспресс-контроля остаточных количеств атразина в объектах окружающей среды. Разработанный метод также можно использовать для определения гербицидов группы сим-1,3,5-триазинов в экстрактах из различных источников в целях мониторинга окружающей среды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бекбергенов Б. М., Житников В. Г. // Антибиотики. — 1988. — Т. 33. № 1. — С. 72—76.
2. Bardalaye P. C., Wheeler W. B. // Int. J. environ. analyt. Chem. — 1986. — Vol. 25. — P. 105—113.
3. Colbert D. L., Eremin S. A., Landon J. // J. immunol. Meth. — 1991. — Vol. 140. — P. 227—233.
4. Harrison R. O., Goodrow M. H., Hammock B. D. // J. Agricult. Food Chem. — 1991. — Vol. 39. — P. 122—128.
5. Hock B. // Analyt. Lett. — 1991. — Vol. 24. — P. 529—549.
6. Popelka S. R., Miller D. M., Holen J. J., Kelso D. M. // Clin. Chem. — 1981. — Vol. 27, N 7. — P. 1198—1201.
7. Ramsteiner K. // J. Chromatogr. — 1989. — Vol. 465. — P. 410—416.
8. Rodbard D. // Analyt. Biochem. — 1978. — Vol. 90. — P. 1.—120.
9. Schlaeppi J.-M., Fory W., Ramsteiner K. // Immunochem. Meth. environ. Analys. — 1990. — Vol. 17. — P. 199—210.
10. Sherma J. // J. Liq. Chromatogr. — 1986. — Vol. 9. — P. 3433—3438.
11. Smith D. S., Al-Hakieem M. H. H., Landon J. // Ann. clin. Biochem. — 1981. — Vol. 18. — P. 253—274.
12. Smith D. S. et al. // Modern Fluorescence Spectroscopy / Ed. L. Wehry. — 1981. — Vol. 3. — P. 143—191.
13. Thurman E. M., Meyer M., Pomes M. et al. // Analyt. Chem. — 1990. — Vol. 62, N 18. — P. 2043—2048.
14. Vickery T. M., Karlesky D. L., Blackmer G. L. // J. Ass. Off. analyt. Chem. — 1980. — Vol. 63. — P. 506—510.

Поступила 28.04.93

POLARIZATION FLUOROIMMUNOASSAY FOR S-1,3,5-TRIAZINE HERBICIDES

J. V. Samsonova, S. A. Eremin, A. M. Egorov

M. V. Lomonosov, Moscow State University, Moscow

Polarization fluoroimmunoassay for s-triazine herbicides was developed. The sensitivity of assay is higher with using shortest chemical "bridge" length between the molecule of antigen and fluorescent label. The detection limit of atrazine in 50 µL sample was 6 ng/ml. The total time required for an assay of 10 sample was 6 ng/ml. The total time required for an assay of 10 samples is approximately 7 min. The method may be used for environmental monitoring of s-triazine herbicides in water samples.

С. А. Еремин, О. А. Мельниченко, А. А. Туманов,
Н. В. Сорокина, Е. В. Молокова, А. М. Егоров

РАЗРАБОТКА ПОЛЯРИЗАЦИОННОГО ФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО ИММУНОАНАЛИЗА ГЕРБИЦИДА 2,4,5-ТРИХЛОРФЕНОКСИУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

Московский университет им. М. В. Ломоносова, Институт химии Нижегородского университета

Постоянное и часто неразумное применение пестицидов в сельском хозяйстве стало одним из потенциальных источников загрязнения окружающей среды. В связи с возникшими экологическими проблемами перед аналитиками поставлена задача разработки экспрессных и экономичных методов определения остаточных количеств пестицидных экотоксикантов в почве, воде, пищевых продуктах и воздухе. Одним из путей ее решения в дополнение к уже существующим классическим физико-химическим методам является применение иммунохимических методов в аналитическую химию пестицидов [3].

Одним из представителей пестицидов типа арилоксиалкилкарбоновых кислот является гербицид 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная кислота (2,4,5-Т). В настоящее время этот эффективный гербицид снимается с массового производства, так как при его синтезе возможно образование примеси высокотоксичного 2,3,7,8-тетрахлоридобензо-*п*-диоксина. Несмотря на прекращение производства 2,4,5-Т в нашей стране, он все еще довольно широко используется для протравки зерновых, уничтожения кустарниковой и древесной растительности. Контроль остаточных количеств 2,4,5-Т в сельхозпродуктах, почве и воде представляет собой вполне актуальную задачу из-за того, что этот гербицид имеет низкую скорость разложения и обладает способностью накапливаться, например, в молоке лактирующих коров. По требованиям комиссии Европейского содружества должен проводиться постоянный контроль питьевой воды на содержание 2,4,5-Т.

Кроме классических хроматографических методов определения гербицидов, известен метод определения 2,4,5-Т в образцах почвы и воды с помощью жидкостной хроматографии, сочетающий ультрафиолетовую фотометрию и подтверждающую масс-спектрометрию с предварительной обработкой проб. Метод позволяет определять 12—80 нг 2,4,5-Т и других хлорсодержащих производных феноксиуксусной кислоты в 10 мкл очищенных экстрактов [6]. Разработан метод радиоиммунного анализа (РИА) гербицида 2,4,5-Т, который определяется совместно с гербицидом 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (2,4-Д) с пределом обнаружения 20 мкг/мл 2,4,5-Т [8]. Неизотопных иммунохимических методов определения 2,4,5-Т к настоящему времени не предложено. Сложность постановки метода РИА, требующего последующей идентификации содержимого проб средствами газовой хроматографии, и трудоемкость проведения процедуры определения 2,4,5-Т по методу жидкостной хроматографии стимули-

ровали разработку альтернативных иммунохимических методов определения этого гербицида.

К современным иммунохимическим тест-системам предъявляются следующие основные требования: простота выполнения, непродолжительность по времени постановки и низкая стоимость анализа. В настоящее время для гербицидов наиболее перспективными, по-видимому, являются методы на основе иммуноферментного анализа (ИФА) и поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (ПФИА). Метод ИФА для определения пестицидов впервые был описан Хаасом и Гардиа в 1968 г. [4] и к настоящему времени применяется для определения многих пестицидов всех типов, в том числе и 2,4-Д [5]. Однако для определения 2,4,5-Т этот метод не описан, что связано, вероятно, с недоступностью высокоспецифических антител по отношению к этому гербициду.

Метод ПФИА заключается в конкуренции определяемого вещества и меченного флуоресцентной меткой за связывание с ограниченным количеством антител. Метод основан на возрастании поляризации флуоресценции меченного флуоресцеином гербицида при его специфическом связывании с антителами [1]. Метод ПФИА довольно прост в постановке и заключается в добавлении аликвоты меченного флуоресцеином гаптена (трассера) к раствору антител, инкубации в течение нескольких минут и измерении поляризации флуоресценции. Ранее мы представили метод ПФИА для наиболее широко используемого гербицида — 2,4-Д [2].

Настоящее исследование посвящено получению специфических антител и разработке ПФИА гербицида 2,4,5-Т.

Методика. Для проведения синтеза и разработки метода анализа мы использовали химические реактивы отечественного (марки о.ч. и х.ч.) и импортного («Sigma») производства.

Поляризационный флуориметр. Для измерения поляризации флуоресценции мы использовали ТДх-анализатор фирмы «Abbott» (США). Исследования проводили в полуавтоматическом режиме по программе «Photo Check».

Буфер для анализа. Разведения трассера, антисыворотки и серии разведений калибровочных проб 2,4,5-Т готовили в 0,25 М боратном буфере рН 7,5—8,0 с добавлением 0,1 % азида натрия. Для его приготовления растворяли 0,95 г тетрабората натрия и 1 г азида натрия в 1 л дистиллированной воды.

Калибровочные пробы 2,4,5-Т. Растворы 2,4,5-Т готовили путем разбавления исходного раствора гербицида в метаноле (1 мг/мл) до конечных концентраций в буфере для анализа 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 50 и 100 мкг/мл.

Меченная флуоресцеином 2,4,5-Т (трассер). К раствору 4 мг (20 мкмоль) 2,4,5-Т в 1 мл диметилформамида добавляли 4 мг (40 мкмоль) N-гидроксисукцинимид и 16 мг (80 мкмоль) 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре 2 ч и добавляли 5 мг (10 мкмоль) этилендиаминфлуоресцеинтиокарбамата (EDF), полученного из флуоресцеинизотиоцианата и этилендиамина [7]. Реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч при комнатной температу-

ре, затем отгоняли в вакууме органический растворитель, остаток растворяли в 0,5 мл метанола и хроматографировали на пластинках «Силуфол» в системе хлороформ — метанол в отношении 4:1 (по объему). Собирали с пластинки основную желтую полосу с $R_f=0,6$ и экстрагировали меченную флуоресцеином 2,4,5-Т (2,4,5-Т-EDF) в 2 мл метанола. Для приготовления рабочей концентрации трассера 100 мкл полученного раствора 2,4,5-Т-EDF разбавляли 3 мл 0,01 М карбонатного буфера pH 9,6, после чего спектрофотометрически определяли концентрацию трассера при длине волны 492 нм и по коэффициенту экстинкции флуоресцеина $8,78 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [8]. Затем этот раствор для анализа разбавляли буфером для анализа до концентрации 10 нмоль/л.

Конъюгат 2,4,5-Т с гемоцианином, выделенным из тела моллюска (2,4,5-Т-KLN). К раствору 100 мг (0,4 ммоль) 2,4,5-Т в 1 мл диметилформамида добавляли 90 мг (0,8 ммоль) N-гидроксисукцинимид и 160 мг (0,8 ммоль) 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида. Реакционную смесь инкубировали при комнатной температуре 2 ч и добавляли по каплям при перемешивании к суспензии 53 мг KLN в 2 мл 0,01 М карбонатного буфера pH 9,6 и оставляли на ночь при 4 °С. Затем полученный иммуноген 2,4,5-Т-KLN диализовали в течение 2 дней в проточной водопроводной воде и лиофильно высушивали. Получили 47 мг вещества в виде серого порошка.

Конъюгат 2,4,5-Т с бычьим сывороточным альбумином (2,4,5-Т-БСА). Синтез и очистку конъюгата проводили аналогично описанному выше с использованием 270 мг БСА вместо 53 мг KLN.

Антисыворотка к 2,4,5-Т. Антитела к 2,4,5-Т получали иммунизацией 6 взрослых кроликов массой 2,5 кг конъюгатом 2,4,5-Т-KLN или 2,4,5-Т-БСА, вводя им подкожно в несколько точек вдоль позвоночника и внутримышечно в область микроузлов задних лап по 2 мг конъюгата в расчете на 1 кролика. Иммунизацию проводили 50 % эмульсией водного раствора конъюгата и полного адъюванта Фрейнда в течение 3 нед с интервалом 7 сут. Реиммунизацию осуществляли ежемесячно в течение 3 дней, вводя внутривенно по 1—1,5 мг конъюгата в 1 мл физиологического раствора. Через 7—9 дней после последней иммунизации отбирали кровь, отделяли сыворотку и методом поляризации флуоресценции определяли титр полученных антител при 50 % связывании

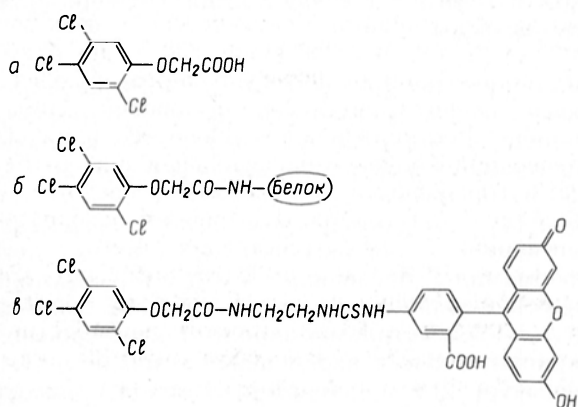


Рис. 1. Химическая структура гербицида 2,4,5-Т (а), конъюгата 2,4,5-Т с белком (б) и трассера 2,4,5-Т-EDF (в).

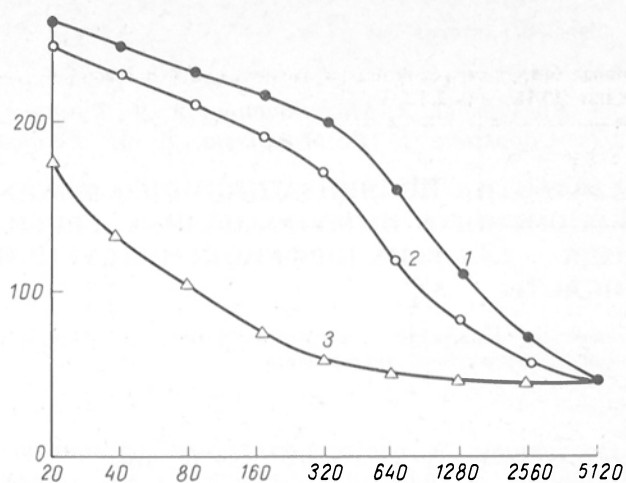


Рис. 2. Кривые разбавления антисыворотки к 2,4,5-Т, при иммунизации кроликов 2,4,5-Т-KLN (1) и 2,4,5-Т-БСА (2). Для сравнения также приведена кривая разбавления нормальной неиммунной сыворотки кролика (3).

По оси абсцисс — разведение антисыворотки; по оси ординат — поляризация флуоресценции, мР.

трассера. Для этого в 10 стеклянных кюветах готовили по 0,5 мл различных разведений антисыворотки в буфере для анализа (начиная с разведения 1:20) и добавляли к ним по 0,5 мл раствора трассера. В последнюю кювету, предназначенную для измерения поляризации флуоресценции от не связанного антителами трассера, вносили 0,5 мл буфера и 0,5 мл трассера. После этого кюветы устанавливали в специальную карусель и измеряли поляризацию флуоресценции. Антисыворотку с наилучшим титром (1:640), полученную от 1 из животных после 3-го кровопускания на 4-м месяце иммунизации конъюгатом 2,4,5-Т-KLN, использовали в разработке анализа, описанного ниже.

Методика анализа. В стеклянную кювету к 50 мкл анализируемой или калибровочной пробы добавляли 0,5 мл раствора 2,4,5-Т-EDF в концентрации 10 нмоль/л и 0,5 мл антисыворотки, разбавленной в соотношении 1:300 буфером для анализа. Загружали 10 кювет в карусель

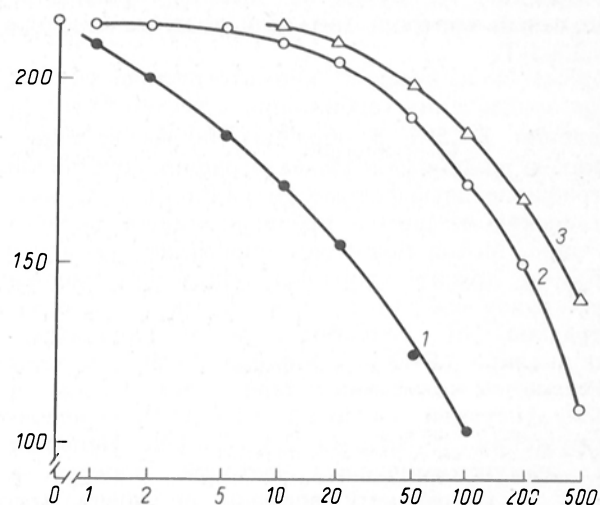


Рис. 3. Калибровочная кривая для ПФИА 2,4,5-Т (1) и перекрестные реакции с гербицидами 2,4-Д (3) и 2-метил-4-хлорофеноксиксусной кислоты (2).

По оси абсцисс — концентрация гербицида, мкг/мл; по оси ординат — поляризация флуоресценции, мР.

Таблица 1

Данные метрологической оценки точности разрабатываемой методики ПФИА для 2,4,5-Т

Концентрация 2,4,5-Т, мкг/мл	Число повторов	Среднее значение \pm стандартное отклонение	Относительное стандартное отклонение
1	9	$0,8 \pm 0,1$	0,28
2	10	$2,0 \pm 0,2$	0,24
5	10	$5,3 \pm 0,5$	0,08
20	4	$21,6 \pm 1,3$	0,11
50	4	$56,0 \pm 1,9$	0,06

для выполнения теста «Photo Check» на приборе TDx фирмы «Abbott» и измеряли поляризацию флуоресценции в автоматическом режиме.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 приведена химическая структура гербицида 2,4,5-Т, конъюгата 2,4,5-Т с белком и трассера 2,4,5-Т-EDF. Синтез конъюгата и трассера проводили в два этапа. На первом этапе активировали карбоксильную группу гербицида с помощью N-гидроксисукцинимиды и дициклогексилкарбодиимиды. На втором этапе такое промежуточное соединение гербицида с активированной карбоксильной группой реагировало с аминокислотой либо белка при синтезе конъюгата, либо производного флуоресценции при синтезе трассера. В свою очередь введение аминокислоты в флуоресцентную молекулу осуществляли обработкой флуоресцеинизотиоцианата раствором этилендиамина.

Скрининговое обследование антисывороток иммунизированных кроликов методом поляризации флуоресценции с помощью синтезированного нами трассера позволило выбрать в качестве донора антител одного из подопытных животных. Первым этапом работы стало определение титра имеющихся поликлональных антител. Количественно титр определялся как разведение раствора антител, при котором наблюдается 50 % связывание трассера. Было установлено, что все подопытные кролики дают антисыворотки, титр которых возрастает с увеличением циклов иммунизации и остается постоянным после 3—4 циклов иммунизации. Титр антисывороток от кроликов, иммунизированных 2,4,5-Т-КЛН (1:640), был достоверно выше, чем иммунизированных 2,4,5-Т-БСА (1:320).

Таблица 2

Перекрестные реакции (в %) различных феноксилифатических кислот при определении 2,4,5-Т и (для сравнения) 2,4-Д [2] методом ПФИА

Соединение	2,4-Д [2]	2,4,5-Т
2,4-Д	100	5,6
2,4,5-Т	59	100
4-(2,4-Дихлорфенокси)масляная кислота	41	15,2
4-(2-Метил-4-хлорфенокси)масляная кислота	12	21,3
2-Хлорфеноксиуксусная кислота	7,7	2,4
2-Метил-4-хлорфеноксиуксусная кислота	7,2	9,3
2-Метил-4,6-дихлорфеноксиуксусная кислота	2,6	4,0
2-(2,4-Дихлорфенокси)пропионовая кислота	2,5	5,4
2-(2-Метил-4-хлорфенокси)пропионовая кислота	1,0	5,0
2-Метилфеноксиуксусная кислота	1,0	4,0
2-Метил-6-хлорфеноксиуксусная кислота	1,0	3,6

Кривые титрования антисывороток и сыворотки нормального неиммунизированного кролика показаны на рис. 2.

При проведении оптимизации метода определения 2,4,5-Т мы варьировали степень разведения антисыворотки. С целью выбора рабочего разведения антисыворотки в кювету с 50 мкл раствора 2,4,5-Т известной концентрации приливали по 0,5 мл раствора трассера в оптимальном разведении и растворы иммунной сыворотки в разведениях 1:300. Для постановки анализа мы использовали целую антисыворотку, так как результаты анализа с использованием очищенной иммуноглобулиновой фракции антител дают практически идентичные результаты. Для проведения анализа мы брали 50 мкл образца, что обеспечивало достаточную чувствительность и широкий диапазон определяемых концентраций 2,4,5-Т.

Калибровочный график ПФИА 2,4,5-Т показан на рис. 3. Разработанный метод анализа позволяет определять гербицид без предварительной стадии инкубации, так как равновесие в системе устанавливается практически сразу при смешивании реагентов. Поляризационный флуориметр TDx фирмы «Abbott» (США) позволяет определять по программе «Photo Check» в автоматическом режиме до 10 образцов одновременно. Общее время определения 10 образцов составляет около 7 мин.

Выполнив 10 повторных измерений нулевого стандарта и используя метод расчета Родбарда [9] при 99 % уровне достоверности, мы нашли, что минимальная определяемая концентрация 2,4,5-Т составила 0,5 мкг/мл. Объем образца для анализа составляет 50 мкл, и поэтому методом ПФИА можно определить 25 нг гербицида в пробе, т. е. по чувствительности определения данный метод превосходит метод жидкостной хроматографии [2] и РИА [8].

Качество разрабатываемой нами тест-системы устанавливали проверкой градуировочной кривой на воспроизводимость. Данные метрологической оценки определения гербицида 2,4,5-Т методом ПФИА представлены в табл. 1. Определение точности метода проводили в течение 3 дней в двух повторностях. Погрешность воспроизводимости анализа для значений концентраций градуировочного графика не превышает 0,05.

Оценку специфичности метода определяли по перекрестной активности структурно-подобных соединений — феноксилифатических кислот — и выражали в процентах перекрестной реакции, определяемой как произведение 100 % на отношение концентрации перекрестно-реагирующего вещества к концентрации 2,4,5-Т, дающих одинаковые значения поляризации флуоресценции на калибровочной кривой. Сравнительная оценка перекрестной активности исследованных соединений дана на рис. 3 и в табл. 2. Процент перекрестной реакции с 2,4-Д составлял всего 5,6, тогда как в ПФИА для определения 2,4-Д [2] перекрестная реакция с 2,4,5-Т была на порядок выше и составляла 56 %. Процент перекрестной реакции с 2-хлорфеноксиуксусной кислотой составил 2,4 %, с феноксиуксусной кислотой — менее 0,1 %, т. е. по мере удаления атомов хлора из бензольного кольца значительно уменьшается связывание 2,4,5-Т с антителами. Процент перекрестных реакций разработанного метода ПФИА с

другими гербицидами ряда феноксиацетических кислот невысокий, и их присутствие в образцах не влияет на точность определения 2,4,5-Т методом ПФИА. Данные табл. 2 свидетельствуют об очень высокой специфичности разработанной нами аналитической системы для определения гербицида 2,4,5-Т.

Таким образом, нами разработан метод определения остаточных количеств широко используемого гербицида 2,4,5-Т. Методика проста в исполнении, точна, специфична и позволяет произвести сканирование 10 подготовленных проб оператором невысокой квалификации в течение примерно 7 мин. В заключение следует отметить, что разработанный метод ПФИА очень быстрый и надежный. Он может быть использован для массового экспресс-контроля концентрации 2,4,5-Т в сточных водах или в экстрактах из различных источников для целей охраны окружающей среды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бекбергенев Б. М., Житников В. Г. // Антибиотики.— 1988.— № 5.— С. 72—76.
2. Еремин С. А., Морева И. Ю., Дзантиев Б. Б. и др. // Вopr. мед. химии.— 1991.— № 6.— С. 93—95.
3. Коростылева Е. А., Мельниченко О. А., Туманов А. А. // Журн. аналит. химии.— 1991.— Т. 46, № 12.— С. 2314—2324.

СОДЕРЖАНИЕ

Обзор

Тиунов Л. А., Соколовский В. В., Костюшов Е. В. Биохимические механизмы развития токсического отека легких при действии диоксида азота

Экспериментальные исследования

Панин Л. Е., Усынин И. Ф., Харьковский А. В., Трубицына О. М. Роль клеток Купфера в регуляции биосинтеза белка в гепатоцитах

Васильева С. М., Муляво Н. А., Донченко Г. В. Изучение динамики репарации повреждений ДНК, вызванных N-метил-N-нитрозомочевинной в условиях активированного биосинтеза НАД в печени крыс

Медведев А. Е., Труфанова Л. В., Кулинский В. И. Роль внутренней мембраны митохондрий в механизме активации НАД-изоцитратдегидрогеназы катехоламинами

Свечников К. В., Бусыгина Т. В., Осадчук А. В. Определение метаболизма стероидных гормонов и активности ферментов их синтеза в клетках Лейдига мышей методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Ефимова М. Г. О роли иона железа в регуляции активности альдозоредуктазы в коре головного мозга и сетчатке здоровых крыс и крыс с наследственной дегенерацией сетчатки

Горошинская И. А., Виноградов А. Ю., Лукаш А. И. Влияние пипразидола на содержание молекул средней массы при разных режимах гипобарической гипоксии

Аманов К., Мамадиев М., Хужамбердиев М. А., Горкин В. З. Особенности биохимического действия параквата на процессы окислительного дезаминирования биогенных аминов и других азотистых соединений

Лукаш А. И., Горошинская И. А., Виноградов А. Ю. Хемилюминесцентный анализ и некоторые показатели азотистого катаболизма в плазме крови крыс при гипоксии с последующей гипероксией

4. Haas G. J., Guardia E. J. // Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.).— 1968.— Vol. 129, N 2.— P. 546—551.
5. Hall J. C., Deschamps R. J. A., Krieg K. K. // J. Agric. Food Chem.— 1989.— Vol. 37.— P. 981—984.
6. Kim I. S., Sasinos F. I., Stephens R. D. et al. // Analyt. Chem.— 1991.— Vol. 63.— P. 819—823.
7. Pourfarzaneh M., White G. W., Landon J., Smith D. S. // Clin. Chem.— 1980.— Vol. 26.— P. 730—733.
8. Rinder D. F., Fleeker J. R. // Bull. environ. Contam. Toxicol.— 1981.— Vol. 26.— P. 375—380.
9. Rodbard D. // Analyt. Biochem.— 1976.— Vol. 90.— P. 1—12.

Поступила 02.06.93

POLARISATION FLUORESCENT IMMUNOASSAY OF HERBICIDE 2,4,5-TRICHLOROPHENOXY ACETIC ACID

S. A. Eremin, O. A. Melnichenko, A. A. Tumanov, N. V. Sorokina, E. V. Molokova, A. M. Egorov

M. V. Lomonosov State University, Moscow; Institute of Chemistry, State University, Nizhni Novgorod.

Immunoreagents were produced and a polarographic fluorescent immunoassay was developed for estimation of residual content of widely used herbicide 2,4,5-trichlorophenoxy acetic acid. The procedure is simple, accurate, specific and allowed one to measure 10 preparations within 7 min. The sample volume was 50 µl and the minimal content of the substance estimated was 0.5 µg/ml. This procedure may be used in screening quick tests of the herbicide concentration in sewage or in extracts from various sources.

CONTENTS

Review of Literature

Tiunov, L. A., Sokolovsky, V. V., Kostyushov, E. V. Biochemical aspects of toxic edema development in the lung tissue caused by nitrogen dioxide

Experimental Studies

Panin, L. E., Usynin, I. F., Kharkovsky, A. V., Trubitsina, O. M. Role of Kupffer cells in regulation of protein synthesis in hepatocytes

Vasilyeva, S. M., Mulyavko, N. A., Donchenko, G. V. The dynamics of DNA breaks repair after N-methyl-N-nitrosourea treatment carried out in simultaneous stimulation of NAD biosynthesis in rat liver tissue

Medvedev, A. E., Trufanova, L. V., Kulinsky, V. I. Role of inner mitochondrial membrane in catecholamine-dependent activation of NAD-isocitrate dehydrogenase

Svechnikov, K. V., Busygina, T. V., Osadchuk, A. V. Metabolism of steroid hormones and activity of some enzymes involved in their synthesis evaluated in mouse Leydig cells by means of HPLC

Efimova, M. G. The role of ferrum ion in regulation of aldose reductase activity in rat brain cortex and retina in health and in hereditary retina degeneration

Goroshinskaya, I. A., Vinogradov, A. Yu., Lukash, A. I. Effect of pyrazidol on content of middle mass molecules in blood plasma of rats under various conditions of hypobaric hypoxia

Amanov, K., Mamadiev, M., Khuzhamberdiev, M. A., Gorokin, V. Z. Peculiarities of the biochemical effects of paraquat on oxydative deamination of biogenic amines and some other nitrogenous compounds

Lukash, A. I., Goroshinskaya, I. A., Vinogradov, A. Yu. Chemiluminescent analysis and some parameters of nitrogen catabolism in blood plasma under hypoxic conditions and subsequent hyperoxia