

ТОМ 40

ВЫПУСК 6

НОЯБРЬ — ДЕКАБРЬ

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. ЛОК-  
ШИНА, В. Н. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАНЧЕНКО, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ,  
Ю. А. РОМАКОВ, В. А. САКС, В. Б. СПИРИЧЕВ, Е. А. СТРОЕВ

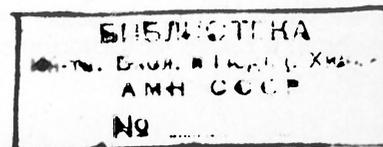
## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

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

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



МОСКВА • МЕДИЦИНА • 1994



# МАТЕРИАЛЫ СИМПОЗИУМА “ПУТИ ПЕРЕДАЧИ ВНЕКЛЕТОЧНОГО СИГНАЛА”, ЗВЕНИГОРОД (17 — 19 МАЯ 1993 Г.)

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 582.28-119:581.17].08

Т. А. Белозерская, В. Ю. Соколовский, М. С. Крицкий

## ЦИКЛИЧЕСКИЕ НУКЛЕОТИДЫ И МЕМБРАН- НЫЙ ЭЛЕКТРОГЕНЕЗ В ЯВЛЕНИЯХ КЛЕТОЧ- НОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ У *NEUROSPORA* *CRASSA*

Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, Москва

Низшие эукариоты совмещают относительную простоту организации, проявляющуюся в относительно малом объеме генома и значительно меньшем по сравнению с высшими организмами количестве клеточных типов, с морфологическими и биохимическими свойствами типичной эукариотической клетки. Это делает их заманчивыми объектами для исследования ряда проблем клеточной регуляции, в том числе в ходе индивидуального развития.

В широком смысле исследование данных моделей важно для выяснения общих физико-химических принципов формирования рецепторным аппаратом информационного сигнала. При этом интересно сопоставить применимость к низшим эукариотическим моделям представлений, сложившихся, как правило, при исследовании организмов с более высоким уровнем организации. Однако исследователь неизбежно сталкивается и с рядом специфических вопросов, обусловленных морфологическими особенностями низших эукариот и соответствием их физиологии определенным экологическим нишам. В случае грибных организмов такие вопросы связаны, например, с уникальной клеточной организацией вегетативного мицелия. Другой особенностью грибов служит их способность извлекать информацию, обуславливающую дифференцировку клеток, из таких, казалось бы, неспецифических внешних стимулов, как изменения концентрации питательных субстратов или режима освещения.

В основу данной статьи положены результаты проводившихся в нашей группе исследований дифференцировочных и адаптационных явлений у *Neurospora crassa*. Благодаря хорошей биохимической и генетической изученности этот организм можно рассматривать как информативную модель для изучения физико-химической организации грибных, а в некоторых отношениях и вообще низших, эукариотических клеток. Целью работы был анализ регуляторных механизмов, участвующих во взаимодействии “клеток” в составе мицелия, а также механизмов, опосредующих процессы клеточной дифференцировки при формировании репродуктивных структур.

В работе использовали штаммы *N. crassa*, любезно предоставленные Fungal Genetics Stock Center, Канзас Сити, США. Методика культивирования организмов, а также их биохимического и электрофизиологического исследования изложена в наших публикациях [1, 12, 13, 16].

Электрофизиологическая дифференцировка “клеток” гифы

Вегетативный мицелий грибов, обеспечивающий поглощение из среды питательных субстратов и их распространение по организму, представляет в морфологическом отношении систему ветвящихся гиф, внутренняя полость которых у высших грибов (в том числе у аскомицета *crassa*) разделена перегородками, септами. Размер межсептальных пространств, “клеток”, входящих в состав гифы *N. crassa*, составляет 10—200×10—20 мкм. В каждой септе, разделяющей “клетки”, имеется пора с регулируемой проницаемостью. Площадь гидрофильного сечения поры составляет 0,03—0,06 мкм<sup>2</sup>, т. е. превышает соответствующую величину для большинства проницаемых межклеточных контактов животных [6]. Микроскопические исследования указывают на то, что закупоривающая пору пробка имеет белковую природу.

Известно, что гифы мицелия, если не принимать во внимание их ветвление, морфологически достаточно однородны. В то же время оказалось, что с помощью электрофизиологического анализа удастся выявить наличие значительных функциональных различий между “клетками”. При этом могут возникать своеобразное разделение функций и физиологическая кооперация между отдельными зонами гифы.

Используя стандартные присмы микроэлектродного анализа с внутриклеточным отведением, в “клетках” мицелия определяли следующие параметры: мембранный потенциал ( $E_m$ ), входное сопротивление ( $R_i$ ) и коэффициент электрической связи между “клетками” ( $K_{ec}$ ).

“Клетки” гифы проявляют значительное разнообразие электрофизиологических показателей, особенно величин  $E_m$ . При этом различие значений  $E_m$  для соседних “клеток” может достигать 50—100 мВ. Наблюдается также большое разнообразие величин  $K_{ec}$ , рассчитанных для отдельных внутригифальных участков гифы, разделенных септами. Эти величины колеблются от 0 до 1. Такая вариабельность данного параметра указывает на то, что септированную гифу можно рассматривать как своеобразный ансамбль, между “клетками” которого поддерживается регулируемое межклеточное электрическое взаимодействие. При этом между “клетками” гифы в одних случаях может устанавливаться электрическая коммуникация, приводящая к формированию единых ансамблей, а в других — возникать полная изоляция отдельной клетки [6].

Выявлены мутанты *N. crassa*, у которых нарушено нормальное проявление электрических свойств клеточной мембраны. Повреждение генов может сказаться не только на величине мембранного по-

тснциала или входного сопротивления мембраны, но и на электрическом взаимодействии между "клетками". Так, у мутанта white collar-1 (wc-1) усредненная величина  $K_{cc}$  в мицелии составляет  $0,4 \pm 0,2$  вместо  $0,7 \pm 0,2$ , что может указывать на большее количество закрытых септальных пор [6]. В плане истолкования молекулярных предпосылок этого факта может быть интересно то обстоятельство, что одним из известных свойств данного мутанта является нарушение в системе фосфорилирования белков [11].

Энергетическое взаимодействие "клеток" в апикальной зоне растущей гифы

Возникает вопрос: в чем заключается физиологическое значение регулируемого межклеточного взаимодействия между "клетками" или зонами мицелиальной гифы? Попытаться ответить на этот вопрос можно, проанализировав ситуацию, складывающуюся в апикальном участке растущей гифы.

У *N. crassa*, как и у других грибов, разность электрических потенциалов на плазматической мембране формируется в основном за счет работы протонной АТФазы. Суммарная величина  $E_m$  может составлять 200—250 мВ. Она складывается из диффузионной калиевой компоненты (около 50 мВ) и энергозависимой  $H^+$ -АТФазной компоненты, которая достигает 200 мВ [15]. Активное функционирование  $H^+$ -АТФазы, приводящее к выбросу из клетки протонов и созданию протонных градиентов, обеспечивающих по существу все транспортные потребности мицелиальных гиф, приводит к потреблению до 50% образующейся в клетке АТФ [15]. Тем самым в условиях растущей клетки, активно использующей макроэргические связи для реакций синтеза, возможно возникновение дефицита АТФ.

Величина  $E_m$  в апикальных участках гифы ниже, чем в более старых, вследствие чего вдоль гифы формируется градиент  $E_m$ , определяющий ток протона из более зрелых участков в растущую зону [6,9]. Апикальная "клетка" растущей гифы всегда деполаризована по отношению к проксимальным клеткам на расстоянии 400—500 мкм: величина ее  $E_m$  всегда на 1—30 мВ ниже, чем у "клеток", удаленных от конца гифы на 3—4 межсептальных участка. Между этими "клетками" в норме поддерживается устойчивая электрическая связь: значение  $K_{cc}$  между межсептальными участками составляет 0,65—0,85 [13]. Существующий на мембране апикальной "клетки" потенциал поддерживается на уровне 130—150 мВ лишь в том случае, если электрическая связь между клетками не прервана. В случае ее прекращения вследствие закрытия септальных пор после механического повреждения гифы или электрического шока величина  $E_m$  в апикальной "клетке" падает до 40—50 мВ, т. е. до уровня диффузионного калиевого потенциала, что указывает на отсутствие в ней функционально активного протонного насоса [13].

Таким образом, достаточно высокий уровень  $E_m$  на плазмолемме апикальной клетки может поддерживаться лишь при связи с энергетическим источником, удаленным на несколько сот микрометров от точки роста. Есть основание думать, что способность апикальной "клетки" поддерживать надлежащий уровень  $E_m$  за счет более старых участков гифы связана, по-видимому, именно с наличием эффективной электрической коммуникации клеток. Диф-

фузия АТФ из этих "клеток" в зону роста гораздо менее эффективна [2]. Вероятно, подобная функциональная дифференциация в составе гифы, обуславливающая энергетическую подпитку растущей "клетки" ее более зрелыми партнерами, позволяет избежать в зоне роста конкуренции за АТФ между транспортными и синтетическими процессами. Учитывая электрофизиологическую неоднородность зрелых участков гифы, можно полагать, что в определенных физиологических ситуациях в них также может устанавливаться подобное разделение функций между дифференцированными "клетками".

Фотоиндуцированная экспрессия генов и ее регуляторы

Формирование на грибом мицелии репродуктивных структур может рассматриваться как пример истинной дифференцировки клеток, сопряженной со специфическим изменением набора экспрессируемых генов и формированием клеток принципиально иного типа. У *N. crassa* дифференцировка и выбор между типом формируемой репродуктивной структуры определяются доступностью углеродных или азотных субстратов: голодание по углероду приводит к развитию по бесполому пути и образованию конидий, а исчерпание азотных источников — к формированию женских половых структур протоперитециев [14].

В обоих случаях развитие регулируется освещением. При определенных условиях освещение вызывает экспрессию генов без видимых морфологических изменений клеток. В ответ на освещение среди более 80 генов экспрессируются также гены каротиногенеза (albino-1, albino-2 и albino-3), кодирующие участок биосинтетической цепи от синтеза геранилгеранилпирофосфата и до образования фитофлюина из фитоина [8]. Накопление окрашенных пигментов, преимущественно конечного продукта биосинтеза —  $C_{35}$ -апокаротиновой кислоты, нейроспораксантина, служит удобным тестом на функционирование фотоиндукционного механизма. Данная система фотоиндукции служит хорошей моделью для исследования регуляции генной экспрессии при дифференцировке. Природа фоторецепторного пигмента, контролирующего индукционный процесс, пока не установлена. Есть серьезные основания полагать, что в основе фоторецепции у *N. crassa*, как и при функционировании сходных рецепторов у ряда других организмов, лежит возбуждение флавинового хромофора [7].

Возникает вопрос: какие системы клетки участвуют в передаче сигнала от фоторецептора к геному? В данной работе суммированы данные, полученные при анализе причастности к этому процессу двух компонентов внутриклеточной регуляторной системы: циклических нуклеотидов и электрогенного механизма плазматической мембраны.

цАМФ — вероятный участник трансдукции сигнала от фоторецептора к геному

Существуют данные, позволяющие судить о причастности цАМФ к информационному каналу, посредством которого свет контролирует экспрессию генов у *N. crassa*.

В темноте, т. е. в конститутивных условиях, у мутантов *N. crassa* с пониженным вследствие нару-

шения синтеза уровнем цАМФ происходит более интенсивное накопление каротиноидных пигментов, чем в клетках дикого типа. У двойного мутанта, несущего в геноме поврежденный ген аденилатциклазы *crisp-1* и *leaky* — мутацию одного из генов каротиногенеза *albino-3*, наблюдается частичное исправление нарушенной функции данного гена, что регистрируется по увеличению синтеза пигментов [3].

После освещения, в ходе лаг-периода фотоиндукции, концентрация цАМФ в клетке снижается. При этом величина снижения коррелирует с интенсивностью последующего накопления каротиноидов [10]. Параллельно с этим в освещенных клетках наблюдается повышение фосфодиэстеразной активности. Фотоактивацию этого фермента удается воспроизвести и в условиях *in vitro* [4].

Ингибитор фосфодиэстеразы 3-изобутил-1-метилксантин, как и высокая ( $>10^{-3}$  М) внеклеточная концентрация цАМФ, подавляет накопление каротиноидов в ответ на освещение [5]. В условиях фотоиндукции, проведенной на фоне высокой внешней концентрации цАМФ, резко снижается количество транскриптов генов *albino-1* и *albino-2*, накапливающихся в освещенных клетках.

Совокупность этих наблюдений позволяет рассматривать цАМФ как вероятный посредник в цепи передачи сигнала от фоторецептора к геному. Результаты исследования ряда мутантов *N. crassa* указывают на причастность к этой цепи протеинкиназы А и энзиматического дефосфорилирования регуляторных белков [11]. Можно заключить, что цАМФ выполняет функцию негативного регулятора генов каротиногенеза, а возбуждение фоторецептора приводит к снижению его уровня и снятию репрессии с генов. Циклический ГМФ, по всей вероятности, не принимает прямого участия в этом механизме регуляции [3].

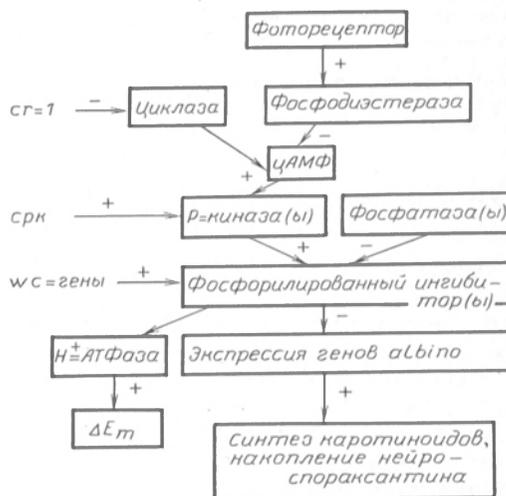
Механизмы мембранного электрогенеза не участвуют в передаче фоторецепторного сигнала на геном

Постановка вопроса о возможной причастности процессов, определяющих выброс протона и электрогенез плазматической мембраны *N. crassa*, продиктована следующими обстоятельствами. Мы установили, что освещение светом сине-фиолетовой области спектра, т.е. в зоне чувствительности фоторецепторного механизма, контролирующего экспрессию генов и процессы развития у *N. crassa*, приводит к сильной (до 50 мВ) транзитивной гиперполяризации плазматической мембраны, следующей за также транзитивным повышением величины входного сопротивления [12]. Оба эти процесса развиваются в ходе лаг-периода фотоиндукции.

Гиперполяризация, связанная с "метаболической", т.е.  $H^+$ -АТФазной компонентой мембранного потенциала, возможно, находится, как и индукция генов, под контролем цАМФ [1]. Более того, как и все известные физиологические и дифференцировочные ответы *N. crassa* на свет, она подконтрольна продукту гена *white collar-1*, функция которого также проявляется в нарушении дефосфорилирования одного из клеточных белков после освещения [11]. Таким образом, складывалось впечатление о тесном взаимодействии системы мембранного электрогенеза с регуляторным механизмом, опосредующим фотоиндукцию генов.

Для проверки возможной связи фотоиндуцированных изменений в системе электрогенеза с механизмом, опосредующим экспрессию генов, были исследованы мутанты *N. crassa* с нарушенными параметрами электрогенеза. Значения  $E_m$  и  $R_i$  у упомянутых выше мутантов по генам биосинтетической цепи каротиногенеза группы *albino* не обнаруживают изменений после освещения. Однако их клетки сохраняют способность к фотоиндуцированной экспрессии генов. Эту способность удается зарегистрировать и по ферментативной активности белковых продуктов генов [8]. На сохранение способности к фотоиндукции генов у данных мутантов указывает также количественная оценка накопления транскриптов соответствующих генов с помощью методов генной инженерии. Так, освещение стимулирует накопление транскриптов гена *albino-1* в клетках дикого типа в 13 раз. В клетках мутанта *albino-1* транскрипция этого гена также возрастает в 13 раз, однако транскрипт функционально неактивен. Для сравнения укажем, что у мутанта по гену *white collar-1*, контролирующего сигнальную трансдукцию от фоторецептора на геном, активации экспрессии указанных генов при освещении практически не происходит.

Таким образом, регистрируемые на плазматической мембране изменения электрогенеза в ответ на освещение не являются необходимой предпосылкой генной экспрессии, контролируемой общим фоторецепторным механизмом. В основе фоторегуляторного механизма лежит функционирование рецепторного аппарата, контролирующего две группы событий: экспрессию генов (в том числе генов каротиногенеза) и электрогенез плазматической мембраны (см. схему). В свете приведенных выше данных можно полагать, что функциональный смысл этих изменений связан с активацией транспортных механизмов гифы и синхронизацией этих функций в ее отдельных "клетках" при фотоиндуцированных процессах дифференцировки.



Последовательность событий при функционировании фоторецепторного механизма *Neurospora crassa*. Знаками "плюс" помечены стимулирующие эффекты, знаками "минус" — ингибирующие.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Белозерская Т.А., Крицкий М.С., Левина Н.Н. и др. // Биол. мембраны. — 1988. — Т. 5. — С. 1081—1089.
2. Потапова Т.В., Асланиди К.Б., Чайлахян Л.М. // Там же. — Т. 5. — С. 613—627.

3. Соколовский В.Ю., Крицкий М.С., Белозерская Т.А., Чернышева Е.К. // Приклад. биохим. микробиол. — 1983. — Т. 19. — С. 176—181.
4. Соколовский В.Ю., Крицкий М.С. // Докл. АН СССР. — Т. 282. — С. 1017—1020.
5. Соколовский В.Ю. Циклические нуклеотиды в регуляции фотоиндуцированного каротиногенеза у *Neurospora crassa*. Дис. ... канд. — М., 1987.
6. Belozerskaya T.A., Potapova T.V. // Exp. Mycol. — 1993. — Vol. 17. — P. 157—169.
7. Galland P., Senger H. // J. Photochem. Photobiol. B. Biol. — 1988. — Vol. 1. — P. 277—294.
8. Harding R.W., Turner R.V. // Plant Physiol. — 1981. — Vol. 68. — P. 745—749.
9. Harold F.M., Caldwell J.H. // Tip Growth in Plant and Fungal Cells. — San Diego, 1990. — P. 59—90.
10. Kritsky M.S., Sokolovsky V.Yu., Belozerskaya T.A., Chernysheva E.K. // Arch. Microbiol. — 1982. — Vol. 133. — P. 206—209.
11. Lauter F.R., Russo V. // J. Photochem. Photobiol. B. Biol. — 1990. — Vol. 5. — P. 95—103.
12. Potapova T.V., Levina N.N., Belozerskaya T.A. et al. // Arch. Microbiol. — 1984. — Vol. 137. — P. 262—265.
13. Potapova T.V., Aslanidi K.B., Belozerskaya T.A. et al. // FEBS Lett. — 1988. — Vol. 24. — P. 173—176.
14. Russo V.E.A., Paridit N.N. // Development — The Molecular Genetic Approach. — Berlin, 1992. — P. 88—102.
15. Slayman C.L. // J. Bioenerg. Biomembr. — 1987. — Vol. 19. — P. 1—20.
16. Sokolovsky V.Yu., Lauter F.-R., Muller-Rober B. et al. // J. gen. Microbiol. — 1992. — Vol. 138. — P. 2045—2049.

Поступила 17.03.94

#### CYCLIC NUCLEOTIDES AND MEMBRANE ELECTROGENESIS IN THE CELL DIFFERENTIATION OF NEUROSPORA CRASSA

T.A. Belozerskaya, V.Yu. Sokolovsky, M.S. Kritsky

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

Significance of membrane electrogenic system and cyclic nucleotides for developmental regulation in lower eukaryotes was studied in *Neurospora crassa*. Despite of their morphological uniformity, hyphal cells were differentiated by their electrophysiological parameters — membrane potential and input resistance. The cells maintained regulated electric communication through septal pores. Such electric communication allowed the apical "cell" to compensate the energy requirements for membrane transport by means of the electrogenic mechanism of proximal zone. The photoinduced gene expression related to differentiation of reproductive structures has been shown to be mediated via cAMP. The changes of electric parameters observed in illuminated hyphal cells were controlled by the same photoregulation mechanism but were not involved in direct control of photoinduced gene expression.

© М.Л. КАКУШКИНА, 1994

УДК 612.015.32:547.915].08.

М.Л. Какушкина

#### РОЛЬ ФАЗОВОГО СОСТОЯНИЯ МЕМБРАННЫХ ЛИПИДОВ, СОПРЯЖЕННОГО С ПЕРЕДАЧЕЙ ВНЕКЛЕТОЧНОГО СИГНАЛА

Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова

Общепризнано, что липидный бислои биологических мембран является неспецифическим фактором регуляции метаболизма при действии внешних сигналов. Интенсивно изучаются межмолекулярные взаимодействия на липидных мембранах, способы упаковки молекул в бислое — жидком кристалле и мезоморфные фазовые превращения липидов, что нашло отражение в литературе. Заслуживает интерес обнаружение каналов проницаемости при фазовых переходах гель — жидкий кристалл, индуциро-

ванных как температурой, так и агентами, влияющими на расположение полярных групп липидов [1]. Существует мнение, что изменения фазовых свойств липидов и проницаемости бислоя могут сопровождать отдельные химические реакции, локализованные на поверхностях раздела [12, 13]. Эти факты имеют непосредственное отношение к проблеме клеточной сигнализации, потому что формирование ионных потоков является одним из эффективных способов передачи информации в живых клетках. Однако в литературе дискутируется вопрос о влиянии текучести мембран на свойства основных транспортных механизмов: подчеркивается зависимость переноса ионов от температурных характеристик диссоциации буферных систем клеток [5]. В плане развития вопроса о значении фазового состояния и проницаемости липидных мембран для передачи внеклеточного сигнала в данной работе описываются результаты исследования температурных характеристик переноса ионов в сравнительном аспекте при использовании моделей разного уровня организации: липосом, эритроцитов, перфузируемой печени.

**Методика.** Липосомы готовили из тионфосфатидной кислоты (синтезирована в лаборатории проф. Д.А. Предводителя, РГПУ). 10—20 мг липида помещали в 1 мл раствора следующего состава: 250 мМ NaCl, 10 мл боратного буфера pH 9,2 и озвучивали 15 мин при 22 кГц. Озвученную суспензию инкубировали 30 мин при комнатной температуре, затем диализовали при температуре выше фазового перехода (60—70°C) 3 раза по 30 мин против 250 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 6,86 (фосфатный буфер). Перенос ионов Cl<sup>-</sup> измеряли селективным электродом в специальной терморегулируемой ячейке.

Эритроциты человека, отмытые от плазмы физиологическим раствором, помещали в термостатируемую ячейку, содержащую незабуференный раствор сахарозы изотонической концентрации; разведение суспензии клеток 1%. Перенос калия через мембрану эритроцитов измеряли после добавления валиномицина K<sup>+</sup>-селективным электродом ЭМК-01, одновременно контролировали изменение pH среды, содержащей клетки. Электроды калибровали перед каждым измерением при фиксированной температуре.

Печень белых крыс перфузировали по разомкнутой схеме через портальную вену солевой сбалансированной средой по Кребсу—Хиншлайту (концентрация калия в среде 1,2 мМ) при одновременной оксигенации карбогеном. Отток перфузата осуществляли через нижнюю полую вену, на выходе из которой размещали камеру с электродными датчиками для регистрации рК, pH и скорости потребления кислорода. Орган и камера с электродными датчиками имели автономные системы термостатирования. Эксперимент начинали после 30—40 мин адаптационного периода после операции.

**Результаты и обсуждение.** В первой серии экспериментов изучали температурную зависимость переноса хлора через мембраны липосом. Результаты одного из типичных опытов этой серии представлены на рис. 1. Как видно, постепенное охлаждение суспензии липосом со скоростью 3—5°C в 1 мин вызывало увеличение измеряемого иона в среде. Температура в момент начала переноса ионов из липосом составляла 49±0,9°C и совпадала с температурой фазового перехода этого же образца липида, измеренной методом дифференциальной

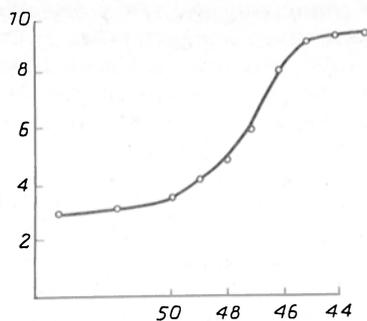


Рис. 1. Температурная зависимость потери хлора липосомами, сформированными из тионфосфатидной кислоты.

По оси абсцисс — температура, °С; по оси ординат — концентрация хлора во внешней среде, мм.

сканирующей калориметрии. Описанные опыты подтвердили имеющиеся данные об изменении проницаемости липидного бислоя в зоне фазового перехода [1, 6]. Следует отметить, что в данных опытах проницаемость липосом контролировали в условиях значительного градиента измеряемого иона. В соответствии с методом формирования везикул на мембране мог возникнуть также градиент рН и градиент поверхностного заряда.

Следующая серия экспериментов была посвящена изучению температурных характеристик валиномицининдуцированного транспорта ионов  $K^+$  через мембрану эритроцитов. Известно, что валиномицин переносит ионы калия в совокупности с работой других транспортных систем клеток, не исключен

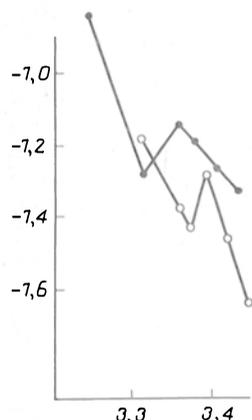


Рис. 2. Температурная зависимость скорости потери калия эритроцитами человека, обработанными валиномицином ( $10^{-6}M$ ) после уравнивания в изотоническом незабуферном растворе сахарозы (результаты двух опытов).

По оси абсцисс — обратная величина абсолютной температуры  $\cdot 10^{-3}$ ; по оси ординат — логарифм скорости выхода калия, выраженный в ммоль/л.к.л. воды в 1 мин.

одновременный перенос протона с помощью кислых липидов [4], а также анионный обмен  $Cl^-—OH^-$  согласно бикарбонатному циклу. Перенос калия через мембрану эритроцитов в сахарозную среду сопровождается интенсивным подщелачиванием этой среды.

Зависимость валиномицининдуцированного переноса калия через мембрану эритроцитов от температуры представлена на рис. 2 в координатах Аррениуса. Так, в области  $24—27^\circ C$  происходит нарушение монотонного характера изменения скорости переноса калия с повышением температуры. Скорость подщелачивания среды изменялась в этих опытах монотонно. Область температуры  $24—27^\circ C$  в литературе идентифицируют с областью структурного фазового перехода липидов плазматических мембран эритроцитов: в этой области обнаружены каналы проводимости для катионов рубидия [10] и изменение скорости переноса окислительно-восстановительных эквивалентов [3]. Наши опыты свидетельствуют о взаимосвязи переноса катионов калия через мембраны клеток с фазовым переходом липидов.

В экспериментах на переживающей перфузируемой печени крыс было изучено влияние температуры на перенос калия через мембраны и на скорость потребления кислорода тканью. На рис. 3 представлены результаты одного из опытов. Видно, что при нагревании органа выше температуры  $28—30^\circ C$  начинается спонтанная утечка калия из клеток. В этой же области температур можно было наблюдать излом на графиках Аррениуса зависимости скорости потребления кислорода от обратной величины абсолютной температуры. Согласно данным [8], при  $20—30^\circ C$  в липидах, выделенных из плазматических мембран клеток печени, происходит широко-

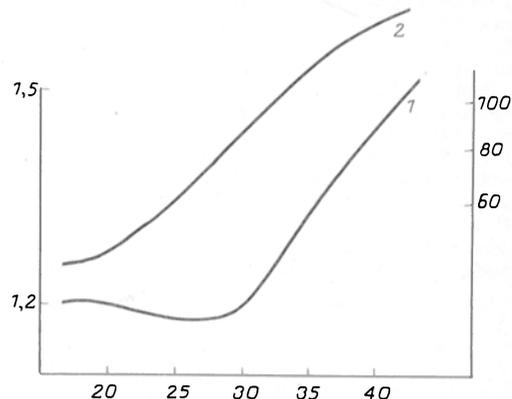


Рис. 3. Непрерывная запись температурной зависимости концентрации калия в протоке (1) и потребления кислорода (2) при перфузии печени крыс.

По оси абсцисс — температура, °С; по оси ординат: слева — концентрация калия, мм; справа — скорость потребления кислорода тканью, мкмоль на 1 г сырой массы.

температурный фазовый переход. Существует мнение, что изменение скорости переноса калия в переживающей печени собак в этой области температур зависит именно от структурных перестроек мембранных липидов [7]. В заключение отметим, что сравнение температурных зависимостей переноса ионов через замкнутые липидные, а также плазматические мембраны клеток свидетельствует в пользу определения связи количественных характеристик описанных процессов с конформационными превращениями мембранных липидов. К сожалению, опыты не дают сведений о конкретном температурочувствительном звене в системе мембранного транспорта. Нарушения упаковки липидов бислоя в области фазового перехода предполагают образование каналов проницаемости; одновременно могут происходить процессы “флип-флоп” молекул и изменения условий связывания ионов с полярными структурами [1, 11], что, очевидно, влияет на поверхностный потенциал клеток [2] и степень насыщения переносчиков (в том числе липидной природы) переносимыми ионами. В связи с вероятностью хемотропных фазовых переходов мембранных липидов [1] можно ожидать обратную последовательность событий: изменения гидрофильной области липидного бислоя мембран и градиентов поверхностных зарядов вызовут деформации бислоя, образование каналов проницаемости и изменения работы переносчиков. Указанные явления в липидах плазматических мембран, по-видимому, могут быть сопряжены с передачей внеклеточного сигнала, особенно при температурных адаптациях и других экстремальных состояниях [9].

Автор приносит большую благодарность проф. В.Ф.Антонову за постановку проблемы исследова-

ния, а также Ю.А.Хитрову и М.С.Федоровой за участие в проведении экспериментов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов В.Ф., Смирнова Е.Ю., Шевченко Е.В. Липидные мембраны при фазовом переходе. — М., 1992.
2. Иванов И.Т., Люцканов В.Г. // Биофизика. — 1988. — Т. 33, № 5. — С. 834—836.
3. Цыбышев В.П., Штемлер В.М., Кузнецов А.Н. // Там же. — 1985. — Т. 30, № 5. — С. 911—915.
4. Bennecow P. // Biochim. biophys. Acta. — 1984. — Vol. 776. — P. 1—9.
5. Ellory J.C., Hall A.C. // Temperature and Animal Cell. — Cambridge, 1987. — P. 53—86.
6. Jacobson K., Papahadjopoulos D. // Biochemistry. — 1975. — Vol. 14, N 1. — P. 151—161.
7. Lambotte L. // Surgery. — 1973. — Vol. 73, N 1. — P. 8—14.
8. Livingston P.J., Schachter D. // J. biol. Chem. — 1980. — Vol. 225, N 22. — P. 35—52.
9. Membrane Fluidity. — New York, 1984.
10. Olcerst R.B., Belman S., Eisenrud M. et al. // Radiat. Res. — 1980. — Vol. 82. — P. 244—256.
11. Taupin Ch., Dvolaitzky M., Sauterey C. // Biochemistry. — 1975. — Vol. 14, N 21. — P. 4771—4775.
12. Tirell D.A. // J. Macromol. Sci. — Chem. — 1988. — Vol. A25, N 5—7. — P. 839—845.
13. Wozniak M., Kossowska E. et al. // Biochem. J. — 1988. — Vol. 225, N 3. — P. 977—981.

Поступила 25.01.94

#### ROLE OF THE PHASE STATE OF MEMBRANE LIPIDS IN TRANSFER OF EXTRACELLULAR SIGNAL

M.L. Kakushkina

I.M. Sechenov Medical Academy, Moscow

Transfer of ions in temperature-dependent phase transition of membrane lipids was studied in liposomes, human erythrocytes and in perfused rat liver tissue. Signal functions of cells appear to be related to the phase state of membrane lipids involving alterations in parameters of ions transfer.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 612.112.91.014.46.08

А. А. Галкин, Е. А. Туманов, Е. Н. Тимин, И. В. Мисочко, А. А. Карелин

#### ВЛИЯНИЕ ВТОРИЧНЫХ ПОСРЕДНИКОВ НА ДВИГАТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ

Институт хирургии им. А. В. Вишневского РАМН, Москва

Известно, что увеличение внутриклеточной концентрации цАМФ,  $Ca^{2+}$  и активация протеинкиназы С вызывают иммобилизацию нейтрофилов [13,18,21,25]. Эти сведения представляют интерес и для прикладных клинических исследований, так как при заболеваниях различной этиологии (бактериальные и вирусные инфекции, онкологические заболевания, ожоговая болезнь) наблюдается угнетение подвижности нейтрофилов, выделенных из крови человека [6,22,24].

По-видимому, механизмы нарушения подвижности во всех перечисленных выше случаях различны, однако методы, наиболее широко применяемые в настоящее время в исследованиях подвижности (миграция под агарозой [16] и миграция в миллиметровых фильтрах [4]), не позволяют выявить специфику нарушения подвижности вследствие то-

го, что в качестве показателя подвижности берется малоинформативная средняя или максимальная скорость движения в популяции нейтрофилов [1,6]. С разработкой в последние годы автоматизированных методов регистрации и анализа подвижности индивидуальных клеток на базе систем обработки изображений [3,8] появилась возможность оценивать подвижность по дополнительным критериям.

Целью настоящей работы явилось: 1) смоделировать различные типы нарушения подвижности нейтрофилов, выделенных из крови здоровых доноров, с помощью экзогенно прикладываемых агентов, повышающих концентрацию или активность различных внутриклеточных вторичных посредников (цАМФ, цГМФ,  $Ca^{2+}$ , аналог естественного вторичного посредника диацилглицерола — форболовый эфир РМА); 2) с помощью системы автоматической обработки изображений Magiscan 2A (Англия) в условиях приблизительно одинакового угнетения подвижности (средней скорости движения) по характеристикам изменения площади клеток выявить особенности нарушения подвижности нейтрофилов; 3) сопоставить объективно регистрируемые параметры с визуально наблюдаемым поведением клеток.

Методика. Подвижность нейтрофилов на стекле исследовали с помощью системы анализа изображений Magiscan 2A [3]. Выделение изображения клеток осуществляли на базе стандартного математического обеспечения Magiscan 2A, слежение за движением клеток проводили по разработанной нами программе межкадровой идентификации клеток. Для оценки скорости движения нейтрофилов устанавливали межкадровый интервал 1 мин, изменение площади клеток в процессе движения регистрировали с межкадровым интервалом 2 с. Темнопольное изображение получали с микроскопа Jenalumar, использовали объективы  $\times 6,3$  и  $\times 16$ . Одновременное слежение за большим числом клеток в поле зрения позволяло оценивать подвижность как индивидуальных клеток, так и популяции в целом.

Выделение нейтрофилов осуществляли из капли крови, взятой из пальца здорового донора. Нормальной средой являлся стандартный раствор Хенкса + 0,5% человеческого сывороточный альбумин ("Fluka", Швейцария) рН 7,3, температура 37°C.

Влияние вторичных посредников на подвижность нейтрофилов оценивали по изменению средней скорости в препарате из 40—50 клеток в камере с протоком. Концентрации веществ были подобраны таким образом, чтобы не подавить подвижность полностью за время эксперимента (2—3 ч), и составляли: dbt цАМФ  $5 \cdot 10^{-6}$ М, dbt цГМФ  $5 \cdot 10^{-6}$ М, А23187  $10^{-6}$ М, РМА  $10^{-6}$ М (dbt — дибутирильные

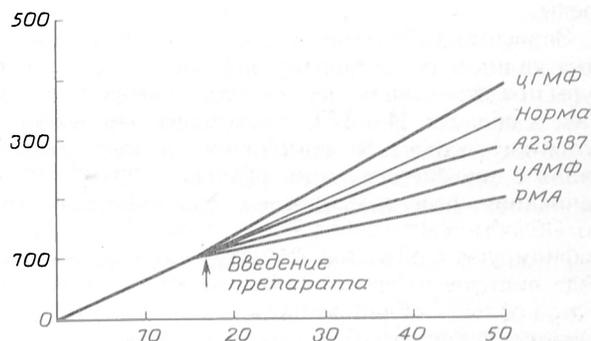


Рис. 1. Изменения средней скорости движения нейтрофилов при действии вторичных посредников. цГМФ —  $5 \cdot 10^{-6}$ М, цАМФ —  $5 \cdot 10^{-6}$ М, А23187 —  $10^{-6}$ М, РМА —  $10^{-6}$ М.

По оси абсцисс — время, мин; по оси ординат — пройденный путь, мкм.

аналоги циклических нуклеотидов, РМА — форболовый эфир — phorbol 12 — myristate 13-acetate, активатор протсинкиназы С, А23187 — Са-ионофор). Все реактивы фирмы "Sigma" США.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 представлен график зависимости пути, пройденного нейтрофилами, от времени при действии dbt цАМФ, dbt цГМФ, А23187 и РМА. Углы наклонов кривых характеризуют скорость (в мкм/мин). Скорости индивидуальных клеток, как мы показали ранее [9], флюктуируют, средняя скорость в популяции — устойчивый показатель двигательной активности. Средняя скорость движения нейтрофилов из крови здоровых доноров составляла  $8,8 \pm 0,2$  мкм/мин ( $n = 40$ ), цГМФ стимулирует подвижность, а цАМФ, А23187, РМА угнетают ее. При использованных нами концентрациях агентов угнетение подвижности было приблизительно одинаковым, средняя скорость составляла 3,5—5 мкм/мин ( $n = 5$  для каждого агента).

Увеличение внутриклеточной концентрации вторичных посредников вызывало характерные изменения формы и средней площади клеток.

Средние значения величины площади клеток и их формы отражают физико-химическое состояние примембранных кортикальных структур и адгезивность к субстрату, динамика изменения площади клеток в процессе движения дает информацию о мощности процессов сокращения—расслабления и характерных частотах образования псевдоподий (см. таблицу).

Для построения спектров изменения площади индивидуальных клеток в процессе движения регистрировали не менее 256 кадров с межкадровым интервалом 2 с. Выбирали клетки, имеющие среднюю для данного препарата подвижность.

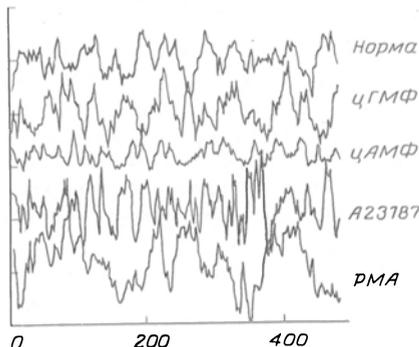


Рис. 2. Экспериментальные кривые изменений площади нейтрофилов во времени.

По оси ординат — изменения площади клетки, отн. ед.; по оси абсцисс — время, с.

На рис. 2 приведены типичные картины изменения площади индивидуальных нейтрофилов в процессе движения в норме и при действии вторичных посредников. Из этого рисунка видно, что А23187 увеличивает частоту изменений площади, а РМА уменьшает ее. Наиболее наглядно это видно на графиках спектров мощности рис. 3. Все вещества, угнетающие подвижность (цАМФ, А23187, РМА), уменьшают мощность спектра, но по-разному изме-

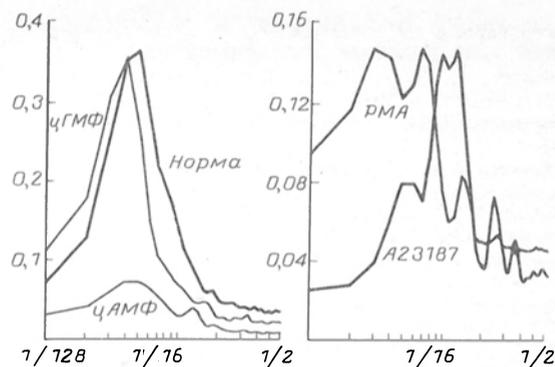


Рис. 3. Спектральные характеристики изменений площади нейтрофилов в норме и при действии dbt цАМФ, цГМФ, А23187, РМА.

По оси абсцисс — частота, 1/с; по оси ординат — мощность, отн. ед.

няют частотные характеристики: цАМФ не вызывает частотного сдвига по сравнению с нормой. А23187 вызывает сдвиг спектра в область высоких частот, а РМА — в область низких частот. цГМФ не изменяет мощность спектра по сравнению с нормой и незначительно сдвигает спектр в область низких частот.

Объяснение обнаруженных фактов мы видим в исходно заложенных в клетках механизмах двигательной активности. В норме движение нейтрофила, как это показано многими авторами [14,17,19], связано с чередованием периодов ускорения и замедления, во время ускорения клетки вытягиваются, при замедлении — округляются. Визуальное наблюдение за клетками позволяет выделить 3 типа перемещения, с которыми связаны флюктуации скорости. Схематически 3 типа перемещения нейтрофилов представлены на рис. 4.

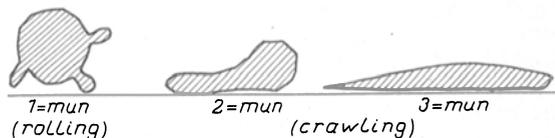


Рис. 4. Три типа перемещения нейтрофилов.

Объяснения в тексте.

1-й тип перемещения связан с образованием коротких тонких выростов, приклеиванием их к стеклу и подтягиванием сжатого округленного тела клетки к одному из них. Этому типу соответствует перемещение путем перекатывания (rolling) с хаотической направленностью. 2-й тип перемещения связан с образованием широких, относительно длинных псевдоподий и подтягиванием или перетеканием тела клетки в направлении псевдоподии, при этом перемещение напоминает ползание (crawling) с относительно устойчивым выбором направления. 3-й тип перемещения связан с морфологической поляризацией клеток, он сопровождается отчетливыми сократительными волнами, бегущими от переднего конца клетки к хвосту [19]. Этому типу соответствует наиболее быстрое ползание с устойчивой направленностью (наиболее выражен при хемотаксисе).

Выделенным 3 типам перемещения соответствуют характерные частоты в спектре изменения пло-

#### Характерные формы и средние площади нейтрофилов в норме и при действии вторичных посредников

Показатель	Норма	цГМФ	цАМФ	А23187	РМА
Средняя площадь, мк <sup>2</sup> (данные 100 измерений)	150	162	151	126	204
Форма	Слабо поляризованы	Поляризованы	Округлы	Сильно округлы, сжаты	Сильно поляризованы, распластаны

щадя нейтрофилов: 1-й тип — примерно от 1/2 до 1/8 цикла в секунду, 2-й тип — примерно от 1/6 до 1/40 цикла в секунду, 3-й тип — примерно от 1/30 до 1/120 цикла в секунду.

Мы считаем, что процентное соотношение этих 3 типов перемещения в реальном движении клетки определяет мощность и частоту спектра изменения площади и может изменяться при действии вторичных посредников. Согласно этому утверждению, цАМФ равномерно угнетает все 3 типа перемещений, и, вероятнее всего, это угнетение связано с общим ослаблением контрактильных структур клетки. Известно, что киназа легких цепей может быть фосфорилирована каталитической субъединицей цАМФ-зависимой протеинкиназы [5], это фосфорилирование ингибирует связывание кальмодулина и может быть одним из механизмов общего угнетения сократительной активности. С другой стороны, цАМФ усиливает полимеризацию тубулина [15], что может привести к увеличению ригидности клетки.

При действии на нейтрофилы кальциевого ионифора А23187 доминируют перемещения 1-го (rolling) и 2-го типа, что отражается на спектре сдвигом в область высоких частот. Кортикальный слой нейтрофила образован перекрестно соединенными друг с другом актиновыми филаментами, образующими актиновую решетку. Кальцийзависимый белок гельзолин определяет жесткость решетки и тем самым ее способность к сокращению [12], при высоких концентрациях Са решетка теряет жесткость и сокращается, с чем, по-видимому, связано уменьшение площади клеток. Псевдоподии возникают в участках клетки с пониженной концентрацией Са [10]. Преобладание коротких выростов по всей поверхности нейтрофила, возможно, связано с тем, что Са принимает активное участие в образовании стресс-фибрилл в образующихся псевдоподиях, в свою очередь на стресс-фибриллах локализуется кальмодулин, регулирующий активность киназы легких цепей миозина [15]. В комплексе с кальмодулином Са вызывает деполимеризацию тубулина [15]. Возможно, что вышеназванными причинами можно объяснить отсутствие поляризованных форм при действии А23187.

При действии РМА нейтрофилы перемещаются исключительно по 2-му и 3-му типу (crawling), при этом спектр сдвигается в низкие частоты, снижение мощности спектра связано с тем, что значительная часть клетки пассивно распластана на стекле и не принимает участия в движении, активность проявляет только передний конец клетки. Основными причинами такого поведения нейтрофилов при активации протинкиназы С могут быть снижение жесткости кортикального актинового слоя вследствие нарушения связи некоторых актинсвязывающих белков (в частности, винкулина) с плазматической мембраной [23], уменьшение вязкости мембранных липидов [2], активация Na/H-антипортера, вследствие чего повышается внутриклеточный рН [11], известно также, что изменения внутриклеточного рН имеют прямое отношение к изменениям формы клеток [7].

При действии цГМФ преобладают перемещения по 2-му и 3-му типу (crawling). Известно, что цГМФ принимает участие в элонгации клеток [20], но механизм действия не изучен.

Таким образом, анализ изменения площади нейтрофилов при действии различных агентов позволяет различить механизмы угнетения подвижности по

мощности и частотным характеристикам спектра. Вторичные посредники способны избирательно действовать на различные двигательные механизмы клетки.

Выяснение механизмов нарушения подвижности нейтрофилов из крови больных под действием бактериальных или сывороточных факторов позволит по-новому подойти к тонкой дифференциальной диагностике некоторых заболеваний.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Галкин А. А., Туманов Е. А., Филиппов М. М. и др. // Бюл. exper. биол. — 1991. — № 5. — С. 491—495.
2. Пальмина Н. П., Богданова Н. Г., Мальцева Е. Л. // Биол. мембраны. — 1992. — Т. 5, № 11. — С. 1707—1710.
3. Туманов Е. А., Галкин А. А., Филиппов М. М. и др. // Бюл. exper. биол. — 1990. — № 6. — С. 594—597.
4. Boyden S. P. // J. exp. Med. — 1962. — Vol. 115. — P. 594—597.
5. Conti M. A., Adelstein R. S. // J. biol. Chem. — 1981. — Vol. 256. — P. 3178—3183.
6. Elgefors B., Olling S. // Acta path. microbiol. immunol. scand. Sect. C. — 1984. — Vol. 92. — P. 113—119.
7. Faucher N., Naccache P. H. // J. Cell. Physiol. — 1987. — Vol. 132. — P. 483—491.
8. Fisher P. R., Merkl R., Gerisch G. J. // J. Cell. Biol. — 1989. — Vol. 108. — P. 973—984.
9. Galkin A. A., Tumanov E. A., Philippov M. M. et al. // Proc. int. Soc. Pathophysiol. — 1991. — Vol. 1. — P. 283.
10. Gilbert S. H., Perry K., Fay F. S. // Biophys. J. — 1992. — Vol. 61, N 2. — Pt 2. — P. 722.
11. Grinstein S., Elder B., Furuya W. // Amer. J. Physiol. — 1985. — Vol. 248. — P. C379—C386.
12. Hartwig J. H., Yin H. L., Stossel T. P. // Mononuclear Phagocytes. Functional Aspects. — Hague, 1980. — Vol. 2. — P. 971—980.
13. Houl J.R.S., Nourshargh S. // Brit. J. Pharmacol. — 1985. — Vol. 86, N 3. — P. 533—537.
14. Howard T. H. // Blood. — 1982. — Vol. 59. — P. 946—951.
15. Means A. R., Tash J. S., Chafouleas J. G. // Physiol. Rev. — 1982. — Vol. 62, N 1. — P. 1—39.
16. Nelson R.D., Quie P. G., Simmons R. L. // J. Immunol. — 1975. — Vol. 115. — P. 11650—11656.
17. Ramsey W. S. // Exp. Cell Res. — 1972. — Vol. 70. — P. 129—139.
18. Roos F. J., Zimmermann A., Keller H. U. // J. Cell Sci. — 1987. — Vol. 88. — P. 399—406.
19. Senda N., Tamura H., Shibata N. et al. // Exp. Cell Res. — 1975. — Vol. 91, N 2. — P. 393—407.
20. Small N. V., Europe - Finner G.N., Newell P. C. // J. Cell Sci. — 1987. — Vol. 88. — P. 537—545.
21. Smith C.W., Hollers J. C., Patrick R. A., Hassett C. // J. clin. Invest. — 1979. — Vol. 63. — P. 221—229.
22. Venge P., Arturson G. // Burns. — 1981. — Vol. 8. — P. 6—18.
23. Werth D. K., Niedel J. K., Pasken I. // J. biol. Chem. — 1983. — Vol. 258. — P. 11423—11426.
24. Wilkinson P. C. // Rev. infect. Dis. — 1980. — Vol. 2. — P. 293—318.
25. Zigmond S. H. // Cell Motility Cytoskelet. — 1988. — Vol. 9, N 2. — P. 184—189.

Поступила 25.01.94

## EFFECT OF SECONDARY MESSENGERS ON LOCOMOTOR ACTIVITY OF NEUTROPHILS

A.A.Galkin, E.A.Tumanov, E.N.Timin, I.V.Misochko, A.A.Karelin

A.V.Vishnevsky Institute of Surgery, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Effects of cAMP and cGMP dibutyl derivatives (dbt), calcium ionophore А23187 and the protein kinase С activator PMA phorbol ester on mobility of human blood neutrophils were studied using the Magiskan 2A system of image processing. These drugs were added at concentrations, which allowed to produce similar inhibition of the cells mobility using a pattern of the middle velocity measurement in the cell population: dbt cAMP  $5 \cdot 10^{-5}M$ , А23187  $10^{-6}M$ , PMA  $10^{-5}M$ ; dbt cGMP  $5 \cdot 10^{-6}M$  stimulated the neutrophil mobility. Differences in the patterns of mobility inhibition were detected by means of spectral characteristics

related to alteration in the area of individual neutrophils. The drugs with inhibitory action (cAMP, A23187 and PMA) caused a decrease in the spectrum capacity of the area alteration as compared with normal state, while they affected dissimilarly the spectrum frequency characteristics. Dbt cAMP did not alter the frequency characteristics, A23187 shifted the spectrum towards a high frequency region and PMA — towards a low frequency range. Dbt cGMP did not alter the spectrum capacity but shifted it slightly to low frequency region. These alterations in the spectrum frequency characteristics are discussed considering the effect of secondary messengers on three types of the neutrophil movement which exhibit inherent frequencies.

© Т. С. СААТОВ, Н. Н. ЯКОВЛЕВА, 1994

УДК 612.44.018:577.175.444].08

Т. С. Саатов, Н. Н. Яковлева

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МЕМБРАННОГО РЕЦЕПТОРА ТИРОКСИНА

Институт биохимии АН Республики Узбекистан, Ташкент

Основой механизма действия тиреоидных гормонов, оказывающих мощное влияние на жизнедеятельность всего организма, является их взаимодействие с ядерными, цитоплазматическими и митохондриальными рецепторами, которые опосредуют трансформацию гормонального сигнала в биохимический ответ клетки, выражающийся в регуляции процессов транскрипции [1,22,24]. Однако вопрос, каким образом тиреоидные гормоны проникают внутрь клетки, окончательно не решен.

За последние годы получены доказательства, что, помимо внутриклеточных рецепторов, тиреоидные гормоны имеют участки специфического связывания на плазматических мембранах клеток-мишеней [6,7,11,14]. Однако природа этих рецепторов не выяснена до конца и экспериментальный материал, накопленный на сегодняшний день, не позволяет достаточно четко ответить на вопрос о роли мембранной рецепции в механизме действия гормонов щитовидной железы.

Задачей исследования явилось изучение особенностей связывания тироксина ( $T_4$ ) с высокоочищенными плазматическими мембранами (ПМ) печени крыс, а также выделение мембранного рецептора  $T_4$ , исследование его свойств и условий проявления связывающей активности.

Методика. Объектом исследования служили самцы беспородных белых крыс массой 150—200 г. Высокоочищенные препараты ПМ из ткани печени получали по методу [2]. Подробное описание использованного метода представлено нами ранее [4]. Чистоту препаратов ПМ определяли электронно-микроскопически и по увеличению активности маркерных ферментов —  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФазы,  $Mg^{2+}$ -АТФазы, 5'-нуклеотидазы [9,15] в сравнении с гомогенатом. В работе использовали  $^{125}I$ - $T_4$  и  $^{125}I$ - $T_3$  (производства фирмы "Reanal" и АО "Изотоп") с удельной радиоактивностью 50 ТБк/г и радиохимической чистотой 97% для  $T_4$  и 94% для  $T_3$ , которые при анализе чистоты с использованием бумажной хроматографии в смеси бутанол — этанол — 2 н.  $NH_4OH$  (5:2:1) показали по одному пику. Анализ связывания меченых гормонов с препаратами мембран и очищенным рецептором проводили по методу [12]: мембраны (50 мкг по белку) и очищенный рецептор (5 мкг по белку) инкубировали в 100 мкл смеси, содержащей 20 мМ трис-НСl, 2 мМ ЭДТА, 1 мМ  $MgCl_2$ , 10 мМ NaCl, 0,2 М сахарозу,

1 мМ дитиотреитол рН 7,6 с 0,1 нМ  $^{125}I$ - $T_4$  или  $^{125}I$ - $T_3$  в течение 1 ч при комнатной температуре. После инкубации и добавления 1 мл ледяного инкубационного буфера связавшийся с мембранами гормон немедленно отделяли от свободного путем центрифугирования при 10 000 г на холоду. Надосадок сливали, снова промывали осадок путем добавления 0,5 мл буфера и повторного центрифугирования. Связавшийся с очищенным рецептором гормон немедленно отделяли от свободного путем промывания проб в 100 мл буфера на фильтрах 1,5 мкм ("Сынпор", Чехия). Затем фильтры высушивали и помещали в пробирки для подсчета радиоактивности. Радиоактивность проб подсчитывали на  $\gamma$ -счетчике Rack- $\gamma$  (ЛКВ, Швеция). Неспецифическое связывание определяли параллельной инкубацией с добавлением 13 мкМ немеченого  $T_4$  или  $T_3$  и вычитали его из общего связывания для подсчета специфического связывания с учетом удельной радиоактивности лиганда, эффективности радиометрии и концентрации белка в пробе. Константы ассоциации ( $K_a$ ) и максимальную связывающую емкость (МСЕ) рецепторов рассчитывали по кривой Скэтчарда [21]. Содержание белка в пробах определяли по методу [18].

Ферментное ингибирование изучали при предварительной инкубации ПМ в течение 1 ч при 22—24°C в присутствии фосфолипазы  $A_2$  (50 и 100 мкг/мл) или трипсина (20 и 50 мкг/мл) в инкубационной среде приведенного выше состава, но без ЭДТА, а с добавлением 1 мкМ  $CaCl_2$ , 0,1 нМ  $^{125}I$ - $T_4$  и 13 мкМ стабильного  $T_4$  для определения общего и неспецифического связывания. В контрольном опыте мембраны инкубировали с гормоном в тех же условиях, но без энзима. Делипидизацию мембран осуществляли экстракцией в равном количестве смеси петролейный эфир — н-бутанол (7:3) в течение 90 с [19].

Выделение и очистку рецептора тироксина из ПМ печени крыс осуществляли с помощью аффинной хроматографии. Аффинный сорбент синтезировали путем последовательного присоединения эпихлоргидрина и  $T_4$  к сефарозе по методу [3]. Для выделения рецептора к суспензии мембран добавляли тритон X-100 до конечной концентрации 1%. Смесь инкубировали, непрерывно встряхивая в течение 40 мин при 25°C, и центрифугировали при 64 000 г 90 мин. Надосадок разбавляли буфером А (20 мМ трис-НСl рН 7,6, 1 мМ  $MgCl_2$ , 1 мМ дитиотреитол) до конечной концентрации тритона 0,05%. Затем 20 мл надосадка при 25°C очень медленно пропускали через аффинную колонку, содержащую 2 мл аффинного сорбента, которая предварительно уравновешивалась буфером А, содержащим 0,05% тритон X-100. После нанесения образца для лучшего насыщения лиганда поток жидкости останавливали на 30 мин. После этого колонку исчерпывающе промывали до максимального снижения оптической плотности при 280 нм буфером А. Неспецифически связавшиеся белки удаляли 0,1 М  $NaHCO_3$  рН 9. Белок, связывающий тироксин, элюировали 0,001 М NaOH рН 11. Для уменьшения денатурирующего действия NaOH рН элюанта после выхода с колонки сразу же доводили до 7,6 добавлением небольшого количества сульфата аммония, подвергали интенсивному диализу и лиофилизировали. Все элюирующие растворы содержали 0,05% тритон X-100. Чистоту выделенного рецептора идентифицировали

по электрофоретическим свойствам. Электрофорез белков проводили в пластинах с линейным градиентом (10—15%) ПААГ по методу Лэммли [16]. Для калировки гелей в качестве маркеров использовали бычий сывороточный альбумин (67 000 Да), химо-трипсиноген А (25 000 Да), цитохром С (12 000 Да). Аминокислотный анализ очищенного рецептора проводили по методу [16] с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии аминокислот в виде фенилтиокарбомильных производных. Гидролиз проводили в вакуумированных запаянных ампулах в 5,6 н. НСl и концентрированной ТХУ (2:1) при 166°C в течение 60 мин. Разделение аминокислот осуществляли на хроматографе Du Pont 8.800 на колонке Lichospher C-18 Merk (Германия). Определение сialовых кислот в молекуле рецептора проводили, используя метод [23]. Реконструкцию очищенного рецептора осуществляли путем встраивания его в фосфолипидные липосомы, полученные из фосфолипидов ПМ печени крыс, очищенных по методу Фольча [10]. Для этого к фосфолипидам ПМ (1 мг) в виде тонкой пленки добавляли буфер Г (20 мМ трис-НСl рН 7,6, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ NaCl, 1 мМ дитиотреитол, 0,01 М азид натрия и 0,01% тритон X-100) и перемешивали встряхиванием в течение 60 мин при 25°C. Затем к смеси добавляли 50 мкг очищенного рецептора, растворенного в 0,25 мл буфера Г, содержащего фосфолипиды ПМ. Инкубировали в течение 3 ч при 4°C. После инкубации смесь переносили в диализный мешочек, вымоченный предварительно в буфере Г, и диализировали против 500 мл этого буфера, не содержащего тритон X-100, с тремя сменами буфера при 4°C. На образование липосом указывало появление опалесценции в липид-белковой смеси.

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

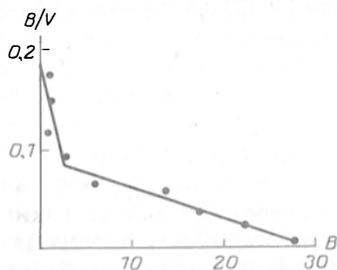


Рис.1. Связывание тироксина ПМ печени крыс в координатах Скэтчарда.

По оси абсцисс — количество связанного гормона (в пг Т<sub>4</sub>/100 мкг белка ПМ); по оси ординат — В/У, где У — концентрация свободного гормона (в пг).  $K_{d1} = 1,8 \pm 0,3 \cdot 10^{-9} \text{ М}^{-1}$ ,  $MSE_1 = 5,0 \pm 0,7$  пмоль Т<sub>4</sub>/мг белка.  $K_{d2} = 0,1 \pm 0,02 \cdot 10^{-9} \text{ М}^{-1}$ ,  $MSE_2 = 38,6 \pm 7,31$  мкмоль Т<sub>4</sub>/мг белка.

Результаты и обсуждение. Связывание Т<sub>4</sub> с ПМ характеризуют специфичность, насыщенность и высокое сродство, а также нелинейная форма графика Скэтчарда, что указывает на присутствие 2 типов связывающих мест для Т<sub>4</sub> (рис.1). Первый характеризуется высоким сродством и низкой емкостью, но с трудом поддается насыщению, второй — низким сродством и высокой емкостью. Наши данные подтверждают результаты, полученные Гарби и Торресани [13], также обнаруживших 2 типа связывающих мест для Т<sub>4</sub> на ПМ печени крыс.

Выделение и очистку рецептора осуществляли с помощью аффинной хроматографии. В качестве агента, модифицирующего и активирующего по-



Рис. 2. Электрофорез в градиентном (10—15%) ПААГ с ДДС натрия очищенного рецептора тироксина.

α — белки — маркеры: БСА (67 кДа), химо-трипсиноген А (25 кДа), цитохром С (12 кДа); β — рецептор, связывающий тироксин на ПМ печени крыс.

лисахаридную матрицу, использовали эпихлоргидрин [3]. Полученные нами после обработки сефарозы 4В эпихлоргидрином активированные матрицы содержали 20—25 мкмоль эпокси-групп на 1 мл геля. Аффинный сорбент, синтезированный на основе этой матрицы, содержал 1,5—2 мкмоль Т<sub>4</sub> на 1 мл геля.

Фракции, обнаруженные при аффинной хроматографии 0,05% тритонового экстракта ПМ печени крыс на сефарозе-Т<sub>4</sub>, анализировали методом электрофореза в градиентном (10—15%) ПААГ. Во фракции, собранной при элюции сефарозы-Т<sub>4</sub> 0,001 М NaOH рН 11, выявился гомогенный компонент, который положительно реагировал с реактивом Фо-

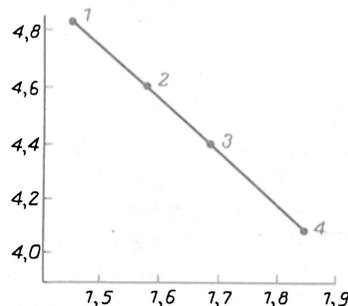


Рис. 3. График зависимости логарифма молекулярной массы (ось ординат) тироксинсвязывающего белка от логарифма его электрофоретической подвижности (ось абсцисс).

1 — сывороточный альбумин быка, 2 — рецептор, 3 — химо-трипсиноген А, 4 — цитохром С.

лина — Чикальтео, что говорит о его белковой природе (рис. 2). Согласно данному методу очистки [3], фракция, собранная при элюции аффинного сорбента 0,001 М NaOH pH 11, является рецептором, связывающим T<sub>4</sub> на ПМ печени крыс.

Молекулярную массу очищенного рецептора определяли путем построения графика зависимости логарифмов молекулярных масс веществ от логарифмов их электрофоретической подвижности, используя белки-маркеры. Было установлено, что молекулярная масса очищенного рецептора T<sub>4</sub> равна 40 000 Да (рис. 3).

Рецептор тироксина содержится в тканях печени в чрезвычайно малых количествах. Всего 0,08 мг рецепторного белка присутствует в гомогенате печени 50 крыс, содержащем около 112 г белка. Это составляет лишь 0,7·10<sup>-4</sup>% общего белка, содержащегося в гомогенате печени, и около 1,5·10<sup>-3</sup>% белка ПМ. Таким образом, для получения чистого рецептора T<sub>4</sub> необходима очистка в 800 000 раз.

Рецептор T<sub>4</sub> является интегральным мембранным белком, прочно связанным с липидным бислоем, поскольку он может быть извлечен из мембраны только солиubilизацией в неионных детергентах, таких, как тритон X-100. Он фактически нерастворим в воде и после снижения концентрации детергента в результате интенсивного диализа склонен к агрегации.

Основные данные о химической природе рецептора получены в экспериментах по определению наличия углеводов в молекуле рецептора и по расщеплению рецептора ферментами.

Результаты экспериментов показывают, что рецептор является гликопротеином. Так, проба на углеводы с сульфифенолом оказалась положительной, количество сиаловых кислот в молекуле рецептора составило 5%.

Таблица 1

Аминокислотный состав очищенного рецептора тироксина

Тип аминокислот	Аминокислота	Число остатков на молекулу белка
Основные	Lys	12
	His	3
	Arg	11
	Всего...	26
Кислые	Asp	31
	Glu	32
	Всего...	63
Нейтральные	Thr	11
	Ser	27
	Pro	12
	Gly	43
	Ala	23
	Всего...	116
Гидрофобные	Met	9
	Val	18
	Ile	41
	Ley	31
	Tyr	10
	Phe	8
	Всего...	117

Как было показано ранее [4], инкубация ПМ печени крыс с ферментом трипсином приводила к подавлению специфического связывания T<sub>4</sub> с рецептором на 60%, что указывает на важную роль белкового компонента рецептора в связывании с гормоном. Изменение фосфолипидного окружения при обработке ПМ фосфолипазой A<sub>2</sub> и частичной делипидизации мембраны приводило к ингибированию связывания T<sub>4</sub> на 30—50%, следовательно, рецептор T<sub>4</sub> обладает липофильными свойствами и тесно связан с фосфолипидами ПМ.

Результаты исследования аминокислотного состава очищенного мембранного рецептора T<sub>4</sub> представлены в табл. 1. Как видно из данных этой таблицы, очищенный рецептор состоит из 322 аминокислотных остатков. Он обогащен нейтральными и кислыми аминокислотами. Такой состав согласуется с предположением о том, что рецептор связан в мембране ионными связями с основными белками (или липидами). Он удерживается в мембране за счет гидрофобных взаимодействий, о чем говорит высокое содержание гидрофобных остатков в молекуле рецептора. Согласно числу аминокислотных остатков в молекуле рецептора его молекулярная масса равна 38 640 Да, что соответствует данным электрофореза.

Как указывалось выше, T<sub>4</sub> с высоким сродством связывается с ПМ печени крыс. Исследования, выполненные на препаратах очищенного рецептора, показали, что в процессе очистки он теряет способность связывать гормон. По-видимому, рецептор T<sub>4</sub> может иницировать гормональные эффекты, если входит в состав мембран, так как биологический эффект опосредуется согласованной работой многих структур, а подчас требует целостности клетки или даже определенного многоклеточного ансамбля.

Практически все рецепторы мембраны — интегральные белки с выраженными гидрофобными свойствами. В процессе очистки, в результате солиubilизации мембраны детергентами нарушаются белок-липидные взаимодействия, изменяется конфигурация рецептора, поскольку специфическая укладка полипептидных цепей мембранных белков определяется и стабилизируется окружающими липидными молекулами. Известно, что полное удаление липидов из биологических мембран сопровождается инактивацией белков даже в присутствии детергента [20].

Поскольку делипидизация белков, происходящая при их очистке, представляет серьезную проблему, чтобы решить ее, ряд авторов предлагают добавлять липиды в исследуемые фракции или элюирующие растворы [5,17].

Таблица 2

Специфическое связывание <sup>125</sup>I-T<sub>4</sub> с ПМ печени крыс и с восстановленным рецептором (в имп/мин на 1 мкг белка в пробе)

Фракция	Специфическое связывание	%
ПМ	229,67 ± 22,26	100
Фосфолипидные липосомы	—	—
Очищенный рецептор	—	—
Рецептор, встроенный в липосомы	3216,70 ± 131,60*	1400

Примечание. Звездочка — p < 0,05 (n = 10) относительно ПМ.

С целью восстановления связывающей активности очищенного нами мембранного рецептора Т<sub>4</sub> мы также попытались провести реконструкцию рецептора, встроив его в фосфолипидные липосомы, полученные из фосфолипидов ПМ печени крыс. При инкубации фосфолипидных липосом с препаратами очищенного мембранного рецептора Т<sub>4</sub> наблюдалось восстановление его способности связывать Т<sub>4</sub> (табл. 2). Было показано, что связывающая способность реконструированного рецептора в пересчете на 1 мкг белка ПМ в 14 раз превышает способность связывать гормон ПМ. Однако вполне возможно, что взаимодействие Т<sub>4</sub> с реконструированным рецептором существенно отличается от специфического взаимодействия с тем же самым рецептором, находящимся в составе нативной мембраны. Тем не менее выявление и характеристика любого фактора, который принимает участие в специфическом связывании гормона рецепторами, ассоциированными с мембранами, с точки зрения предполагаемого механизма действия гормона представляют большой интерес для наших дальнейших исследований.

Итак, анализ данных литературы и результаты собственных исследований молекулярных механизмов действия тиреоидных гормонов позволяют заключить, что классическая двухэтапная схема реализации физиологической активности тиреоидных гормонов, включающая связывание их с цитозольными рецепторами и активацию гормон-рецепторным комплексом процессов транскрипции, является неполной. Можно утверждать, что "мембранный путь" также играет важную роль в процессе рецепции гормонов щитовидной железы, что позволяет вычленить его как отдельную стадию в реализации их активности.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Верещагина Г. В., Трапкова А. А. // Успехи соврем. биол. — 1984. — Т. 97, № 3. — С. 447—457.
2. Воейков В. Л. // Итоги науки и техники. Биоорганическая химия. — М., 1984.
3. Свиридов О. В., Ермоленко М. Н., Стрельченко О. А. // Биохимия. — 1989. — № 3. — С. 506—514.
4. Туракулов Я. Х., Саатов Т. С., Гулямова Ф. Я. и др. // Там же. — 1991. — Т. 56, № 3. — С. 839—845.
5. Финдлей Дж., Эванс У. Биологические мембраны. — М., 1990. — С. 214—248.
6. Alderson R., Pastan I., Cheng Sh.-Y. // Endocrinology. — 1985. — Vol. 116, N 6. — P. 2621—2630.
7. Cheng S. J., Mexfield F.R., Robbins J. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1980. — Vol. 77. — P. 3425.
8. Cohen M.P. // Annu. Rev. Physiol. — 1985. — Vol. 47. — P. 357—381.
9. Emmelot P., Bos C.J., Benedetti E.L. // Biochim. biophys. Acta. — 1964. — Vol. 90, N 1. — P. 126—145.
10. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. // J. biol. Chem. — 1957. — Vol. 226. — P. 497—509.
11. Frenvo V. L., Rudas P., Pethes G. et al. // International Congress of Physiological Science, 31-st: Abstracts. - Qulu, 1989. — P. 182.
12. Gharbi C.J., Torresani J. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1979. — Vol. 3, N 1. P. 170—171.
13. Gharbi C.J., Torresani J. // J. Endocr. Invest. — 1981. — Vol. 4. — P. 177—183.
14. Goncalves F., Lakshmanam M., Cahnmann J. et al. // Biochim. biophys. Acta. — 1990. — Vol. 1055, N 2. — P. 151—156.
15. Heppel L.A., Hilmor R.J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 188, N 2. — P. 665—667.
16. Laemmli U.K. // Nature. — Vol. 227. — P. 680—685.
17. Levitsky A. // Biochim. biophys. Acta. — 1985. — Vol. 822. — P. 127—153.
18. Lowry O. H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265—275.
19. Rethy A., Tomasi V. // Biochim. biophys. Acta. — 1972. — Vol. 290. — P. 58—69.
20. Robinson N.C., Strey F., Talbert L. // Biochemistry. — 1980. — Vol. 19. — P. 3656—3661.
21. Scatchard G. // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 1949. — Vol. 51. — P. 660—672.
22. Svats G., Butow R. // Cell. — 1983. — Vol. 32. — P. 316—318.
23. Svennerholm L. // Biochim. biophys. Acta. — 1957. — Vol. 24. — P. 604.
24. Tata J.R. // Biochemistry. — 1982. — Vol. 21. — P. 1781—1787.

Поступила 17.03.94

#### ISOLATION AND SOME PROPERTIES OF THE MEMBRANE-BOUND THYROXIN RECEPTOR

T.S. Saatov, N.N. Yakovleva

Institute of Biochemistry, Uzbek Republic Academy of Sciences, Tashkent

A thyroxin receptor was isolated from rat liver plasma membranes by means of affinity chromatography. The receptor proved to be glycoprotein with a molecular mass of 40 kDa and contained 322 amino acid residues. Incorporation of the purified receptor into artificial phospholipid membrane was carried out.

© В. И. Кулинский, 1994

УДК 616-092:612.014.4-063]-085.849.2.015.25

В. И. Кулинский

#### ПРОТЕКТОРЫ РЕЦЕПТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ ПРИ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ СОСТОЯНИЯХ

Иркутский медицинский институт

Профилактика экстремальных состояний — одна из очень актуальных проблем биологии и медицины. Она начала разрабатываться в конце 40-х годов при радиационных поражениях, а в начале 60-х — при гипоксических состояниях. При этом поиски протекторов вначале носили эмпирический характер и осуществлялись путем скрининга самых разных химических соединений. Это определило и термин "химическая защита", устойчиво используемый, например, в названиях монографий по радиопротекторам на протяжении десятилетий. Естественно, на смену скринингу приходят более рациональные биохимико-фармакологические подходы. Один из наиболее перспективных основан на достижениях новой, бурно развивающейся дисциплины — рецепторологии. При исследованиях в этой области не только получены важнейшие фундаментальные результаты, но и созданы качественно новые и высокоэффективные лекарства рецепторного действия — агонисты и антагонисты, которыми успешно лечат миллионы больных при самых распространенных заболеваниях. О высокой оценке рецепторологии свидетельствует присуждение Нобелевских премий 1988 г. — за обнаружение  $\beta$ -адрено- и H<sub>2</sub>-гистаминорецепторов и создание на этой основе широко применяемых лекарств и 1992 г. — за открытие протеинкиназ.

Настоящая работа обобщает наш почти 30-летний опыт по применению рецепторного подхода для поисков эффективных протекторов при экстремальных состояниях. Накопленный материал позволил выделить самостоятельный класс протекторов рецепторного действия (ПРД), имеющий важные достоинства.

Биохимико-фармакологические основы исследования ПРД. В биохимии термин "гормоны" теперь применяется в широком смысле и означает не только

регуляторы, переносимые кровью, но и любые другие межклеточные регуляторы рецепторного действия: нейротрансмиттеры, нейропептиды, местные гормоны, факторы роста клеток, эйкозаноиды и др. Гормоны всегда действуют через рецепторы — белковые молекулы, специфически связывающие гормоны. Возникновение гормон-рецепторного комплекса и приводит в конечном счете к специфическим ответам (их появление — вторая обязательная характеристика рецептора). Поэтому гормоны и рецепторы одинаково важны: без рецепторов гормоны не действуют. Для каждого гормона существуют свои собственные рецепторы, причем обычно их несколько типов, многие из которых подразделяются на подтипы. Вещества, стимулирующие рецепторы, называются агонистами (ранее — миметиками), они могут быть природными (гормоны) и синтетическими. Вещества, связываемые рецепторами, но не стимулирующие их и препятствующие действию агонистов, называются антагонистами (блокаторами, ранее — литиками). По сравнению с гормонами синтетические агонисты и антагонисты более избирательны: они связываются отдельными типами (специфичность) или даже подтипами (селективность).

Существует два основных биохимико-фармакологических метода идентификации рецепторов, опосредующих определенный эффект: сравнение эффектов агонистов и изучение блокады эффекта антагонистами.

Дозозависимая кривая рецепторного эффекта, совпадающая с кривой связывания меченых лигандов рецепторов, описывается уравнением Кларка — Ариенса и является типичной гиперболой: она линейна при малых концентрациях агониста, но затем постепенно выходит на плато насыщения. Гормоны действуют на клетки в очень малых концентрациях  $10^{-12}$ — $10^{-6}$  М (амины —  $10^{-8}$ — $10^{-6}$  М). При введении в организм ввиду наличия барьеров проницаемости и быстрого метаболизма действующие дозы гормонов выше, но обычно не превышают  $10^{-1}$ — $10^1$  мкмоль/кг. Неметаболизируемые агонисты активны в намного меньших дозах.

Рецепторы подавляющего большинства гормонов находятся на наружной поверхности плазматической мембраны. Поэтому действие таких агонистов не требует их проникновения в клетку. Более того, последнее снижает эффекты ввиду депонирования части гормона внутри клетки в неактивном виде и/или его метаболизма, оба процесса приводят к инактивации гормона. Поэтому блокаторы внутриклеточного захвата и ингибиторы метаболизма усиливают эффект малых доз агонистов — до уровня плато дозовой кривой и не изменяют действие больших, насыщающих доз. Такой эффект блокаторов депонирования свидетельствует о локализации рецепторов на наружной стороне плазматической мембраны. Наоборот, внутриклеточные механизмы действия под влиянием блокаторов депонирования должны ингибироваться.

Образование агонист-рецепторного комплекса на плазматической мембране включает системы передачи сигнала внутрь клетки: 1) быстрые ионные каналы, 2) вторые посредники — протеинкиназы (эти системы в статье не рассматриваются). Они обеспечивают каскадное усиление эффекта: если действующие концентрации гормонов  $10^{-12}$ — $10^{-6}$  М, то вторых посредников —  $10^{-7}$ — $10^{-6}$  М, субстра-

тов и метаболитов — обычно  $10^{-4}$ — $10^{-2}$  М, т. е. общее усиление достигает  $10^6$ — $10^9$  раз.

Основные принципы исследования гормонов и вторых посредников (специфичность, концентрационный и др.), изложенные в специальном обзоре [3], вполне применимы к поискам ПРД.

**Радиопротекторы рецепторного действия.** Радиозащитный эффект (РЗЭ) гормонов был открыт в 1952 г.; вскоре был показан его рецепторный механизм для холиномиметиков, гистамина и серотонина [23]. К сожалению, в последние 25 лет эти интересные работы не имели продолжения и не соответствуют современным представлениям о холино-, гистамино- и серотонинорецепторах.

Наши исследования были начаты в 1965 г., когда был обнаружен РЗЭ специфического  $\beta$ -агониста изопропилнорадреналина (изадрина) [1]. Дозовые кривые его РЗЭ, а также адреналина, норадреналина и относительно селективного  $\alpha_1$ -агониста фенилэфрина (мезатона) — это кривые с насыщением [2,6]. В пользу рецепторного механизма свидетельствует также стереоспецифичность РЗЭ мезатона. Блокатор нейронального захвата катехоламинов — кокаин увеличивает РЗЭ малых (но не больших) доз адреналина и особенно норадреналина до уровня плато дозовой кривой; РЗЭ почти недепонированных изадрина и мезатона не изменяется [2]. Роль  $\beta$ -адренорецепторов (АР) в РЗЭ изадрина показана его полной блокадой  $\beta$ -адреноантагонистом пропранололом [6,17]. Окончательными доказательствами реализации РЗЭ изадрина через  $\beta$ -АР являются две независимые группы фактов: 1) РЗЭ воспринимается 7 другими  $\beta$ -агонистами разной химической структуры, но отсутствует у ряда их химических аналогов, не стимулирующих  $\beta$ -АР; 2) 3 других  $\beta$ -блокатора также предупреждают или резко снижают РЗЭ изадрина. Протекторами являются агонисты как  $\beta_1$ -АР, так и  $\beta_2$ -АР [6]. Реализация РЗЭ изадрина через  $\beta$ -АР как на млекопитающих, так и на изолированных клетках подтверждена в ряде лабораторий [6, 22].

В отличие от этого РЗЭ адреналина, норадреналина и мезатона  $\beta$ -блокаторы не предупреждают, а даже увеличивают [7,17]. РЗЭ мезатона блокируется 5 сильными  $\alpha_1$ -антагонистами из разных химических групп, включая селективные празозин и коринантин, а 3 разных  $\beta_1$ -блокатора его не снимают [2,7,17]. По косвенным данным, мезатон защищает мышей через  $1\beta$ -подтип АР. Клонидин (клофелин), стимулирующий преимущественно  $\alpha_2$ -АР, в основном через них реализует и свой РЗЭ. Это доказывается блокадой его РЗЭ  $\alpha_2$ -антагонистами пипероксаном, иохимбином и особенно  $\alpha_2$ -селективным раувольсцином, но не  $\alpha_1$ -антагонистами (в том числе селективным коринантином) [7,9]. РЗЭ обладает и более селективный  $\alpha_2$ -агонист гуанбенз [9]. Химические аналоги мезатона и клофелина, не стимулирующие  $\alpha_1$ - и  $\alpha_2$ -АР, не защищают мышей [7]. Хотя природные катехоламины стимулируют все 4 (адреналин) или 3 (норадреналин) типа АР, их РЗЭ реализуется через  $\alpha_1$ -АР, так как он полностью предупреждается лабеталолом ( $\alpha_1$ ,  $\beta_2$ -антагонист) и особенно празозином, но не пипероксаном и иохимбином [7].

Таким образом, как природные (катехоламины), так и синтетические агонисты всех 4 типов АР:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ , — обладают РЗЭ. Теперь общепризнан рецепторный механизм действия этих веществ [22, 23].

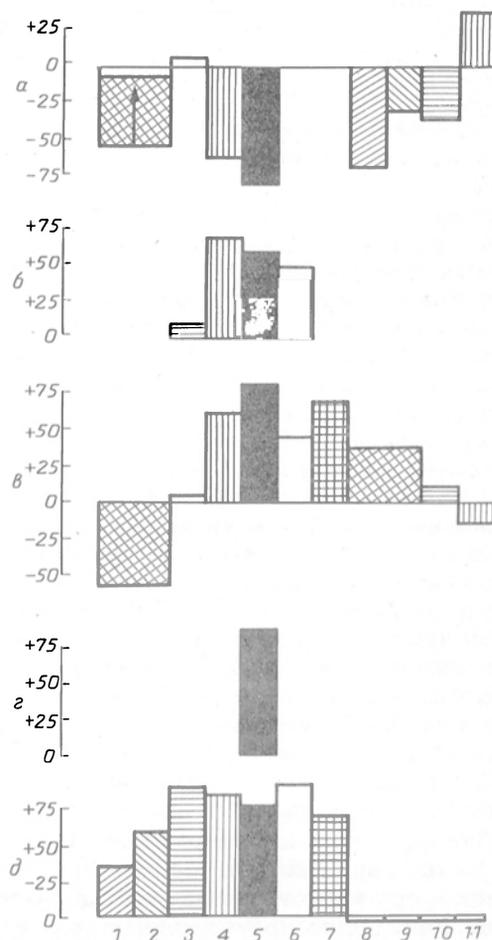
Успехи в исследовании агонистов АР побуждали к распространению рецепторного подхода и на другие регуляторы. ГАМК и вещества, увеличивающие ее концентрацию в тканях, обладают определенным РЗЭ. Сравнение агонистов различных ГАМК-рецепторов показало, что наиболее активен ГАМК<sub>B</sub>-агонист баклофен. Он превосходит как более слабый фенибут, так и ГАМК<sub>A</sub>-агонисты мусцимол и прогабид. Химически близкий к ГАМК, но не действующий на ее рецепторы пирацетам не защищает мышей [4]. Эти данные надо дополнить исследованием блокаторов эффекта ГАМК-рецепторов.

РЗЭ аденозина и аденилатов известен давно, но его считали неспецифическим и объясняли проникновением этих веществ в клетку и превращением в нуклеиновые кислоты и/или макроэрги [5]. Однако мы показали, что высокий и специфический РЗЭ дают только аденозин и аденилаты. Блокатор клеточного захвата аденозина дипиридамолом увеличивает РЗЭ меньших (но не большой) доз аденозина и 5'-АМФ, что опровергает необходимость их проникновения в клетку и метаболизма в ней. Блокатор А-рецепторов теofilлин резко снижает РЗЭ аденозина и аденилатов; более слабые А-блокаторы кофеин и метилизобутилксантин меньше снижают РЗЭ аденозина. Эти данные вместе со сравнительной активностью А-агонистов доказывают, что РЗЭ реализуется через А-рецепторы, а не Р-сайты и не Р<sub>2</sub>-рецепторы аденилатов [5]. Более сильные, специфические и неметаболизируемые А-агонисты N-этилкарбоксамидоаденозин и L-фенилизопропиладенозин дают РЗЭ в дозах, на 3—4 порядка более низких [21].

**Фригопротекторы и фервопротекторы рецепторного действия.** Эти термины введены нами для обозначения средств, защищающих от охлаждения (frig — холод, мороз) и перегревания (ferg — жар, зной) [14, 16]. При остром интенсивном охлаждении блокада симпатико-адреналовой системы и катехоламинов на 3 разных уровнях (ганглии, синапс, АР) резко снижает устойчивость к холоду и терморегуляторные реакции (поддержание температуры тела, увеличение потребления O<sub>2</sub>, накопление в крови метаболитов всех видов обмена, активация дыхания, фосфорилирования и ключевых ферментов митохондрий) [15, 16]. Экзогенные катехоламины и синтетические агонисты АР у интактных животных не дают позитивного эффекта (вероятно, из-за очень высокой мобилизации эндогенных катехоламинов или снижения действия агонистов АР в условиях охлаждения), но на фоне ганглиолитика пирилена, а также удаления надпочечников экзогенные катехоламины восстанавливают устойчивость к холоду [16]. Затем нам удалось обнаружить вещества, защищающие от острого охлаждения интактных животных (фригопротекторы): это малые дозы α<sub>1,2</sub>-блокаторов (фентоламин) и α<sub>2</sub>-блокаторов (пипероксан), а также 4 разных блокатора синтеза простаноидов [15, 16]. Эти эффекты могут быть связаны с потенцированием освобождения в синапс эндогенного норадреналина ввиду блокады тормозных синаптических α<sub>2</sub>-АР и рецепторов простагландина Е.

Наш материал по защите от острого интенсивного перегревания не столь значителен. Удалось показать, что клофелин, нафтизин, аденозин, N-этилкарбоксамидоаденозин, серотонин увеличивают продолжительность жизни при перегревании, при этом эффект аденозина предупреждается теofilли-

ном; клофелин и гуанобенз защищают при ожоговом шоке [10, 11, 14]. Обнаружение реальной защиты от острого интенсивного охлаждения и перегревания и привело нас к необходимости введения терминов "фригопротекторы" и "фервопротекторы" (см. рисунок).



Влияние веществ рецепторного действия на устойчивость мышей к экстремальным состояниям (в процентах от контроля).

1—7 — агонисты рецепторов: 1 — β<sub>1</sub>, 2 — β<sub>2</sub>, 3 — α<sub>1</sub>, 4 — α<sub>2</sub>, 5 — А, 6 — S, 7 — ГАМК<sub>B</sub>; 8—11 — антагонисты рецепторов: 8 — В<sub>1</sub>, 9 — В<sub>2</sub>, 10 — α<sub>1</sub>, 11 — α<sub>2</sub>. Широкие столбики — эффекты неселективных веществ. а — острое охлаждение при -18°C (стрелкой показан эффект катехоламинов на фоне снижения устойчивости пириленом); б — острое перегревание при 65°C; в — гипобарическая гипоксия, "подъем" на 10,5 км; г — полная ишемия головного мозга; д — общее острое облучение в дозе 8 Гр.

**Антигипоксанты рецепторного действия.** Ранее был известен антигипоксический эффект (АГЭ) аденозина, серотонина, холин-, дофамин- и ГАМК-ергических веществ [11, 20], но рецепторный механизм их действия не исследовался. На моделях гипоксической и гиперкапнической гипоксии мы обнаружили АГЭ α<sub>2</sub>-агонистов клофелина и гуанобенза, а также стимулирующих α<sub>1,2</sub>-АР нафтизина и сочетания пропранолол + адреналин, но не α<sub>1</sub>-агониста мезатона и не изадрина и адреналина [10, 12]. α<sub>2</sub>-Антагонисты пипероксан и иохимбин и α<sub>1,2</sub>-антагонист фентоламин (но не α<sub>1</sub>-блокатор празозин) сами несколько снижают устойчивость к гипоксии и значительно снижают или предупреждают АГЭ клофелина [10, 12].

АГЭ аденозина реализуется через А-рецепторы, так как он не снижается, а увеличивается дипиридамолом (блокатором проникновения аденозина в клетку), не воспроизводится не действующим на рецепторы инозином и антагонистом Р-сайтов 2'-де-

зоксиаденозином, снижается А-блокатором теофилином [10, 13], воспроизводится малыми дозами специфических А-агонистов N-этилкарбоксамидоаденозина и L-фенилизопропиладенозина [21].

АГЭ обладают агонист ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов баклофен, серотонин и блокаторы S<sub>2</sub>-рецепторов метилсергид, пизотифен и ципрогептадин [10, 11]. Последнее свидетельствует в пользу значения S<sub>1</sub>-рецепторов в АГЭ, но это требует дополнительной проверки. Клофелин, гуанобенз, нафтизин, аденозин, N-этилкарбоксамидоаденозин, серотонин защищают при гемической и цитотоксической гипоксии [10, 11, 21].

Наши данные и результаты более поздних исследований привели к тому, что в классификации антигипоксантов впервые были выделены "вещества, действующие через рецепторы" [20].

*Антиишемические церебропротекторы рецепторного действия.* В последние годы очень большое внимание привлекает антиишемический эффект (АИЭ) агонистов А-рецепторов. На моделях окклюзии артерий головного мозга, сочетания гипоксии и гипогликемии в опытах на клетках [25] и полной ишемии головного мозга [18, 19, 24] установлено, что различные А-агонисты являются высокоэффективными церебропротекторами, а блокаторы А-рецепторов сами уменьшают устойчивость головного мозга и резко снижают АИЭ А-агонистов. Реализация АИЭ через А-рецепторы доказывается отсутствием активности у инозина, 2'-дезоксиаденозина и ГТФ, меньшей активностью 5'-АМФ, АДФ и АТФ [18], намного более высоким и длительным эффектом N-этилкарбоксамидоаденозина и циклогексиладенозина по сравнению с аденозином и полной блокадой АЭИ всех трех А-агонистов А-антагонистами [19, 25]. АЭИ А-агонистов является центральным и связан с прямой защитой нейронов, так как он отсутствует у веществ, увеличивающих мозговой кровоток (нимодипин, флунаризин и др.), но имеется у соединений, снижающих функциональную активность головного мозга (феназепам, ГОМК и др.) [18], и главное — защитные дозы всех трех А-агонистов при интрацеребровентрикулярном введении на 1—2 порядка меньше, чем при подкожном. АИЭ малых доз, реализуется через А<sub>1</sub>-рецепторы, но при больших дозах он дополняется, вероятно, А<sub>2</sub>-эффектом [24].

*Общие особенности и преимущества ПРД.* Дозовые кривые ПРД — это кривые с насыщением. Это вообще характерно для любых рецепторных эффектов и является доводом, что они имеют место. Из такого характера дозовой кривой вытекают важные следствия: ПРД не стоит применять в высоких дозах, так как это не даст никакого возрастания защитного эффекта, но увеличит количество и выраженность побочных эффектов и токсичность. Оптимальная доза ПРД находится в начале плато дозовой кривой, но лучше несколько правее для запаса надежности.

Другая особенность ПРД — активность в малых дозах и связанный с этим высокий терапевтический индекс —  $K = LD_{50}/ED_{50}$ . Так, специальное исследование показало, что радиопротекторы можно разделить на 3 группы: 1-я — классические серозотсодержащие (цистамин, гаммафос и др.) с  $ED_{50} = 10^3 - 10^{1,6}$  мкмоль/кг и  $K = 10^0 - 10^{1,6}$ ; 2-я — мексамин, серотонин, мезатон, норадреналин с

$ED_{50} = 10^1 - 10^0$  мкмоль/кг и  $K = 10^{1,8} - 10^{2,6}$ ; 3-я — клофелин и изадрин с  $ED_{50} = 10^{-0,5}$  и  $10^{-0,8}$  мкмоль/кг и  $K = 10^3$  и  $10^4$ . Намного более низкие  $ED_{50}$  2-й и 3-й групп, т. е. ПРД, связаны, очевидно, с тем, что эти протекторы включают каскадные механизмы усиления эффекта (см. выше). Преимущество 3-й группы перед 2-й объясняется, очевидно, их большой рецепторной селективностью [8]. Промежуточное положение между 2-й и 3-й группой занимают специфические агонисты А-рецепторов L-фенилизопропиладенозин и N-этилкарбоксамидоаденозин соответственно с  $ED_{50} = 10^{-0,3}$  и  $10^{-1}$  мкмоль/кг и  $K = 10^{1,6}$  и  $10^{1,7}$  [21].

При других экстремальных воздействиях ПРД также превосходят другие протекторы низкими величинами  $ED_{50}$  и высокими K. При гипоксической гипоксии  $ED_{50}$  L-фенилизопропиладенозина и N-этилкарбоксамидоаденозина соответственно равны  $10^{-0,1}$  и  $10^{-1,3}$  мкмоль/кг и  $K = 10^{1,5} - 1,6$ , при этом защитные дозы этих веществ на 3—4 порядка ниже, чем известного антигипоксанта гутимина [21]. При полной ишемии головного мозга  $ED_{50}$  циклогексиладенозина и N-этилкарбоксамидоаденозина соответственно равны  $10^0$  и  $10^{-0,6}$  мкмоль/кг, что намного ниже, чем дозы других, к тому же менее активных, веществ (для N-этилкарбоксамидоаденозина — на 1,5 порядка ниже, чем для галоперидола и феназепама, и на 4 порядка ниже, чем для ГОМК) [18, 19, 24].

В целом достоинства ПРД могут быть кратко сформулированы следующим образом [10, 11]: 1) физиологический, регуляторный характер действия, воспроизводящий естественные защитные реакции организма; 2) возможность оптимального подбора протекторов в зависимости от длительности воздействия; 3) возможность срочной модуляции или обращения нежелательных эффектов при помощи антагонистов, в том числе вводимых после воздействия; 4) низкие  $ED_{50}$  — на 2—4 порядка ниже, чем у традиционных протекторов; 5) высокие терапевтические индексы — на 2—4 порядка ниже; 6) возможность комплексной и высокоэффективной защиты одним веществом от целого ряда экстремальных воздействий: агонисты  $\alpha_2 =$  и А-рецепторов, а также баклофен и серотонин успешно защищают от облучения, разных форм гипоксии, перегревания;  $\alpha_2$ -агонисты — и от ожогового шока и операционной травмы, А-агонисты — и от ишемии головного мозга. Для таких веществ мы предложили термин "полипротекторы" [10, 11]. Сводные результаты применения ПРД при разных экстремальных состояниях приведены на рисунке.

Важной биологической основой для поисков протекторов может быть представление о наличии у обычных незимнеспящих млекопитающих не только гиперкатаболической стрессовой стратегии резистентности, но и гипобиотической стратегии толерантности. Если первая используется при охлаждении, физической нагрузке, травме и реализуется прежде всего катехоламинами ( $\alpha_1$ - и  $\beta$ -АР) и глюкокортикостероидами, то вторая стратегия используется при перегревании, гипоксии и реализуется аденозином (А-рецепторы), катехоламинами ( $\alpha_2$ -АР), ГАМК (ГАМК<sub>B</sub>-рецепторы), серотонином и, вероятно, некоторыми другими гормонами. При облучении эффективны обе стратегии [11].

Нет сомнения, что ПРД — перспективная группа высокоактивных и малотоксичных лекарств. Их

открытие и изучение — яркий пример эффективности биохимических идей и подходов для развития экспериментальной профилактики экстремальных состояний и шире — для фармакологии в целом.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Кулинский В. И. // Вопросы экспериментальной и клинической радиологии. — Киев, 1965. — Вып. 1. — С. 91—95.
2. Кулинский В. И. // Радиобиология. — 1970. — Т. 10, № 6. — С. 887—891.
3. Кулинский В. И. // Успехи соврем. биол. — 1980. — Т. 90, № 3(6). — С. 382—393.
4. Кулинский В. И., Климова А. Д. // Радиобиология. — 1993. — Т. 33, № 1. — С. 131—136.
5. Кулинский В. И., Климова А. Д., Филиппович И. В. // Там же. — 1988. — Т. 28, № 2. — С. 230—235.
6. Кулинский В. И., Климова А. Д., Яшунский В. Г., Алпатова Т. В. // Там же. — 1985. — Т. 25, № 6. — С. 738—743.
7. Кулинский В. И., Климова А. Д., Яшунский В. Г., Алпатова А. Д. // Там же. — 1986. — Т. 26, № 1. — С. 11—16.
8. Кулинский В. И., Ковтун В. Ю., Климова А. Д., Яшунский В. Г. // Там же. — 1992. — Т. 32, № 6. — С. 896—900.
9. Кулинский В. И., Ковтун В. Ю., Климова А. Д., Яшунский В. Г. // Там же. — 1993. — Т. 33, № 2(5) — С. 683—686.
10. Кулинский В. И., Ольховский И. А. // Фармакологическая коррекция гипоксических состояний / Под ред. Л. Д. Лукьяновой. — М., 1989. — С. 133—143.
11. Кулинский В. И., Ольховский И. А. // Успехи соврем. биол. — 1992. — Т. 112, № 5—6. — С. 697—714.
12. Кулинский В. И., Ольховский И. А., Ковалевский А. Н. // Бюл. exper. биол. — 1986. — № 6. — С. 669—671.
13. Кулинский В. И., Ольховский И. А., Ковалевский А. Н. // Вопр. мед. химии. — 1987. — № 3. — С. 107—111.
14. Кулинский В. И., Ольховский И. П., Плотников Н. Ю. // Физиология экстремальных состояний и индивидуальная защита человека / Под ред. Е. И. Воробьева. — М., 1986. — С. 339.
15. Кулинский В. И., Плотников Н. Ю. // Бюл. Сиб. отд. АМН СССР. — 1983. — № 5. — С. 11—19.
16. Кулинский В. И., Плотников Н. Ю. // Фармакологическая регуляция состояний дезадаптации / Под ред. Ю. Г. Бобкова. — М., 1986. — С. 119—127.
17. Кулинский В. И., Симон И. Б. // Бюл. exper. биол. — 1969. — № 4. — С. 63—66.
18. Кулинский В. И., Усов Л. А., Суфианова Г. З. // Там же. — 1993. — № 1. — С. 46—47.
19. Кулинский В. И., Усов Л. А., Суфианова Г. З. и др. // Экспер. и клин. фармакол. — 1993. — Т. 56, № 6. — С. 13—16.
20. Лукьянова Л. Д. // Фармакологическая коррекция гипоксических состояний / Под ред. Л. Д. Лукьяновой. — М., 1989. — С. 11—14.
21. Ольховский И. А., Кулинский В. И., Климова А. Д. и др. // Экспер. и клин. фармакол. — 1992. — № 3. — С. 72—73.
22. Соболев А. С. Радиационная биохимия циклических нуклеотидов. — М., 1987.
23. Суворов Н. Н., Шашков В. С. Химия и фармакология средств профилактики радиационных поражений. — М., 1975.
24. Kulinsky V. I., Usov L. A., Sufianova G. Z. // International Symposium of Japan — Russia Medical Exchange Foundation, 1-st: Proceeding — Niigata, 1993. — P. 294—297.
25. Rudolphi K. A., Schubert P., Parkinson F. E., Fredholm B. B. // Trends pharmacol. Sci. — 1992. — Vol. 13, N 12. — P. 439—445.

Поступила 25.01.94

#### PROTECTORS OF THE RECEPTOR ACTION UNDER EXTREMAL CONDITIONS

V. I. Kulinsky

Medical School, Irkutsk

High effectivity of the protectors of receptor action was detected in acute irradiation, cooling, heating, hypoxia and cerebral ischemia. They proved to be independent class of protectors. Their advantages were shown as follows: especially small values of ED<sub>50</sub>, low toxicity and simultaneous protection from many harmful factors.

© Т. Д. ЧЕРКАСОВА, В. А. ЮРКИВ, 1994  
УДК 616.155.25-008.1-02:615.919:579.843.951-07

Т. Д. Черкасова, В. А. Юркив

#### ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ СИСТЕМ В ТРОМБОЦИТАХ ПОД ВЛИЯНИЕМ ЧУМНОГО ТОКСИНА

Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии, Москва

Геморрагический диатез на почве нарушения функционального состояния и изменения числа тромбоцитов играет важную роль в патогенезе чумы и экспериментальной чумной интоксикации [1, 2, 4, 16]. Ранее мы показали, что чумной токсин (ЧТ) (II фракция, по Е. Е. Baker), введенный внутривенно крысам, вызывает снижение агрегационной способности тромбоцитов в ответ на тромбин, обусловленное изменением в клетках концентрации циклических нуклеотидов и простагландинов [3]. Выявленные изменения функционального состояния клеток *in vivo* могут быть связаны как с непосредственным эффектом ЧТ на тромбоциты, так и с развитием комплекса гемодинамических и метаболических нарушений в организме животного, обусловленных интоксикацией. Эффект ЧТ на функциональную активность и регуляторные системы тромбоцитов человека изучен недостаточно. В связи с этим в работе мы исследовали агонистиндуцируемую агрегацию тромбоцитов человека, а также состояние цАМФ-, цГМФ- и Ca<sup>2+</sup>-регуляторных механизмов в этих клетках при воздействии ЧТ.

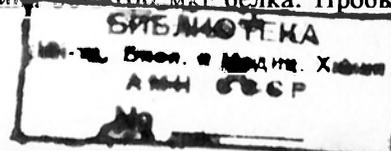
**Методика.** Токсин чумного микроба ЕВ-76, штамм 1290, линия НИИЭГ, приготовленный по Е. Е. Baker и соавт. [6] (II фракция), был получен в Ростовском-на-Дону противочумном научно-исследовательском институте. Летальная активность (ЛД<sub>50</sub>) для мышей массой 16—18 г составляла 15—17 мкг.

Получение тромбоцитов, включение в них флюоресцентного кальциевого зонда фура 2/АМ и определение концентрации Ca<sup>2+</sup> проводили, как описано [7]. Базальный уровень свободного внутриклеточного кальция был 87±23 нМ (*n* = 10).

АДФ-индуцируемую агрегацию суспензии отмытых от плазмы тромбоцитов проводили по методу [10] в среде, содержащей 150 мМ NaCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2,7 мМ KCl, 0,37 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 мМ глюкозы, 10 мМ HEPES-NaOH pH 7,4, 1 мМ CaCl<sub>2</sub>, 0,5 мг/мл фибриногена.

Содержание цАМФ и цГМФ определяли с использованием радиоиммунологических наборов фирмы "Amersham" (Англия) в присутствии 0,1 мМ 3-изобутил-1-метилксантина в суспензии тромбоцитов.

Активность аденилатциклазы (АЦ) в препарате токсина в тромбоцитах определяли по методу [13], гуанилатциклазы (ГЦ) — по модифицированному методу [20]. Для определения ГЦ в тромбоцитах клетки разрушали 3-кратным замораживанием — оттаиванием в жидком азоте. Активность ГЦ измеряли в среде, содержащей 50 мМ трис-HCl pH 7,6, 30°C, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ ГТФ [2—3·10 cpm] (α-<sup>32</sup>P-ГТФ), 2 мМ теofilлина, 0,1% (масса/объем) бычьего сывороточного альбумина, 15 мМ креатинфосфата, 135 ед/мл креатинфосфокиназы, 5 мМ цГМФ. Конечный объем 50 мкл, концентрация токсина 50—100 мкг белка. Пробы ин-



кубировали 15 мин при 30 °С, останавливали реакцию 200 мкл 0,5 н.НСl, кипятили 9 мин, охлаждали и нейтрализовали 200 мкл 1,5 М имидазола. Содержимое пробирок наносили полностью на колонки с 1 г окиси алюминия (нейтральной по Брокману), предварительно уравновешенной 10 мМ имидазола рН 7,4 (5 мл), промывали 10 мл 10 мМ имидазола. Выход цГМФ составлял 90—100%.

Содержание белка определяли по [19].

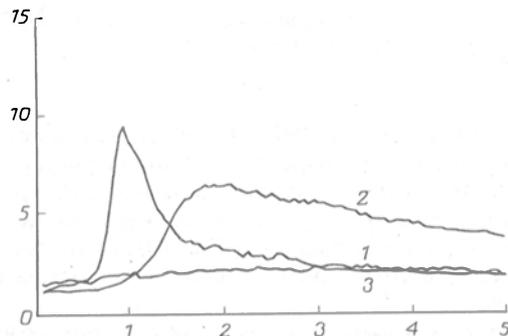


Рис. 1. Влияние исходного препарата ЧТ на АДФ-стимулированную агрегацию тромбоцитов человека.

По оси абсцисс — время, мин; по оси ординат — размеры агрегации, отн. ед. Тромбоциты суспендировали в модифицированном растворе Тироде. 1 — клетки, не обработанные токсином, 2 — клетки, обработанные в течение 2 мин токсином, 20 мкг/мл, 3 — 60 мкг/мл. Концентрация АДФ  $5 \cdot 10^{-7}$  М.

**Результаты и обсуждение.** Определение АДФ-индуцируемой агрегации тромбоцитов с помощью нового метода, основанного на анализе флуктуаций светопропускания, вызванных изменением количества тромбоцитов и их агрегатов в тонком лазерном оптическом канале [10], показало, что агрегация клеток, отмытых от плазмы крови и обработанных в течение 2 мин токсином, была сниженной в сравнении с контролем (рис.1). Следует отметить, что токсин оказывал более выраженное действие на клетки, отмытые от плазмы крови. Это, по-видимому, обусловлено связыванием части молекул токсина с плазменными белками или клеточными структурами крови (данные не представлены). Следует подчеркнуть, что ЧТ, инкубированный с тромбоцитами в течение 20—30 мин, не вызывал их

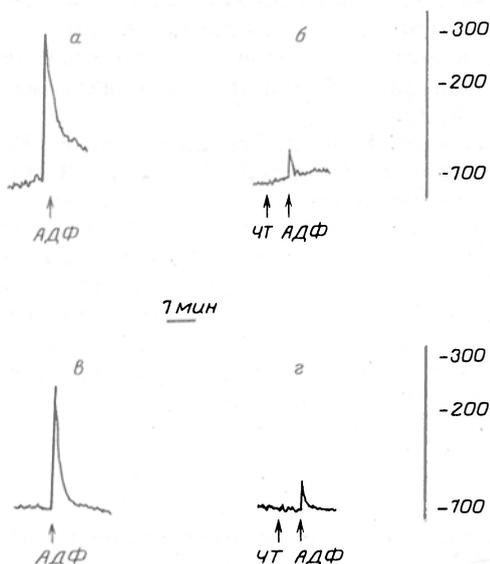


Рис. 2. АДФ-индуцированное изменение  $Ca^{2+}$  в тромбоцитах, нагруженных фура-2/АМ.

По оси абсцисс — время, мин; по оси ординат — концентрация  $Ca^{2+}$ , нМ. Клетки суспендировали в модифицированной среде Тироде, содержащей 1 мМ  $CaCl_2$  (а, б) и 1 мМ ЭГТА (в, г), в отсутствие токсина (а, в) и после обработки 2 мин исходным препаратом токсина — 40 мкг/мл (б, г). Концентрация АДФ  $5 \cdot 10^{-7}$  М.

самопроизвольной агрегации и ингибирующий эффект токсина был дозозависимым (см. рис.1).

Известно, что агрегация, изменение формы тромбоцитов, секреция внутриклеточных гранул, возникающая под действием гормонов, опосредуется повышением концентрации цитоплазматического кальция. Подобное влияние на клетки оказывают такие вещества, как тромбин, вазопрессин, АДФ, фактор активации тромбоцитов (ФАТ) и др. Действие этих веществ опосредуется специфическими рецепторами, расположенными на внешней поверхности плазматической мембраны и способными с высоким сродством связывать соответствующие гормоны [21].

Как видно на рис. 2, а, обработка тромбоцитов, нагруженных фура 2/АМ, АДФ ( $5 \cdot 10^{-7}$  М), вызывает резкое повышение концентрации свободного внутриклеточного кальция, развивающееся в течение нескольких секунд. Инкубация клеток в присутствии 40 мкг/мл ЧТ значительно снижает активирующее влияние агониста (рис. 2, б). Инкубация тромбоцитов в течение 5—10 мин в присутствии ЧТ не сопровождается изменением базального уровня внутриклеточного кальция. Блокирующий эффект определяется дозой токсина (рис.3) и практически

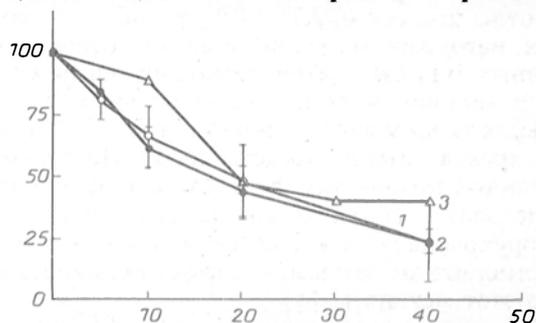


Рис. 3. Зависимость агонистиндуцируемого содержания  $Ca^{2+}$  в тромбоцитах, нагруженных фура-2/АМ, от концентрации токсина.

По оси абсцисс — концентрация ЧТ, мкг белка/мл; по оси ординат — увеличение  $Ca^{2+}$ , % от контроля. Время преинкубации с токсином 2 мин. 1 — АДФ,  $5 \cdot 10^{-7}$  М. 2 — ФАТ,  $10^{-9}$  М, 3 — тромбин, 0,01 ед./мл.

не зависит от используемого агониста. 50% блокирование повышения уровня  $Ca^{2+}$  наблюдается при концентрации ЧТ, равной 20 мкг/мл, при использовании таких индукторов агрегации, как АДФ, ФАТ, тромбин. Как видно на рис. 4, блокирующий эффект развивается уже через 1—1,5 мин преинкубации клеток с токсином.

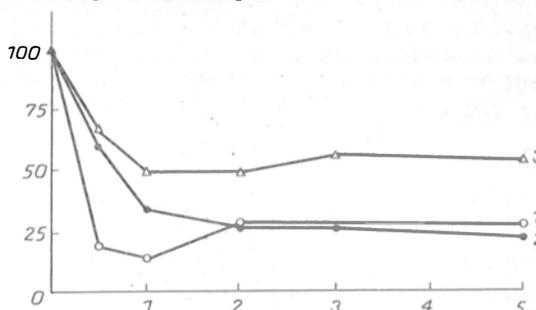


Рис. 4. Зависимость агонистиндуцируемого содержания  $Ca^{2+}$  в тромбоцитах, нагруженных фура-2/АМ, от времени преинкубации с неоднородным препаратом токсина (40 мкг/мл).

По оси абсцисс — время инкубации с ЧТ, мин; по оси ординат — содержание  $Ca^{2+}$ , % от контроля. 1 — АДФ,  $5 \cdot 10^{-7}$  М, 2 — ФАТ,  $10^{-9}$  М, 3 — тромбин, 0,01 ед./мл.

Известно, что большинство гормонов, активирующих тромбоциты, повышают уровень  $Ca^{2+}$  не только за счет выброса из мембран эндоплазматического ретикулума, но и за счет активации входа

этих ионов из внеклеточного пространства [21]. Наличие рецепторактивируемого входа кальция в тромбоциты подтверждено рядом авторов [5,15]. Представлялось интересным исследовать, какой именно путь увеличения  $\text{Ca}^{2+}$  блокируется ЧТ. Как видно на рис. 2, в, удаление ионов кальция из внеклеточной среды с помощью известного хелатора ионов — ЭГТА приводит к уменьшению величины АДФ-индуцируемого кальциевого ответа. Компонента кальциевого сигнала, сохраняющаяся в бескальциевой среде, соответствует выбросу  $\text{Ca}^{2+}$  из ретикулула, в то время как компонента, исчезающая при добавлении ЭГТА, по-видимому, отражает вход ионов кальция из внешней среды. Как видно на рис. 2, б, г, прединкубация тромбоцитов с токсином приводит к ингибированию  $\text{Ca}^{2+}$  независимо от присутствия или отсутствия кальция в среде инкубации. Таким образом, можно заключить, что токсин блокирует не только выброс ионов кальция из мембран эндоплазматического ретикулула, обусловленный влиянием инозит-1,4,5-трисфосфата, образующегося при гормональной активации фосфолипазы С, но и также вход кальция в цитоплазму тромбоцитов из внеклеточной среды. Мы установили, что сигнал флуоресценции зонда, возникающий в ответ на агонист (ФАТ, АДФ, тромбин) в тромбоцитах, нагруженных квин-2 и предварительно обработанных ЧТ, был значительно снижен по сравнению с величиной сигнала контрольных клеток в условиях замены внеклеточных ионов  $\text{Ca}^{2+}$  на ионы  $\text{Ba}^{2+}$  (результаты не представлены). По-видимому, эти данные можно рассматривать как дополнительное доказательство блокады под действием ЧТ рецептуруправляемых кальциевых каналов, так как известно, что агонисты активируют вход ионов  $\text{Ba}^{2+}$  через этот механизм [5].

Известно, что активаторы АЦ, ГЦ, а также ингибиторы фосфодиэстеразы, повышая уровень циклических нуклеотидов, блокируют агрегацию тромбоцитов и уменьшают влияние гормонов и агонистов на уровень внутриклеточного кальция [17,18]. Все эти эффекты циклических нуклеотидов реализуются через соответствующие протеинкиназы и коррелируют с фосфорилированием ряда белков [22]. Микробные клетки содержат свою систему метаболизма циклического аденозинмонофосфата, и в некоторых случаях бактериальные АЦ способны проникать внутрь эукариотической клетки и резко увеличивать в ней уровень цАМФ [8,12]. При исследовании влияния ЧТ на содержание цАМФ и цГМФ в тромбоцитах человека было выявлено, что токсин незначительно влиял на уровень цАМФ, но резко увеличивал концентрацию цГМФ. Влияние

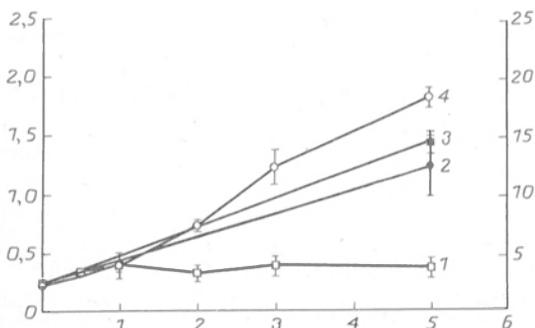


Рис. 5. Влияние ЧТ на содержание цАМФ и цГМФ в тромбоцитах.

По оси абсцисс — время, мин; по оси ординат: справа — содержание цАМФ, пмоль/ $10^7$  клеток, слева — содержание цГМФ, пмоль/ $10^7$  клеток. 1 и 4 — цАМФ и цГМФ в присутствии ЧТ, 40 мкг/мл, 2 — цГМФ в присутствии нитропруссид натрия,  $10^{-4}$  М, 3 — цАМФ в присутствии форсколина,  $10^{-6}$  М.

Активация ГЦ тромбоцитов человека при действии различных препаратов ЧТ

Препараты токсина	ГЦ, пмоль на 1 мг белка в 1 мин
Тромбоциты (без токсина)	$1,6 \pm 0,01$
Тромбоциты + исходный ЧТ (40 мкг/мл)	$2,1 \pm 0,05$
Тромбоциты + инактивированный нагреванием ЧТ (40 мкг/мл)	$2,4 \pm 0,07$
Тромбоциты + ЧТ, полученный гелефильтрацией на сефадексе G-75 (10 мкг/мл)	$5,2 \pm 0,5$

ЧТ на содержание цГМФ в клетках было даже более выраженным, чем эффект нитропруссид натрия — известного активатора цитозольной ГЦ (рис. 5). Следует подчеркнуть, что используемые в нашей работе препараты токсина (ЧТ, ФЧТ) не выявляли как аденилатциклазной, так и гуанилатциклазной активности.

Обнаруженный нами факт повышения концентрации цГМФ в тромбоцитах под действием ЧТ свидетельствует о наличии в препарате ЧТ либо активатора ГЦ, либо ингибитора ФДЭ. Как видно из таблицы, ЧТ и различные его фракции, обладающие способностью блокировать АДФ-зависимое повышение внутриклеточного кальция, вызывают активацию ГЦ гомогената суспензии тромбоцитов. Гельфильтрация инактивированного нагреванием ЧТ на сефадексе G-75 в 0,25 мМ натрий-фосфатном буфере pH 7,4, 150 мМ NaCl позволила выделить фракцию (ФЧТ), вызывающую повышение активности ГЦ тромбоцитов в 3 раза в сравнении с контрольными клетками.

Таким образом, обнаруженный и выделенный нами белок из *Y. pestis* является активатором ГЦ и способен проникать внутрь тромбоцитов человека, повышая в них содержание цГМФ.

Следует отметить, что активаторы мембранной ГЦ обнаружены среди группы термостабильных энтеротоксинов многих грамотрицательных бактерий [11, 14]. Однако мы не нашли работ, свидетельствующих о наличии рецепторов к термостабильным энтеротоксинам на тромбоцитах животных и человека. Наличие рецепторов к этим токсинам показано лишь для энтероцитов и эндотелиальных клеток почек [9, 23].

Таким образом, II фракция, по Е. Е. Вакер, полученная из бактерий *Y. pestis* EB-76, штамм 1290, содержит активатор ГЦ, способный взаимодействовать с тромбоцитами человека. Активация процессов цГМФ-зависимого фосфорилирования в тромбоцитах в свою очередь приводит к блокированию гормониндуцируемого повышения уровня цитоплазматического кальция и агрегации клеток, что, по-видимому, может играть важную роль в патогенезе чумной интоксикации.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Домарадский И. В. Очерки патогенеза чумы. — М., 1966. — С. 272.
2. Коробков Г. Г., Мейерова Е. А. // Пробл. особо опасных инфекций. — 1970. — Вып. 2. — С. 150—152.
3. Черкасова Т. Д. // Журн. микробиол. — 1991. — № 4. — С. 9—11.
4. Шальгина Н. Б., Шенелева Г. К., Титов В. В. и др. // Пробл. особо опасных инфекций. — Саратов, 1988. — С. 33—39.

5. Avdonin P. V., Cheglakov I., Tkachuk V. A. // *Europ. J. Biochem.* — 1991. — Vol. 198. — P. 267—273.
6. Baker E. E., Sommer M., Foster L. E., Meyer K. F. // *J. Immunol.* — 1952. — Vol. 68. — P. 131—138.
7. Conrad G. W., Rink T. J. // *J. Cell. Biol.* — 1986. — Vol. 103. — P. 439—450.
8. Donovan H. G., Storm D. R. // *J. Cell. Physiol.* — 1990. — Vol. 145. — P. 444—449.
9. Ivens K., Gazzano H., Hanley P., Waldman S. A. // *Infect. Immun.* — 1990. — Vol. 58. — P. 1817—1820.
10. Gabbasov L. A., Popov E. G., Gavrilov I. // *Thrombos. Res.* — 1989. — Vol. 54, N 3. — P. 215—223.
11. Gazzano H., Wu H. I., Waldman S. A. // *Infect. Immun.* — 1991. — Vol. 59. — P. 1552—1557.
12. Gentile F., Knipling L. G., Sackett D. L. et al. // *J. Biol. Chem.* — 1990. Vol. 265, N 18. — P. 10686—10692.
13. Gordon V., Young W., Lechler S. et al. // *Ibid.* — 1989. — Vol. 264. — P. 14792—14796.
14. Guazzino A., Giannella R., Thompson M. R. // *Infect. Immun.* — 1989. — Vol. 57. — P. 649—652.
15. Hallam T. J., Rink T. J. // *FEBS Lett.* — 1985. — Vol. 186. — P. 175—179.
16. Leung K. G., Reisner B. S., Straley S. // *Infect. Immun.* — 1990. — Vol. — P. —
17. Nakashima S., Tohnatsu T., Hattori H. et al. // *Biochem. biophys. Res. Commun.* — 1986. — Vol. 135. — P. 1099—1104.
18. Packham M. A. // *Trombos. Haemostas.* — 1983. — Vol. 50. — P. 610—619.
19. Petersen G. L. // *Analyt. Biochem.* — 1947. — Vol. 83. — P. 346—356.
20. Schulz S., Singh S., Bellet R. A. et al. // *Cell.* — 1989. — Vol. 58. — P. 1155—1162.
21. Siess W. // *Physiol. Rev.* — 1989. — Vol. 69. — P. 58—178.
22. Waldmann R., Bauer S., Gobel C. et al. // *Europ. J. Biochem.* — 1986. — Vol. 158. — P. 203—210.
23. White A. A., Krauze W. J., Turner J. T., Forte L. R. // *Biochem. biophys. Res. Commun.* — 1989. — Vol. 159. — P. 363—367.

Поступила 17.03.94

#### EFFECTS OF THE TOXIN FROM YERSINIA PESTIS ON THE FUNCTION OF THE REGULATORY SYSTEMS IN PLATELETS.

T. D. Cherkasova, V. A. Yurkiv

Central Institute of Epidemiology, Moscow

*Yersinia pestis* toxin (II fraction by E. Baker) inhibited aggregation of human platelets as well as elevation of  $Ca^{2+}$ , induced by different agonists ADP, PAF, thrombin. Agonist-induced  $Ca^{2+}$  mobilization and  $Ca^{2+}$  influx were dose-dependently inhibited by the toxin. The effect was rapid, developing during the first minute of incubation with the toxin. In contrast to murine lethal protein the platelet inhibitory activity was thermostable. The action of thermostable factor on platelets was accompanied by elevation of cellular cGMP level. This factor of *Y. pestis* activated guanylate cyclase in human platelets.

© Т.Л. Дьяконова, В.П. Реутов, 1994

УДК 616.8-091.81-02.546.173]-092.9-07

Т.Л. Дьяконова, В.П. Реутов

#### НИТРИТЫ БЛОКИРУЮТ $Ca$ -ЗАВИСИМОЕ ПРИВЫКАНИЕ НЕЙРОНОВ НА УРОВНЕ ЭЛЕКТРОВОЗБУДИМОЙ МЕМБРАНЫ: ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ ОКИСИ АЗОТА

Институт биологии развития РАН, Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва

Вплоть до 80-х годов окись азота (NO), нитриты ( $NO_2$ ) и нитраты ( $NO_3$ ) рассматривали как чужеродные для организма соединения — ксенобиотики [2]. Однако позднее было показано, что окись азота синтезируется в организме из L-аргинина при участии фермента NO-синтазы [17, 21]. Являясь короткоживущим соединением, NO в присутствии кисло-

рода и его активированных форм может превращаться в нитриты и нитраты [19, 20]. При этом как эндогенные, так и экзогенные нитриты и нитраты в свою очередь могут быть еще одним источником NO в организме. Показано, что ионы  $NO_2^-$  восстанавливаются в окись азота при участии гемсодержащих белков, находящихся в дезоксиформе [2, 9]. Накопившиеся данные о физиологической роли NO позволили отнести эту молекулу к вторичным посредникам, при этом было установлено, что основной функцией NO является активация растворимой гуанилатциклазы и как следствие повышение уровня цГМФ в клетках-мишенях [10, 11, 26]. В последние годы показано также, что NO, активируя растворимую гуанилатциклазу, а также АДФ-рибозилтрансферазу, регулирует внутриклеточную концентрацию  $Ca^{2+}$ : повышение синтеза NO приводит к снижению содержания свободного  $Ca^{2+}$  в клетках [7, 10]. Именно способность NO регулировать внутриклеточную концентрацию  $Ca^{2+}$  дает основание предполагать причастность ее к различным  $Ca^{2+}$ -зависимым функциям и процессам, в том числе и в нервной системе.

В связи с этим в настоящей работе исследовалось влияние экзогенного нитрита ( $NaNO_2$ ) на пластические свойства идентифицированных нейронов мозга виноградной улитки, а именно на способность нейронов привыкать к внутриклеточной стимуляции повторяющимися импульсами тока. Ранее было показано, что развивающееся при этом привыкание обусловлено пластическими свойствами электровозбудимой мембраны нейрона и связано прежде всего с повышением вхождения  $Ca^{2+}$  в клетку [4, 6]. Предполагалось, что нитриты как источник NO могут влиять на  $Ca^{2+}$ -зависимые механизмы привыкания. Другой предпосылкой для проведения этой работы послужили уже существующие данные о причастности NO к пластичности синапсов: к их длительной потенциации или депрессии [23, 24]. Следовые изменения эффективности синапсов являются, как известно, одним из механизмов нейрональной пластичности, лежащих в основе обучения, и других форм пластичности в нервной системе. В данном случае исследовали возможную роль NO в регуляции другого механизма нейрональной пластичности — пластических свойств электровозбудимой мембраны.

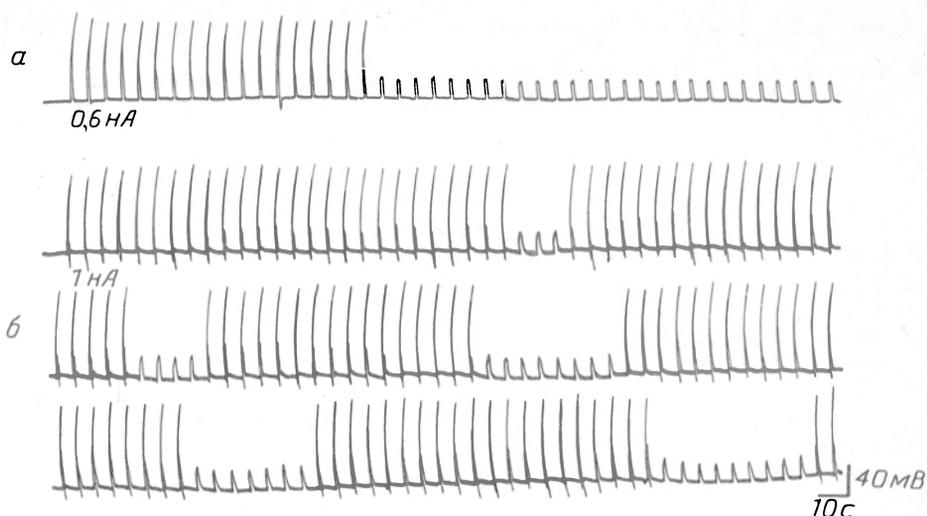
Проведены также исследования действия нитрита на характер ответов на стимуляцию нейронов с иными пластическими свойствами электровозбудимой мембраны — не привыкающих к внутриклеточной стимуляции.

В работе, помимо физиологически адекватных концентраций нитритов ( $10^{-6}$ — $10^{-5}$ М), использовали концентрации, на 1—2 порядка их превосходящие. В экологически неблагоприятных условиях организм реально подвергается действию высоких концентраций нитритов. Нам представлялось интересным выяснить возможные последствия таких воздействий на исследуемой экспериментальной модели.

**Методика.** Работа проведена на идентифицированных нейронах виноградной улитки *Helix lucorum* с различными пластическими свойствами электровозбудимой мембраны: привыкающих и не привыкающих к ритмической внутриклеточной стимуляции импульсами тока. Детальное описание этих клеток, их расположение в париетальных ганглиях, а также способ приготовления препарата мозга для электрофизиологических исследований

Рис. 1. Действие нитрита натрия ( $5 \cdot 10^{-5}$  М) на пластические свойства привыкающего нейрона ЛПа3.

а — привыкание нейрона ЛПа3 к стимуляции в контроле; б — отсутствие привыкания у того же нейрона через 20 мин после введения нитрита натрия в среду, клетка отвечает на стимуляцию длительное время с периодическим выключением ответа на 0,5 — 1 мин. Все три записи — продолжение одна другой.



были описаны ранее [4]. Пластические свойства нейронов исследовали при внутриклеточной стимуляции их импульсами постоянного тока пороговых значений длительностью 1 с, частотой 0,2 Гц. Пороговым считали значение тока, при котором клетка генерировала 1 потенциал действия (ПД) на 1 импульс. Стимуляцию и регистрацию активности нейрона осуществляли через один внутриклеточный электрод с использованием усилительной системы М707, снабженной мостовой схемой (WPI, США). Изменения в электрическом ответе клеток на повторяющуюся стимуляцию рассматривали как проявление пластических свойств электровозбудимой мембраны нейрона. Необратимое выключение ответов в процессе стимуляции по своим характеристикам соответствует одной из форм нейрональной пластичности — привыканию.

Исследования проводили в камере с протоком, в ходе эксперимента основной физиологический раствор заменяли раствором с добавлением различных фармакологических препаратов. В отдельных случаях вещества вводили в камеру микропипеткой. Исследовали действие следующих веществ на пластичность электрического ответа идентифицированных нейронов: нитрита натрия,  $\text{Ca}^{2+}$ -ионофора А23187 ("Calbiochem", США), нитропруссид, имидазола ("P-L-Biochemical Inc.", США). Было исследовано 25 нейронов у 15 улиток.

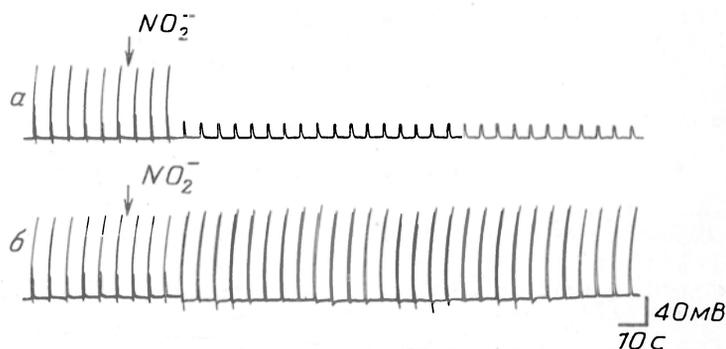
Результаты и обсуждение. 1. Действие нитрита натрия на привыкающие нервные клетки (ПК). Из описанных ранее ПК [4] в настоящей работе исследовались клетки ЛПа2, ЛПа3, ППа2, ППа3, а также "белые" клетки из левого и правого паристальных ганглиев. В контроле эти клетки выключают ответ через 1—3 мин после

начала стимуляции, в некоторых случаях уже на 3—5-й импульс (рис. 1). Продолжение стимуляции не приводит к восстановлению ответов.

Предварительное инкубирование изолированного мозга улитки в среде с нитритом натрия ( $10^{-6}$ — $10^{-5}$  М) в течение 10—30 мин существенно изменяет характер ответов ПК на ритмическую стимуляцию. Развития типичного привыкания не происходит, клетки отвечают на стимуляцию в течение длительного времени, однако при этом наблюдается периодическое выключение ответов на 0,5—1 мин и затем их восстановление на 1—2 мин. Такая периодичность в ответах сохраняется все время, пока нитрит присутствует в среде (наблюдение около 1 ч), и еще более 1 ч после его отмывания. В концентрациях  $10^{-6}$ — $10^{-5}$  М нитрит не дает быстрого эффекта, введение его в среду на фоне развивающегося привыкания не вызывает заметных сдвигов мембранного потенциала (МП), изменений в характере ответов на стимуляцию и не предотвращает привыкания (рис. 2, а). Однако серотонин может потенцировать быстрое действие нитрита. В присутствии серотонина нитрит дает эффект менее чем через 1 мин после введения: ответы на стимуляцию в этом случае не выключаются, а, напротив, могут усиливаться и сохраняются длительное время (рис. 2, б). В свою очередь предварительное введение в среду нитрита натрия усиливает и продлевает эффект блокирования привыкания серотонином (рис. 3).

Чтобы проверить, связано ли блокирование привыкания нитритом с активирующим действием NO на гуанилатциклазу и, следовательно, с повышением уровня цГМФ в клетке, исследовали действие на привыкание активатора гуанилатциклазы нитропруссид. Показано, что нитропруссид ( $4 \cdot 10^{-4}$  М),

Рис. 2. Потенцирование серотонином ( $10^{-5}$  М) быстрого эффекта нитрита натрия ( $10^{-5}$  М) на привыкающем нейроне ЛПа3. Действие нитрита натрия в контроле (а) и в присутствии серотонина (б).



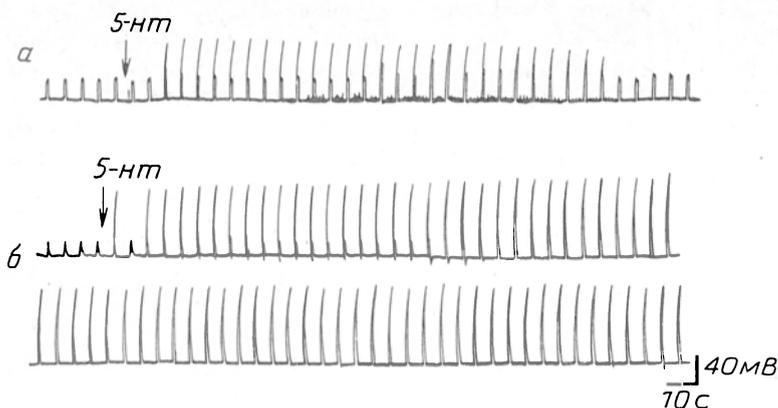


Рис. 3. Потенцирование нитритом натрия ( $10^{-5}$  М) эффекта блокирования привыкания нейрона ЛПаЗ серотонином ( $10^{-5}$  М). Эффект серотонина в контроле (а) и в присутствии нитрита натрия (б).

так же как нитрит, блокирует привыкание нейронов к стимуляции. Однако его эффект менее выражен, ответы нейрона на стимуляцию восстанавливаются на несколько минут, а затем выключаются снова и не возобновляются, несмотря на присутствие нитропруссиды в среде. Ответы не восстанавливались и при введении дополнительной порции нитропруссиды.

В серии опытов исследовали действие на ПК высоких концентраций нитрита натрия, порядка  $10^{-4}$  —  $10^{-3}$  М. В этом случае прежде всего отсутствовала большая латентность эффекта, отмеченная для более низких концентраций. Блокирование привыкания происходило не позже чем через 1 мин после введения нитрита, при этом медленно развивалась небольшая деполяризация, за 30 мин на несколько милливольт. Блокирование привыкания было устойчивым, ответы не выключались в течение всего эксперимента (до 4 ч), отсутствовала отмеченная для меньших доз нитрита периодичность ответов. Отмывание нитрита в течение 1—1,5 ч не восстанавливало привыкания у исследовавшихся нейронов.

Был проведен эксперимент, в котором изменения пластических свойств ПК под влиянием высоких доз нитрита контролировались в течение 7 сут. В 1-е сутки препарат изолированного мозга инкубировали в среде с нитритом натрия ( $10^{-3}$  М) 45 мин. В течение всего времени действия нитрита и на фоне последующего отмывания препарата чистым физиологическим раствором, всего более 4 ч, наблюдали блокирование привыкания у нейрона ЛПаЗ. Далее препарат сохранялся в холодильнике при температуре  $8^{\circ}\text{C}$  в растворе без нитрита. В последующие дни нейрон

ЛПаЗ и другие ПК в этом препарате стимулировали по 2 ч ежедневно. На 2-е сутки нейрон ЛПаЗ также не обнаруживал привыкания, при этом порог стимуляции снизился от 10 до 2,5 нА. Не обнаруживали привыкания и другие ПК в этом препарате мозга. В общей сложности отсутствие привыкания для нейрона ЛПаЗ в этом препарате регистрировали в течение 3 сут, далее клетка была повреждена и погибла. Другие же исходно привыкающие нейроны в этом препарате мозга не обнаруживали привыкания в течение 7 сут (рис. 4), все время жизни препарата мозга.

В ходе проведения этих экспериментов отмечена более высокая жизнеспособность препаратов изолированного мозга, подвергшихся воздействию нитрита. Даже после однократной обработки нитритом, как это было в описанном опыте, препарат сохранялся 7 сут и нейроны обнаруживали нормальные электрические параметры: МП, возбудимость, специфичность реакции на медиаторы, синаптическую активность и т.д. Тогда как в обычных (контрольных) условиях препарат сохраняется, как правило, до 2 сут.

В опытах с высокими концентрациями нитрита была сделана попытка снять устойчивое блокирование привыкания действием  $\text{Ca}^{2+}$ -ионофора, повышающего входение кальция в клетку, и действием имидазола, снижающего уровень цАМФ за счет активации фосфодиэстеразы. Как было показано ранее [4, 5], оба эти вещества в отсутствие нитритов способствовали развитию привыкания у исследуемых нейронов. Введение  $\text{Ca}^{2+}$ -ионофора ( $2 \cdot 10^{-6}$  М) на фоне блокирования привыкания нитритом в 1-й день описанного 7-дневного эксперимента не приве-

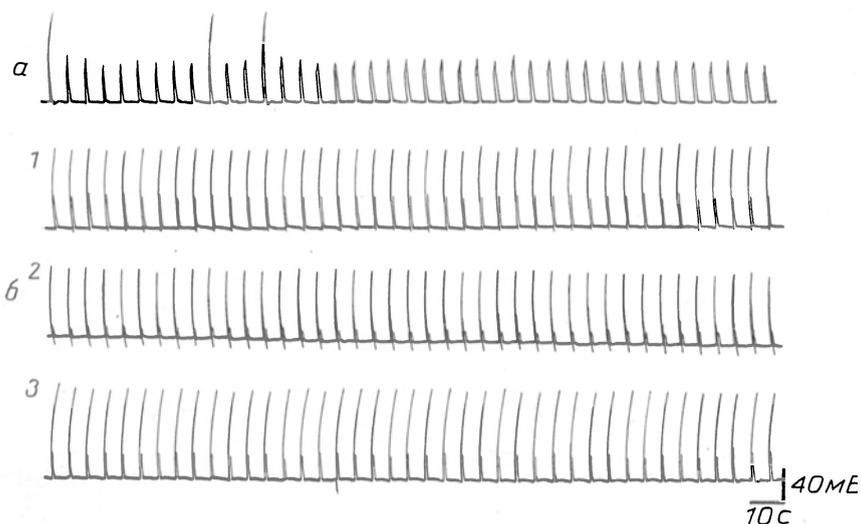


Рис. 4. Эффект блокирования привыкания ПК действием высоких концентраций ( $10^{-3}$  М) нитрита натрия.

Наблюдение в течение 7 сут после однократного введения нитрита в среду на 45 мин в 1-й день эксперимента. а — привыкание нейрона ЛПаЗ к стимуляции в контроле; б — отсутствие привыкания у того же нейрона в 1-й (1) и 2-й (2) дни эксперимента и у нейрона ЛПа2 на 6-й день (3) эксперимента.

ло к восстановлению привыкания у нейрона ЛПа3. Напротив, ионофор вызвал непродолжительное усиление ответов на пороговую стимуляцию до 2—3 ПД вместо 1 ПД на каждый стимул. Действие имидазола ( $1-3 \cdot 10^{-3} \text{M}$ ) исследовали на 3-й и 6-й дни эксперимента. Так же, как в случае ионофора, не было обнаружено восстановления привыкания или снижения ответов на стимуляцию под влиянием имидазола.

2. *Действие нитрита натрия на непривыкающие нервные клетки (НПК).* Исследованные нами НПК расположены на дорсальной поверхности левого париеального ганглия латеральнее нейрона ЛПа2. Это группа нейронов средней величины (30—40 мкм) включает более 20 клеток и легко выявляется у каждой улитки. НПК в контроле, как правило, не выключают и не снижают ответа на пороговую стимуляцию в течение 4—5 ч, не обнаруживают привыкания. Добавление нитрита натрия ( $10^{-5} - 10^{-4} \text{M}$ ) в инкубационный раствор оказывает устойчивое сенситизирующее действие на их ответы на стимуляцию: наблюдается повышение вызванной активности, связанное как со снижением порога возбуждения (на исходно пороговый стимул клетка генерирует 2—3 ПД вместо 1 ПД), так и с усилением возбуждающего синаптического притока. При этом отмечается периодичность в усилении вызванной активности (рис. 5). Эффект нитрита на НПК развивается с относительно высокой латентностью. Усиление ответа на стимуляцию возникает лишь через несколько минут после введения нитрита, далее эффект нарастает на фоне медленно развивающейся деполяризации (несколько милливольт за 5—10 мин). На рис. 5 видно, что через 15 мин после введения нитрита эффект усиления вызванной активности значительно более выражен, чем через 5 мин. Эффект нитрита устойчив, он сохраняется все время, пока нитрит присутствует в среде, и после отмывания его в течение 1 ч. Более длительно последствие нитрита не контролировалось.

Полученные результаты показывают, что инкубирование изолированного мозга в среде с добавлением нитрита натрия существенно изменяет пластические свойства электровозбудимой мембраны привыкающих нейронов. В контрольных условиях эти нейроны отвечают на стимуляцию импульсами тока очень непродолжительное время (1—3 мин), далее ответы прекращаются, развивается привыкание. В присутствии нитрита привыкания не происходит в течение длительного времени: от нескольких часов до нескольких суток. Блокирование привыкания на-

иболее устойчиво и продолжительно при больших концентрациях нитрита ( $10^{-3} \text{M}$ ), в этом случае эффект фактически необратим: максимально нейроны не восстанавливали способности привыкать в течение 7 сут после однократного воздействия нитритом, т. е. в течение всего времени, пока препарат мозга сохранял жизнеспособность.

Ранее нами было показано [4—6], что развитие привыкания можно замедлить или заблокировать полностью различными экспериментальными приемами, снижающими входение  $\text{Ca}^{2+}$  в клетку или его внутриклеточное содержание (уменьшение экстраклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , действие блокаторов  $\text{Ca}^{2+}$ -проводимости, действие хелатирующих растворов и т.д.), или действием различных веществ, способствующих повышению уровня цАМФ в клетке (действие блокаторов фосфодиэстеразы, дибутирил-цАМФ, серотонина и т.д.). Во всех случаях блокирование привыкания было обратимым и снималось восстановлением контрольных условий или веществами обратного действия. Например,  $\text{Ca}^{2+}$  ионофор А23 187 и активатор фосфодиэстеразы имидазол способствовали развитию привыкания. Эти данные позволили предполагать, что механизмы привыкания связаны с повышением входения кальция в клетку и снижением уровня цАМФ в ней.

Исходя из известных и частично уже упоминавшихся выше данных, мы полагаем, что механизмы блокирующего действия на привыкание экзогенного нитрита могут быть также связаны с регуляцией уровня внутриклеточного кальция окисью азота, синтез которой должен активироваться при действии нитрита с участием гемсодержащих белков в дезоксиформе. В пользу того, что экзогенные нитриты могут стимулировать образование NO в клетках-мишенях, убедительно свидетельствуют, например, терапевтические эффекты таких нитритов, как нитроглицерин и различные органические его заменители. Показано, что сами эти вещества не активны, а их сосудорасширяющее действие обусловлено превращением их в окись азота, которая и обуславливает этот эффект [11, 18]. Методом электронного парамагнитного резонанса обнаружено, что при инкубировании различных тканей — печени, почек, сердца, легкого, коры мозга — в среде с добавлением нитритов образуются парамагнитные комплексы с гемовым и негемовым железом [1, 3, 8].

Регулирование уровня свободного внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  с участием NO осуществляется следующим образом. Окись азота активирует растворимую гуанилатциклазу и повышает уровень цГМФ в клет-

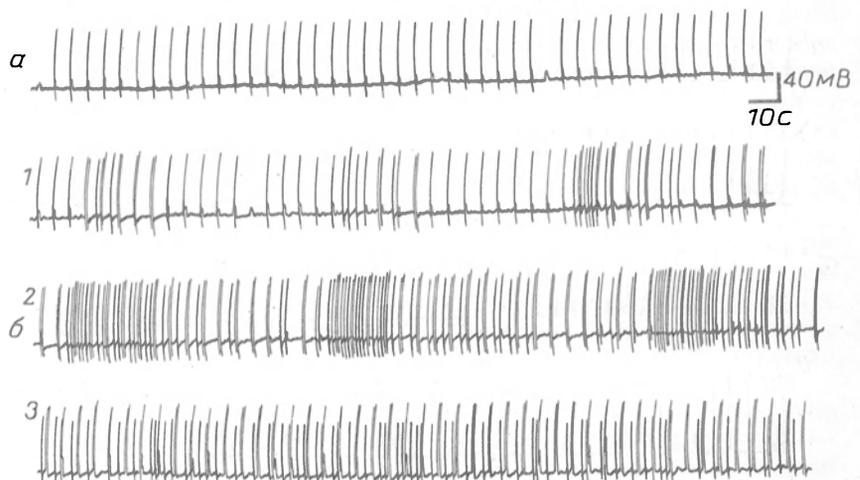


Рис. 5. Сенситизирующее действие нитрита натрия ( $10^{-5} \text{M}$ ) на ответы НПК на стимуляцию их пороговым током.

а — характер ответов в контроле; б — в присутствии нитрита натрия через 5 (1), 15 (2) мин после введения нитрита и через 15 мин после его отмывания (3).

ках. Известно, что цГМФ-зависимые протсинкиназы активируют фосфатидилинозитолкиназу, которая является промотором образования фосфатидилинозитолмонофосфата, обладающего способностью активировать  $\text{Ca}^{2+}$ -насос в клеточных мембранах [13, 16]. В свою очередь  $\text{Ca}^{2+}$ -насос и является тем механизмом, который убирает свободный  $\text{Ca}^{2+}$  в депо и снижает уровень его в цитоплазме. Кроме того, есть данные, что цГМФ и нитросоединения, активирующие гуанилатциклазу, могут ингибировать входящий поток  $\text{Ca}^{2+}$  [14, 22]. При этом показано, что блокирование трансмембранного потока  $\text{Ca}^{2+}$  при участии цГМФ на разных объектах (сердечные и гладкие мышцы, нейроны гиппокампа и др.) может быть опосредовано через цГМФ-активируемые и цГМФ-блокируемые фосфодиэстеразы, т. е. через влияние цГМФ на уровень цАМФ [12, 15, 25]. Иными словами, цГМФ обуславливает взаимодействие систем цГМФ и цАМФ, которые могут действовать как однонаправленно, так и разнонаправленно.

Таким образом, снижение уровня свободного  $\text{Ca}^{2+}$  в клетке, опосредуемое окисью азота, может осуществляться двумя основными механизмами: закачиванием  $\text{Ca}^{2+}$  в депо и блокированием его вхождения в клетку через трансмембранные  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы. В обоих случаях участвуют обе циклазные системы: цГМФ и цАМФ. Блокирование привыкания экзогенными нитритами в наших экспериментах может быть связано с обоими этими механизмами. Осцилляторный характер эффекта нитрита натрия в наших экспериментах при использовании физиологически адекватных его концентраций также может быть следствием периодических изменений концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ . Окись азота регулирует внутриклеточный  $\text{Ca}^{2+}$  по механизму отрицательной обратной связи, что предполагает колебания его концентрации с определенным периодом в зависимости от типа клеток [10, 13].

Участие цГМФ-зависимых механизмов в наблюдаемых эффектах нитритов в какой-то степени подтверждается опытами с нитропруссидом, активатором гуанилатциклазы. Нитропруссид оказывает однонаправленное с нитритами блокирующее действие на привыкание, хотя его эффект менее выражен и непродолжителен.

В данной работе получены также данные о взаимном потенцирующем действии нитрита и серотонина на эффекты блокирования привыкания друг друга. Можно полагать, что их взаимодействие в этом случае также опосредуется через циклазные системы: цАМФ и цГМФ. Вторичным посредником действия серотонина на этих клетках является, по видимому, цАМФ (его эффект блокируется имидазолом) [5], а следствием действия нитритов является повышение уровня цГМФ. Как уже отмечалось выше, функционирование этих систем может быть взаимосвязано.

Действие нитрита натрия на НПК имеет такую же направленность, как и на ПК. Нитрит повышает ответ нейрона на предъявляемый стимул, сенситизирующее действие нарастает во времени и длительно сохраняется после удаления нитрита из инкубационной среды.

Устойчивость и продолжительность последствия (необратимость при больших концентрациях) — отличительная особенность эффектов нитрита натрия на исследуемой модели. Особого внимания

заслуживает значительно более длительное сохранение жизнеспособности изолированного препарата мозга в присутствии нитрита. Такой эффект может быть связан с бактерицидным действием нитритов [2].

Полученные данные о регуляции пластических свойств нейронов улитки нитритом натрия, предполагающие участие NO, свидетельствуют о важной роли нитритредуктазной (восстанавливающей ионы  $\text{NO}_2^-$  в NO) способности нейронов. Такая способность клеток мозга при наличии эндогенно синтезируемых нитритов может дополнять или заменять NO-синтазную активность в тех клетках, где она слабо выражена или отсутствует полностью. С другой стороны, эти результаты дают основание предполагать, что нитриты и продукты их метаболического превращения NO могут выполнять функцию посредников, активирующих внутриклеточные механизмы длительного сохранения информации, в частности механизмы сохранения нейронами пластических изменений свойств электровозбудимой мембраны.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ажина Я.И., Каюшин Л.П., Никишкин Е.И. // Биофизика. — 1966. — Т. 11, № 4. — С. 710—713.
2. Ажина Я.И., Реутов В.П., Каюшин Л.П. // Физиология человека. — 1990. — Т. 16, № 3. — С. 131—150.
3. Ванин А.Ф., Блюменфельд Л.А., Четверяков А.Г. // Биофизика. — 1967. — Т. 12, № 5. — С. 829—838.
4. Дьяконова Т.Л. // Журн. высш. нервн. деят. — 1985. — Т. 35, № 3. — С. 552—560.
5. Дьяконова Т.Л. // Там же. — № 4. — С. 753—759.
6. Дьяконова Т.Л. // Там же. — 1987. — Т. 37, № 1. — С. 106—114.
7. Меньшиков М.Ю., Болдинов Г.Н., Негреску Е.В. // Биохимия. — 1987. — Т. 52, № 3. — С. 430—440.
8. Никишкин Е.И. Исследование электронного парамагнитного резонанса тканей различных отделов центральной нервной системы животных. Дис. ... канд. биол. наук. — М., 1969.
9. Реутов В.П., Ажина Я.И., Каюшин Л.П. // Изв. АН СССР. Сер. биол. — 1983. — № 3. — С. 408—418.
10. Реутов В.П., Орлов С.Н. // Физиология человека. — 1993. — Т. 19, № 1. — С. 124—137.
11. Arnold W.P., Mittal C.K., Katsuki S., Murad F. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1977. — Vol. 74. — P. 3203—3207.
12. Beavo J.A., Reifsnnyder D.U. // Trends pharmacol. Sci. — 1990. — Vol. 11. — P. 150—155.
13. Berridge M.J. // Proc. roy. Soc. Lond. — 1988. — Vol. 234, N 1277. — P. 359—365.
14. Cornwell T.L., Lincoln T.M. // J. biol. Chem. — 1989. — Vol. 264. — P. 1146—1155.
15. Doermer D., Alger B.E. // Neuron. — 1988. — Vol. 1. — P. 693—699.
16. Gill D.L., Mullaney J.M., Ghosh T.K. // J. exp. Biol. — 1988. — Vol. 139. — P. 105—115.
17. Hibbs J.B.Jr., Taintor R.R., Vavrin V. et al. // A Bioregulatory System / Eds. S.Moncada, E.A.Higgs. — Amsterdam, 1990. — P. 189—223.
18. Ignarro L.J., Lipton H., Edward J.C. et al. // J. Pharmacol. exp. Ther. — 1981. — Vol. 218. — P. 739—749.
19. Iyengar R., Stuehr D.J., Marletta M.A. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1987. — Vol. 84. — P. 6369—6373.
20. Marletta M.A., Yoon P.S., Iyengar R. et al. // Biochemistry. — 1988. — Vol. 21. — P. 8706—8711.
21. Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A. // Pharmacol. Rev. — 1991. — Vol. 43. — P. 109—142.
22. Morgan R.O., Newby A.C. // J.Biochem. — 1989. — Vol. 258. — P. 447—454.
23. Schuman E.M., Medison D.V. // Science. — 1991. — Vol. 254. — P. 1503—1506.
24. Shibuki K., Okada D. // Nature. — 1991. — Vol. 349. — P. 326—328.
25. Simmons M.A., Hartzell H.C. // Molec. Pharmacol. — 1988. — Vol. 33. — P. 664—671.
26. Snyder S.H. // Science. — 1992. — Vol. 257. — P. 494—496.

Поступила 24.02.94

# NITRITE IONS INHIBIT $\text{Ca}^{2+}$ -DEPENDENT HABITUATION OF NEURONES IN THE STRUCTURES OF ELECTROEXCITABLE MEMBRANE: POSSIBLE ROLE OF NITRIC OXIDE

T.L.Dyakonova, V.P.Reutov

N.K.Koltsov Institute of Developmental Biology, Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow

Penetration of  $\text{Ca}^{2+}$  into neuron have been shown earlier to be mainly responsible for the cell habituation to repeated intracellular stimulation by impulse depolarizing current. Considering the key role of nitric oxide (NO) in regulation of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  turnover, effects of exogenous nitrite  $\text{NaNO}_2$ , used as a source of NO, on plasticity properties of the electrostimulated membrane were studied in the identified habituating and non-habituating neurones of snail (Gastropoda) brain. The sodium nitrite  $10^{-6}$ — $10^{-4}\text{M}$  was found to inhibit, with a latent period 10—30 min, the ability of the habituating neurones to get accustomed to stimulation; this phenomenon was oscillatory. The concentration of nitrite  $10^{-3}\text{M}$  affected irreversibly the habituation. Serotonin potentiated the inhibitory effect of nitrite on habituation and vice versa nitrite augmented the serotonin effect on habituation of the same neurones. The exogenous nitrite sensitized the non-habituating neurones to intracellular stimulation. These data suggest that nitrite affects the plasticity properties of the electrostimulated neurone membrane. Besides, these results and well-known properties of NO allowed one to assume that NO-dependent regulation of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  was responsible for the phenomenon observed as well as that NO- and serotonergic systems appear to interact in the snail brain.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 615.272.014.425].015.4.07

Л.Х.Комиссарова, В.П.Реутов, А.Л.Комиссаров

## ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НЕКОТОРЫХ АНТИОКСИДАНТОВ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ФЕРРИГЕМА

Институт химической физики РАН, Москва

Гемсодержащие протеины: гемоглобин, миоглобин, растворимая гуанилатциклаза, протетической группой которых является протогем IX, — играют важную роль в функционировании различных систем организма.

Как известно, гемоглобин и миоглобин способны обратимо связывать молекулярный кислород. Гемоглобин обеспечивает транспорт кислорода в органы и ткани, миоглобин — сохранение запасов кислорода в мышцах. При этом гемоглобин и миоглобин присоединяют кислород только при двухвалентном состоянии атома железа гема. Растворимая гемсодержащая гуанилатциклаза участвует в регуляции  $\text{Ca}^{2+}$ -мобилизирующей системы [4]. Один из механизмов регуляции этой системы обусловлен активацией растворимой гуанилатциклазы в результате связывания окиси азота (NO) с железом. Повышение активности гуанилатциклазы приводит к увеличению содержания циклического ГМФ и активации через систему G-киназ  $\text{Ca}^{2+}$ -насоса эндоплазматического ретикулума. Известно, что переход растворимой гуанилатциклазы в гемодифицитное состояние приводит к тому, что активация этого фермента при участии NO и нитросоединений не может осуществляться. Кроме того, NO может взаимодействовать лишь с восстановленным железом гема. Таким образом, для функционирования гемсодержащих протеинов: гемоглобина, миоглобина и растворимой

гуанилатциклазы — определяющим фактором является валентное состояние железа гема. Поэтому для поддержания окислительно-восстановительного потенциала гема в ряде случаев необходимо использование экзогенных антиоксидантов.

Другая сторона этой проблемы связана с гемодифицитными состояниями организма, вследствие чего возникает необходимость введения железа. В частности, в связи с большой распространенностью железодифицитной анемии с профилактической и лечебной целью практикуется обогащение продуктов питания неорганическим железом [3]. Однако из-за низкой усвояемости неорганического железа (1—6%) [3] более целесообразно применять гемовое железо, усвояемость которого достигает 25—90% [5]. В то же время в желудочно-кишечном тракте всасывается только двухвалентное железо [5], а в ферригеме, получаемом из гемоглобина бычьей крови, оно находится в трехвалентном состоянии. Поэтому изыскание путей восстановления ферригема с целью его использования при гемодифицитных состояниях является актуальной задачей.

Целью настоящей работы явилось изучение возможности восстановления ферригема под действием некоторых антиоксидантов: дитионита натрия и тиосульфита натрия. Имеются работы по воздействию дитионита натрия на ферригем [1], однако соответствующих сведений относительно тиосульфита натрия не обнаружено.

**Методика.** В опытах использовали кристаллический препарат ферригема фирмы "Sigma", а также гемин, выделенный из гемоглобина бычьей крови спиртовым методом [6], основанным на расщеплении гемоглобина на гемин и глобин при pH 3,0 с последующим расщеплением гемоконцентрата и экстракцией гемина щелочным спиртом. Изучение кинетики взаимодействия антиоксидантов с геминном проводили следующим образом. Готовили растворы гемина и антиоксидантов требуемых концентраций при мольных отношениях антиоксидант/гемин 100, 200, 500, 1000 при pH 11,85. При мольном отношении, равном 1000, реакцию проводили также в присутствии 30% этилового спирта. К раствору гемина добавляли равный объем раствора антиоксиданта, сосуд с реакционной смесью помещали в термостат с мешалкой при 20°C. Через различные интервалы времени в течение 60 мин брали пробы растворов и регистрировали спектры поглощения в видимой области на спектрофотометре "Specord UV vis".

**Результаты и обсуждение.** Изменения спектров поглощения гемина в присутствии тиосуль-

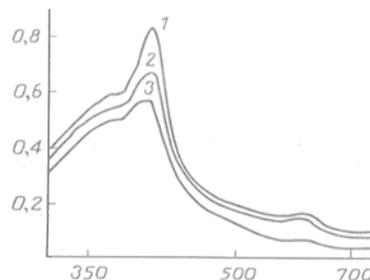


Рис. 1. Изменение спектров поглощения в присутствии тиосульфита натрия при pH 11,85.

Концентрация в кювете: гемин  $1 \cdot 10^{-4}$  М, тиосульфит натрия 0,1 М. 1 — контроль; гемин; 2 — гемин + тиосульфит натрия через 5 мин; 3 — гемин + тиосульфит натрия через 60 мин. По оси абсцисс — длина волны, нм; по оси ординат — оптическая плотность, отн. ед.

Условия эксперимента	Мольные отношения антиоксидант/гемин			
	100	200	500	1000
Тиосульфит натрия	0,36 26,5±10,0	0,48 32,0±9,3	0,56 38,2±10,2	0,84 42,1±8,9
Дитионит натрия	0,33 29,0±9,2	0,36 29,4±8,0	0,47 30,0±8,3	1,1 42,4±9,0

Примечание. В числителе — начальная скорость реакции, отн. ед.; в знаменателе — глубина реакции, %.

фита натрия приведены на рис. 1. Как видно, при взаимодействии гемина с тиосульфитом натрия наблюдается падение интенсивности поглощения спектра в области 350—500 нм, снижение пика при 630 нм. Аналогичные изменения спектров поглощения гемина обнаружены при воздействии дитионита натрия. В присутствии этилового спирта, кроме отмеченных изменений, обнаружено также смещение полосы Сорс в длинноволновую область спектра, что соответствует данным [1]. На основании регистрации спектров поглощения гемина в присутствии антиоксидантов во времени были построены кинетические кривые изменения оптической плотности гемина при 400 нм. На рис. 2 приведена кинетическая кривая изменения оптической плотности гемина в присутствии тиосульфита натрия. С помощью

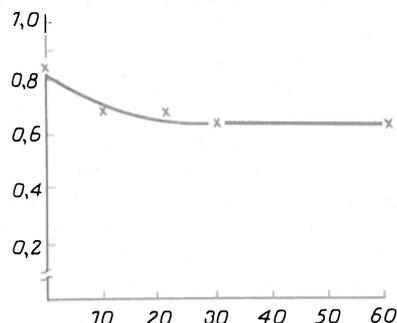


Рис. 2. Кинетическая кривая изменения оптической плотности гемина в присутствии тиосульфита натрия при pH 11,85.

Концентрация в кювете: гемин  $1 \cdot 10^{-4}$  М, тиосульфит натрия 0,01 М. По оси абсцисс — время реакции, мин; по оси ординат — оптическая плотность, отн. ед.

этих кривых были рассчитаны начальная скорость и глубина реакции (степень восстановления ферригема). Значения начальной скорости реакции, рассчитанной как тангенс угла наклона кривых (в отн. ед.), и глубина реакции (в %) приведены в таблице. Как видно из представленных данных, начальная скорость и глубина реакции возрастают с увеличением мольных отношений антиоксидант/гемин от 100 до 1000. Наибольшая глубина реакции обнаружена для дитионита натрия (42,4%). Полученные результаты спектральных изменений гемина и кинетических параметров реакции воздействия дитионита натрия и сульфита натрия на гемин, очевидно, свидетельствуют о восстановлении ферригема, поэтому на основании значений глубины реакции можно оценивать степень восстановления ферригема. В присутствии 30% этилового спирта при мольном отношении антиоксидант/гемин, равном 1000, начальная скорость реакции соответствует начальной скорости реакции в отсутствие этанола для дитионита натрия и уменьшается для тиосульфита натрия. Глубина реакции при этом возрастает для обоих антиоксидантов и достигает значений 46—47%, что, видимо, можно объяснить восстановительными свойствами этилового спирта.

Известно, что основным свойством гемов, в частности протогема IX, является их способность поддерживать окислительно-восстановительное состояние системы. Окислительно-восстановительный потенциал гема, очевидно, будет изменяться в зависимости от природы и пространственного расположения связей гем — белок в гемопротейнах: гемоглобине, миоглобине, растворимой гуанилатциклазе. Однако, исходя из данных по окислительно-восстановительным превращениям для гемоглобина и гема [2], можно полагать, что направленность процессов для ферригема и гемопротейнов будет аналогичной. В связи с этим полученные нами результаты, свидетельствующие о возможности восстановления ферригема тиосульфитом натрия и дитионитом натрия, позволяют предположить, что под действием этих антиоксидантов будет происходить также восстановление гемопротейнов. Поэтому дитионит натрия и сульфит натрия могут быть использованы не только для восстановления ферригема (гемина) с целью его последующего введения в организм при железодефицитных состояниях, но также и для непосредственного использования для поддержания окислительно-восстановительного состояния гемопротейнов (предотвращения окисления гемового железа). Для проверки нашего предположения необходимо проведение дальнейших исследований по воздействию антиоксидантов и восстановленного ферригема *in vivo*.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Блюменфельд Л.А. Гемоглобин и обратимое присоединение кислорода. — М., 1957.
2. Неорганическая биохимия / Под ред. Г. Эйхорна. — 1978. — Т. 2. — С. 218—338.
3. Петров В.Н. Физиология и патология обмена железа. — М., 1980.
4. Северина И.С. // Вести. АМН СССР. — 1987. — № 7. — С. 41—47.
5. Heinrich H.C., Cable E.E., Kuglu G. // Europ. J. clin. Invest. — 1979. — Vol. 1. — P. 321—332.
6. Lidross P. Pat. 4431581 1984.

Поступила 29.01.94

#### REDUCTION OF FERRIHEM USING SOME ANTIOXIDANTS

L.Kh. Komissarova, V.P. Reutov, A.L. Komissarov

Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow

Kinetic parameters of the hemine spectral alterations occurred in reactions with sodium thiosulfate and sodium dithionite were studied depending on the reagents content as well as on the ratio between the antioxidant initial concentration and hemine. Simultaneous analysis of the kinetic parameters enabled one to suggest that hemine was reduced in reactions with sodium thiosulfate and sodium dithionite.

В. П. Реутов, Е. Г. Сорокина, В. Г. Пинелис,  
Т. С. Коршунова, А. А. Родионов, Л. Х. Комиссарова,  
В. Б. Кошелев, С. М. Струкова, Л. П. Каюшин,  
П. Браке

## УЧАСТВУЮТ ЛИ НИТРИТНЫЕ ИОНЫ В РЕГУЛЯЦИИ СИСТЕМ ВНУТРИ- И МЕЖКЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ?

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Институт педиатрии РАМН, Институт неврологии РАМН, Институт химической физики РАН, Москва; Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Институт Анри Бюфур, Париж

Нитраты ( $\text{NO}_3^-$ ), нитриты ( $\text{NO}_2^-$ ) и окислы азота ( $\text{NO}$  и  $\text{NO}_2$ ) относятся к наиболее широко распространенным химическим соединениям [1, 2, 9, 12]. Вплоть до 80-х годов эти соединения азота рассматривали только как чужеродные вещества — ксенобиотики, которые поступают в организм человека вместе с водой, пищей, воздухом и лекарственными препаратами [1, 2—5]. Однако в последнее десятилетие стало известно, что  $\text{NO}$ , активируя растворимую гемсодержащую гуанилатциклазу и АДФ-рибозилтрансферазу, участвует в регуляции внутриклеточной концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  [11, 14, 17, 18, 20, 23, 32, 33, 38]. Один из механизмов регуляции связан с активацией синтеза  $\text{NO}$ , увеличением внутриклеточной концентрации цГМФ и активацией через систему G-киназ  $\text{Ca}^{2+}$ -насосов эндоплазматического ретикулаума [14, 17, 18, 23]. Другим механизмом может быть регуляция высвобождения ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из пула этих ионов, нечувствительного к инозитол-1,4,5-трифосфату, но чувствительного к самим ионам  $\text{Ca}^{2+}$  и циклической АДФ-рибозе [20, 23]. Активация АДФ-рибозилтрансферазы при участии  $\text{NO}$  может влиять на механизм высвобождения ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из этого второго пула, нечувствительного в инозитол-1,4,5-трифосфату. И наконец, образование  $\text{NO}^+$ , одного из промежуточных продуктов метаболизма  $\text{NO}$ , может, по мнению некоторых исследователей [27], влиять на проницаемость  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов благодаря образованию комплексов  $\text{NO}^+$  с сульфгидрильными группами белков, входящих в состав структурных компонентов  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов.

Известно, что источником  $\text{NO}$  является гуанидиновый азот L-аргинина [32, 33, 35]. В присутствии кислорода ( $\text{O}_2$ ), супероксидных анион-радикалов ( $\text{O}_2^-$ ), перекиси водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) и  $\text{OH}^-$ -радикалов  $\text{NO}$  может окисляться в ионы  $\text{NO}_2^-$  и  $\text{NO}_3^-$ :  $\text{L-аргинин} \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  (1)

В свою очередь ионы  $\text{NO}_2^-$  и  $\text{NO}_3^-$  могут вновь восстанавливаться в  $\text{NO}$  и, как указывалось в статье, посвященной циклу окиси азота, замыкать цепочку (1) в цикл. Таким образом,  $\text{NO}$ , а также ионы  $\text{NO}_2^-$  и  $\text{NO}_3^-$  не только являются химическими соединениями среды обитания человека и животных, но и входят в состав внутренней среды млекопитающих.

При воспалительных процессах, нарушениях деятельности желудочно-кишечного тракта, нарушениях кровообращения, ишемических и гипоксических состояниях в организме человека и животных усиливаются процессы образования  $\text{NO}$  и продуктов ее метаболического превращения — ионов  $\text{NO}_2^-$  и  $\text{NO}_3^-$  [1, 2, 5, 8—12, 38]. Поэтому изучение действия

$\text{NO}$  и нитросоединений — одна из важнейших проблем современной биологии и медицины.

Как известно,  $\text{NO}$  является одним из физиологически активных соединений, объединяемых общим названием “эндотелиальный фактор релаксации” (EDRF). Обладая способностью снижать внутриклеточную концентрацию ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в гладкомышечных клетках,  $\text{NO}$  вызывает вазодилатацию [32, 33, 35, 38]. Противоположным (вазоконстрикторным) свойством обладает вазоактивный пептид — эндотелин (Эт). Было высказано предположение, что Эт играет важную роль в регуляции регионального кровотока в гипоксических условиях [25]. Наибольшая плотность клеток, содержащих мРНК Эт, локализуется в гипоталамусе, что свидетельствует о регуляторном значении Эт в мозговой ткани [26, 29]. Эт принимает активное участие в механизмах повышения содержания внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , как за счет увеличения поступления внеклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , так и за счет высвобождения ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточного депо [7, 19, 21, 30]. Известно, что Эт стимулирует высвобождение некоторых гормонов, эйкозаноидов и эндотелийзависимого фактора расслабления [22, 34]. Таким образом,  $\text{NO}$  и Эт являются вазорегуляторами и нарушение их баланса в крови может играть важную роль в патогенезе сосудистых расстройств, приводящих к нарушению кровообращения и возникновению на этом фоне гипоксических состояний [15, 32, 33]. Настоящая работа является продолжением исследования механизмов регуляторного, фармакологического и токсического действия ионов  $\text{NO}_2^-$  [1, 10, 12]. В основе этих механизмов, как указывалось ранее [10—12], лежит реакция восстановления ионов  $\text{NO}_2^-$  в  $\text{NO}$ , которая замыкает цепочку метаболического превращения L-аргинина (1) в цикл окиси азота. Согласно нашей гипотезе, широкий спектр действия ионов  $\text{NO}_2^-$  на организм млекопитающих обусловлен не только свободнорадикальной природой продуктов метаболизма этих ионов, но и тем, что указанные выше соединения могут участвовать в регуляции систем внутри- и межклеточной сигнализации. Поэтому целью настоящей работы явилось изучение взаимосвязи между отдельными компонентами систем внутри- и межклеточной сигнализации при действии ионов  $\text{NO}_2^-$  на организм млекопитающих. Обнаружение такой взаимосвязи могло бы свидетельствовать в пользу того, что ионы  $\text{NO}_2^-$  действительно участвуют в регуляции этих систем.

**Методика.** Работа выполнена на крысах-самцах (110 беспородных крыс и 12 крыс линии Вистар). Раствор нитрита натрия вводили внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл в дозе 5 мг на 100 г массы тела. Кровь брали через 1 ч после введения нитрита натрия, когда уровень метгемоглобина для данной дозы нитрита достигал максимального значения. Содержание белка в сыворотке крови определяли по методу Лоури [28], альбумина — колориметрическим методом с бромкрезоловым зеленым [6], гемоглобина и метгемоглобина — унифицированными методами [24], суммарного  $\alpha$ -аминоазота — по методу Рубинштейна и Прайса [37]. Белки и пептиды сыворотки крови разделяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым детектором при  $\lambda = 280$  нм на приборе фирмы “Waters” (США) [36].

Кровь для определения содержания Эт и цГМФ брали из яремной вены, а для определения содержания гемоглобина, метгемоглобина, общего белка,

альбумина и хроматографического разделения белков — из хвостовой вены. Образцы крови собирали в пробирки, содержащие 7,5 мМ ЭДТА (для определения цГМФ) и дополнительно 100 кIU/мл контрикала (для определения Эт). Для получения плазмы кровь центрифугировали 10 мин при 2000 g и 4°C, хранили до начала анализа при -20°C. Экстракцию и очистку Эт из подкисленной 0,25 мл 2 М HCl плазмы осуществляли последовательным элюированием 5 мл 0,1% трифторуксусной кислоты (ТФК) и 2 мл 80% метанола с 0,1% ТФК на колонках Amprer 500 mg C2 ("Amersham", Англия). Последнюю фракцию, содержащую Эт, высушивали в атмосфере азота и использовали для определения содержания Эт с помощью радиоиммунологических наборов фирмы "Amersham". Для определения содержания цГМФ в плазме крови применяли этанольную экстракцию с последующим высушиванием под струей азота и спектрофотометрическим определением при  $\lambda = 492$  нм с помощью иммуноферментных наборов фирмы "Экрос". Концентрацию АКТГ в плазме определяли с помощью радиоиммунологических наборов фирмы "CEA SORIN" (Франция). Спектры электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) крови измеряли на ЭПР-спектрометре отражательного типа с двойной модуляцией магнитного поля [10].

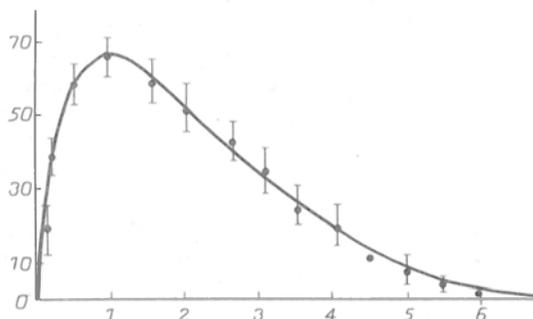


Рис. 1. Динамика содержания метгемоглобина в крови крыс при поступлении нитритов в дозе 5 мг на 100 г массы тела.

По оси ординат — содержание метгемоглобина, % от общей концентрации гемоглобина; по оси абсцисс — время от момента введения  $\text{NaNO}_2$ , ч.

**Результаты и обсуждение.** Динамика уровня метгемоглобина в крови крыс при введении нитрита в дозе 5 мг на 100 г массы тела представлена на рис. 1. Видно, что поступление ионов  $\text{NO}_2^-$  в кровь вызывает через 1 ч максимальное для данной дозы нитритов образование метгемоглобина. Поэтому и гипоксия в это время достигает своего максимального значения. Спектры ЭПР Hb—NO-комплексов и метгемоглобина, образующихся в крови спустя 1 ч после введения  $\text{NaNO}_2$ , представлены на рис. 2, а, б, а оптические спектры поглощения гемоглобина крови контрольных животных и животных через 1 ч после действия  $\text{NaNO}_2$  — на рис. 2, в. На фоне максимального образования в эритроцитах метгемоглобина и Hb—NO-комплексов в сыворотке крови наблюдается снижение содержания общего белка на 33% ( $p < 0,001$ ) и альбумина на 49% ( $p < 0,001$ ). В эритроцитах содержание гемоглобина снижалось на 22% (рис. 3). Одновременно с уменьшением содержания белков в сыворотке крови наблюдали повышение на 57% уровня  $\alpha$ -аминоазота ( $p < 0,001$ ).

Одной из причин наблюдаемых изменений могли явиться активация эндопептидаз и усиление деструктивных изменений белков под действием свободнорадикальных соединений NO и  $\text{NO}_2$ , образующихся при нитритной гипоксии [1, 8, 10]. Разделение белков и пептидов методом ВЭЖХ (рис. 4)

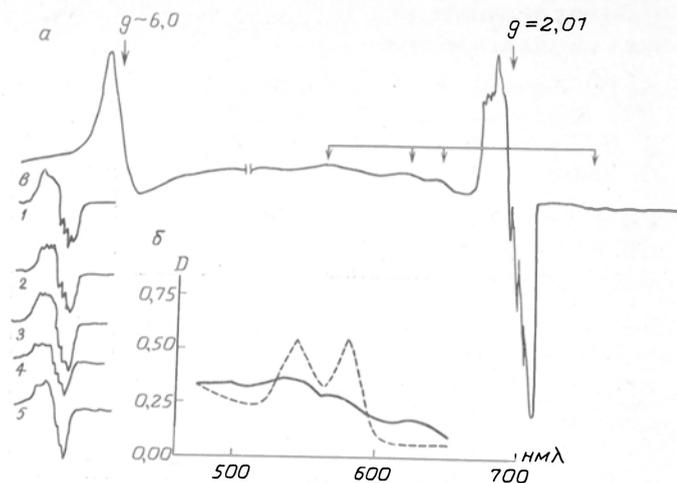


Рис. 2. Спектры ЭПР (а, б) и оптические спектры поглощения гемоглобина (в) после образования парамагнитных Hb—NO-комплексов и метгемоглобина в крови крыс при введении  $\text{NaNO}_2$  в дозе 5 мг на 100 г массы тела.

а — спектры ЭПР метгемоглобина с  $g \approx 6,0$ , Hb—NO-комплексов с  $g = 2,01$  и гемихромов (отдельные компоненты их спектра отмечены стрелками); б — оптические спектры поглощения гемоглобина крови контрольных животных (пунктирная линия) и у животных спустя 1 ч после введения  $\text{NaNO}_2$  (сплошная линия); в — спектры ЭПР Hb—NO-комплексов, образовавшихся в крови 5 животных спустя 1 ч после введения  $\text{NaNO}_2$ . Условия регистрации: а — мощность СВЧ 10 мВт, амплитуда модуляции 5 Гс, усиление 5-10, частота модуляции 100 кГц, постоянная времени — 0,032 с, микроволновая частота 9,3 ГГц, магнитное поле 2200 Гс, диапазон сканирования магнитного поля 4,0 кГс, температура регистрации 77°K; в — мощность СВЧ 2 мВт, диапазон сканирования магнитного поля 800 Гс, остальные параметры те же, что и на рис. 2, а.

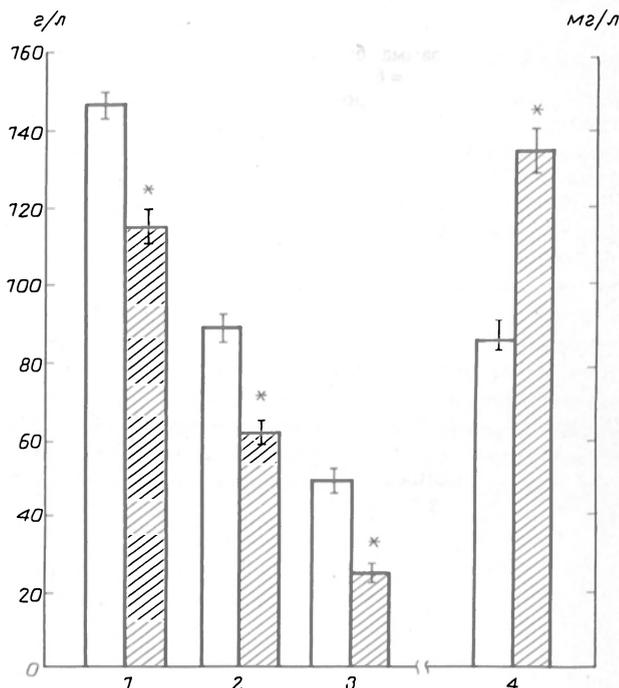


Рис. 3. Содержание гемоглобина (1), общего белка (2), альбумина (3) и  $\alpha$ -аминоазота (4) в крови крыс через 1 ч после введения  $\text{NaNO}_2$  в дозе 5 мг на 100 г массы тела.

Светлые столбики — контроль; заштрихованные — опыт. Звездочка —  $p < 0,001$ . По оси ординат — содержание: 1, 2, 3 — в г/л, 4 — в мг/л.

подтвердило результаты биохимических исследований, полученные с использованием метода спектрофотометрии. Наиболее заметное снижение содержания белков было отмечено для фракции с молекулярной массой 60—70 кД (альбумин). Напротив, содержание пептидов с молекулярной массой 2—5 кД повышалось, при этом максимум увеличения отмечался для фракции с молекулярной массой 2,5 кД. В состав этой фракции может входить достаточно большое количество физиологически активных пептидов. Содержание последних может изме-

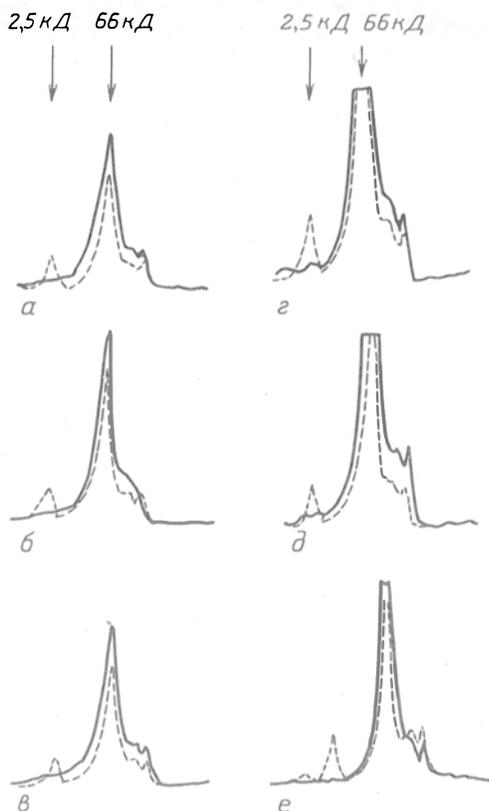


Рис. 4. Хроматограмма белков и пептидов сыворотки крови контрольных крыс ( $n = 6$ , сплошная линия) и у крыс через 1 ч после введения  $\text{NaNO}_2$  в дозе 5 мг на 100 г массы тела ( $n = 6$ , пунктир).

Условия регистрации:  $\lambda = 280$  нм; скорость элюции 0,5 мл/мин. Коэффициент усиления сигнала в случаях а, б и в 2 раза ниже, чем в случаях г, д и е.

няться в ходе реализации компенсаторно-приспособительных механизмов при нитритной гипоксии. Одним из пептидов, содержание которого могло изменяться при нитритной гипоксии, является гипофизарный гормон АКТГ. Его молекулярная масса составляет  $\sim 4,5$  кД. Известно, что основной ответ организма на стресс — высвобождение АКТГ из гипофиза. Существует предположение, что контроль выделения АКТГ осуществляется семейством гипоталамических гормонов [13, 16]. Если действительно сами ионы  $\text{NO}_2^-$  или продукты их метаболизма участвуют в регуляции нейрогуморальных взаимоотношений, тогда можно ожидать изменения содержания АКТГ в крови. Результаты исследования показали, что концентрация этого гормона в плазме крови через 1 ч после воздействия  $\text{NaNO}_2$  повышается на 120% ( $p < 0,01$ ) (см. таблицу). Полученные нами данные согласуются с результатами исследований, свидетельствующими о вовлечении гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы в ответ на поступление ионов  $\text{NO}_2^-$  в кровь [3, 4].

Вторым пептидом, содержание которого могло изменяться при нитритной гипоксии, является Эт. Его молекулярная масса равна 2,492 кД. Этот пептид, как указывалось выше, обладает вазоконстрик-

торным свойством и высвобождается при гипоксии и усилении синтеза NO в организме млекопитающих [7, 12, 15, 21, 25, 29]. В плазме крови крыс спустя 1 ч после введения  $\text{NaNO}_2$  в дозе 5 мг на 100 г массы тела выявлено повышение концентрации Эт-1,2 более чем в 2 раза по сравнению с таковой у контрольных животных (в опыте  $42,34 \pm 7,76$  пмоль/л, в контроле  $20,10 \pm 1,84$  пмоль/л;  $p < 0,01$ ). Определение концентрации цГМФ в плазме крови одновременно с содержанием Эт-1,2 показало ее повышение в 3 раза после введения  $\text{NaNO}_2$  ( $42,8 \pm 12,9$  нмоль/л в опыте и  $14,0 \pm 2,77$  нмоль/л в контроле;  $p < 0,05$ ). Такое изменение содержания цГМФ в плазме крови крыс могло явиться следствием активации окисью азота растворимой гемсодержащей гуанилатциклазы в клетках тканей организма [11, 12, 14]. В этот период регистрировали образование Hb—NO-комплексов, спектры ЭПР которых представлены на рис. 2, а, б. Содержание этих комплексов составляло 10—15% от общего содержания Hb и было равно  $\sim 2 \cdot 10^{-4}$  М. Следовательно, при повышенном поступлении нитритов в организм идет интенсивное образование NO и Hb—NO-комплексов, что в свою очередь может приводить к увеличению синтеза Эт-1,2, выявленному в настоящей работе. Недавно было показано, что стимуляцию синтеза Эт способен вызвать также и оксигемоглобин [31]. Последнее обстоятельство может быть обусловлено способностью лигандов гемоглобина — NO,  $\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$  и CO взаимодействовать с гемсодержащими белками, в том числе и с растворимой гуанилатциклазой, и повышать уровень цГМФ. Повышение уровня цГМФ в свою очередь может по механизму отрицательной обратной связи увеличивать синтез Эт-1,2. Таким образом, можно полагать, что не только NO, но и другие активаторы растворимой гуанилатциклазы (например,  $\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$ , CO и др.) также будут способны повышать синтез Эт-1,2. Подтверждением этому, по-видимому, может служить факт сосудосуживающего действия повышенного поступления в организм кислорода, который, как указывалось ранее [31], усиливает синтез Эт-1,2.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что нитритная гипоксия и изменение сосудистого тонуса по типу вазодилатации, отмеченные многими исследователями на фоне действия нитропрепаратов, сопровождаются активацией компенсаторных систем, одним из действующих элементов которых является пептид, обладающий вазоконстрикторным свойством — Эт-1,2. Известно, что при связывании с пептидгергическими рецепторами Эт-1,2 активирует  $\text{Ca}^{2+}$ -мобилизующую систему, а вместе с ней и синтез окиси азота, которая при взаимодействии с растворимой гемсодержащей гуанилатциклазой увеличивает ее активность и повышает уровень цГМФ [7, 11, 12, 15, 21].

Таким образом, выявленное повышение содержания веществ, оказывающих вазоконстрикторное

Содержание АКТГ, Эт-1,2 и цГМФ в плазме крови крыс после введения нитрита натрия в дозе 5 мг на 100 г массы тела

Показатель	Контроль			$\text{NaNO}_2$			P
	n	$M \pm m$	$\sigma$	n	$M \pm m$	$\sigma$	
АКТГ, пмоль/л	4	$347,2 \pm 81,1$	140,3	7	$764,9 \pm 50,6$	124,0	$< 0,01$
Эт-1,2, пмоль/л	5	$20,1 \pm 1,8$	3,7	6	$42,3 \pm 7,8$	17,4	$< 0,01$
цГМФ, нмоль/л	5	$14,0 \pm 5,5$	2,8	6	$42,8 \pm 12,9$	25,9	$< 0,05$

действие (Эт-1,2), приводит к усилению синтеза соединений, способных вызывать вазодилатацию (NO и цГМФ), а усиление образования NO при нитритной гипоксии активирует синтез Эт-1,2. Такое сопряжение регуляторных систем по принципу реципрокной комплементарности, по-видимому, необходимо для обеспечения организма эффективной регуляцией с участием механизмов отрицательной обратной связи. Наличие последних, как известно, лежит в основе поддержания гомеостаза живыми организмами и осуществляется, как правило, на основе мультипараметрического регулирования.

Одним из элементов системы мультипараметрического регулирования, как указывалось ранее, является цикл окиси азота. Необходимость существования этого цикла определяется тем, что для таких активных соединений, какими являются нейтральные свободнорадикальные молекулы NO и NO<sub>2</sub>, нет и не может существовать регулируемых пулов (депо), как это имеет место для ионов Ca<sup>2+</sup>. Эта особенность NO и NO<sub>2</sub> обусловлена их высокой проницаемостью через клеточные и субклеточные мембраны [1, 9]. В свою очередь высокая проницаемость NO и NO<sub>2</sub> связана с физико-химическими свойствами этих молекул — малыми размерами и отсутствием заряда (электронейтральность молекул). Каким же образом может решаться проблема регуляции содержания NO и NO<sub>2</sub> в клетках? В ходе окислительно-восстановительных реакций NO и NO<sub>2</sub> могут менять валентность атома азота, переходя в менее активные соединения — ионы NO<sub>2</sub><sup>-</sup> и NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. При гипоксии, когда гемсодержащие белки переходят в дезоксиформу, ионы NO<sub>2</sub><sup>-</sup> могут вновь превращаться в NO. Тот факт, что существует взаимосвязь между концентрацией ионов NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO, цГМФ, АКТГ и Эт-1,2, свидетельствует о наличии в организме механизмов тонкой регуляции содержания этих физиологически активных веществ. Причастность ионов NO<sub>2</sub><sup>-</sup> к внутри- и межклеточной сигнализации обусловлена тем, что они являются депонированной формой NO. Поэтому, если в клетках создаются условия, при которых гемсодержащие белки (цитохромоксидаза, цитохром P-450, миоглобин и гемоглобин) переходят в дезоксиформу, ионы NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, акцептируя электроны с этих белков, могут вновь превращаться в NO. Благодаря этому свойству молекула NO, несмотря на короткий период полураспада, может диффундировать из клетки в клетку. Если же на этом пути NO превратится в ион NO<sub>2</sub><sup>-</sup> или NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, то благодаря наличию цикла окиси азота эти ионы могут вновь восстановиться в NO. Другими словами, цикл окиси азота обеспечивает ионам NO<sub>2</sub><sup>-</sup> участие в регуляции систем внутри- и межклеточной сигнализации.

Авторы выражают благодарность фирме "Amersham" за безвозмездно предоставленный набор реактивов для определения Эт.

Авторы считают своим долгом выразить искреннюю благодарность и признательность профессорам А.Ф.Ванину, М.К.Пулатовой и И.С.Севериной за полезные советы и рекомендации, которые они дали в разные годы при выполнении отдельных фрагментов работы.

Работа выполнена при поддержке Фонда фундаментальных исследований, грант 94-04-11950.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ажина Я.И., Реутов В.П., Каюшин Л.П. // Физиология человека. — 1990. — Т. 16, № 3. — С. 131—150.
2. Ажина Я.И., Реутов В.П., Каюшин Л.П., Никишкин Е.И. // Изв. АН СССР. Сер. биол. — 1983. — № 2. — С. 240—250.
3. Иванецкая Н.Ф. // Пат. физиол. — 1974. — № 5. — С. 67—69.
4. Иванецкая Н.Ф. // Бюл. exper. биол. — 1975. — № 6. — С. 24—27.
5. Куроптева З.В., Пастушенко О.Н. // Докл. АН СССР. — 1985. — Т. 281, № 1. — С. 189—192.
6. Лукичева Т.И., Сентебова Н.А. // Лаб. дело. — 1977. — № 11. — С. 675—677.
7. Пинеллис В.Г., Лончамп М.-О., Шульц Г. и др. // Бюл. exper. биол. — 1992. — № 12. — С. 1784—1787.
8. Пулатова М.К., Рихирева Г.Т., Куроптева З.В. Электронный парамагнитный резонанс в молекулярной радиобиологии. — М., 1989.
9. Реутов В.П., Ажина Я.И., Каюшин Л.П. // Докл. АН СССР. — 1978. — Т. 241, № 6. — С. 1375—1377.
10. Реутов В.П., Ажина Я.И., Каюшин Л.П. // Изв. АН СССР. Сер. биол. — 1983. — № 3. — С. 408—418.
11. Реутов В.П., Орлов С.Н. // Физиология человека. — 1993. — Т. 19, № 1. — С. 124—137.
12. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Пинеллис В.Г. и др. // Бюл. exper. биол. — 1993. — № 11. — С. 506—508.
13. Робу А.И. Стресс и гипоталамические гормоны. — Кишинев, 1989.
14. Северина И.С. // Вестн. АМН СССР. — 1987. — № 7. — С. 41—47.
15. Старожевых Т.П., Загулова Д.В., Пинеллис В.Г. и др. // Бюл. exper. биол. — 1993. — № 10. — С. 374—376.
16. Тенпермен Дж., Тенпермен Х. Физиология обмена веществ и эндокринной системы. — М., 1989.
17. Berridge M.J., Irvine R.F. // Nature. — 1993. — Vol. 365, N 6445. — P. 388—389.
18. Berridge M.J., Irvine R.F. // Ibid. — 1989. — Vol. 341, N 6239. — P. 197—205.
19. Bialecki R.A., Izzo N.J., Colucci Jr., Colucci W.S. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1989. — Vol. 164, N 1. — P. 474—479.
20. Brune B., Lapetina E. // J. biol. Chem. — 1989. — Vol. 264. — P. 8455—8458.
21. Chabrier P.-E., Lonchampt M.-O., Roubert P. et al. // International Union of Pharmacologists. — London, 1990. — P. L. 15.
22. Furchgott R.F., Zawadzki J.V. // Nature. — 1980. — Vol. 288. — P. 373—376.
23. Galione A. // Trends pharmacol. Sci. — 1992. — Vol. 13, N 8. P. 304—306.
24. Hegesh E., Gruener N., Cohen S. et al. // Clin. chim. Acta. — 1970. — Vol. 30. — P. 679—682.
25. Kourembanas S., Marsden P.A., McQuillan L.-P., Faller D.V. // J. clin. Invest. — 1991. — Vol. 88, N 3. — P. 1054—1057.
26. Lee M.E., dela-Monte S.M., Ng S.C., Bloch K.D. // Ibid. — 1990. — Vol. 86, N 1. — P. 141—147.
27. Lipton S.A., Stamler J.S., Singel D.J. // Nature. — 1993. — Vol. 364. — P. 626—632.
28. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265—275.
29. Luscher T.F. // Amer. J. Hypertens. — 1990. — Vol. 3, № 4. — P. 317—330.
30. MacNulty E.E., Plevin R., Wakelam M.J. // Biochem. Soc. Trans. — 1990. — Vol. 18, № 3. — P. 482—483.
31. Ohlstein E.H., Storer B.L. // J. Neurosurg. — 1992. — Vol. 77, N 2. — P. 274—278.
32. Palmer R.M.J., Ferrige A.G., Moncada S. // Nature. — 1987. — Vol. 327, N 6122. — P. 524—526.
33. Palmer R.M.J., Ress D.D., Ashton D.S., Moncada S. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1988. — Vol. 153. — P. 1251—1256.
34. Pohl U., Busse R. // J. Physiol. (Lond.). — 1989. — Vol. 256, N 6. — Pt 2. — P. H1595—H1600.
35. Rees D.D., Palmer R.M.J., Moncada S. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1989. — Vol. 86, N 9. — P. 3375—3378.
36. Rivier J., Klimtack R., Galyean R. // J. Chromatogr. — 1984. — Vol. 288. — P. 303—328.
37. Rubinstein H.M., Pryce J.D. // J. clin. Path. — 1959. — Vol. 12, N 1. — P. 80—84.
38. Vedernidov Yu.P., Mordvincev P.J., Malenkova T.V., Vanin A.F. // Nitric Oxide from L-Arginine: a Bioregulatory System. — Amsterdam, 1990. — P. 337—377.

## ARE NITRITE IONS REALLY INVOLVED IN REGULATION OF INTRA- AND INTERCELLULAR SYSTEMS?

V. P. Reutov, E. G. Sorokina, V. G. Pinelis, T. S. Korshunova, A. A. Rodionov, L. Kh. Komissarova, V. B. Koshelev, S. M. Strukova, L. P. Kayushin, P. Brake

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Institute of Pediatrics, Institute of Neurology, Russian Academy of Medical Sciences, M.V.Lomonosov State University, Moscow, Anry Bofar Institute, Paris

Effect of nitrite ions on content of proteins (hemoglobin, albumin and others), peptides (AKTH and endothelin-1,2) of total  $\alpha$ -aminonitrogen and cGMP was studied in rat blood. The data obtained suggest that  $\text{NO}_2^-$  may be involved in regulation of these physiologically active substances because  $\text{NO}_2^-$  are the deposited form of nitric oxide which may regulate the inter- and intracellular signal systems.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616-008.921.7:547.96-092.9-07

В.П.Реутов, Е.Г.Сорокина, Л.П.Каюшин

## ЦИКЛ ОКИСИ АЗОТА В ОРГАНИЗМЕ МЛЕКОПИТАЮЩИХ И НИТРИТРЕДУКТАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕМСОДЕРЖАЩИХ БЕЛКОВ

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Институт педиатрии РАМН, Институт химической физики РАН, Москва

В организме млекопитающих окись азота выполняет одну из ключевых функций, которая связана с регуляцией  $\text{Ca}^{2+}$ -мобилизующей системы [12]. Некоторые исследователи относят NO наряду с  $\text{Ca}^{2+}$ , цАМФ, цГМФ, инозитол-1,4,5-трифосфатом, диацилглицеролом, арахидоновой кислотой и  $\text{H}^+$  к вторичным мессенджерам [11, 13, 16]. Ранее нами было показано, что цепочка, ведущая к образованию NO, нитритов и нитратов, в условиях гипоксии или снижения парциального давления кислорода может быть замкнута в цикл окиси азота (см. схему 1). Эта возможность реализуется в организме млекопитающих благодаря способности нитритов восстанавливаться в NO при участии гемсодержащих белков [7, 10]. Вместе с тем в условиях нормальной или повышенной обеспеченности организма кислородом ионы  $\text{NO}_2^-$ , образующиеся из NO, при взаимодействии с оксигемоглобином приводят к образованию супероксидных анион-радикалов, которые в свою очередь интенсифицируют процесс образования ионов  $\text{NO}_2^-$  и  $\text{NO}_3^-$  [6, 18].

### Окись азота и токсикология

К проблеме воздействия NO на регуляцию метаболизма клеток тканей млекопитающих мы подошли, изучая механизмы токсического действия нитратов и нитритов [1, 7, 11]. Ранее было показано, что нитриты могут оказывать свое токсическое действие практически на всех структурно-функциональных уровнях в организме млекопитающих [1, 2, 7, 10]. Было также обнаружено, что в основе таких универсальных механизмов токсического действия лежит реакция превращения ионов  $\text{NO}_2^-$  в NO (см. схему 2). Именно это звено ( $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$ )

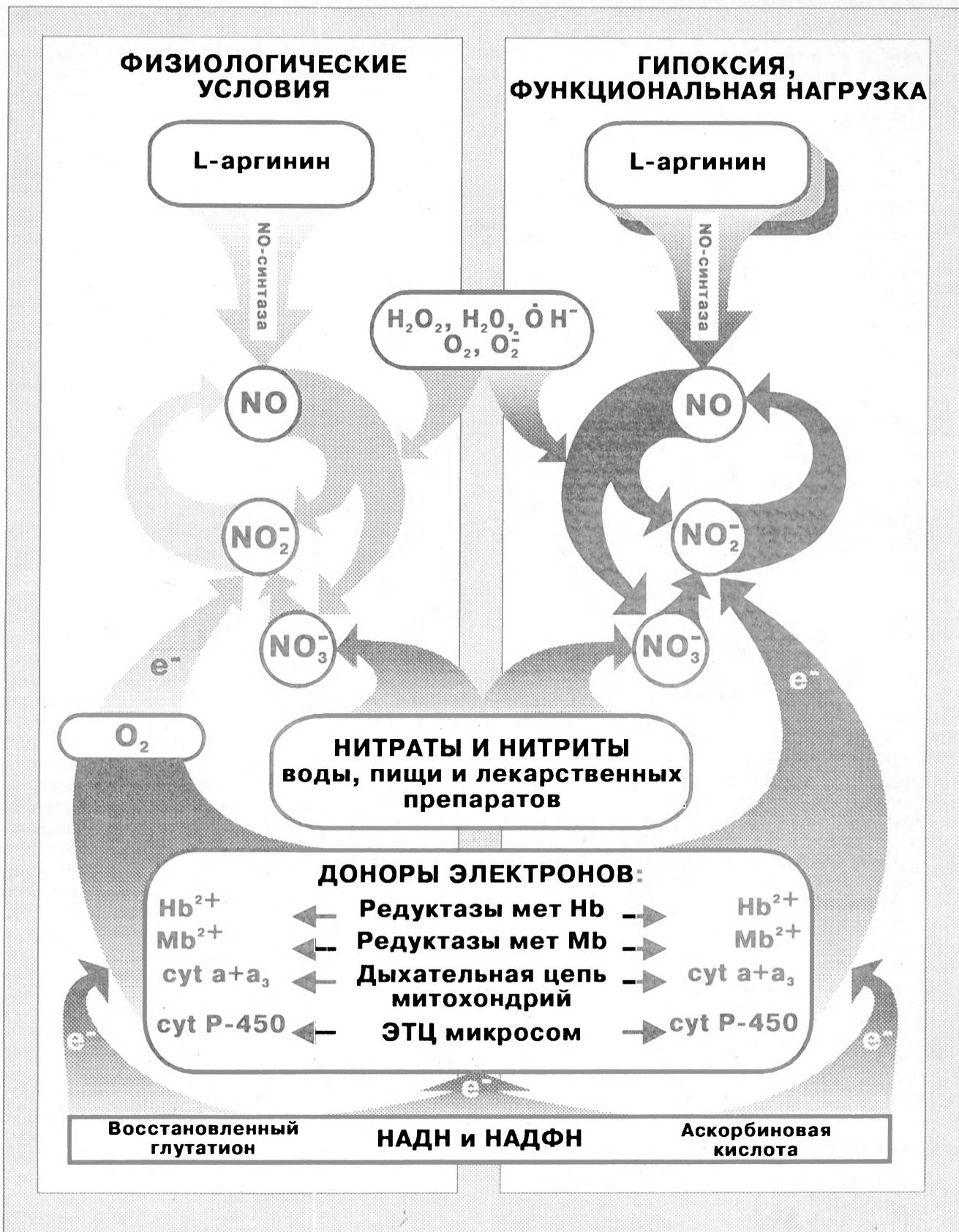
определяет многочисленные токсические свойства нитритов: способность ионов  $\text{NO}_2^-$  окислять гемоглобин и образовывать Hb—NO-комплексы; оказывать влияние на активность растворимой гуанилатциклазы и уровень цГМФ, а также на внутриклеточную концентрацию ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Через изменение содержания ионов  $\text{Ca}^{2+}$  осуществляется регуляция метаболизма клеток многочисленными ферментными системами, а также вторичными мессенджерами [15]. Поскольку вторичные мессенджеры функционируют в системах с коэффициентом усиления сигнала  $10^6$ — $10^8$  [3, 4], роль этого звена в осуществлении механизмов токсического действия ионов  $\text{NO}_2^-$  трудно переоценить.

Кроме того, было показано, что окись азота, окисляясь в присутствии кислорода до двуокиси азота ( $\text{NO}_2$ ), может взаимодействовать с белками (SH-группами цистина и цистеина и OH-группами тирозиновых остатков), а также с ненасыщенными жирными кислотами, входящими в состав мембран клеток и субклеточных структур [7—9]. Свободно-радикальные продукты — окись и двуокись азота — обладают способностью повреждать белки и ненасыщенные жирные кислоты; уменьшать активность большинства ферментных систем (исключение составляют растворимая гуанилатциклаза и АДФ-рибозилтрансфераза); нарушать целостность клеточных и субклеточных мембранных структур; разобщать окислительное фосфорилирование; ингибировать транспорт электронов по дыхательной цепи митохондрий; понижать уровень АТФ в крови и клетках тканей млекопитающих; окислять пигмент крови и участвовать в образовании R- и T-конформеров Hb—NO-комплексов [1, 7, 10]. Кроме того, эти вещества обладают мутагенной и тератогенной активностью [2]. Таким образом, знание механизмов восстановления нитритов в окись азота чрезвычайно важно для понимания причин столь широкого спектра токсического действия этих веществ. Помимо токсических свойств, на стадии превращения ионов  $\text{NO}_2^-$  в NO образуются канцерогенные N-нитрозосоединения (см. схему 2). Умение управлять процессами превращения нитритов в окись азота может открыть исследователям способы уменьшения неблагоприятного воздействия нитратов и нитритов на организм человека и животных.

### Нитритредуктазная активность гемсодержащих белков и цикл окиси азота

В связи с важной ролью звена  $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$  в цепи превращений нитратов и нитритов (см. схему 2) нами были поставлены 3 основные задачи: 1) локализовать места восстановления ионов  $\text{NO}_2^-$  в NO в организме млекопитающих; 2) выснить природу ферментов и низкомолекулярных органических веществ, способных выполнять нитритредуктазную функцию в организме млекопитающих; 3) исследовать факторы, влияющие на активацию и ингибирование процессов восстановления нитритов в NO.

В ходе решения этих задач было показано, что гемоглобин крови в дезоксиформе способен восстанавливать нитриты в NO. Кислород может выступать в качестве ингибитора нитритредуктазной активности пигмента крови [7, 10]. В дальнейшем было выяснено, что такую же нитритредуктазную функцию может выполнять миоглобин, находящийся в дезоксиформе. Восстановление нитритов в NO



Цикл окиси азота в организме млекопитающих.

у млекопитающих может осуществляться в митохондриях [2, 7] и микросомах [19]. В митохондриях нитритредуктазную функцию выполняет цитохромоксидаза [2, 7], а в микросомах — цитохром P-450 [19]. Таким образом, гемсодержащие белки — гемоглобин, миоглобин, цитохромоксидаза и цитохром P-450, взаимодействуя с кислородом, могут

восстанавливать нитриты в NO и, тем самым, замыкать цепочку превращений L-аргинин → NO → NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> в единый цикл окиси азота (см. схему 2). В связи с тем что восстанавливать ионы NO<sub>2</sub> в NO могут лишь восстановленные формы гемсодержащих белков, нельзя не учитывать роль ферментных и неферментных систем, принимающих участие в пе-

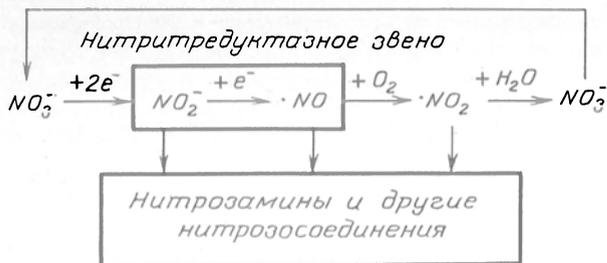


Схема основных продуктов метаболизма нитратов и нитритов.

реносе электронов на эти гемсодержащие белки. В первую очередь к ним нужно отнести метгемоглобин и метмиоглобинредуктазы, а также электронно-транспортные цепи митохондрий и эндоплазматического ретикулума. Среди низкомолекулярных систем следует отметить роль аскорбиновой кислоты и восстановленного глутатиона [2, 7].

В чем состоит биологический смысл наличия у гемсодержащих белков нитритредуктазной способности? Многие биологически важные функции в живых системах сопряжены между собой. Примерами служат сократительная и АТФазная активность миозина, процессы окисления и фосфорилирования у митохондрий. Широко известна способность эндоплазматического ретикулума и митохондрий участвовать в регуляции внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , который, как известно, играет важную роль в осуществлении процессов внутриклеточной сигнализации [3, 4, 11, 13, 16]. Значительно менее известно о способности вышеупомянутых клеточных структур восстанавливать ионы  $\text{NO}_2^-$  в  $\text{NO}$ . Анализ собственных исследований и данных литературы позволил выдвинуть гипотезу о том, что биологический смысл сопряженности  $\text{Ca}^{2+}$ -мобилизующей и нитритредуктазной активности у митохондрий и эндоплазматического ретикулума заключается в более эффективном использовании  $\text{NO}$  и продуктов метаболического превращения — ионов  $\text{NO}_2^-$  и  $\text{NO}_3^-$  — в регуляции концентрации внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ . Эта способность субклеточных структур может иметь особое значение при развитии многих патологических процессов, протекающих на фоне ишемии и гипоксии клеток тканей человека и животных.

Известно, что при гипоксии усиливается синтез  $\text{NO}$ , а также нитритов и нитратов. Вместе с тем повышается активность ферментов, участвующих в восстановлении нитратов и нитритов в  $\text{NO}$  [5, 6], и снижается содержание L-аргинина в сыворотке крови [24]. Имеющиеся данные позволяют предполагать, что механизмы адаптации к гипоксии и развитие резистентности животных к пониженному содержанию кислорода в организме млекопитающих могут включать системы, связанные с нитритредуктазной активностью гемсодержащих белков и с усиленной утилизацией L-аргинина.

#### Множественность форм существования эндотелиального фактора (EDRF)

Вопрос о химической природе EDRF широко обсуждается в литературе [22, 23, 25]. Короткий период полураспада  $\text{NO}$  (4–6 с) и вместе с тем важная роль этого соединения в регуляции активности растворимой гемсодержащей гуанилатциклазы и АДФ-рибозилтрансферазы [20] обращают внимание исследователей на возможность существования других, более долго живущих форм EDRF, которые

бы могли не только участвовать в регуляции внутриклеточных процессов, но и распространять свое влияние на межклеточные и межорганные взаимодействия. В литературе последних лет  $\text{NO}$  рассматривается как возможный нейротрансмиттер, участвующий в осуществлении взаимосвязи между постсинаптическим и пресинаптическим нейроном [21].

Полученные нами данные позволяют по-новому взглянуть на проблему, связанную с химической природой EDRF, вызывающей релаксацию гладкомышечных элементов сосудов. В настоящее время существуют по крайней мере две гипотезы о химической природе EDRF: 1) EDRF как окись азота [23]; 2) EDRF — динитрозильные комплексы железа [25]. Вместе с тем известно, что ионы  $\text{NO}_2^-$  постоянно присутствуют во всех биологических жидкостях и клетках тканей млекопитающих. Концентрация ионов  $\text{NO}_2^-$  может достигать  $10^{-6}\text{M}$ , а ионов  $\text{NO}_3^-$  —  $10^{-5}\text{M}$  и выше. На основании анализа данных собственных исследований и данных литературы мы пришли к выводу о том, что окись азота и продукты ее метаболического превращения — ионы  $\text{NO}_2^-$  и  $\text{NO}_3^-$  — в результате окислительно-восстановительных превращений могут взаимно переходить друг в друга, образуя короткоживущую и высокоактивную форму EDRF —  $\text{NO}$  и формы с более длительным периодом существования — нитрозотиолы, динитрозильные комплексы железа, ионы  $\text{NO}_2^-$  и  $\text{NO}_3^-$ . Не отрицая возможности существования EDRF в указанных выше двух формах, мы предложили новую, более длительно живущую форму EDRF — ионы  $\text{NO}_2^-$ , которые, как известно, также могут активировать растворимую гемсодержащую гуанилатциклазу и повышать уровень цГМФ. Не исключено, что эта способность нитритов активировать гуанилатциклазу также связана с восстановлением ионов  $\text{NO}_2^-$  самой гуанилатциклазой или другими гемсодержащими белками.

В условиях гипоксии активируются Mo-содержащие ферменты (ксантиноксидаза/ксантиндегидрогеназа), которые могут выступать в качестве нитратредуктаз [17]. В связи с этим можно ожидать активацию процесса восстановления нитратов при гипоксии и усиление продукции  $\text{NO}$  не только из ионов  $\text{NO}_2^-$  гемсодержащими белками, но и из ионов  $\text{NO}_3^-$ . Таким образом, имеющиеся в настоящее время данные позволяют высказать гипотезу о множественности форм существования EDRF, одними из которых могут быть:  $\text{NO}$ , нитрозотиолы, динитрозильные комплексы железа, ионы  $\text{NO}_2^-$  и, возможно, ионы  $\text{NO}_3^-$ .

#### Физиологическое значение нитритредуктазной и $\text{NO}$ -связывающей способности у гемоглобина

При изучении действия ионов  $\text{NO}_2^-$  на организм млекопитающих было показано, что при восстановлении этих ионов в  $\text{NO}$  образуются более стабильные R-конформеры Hb— $\text{NO}$ -комплексов и менее стабильные T-конформеры Hb— $\text{NO}$ -комплексов [1, 2, 7, 10]. Соотношение между этими формами зависит от степени оксигенации крови, содержания ионов  $\text{NO}_2^-$ , тяжести гипоксического состояния, наличия или отсутствия некоторых физиологически активных соединений (например, аскорбиновой кислоты) и некоторых других факторов. Показано также, что поступление ионов  $\text{NO}_2^-$  в кровь может приводить к образованию комплексов  $\text{NO}$  с гемовым и негемовым железом практически во всех клетках тканей животных. На основании наших данных

высказана гипотеза, что сопряженность кислород-транспортной, а также нитритредуктазной и NO-связывающей способности у пигмента крови может иметь физиологическое значение, особенно при гипоксических состояниях, для осуществления транспорта NO на большие расстояния в виде R-конформеров Hb—NO-комплексов с последующим переходом R-конформеров в T-конформеры и высвобождением NO. В связи с этим нельзя исключить возможности переноса NO в головной мозг и другие ткани, а также участия этого соединения в регуляции  $Ca^{2+}$ -мобилизующей системы в форме NO или ионов  $NO_2^-$ . В клетках различных тканей млекопитающих ионы  $NO_2^-$  могут вновь восстанавливаться в NO в митохондриях и в эндоплазматическом ретикулуме. Доказательство участия цитохромоксидазы митохондрий в восстановлении ионов  $NO_2^-$  в NO привело нас к необходимости обратить внимание на эндосимбиотическую гипотезу о происхождении митохондрий и о нитратном дыхании как предшественнике кислородного дыхания [7].

Таким образом, биологическое значение нитритредуктазной и NO-связывающей способности пигмента крови может заключаться в транспорте NO в клетки тканей, которые находятся в условиях ишемии и гипоксии. Известно, что именно в этих условиях в клетках мозга резко повышается уровень глутамата, который, взаимодействуя с NMDA-рецепторами, приводит к усилению входа  $Ca^{2+}$  внутрь клетки, активации системы фосфоинозитидного цикла и мобилизации ионов  $Ca^{2+}$  из депо. В клетках ишемизированных тканей возникает острая потребность в активации систем защиты от избытка ионов  $Ca^{2+}$ . Окись азота, активируя растворимую гемсодержащую гуанилатциклазу, повышает уровень цГМФ, который в присутствии инозитолмонофосфата и фосфорилированного белка фосфоламбана в свою очередь повышает активность  $Ca^{2+}$ -АТФаз, осуществляющих транспорт ионов  $Ca^{2+}$  внутрь эндоплазматического ретикулума.

#### Сопряженность кислородааккумулирующей и нитритредуктазной способности у миоглобина

Интересно также отметить, что миоглобин, обладающий способностью восстанавливать ионы  $NO_2^-$  в NO, локализуется в мышечных клетках в непосредственной близости от  $Ca^{2+}$ -зависимых систем актин-миозинных комплексов. Таким образом, биологический смысл сопряженности кислородзапасующей и нитритредуктазной способности миоглобина может заключаться в обеспечении энергетических систем кислородом, а систем аккумуляции ионов  $Ca^{2+}$  — окисью азота. Последняя через активацию растворимой гуанилатциклазы повышает уровень цГМФ и, тем самым, влияет на внутриклеточную концентрацию ионов  $Ca^{2+}$ . В связи с этим можно предположить, что ионы  $NO_2^-$  наряду с ионами натрия, калия, кальция, водорода и хлора выполняют в организме млекопитающих важную регуляторную роль.

Итак, на уровне макромолекул (белков) нитритредуктазная активность оказалась сопряженной с кислородтранспортной и кислородааккумулирующей функциями гемоглобина и миоглобина соответственно.

#### Заключение

Механизм восстановления ионов  $NO_2^-$  в NO начинается активно действовать в тех условиях, когда

гемсодержащие белки переходят в дезоксиформу и приобретают способность восстанавливать нитриты в NO. Таким образом, L-аргинин в условиях гипоксии или снижения парциального давления кислорода перестает быть единственным источником NO. В этих условиях начинают использоваться также и метаболические продукты — ионы  $NO_2^-$  и  $NO_3^-$ .

Преимущества, которые получает клетка в результате работы цикла окиси азота, заключаются в следующем. Во-первых, ионы  $NO_2^-$  могут выполнять роль альтернативных акцепторов электронов в условиях дефицита кислорода. Во-вторых, клетка получает возможность использовать продукты метаболизма — ионы  $NO_2^-$  для образования NO-антикальциевого агента. В-третьих, цГМФ в тканях может играть роль эффектора отрицательной обратной связи, а увеличение его содержания может ингибировать интенсивность окислительно-восстановительных реакций и снижать потребность тканей в кислороде [5]. И наконец, в-четвертых, активация молибденсодержащих ферментов (ксантиноксидаза/ксантиндегидрогеназа) при гипоксии также обеспечивает возможность восстановления ионов  $NO_3^-$  в  $NO_2^-$ . Кроме того, следует отметить, что цикл окиси азота позволяет внести дополнительные динамические компоненты в систему внутриклеточной сигнализации. Действительно, ранее осцилляцию ионов  $Ca^{2+}$  рассматривали как зависящий от времени процесс. Ясно также было и то, что от обеспеченности клеток энергией зависит работа системы внутриклеточной сигнализации. Однако было неясно, как функциональная нагрузка или изменение обеспечения организма кислородом влияет на синтез окиси азота. Обнаружение циклического превращения промежуточных продуктов цикла окиси азота (L-аргинина, NO, нитритов и нитратов) и зависимости между нитритредуктазной активностью и степенью обеспеченности клеток кислородом позволило понять, как системы внутриклеточной сигнализации могут быть связаны с функциональной нагрузкой. Предложенный нами механизм активации синтеза NO в условиях снижения парциального давления кислорода в крови и тканях при функциональной нагрузке расширяет представления физиологов о механизме функциональной гиперемии органов, сопровождающейся расширением сосудов. Как известно, функциональную гиперемию в последнее время физиологи объясняли усилением синтеза NO эндотелиальными клетками вследствие сдвигового напряжения на эндотелий, вызванного усилением кровотока [14].

Таким образом, цикл окиси азота можно рассматривать как компенсаторный механизм, который обеспечивает клеткам различных тканей организма меньшую зависимость от нагрузки в условиях дефицита кислорода и энергии.

Работа выполнена при поддержке Фонда фундаментальных исследований, грант 94-04-11950.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ажипа Я.И., Реутов В.П., Каюшин Л.П. // Изв. АН СССР. Сер. биол. — 1983. — № 2. — С. 240—250.
2. Ажипа Я.И., Реутов В.П., Каюшин Л.П. // Физиология человека. — 1990. — Т. 16, № 3. — С. 131—149.
3. Костюк П.Г., Чазов Е.И. // Успехи физиол. наук. — 1988. — Т. 19, № 4. — С. 3—8.
4. Крыжановский Г.Н. // Пат. физиол. — 1990. — № 2. — С. 3—6.
5. Петровский Б.В., Ефунди С.П., Демуров Е.А., Родионов В.В. Гипербарическая оксигенация и сердечно-сосудистая система. — М., 1987.

6. *Поберезкина Н.Б., Задорина О.В., Андрищенко П.И., Хмельский Ю.В.* // Укр. биохим. журн. — 1992. — Т. 64, № 6. — С. 64—71.
7. *Реутов В.П.* Изучение механизмов восстановления ионов NO<sub>2</sub> в крови и митохондриях клеток тканей млекопитающих: Дис. ... канд. биол. наук. — М., 1988.
8. *Реутов В.П., Ажина Я.И., Каюшин Л.П.* // Бюл. exper. биол. — 1978. — № 9. — С. 299—301.
9. *Реутов В.П., Ажина Я.И., Каюшин Л.П.* // Докл. АН СССР. — 1978. — Т. 214. — С. 1375—1377.
10. *Реутов В.П., Ажина Я.И., Каюшин Л.П.* // Изв. АН СССР. Сер. биол. — 1983. — № 3. — С. 408—418.
11. *Реутов В.П., Орлов С.П.* // Физиология человека. — 1993. — Т. 19, № 1. — С. 124—137.
12. *Северина И.С.* // Вестн. АМН СССР. — 1987. — № 7. — С. 41—47.
13. *Скулчев В.П.* Энергетика биологических мембран. — М., 1989.
14. *Хаютин В.М.* // Итоги науки и техники. Физиология человека и животных. — М., 1979. — Т. 23. — С. 46—107.
15. *Berridge M.J.* // Advanc. Cycl. Nucl. Res. — 1975. — Vol. 5. — P. 1.
16. *Berridge M.J., Irvin R.F.* // Nature. — 1989. — Vol. 341, N 6239. — P. 197—205.
17. *Boda D., Nemeth I.* // Biomed. biochim. Acta. — 1989. — Vol. 48, N 2/3. — P. 31—35.
18. *Doyle M.P., Pickering R.A., Dykstra R.L. et al.* // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1982. — Vol. 105, N 1. — P. 127—132.
19. *Duthu G.S., Shertzer H.B.* // Drug. Metab. Dispos. Biol. Fate Chem. — 1979. — Vol. 7, N 5. — P. 263—269.
20. *Galione A.* // TIPS. — 1992. — Vol. 13, № 8. — P. 304—306.
21. *Garthwaite J.* // Trends Neurosci. — 1991. — Vol. 14, N 2. — P. 60—67.
22. *Palmer R.M.J., Ashton D.S., Moncada S.* // Nature. — 1988. — Vol. 333. — P. 664—666.
23. *Palmer R.M.J., Rees D.D., Ashton D.S., Moncada S.* // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1980. — Vol. 153. — P. 1251—1256.
24. *Reutov V.P., Sorokina E.G., Rodionov A.A., Korshunova T.S.* // Symposium "Structure and Function of Regulatory Polypeptides": Abstracts. — Moscow, 1992. — P. 67.
25. *Vedernikov Yu.P., Mordvincev P.J., Malenkova J.V., Vanin A.F.* // Symposium "Nitric Oxide from L-Arginine": Proceedings. — Amsterdam, 1990. — P. 373—377.

Поступила 24.02.94

## THE NITRIC OXIDE CYCLE IN MAMMALS AND THE NITRITE REDUCTASE ACTIVITY OF HEME-CONTAINING PROTEINS

V.P.Reutov, E.G.Sorokina, L.P.Kayushin

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Institute of Pediatrics, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

A nitric oxide cycle is proposed, which explains numerous experimental data demonstrating that under hypoxic conditions synthesis of NO was elevated. Two pathways appear to be fundamental for activation of NO formation: 1) activation of L-arginine utilization as its content was decreased in blood; 2) transfer of heme-containing proteins hemoglobin, myoglobin, cytochrome oxidase and cytochrome P-450 into their deoxy-form, where these proteins are able to reduce NO<sub>2</sub> into NO. This suggests that the nitric oxide cycle may be considered as a compensatory mechanism which allowed the various cells to acquire reduced dependence on overloading under conditions of oxygen and energy deficiency.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616-018-008.931:577.152.361:092.9-07

Г.А.Грибанов, А.Н.Панкрушина, И. В. Федоровский

### ИЗМЕНЕНИЯ АТФАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ТКАНИ И МИТОХОНДРИЙ НЕКОТОРЫХ СТЕРОИДПРОДУЦИРУЮЩИХ ОРГАНОВ КРЫС ПРИ АУТОЛИЗЕ

Тверской государственный университет

Данные литературы об изменениях АТФаз тканей, органов, их ультраструктур при аутолизе отличаются чрезвычайным разнообразием, что связано как с биохимическими различиями изучаемых объектов, так и с условиями и методикой проведения эксперимента, предшествующим состоянием организма и многими другими факторами. В связи с этим интерпретация данных, получаемых при исследовании аутолитических изменений АТФазной активности, весьма затруднительна [6]. Как отмечается в ряде исследований [5—7], энергетические процессы при аутолизе резко ингибируются, что обычно связывают с деградацией ультраструктур и угнетением активности ферментных систем, генерирующих АТФ и другие макроэргические соединения. Характер таких изменений имеет определенную органную специфичность. Наиболее быстро падает активность митохондриальных АТФаз в ишемизированном миокарде, почках, медленнее изменяется активность

фермента в мозге, в котором через 32 ч после смерти сохраняется около 50% активности фермента.

Исследованиями активности фермента в аутолизирующихся стероидпродуцирующих органах и их ультраструктурах (митохондриях) не проводилось. В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение динамики активности Mg-зависимой АТФазы в аутолизирующихся тканях, гомогенатах и митохондриях надпочечных и семенных желез крыс. Такие варианты постановки эксперимента имели целью выяснение роли структурной организации в аутолитических изменениях АТФазной активности.

**Методика.** Опыты проводили на крысах-самцах линии Вистар. Надпочечные и семенные железы удаляли после декапитации животных. С целью выяснения характера влияния клеточной организации на изменения активности АТФазы в процессе посмертного аутолиза эксперименты ставили в трех вариантах: в тканях, гомогенатах, митохондриях.

Навески выделенных тканей и органов помещали на часовые стекла в стерильные чашки Петри, на дно которых наливали по 0,5 мл H<sub>2</sub>O (стерилизованная); 10% гомогенат семенников и 2% гомогенат надпочечников готовили на 0,25 М раствора сахаразы, содержащем 1 мМ трис-НСl pH 7,4; фракцию изолированных митохондрий получали с помощью дифференциального центрифугирования постядерных супернатантов, после чего суспендировали в 2 мл среды выделения (0,25 М раствор сахаразы, содержащий 1 мМ трис-НСl pH 7,4).

Изучение активности Mg-зависимой АТФазы тканей, гомогенатов и митохондрий в ходе посмер-

Время аутолиза, ч	Семенники			Надпочечники		
	ткань	гомогенат	митохондрии	ткань	гомогенат	митохондрии
0	6,5±0,29	6,5±0,26	11,3±0,64	15,5±0,9	15,6±0,9	32,2±2,4
4	1,7±0,12	1,4±0,16	2,8±0,26	4,6±0,2	8,4±0,7	10,1±0,9
% от контроля	26	22	25	30	54	31
<i>p</i>	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
24	0	0	0	0	1,4±0,17	4,0±0,13
% от контроля					9,0	12,0
<i>p</i>					< 0,05	< 0,05

тного аутолиза проводили сразу после умерщвления животного, получения гомогенатов или митохондрий, а также через 4 и 24 ч инкубации объектов исследования при температуре 24°C. Активность фермента определяли модифицированным методом с использованием малахитового зеленого Б [4].

Результаты экспериментов обрабатывали статистически.

**Результаты и обсуждение.** Исследованы перестройки активности АТФазы надпочечников, семенников в ходе аутолиза в целых органах, их гомогенатах (рН 7,4) и митохондриальных препаратах. Цель такой постановки эксперимента — выяснить роль структурной организации в аутолитических изменениях АТФазной активности органов, гомогенатов и митохондрий. Полученные результаты представлены в таблице.

Как следует из приведенных данных, исходный уровень активности Mg-зависимой АТФазы в ткани семенников и их гомогенатах был одинаков, но примерно в 2 раза ниже активности фермента в митохондриальных препаратах. В процессе аутолиза уже к 4-му часу АТФазная активность резко снижалась во всех препаратах практически в одинаковой степени, составляя всего 22—26% исходной величины.

Через 24 ч активность фермента не определялась ни в ткани, ни в гомогенате, ни в митохондриях. Можно считать, что характер аутолитических изменений АТФазы органа, гомогената и митохондрий семенных желез одинаков и не зависит от структурного фактора. Резкое угнетение активности фермента в первые 4 ч, очевидно, связано с деградацией АТФазного комплекса митохондриальных и других структур, протекающей, видимо, по единому механизму.

В надпочечных железах активность АТФазы выше, чем в семенных железах, в 2,5—3 раза, что, вероятно, связано с органной специфичностью и наличием определенных гормональных факторов (минерал- и глюкокортикоидов, катехоламинов), как известно, активирующих фермент [8].

В процессе аутолиза надпочечников (органный уровень) активность фермента резко снижается и уже к 4-му часу составляет лишь 30% исходной величины, к концу суток активность фермента не определяется. В гомогенатах и митохондриальных препаратах надпочечников фермент проявлял большую стабильность. Это может быть связано со стабилизирующим действием некоторых гормональных факторов на мембранные структуры, в том числе и на митохондриальные. В процессе дальнейшей инкубации активность фермента продолжала снижаться, но полностью не инактивировалась.

Таким образом, выявлены неоднотипные изменения (при общей однонаправленности процесса) активности одного из важнейших ферментов фосфор-

но-энергетического обмена — Mg-зависимой АТФазы — в ходе посмертного аутолиза стероидпродуцирующих органов. В процессе аутолитической деградации ткани семенников и надпочечников, а также гомогената и препарата митохондрий семенных желез в первые 4 ч активность фермента снижалась примерно в одинаковых пределах. В гомогенате и митохондриях надпочечников ингибирование АТФазы было менее резким. Это может указывать на большую стабильность фермента в них. Можно предположить, что дезинтеграция органа (гомогенизация) для АТФаз аутолизирующихся ткани и биоструктур надпочечников не является фактором, способствующим понижению ее активности, поскольку на тканевом уровне ингибирование фермента в процессе аутолиза было более выраженным, чем в гомогенате. Для семенников, где составляющие их ткань клетки более разобщены, структурный фактор, по-видимому, вообще не имеет существенного значения для последующих изменений активности фермента. В ходе дальнейшего аутолиза (к 24-му часу инкубации) в аутолизирующихся тканях, гомогенате, митохондриях семенников, ткани надпочечников активность фермента уже не выявлялась, тогда как в гомогенате и особенно митохондриях надпочечников некоторая активность сохранялась (причем в митохондриях она была выше, чем в гомогенате). Причин этому может быть много. Одной из них, на наш взгляд, является особенность липидного состава этих биоструктур. В составе ткани, гомогената и митохондрий надпочечников выявляются значительные количества эфиров холестерина, а в митохондриях — кислых фосфолипидов (фосфатидных кислот, полиглицерофосфатидов, фосфатидилсерин) [2, 3]. С другой стороны, многочисленными исследованиями установлено, что различные АТФазы являются липидзависимыми ферментами и нуждаются, хотя и не абсолютно, для проявления своей активности в наличии отрицательно заряженных молекул фосфолипидов (фосфатидилсерин, фосфатидных кислот, фосфатидилинозитидов), представляющих собой потенциальные реактиваторы фермента [1, 9].

Исходя из этого, можно заключить, что в стабильности АТФазы ткани, гомогената и митохондрий надпочечников немаловажное значение имеют липидный состав и их перестройки в ходе посмертного аутолиза, наличие соответствующих гормонов, вследствие чего данный фермент в надпочечниках более защищен от действия ингибиторов и протеаз, нежели в семенных железах.

В целом можно считать, что при аутолизе общая направленность процесса — снижение активности АТФазы — остается однотипной как в семенниках,

так и надпочечниках. Появление лизофосфолипидов, накопление свободных жирных кислот, нарушение структуры органов, их мембранных образований, имеющее место при аутолизе [2], ингибируют активность фермента. Вместе с тем сохранение достаточно высоких количеств кислых фосфолипидов в ряде биоструктур (митохондрий надпочечников и др.), наличие неповрежденных путей биотрансформации некоторых фосфолипидов (фосфатидилсерина, фосфатидилэтаноламина) могут обеспечивать, возможно и не в полной мере, необходимое для проявления АТФазной активности липидное окружение. В тех случаях, когда альтерация биоструктур и их молекулярных компонентов является необратимой, наблюдается и необратимое угнетение многих мембранно-связанных ферментов, в том числе и АТФазы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Болдырев А. А. // Науч. докл. высш. школы. Биол. науки. — 1979. — № 3. — С. 5.
2. Грибанов Г. А. // Вопр. мед. химии. — 1977. — № 3. — С. 381.
3. Грибанов Г. А. Исследование биохимических превращений липидов биологических структур при аутолизе: Автореф. дис. ... биол. наук. — М., 1986.
4. Грибанов Г. А., Щенникова В. В., Федоровский И. В. // Вопр. мед. химии. — 1985. — № 2. — С. 120.
5. Лопухин Ю. М., Коган Э. Н. Критерии жизнеспособности органов и тканей перед трансплантацией. — М., 1975.
6. Лушников Е. Ф., Шапиро Н. А. Аутолиз. — М., 1974.
7. Шумаков В. И., Штенгольд Е. Ш., Онищенко Н. А. Консервация органов. — М., 1975.
8. Edelman I. S., Gick G. et al. // 5-th International Conference Na-K-ATPase. — Arhus, 1987. — P. 16.
9. Roelofsen B. M., Linde-Sibenius T. van // Biochim. biophys. Acta. — 1981 — N 2. — P. 302.

Поступила 23.11.93

#### CHANGES IN THE ATPASE ACTIVITY OF TISSUES AND MITOCHONDRIA OF SOME RAT STEROID-PRODUCING ORGANS DURING AUTOLYSIS

G. A. Gribanov, A. N. Pankrushina, I. V. Fedorovsky

Faculty of Biochemistry and Biotechnology, State University, Tver

The activity of  $Mg^{2+}$ -ATPase was studied in the tissues, homogenates, specimens of rat spermatic and adrenal glands during postmortem autolysis. The initial enzymatic activity was 2-fold higher in adrenal tissue, homogenate and mitochondria than in spermatic ones. As autolysis proceeded in the tissue and homogenate of the adrenal and spermatic glands, and spermatic mitochondria, the ATPase activity was drastically decreased, by disappearing completely at hour 24 of autolysis. At the same time, the enzyme from adrenal mitochondria exhibited a higher stability. Of great importance for this can be rearrangements in the phospholipid profile of the corresponding membranous structures, as well as hormonal factors.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616.379-008.64-06:616.61-092-07

А. Г. Кучеренко, Г. Ф. Задкова, Х. М. Марков, В. С. Полещук

#### ПОЧЕЧНЫЕ ПРОСТАНОИДЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

НИИ педиатрии РАМН, Москва

Как известно, одним из наиболее частых и тяжелых осложнений сахарного диабета является диабетическая нефропатия. Высокая биологическая ак-

тивность простаноидов (ПН) и их сильное влияние на функции почек [2, 7, 11] ставят вопрос о возможном участии ПН в развитии данной патологии.

Имеющиеся в литературе сведения о состоянии почечных ПН при этом заболевании немногочисленны и противоречивы [4, 13, 16, 17]. Это обстоятельство побудило нас провести исследование, основная цель которого изучить роль ПН почек в развитии диабетической нефропатии у крыс с экспериментальным сахарным диабетом.

Методика. В работе использованы крысы-самцы линии Вистар—Киото (WKY). Сахарный диабет вызывали в 8-недельном возрасте животных однократным внутривбрюшинным введением раствора стрептозотоцина, приготовленного ex tempore из расчета 60 мг на 1 кг массы в 0,5 мл цитратного буфера pH 4,2 [18]. Контрольные животные получали внутривбрюшинную инъекцию цитратного буфера в том же объеме.

В течение 6 нед у опытных и контрольных животных измеряли массу тела, артериальное давление (АД), содержание глюкозы в крови. В группу крыс с развивающимся сахарным диабетом включены животные, у которых уровень глюкозы в крови (определяемый ортотолуидиновым методом) через 1 нед после введения стрептозотоцина был равен или превышал 250 мг/дл [5].

Накануне забоя животных с диабетом и контрольных помещали в обменные клетки для регистрации объема выпитой и выделенной за сутки жидкости и суточной экскреции электролитов. В свежесобранной порции мочи с помощью индикаторной бумаги "Meditest" (США) определяли pH мочи, концентрацию в ней глюкозы, наличие белка, кетоновых тел, азота. Указанные параметры на момент забоя представлены в таблице.

Показатели функций почек у крыс с экспериментальным сахарным диабетом ( $M \pm m$ )

Показатель	Крысы линии WKY	
	контроль (n = 16)	опыт (n = 6)
Количество выпитой жидкости, мл	9,64 ± 1,25	19,86 ± 3,88*
Диурез, мл	8,54 ± 1,05	24,4 ± 5,0*
Глюкоза крови, мг/дл	100,5 ± 6,1	320,8 ± 36,2*
Глюкоза мочи, мг/дл	Нет	550,0 ± 42,8*
Белок мочи, мг/сут	"	17,62 ± 1,8*
Азот мочи	"	62,5% случаев
Кетоновые тела в моче	"	50% случаев
pH мочи	7,21 ± 0,16	6,43 ± 0,14*
Масса тела, г	252,8 ± 5,0	213,0 ± 10,1*
Масса почки, мг на 100 г массы тела	711,5 ± 18,0	969,8 ± 11,4*
Экскреция натрия	0,402 ± 0,07	0,135 ± 0,02*

\*  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

О состоянии системы ПН почек судили по уровню экскреции простагландина — ПГЕ, ПГФ<sub>2α</sub>, тромбосана В<sub>2</sub> (ТхВ<sub>2</sub>) — стабильного метаболита ТхА<sub>2</sub> и 6-кето-ПГФ<sub>1α</sub> — стабильного метаболита простациклина (ПГ<sub>12</sub>); эндогенному биосинтезу ПГЕ и ПГФ<sub>2α</sub> микросомальной фракцией медуллярного слоя почек; катаболизму экзогенных <sup>3</sup>H-ПГЕ<sub>2</sub> и <sup>3</sup>ПГФ<sub>2α</sub> корковым и мозговым веществом почек.

Животных забивали под легким эфирным наркозом, быстро извлекали почки и отделяли корковый слой от медуллярного. Кору и медуллу раздельно гомогенизировали в 10 мл 0,05 М ледяного калийно-фосфатного буфера рН 7,5. Микросомальную фракцию выделяли дробным центрифугированием гомогенатов при 9000 g 15 мин и 210 000 g 30 мин на центрифуге L8-M "Bekman" (США) при 4°C.

Высокосортный супернатант использовали в дальнейшем как источник ферментов, катаболизирующих  $^3\text{H}$ -ПГЕ<sub>2</sub> и  $^3\text{H}$ -ПГФ<sub>2α</sub>.

Осадок, содержащий медуллярную микросомальную фракцию, ресуспендировали в 1,2 мл охлажденного буфера Кребса — Хензеляйта рН 7,5 и делили пробу на 3 части: в 0,2 мл определяли белок по Лоури, аликвоты по 0,5 мл использовали для изучения эндогенного биосинтеза ПГ.

К одной аликвоте (0,5 мл) добавляли индометацин ( $10^{-6}$  М) [14] для подавления спонтанного биосинтеза ПГ и, не инкубируя, тотчас доводили рН до 3,5 2 н. муравьиной кислоты; эта проба считалась нулевой, отражающей базальное содержание ПН, образованных в процессе обработки ткани.

Вторую аликвоту (0,5 мл) инкубировали при 37°C в течение 30 мин в атмосфере 4% карбогена. Реакцию останавливали снижением рН пробы до 3,5 — 4,0 муравьиной кислотой.

Количественное определение синтезированных медуллой, а также экскретируемых с мочой ПН проводили радиоиммунным методом с помощью наборов фирмы "Clinical Assay" (США) и Института изотопов (Венгрия) после предварительной органической экстракции биологических образцов этиловым эфиром уксусной кислоты и разделения их на серии методом адсорбционной колоночной хроматографии в системе: бензол — этилацетат — метанол [6]. Скорость биосинтеза ПН медуллярной микросомальной фракцией выражали разностью его в нулевой и после 30-минутной инкубации пробах (в пг/мг белка). Конечный результат экскретируемых за сутки ПГ выражали в пг/сут.

О скорости катаболизма  $^3\text{H}$ -ПГЕ<sub>2</sub> и  $^3\text{H}$ -ПГФ<sub>2α</sub> судили по количеству оставшихся неметаболизированными за время инкубации меченных соединений ( $^3\text{H}$ -ПГЕ<sub>2</sub> — 30 мин,  $^3\text{H}$ -ПГФ<sub>2α</sub> — 60 мин) высокоскоростным цитозолем коры и медуллы в присутствии НАД<sup>+</sup> (кора) и НАДФ<sup>+</sup> (медулла) соответственно.

Пробы по 4,5 мл высокоскоростного цитозоля (210 000 g) инкубировали с  $^3\text{H}$ -ПГЕ<sub>2</sub> (30 000 СРМ) и  $^3\text{H}$ -ПГФ<sub>2α</sub> (30 000 СРМ) при 37°C на воздухе при постоянном перемешивании. Реакцию прекращали добавлением 2 н. муравьиной кислоты. После органической экстракции образцы наносили на тонкослойные пластины "Silufol" (фирмы "Kavalier", Чехо-Словакия) и продукты катаболизма разделяли одномерной хроматографией в системе хлороформ — метанол — уксусная кислота — вода (90:9:0,65:1). Результат рассчитывали в процентах оставшегося некатаболизируемым ПН от общей радиоактивности на хроматографической пластине/100 мг белка ткани.

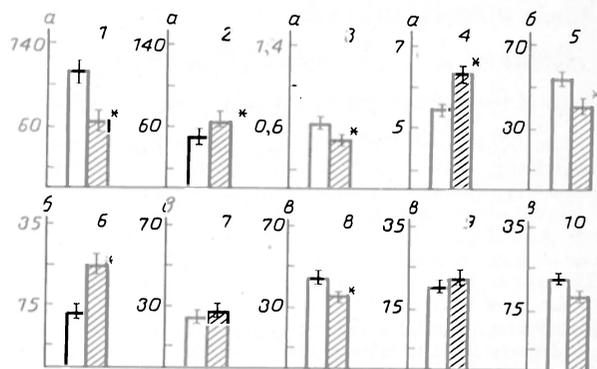
Радиоактивность проб подсчитывали на жидкостном сцинтилляционном счетчике "Mark-III" и гамма-счетчике "1175" фирмы "Delta Medical" (США). Результаты обрабатывали методом вариационной статистики с использованием критерия Фишера — Стьюдента.

Экскретируемые с мочой электролиты определяли методом пламенной фотометрии на приборе FLM-2 "Radiometer" (Дания). Результат выражали в мМ/сут. АД измеряли в хвостовой артерии крыс с помощью электросфигмоманометра фирмы "Narco Bio-Systems" (США).

Результаты и обсуждение. В ответ на введение стрептозотоцина снижалась масса тела животных, появлялись гипергликемия, глюкозурия, кетонурия, ацидурия, полиурия и полидипсия в отличие от контроля, что свидетельствует о развитии хронического сахарного диабета и согласуется с данными других авторов [3,4]. Имели место также высокая протеинурия и повышение АД, что указывает на возникновение диабетической нефропатии (см. таблицу). При этом установлена прямая зависимость потери белка от уровня глюкозы крови. Развитие артериальной гипертензии у крыс с сахарным диабетом наблюдали и другие авторы [10, 12, 15].

Выявленные нами изменения в моче крыс с диабетом (см. таблицу) позволяют думать о глубоком поражении почек, относя его к IV-й (предтерминальной) стадии диабетической нефропатии [8] с характерным для нее снижением скорости клубочковой фильтрации, осмо- и ионорегулирующей функций. Снижение в наших опытах выделения натрия с мочой у крыс с сахарным диабетом хорошо согласуется с установленным [1] уменьшением суточной экскреции электролитов (натрия, калия, хлора) у детей с сахарным диабетом по мере нарастания глубины метаболических нарушений.

Какова при всем этом роль ПН почек? Исследование спектра экскретируемых с мочой ПН у крыс с сахарным диабетом выявило снижение выделения ПГЕ и 6-кето-ПГФ<sub>2α</sub> при одновременном повышении экскреции ПГФ<sub>2α</sub> и ТхВ<sub>2</sub> (см. рисунок), что сопоставимо с данными других авторов [4,9,16,17].



Биосинтез, катаболизм и экскреция с мочой почечных простаноидов (ПН) у крыс линия WKY с экспериментальным сахарным диабетом.

По осям нг/сут (а): экскреция с мочой: 1 — ПГЕ, 2 — ПГФ<sub>2α</sub>, 3 — 6-кето-ПГФ<sub>1α</sub>, 4 — ТхВ<sub>2</sub>; по осям пг/102 мг белка (б): биосинтез микросомальной фракцией почечной медуллы: 5 — ПГЕ, 6 — ПГФ<sub>2α</sub>; по осям % общего р-ти/мг белка: (в) катаболизма ПН медуллой почек: 7 — ПГЕ, 8 — ПГФ<sub>2α</sub> и катаболизм ПН коры почек: 9 — ПГЕ, 10 — ПГФ<sub>2α</sub>. Светлые столбики — контрольные животные, заштрихованные столбики — крысы с экспериментальным сахарным диабетом. \* — p < 0,05 по сравнению с контролем.

По-видимому, основной причиной, определяющей низкую концентрацию ПГЕ в моче крыс с диабетом, является уменьшение его продукции медуллой почки, где он синтезируется в наибольшем количестве. Действительно, образование ПГЕ микросомальной фракцией медуллярного слоя почек оказалось в наших исследованиях достоверно ниже нормы, тогда как синтез ПГФ<sub>2α</sub> значительно выше в контрольной группе (см. рисунок).

Второй фактор, влияющий на содержание ПН в моче, — активность ферментов, катаболизирующих эти соединения. Как свидетельствуют полученные результаты, скорость катаболизма  $^3\text{H}$ -ПГЕ<sub>2</sub> в медулле и коре почек контрольных и опытных крыс оставалась без изменений. При этом деградация  $^3\text{H}$ -ПГФ<sub>2</sub>α была более интенсивной в группе диабетических животных, хотя не настолько, чтобы нормализовать его экскрецию с мочой (см. рисунок).

Снижение у крыс с диабетом внутрипочечного образования ПГЕ и простаглицлина на фоне увеличения тромбксана и ПГФ<sub>2</sub>α должны вызывать существенные изменения почечной гемодинамики, экскреции электролитов, на что указывает прямая корреляционная связь экскреции с мочой ПГЕ и натрия ( $r = 0,57, p < 0,05$ ), уровня АД у этих животных, способствуя тем самым формированию имевшейся диабетической нефропатии. Действительно, воспроизведение сахарного диабета у крыс WKY сопровождалось повышением АД у всех животных, что согласуется с данными [10,12] и связано, очевидно, с развитием у них диабетической нефропатии как таковой, а также с отмеченными при этом изменениями синтеза ПН почек (снижение образования ПГЕ и простаглицлина, увеличение ПГФ<sub>2</sub>α и тромбксана), характеризующимися резким преобладанием сосудосуживающих и антинатрийуретических (прессорных в целом) ПН.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Князев Ю. А., Никифорова А. Т. // Педиатрия. — 1982. — № 5. — С. 34—37.
2. Марков Х. М., Пинелис В. Г. // Кардиология. — 1973. — № 11. — С. 32—38.
3. Baer P., Cagen L., Najletti A. // Prostaglandins. — 1986. — Vol. 32, N 2. — P. 311—316.
4. Bunke M., Itkovitz H. // J. Lab. clin. Med. — 1986. — Vol. 108, N 4. — P. 332—339.
5. Craven P., Caines M., De Rubertis F. // Metabolism. — 1987. — Vol. 36, N 1. — P. 95—103.
6. Dray F. K., Gerozissis K., Kowznetzova B. // Advanc. Prostagland. Thrombox. Res. — 1980. — Vol. 6. — P. 167—181.
7. Gerber J. G., Niels A. S. // Circulat. Res. — 1979. — Vol. 44. — P. 406—410.
8. Irsigler K., Kare B., Ogres E. // Nieren u. Hockdruckkr. — 1987. — Bd 16, N 7. — P. 303—307.
9. Katayama S., Lee J. B. // Hypertension. — 1985. — Vol. 7. — P. 554—561.
10. Kohlemann O., Bossolan D., Lanella M. // Ibid. — 1987. — Vol. 9, N 5. — P. 531—535.
11. Kramer H. J., Stinnesbeck B., Klautke J. // Clin. Sci. — 1985. — Vol. 68, N 4. — P. 387—393.
12. Kusaka M., Kishik I., Sokabe H. // Hypertension. — 1987. — Vol. 10, N 5. — P. 517—521.
13. Morris S., Slake S., Sraer J., Bens M. // J. clin. Invest. — 1985. — Vol. 75, N 2. — P. 404—412.
14. Nowak Y., Bohman S. O., Alster P., Berlin T. // Prostagland. Leukotr. Med. — 1983. — Vol. 11. — P. 269—279.
15. Somani P., Singh H. // Metabolism. — 1979. — Vol. 28, N 11. — P. 1075—1078.
16. Quilley G., McGiff J. C. // J. Pharmacol. exp. Ther. — 1985. — Vol. 234, N 1. — P. 211—216.
17. Quilley J., McGiff J. // Ibid. — 1986. — Vol. 238, N 2. — P. 605—611.
18. Takahashi R., Morita I., Murota S. // Prostagland. Leukotr. Med. — 1986. — Vol. 25, N 2—3. — P. 123—129.

Поступила 01. 07. 93

#### RENAL PROSTANOIDS IN EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

A. G. Kucherenko, G. F. Zadkova, Kh. M. Markov, V. S. Podeschuk  
Institute of Pediatrics, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Participation of renal prostanoids in development of diabetes-induced nephropathy was studied in rats with streptozotocine diabetes.

Development of diabetic nephropathy occurred with simultaneous decreases in production of intrarenal natriuretic, depressor prostaglandin and prostacyclin as well as with increases in content of antinatriuretic, pressor, prothrombogenic T×A<sub>2</sub>. The imbalance observed in the production of renal prostanoids contributed slightly to impairments of hemodynamics, osmo- and ion regulating functions of kidney, i.e. to formation of diabetic nephropathy in the experimental animals.

© С. А. ГУЛИЕВА, Л. Г. АМРАХОВА, 1994

УДК 615.97:553.725].015.4:6167.1/4-008.939.15-39

С. А. Гулиева, Л. Г. Амрахова

#### ВЛИЯНИЕ ЙОДОБРОМНОЙ ВОДЫ НАФТАЛАНСКОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В ГОМОГЕНАТАХ ТКАНЕЙ ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ ИНТАКТНЫХ КРЫС

НИИ МР и ПЛФ, Баку

Процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ), рассматриваемый прежде как патологический, приобрел иную значимость в свете современных данных. Стационарный уровень ПОЛ как ферментативный процесс характерен для метаболизма всех нормальных тканей, являясь, в частности, одним из инструментов быстрой модификации свойств биологических мембран и мембранозависимых процессов [1,10].

Многие патологические состояния организма человека сопровождаются активацией процессов ПОЛ [3,4]. Интенсификация процессов ПОЛ наблюдается при атерогенезе и ишемической болезни сердца, стрессовых поражениях миокарда, гипоксии и т. д. [6,11].

Лечебные свойства нафталановой нефти известны с давних пор [7], однако йодобромная вода Нафталанского месторождения (ЙВНМ) до сих пор как бальнеофактор не исследована.

В настоящей работе мы поставили цель изучить влияние ЙВНМ из скважины №54 на процессы ПОЛ во внутренних органах интактных экспериментальных животных. С бальнеологической точки зрения пластовые воды майкопской свиты Нафталана являются среднеминерализованными, йодобромно-борными, хлоридно-гидрокарбонатно-натриевыми. Они имеют классификационные индексы Д. б. VIII. I и Д. б. VII. I [9]. Проведенные нами специальные исследования показали, что ЙВНМ оказывает определенное антиагрегационное действие, хотя и приводит к незначительной активации по нескольким показателям плазменного гемостаза [2].

Методика. Опыты проводили на 22 белых беспородных крысах массой 150—180 г. 10 животных были подопытными, 6 — контрольными и 6 — интактными. Крыс опытной и контрольной групп подвергли воздействию 10 общих ванн по методике [8] с применением ЙВНМ из скважины № 54 и обычной воды соответственно. 6 интактных крыс не подвергались воздействию ванн и служили в качестве исходных по показателям ПОЛ во внутренних органах. После 10 общих ванн животных опытной и контрольной групп забивали и готовили гомогенаты из сердца, легких, печени, почек и селезенки, в которых ПОЛ изучали по накоплению малонового диальдегида (МДА) и гидроперекиси (ГП) тиобарбитуровым методом [16].

Показатели ПОЛ в гомогенатах тканей внутренних органов крыс под воздействием ЙВНМ из скважины №54

Показатели ПОЛ, ед. опт. пл.	Орган	Интактные крысы	Контрольная группа	Опытная группа
МДА	Сердце	0,152±0,014 (6)	0,130±0,017 (6)	0,181±0,027 (10)
	<i>p</i>		>0,1	> 0,1
	Легкие	0,107±0,023 (6)	0,105±0,013 (6)	0,153±0,027 (10)
	<i>p</i>		>0,1	>0,1
	Печень	0,102±0,018 (6)	0,108±0,019 (6)	0,970±0,410 (8)
	<i>p</i>		> 0,1	< 0,01
	Селезенка	0,170±0,025 (4)	0,130±0,028 (6)	0,159±0,034 (10)
<i>p</i>		> 0,1	> 0,1	
ГП	Почки	0,095±0,013 (6)	0,120±0,021 (6)	0,180±0,042 (10)
	<i>p</i>		> 0,1	< 0,01
	Сердце	0,102±0,096 (6)	0,117±0,051 (6)	0,245±0,044 (10)
	<i>p</i>		> 0,1	> 0,1
	Легкие	0,108±0,047 (6)	0,121±0,023 (6)	0,181±0,026 (10)
	<i>p</i>		> 0,1	> 0,1
	Печень	0,123±0,023 (6)	0,135±0,018 (6)	0,209±0,018 (10)
<i>p</i>		> 0,1	< 0,01	
ГП	Селезенка	0,128±0,031 (5)	0,127±0,012 (6)	0,171±0,024 (10)
	<i>p</i>		> 0,1	> 0,1
	Почки	0,133±0,033 (6)	0,135±0,018 (6)	0,284±0,039 (10)
	<i>p</i>		> 0,1	< 0,001

Примечание. В скобках — число крыс.

Полученные результаты обработаны статистически.

Результаты и обсуждение. Как видно из таблицы, величина МДА в гомогенатах тканей внутренних органов крыс после 10 ванн с ЙВНМ в сердце увеличивалась на 19,1% ( $p > 0,1$ ), в печени — на 850% ( $p < 0,01$ ), в почках — на 89,5% ( $p < 0,01$ ), в легких — на 43% ( $p > 0,1$ ), а в селезенке уменьшилась на 6,5% ( $p > 0,1$ ). Величина ГП в сердце увеличивалась на 140% ( $p > 0,1$ ), в селезенке — на 33,6% ( $p > 0,1$ ), в печени — на 69,9% ( $p < 0,1$ ), в почках — на 113,5% ( $p < 0,001$ ), в легких — на 67,6% ( $p > 0,1$ ). По данным литературы [12], гомогенаты, приготовленные из разных тканей, значительно различаются способностью к образованию радикалов. Липиды в гомогенатах тканей мозга, печени и почек легко подвергаются перекисному окислению, тогда как липиды в гомогенатах из яичника и кишечника не окисляются, и этим можно объяснить наш результат, где величины МДА и ГП оказались больше именно в гомогенатах тканей печени и почек.

Итак, полученные результаты свидетельствуют, что изменения величин МДА в гомогенатах тканей сердца, селезенки и легких недостоверны, в гомогенатах же тканей печени (в особенности) и почек достоверны. При этом величина ГП в гомогенатах тканей внутренних органов, кроме селезенки, значительно увеличена, ПОЛ в гомогенатах тканей селезенки происходит медленнее, чем в остальных органах.

Судя по показателям МДА и ГП, в настоящих экспериментах под воздействием ЙВНМ наблюдается активация ПОЛ, которую можно объяснить стимуляцией функции щитовидной железы под воздействием йодобромной воды, что меняет метаболизм в сторону катаболических процессов [5,14,15].

ГП и продукты их восстановления обладают высокой биологической активностью: 5-, 12- и 15-гидроперекиси арахидоната являются вазодилаторами, а 13-гидроксилинолеат, синтезируемый с участием липоксигеназы эндотелия стенки сосуда, препятствует адгезии и агрегации тромбоцитов [17, 19]. В предыдущих исследованиях под воздействием ЙВНМ мы наблюдали некоторое снижение агрегации тромбоцитов [2]. Ведущую роль в регуляции процессов ПОЛ в организме играют антиоксидантные ферменты, способные утилизировать активный кислород, в том числе глутатионпероксидазу, поскольку этот фермент контролирует скорость биосинтеза тромбосанов в тромбоцитах [18]. Так как ЙВНМ несколько снижает агрегацию тромбоцитов [2], можно предположить, что это происходит за счет повышения активности глутатионпероксидазы в тромбоцитах, активация же последней приводит к ингибированию липогидроперекисей, которые в свою очередь подавляют активность простагландинсинтазы [13]. Таким образом, можно предположить, что под воздействием ЙВНМ в эндотелии сосудов повышается синтез простагландина, что позволяет говорить о перспективах лечебного применения ЙВНМ при некоторых нарушениях реологических свойств крови.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Айдарханов Б. Б., Локушина Э. А., Ленская Е. Г. // *Вопр. мед. химии* — 1989. — № 3. — С. 2—9.
2. Амрахова Л. Г. Сравнительное изучение показателей гемостаза и реологии крови экспериментальных животных под воздействием нафталиновой нефти из различных скважин и йодобромной воды, сопутствующей ей: Автореф. дис. ... канд. наук. — Баку, 1991.
3. Афанасьев И. Б. // *Кислородные радикалы в химии и биологии*. — Минск, 1984. — С. 13—29.

4. Вельтищев Ю. Ю., Юрьева Э. А., Воздвиженский Е. С. // *Вопр. мед. химии.* — 1987. — № 2. — С. 2—9.
5. Вульфсон И. З. Йодобромные воды и их лечебное применение при заболеваниях суставов. — М., 1973.
6. Гукасов В. М., Матюшин А. И., Бучнева Е. А. // *Перекисное окисление липидов и антиоксидантная терапия при ишемической болезни сердца* / Под ред. С. С. Белоусова. — Горький, 1988. — С. 74—79.
7. Гулиева С. А. Уникальная лечебная нафталановая нефть. — Баку, 1981.
8. Гулиева С. А., Самедов С. И. // *Азерб. мед. журн.* — 1991. — № 1. — С. 73—75.
9. Кадыров А. А., Ахундов А. Р., Алиханов Г. Г. // *Сборник трудов Азерб. НИИ курортологии и физиотерапии.* — 1973. — Вып. 14. — С. 130—134.
10. Казарян А. Б., Карагезян К. Г., Барсамян А. Г. // *Биол. журн. Армении.* — 1988. — № 12. — С. 980—981.
11. Козлов Г. С., Буйдина Т. А., Прибытков Ю. И. // *Врач. дело.* — 1990. — № 2. — С. 92—95.
12. Мид Дж. // *Свободные радикалы в биологии.* — 1970. — С. 68—87.
13. Тилис А. Ю., Ильин А. А. // *Здравоохранение Киргизии.* — 1987. — № 1. — С. 13—16.
14. Шацова Е. Н. Особенности сердечно-сосудистой системы, эригрона и иммунитета у больных диффузным токсическим зобом в условиях Европейского севера СССР: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1990.
15. Янголенко В. В. // *Тер. арх.* — 1991. — № 10. — С. 60—63.
16. Asabawa T., Matsushita S. // *Lipids.* — 1980. — Vol. 15, N 3. — P. 137—140.

17. Bauchanan M. R., Haas T. A., Lagarde M., Guichardont M. // *J. Biol. Chem.* — 1985. — Vol. 260. — P. 16056—16059.
18. Guidi G., Schiakon R., Biasioli A., Perona G. // *J. Lab. Clin. Med.* — 1984. — Vol. 104. — P. 547—582.
19. Salvati P., Whittle B. J. R. // *Prostaglandins.* — 1981. — Vol. 22. — P. 141—156.

Поступила 29.07.93

#### EFFECT OF IODINE-BROMINE CONTAINING WATER FROM NAPHTHALANE LAYER ON LIPID PEROXIDATION IN RAT TISSUE HOMOGENATES

S.A. Gulieva, L. G. Amrakhova

Institute of Health Resort and Physical Methods of Treatment, Baku

Iodine-bromine water from pit-hole of naphthalene layer was used in the daily water-bath treatment course of 22 rats within 10 days; after decapitation of these animals content of malonic dialdehyde and lipid hydroperoxides was estimated in homogenates of heart, lung, liver, kidney and spleen tissues. Simultaneous increase in the rate of lipoperoxidation was observed in the tissue homogenates of experimental animals. The treatment course with iodine-bromine water appears to activate the prostacycline synthesis in vessel endothelium, thus suggesting the promising efficiency of the water in treatment of some blood rheology-related pathological states.

## КЛИНИКО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616.633:577.164.12]-074

О.А.Вржесинская, В.М.Коденцова, Л.А.Харитончик,  
И.А.Алексеева, В.В.Рисник, В.Б.Спиричев

### УТОЧНЕНИЕ КРИТЕРИЕВ ОБЕСПЕЧЕННОСТИ ОРГАНИЗМА ВИТАМИНОМ В<sub>2</sub>

Институт питания РАМН, Москва

Для оценки обеспеченности организма витамином В<sub>2</sub> используют величины экскреции рибофлавина с мочой, концентрации свободного рибофлавина в плазме крови и общего в эритроцитах, а также функциональный тест — коэффициент активации экзогенным флавинадениндинуклеотидом (ФАД) глутатионредуктазы эритроцитов (ФАД-эффект). Ранее нами было подтверждено, что эти показатели отражают действительное поступление витамина В<sub>2</sub> с пищей и насыщенность организма этим витамином (по содержанию его в печени) [7]. Однако до сих пор нет единого мнения о критериях, т. е. о конкретных минимальных величинах каждого показателя, соответствующих нормальной обеспеченности организма рибофлавином. Так, по мнению одних авторов, об адекватной обеспеченности организма рибофлавином свидетельствуют величины ФАД-эффекта менее 1,20, по мнению других — менее 1,25 [10,12,13,15,16]. Невозможность установления критериев нормального содержания рибофлавина в плазме (сыворотке) крови до недавнего времени объяснялась отсутствием высокоспецифичных и достаточно простых методов определения уровня ри-

бофлавина. Отчасти это же послужило причиной недостаточно широкого применения для оценки обеспеченности организма этим витамином величин экскреции рибофлавина с мочой. В последние годы в нашей лаборатории был разработан высокочувствительный избирательный метод определения содержания рибофлавина в моче и плазме крови с помощью титрования рибофлавинсвязывающим апо-белком [1,2,17]. С использованием этого метода были изучены зависимости экскреции рибофлавина с мочой от его содержания в плазме и эритроцитах, величины ФАД-эффекта и было показано, что все исследованные показатели коррелируют между собой, что доказывает их взаимозаменяемость при оценке обеспеченности организма витамином В<sub>2</sub> [3,6,7]. В то же время критерии нормальной обеспеченности организма рибофлавином были оценены лишь приблизительно, в силу того что полученные в наших работах [3,6] кривые взаимозависимости показателей обеспеченности имеют нелинейный характер.

В данной работе в связи с накоплением большого количества данных по обследованию витаминной обеспеченности представлены результаты математического анализа вышеуказанных кривых для детей и взрослых и интерпретации вариационных кривых распределения величин ФАД-эффекта и концентрации рибофлавина в плазме крови после дополнительной витаминизации в течение 2—4 нед, в ходе которой были использованы поливитаминные препараты "Ундевит", "Гексавит", "Гендевит", "Ревит", "Доувит" (KRKA, Словения), обогащение вторых и третьих готовых блюд поливитаминными премиксами фирмы "Хоффманн-Ла Рош" (Авст-

рия). Были использованы результаты обследования следующих групп населения: школьников 14—16 лет Литвы (1988 г.), детей, поступивших на лечение в подмосковный санаторий им. А. И. Герцена (1991—1992 гг.), детей из детского сада г. Славутич (1992 г.), пациентов, находившихся на лечении в клинике лечебного питания Института питания РАМН (1991—1993 гг.), здоровых добровольцев — доноров крови (1988—1993 гг.).

**Методика.** Обеспеченность витамином В<sub>2</sub> оценивали по экскреции с утренней порцией мочи, собранной за 1 ч натощак, концентрации рибофлавина в плазме крови и эритроцитах и степени активации глутатионредуктазы эритроцитов экзогенным ФАД (ФАД-эффект).

Содержание рибофлавина в моче и плазме крови определяли титрованием рибофлавинсвязывающим апопротеином [1,2] с использованием внутреннего стандарта, в эритроцитах — люмифлавиновым методом [11]. Интенсивность флюоресценции измеряли на спектрофлуориметре "Perkin Elmer MPF-43A". Активность глутатионредуктазы эритроцитов и величину ФАД-эффекта определяли, как описано ранее [10].

Уравнения, описывающие зависимости между показателями обеспеченности организма рибофлавином, рассчитывали по методу наименьших квадратов [8] с использованием программы "Quattro". В качестве показателей вариационного ряда рассчитывали доверительный интервал, моду и среднее квадратичное отклонение [9].

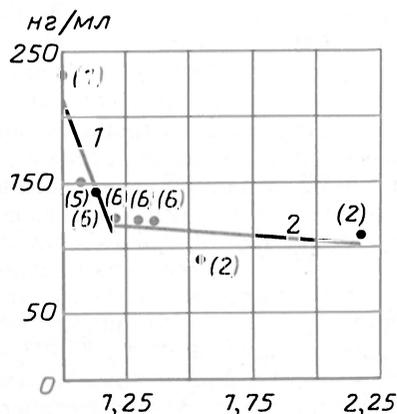


Рис. 1. Зависимость между величиной ФАД-эффекта и содержанием общего рибофлавина в эритроцитах для взрослых здоровых людей.

По оси абсцисс (x) — величина ФАД-эффекта, по оси ординат (y) — концентрация общего рибофлавина в эритроцитах (в нг/мл). Линейные участки описываются уравнениями: 1 —  $y_1 = -513,07x + 727,01$ ; 2 —  $y_2 = -15,87x + 137,49$ . На рис. 1-4 в скобках рядом с точкой указано количество обследованных. Светлые символы — показатели детей, темные — взрослых.

**Результаты и обсуждение.** На рис. 1 представлена зависимость между концентрацией рибофлавина в эритроцитах взрослых здоровых людей и величиной ФАД-эффекта. Через совокупность точек методом наименьших квадратов можно провести две прямые. Первый линейный участок, очевидно, отражает ситуацию, когда организм и соответственно глутатионредуктаза эритроцитов насыщены витамином В<sub>2</sub>, дополнительное внесение ФАД in vitro практически не вызывает активации фермента. Содержание общего рибофлавина в эритроцитах при изменении величины ФАД-эффекта в диапазоне от 1,20 до 1,00 возрастает. Второй участок соответствует недостаточной обеспеченности организма витамином В<sub>2</sub>, когда глутатионредуктаза эритроцитов не насыщена коферментом, и дополнительное внесение

ФАД in vitro вызывает существенную активацию фермента. В диапазоне величин ФАД-эффекта от 2,2 до 1,2 концентрация рибофлавина в эритроцитах практически не изменяется. Точка пересечения этих прямых ( $x = 1,19$ ,  $y = 119$ ), по-видимому, соответствует нижнему пределу адекватной обеспеченности организма витамином В<sub>2</sub>. Другими словами, величина ФАД-эффекта ниже 1,19 отражает нормальную обеспеченность организма рибофлавином, при этом его содержание в эритроцитах превышает 119 нг/мл.

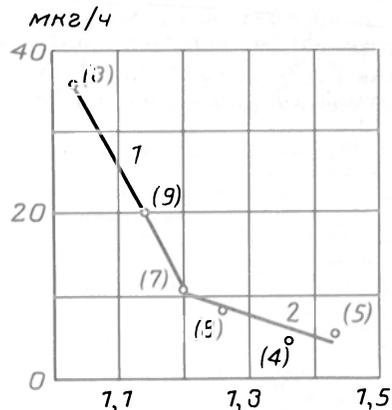


Рис. 2. Зависимость между величиной ФАД-эффекта и экскрецией рибофлавина с мочой для детей 5—7 лет.

По оси абсцисс (x) — величина ФАД-эффекта, по оси ординат (y) — часовая экскреция рибофлавина (в мкг/ч). Линейные участки описываются уравнениями: 1 —  $y_1 = -146,01x + 186,28$ ; 2 —  $y_2 = -26,45x + 41,97$ .

На рис. 2 представлена зависимость между величиной ФАД-эффекта и часовой экскрецией рибофлавина с мочой для детей 5—7 лет. И в этом случае зависимость характеризуется двумя линейными участками. Возрастание величины ФАД-эффекта от 1,03 до 1,20 сопровождается резким уменьшением экскреции рибофлавина с 36 до 11 мкг/ч. В ходе дальнейшего увеличения величины ФАД-эффекта вплоть до 1,43 экскреция снижается более медленно до 4—5 мкг/ч. Таким образом, первая ветвь отражает хорошую насыщенность организма витамином В<sub>2</sub>, вторая — соответствует недостаточной обеспеченности. Точка пересечения этих прямых, характеризующая нижний предел адекватной обеспеченности организма витамином В<sub>2</sub>, равна величине ФАД-эффекта 1,21, экскреции рибофлавина с мочой — 10 мкг/ч.

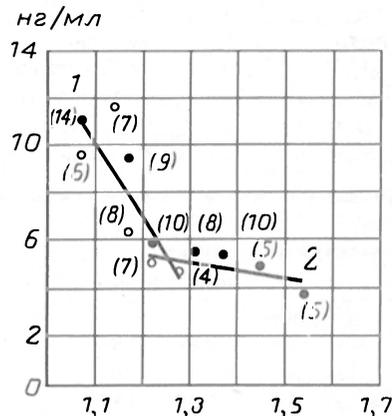


Рис. 3. Зависимость между величиной ФАД-эффекта и содержанием рибофлавина в плазме крови для взрослых и детей 5—7 лет.

По оси абсцисс (x) — величина ФАД-эффекта, по оси ординат (y) — концентрация рибофлавина в плазме (в нг/мл). Линейные участки описываются уравнениями: 1 —  $y_1 = -31,47x + 44,73$ ; 2 —  $y_2 = -3,40x + 9,53$ .

В соответствии с данными рис. 3 совокупность точек, отражающая зависимость между концентрацией рибофлавина в плазме крови и величиной ФАД-эффекта, является общей для взрослых и детей 5—7 лет и также может быть представлена двумя линейными участками. Увеличение величины ФАД-эффекта от 1,07 до 1,25 сопровождается значительным снижением содержания рибофлавина с 11—12 до 5 нг/мл плазмы. Дальнейшее изменение величины ФАД-эффекта вплоть до 1,55 практически не сопровождается снижением содержания рибофлавина в плазме. Точка пересечения этих прямых равна 1,25 и 5,3. Это означает, что нормальной обеспеченности организма рибофлавином соответствует величина ФАД-эффекта ниже 1,25, а содержание рибофлавина в плазме выше 5,3 нг/мл.

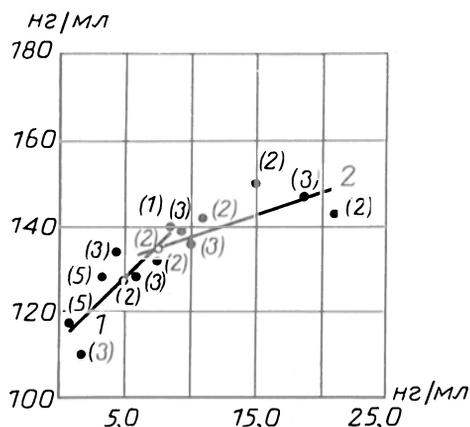


Рис. 4. Зависимость между содержанием рибофлавина в плазме и эритроцитах для взрослых здоровых людей и детей 9—13 лет.

По оси абсцисс (x) — концентрация рибофлавина в плазме (в нг/мл); по оси ординат (y) — концентрация общего рибофлавина в эритроцитах (в нг/мл). Линейный участки описываются уравнениями: 1 —  $y_1 = 2,99x + 113,14$ ; 2 —  $y_2 = 1,02x + 127,63$ .

Совокупность точек, отражающая зависимость между содержанием рибофлавина в плазме и эритроцитах для детей 9—13 лет и взрослых, разложенная по методу наименьших квадратов на два прямолинейных участка, представлена на рис. 4. В этом случае координаты точки пересечения двух прямых равны 7,3 и 135. Исходя из этого, минимальная концентрация рибофлавина в плазме крови, соответствующая адекватной обеспеченности организма этим витамином, составляет 7,3 нг/мл, а его концентрация в эритроцитах — 135 нг/мл.

Результаты математического определения критериев, соответствующих нормальной обеспеченности организма витамином В<sub>2</sub>, суммированы в таблице. Величина ФАД-эффекта, соответствующая нормальной обеспеченности организма витамином В<sub>2</sub>, полученная при анализе трех зависимостей, дает хорошо совпадающие величины, варьируя от 1,19 до

#### Критерии нормальной обеспеченности организма витамином В<sub>2</sub>

Зависимость, используемая для расчетов (возраст)	ФАД-эффект	Рибофлавин		
		плазма, нг/мл	эритроциты, нг/мл	экскреция, мкг/ч
ФАД-эффект — эритроциты (взрослые)	1,19	—	119	—
ФАД-эффект — плазма (взрослые и дети)	1,25	5,3	—	—
ФАД-эффект — экскреция (дети 5—7 лет)	1,21	—	—	10
Плазма — эритроциты (взрослые и дети)	—	7,3	135	—

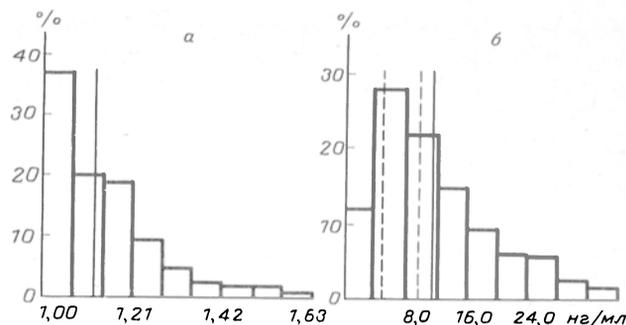


Рис. 5. Гистограмма распределения частот встречаемости (в %) данной величины ФАД-эффекта (а) для 191 человека и данной концентрации рибофлавина в плазме крови (б) для 221 человека после В<sub>2</sub>-витаминизации.

Сплошной вертикальной линией отмечена средняя по группе обследованных величина, пунктирными вертикальными линиями на рис. 5, а — доверительный интервал, на рис. 5, б — медиана (1) и мода (2).

1,25. В качестве еще одного подхода к установлению этой величины были проанализированы частоты встречаемости величин ФАД-эффекта у людей, принимавших в течение довольно длительного времени (от 2 нед до 1 мес и более) дополнительно к основному рациону витамин В<sub>2</sub> в том или ином виде, которые, по нашему мнению, с достаточной степенью допущения могут быть приняты за лиц, хорошо обеспеченных этим витамином.

На рис. 5, а представлена гистограмма распределения частот встречаемости (в %) данной величины ФАД-эффекта (с рассчитанным для выборки из 191 человека интервалом 0,07 [8]) после витаминизации. Гистограмма представляет собой фрагмент (правая часть) нормального распределения. Отсутствие левой части этой кривой обусловлено тем, что при максимальном насыщении организма витамином В<sub>2</sub> глутатионредуктаза эритроцитов полностью насыщена коферментом и, таким образом, степень ее активации ФАД равна 1,0 и теоретически не может быть ниже этой величины. Средняя по группе величина ФАД-эффекта в данной выборке составляет 1,12, среднее квадратичное отклонение равно 0,13, доверительный интервал составляет от 0,99 до 1,25. Как видно из рис. 5, а, величина ФАД-эффекта в этом диапазоне обнаруживается у 83,8% обследованных, дополнительно получавших витамин. Это можно рассматривать как дополнительное свидетельство в пользу принятия в качестве нижней границы нормальной обеспеченности организма витамином В<sub>2</sub> величину ФАД-эффекта меньше 1,25. Если принять за норму величину 1,20, то доля людей, обеспеченных витамином В<sub>2</sub>, снизится до 77,6%.

Полученные четырьмя способами максимальные величины (1,19, 1,21, 1,25, 1,25) ФАД-эффекта для людей, нормально обеспеченных этим витамином, достаточно хорошо совпадают между собой и с критерием, принятым в литературе [10,12,13]. Таким образом, мы склонны считать, что адекватной обеспеченности витамином В<sub>2</sub> соответствуют значения ФАД-эффекта в диапазоне от 1,00 до 1,25.

При установлении концентраций рибофлавина в плазме крови, характерных для нормальной обеспеченности организма этим витамином, использовать кривые зависимости часовой экскреции рибофлавина с мочой от его содержания в плазме оказалось невозможным, поскольку эти кривые не имеют выраженных точек перегиба [3,6]. Концентрации рибофлавина в плазме, рассчитанные из кривых зависимости между этим показателем и величиной ФАД-

эффекта или содержанием рибофлавина в эритроцитах, довольно близки и составили 5,3 и 7,3 нг/мл (см. таблицу). Анализ данных по обследованию взрослых и детей, принимающих наряду с основным рационом от 2 нед до 3 мес поливитаминные препараты или продукты, обогащенные витаминами, включая рибофлавин, послужил еще одним способом определения нормального его содержания в плазме крови. На рис. 5,6 представлена гистограмма распределения частот встречаемости (в%) концентрации рибофлавина в плазме крови людей после витаминизации тем или иным способом с рассчитанным для выборки из 221 человека интервалом 4,0 нг/мл [8]. Гистограмма представляет собой асимметричное распределение. Средняя по группе ( $M$ ) концентрация рибофлавина в плазме крови в данной выборке составляет 11,4 нг/мл. Поскольку среднее квадратичное отклонение, равное 7,5, достаточно хорошо совпадает с параметром  $0,6267 M = 7,1$ , полученное эмпирическое распределение следует закону Максвелла [9]. В этом случае для характеристики распределения используют такие параметры, как медиана и мода. Медиана — величина, относительно которой вся совокупность делится на 2 равные части, равна 9,5 нг/мл. Таким образом, 50% всех обследованных имеют концентрацию рибофлавина в плазме крови ниже этой величины и 50% — выше. По-видимому, концентрации рибофлавина, превышающие 9—10 нг на 1 мл плазмы, характерны для людей, оптимально обеспеченных этим витамином, поскольку маловероятно, что дополнительный прием витамина B<sub>2</sub> привел к повышению содержания рибофлавина в плазме крови до нормального уровня только у половины обследованных. Если предположить, что в результате витаминизации содержание витамина B<sub>2</sub> в крови повысилось до нормального уровня не менее чем у 80% обследованных, то в качестве минимальной нормы в соответствии с представленной гистограммой следует принять величину 4—5 нг/мл. Любопытно, что концентрация, равная 4,9 нг/мл (мода), наиболее часто встречается в данной популяции.

Наконец, дополнительным подтверждением принятия в качестве критерия нормальной обеспеченности организма витамином B<sub>2</sub> его концентрации в плазме крови более 5 нг/мл являются полученные нами ранее данные о том, что при более низких концентрациях наблюдаются нарушения обмена витамина B<sub>6</sub> и ниацина, что обусловлено участием в их метаболизме витамин B<sub>2</sub>-зависимых ферментов [4—7].

Таким образом, совокупность всех данных позволяет нам рекомендовать в качестве нижней границы нормы концентрацию рибофлавина в плазме крови 5 нг/мл. Такая же величина была получена при определении концентрации рибофлавина в плазме крови адекватно обеспеченных этим витамином людей методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [14].

Полученные при анализе двух зависимостей (см. таблицу) концентрации рибофлавина в эритроцитах, соответствующие нормальной обеспеченности организма витамином B<sub>2</sub>, составили 119 и 135 нг/мл, в среднем 127 нг/мл, что хорошо согласуется с данными литературы [11].

Величина экскреции рибофлавина с мочой для детей 5—7 лет, соответствующая нормальной обес-

печенности организма витамином B<sub>2</sub>, составила 10 мкг/ч (см. таблицу).

В целом на основе применения математического анализа кривых взаимозависимости показателей обеспеченности витамином B<sub>2</sub>, а также построения математической интерпретации вариационных кривых распределения этих показателей для людей после дополнительной витаминизации мы склонны рекомендовать в качестве критерия нормальной обеспеченности организма витамином B<sub>2</sub> величину ФАД-эффекта, не превышающую 1,25, концентрацию рибофлавина в плазме крови более 5 нг/мл, в эритроцитах более 130 нг/мл. В качестве критерия нормальной обеспеченности витамином B<sub>2</sub> детей 5—7 лет, по-видимому, следует принять часовую экскрецию рибофлавина более 10 мкг/ч.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Вржесинская О. А., Кодецова В. М., Рисник В. В., Спиричев В. Б. // Вопр. питания. — 1991. — № 4. — С. 67—72.
2. Кодецова В. М., Алексеева И. А., Сокольников А. А. и др. // Там же. — 1991. — № 3. — С. 59—64.
3. Кодецова В. М., Вржесинская О. А., Алексеева И. А., Спиричев В. Б. // Вопр. мед. химии. — 1991. — № 5. — С. 76—79.
4. Кодецова В. М. // Там же. — 1992. — № 4. — С. 33—37.
5. Кодецова В. М., Вржесинская О. А., Спиричев В. Б. // Там же. — № 1. — С. 22—24.
6. Кодецова В. М., Вржесинская О. А., Денисова С. Н. и др. // Там же. — 1993. — № 4. — С. 27—31.
7. Кодецова В. М., Вржесинская О. А., Сокольников А. А. и др. // Там же. — № 5. — С. 29—33.
8. Лакин Г. Ф. Биометрия. — М., 1990. — С. 264—266.
9. Урбах В. Ю. // Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. — М., 1975.
10. Хотимченко С. А., Алексеева И. А., Гвоздова Л. Г., Смирнова А. Н. // Теоретические и клинические аспекты науки о питании. — М., 1987. — Т. 8. — С. 98—109.
11. Чернышов В. Г. // Лаб. дело. — 1985. — № 3. — С. 171—173.
12. Bamji M. S. // Clin. chim. Acta. — 1969. — Vol. 26. — P. 263—268.
13. Belko A. Z., Obarzanek E., Kalkwarf H. J. et al. // Amer. J. clin. Nutr. — 1983. — Vol. 37. — P. 509—517.
14. Botticher B., Botticher D. // Int. J. Vitamin. Nutr. Res. — 1987. — Vol. 57. — P. 273—278.
15. Glatzle D., Korner W. F., Christeller S., Wiss O. // Ibid. — 1970. — Vol. 40. — P. 166—170.
16. Sauberlich H. E., Judd J. H., Nicholds G. E. // Amer. J. clin. Nutr. — 1972. — Vol. 25. — P. 756—762.
17. Tillotson J. A., Bachor M. M. // Analyt. Biochem. — 1980. — Vol. 107. — P. 214—219.

Поступила 15.01.94

## REFINEMENT OF CRITERIA FOR THE BODY'S VITAMIN B<sub>2</sub> REQUIREMENTS

O. A. Vrzhesinskaya, V. M. Kodentsova, L. A. Kharitonchik, I. A. Alexeeva, V. V. Risnik, V. B. Spirichev

Institute of Nutrition, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

The following patterns should be recommended as a criterion of normal vitamin B<sub>2</sub> requirements: the FAD-effect is no more than 1.25, the levels of riboflavin, more than 5 ng/ml in the plasma and more than 130 ng/ml in the erythrocytes. At the same time, the hourly urinary riboflavin excretion more than 10 g/h may be used as a criterion of normal vitamin B<sub>2</sub> requirements in children of 5—7 years old. These values were obtained while analysing the many-year experimental data on riboflavin treatment and using the mathematical analysis of the dependence curves for the urinary riboflavin excretion, its levels in plasma and erythrocytes, and the value of the FAD effect, as well as deriving and mathematically interpreting the variation curves for the distribution of the given value of the FAD effect and the plasma riboflavin levels for human beings after additional vitamin therapy.

*В.М.Коденцова, Л.А.Харитончик, О.А.Вржесинская,  
Е.И.Абрамова, С.Л.Шумилова, В.Б.Спиричев*

## УТОЧНЕНИЕ КРИТЕРИЕВ ОБЕСПЕЧЕННОСТИ ВЗРОСЛЫХ И ДЕТЕЙ 12—14 ЛЕТ ВИТАМИНА- МИ В<sub>1</sub> И В<sub>2</sub>

Институт питания РАМН, Москва

Благодаря своей доступности определение экскреции витаминов или их метаболитов с мочой может служить удобным тестом для оценки обеспеченности организма детей этими нутриентами. Ранее нами было показано, что часовая экскреция витаминов группы В и их метаболитов коррелирует с их содержанием в крови и степенью насыщенности соответствующими коферментными формами (ФАД, ТДФ, ПАЛФ) витаминзависимых ферментов эритроцитов [5,6,10]. До последнего времени существенным препятствием для практического использования величин экскреции являлось отсутствие критериев нормальных величин этих показателей для детей различного возраста. По нашим данным, величины, соответствующие нормальной обеспеченности витаминами В<sub>1</sub> и В<sub>2</sub> для детей 5—7 лет, существенно ниже, чем для взрослых, и составляют 9 мкг/ч рибофлавина против 14 мкг/ч для взрослых и 10—11 мкг/ч тиамин против 15 мкг/ч для взрослых [10].

При обследовании 31 здорового ребенка обоего пола 9—13 лет было установлено, что при нормальной обеспеченности организма витаминами В<sub>1</sub> и В<sub>2</sub> часовая экскреция этих витаминов с мочой превышает 11—12 и 10—11 мкг соответственно [5]. Важно отметить, что обследуемая группа детей охватывала достаточно широкий возрастной диапазон, причем большинство детей (64%) были в возрасте 10—11 лет, 12% — в возрасте 9 лет и 24% — в возрасте 12—13 лет. Для уточнения критериев обеспеченности детей более старшего возраста в данной работе на основании исследования зависимостей экскреции витаминов от их содержания в плазме крови и активности витаминзависимых ферментов были определены величины часовой экскреции с мочой тиамин и рибофлавин для 20 детей обоего пола в возрасте 12—14 лет с диагнозом вегетососудистой дистонии, поступивших на лечение в подмосковный санаторий "Клязьма". Первое обследование было проведено в сентябре. Второе обследование тех же детей проводили после 2 нед ежедневного приема 50 г экструдированного продукта — завтрака на зерновой основе (смесь пшеничной и ржаной муки), обогащенного молочным белком и витаминами ("Нутритек", Россия). Это обеспечивало дополнительное поступление по 0,5 мг витаминов В<sub>1</sub> и В<sub>2</sub>, 0,4 мг пиридоксина, 15 мг витамина С, 1,9 мг витамина Е, 0,1 мг витамина А и 0,38 мг β-каротина.

Кроме того, для уточнения критериев обеспеченности витамином В<sub>1</sub>, в частности величины ТДФ-эффекта, отражающего насыщенность организма этим витамином, были использованы результаты обследования обеспеченности и дополнительной витаминизации следующих групп населения: детей, поступивших на лечение в подмосковный санаторий им. А. И. Герцена (1991—1992 гг.), детей из детско-

го сада г. Славутич (1992 г.), пациентов, находившихся на лечении в клинике лечебного питания Института питания РАМН (1991—1993 гг.), здоровых доноров (доноры крови, 1991—1993 гг.). Для дополнительной витаминизации были использованы поливитаминные препараты "Ундевит", "Дуовит" (KRKA, Словения), обогащение вторых и третьих готовых блюд, крекеров поливитаминным премиксом 730/4 фирмы "Рош" (Австрия), безалкогольный напиток "Золотой шар" ("Валетек-ЛТД", Россия).

Методика. Обеспеченность витаминами оценивали по их экскреции с мочой, собранной за 1 ч натощак, и концентрации рибофлавина в плазме крови.

Рибофлавин в моче и плазме крови определяли титрованием рибофлавинсвязывающим апопротеином [1,3], тиамин в моче — тioxромным методом [8]. Во всех флюоресцентных методах использовали соответствующий внутренний стандарт. Интенсивность флюоресценции измеряли на спектрофлуориметре "Perkin Elmer MPF-43A".

Активность транскетолазы эритроцитов и величину ТДФ-эффекта в качестве показателей обеспеченности обследуемых тиамин определяли после предварительной инактивации трансальдолазы [10,13].

В эксперименте использовали крыс-самцов линии Вистар с исходной массой тела 120—150 г, в течение 4 нед получавших полноценный полусинтетический рацион, содержащий 20% казеина, отмытого от водорастворимых витаминов, 42,7% крахмала, 20% глюкозы, 9% подсолнечного масла с добавленными витаминами А и D в количестве 300 и 20 МЕ соответственно на крысу в день, 4% солевой смеси, 0,2% холинхлорида и 0,1% смеси водорастворимых витаминов, что обеспечивало поступление 100 мкг тиамин на крысу в день.

Коэффициент ранговой корреляции между содержанием витаминов в крови и экскрецией их с мочой рассчитывали по Спирмену [2]. Уравнения, описывающие зависимость между величиной ТДФ-эффекта и экскрецией тиамин с мочой, рассчитывали по методу наименьших квадратов [7]. В качестве показателей вариационного ряда рассчитывали доверительный интервал и стандартное квадратичное отклонение [9].

Результаты и обсуждение. Для анализа данных результаты представляли в виде кривых зависимости экскреции рибофлавина от его содержания в плазме крови (рис.1) или тиамин от величины ТДФ-эффекта (рис.2), как описано ранее [4,5,11]. Для сравнения были использованы аналогичные кривые, полученные при обследовании 35 здоровых взрослых обоего пола [10].

Как следует из рис. 1, совокупность точек характеризующих экскрецию и содержание рибофлавина, для детей с вегетососудистой дистонией 12—14 лет и здоровых взрослых ложится на одну кривую. Это означает, что критерии обеспеченности витамином В<sub>2</sub> детей этого возраста не отличаются от соответствующих показателей для взрослых. Отсутствие возрастных отличий в содержании рибофлавина в плазме крови при нормальной обеспеченности этим витамином отмечалось ранее [12]. Между экскрецией рибофлавина с мочой и его содержанием в плазме крови обнаруживается хорошая корреляция (табл.1), что подтверждает возможность использования величин экскреции этого витамина с мочой

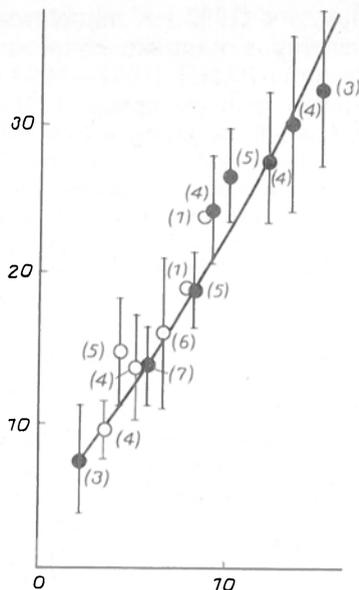


Рис. 1. Зависимость часовой экскреции рибофлавина от его концентрации в плазме для взрослых и детей.

По оси абсцисс — концентрация рибофлавина, нг/мл; по оси ординат — экскреция рибофлавина, мкг/ч. Здесь и на рис. 2 в скобках рядом с точкой указано количество обследованных. Светлые символы — показатели детей, темные — взрослых.

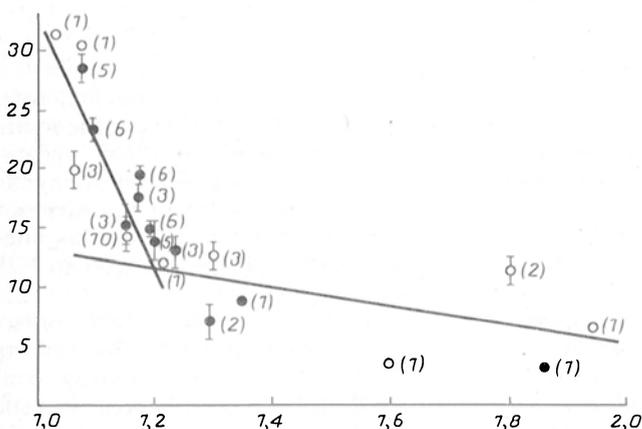


Рис. 2. зависимость между величиной ТДФ-эффекта и экскрецией тиаминна с мочой для детей и взрослых.

По оси абсцисс — ТДФ-эффект; по оси ординат — экскреция тиаминна, мкг/ч. для оценки обеспеченности им организма детей. При концентрации рибофлавина в плазме более 6 нг/мл его экскреция превышает 14 мкг/ч. Таким образом, полученные нами ранее данные о том, что для детей 9—13 лет часовая экскреция при нормальной обеспеченности витамином В<sub>2</sub> составляет 10—11 мкг [5], преимущественно относятся к детям 9—11 лет.

Таблица 1

Коэффициенты корреляции между показателями обеспеченности витаминами группы В здоровых взрослых и детей 12—14 лет с вегетососудистой дистонией

Параметр	$r$	n
Рибофлавин в плазме — экскреция рибофлавина с мочой:		
взрослые	0,603	35
дети	0,571	22
ТДФ-эффект — экскреция тиаминна с мочой:		
взрослые	-0,529	23
дети	-0,648	23

Примечание.  $p \leq 0,01$ .

На рис. 2 представлены данные, отражающие зависимость экскреции тиаминна от величины ТДФ-эффекта. Расчет коэффициентов ранговой корреляции демонстрирует выраженную зависимость между этими двумя показателями обеспеченности витамином В<sub>1</sub> в случае как взрослых, так и детей (см. табл. 1). Через совокупность точек для детей 12—14 лет и взрослых методом наименьших квадратов можно провести две прямые: пологую и крутую. Первая описывается уравнением  $y_1 = -7,74x + 21,40$  и соответствует недостаточной обеспеченности организма витамином В<sub>1</sub>, когда транскетолаза эритроцитов не насыщена коферментом и уменьшение величины ТДФ-эффекта не сопровождается значительным увеличением экскреции тиаминна. Вторая прямая, описываемая уравнением  $y_2 = -69,80x + 98,62$ , очевидно, отражает ситуацию, когда организм и соответственно транскетолаза уже насыщены витамином В<sub>1</sub>, дополнительное внесение ТДФ in vitro практически не вызывает активацию фермента и сопровождается значительным увеличением выброса тиаминна с мочой. Точка пересечения этих прямых ( $x = 1,24$ ,  $y = 11,77$ ), по-видимому, соответствует нижнему пределу адекватной обеспеченности организма витамином В<sub>1</sub> и является общей для взрослых и детей этого возраста. Другими словами, величина ТДФ-эффекта ниже 1,24 отражает нормальную обеспеченность организма тиаминном, при этом его экскреция с мочой превышает 12 мкг/ч. Ранее вследствие недостаточного количества людей с величинами ТДФ-эффекта, превышающими величину 1,3 [10], кривая, отражающая зависимость между величиной ТДФ-эффекта и экскрецией тиаминна с мочой, была представлена практически одной восходящей ветвью, что не позволило нам уточнить величину ТДФ-эффекта, характерную для нормальной обеспеченности организма витамином В<sub>1</sub>.

Полученные нижние пределы часовой экскреции тиаминна на 20% ниже, а величина ТДФ-эффекта на 9% выше принятых в отечественной литературе [8]. Это может быть обусловлено различиями методов определения активности транскетолазы, подробный анализ которых был проведен нами ранее [10]. Основные отличия использованного нами метода заключаются в предварительной термоинактивации трансаальдолазы, расщепляющей образующийся в ходе транскетолазной реакции седогептулозо-7-фосфат, а также в использовании более чувствительного колориметрического метода его определения. С другой стороны, это различие может отражать неодинаковый смысл, вкладываемый разными авторами в понятие "достаточность" витамина для организма. Скорее всего, ранее используемые величины характеризуют оптимальное насыщение организма витамином В<sub>1</sub>.

Дополнительное подтверждение этого заключения было получено при анализе данных по обследованию взрослых и детей, принимавших дополнительно к основному рациону в течение от 2 нед до 3 мес поливитаминные препараты или продукты, обогащенные витаминами (табл. 2). По нашему мнению, этих людей с достаточным основанием можно принять за хорошо обеспеченных витамином В<sub>1</sub>. На рис. 3 представлена гистограмма распределения частот встречаемости (в процентах) величины ТДФ-эффекта (с интервалом 0,05) для 192 человек после витаминизации тем или иным способом. Гистограмма представляет собой фрагмент (правая часть) нормального распределения. Отсутствие левой части этой кривой обусловлено тем, что при максимальном насыщении организма витамином В<sub>1</sub> транскетолаза эритроцитов полностью насыщена ко-

Величина ТДФ-эффекта у крыс, получавших стандартный полусинтетический рацион, и людей после витаминизации различными препаратами, содержащими тиамин

Препарат, срок (доза тиамина)	Обследуемые	ТДФ-эффект	
4 нед (100 мкг/сут)	Крысы (8)	1,27 ± 0,10	(1,13—1,63)
“Дуовит“: 3 нед (2 мг)	Взрослые (10)	1,09 ± 0,04	(1,00—1,33)
4 нед (1 мг)	Дети 9—13 лет (14)	1,14 ± 0,02	(1,00—1,25)
4 нед (1 мг)	Дети 5—7 лет (11)	1,13 ± 0,01	(1,00—1,24)
“Ундевит“: 2 нед (4 мг)	Взрослые (11)	1,17 ± 0,02	(1,04—1,35)
4 нед (6 мг)	Дети 9—13 лет (9)	1,27 ± 0,07	(1,08—1,51)
Компот, обогащенный премиксом 730/4, 3 нед (2,1 мг)	Взрослые (9)	1,17 ± 0,04	(1,08—1,35)
Молоко, обогащенное премиксом 730/4, 4 нед (1 мг)	Дети 9—13 лет (26)	1,17 ± 0,02	(1,02—1,39)
Крекеры и напиток, обогащенные витаминами, 3 нед (1 мг)	Взрослые (19)	1,17 ± 0,04	(1,00—1,44)
Экструдаты из ржаной и пшеничной муки, обогащенные витаминами, 2 нед (0,5 мг)	Дети 12—14 лет (9)	1,25 ± 0,10	(1,04—1,31)

Примечание. В скобках — число обследованных и пределы колебаний.

ферментом и, таким образом, степень ее активации ТДФ равна 1,0 и не может быть ниже этой величины. Средняя по группе величина ТДФ-эффекта в данной выборке составляет 1,17. Если в качестве минимальной нормы принять обычно используемую отечественными исследователями величину менее или равную 1,15, то в соответствии с гистограммой в результате дополнительной витаминизации количество оптимально обеспеченных витамином В<sub>1</sub> людей составит менее половины (47,8% от всех обследованных). Эти и нижеприведенные данные позволяют думать, что принятый в литературе критерий нормальной обеспеченности витамином В<sub>1</sub> нуждается в уточнении.

Нормальное распределение характеризуется параметрами  $\mu$  — математическое ожидание и  $\sigma$  —

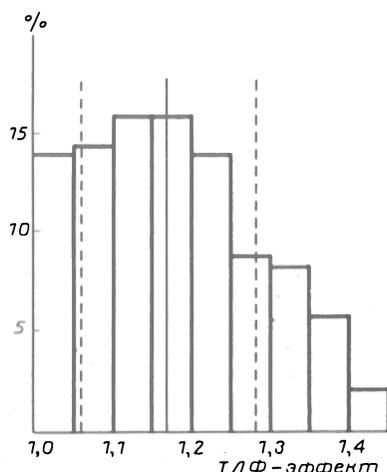


Рис. 3. Гистограмма распределения частот встречаемости (в %) данной величины ТДФ-эффекта (с интервалом 0,05) для 192 человек после В<sub>1</sub>-витаминизации тем или иным способом.

Сплошная вертикальная линия — средняя по группе обследованных величина ТДФ-эффекта; пунктирная вертикальная линия — доверительный интервал для математического ожидания.

среднее (стандартное) квадратичное отклонение, характеризующие положение центра распределения и степень рассеяния данной величины ТДФ-эффекта относительно этого центра [9]. В нашем случае  $\sigma$  равна 0,11, доверительный интервал для математического ожидания составляет 1,17 ± 0,11. Как видно из рис. 3, величина ТДФ-эффекта от 1,06 до 1,28 обнаруживается у 66,5% обследованных людей. Если учесть и долю людей, заведомо обеспеченных тиаминном, т. е. людей с величиной ТДФ-эффекта от 1,00 до 1,06, то доля людей, обеспеченных этим витамином, составит 82,6% от всех дополнительно получавших витамин. Это можно рассматривать как дополнительное свидетельство в пользу принятия в качестве нижней границы нормальной обеспеченности организма витамином В<sub>1</sub> величину ТДФ-эффекта меньше или равную 1,28. Хотя средние по выборкам величины ТДФ-эффекта у принимавших тиамин несколько варьируют (см. табл. 2), все они находятся в пределах доверительного интервала для математического ожидания, что отражает свойство функции, имеющей нормальное распределение [9].

Полученная путем таких расчетов максимальная величина (1,28) ТДФ-эффекта для людей, нормально обеспеченных этим витамином, достаточно хорошо совпадает с рассчитанной из кривой зависимости экскреции тиамина с мочой от степени активации транскетотлазы эритроцитов ТДФ (1,24).

Еще одним подтверждением могут служить результаты эксперимента на крысах, получавших дозу тиамина, обеспечивающую физиологическую потребность, в течение 4 нед. Средняя по группе величина ТДФ-эффекта составила 1,27 ± 0,10 (см. табл. 2).

Таким образом, на основании анализа многолетнего опыта проведения витаминизации населения тиаминном, в ходе которой средние по группам величины ТДФ-эффекта не всегда снижались до величины ≤ 1,15, и применения двух способов математической обработки экспериментальных данных мы

склонны рекомендовать в качестве критерия нормальной обеспеченности организма витамином В<sub>1</sub> использовать величины ТДФ-эффекта, не превышающие 1,25. Принятая в нашей литературе величина 1,15 скорее характеризует оптимальный уровень обеспеченности этим витамином. В соответствии с представленными данными в качестве критерия нормальной обеспеченности витамином В<sub>1</sub> для детей старше 12 лет и взрослых, по-видимому, следует принять часовую экскрецию тиамина более 12 мкг. Критерии обеспеченности витамином В<sub>2</sub> для детей этого возраста не отличаются от соответствующих показателей для взрослых: минимальная концентрация рибофлавина в плазме составляет 6 нг/мл, а его экскреция с мочой — 14 мкг/ч.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Вржесинская О. А., Коденцова В. М., Рисник В. В., Спиричев В. Б. // Вопр. питания. — 1991. — № 4. С. 67—72.
2. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. — Л., 1973.
3. Коденцова В. М., Алексеева И. А., Сокольников А. А. и др. // Вопр. питания. — 1991. — № 3. — С. 59—64.
4. Коденцова В. М., Вржесинская О. А., Алексеева И. А., Спиричев В. Б. // Вопр. мед. химии. — 1991. — № 5. — С. 76—79.
5. Коденцова В. М., Вржесинская О. А., Денисова С. Н. и др. // Там же. — 1993. — № 4. — С. 27—31.
6. Коденцова В. М., Вржесинская О. А., Сокольникова А. А. и др. // Там же. — № 5. — С. 26—29.
7. Лакин Г. Ф. Биометрия. — М., 1990. — С. 264—266.
8. Мартинчик А. Н., Ларина Т. И., Исаева В. А. // Теоретические и клинические аспекты науки о питании. Т. 8. Методы оценки витаминной обеспеченности населения. — М., 1987. — С. 87—98.
9. Урбах В. Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. — М., 1975.
10. Сокольников А. А., Коденцова В. М., Исаева В. А. // Вопр. мед. химии. — 1993. — № 3. — С. 50—53.
11. Horwitz M. K. // Amer. J. clin. Nutr. — 1986. — Vol. 44. — P. 937—986.
12. Sancar D. V. S. // Int. J. Vitam. Nutr. Res. — 1978. — Vol. 48. — P. 140—144.
13. Takeuchi T., Nishino K., Itokawa Y. // Clin. Chem. — 1984. — Vol. 30. — P. 658—661.

Поступила 20.12.93

#### IMPROVEMENT OF THE CRITERIA OF VITAMINS B<sub>1</sub> AND B<sub>2</sub> CONSUMPTION IN ADULT PERSONS AND IN CHILDREN OF 12-14 YEARS OLD

V. M. Kodentsova, L. A. Kharitonchik, O. A. Vrzhesinskaya, E. I. Abramova, S. L. Shumilova, V. B. Spirichev

Institute of Nutrition, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Analysis of many-year people vitaminization with thiamine showed that middle values of the TDP-effect were not always decreased down to the level of 1.15. The TDP-effect not exceeding 1.25 value should be recommended as a criterion of normal vitamin B<sub>1</sub> consumption as followed from mathematical analysis of the correlation between excretion of thiamine with urine and the TDP-effect value as well as from plotting and mathematical interpretation of the variation curves involving distribution of the TDP-effect value among people with additional vitaminization. The literature available data equal to 1.15 appears to exhibit the optimum rate of the vitamin consumption. Excretion of thiamine with urine more than 12  $\mu\text{g}/\text{h}$  should be also considered as a normal consumption of vitamin B<sub>1</sub> in children of 12 years old and older and in adults. The criteria of vitamin B<sub>2</sub> consumption in children of this age were similar to corresponding patterns of adults: minimal concentration of riboflavin in blood plasma was about 6 ng/ml and its excretion with urine — about 14  $\mu\text{g}/\text{h}$ .

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616.831.322-003.8-06:616.36-004-02-07

Т. И. Мжельская, И. А. Иванова-Смоленская, Н. В. Коробова

#### ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА КОНЦЕНТРАЦИЮ СЫВОРОТОЧНОГО ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА ПРИ БОЛЕЗНИ ВИЛЬСОНА—КОНОВАЛОВА

НИИ неврологии РАМН, Москва

Важная роль меди в обеспечении различных этапов биологического окисления обуславливает наличие в организме человека и животных специальной системы белков, контролирующей состояние и перенос меди. Важнейшим компонентом транспортной системы меди является церулоплазмин (ЦП) сыворотки крови [9]. Этот белок секретируется в кровотоке печеночными клетками и обладает антиоксидантной и оксидазной активностью [9]. ЦП обусловлена почти вся парафенилендиаминоксидазная активность сыворотки крови. Определение концентрации сывороточного ЦП представляется необходимым при установлении или подтверждении диагноза болезни Вильсона—Коновалова (БВК, гепатолентикулярная дегенерация). Это относительно редкое моногенное наследственное заболевание, патогенез которого связан с накоплением токсических концентраций меди в печени (преневрологическая стадия), а после ее насыщения — и в других органах, главным образом в мозговой ткани (неврологическая стадия) [4, 9, 12, 22]. БВК — одно из немногих наследственных заболеваний, успешно поддающихся патогенетическому лечению, и, следовательно, выявление больных на возможно более ранней стадии болезни представляется особенно важным. Отсутствие конкретных сведений о физиологической функции ЦП затрудняет определение роли этого белка в патогенезе БВК. Получен ряд данных, свидетельствующих о том, что, хотя ЦП не является первичным продуктом гена БВК, поскольку ген его расположен на другой хромосоме, роль его в патогенезе болезни весьма существенна [9, 22, 23].

Установлено, что в гепатоцитах больных БВК понижено содержание мРНК, кодирующей ЦП, снижена скорость транскрипции гена ЦП и имеются другие нарушения его экспрессии [9, 10, 23]. В литературе высказываются предположения о том, что при БВК в сыворотке крови больных присутствует аномальный ЦП-подобный белок, который авторы рассматривают как патогномоничный признак носительства “вильсоновского” гена. Представлены данные о том, что ЦП желчи при БВК приобретает нехарактерные для него в норме функции секреторного сывороточного ЦП и попадает в кровяное русло [10]. В то же время именно отсутствие этого белка в желчи больных может оказаться ответственным за нарушение транспорта меди из клеток печени в желчь и удаление меди из организма [19].

У больных БВК отмечается значительная вариабельность концентрации сывороточного ЦП. Она колеблется от величин, не поддающихся измерению, до субнормальных, а иногда и нормальных значений. Четкая связь между содержанием этого белка и клиническими показателями при БВК не установлена. Отмечено лишь повышение концентрации ЦП под действием эстрогенов и при активизации воспалительных и деструктивных процессов в печени, в

связи с чем среди больных с печеночной формой БВК процент имеющих нормальный уровень ЦП выше, чем среди больных с первичными неврологическими симптомами [22]. В то же время у здоровых людей отмечен ряд факторов (в том числе возраст, пол и прием гормонов), влияющих на уровень этого белка [15]; концентрация сывороточного ЦП может снижаться в результате повышенной его потери из организма и при снижении абсорбции меди [3,7].

Исследование закономерностей изменения концентрации ЦП в сыворотке крови больных БВК способствует усовершенствованию диагностики этого заболевания и раскрытию его внутренних биохимических механизмов. Оно способствует также выяснению механизмов обмена меди в норме и их нарушений при патологических состояниях организма. Цель данной работы — установление связи между концентрацией ЦП в сыворотке крови и рядом клинических показателей при БВК.

Методика. Материал для исследования был накоплен нами на протяжении 2 десятилетий, с 1969 по 1992 г., и включает анализ более 300 случаев. Концентрация ЦП до начала специфического медегонного лечения определена у 335 больных БВК в возрасте от 5 до 47 лет (средний возраст  $23,3 \pm 0,4$  года; здесь и далее приведены среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего значения). Обследовано 177 мужчин и 158 женщин. Диагноз БВК установлен в отделении нейрогенетики НИИ неврологии РАМН по общепринятым критериям [4,22]. На основании детального клинико-лабораторного и функционального исследования [4] у 34 больных была выявлена преневрологическая стадия БВК, у 301 больного — неврологическая стадия. Среди пациентов не было беременных женщин и женщин, принимавших оральные контрацептивы, поскольку в этих случаях концентрация ЦП в крови возрастает [15].

По возрасту больные разделены на группы: группа 1 — дети от 5 до 12 лет, группа 2а — подростки от 13 до 16 лет, группа 2б — подростки от 17 до 20 лет, группа 3а — взрослые от 21 года до 30 лет, группа 3б — взрослые от 31 года до 40 лет, группа 3в — взрослые от 41 года до 50 лет [6,15]. Для более подробного изучения динамики концентрации ЦП больные были разделены на 6 возрастных групп с 5-годовалыми интервалами.

В состав контрольной группы вошли 827 больных нейрогенетического отделения с наследственными экстрапирамидными или мозжечковыми заболеваниями (кроме БВК), а также их фенокопиями. Концентрация ЦП в сыворотке крови этих больных существенно не отличалась от нормы. Детальный анализ возрастной динамики уровня ЦП у больных этой группы и здоровых людей представлен в нашем предыдущем исследовании [6]. Содержание сывороточного ЦП определено также у 116 родителей больных БВК.

Оксидазную активность ЦП сыворотки крови определяли относительно парафенилендиамина. С 1969 по 1988 г. активность ЦП определяли по методу O.Houchin [18], с 1988 г. — по методу H.Ravin [21]. Детальное описание методов представлено в предыдущих публикациях [5,6]. Для выражения активности ЦП в единицах концентрации в методе Houchin прирост оптической плотности инкубационной среды при 530 нм за 15 мин при 37°C умножали на коэффициент 1750, определенный нами экспериментально [6]. При анализе по методу Ravin для количественного определения ЦП прирост

оптической плотности при 530 нм за 1 ч при той же температуре умножали на коэффициент 818. По причинам, обсуждаемым ниже, введение этих коэффициентов позволило сопоставить данные исследования всего периода (1969—1992 гг.).

В работе использованы коммерческие препараты ЦП Ленинградского предприятия по производству бактериальных препаратов при Институте им. Л.Пастера. Удельную оксидазную активность препаратов ЦП (прирост оптической плотности при 530 нм на 1 мг белка за 1 ч) оценивали по методу [8].

Результаты обрабатывали методом вариационной статистики с использованием критерия *t* Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Точность метода определения концентрации ЦП в сыворотке крови ограничена отсутствием референтного стандарта этого белка. Согласно нашим экспериментальным данным, коммерческие препараты ЦП имели удельную оксидазную активность от 7 до 12, 5 ед. Дополнительная очистка повышала это значение до 21,1 ед. (определено экспериментально совместно с О. Б. Сивериной, цит. [6]). Препараты ЦП использовались нами для определения количества этого белка в образцах сыворотки крови по калибровочному графику, который представляет собой зависимость оптической плотности при 530 нм от концентрации ЦП в исходных анализируемых растворах с известной его концентрацией.

Оказалось, что этот способ непригоден в качестве эталона для клинико-диагностической работы, поскольку с повышением удельной активности препаратов ЦП происходило кажущееся снижение определяемого с их помощью уровня этого белка в сыворотке крови. При использовании наиболее активного препарата сравнения средняя концентрация ЦП в сыворотке крови здоровых людей составила 175 мг/л, что явно не соответствует данным, полученным другими методами [6].

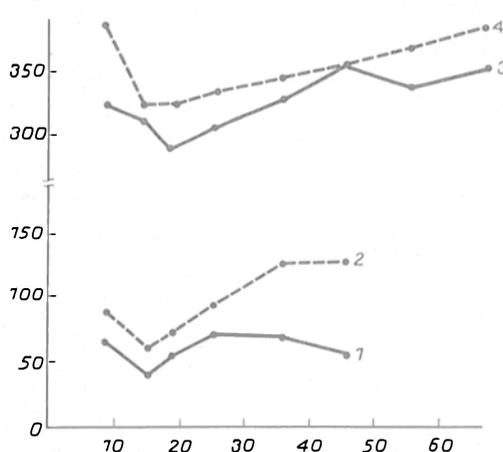
Иммунохимические подходы также не обеспечивают стандартизации количественного определения ЦП, поскольку, как правило, дают завышенные величины [7]. Учитывая сказанное выше, коэффициент для пересчета единиц оптической плотности в концентрацию ЦП определен нами по содержанию меди в сыворотке крови [6]. Для метода Houchin он составил 1750. Соответствующий коэффициент для метода Ravin вычислен после того, как нами экспериментально была установлена величина, определяющая соотношение прироста оптической плотности при 530 нм для метода Houchin к соответствующему значению для метода Ravin ( $N_{оп}/R_{оп}$ ). Это соотношение оказалось равным  $0,4675 \pm 0,0077$  при анализе сывороток крови 63 больных с разными заболеваниями. Коэффициент пересчета в единицы концентрации для метода Ravin, таким образом, оказался равен  $1750 \times 0,4675 = 818$ . Для подтверждения справедливости этого соотношения нами были построены дополнительно графики зависимости прироста оптической плотности при 530 нм от концентрации очищенного ЦП с помощью обоих методов (Houchin и Ravin). Соотношение  $N_{оп}/R_{оп}$  было определено равным  $0,4710 \pm 0,0084$ . Расхождение между установленными нами значениями коэффициента пересчета с использованием двух указанных подходов не превышает 0,754%.

Измеренные таким образом значения концентраций ЦП у здоровых людей равны  $315 \pm 7$  мг/л.

Распределение концентрации сывороточного ЦП у больных БВК и гетерозигот по БВК

Концентрация ЦП, мг/л	Больные						Гетерозиготы						Контрольная группа	
	мужчины		женщины		оба пола		мужчины		женщины		оба пола		оба пола	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
0	17	9,61	12	7,60	29	8,66	—	—	—	—	—	—	—	—
1—49	75	42,37	32	20,25	107	31,94	—	—	—	—	—	—	—	—
50—99	44	24,86	53	33,54	97	28,96	—	—	—	—	—	—	—	—
100—149	27	15,25	34	21,52	61	18,21	—	—	1	1,32	1	0,86	—	—
150—199	13	7,35	18	11,39	31	9,25	1	2,50	4	5,26	5	4,31	14	1,70
200—249	—	—	5	3,17	5	1,49	6	15,00	11	14,47	17	14,66	91	11,00
250—299	1	0,56	3	1,90	4	1,19	15	37,50	16	21,05	31	26,72	168	20,31
300—349	—	—	1	0,63	1	0,30	11	27,50	25	32,90	36	31,03	226	27,33
350—399	—	—	—	—	—	—	4	10,00	13	17,11	17	14,66	179	21,64
400—449	—	—	—	—	—	—	2	5,00	6	7,89	8	6,90	90	10,89
450—499	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	43	5,20
500—549	—	—	—	—	—	—	1	2,50	—	—	1	0,86	10	1,21
550—599	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	0,36
600—649	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	0,36
Итого...	177	100	158	100	335	100	40	100	76	100	116	100	827	100

Как показали исследования, концентрация ЦП у больных БВК была снижена в среднем до  $74,4 \pm 3,3$  мг/л. У мужчин уровень ЦП был ниже, чем у женщин ( $62,1 \pm 4,0$  и  $88,2 \pm 5,0$  мг/л соответственно;  $p < 0,001$ ). Значение концентрации ЦП в 200 мг/л было повышено лишь у 2,98% больных БВК (табл. 1). Нормальные концентрации ЦП чаще встречались у женщин, чем у мужчин (5,7 и 0,56% соответственно). При этом ни в одном случае БВК уровень ЦП не превышал 300 мг/л у мужчин и 350 мг/л у женщин. Снижение концентрации ЦП до величин ниже 100 мг/л отмечено у 76,84% мужчин и 61,39% женщин. В то же время в контрольной группе концентрация ЦП ниже 200 мг/л встречалась лишь в 1,7% случаев и ни в одном случае не была ниже 150 мг/л. Обращает на себя внимание сходство структуры распределения концентраций ЦП в контроле и при БВК (см. табл. 1).



Концентрация сывороточного ЦП у пациентов разного возраста с БВК (кривые 1 и 2) по сравнению с аналогичными данными для пациентов контрольной группы (кривые 3 и 4).

По оси абсцисс — возраст, годы; по оси ординат — концентрация ЦП, мг/л. 1 и 3 — пациенты мужского пола; 2 и 4 — пациенты женского пола.

На рисунке представлено распределение концентраций ЦП у детей, подростков и взрослых с БВК (кривые 1 и 2) и в соответствующих контрольных группах (кривые 3 и 4). Между двумя парами кривых имеется определенное сходство: все точки

кривых, отражающие уровень ЦП у женщин, расположены в зоне более высоких концентраций ЦП, чем у мужчин; наиболее низкая концентрация ЦП отмечается в подростковом возрасте. Отличие же заключается в том, что при БВК самый низкий уровень ЦП у мужчин и женщин отмечается в одном и том же возрасте (от 13 до 16 лет), а в контроле концентрации ЦП особенно резко снижены у женщин в возрасте от 13 до 20 лет, а у мужчин в возрасте 17—20 лет.

При разделении больных на группы с 5-годовалыми интервалами (табл. 2, группы — 16—21) во всех возрастных группах (за исключением групп детей от 5 до 9 лет с небольшим числом обследованных) отмечается более высокая концентрация ЦП у женщин. Разница достоверна для мужчин и женщин, взятых в целом (при  $p < 0,001$ ), и для старших возрастных групп ( $p < 0,05$ ). Период снижения концентрации ЦП у мужчин ограничивается возрастной группой от 15 до 19 лет, а у женщин уровень ЦП минимален в возрасте от 5 до 9 и от 10 до 14 лет. Как следует из сравнения возрастных групп 16—21, статистически достоверные различия в уровне сывороточного ЦП отмечены при сравнении больных в возрасте от 15 до 19 лет с группой больных от 30 лет и старше ( $p_{18-21} < 0,01$  для мужчин и  $< 0,01$  для женщин), а также больных в возрасте от 20 до 24 лет с более старшими возрастными группами ( $p_{19-21} < 0,05$  для мужчин и женщин).

Зависимость концентрации ЦП от стадии болезни представлена в табл. 2. На более ранней преневрологической стадии (при среднем возрасте установления диагноза  $15,7 \pm 1,0$  года) концентрация ЦП превышала соответствующую величину для больных с первичными неврологическими проявлениями болезни (средний возраст  $24,2 \pm 0,4$  года) и составила  $86,4 \pm 11,9$  и  $73,1 \pm 3,3$  мг/л соответственно (различия недостоверны). Для отдельно взятых групп мужчин и женщин различия также не достигали уровня значимости. Соответственно малому числу больных, которым диагноз БВК был поставлен на печеночной стадии, при разделении по полу и возрасту группы были малы и большой разброс концентраций ЦП отражался в высоких значениях стандартной ошибки (см. табл. 2). Вместо снижения

концентрации ЦП в подростковом периоде отмечались даже более высокие значения ее у мужчин 15—19 лет, превышающие соответствующие величины у женщин.

В группе больных с неврологической стадией БВК (группы № 8—14) отмеченные выше закономерности в зависимости уровня ЦП от пола и возраста, свойственные контролю, соблюдались. В объединенной группе мужчин и женщин наиболее низкая концентрация ЦП наблюдалась в возрасте 15—19 лет. Наибольшее снижение концентрации ЦП у мужчин отмечалось в той же возрастной подгруппе, а у женщин — в более раннем возрасте. В возрасте от 10 до 14 лет (при ограниченном числе наблюдений) концентрация ЦП была выше в группе мужчин (отличие недостоверно).

При неврологической стадии БВК процент больных с уровнем сывороточного ЦП, превышавшим границу нормы, был приблизительно таким же, как в общей группе больных БВК, — 2,33. В то же время у больных с преневрологической стадией болезни нормальная концентрация ЦП встречалась значительно чаще (8,82%) и чаще у женщин (15,79%), чем у мужчин (0%, табл. 3).

Определенные нами значения концентрации ЦП у здоровых людей соответствуют величинам, принятым основными группами, занимающимися исследованием БВК [1,2,15,22]. Способ калибровки по сыворотке крови с известной концентрацией меди применен одной из самых авторитетных научно-исследовательских групп, занимающихся проблемой БВК [22]. При этом содержание сывороточного ЦП в норме в среднем составило  $305 \pm 35$  мг/л. При диагностике БВК пограничное нормальное значение концентрации ЦП принято равным 200 мг/л [22,23].

В целом же сообщения о средней концентрации ЦП и меди в сыворотке крови весьма разноречивы [6,8,23]. Неточности при определении ЦП могут быть выявлены, когда при расчете количества меди, входящей в состав ЦП (0,3% от массы белка), получают результат, который превышает величину общего количества меди в сыворотке крови. В норме разница между общей и церулоплазминовой медью (так называемая свободная медь) не превышает 100 мкг/л [17].

Описанные нами колебания концентраций ЦП в контроле совпадают с данными других авторов

Таблица 2

Концентрация сывороточного ЦП на разных стадиях БВК

№ группы	Возраст, годы	Концентрация ЦП, мг/л		
		мужчины	женщины	оба пола
Преневрологическая стадия				
1	15,7±1,0	80,33±14,54 (15)	91,13±18,18 (19)	86,36±11,88 (34)
2	5—9	69,03±23,34 (3)	24,70±4,70 (2)	51,30±16,84 (5)
3	10—14	72,50±45,37 (3)	93,32±48,54 (5)	85,51±32,82 (8)
4	15—19	94,18±25,68 (6)	90,43±26,27 (8)	92,04±17,92 (14)
5	20—24	71,77±34,31 (3)	139,50±69,50 (2)	98,86±33,34 (5)
6	25—29	—	149,0 (1)	149,0 (1)
7	30 и старше	—	64,0 (1)	64,0 (1)
Неврологическая стадия				
8	24,2±0,4	60,46±4,09 (162)	87,81±5,28 (139)***	73,09±3,37 (301)
9	5—9	—	109,0 (1)	109,0 (1)
10	10—14	58,00±16,94 (9)	41,80±16,41 (5)	52,21±12,16 (14)
11	15—19	35,88±7,32 (33)	64,73±8,62 (32)	50,08±5,88 (65)
12	20—24	50,87±7,19 (44)	77,76±8,61 (44)*	64,32±5,76 (88)
13	25—29	74,50±8,68 (37)	102,64±11,75 (31)	87,33±7,29 (68)
14	30 и старше	79,30±8,84 (39)	123,53±13,28 (26)**	96,99±7,92 (65)
Все больные				
15	23,3±0,4	62,14±3,95 (177)	88,21±5,11 (158)***	74,43±3,26 (335)
16	5—9	69,03±23,34 (3)	52,93±28,36 (3)	60,98±16,82 (6)
17	10—14	61,62±15,93 (12)	67,56±25,64 (10)	64,32±14,18 (22)
18	15—19	44,85±7,94 (39)	69,87±8,65 (40)	57,52±6,01 (79)
19	20—24	52,20±7,01 (47)	80,45±8,72 (46)**	66,18±5,74 (93)
20	25—29	74,50±8,68 (37)	104,05±11,47 (32)	88,22±7,24 (69)
21	30 и старше	79,30±8,84 (39)	121,33±12,97 (27)**	96,49±7,81 (66)
		$p_{11-14} < 0,001$	$p_{11-14} < 0,001$	$p_{18-21} < 0,001$
		$p_{11-13} < 0,01$	$p_{10-14} < 0,001$	$p_{11-13} < 0,001$
		$p_{12-14} < 0,05$	$p_{18-21} < 0,01$	$p_{11-14} < 0,001$
		$p_{19-21} < 0,05$	$p_{12-14} < 0,01$	$p_{10-14} < 0,01$
		$p_{18-21} < 0,01$	$p_{19-21} < 0,05$	$p_{12-14} < 0,01$
		$p_{12-14} < 0,05$	$p_{18-20} < 0,05$	$p_{18-20} < 0,01$
				$p_{19-21} < 0,01$
				$p_{10-13} < 0,05$
				$p_{19-20} < 0,05$

Примечание. Представлены среднее ± стандартная ошибка среднего значения, в скобках — число обследованных. Достоверность различий между мужчинами и женщинами: одна звездочка —  $p < 0,05$ , две звездочки —  $p < 0,01$ , три звездочки —  $p < 0,001$ .

Распределение концентрации сывороточного ЦП в зависимости от стадии БВК

Концентрация ЦП, мг/л	Преневрологическая стадия						Неврологическая стадия					
	мужчины		женщины		оба пола		мужчины		женщины		оба пола	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
0	—	—	3	15,79	3	8,82	17	10,49	9	6,48	26	8,64
1—49	7	46,67	3	15,79	10	29,41	68	41,98	29	20,86	97	32,23
50—99	3	20,00	6	31,58	9	26,47	41	25,31	47	33,81	88	29,23
100—149	3	20,0	4	21,05	7	20,59	24	14,81	30	21,58	54	17,94
150—199	2	13,33	—	—	2	5,88	11	6,79	18	12,95	29	9,63
200—249	—	—	2	10,53	2	5,88	—	—	3	2,16	3	1,00
250—299	—	—	1	5,26	1	2,94	1	0,62	2	1,44	3	1,00
300—349	—	—	—	—	—	—	—	—	1	0,72	1	0,33
Всего...	15	100	19	100	34	100	162	100	139	100	301	100

[1,11,22]. Так, по данным [22], концентрация ЦП в норме колеблется в пределах 185—659 мг/л. В работе [11] сообщается о еще более низких границах нормальной концентрации ЦП (от 90 до 510 мг/л). На фоне столь значительного разброса концентраций ЦП в контрольных группах неудивительно, что у больных БВК содержание этого белка варьируется весьма значительно.

Приведенный нами материал показывает, однако, что нулевые и резко сниженные уровни ЦП среди больных БВК встречались относительно редко. Так, по сообщениям ряда исследователей, обобщенным недавно [22], уровень ЦП в сыворотке, не превышавший 50 мг/л, отмечался у 52—64% больных, в то время как по нашим данным, — не более чем у 40,6% больных. Точно так же, по данным этих исследований, приблизительно 25% больных не имеют детектируемого ЦП, в то время как по нашим данным (см. табл. 1), эта величина существенно ниже — 8,66%.

Частично такое расхождение можно объяснить различиями в методах определения концентрации ЦП. Американские и канадские исследователи, например, пользовались кинетическими методами, которые, безусловно, являются более точными [14,22]. Повышение точности связано с тем, что учитывается лаг-период, который при анализе сыворотки крови некоторых больных БВК с низкой концентрацией ЦП может достигать 10 мин и более (собственные наблюдения, [15]). С другой стороны, чувствительность кинетических методов ниже, чем, к примеру, метода Ravin, где используется длительная (60 мин) инкубация; при их применении активность ЦП может не выявляться полностью.

Второй и, по нашему мнению, более веской причиной являются этнические особенности исследованных больных. Сведения о связи отдельных клинических вариантов БВК с этническими группами населения земного шара приведены в работе [14]. Ими выделены три генетических типа БВК: "славянский", ювенильный и атипичный. Третья форма получила название атипичной, так как отмечено отчетливое снижение содержания ЦП в сыворотке крови у облигатных гетерозигот — родителей больных БВК, признаки заболевания у которых никогда не выявлялись. Первый тип был характерен для выходцев из Восточной Европы, второй — для семей, происходящих из Западной Европы и с Востока, третий был характерен в основном для Западной Европы. Обращает на себя внимание то, что самая высокая концентрация ЦП была обнаружена именно у больных со "славянским" вариантом болезни (в среднем 109 мг/л при

значениях для двух других типов 80 и 35 мг/л соответственно) [14].

Таким образом, можно предположить, что относительно меньшее снижение уровня ЦП объясняется преобладанием в исследованной группе больных со "славянским" типом БВК. Косвенным подтверждением тому могут служить данные о распределении ЦП у гетерозигот. Как видно из табл. 1, концентрация ЦП у них была ниже 200 мг/л только в 5,1% случаев и ни в одном случае не снижалась ниже 100 мг/л, в то время как по данным работы [22], дефицит ЦП отмечается у 20% гетерозигот, наиболее низкая концентрация этого белка (от 10 до 99 мг/л) — у 2,2% гетерозигот.

Как показано выше, у здоровых индивидуумов наблюдаются значительные вариации уровня ЦП в крови. Среди факторов, ответственных за такие колебания, отмечаются как генетические, так и внешнесредовые [13,16]. У гетерозигот по БВК наличие мутантного гена (при статистической обработке данных) сказывается в небольшом снижении концентрации ЦП в сыворотке крови. Однако существенную роль в вариабельности содержания этого белка играют семейные факторы, независимые от гена БВК. Такими факторами могут быть наследственные вариации в локусе ЦП и аддитивные полигенные эффекты [13,16]. Одним из важных факторов, ответственных за колебания уровня ЦП, является возраст [15,16]. Зависимость концентрации ЦП от возраста и пола изучалась неоднократно, и большинством исследователей отмечено, что уровень ЦП более высок у женщин и с возрастом повышается. Уровень ЦП очень мал при рождении, остается низким в течение первого года жизни [22] и быстро нарастает в раннем детстве (сводные данные работы [3]). У детей до 12 лет концентрация ЦП выше, чем у взрослых, в подростковом возрасте она снижается [15]. Особенно четкие половые различия в концентрации ЦП были найдены в подростковом возрасте, когда у больных мужского пола в возрасте 17—19 лет в отличие от больных женского пола продолжается снижение концентрации ЦП [15]. О более высокой концентрации ЦП у женщин и о повышении концентрации ЦП с возрастом свидетельствуют известные данные литературы [20].

Итак, анализ данных, касающихся концентрации ЦП в однородных по возрастно-половому составу группах больных БВК, позволил сделать вполне определенные выводы о том, что у этих больных отмечаются те же закономерности, что и у здоровых людей и у больных с другими неврологическими заболеваниями. Таким образом, можно думать, что

у больных БВК, несмотря на резкое снижение концентрации ЦП в крови, его секреция из гепатоцитов печени, где он синтезируется, подвержена тем же воздействиям, которые происходят в процессе роста и развития здорового организма.

В литературе этот вопрос почти не обсуждался. Единственным упоминанием является исследование В. Вонпе-Тамиг и соавт. [13], в котором подчеркнута отсутствие различий в концентрации ЦП при БВК между мужчинами и женщинами. Однако приведенные авторами данные о концентрации меди указывают на существенно более высокий ее уровень в плазме крови женщин, чем мужчин (283 и 156 мкг/л соответственно), и, возможно, на существенно более высокий уровень ЦП у женщин (на 42 мг/л, если принять равными концентрации свободной меди у мужчин и женщин).

Полученные нами данные о возрастно-половой зависимости концентрации ЦП имеют, помимо теоретического, и практическое значение при обследовании больных с подозрением на БВК. Особенно большое значение следует придавать возрасту детей.

Возрастную динамику концентрации ЦП следует учитывать также при анализе концентрации ЦП у больных БВК в процессе многолетнего лечения тиоловыми препаратами. Полученные нами результаты и данные литературы [22] свидетельствуют о том, что концентрация ЦП при таком лечении больных свойственно резкое ее снижение, в то время как при длительном многолетнем лечении часто наблюдается ее повышение до субнормальных и нормальных величин. Несомненно, что в случаях длительного лечения (20—30 лет) следует учитывать возраст пациента при характеристике уровня ЦП.

Учет возраста и пола может оказаться важным и при сравнении уровня ЦП при разных неврологических формах БВК, поскольку возраст проявления болезни в этих случаях существенно варьирует.

У больных с преневрологической стадией болезни более часто, чем при неврологической, встречаются субнормальные и нормальные концентрации ЦП (см. табл. 3). Повышение уровня ЦП объясняется разными причинами: активностью процессов, протекающих в печени (с воспалением и некрозом), недостаточностью ее обезвреживающей функции по отношению к эстрогенам [22]. Последующее улучшение функций печени сопровождается снижением концентрации ЦП [22].

Таким образом, хорошо известный факт снижения концентрации ЦП при БВК может быть дополнен новыми данными о его возрастно-половых различиях, возрастной динамике (в сравнении со здоровыми лицами), а также различиями у больных с первичными преневрологическими и неврологическими формами. Полученные результаты могут сыграть определенную роль в дальнейших исследованиях, направленных на уточнение функциональной роли ЦП в организме, а также будут способствовать совершенствованию диагностики БВК, особенно в преคลินิกической стадии.

Выражаем благодарность Е.В.Готовцевой за участие в подборе больных с БВК, проф. А.А.Болдыреву за участие в обсуждении полученных данных и подготовке статьи к печати и О.Н.Коваленко за

помощь в сопоставлении двух методов оценки оксидазной активности церулоплазмينا.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ботвинник В.С., Лекарь П.Г., Макарова В.А. // Журн. невропатол. и психиатр. — 1981. — № 3. — С. 334—337.
2. Вахарловский В.Г., Никитина Л.М., Бондарчук А.Н. // Клин. мед. — 1980. — № 1. — С. 56—60.
3. Клиническая оценка лабораторных тестов / Под ред. Н.У.Тича: Пер. с англ. — М., 1986. — С. 390—392.
4. Иванова-Смоленская И.А., Мжельская Т.И. // Тер. арх. — 1990. — № 10. — С. 79—83.
5. Мжельская Т.И. Методы биохимической диагностики и контроля за лечением болезни Вильсона—Коновалова. — М., 1992 (Деп. в ВИНТИ. — № 2931 — В-92 от 08.10.92).
6. Мжельская Т.И., Завалишин И.А., Иванова-Смоленская И.А. и др. // Лаб. дело. — 1989. — № 11. — С. 12—15.
7. Мжельская Т.И., Ларский Э.Г., Басевич В.В. // Мед. реф. журн. — XXII. — 1988. — № 3. — С. 19—21.
8. Мошков К.А., Усатенко М.С., Бурмистров С.О., Яковлев А.С. // Лаб. дело. — 1985. — № 7. — С. 390—394.
9. Нейфах С.А., Шавловский М.М. // Прогресс в медицинской генетике / Под ред. Н.П.Бочкова. — М., 1978. — С. 106—150.
10. Пучкова Л.В. Биосинтез церулоплазмينا у здоровых людей, больных болезнью Вильсона—Коновалова и у экспериментальных животных: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — Л., 1991.
11. Bachmann H., Lossner J., Kuhn H.-J. et al. // Symposium on Wilson's Disease, 5-th: Proceedings / Eds A.Czlonkowska, C.J.A. Van den Hamer. — Delft, 1991. — P. 79—86.
12. Bachmann H., Lossner J., Kuhn H.-J., Siegemund R. // Ibid. — P. 121—128.
13. Bonne-Tamir B., Frydman M., Agger M.S. et al. // Ann. hum. Genet. — 1990. — Vol. 54. — P. 155—168.
14. Cox D.W., Fraser F.C., Sass-Kortsak A. // Amer. J. hum. Genet. — 1972. — Vol. 24, № 6. — P. 646—666.
15. Cox D.W. // J. Lab. clin. Med. — 1966. — Vol. 68, № 6. — P. — 893—904.
16. Farrer L.A., Bowcock A.M., Hebert J.M. et al. // Neurology. — 1991. — Vol. 41, № 7. — P. 992—999.
17. Hoogenraad T.U., Van Hattum J., Van den Hamer C.J.A. // J. neurol. Sci. — 1987. — Vol. 77. — P. 137—146.
18. Houchin O.B. // Clin. Chem. — 1958. — Vol. 4. — P. 519—523.
19. Jyengar V., Brewer G.J., Dick R.D., Owyang C. // J. Lab. clin. Med. — 1988. — Vol. 111, № 3. — P. 267—274.
20. Linder M.S., Moor J.R., Wright K. // J. nat. Cancer Inst. — 1981. — Vol. 67, № 2. — P. 263—275.
21. Ravin H.A. // J. Lab. clin. Med. — 1961. — Vol. 58. — P. 161—168.
22. Scheinberg I.H., Sternlieb I. Wilson's Disease. — Philadelphia, 1984 (Major Problems in Internal Medicine, Vol. 23).
23. Sternlieb I. // Hepatology. — 1990. — Vol. 12, № 5. — P. 1234—1239.

Поступила 08.12.93

#### FACTORS AFFECTING THE CONTENT OF BLOOD SERUM CERULOPLASMIN IN WILSON-KONOVALOV DISEASE

T.I.Mzhelskaya, I.A.Ivanova-Smolenskaya, N.V.Korobova

Institute of Neurology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

An oxidase activity of ceruloplasmin was studied in blood serum of 335 patients with Wilson-Konovalov disease before specific copper-obviating treatment. Coefficient for calculation of concentration units depending on optic density was estimated by means of copper content measurement in ceruloplasmin. The well-known fact of ceruloplasmin content decrease in the Wilson-Konovalov disease was supplemented by the new data involving age-sex differences and the age-dependent dynamics as compared with healthy persons and with a group of 827 patients with other neurological diseases. Under conditions of the pathology concentration of ceruloplasmin was minimal in teenagers and in men it was lower than in women ( $62.1 \pm 4.0\%$  and  $88.2 \pm 5.0\%$ , respectively,  $P < 0.001$ ). Statistically distinct differences in content of ceruloplasmin were found in the patients of 15-19 years old and 20-24 years old as compared with the older age groups. Higher content of ceruloplasmin, exceeding the normal level about 200 mg/l, was most often detected at the preneurological step of the disease as compared with the neurological period (8.8% and 2.3%, respectively).

А. А. Акопян, М. В. Арутюнян, А. М. Агавелян

## РОЛЬ МОНОАМИНОКСИДАЗЫ В ПАТОЛОГИИ ТОЛСТОЙ КИШКИ

НИИ проктологии Минздрава Республики Армения, Ереван

За последние годы накопилось достаточно данных, свидетельствующих о важном патогенетическом значении нарушенных каталитических функций моноаминоксидаз (МАО) при многих заболеваниях центральной нервной, сердечно-сосудистой систем и желудочно-кишечного тракта [17,19].

МАО (1.4.3.4-амин:кислород оксидоредуктаза деаминирующая) широко представлены во всех органах человека и млекопитающих [21], однако свойства ферментов этой группы в органах и различных клетках одного органа значительно различаются [16].

Функции МАО в организме не ограничены участием в регуляции внутриклеточного уровня биогенных моноаминов, в обезвреживании токсичных аминов, поступающих в кровоток из кишечника. Наряду с этим продукты дезаминирования биогенных аминов, катализируемые МАО (альдегиды, спирты), участвуют в регуляции активности ряда окислительных ферментов и физиологических процессов [18,22].

В литературе имеются данные, свидетельствующие о наличии прямой корреляционной связи между интенсивностью обмена биогенных аминов в клеточных структурах и степенью активности патологического процесса в различных органах [7,9,13].

При патологических состояниях возможны не только количественные (ингибирование или активация, иногда с изменением соотношения скоростей окисления различных аминов), но и качественные нарушения функций МАО, характеризующиеся тем, что они приобретают свойства катализировать дезаминирование азотистых соединений, которые не являются субстратами МАО [7].

Исходя из изложенного выше, мы поставили цель изучить активность МАО при функциональных, в частности синдроме раздраженной толстой кишки (СРТК) [3,15], воспалительных и опухолевых заболеваниях толстой кишки.

Диагнозы больных установлены на основании клинических, инструментальных и лабораторно-морфологических исследований. Обследовано 88 больных мужчин и женщин в возрасте от 20 до 60 лет: 24 больных с СРТК, 31 с воспалительными (18 с неязвенным колитом, 13 с неспецифическим язвенным колитом — НЯК) и 33 с опухолевыми (21 с аденокарциномой, 12 с аденомой) заболеваниями толстой кишки. Контролем служили 12 практически здоровых лиц.

Методика. Для выделения тромбоцитов к 0,5 мл цитрата натрия добавляли 4,5 мл исследуемой крови, затем центрифугировали в течение 10 мин при 200 г и 5°C. Верхнюю фракцию отбирали автоматической пипеткой, а эритроциты снова промывали дважды 2 мл 0,15 М NaCl, центрифугируя в тех же условиях. Объединенные надосадки центрифугировали еще раз в течение 10 мин при 200 г, далее из надосадки осаждали тромбоциты, центрифугируя в течение 20 мин при 650 г. Осадок ополаскивали 0,01 М К-фосфатным буфером pH 7,4 и

суспендировали в 1 мл 0,01М 2-фосфатного буфера. Активность МАО определяли по методике С. McEwen, J. Cohen в модификации [5]. Для определения активности фермента пробирки со шлифованной пробкой, содержащие 0,3 мл 0,4М К, Na-фосфатного буфера pH 7,4, 0,1—0,5 мг белка тромбоцитов и 0,1мл 45 мМ бензиламингидрохлорида, инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Ферментативную реакцию останавливали добавлением 0,2 мл 1М HCl. Затем к пробам добавляли 3 мл гексана и закрытые пробирки встряхивали в шюттель-аппарате в течение 4 мин. Верхнюю фазу отбирали автоматической пипеткой и при длине волны 241 нм спектрофотометрировали. Удельную активность (Уд.акт.) выражали числом единиц ферментативной активности на 1 мг белка, количество которого определяли по методу Лоури [20] и рассчитывали по формуле

$$\text{Уд.акт.} = \frac{296,3 \cdot \text{ОП}_{241}}{t \cdot C}$$

где  $t$  — время инкубации (в мин);  $C$  — количество белка в пробе (в мг);  $\text{ОП}_{241}$  — изменение оптической плотности в опыте. Результаты исследований обработаны статистически методом Фишера—Стьюдента [11].

Результаты и обсуждение. Результаты проведенных исследований, характеризующие изменения активности МАО тромбоцитов у больных с изучаемой патологией толстой кишки, представлены в табл. 1 и 2.

Таблица 1

Удельная активность МАО тромбоцитов (в нмоль субстрата на 1 мг белка в 1 мин) больных с функциональными и воспалительными заболеваниями толстой кишки в динамике

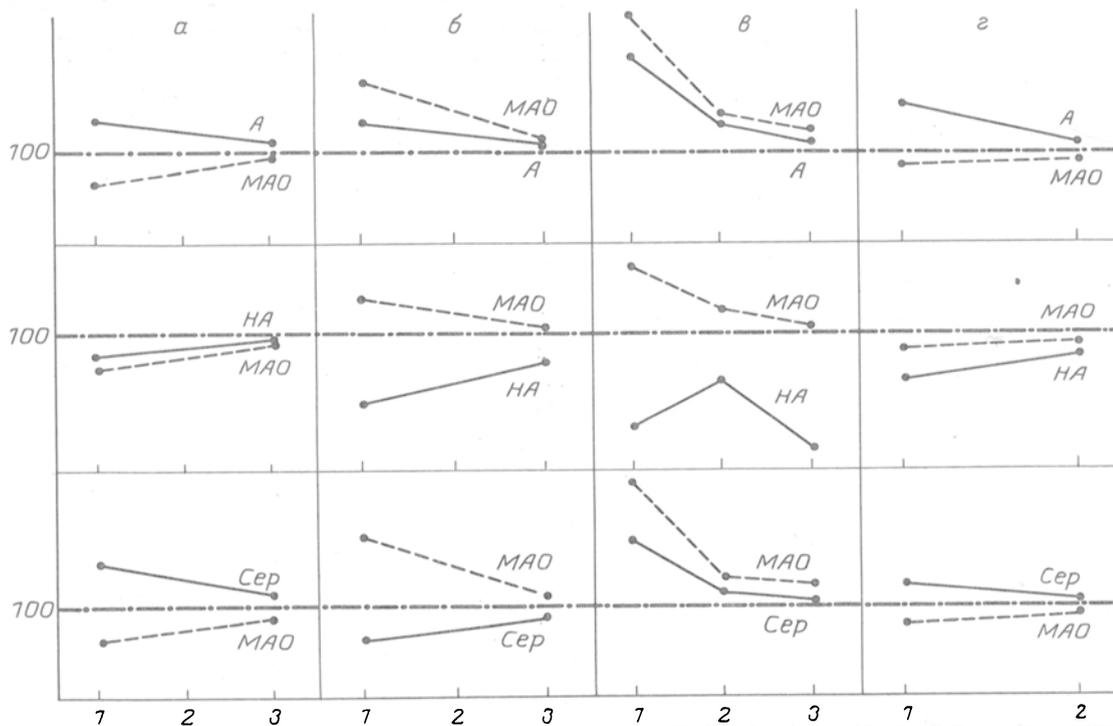
Заболевание	Активность МАО	
	при поступлении	при выписке
СРТК ( $n = 24$ )	$0,6 \pm 0,1$	$0,85 \pm 0,02$
$p$	$< 0,01$	$> 0,05$
Неязвенный колит ( $n = 8$ )	$0,87 \pm 0,01$	$0,90 \pm 0,01$
$p$	$> 0,05$	$> 0,05$
НЯК ( $n = 13$ )	$1,31 \pm 0,13$	$0,98 \pm 0,01$
$p$	$< 0,01$	$< 0,05$
Контроль ( $n = 12$ )	$0,91 \pm 0,03$	

Таблица 2

Удельная активность МАО тромбоцитов (в нмоль субстрата на 1 мг белка в 1 мин) больных с новообразованиями толстой кишки в динамике

Заболевание	Активность		
	при поступлении	перед операцией	при выписке
Аденома ( $n = 12$ )	$0,77 \pm 0,07$		$0,88 \pm 0,04$
$p$	$> 0,05$		$> 0,05$
Аденокарцинома ( $n = 21$ )	$1,74 \pm 0,15$	$1,2 \pm 0,12$	$1,0 \pm 0,03$
$p$	$< 0,001$	$< 0,001$	$< 0,05$
Контроль ( $n = 12$ )	$0,91 \pm 0,03$		

По данным 12 анализов, у контрольной группы лиц активность МАО тромбоцитов составляла  $0,91 \pm 0,03$  нмоль субстрата на 1 мг белка в 1 мин, что близко к величинам, представленным в литературе [5,14]. Как видно из табл. 1, удельная активность МАО у больных с СРТК при поступлении в активной стадии болезни достоверно понижается на 34% при сравнении с данными контрольной группы.



Сравнительное содержание биогенных аминов и активность MAO у больных с функциональными, воспалительными и опухолевыми заболеваниями толстой кишки до и после лечения.

По оси абсцисс — время исследования, нед; по оси ординат — величины соответствующих показателей, % от контроля, принятого за 100%. а — СРТК; б — НЯК; в — аденокарцинома; г — аденома. А — адреналин; HA — норадреналин; Сер — серотонин.

Анализ полученных данных показывает, что при воспалительных заболеваниях толстой кишки, в частности неязвенном колите и НЯК, наблюдаются разнонаправленные сдвиги в активности MAO: при неязвенном колите активность фермента колеблется в пределах контрольных величин или отмечается небольшое ее понижение — на 4% по сравнению с данными контрольной группы, а у больных с НЯК активность MAO тромбоцитов превышает уровень контроля на 44%.

При сопоставлении данных, полученных при изучении активности MAO у больных с функциональными и воспалительными заболеваниями толстой кишки, обнаруживается зависимость активности MAO от изменения функциональных свойств клеток до появления выраженных морфологических признаков — нарастание активности фермента от 0,6 — 0,87 до 1,31 нмоль субстрата на 1 мг белка в 1 мин.

Особый интерес представляло изучение динамики активности MAO и выявление эффективности применяемых методов лечения с помощью улучшения указанных показателей, а также на основе ведущего значения клинических признаков в комплексе с различными лабораторными и инструментальными исследованиями.

Недостаточная эффективность традиционных методов лечения СРТК, увеличение числа аллергических реакций при фармакотерапии обуславливают актуальность поиска новых методов лечения указанного заболевания.

Известен положительный опыт применения игло-терапии, однако инвазивность этого метода, болезненные реакции, которыми сопровождается введение игл у больных с СРТК, у которых даже нормальные импульсы воспринимаются как боль, побудили клиницистов апробировать метод воздействия на биоло-

гически активные точки ультразвуком, что явилось более эффективным методом лечения.

В другой серии исследований больные с СРТК были разделены на две группы. Больные 1-й группы на фоне базисной терапии получали токи переменного магнитного поля (ПМП), а 2-й группы — вместо ПМП-терапии синусоидальные модулированные токи (СМТ), применение которых оказалось более эффективным.

В процессе лечения больных при динамическом наблюдении за показателями активности MAO отмечается тенденция к их нормализации — как при СРТК, так и при неязвенном колите активность, повышаясь, достигает  $0,90 \pm 0,01$  и  $0,98 \pm 0,01$  нмоль на 1 мг белка в 1 мин соответственно.

При НЯК с наступлением клинической ремиссии отмечается понижение удельной активности MAO, однако нормальных значений она не достигает.

Следующим этапом наших исследований явилось изучение активности MAO тромбоцитов больных с новообразованиями толстой кишки — аденокарциномой и аденомой.

Обследование больных со злокачественными опухолями толстой кишки в день госпитализации выявило повышение активности MAO на 91% по сравнению с контрольной группой, что, по средним данным 21 исследования, составляет  $1,74 \pm 0,15$  нмоль субстрата на 1 мг белка в 1 мин (см. табл. 2).

При динамическом наблюдении за изменениями активности MAO тромбоцитов в период предоперационной подготовки было отмечено заметное ее понижение, что совпадало с некоторым улучшением клинической картины заболевания. У оперированных больных перед выпиской активность MAO имеет тенденцию к понижению, однако нормальных значений она не достигает.

Содержание биогенных аминов в крови больных с функциональными, воспалительными и опухолевыми заболеваниями толстой кишки в динамике

Заболевание	Адреналин, нмоль/л		Норадреналин, нмоль/л		Серотонин, мкмоль/л	
	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения
СРТК (n = 56)	14,74 ± 0,25	12,88 ± 0,07	13,06 ± 0,03	15,96 ± 0,1	0,28 ± 0,02	0,22 ± 0,01
<i>p</i>	< 0,001	> 0,05	< 0,001	< 0,001	< 0,001	> 0,05
НЯК (n = 25)	15,82 ± 0,3	13,2 ± 0,2	11,23 ± 0,2	14,43 ± 0,3	0,13 ± 0,02	0,19 ± 0,03
<i>p</i>	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	> 0,05
Аденокарцинома (n = 30)	22,3 ± 0,5	13,4 ± 0,2	12,0 ± 0,4	10,5 ± 0,3	0,32 ± 0,05	0,21 ± 0,04
<i>p</i>	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	> 0,05
Аденома (n = 20)	15,6 ± 0,2	13,5 ± 0,3	16,2 ± 0,3	17,1 ± 0,3	0,24 ± 0,03	0,21 ± 0,02
<i>p</i>	< 0,001	< 0,01	< 0,001	< 0,01	> 0,05	> 0,05
Контроль (n = 20)	12,5 ± 0,1		18,5 ± 0,3		0,20 ± 0,02	

Как показывают данные табл. 2, активность МАО тромбоцитов у больных с аденомами толстой кишки понижается на 15% по сравнению с контрольными значениями. После аденомэктомии она нормализуется.

В исследованиях, проведенных по изучению активности МАО тромбоцитов при опухолевых поражениях толстой кишки в зависимости от структуры опухоли, статистически достоверных сдвигов не установлено. Во всех группах больных с аденомами (легкая, умеренная и тяжелая дисплазии) и аденокарциномой (высокая, умеренная и низкая дифференциации) активность фермента колеблется в пределах 0,70—0,84 и 1,59—1,89 нмоль субстрата на 1 мг белка в 1 мин соответственно.

Из заболеваний толстой кишки, вызывающих вторичные изменения ферментативной активности, наиболее часто встречаются язвенные колиты и рак [4].

Своими исследованиями по определению активности МАО мы попытались частично объяснить некоторые механизмы регуляции обмена катехоламинов и серотонина при патологии толстой кишки.

На рисунке представлены изменения активности МАО и содержания биогенных аминов в зависимости от заболеваний толстой кишки. Для повышения информативности рисунка дана табл. 3, где суммированы данные по изучению содержания биогенных аминов при патологии толстой кишки, зарегистрированные в наших прежних исследованиях [1].

Анализ результатов, представленных на рисунке, показывает, что у больных с СРТК повышение уровня адреналина и серотонина в крови сопровождается понижением активности МАО, свидетельствующим о том, что высокое содержание биогенных аминов зависит не только от увеличения выброса в кровь, но и от нарушения их метаболизма.

При НЯК и аденокарциноме толстой кишки [2] высокое содержание адреналина сопровождается значительным повышением активности МАО. По-видимому, здесь процессы анаболизма превалируют над процессами катаболизма, т. е. увеличение содержания адреналина, а при аденокарциномах и серотонина происходит благодаря активации ключевых ферментов, отвечающих за их биосинтез, — тирозин- и триптофангидроксилазы соответственно. Известно, что катехоламины и серотонин могут активировать циклазные реакции, направленные на биосинтез циклических нуклеотидов [12]. Последние могут участвовать в реакциях фосфорилирования ферментов, задействованных в биосинтезе био-

активных аминов — тирозин- и триптофангидроксилаз.

В работе [8] показано значительное повышение содержания серотонина в крови при аденокарциномах, обусловленное не только нарушением процессов инактивации, но и их поступлением из тканей, подвергшихся действию бактериальных токсинов, в частности за счет разрушения тучных клеток брюшины.

Сопоставление полученных нами результатов с данными литературы позволяет подтвердить, что окислительное дезаминирование с участием МАО не единственный путь биотрансформации биогенных аминов, в частности серотонина и норадреналина [6].

Результаты наших исследований по изучению активности МАО и содержания норадреналина в крови при функциональных и опухолевых заболеваниях толстой кишки не позволяют однозначно интерпретировать причину пониженного уровня норадреналина.

По данным ингибиторного анализа, один тромбоцит взрослого здорового человека содержит примерно 900 молекул МАО типа Б, но не содержит МАО типа А. Поэтому на основании сведений об активности МАО тромбоцитов нельзя оценивать состояние в организме МАО типа А, которым принадлежит важная роль в обмене нейромедиаторов, в частности норадреналина [7].

В настоящем исследовании измерялась суммарная активность МАО тромбоцитов человека. Поскольку известна гетерогенность МАО [10], можно предположить, что при патологии толстой кишки, по всей видимости, происходят изменения в соотношении множественных форм МАО тромбоцитов, а не суммарной, что представляется целесообразным для дальнейших исследований. Подводя общий итог исследования, можно полагать, что выявленные изменения активности МАО отражают характер клинических проявлений патологического процесса в толстой кишке.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Арутюнян М. В., Акопян А. А., Макарян А. П. и др. // Врач. дело. — 1990. — № 2. — С. 66—69.
2. Арутюнян М. В., Макарян А. П., Акопян А. А. и др. // НТК молуч. и спец. 26-ти ком.: Тезисы докладов. — Ереван, 1990. — С. 47.
3. Бекюл Е. А. // Всесоюзный съезд гастроэнтерологов, 3-й: Материалы. — М.; Л., 1984. — С. 140—142.
4. Вилкинсон Д. Принципы и методы диагностической энзимологии. — М., 1981.

5. Волошина О. Н., Москвитина Т. А. // Лаб. дело. — 1985. № 5. — С. 289—291.
6. Горкин В. З. // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева. — 1976. — № 3. — С. 181—185.
7. Горкин В. З. Аминоксидазы и их значение в медицине. — М., 1981. — С. 333.
8. Ильчева Р. Ф., Торицин А. А. // Хирургия. — 1981. — № 7. — С. 46—51.
9. Кушнир В. Е. // Врач. дело. — 1980. — № 6. — С. 36—40.
10. Москвитина Т. А. // Бюл. exper. биол. — 1990. — № 2. — С. 152—153.
11. Рокицкий П. Ф. Основы вариационной статистики для биологов. — Минск, 1981.
12. Федоров П. М. // Биологическое и клиническое значение циклических нуклеотидов. — М., 1979. — С. 184.
13. Френкель И. Д., Комиссарова И. В. // Тер. арх. — 1975. — № 2. — С. 142—146.
14. Abel C. W. et al. // Proteins in the Nervous System. Structure Function. — New York, 1982. — P. 209—221.
15. Almy T. P. // Gastroenterology. — 1978. — Vol. 68. — P. 1351.
16. Cotzias I. E. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1974. — Vol. 71. — P. 2715—2719.
17. Glover V., Reveley M. A., Sandler M. // Biochem. Pharmacol. — 1980. — Vol. 29. — P. 467—470.
18. Gorkin V. Z. // Advanc. Pharmacol. Chemother. — 1973. — Vol. 11. — P. 1—50.
19. Lewinson R., Glover V., Sandler M. // Biochem. Pharmacol. — 1980. — Vol. 29. — P. 1221—1230.
20. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. et al. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
21. Murphy D. // Biochem. Pharmacol. — 1978. — Vol. 27. — P. 1889—1893.
22. White H. L., Glassman A. T. // J. Neurochem. — 1977. — Vol. 29. — P. 287—297.

Поступила 07.07.93

#### INVOLVEMENT OF MONOAMINE OXIDASE IN THE PATHOGENESIS OF LARGE INTESTINAL ABNORMALITIES

A. A. Akopyan, M. V. Arutyunyan, A. M. Agavelyan

Institute of Proctology, ministry of Public Health of the Armenian Republic, Yerevan

The activity of monoamine oxidase (MAO) was studied during functional, inflammatory and tumoral diseases of the large intestine. In the patients with the irritable colon syndrome, the enzymatic activity was decreased by 34% at the acute stage of the disease and in those with nonspecific ulcerative colitis it was increased by 44%. Follow-ups of MAO activity may serve as an indicator of the adequacy and efficiency of the treatment performed.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616.98:578.831.31]-07:616.155.3-008.931

А. А. Савченко, С. А. Догадин, К. Г. Ноздрачев

#### АКТИВНОСТЬ НАД(Ф)-ЗАВИСИМЫХ ДЕГИДРОГЕНАЗ ЛИМФОЦИТОВ И СОДЕРЖАНИЕ ГОРМОНОВ В КРОВИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ И ЛИЦ, ЧАСТО БОЛЕЮЩИХ ОРЗ

Институт медицинских проблем Севера СО РАМН, Красноярск

Иммунная система вместе с нервной и эндокринной формируют гомеостатическую систему организма, которая, осуществляя постоянный контроль, обеспечивает оптимальное состояние для выполнения той или иной функции. Изменение любого звена этой гомеостатической системы приводит к проявлению патологии человека.

Известно, что при многих инфекционных процессах в крови меняется содержание и соотношение гормонов и медиаторов. Например, в разгар заболевания острым вирусным гепатитом у детей в крови

увеличивается содержание кортизола, альдостерона, тироксина, снижается концентрация пролактина [1].

В последние годы исследованы некоторые механизмы гормональной регуляции клеточного метаболизма. Так, к гормонам щитовидной железы обнаружены рецепторы, расположенные на внешней цитоплазматической мембране и непосредственно на ДНК [8,9]. При этом инкубация клеток с тироксином (Т<sub>4</sub>) или трийодтиронином (Т<sub>3</sub>) приводит к увеличению синтеза митохондриальной глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (Г-3-ФДГ) и малик-фермента, усиливается дыхание митохондрий [9—12]. Воздействие инсулина *in vitro* на гепатоциты повышает образование СО<sub>2</sub> в митохондриях, стимулирует синтез аминокислот из сукцината, активирует гликолиз и липогенез [9,10].

В то же время иммунореактивность организма во многом определяется состоянием обмена веществ в лимфоцитах. Такой иммунодефицит, как гипогаммаглобулинемия характеризуется снижением активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ), малатдегидрогеназы (МДГ) и кислой фосфатазы [4]. Врожденный дефицит глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) приводит к учащению инфекционных заболеваний, при этом наблюдается снижение розеткообразующей способности лимфоцитов человека с эритроцитами барана [5].

Целью данного исследования явилось изучение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах и взаимосвязи ее с содержанием гормонов в крови здоровых людей и лиц, часто и длительно болеющих ОРЗ.

Методика. Обследованы 2 группы людей в возрасте 18—45 лет: 1-я — практически здоровые (35 мужчин и 38 женщин) без хронической патологии, болеющие ОРЗ не чаще 2 раз в год; 2-я — здоровые на момент обследования (26 мужчин и 27 женщин), но болеющие ОРЗ не реже 3 раз в год общей продолжительностью не менее 1 мес. Группы были составлены на основании результатов анкетного опроса, осмотра врачей-специалистов, данных медицинской документации.

Выделение общей фракции лимфоцитов из венозной крови осуществляли по общепринятому методу в градиенте плотности фиколл—верографин с последующей очисткой от прилипающих клеток [2]. Определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов проводили биолюминесцентным методом [6]. Для этого использовали ферментный препарат НАД(Ф)Н: ФМНоксидоредуктаза-люцифераза из *Photobacterium leognathi* (получен в Институте биофизики СО РАН, Красноярск). Данным методом определяли следующие показатели: активность Г-6-ФДГ, Г-3-ФДГ, прямую и обратную реакции ЛДГ, прямую и обратную реакции МДГ, активность НАДФ- и НАД-зависимых глутаматдегидрогеназ (НАДФ-ГДГ и НАД-ГДГ). Активность дегидрогеназ выражали в ферментативных единицах (1 Е = 1 мкмоль/мин по [8]) на 10 000 клеток.

Концентрацию гормонов в сыворотке крови — Т<sub>4</sub>, Т<sub>3</sub>, тиреоглобулина (ТГ), кортизола, инсулина, соматотропина (СТГ) — определяли радиоиммунохимическими методами с использованием коммерческих тест-наборов.

Результаты и обсуждение. Данные об активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов и содержании гормонов в сыворотке крови

Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов и содержание гормонов в крови здоровых людей и лиц, часто и длительно болеющих ОРЗ ( $M \pm m$ )

Показатель	Здоровые (n = 73)	Часто и длительно болеющие ОРЗ (n = 53)
Г-6-ФДГ	6,57 ± 1,23	3,25 ± 0,45**
Г-3-ФДГ	1,78 ± 0,17	1,65 ± 0,18
Прямая реакция:		
ЛДГ	28,58 ± 2,53	20,39 ± 2,23**
МДГ	82,93 ± 9,31	55,91 ± 6,26**
НАДФ-МДГ	17,55 ± 1,65	15,84 ± 1,60
НАДФ-ГДГ	4,85 ± 0,61	3,61 ± 0,48
НАД-ГДГ	10,14 ± 1,28	5,13 ± 0,64***
Обратная реакция:		
ЛДГ	193,96 ± 17,03	146,89 ± 18,91*
МДГ	306,64 ± 18,04	265,34 ± 21,71
Т <sub>4</sub> , нмоль/л	131,03 ± 3,41	133,60 ± 4,14
Т <sub>3</sub> , нмоль/л	1,64 ± 0,05	1,63 ± 0,06
ТГ, нг/мл	35,86 ± 4,49	23,86 ± 3,71**
Кортизол, нмоль/л	469,99 ± 22,43	440,58 ± 29,89
СТГ, нг/мл	5,44 ± 1,37	2,52 ± 0,42**
Инсулин, пмоль/л	181,65 ± 11,91	173,77 ± 14,30

Примечание. Одна, две и три звездочки — статистическая достоверность различий при 90, 95 и 99% уровнях значимости соответственно.

представлены в табл.1. Обнаруженные различия в активности исследуемых ферментов лимфоцитов периферической крови у здоровых людей и лиц, часто и длительно болеющих ОРЗ, позволяют оценить физиологическое состояние иммунокомпетентных клеток. Так, снижение активности Г-6-ФДГ — ключевого фермента пентозофосфатного цикла — может привести к меньшему образованию НАДФН и рибозо-5-фосфата — важных компонентов для многих синтетических процессов (синтеза РНК, ДНК, липидов и др.) [8,9]. Ингибирование прямой и обратной реакции ЛДГ, с одной стороны, свидетельствует об ослаблении способности иммунокомпетентных клеток у лиц, часто и длительно болеющих ОРЗ, метаболизировать эндогенный лактат при аэробном дыхании, с другой — о снижении возможности окисления цитоплазматического НАДН, что может вести к постоянному ингибированию гликолиза на уровне гексокиназы и фосфофруктокиназы [8,13]. Нарушение обмена веществ в цитоплазме может отражаться на внутримитохондриальных процессах, ингибирование которых и выявляется через понижение уровня прямой реакции МДГ. О недостаточной активности внутримитохондриальных процессов дополнительно свидетельствует ингибирование окислительного дезаминирования глутамата НАД-ГДГ. Необходимо отметить, что окисление глутамата и малата влияет на процессы окислительного фосфорилирования [8]. Следовательно, изменение метаболических реакций в лимфоцитах у лиц, часто и длительно болеющих ОРЗ, ведет к изменению синтетических и энергетических процессов, в результате нарушается общее физиологическое состояние клеток.

Содержание гормонов в крови у обследованных находилось в пределах физиологической нормы (см. табл. 1). Однако у лиц, часто и длительно болеющих ОРЗ, выявлена более низкая концентрация ТГ и СТГ.

Для изучения взаимосвязи между содержанием гормонов и активностью НАД(Ф)-зависимых дегид-

рогеназ лимфоцитов использовалась модель множественной линейной регрессии (табл. 2). Уравнения регрессии рассчитывали для каждого фермента (зависимая переменная), в качестве влияющих переменных — концентрация гормонов в сыворотке крови. Статистическую достоверность коэффициентов множественной регрессии подсчитывали с помощью критерия Фишера [7]. Наиболее значимым показателем регрессионной модели принимался тот показатель, у которого коэффициент регрессии по критерию Фишера имел максимальный статистический вес.

Анализ уравнений регрессии показал, что наибольшее влияние на активность исследованных ферментов оказывают гормоны щитовидной железы (см. табл. 2). Возможно, это связано с тем, что воздействию Т<sub>4</sub> и Т<sub>3</sub> на процессы обмена веществ многообразно: модуляция углеводного, липидного и белкового обмена [9,10]. Однако на активность одного и того же фермента у здоровых людей и лиц, часто и длительно болеющих ОРЗ, наибольшее влияние оказывают разные гормоны. Только при обратной реакции ЛДГ в качестве зависимой переменной Т<sub>3</sub> является основным влияющим показателем и у здоровых людей, и у лиц, часто и длительно болеющих ОРЗ. Но в данном случае у последних наблюдается инверсия знака коэффициента регрессии. Следовательно, если у здоровых людей регрессионная модель выявляет ингибирующее влияние Т<sub>3</sub> на активность обратной реакции ЛДГ, то у лиц, часто и длительно болеющих ОРЗ, с увеличением концентрации гормона в крови уровень данной реакции в лимфоцитах возрастает. Анализ зависимостей активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов от содержания гормонов в крови позволяет обнаружить и другие случаи изменения знака коэффициентов множественной регрессии. Например, уровни МДГ, НАДФ-МДГ, обратных реакций ЛДГ и МДГ у здоровых людей и лиц, часто и длительно болеющих ОРЗ, изменяются противоположно под влиянием Т<sub>4</sub>, Т<sub>3</sub> и ТГ. Константу модели множест-

Регрессионная зависимость активности дегидрогеназ лимфоцитов от уровня гормонов в крови у здоровых людей (в числителе) и лиц, часто и длительно болеющих ОРЗ (в знаменателе)

Показатель	B <sub>0</sub>	B <sub>m</sub>					
		T <sub>4</sub>	T <sub>3</sub>	TГ	кортизол	СТГ	инсулин
Г-6-ФДГ	15,02	0,02	-4,42	0,03*	-0,01	-0,02	-0,02
	-1,65	0,06*	-2,39	0,03	0,01	0,18	-0,01
Г-3-ФДГ	7,88	-0,01	-0,17	-0,02	-0,01*	-0,03	-0,01
	0,66	0,01	-1,34*	0,01	0,01	0,20	0,01
Прямая реакция:							
ЛДГ	98,07	-0,05	-18,15*	-0,07	0,01	-0,58	-0,08
	-4,00	0,25*	-16,65	0,55	0,00	3,51	-0,03
МДГ	177,03	-0,07*	68,12	-0,19	-0,19	0,61	-0,06
	112,18	0,17	-38,10]	1,21	-0,03	4,08	-0,20*
НАДФ-МДГ	54,34	-0,23*	11,86	-0,06	0,01	-0,38	-0,04
	30,81	0,07	-24,34*	0,13	0,02	3,40	-0,02
НАДФ-ГДГ	9,38	-0,01	-0,14	-0,01	0,00	-0,05	-0,02*
	-0,45	0,00	3,63	-0,12*	0,01	1,55	-0,01
НАД-ГДГ	87,54	0,04	-9,50	-0,25	-0,06*	-0,24	-0,04
	-1,97	0,04	6,00*	-0,05	-0,01	0,99	0,01
Обратная реакция:							
ЛДГ	600,1	1,93	-266,3*	-0,34	-0,20	-1,80	-0,79
	153,6	-1,30	152,1*	1,55	-0,26	6,66	-0,13
МДГ	501,0	1,61	-163,6*	-0,41	-0,09	-2,78	-0,41
	573,8	-1,44	21,63	1,49	-0,32*	-4,56	-0,23

Примечание. B<sub>0</sub> — константа регрессии; B<sub>m</sub> — коэффициент множественной регрессии. Звездочкой отмечены наиболее значимые показатели в регрессионной модели.

венной регрессии можно трактовать как исходный уровень активности ферментов при отсутствии регуляторных воздействий исследуемых гормонов. В этом случае у лиц, часто и длительно болеющих ОРЗ, начальный уровень активности ферментов лимфоцитов ниже, чем у здоровых людей (за исключением обратной реакции МДГ).

Выявленный нами характер влияния исследуемых гормонов на активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов у лиц, часто и длительно болеющих ОРЗ, не всегда соответствовал описанному в литературе. Известно, что под воздействием T<sub>3</sub> возрастает экспрессия генов НАДФ-МДГ и митохондриальной Г-3-ФДГ (ФАД-зависимой), участвующей в α-глицерофосфатном водородном шунте митохондрий [10—12]. При этом если отрицательные коэффициенты регрессии между T<sub>3</sub> и Г-3-ФДГ у здоровых людей и лиц, часто и длительно болеющих ОРЗ, отражают физиологически нормальный ответ клеток на воздействие (активация α-глицерофосфатного шунта происходит за счет повышения уровня восстановления диоксиацетонфосфата до глицерол-3-фосфата цитоплазматической Г-3-ФДГ и ингибирования реакции окисления глицерол-3-фосфата [8], по которой определяли активность фермента в исследовании), то отрицательная регрессия между T<sub>3</sub> и НАДФ-МДГ у лиц, часто и длительно болеющих ОРЗ, выражает нефизиологическую взаимосвязь данных показателей, так как увеличение экспрессии гена должно приводить к активации фермента, что и определяется у здоровых людей положительным знаком коэффициента регрессии. Дальнейший анализ уравнений множественной регрессии позволит выявить и другие примеры различий модулирующего влияния исследуемых гормонов на активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ лим-

фоцитов у здоровых людей и лиц, часто и длительно болеющих ОРЗ. По этому поводу можно высказать два предположения. Во-первых, к настоящему времени на лимфоцитах выявлены рецепторы практически ко всем гормонам и медиаторам организма [3,9]. В то же время в нашем исследовании для построения регрессионной модели использовано содержание лишь нескольких основных гормонов. Во-вторых, частая антигенная стимуляция лимфоцитов вызывает изменения их метаболизма, что и выявляется, в частности, при исследовании активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ. Возможно, что выявленные и невыявленные нарушения в обмене веществ иммунокомпетентных клеток у лиц, часто и длительно болеющих ОРЗ, и приводят к неадекватному ответу на воздействие гормонов (в сравнении со здоровыми людьми). К сожалению, данное исследование не позволяет дифференцировать тот участок функциональной системы гормон—рецептор—вторичный мессенджер—эффektor—метаболический ответ, где могут быть нарушения, изменяющие ответ клеток на гормональные воздействия.

Таким образом, у здоровых людей и лиц, часто и длительно болеющих ОРЗ, обнаружены различия в величине некоторых гормональных показателей крови и в уровнях активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов. С нашей точки зрения, снижение уровней исследуемых НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ иммунокомпетентных клеток у лиц, часто и длительно болеющих ОРЗ, может быть отражением нарушений обмена веществ как в клетках иммунной системы в частности, так и в организме в целом. При помощи уравнений множественной регрессии выявлены нарушения гормональной регуляции активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов, что отражает нарушение взаимосвязей

между иммунной и эндокринной системой. Изменение обмена веществ иммунокомпетентных клеток и регуляторных влияний эндокринной системы является, возможно, основной причиной снижения иммунореактивности (увеличивается склонность к частым ОРЗ у обследуемых). Поэтому для повышения иммунореактивности организма лиц, часто и длительно болеющих ОРЗ, необходимо не только использовать иммунокорректирующие методы, определяющие выброс в кровь дополнительного числа метаболически слабых лимфоцитов, но и проводить терапию, активирующую обменные процессы в организме.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Дильман В. М., Нисевич Н. И., Зубикова И. И. и др. // Пробл. эндокринол. — 1987. — № 6. — С. 32—37.
2. Мальев Л., Диас Х. В., Гонсалес-Григо А. // Лаб. дело. — 1977. — № 1. — С. 7—9.
3. Петров Р. В. Иммунология. — М., 1987.
4. Подосинников И. С., Чухловина М. Л. // Иммунология. — 1986. — № 4. — С. 30—38.
5. Рагимов А. А., Байрамалибейли И. Э. // Лаб. дело. — 1985. — № 7. — С. 405—408.
6. Савченко А. А., Сугцова Л. Н. // Там же. — 1989. — № 11. — С. 23—25.
7. Славин М. Б. Методы системного анализа в медицинских исследованиях. — М., 1989.
8. Строев Е. А. Биологическая химия. — М., 1986.
9. Теппермен Дж., Теппермен Х. Физиология обмена веществ и эндокринной системы. — М., 1989.
10. Brent G. A., Moore D. D., Larsen P. R. // Ann. Rev. Physiol. — 1991. — Vol. 53. — P. 17—37.

11. Khawaja Y., Dobnig H., Shapiro L. E., Surks M. J. // Endocrinology. — 1990. — Vol. 127, N 1. — P. 387—393.
12. Ness G. C., Pendleton L. C. // FEBS Lett. — 1991. — Vol. 288, N 1—2. — P. 21—23.
13. Pettersson G. // Europ. J. Biochem. — 1990. — Vol. 194, N 1. — P. 141—146.

Поступила 08. 05. 93

#### ACTIVITY OF NAD(P)-DEPENDENT LYMPHOCYTE DEHYDROGENASES AND CONTENT OF SOME HORMONES IN THE BLOOD OF HEALTHY PERSONS AND PATIENTS WITH FREQUENTLY RECURRENT ACUTE RESPIRATORY DISEASES

A. A. Savchenko, S. A. Dogadin, K. G. Nozdrachev

Institute of the North Medical Problems, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Krasnoyarsk

The activity of NAD(P)-dependent lymphocyte dehydrogenases and their correlation with the blood levels of hormones was studied in healthy individuals and patients with frequently recurrent acute respiratory diseases. There were decreases in the activity of glucose-6-phosphate-, malate-, NAD-dependent glutamate dehydrogenases and direct and reverse reactions catalyzed by lactate dehydrogenase. In the blood of the examinees, the content of the hormones was similar to the physiological values; however, a decrease in content of thyroglobulin and somatotropin was found in the patients with acute respiratory disease. A model of multiple linear regression was applied to study the interrelationships between the content of hormones and the activity of the NAD(P)-dependent lymphocyte dehydrogenases. Dissimilar alterations in the activity of these enzymes and in their correlation with the content of hormones as compared with those in healthy persons suggest that decreased rates of immunoreactivity in the patients with acute respiratory disease determined by impairments in immunocompetent cell metabolism and in relationships between the immune and the endocrine systems.