

ТОМ 41

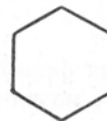
ВЫПУСК 5

СЕНТЯБРЬ—ОКТАБРЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор **С. С. ДЕБОВ**

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

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

ТУРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)
ТЯХЕПЫЛД Л. Я. (Гарту)
ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)

Адрес редакции журнала:

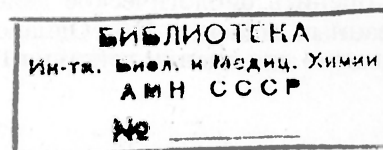
109801, Москва, Солянка, 14, РАМН

Тел. 917-16-44

Зав. редакцией *Э. А. Половинко*



МОСКВА · МЕДИЦИНА · 1995



В. Н. ТИТОВ

**КРУГООБОРОТ ХОЛЕСТЕРИНА В ТРАНСПОРТЕ ТРИГЛИЦЕРИДОВ
И ДЕЙСТВИЕ ПРОБУКОЛА**

Институт клинической кардиологии КНЦ РАМН, Москва

Более 20 лет назад французские химики синтезировали вещество, названное ими “пробукол” (Пб) [13, 42]. В дальнейшем экспериментальные и клинические исследования показали, что Пб влияет на транспорт липидов в крови животных и человека, снижая содержание холестерина (Хс) [11, 17, 47]. Пб понижает уровень Хс в крови у пациентов с семейной (гомо- и гетерозиготной) гиперлиппротеинемией (ГЛП) [26, 31], способствуя регрессии ранее образованных ксантом [15, 76]. Препарат выпускают несколько фармацевтических фирм, в том числе и в России, используя торговое название “Фенбутол” [5, 37].

Несмотря на длительное применение в клинике, механизм действия Пб остается непознанным [2]. Установлено, что Пб ингибирует синтез Хс [4], увеличивает скорость катаболизма липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) [16], повышает экскрецию желчных кислот [50, 62]. Пб стимулирует поглощение клетками ЛПНП, клиренс биологически модифицированных ЛПНП [16, 58]. Препарат обладает свойствами антиоксиданта [23, 63] и предотвращает в макрофагах накопление модифицированных ЛПНП [19, 35]. Пб изменяет липидный состав липопротеидов промежуточной плотности (ЛППП), ЛПНП и липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) [29, 51], ингибирует синтез всех апобелков, за исключением апоЕ [7, 9], активирует переход эфирив холестерина (ЭХ) от ЛПВП-2а к ЛППП [22, 54] и не оказывает влияния на активность ферментов липолиза [40]. Еще более неясным стало действие Пб после того, как было предложено отдельно рассматривать его влияние на транспорт липидов, перекисное окисление и атерогенез [57]. Столь разнообразное влияние Пб на обмен липопротеидов (ЛП) требует логического осмысления. Детальный анализ накопленной информации с принципиально новых позиций даст нам основание полагать, что многочисленные аспекты действия Пб на транспорт липидов являются по сути следствием единого механизма.

Для понимания действия Пб, по нашему мнению, рационально рассмотреть химическое строение его молекулы, фармакокинетику препарата в экспериментах на животных и у пациентов с ГЛП, оценить биологическое действие модифицированных молекул Пб. Однако главное, что необходимо для оценки действия Пб, это понять,

какова роль ЭХ в транспорте в кровотоке триглицеридов (Тг).

Пб представляет собой [бис (3,5-терт-бутил-4 гидроксифенилтио) пропан] [13]. Для молекулы Пб характерна высокая степень гидрофобности (липофильности) и низкая реакционноспособность. Два гидроксила в молекуле Пб в пространстве полностью экранированы тетраметильными группами и, находясь глубоко внутри молекулы, в химическое взаимодействие практически вступать не могут. В узкую щель в молекуле Пб до гидроксильных групп могут добраться только очень малые молекулы, в частности активные формы кислорода. Согласно химическому строению, Пб действительно обладает свойствами антиоксиданта [55], однако в силу гидрофобности Пб его действие как антиоксиданта *in vivo* является крайне ограниченным.

Основная масса Пб у человека и животных экскретируется с желчью в неизменном виде [17, 47]. В то же время на модельных системах *in vitro* удастся продемонстрировать инактивацию Пб активных форм кислорода [63]. Следовательно, действие Пб на перекисное окисление липидов *in vivo* и *in vitro* не является идентичным. Это дало авторам основание характеризовать в клинике действие Пб только как потенциального антиоксиданта.

Экспериментальные исследования показали, что гипохолестеринемическое действие Пб связано с высокой степенью его гидрофобности. Модификация молекулы Пб при удалении из нее двух метильных групп [4] и атома серы [52], которые в химическом отношении являются инертными, лишает препарат гипохолестеринемического действия. Следовательно, снижение степени гидрофобности молекулы лишает Пб активности. Высокая гидрофобность Пб определяет и его низкую биодоступность: он лишь в незначительной степени всасывается в кишечнике, но этот процесс можно усилить путем добавления в пищу жиров [17, 47]. Низкая биодоступность и высокая гидрофобность Пб определяют все параметры его фармакокинетики [1]. Поступив в энтероциты, Пб включается в липидную фазу Тг и покидает энтероциты в составе насцентных хиломикрон (н-ХМ). н-ХМ, с функциональной точки зрения являются контейнером для экзогенных Тг [74]. В гепатоцитах Пб, как и Тг, ста-

новится компонентом н-ЛПОНП (контейнер для эндогенных Тг). Далее в ходе метаболических превращений, происходящих в кровотоке, Пб из н-ЛПОНП через ЛПОНП оказывается в ЛПНП.

Несмотря на то что пациенты принимают Пб в больших дозах (до 1 г/сут), содержание его в крови нарастает медленно. Стабильная концентрация Пб достигается в крови не ранее чем через 2—4 нед от начала приема препарата [1]. Одновременно с ЛП крови накопление Пб происходит и в жировой ткани [59]. При этом, по нашим данным, чем в большей степени увеличена масса тела, тем более медленно нарастает в крови содержание Пб [79]. Пб присутствует в жировой ткани пациентов даже через 6 мес после отмены препарата [46]. Однако важен также тот факт, что после отмены Пб терапевтическая концентрация препарата в крови сохраняется на протяжении 4—5 мес [1]. Это требует осмысления, поскольку в крови нет ни белков, ни клеточных элементов, которые пребывали бы в ней столь длительное время и с которыми мог бы связаться Пб. Реальным объяснением происходящему может явиться только феномен рециркуляции Пб между тканями и ЛП крови.

Практически важно проследить в кровотоке распределение Пб между отдельными классами ЛП. Если в энтероцитах в составе н-ХМ весь Пб встраивается в жидкокристаллическую фазу из Тг, то в процессе метаболических превращений апоВ-100 ЛП в кровотоке он перераспределяется между ЛП пропорционально содержанию в них не Тг, а ЭХ. Пропорционально концентрации ЭХ наиболее низкая концентрация Пб определяется в насцентных липопротеидах очень низкой плотности (н-ЛПОНП), ЛПОНП, более значительная — в ЛППП и более 70% препарата структурировано в ЛПНП [30]. В ЛПВП содержание Пб также пропорционально концентрации ЭХ и составляет 13—15% от общего его количества в кровотоке. В жировой ткани накопление Пб происходит одновременно с депонированием в ней ЭХ. Это связано с тем, что только в адипоцитах накопление Тг происходит в форме липопротеидных комплексов, содержащих ЭХ [65].

С учетом химического строения Пб, его низкой реакционной способности и высокой степени гидрофобности, данных фармакокинетики и распределения препарата среди ЛП и в жировой ткани мы имеем основания полагать, что действие Пб в транспорте Тг в кровотоке сходно той функции, которая присуща функциональной роли ЭХ. Однако, какова же роль ЭХ в транспорте Тг? Согласно имеющимся в литературе данным [72], функциональное значение ЭХ в транспорте Тг определено только тем, что они являются единственной эндогенной липидной молекулой, обладающей большей степенью гидрофобности, чем Тг. Как же реализуется действие ЭХ?

Основным апобелком, переносимым в кровотоке гидрофобные Тг, является апоВ-100 [20]. Первичная структура этой гигантской молекулы в кровотоке предопределяет собой все превращения ЛПНП [73]. Основная функция апоВ-100

состоит в транспорте к тканям Тг. В гепатоцитах апоВ-100 формируют н-ЛПОНП, белок-липидный комплекс (БЛК), состоящий из жидкокристаллической массы Тг. В составе н-ЛПОНП фосфолипиды (ФЛ) и Хс являются компонентами только поверхностного монослоя; ЭХ практически отсутствуют. Как и все липидсвязывающие белки, молекула апоВ-100 обладает свойством амфифильности. Амфифильность — важное свойство апобелков, согласно которому первичную структуру аполипопротеинов определяет ДНК, а вторичную — характер гидрофобного окружения, т. е. степень контакта с липидами [6]. В ходе формирования н-ЛПОНП в гепатоцитах молекула апоВ-100, контактируя с массой Тг, как и все другие апобелки, принимает форму диска, одна сторона которого становится гидрофобной, а другая — гидрофильной. На гидрофобной стороне апоВ-100 структурирует Тг; на гидрофильной же стороне молекулы расположен рецепторсвязывающий домен (участок полипептидной цепи), предназначенный для взаимодействия с апоВ-100-рецептором клеток. В контакте с Тг на гидрофобной стороне апобелка формируются α -спиральные цепи, которые и структурируют массу Тг. В результате образования α -структур диск изгибается в гидрофобную сторону. В этих условиях гидрофильная сторона молекулы становится вогнутой и сигнальный домен (лиганд) апоВ-100 оказывается расположенным в глубокой щели. Наличие щели в структуре апоВ-100 ЛП показано методом электронной микроскопии [21]. В силу такого расположения в структуре всех триглицеридбогатых ЛП сигнальный домен апоВ-100 оказывается недоступным для взаимодействия с апоВ-100-рецептором. Чем больше в н-ЛПОНП структурировано Тг, тем в большей степени сигнальный домен апоВ-100 оказывается недоступным. Поскольку в гидратированной среде гидрофобная масса Тг всегда принимает шарообразную форму, н-ЛПОНП представляет собой округлые образования. Следует заметить, что в химии белка конформация с образованием щелевых структур свойственна многим макромолекулам, не имеющим отношения к транспорту липидов. Именно в силу такой конформации апоВ-100 белком-вектором всех триглицеридбогатых ЛП является апоЕ. АпоЕ формирует индивидуальный БЛК и ассоциируется с н-ЛПОНП в кровотоке. В результате ассоциации н-ЛПОНП и апоЕ БЛК н-ЛПОНП превращается в ЛПОНП.

Гидролиз Тг ЛПОНП в кровотоке осуществляют два липолитических фермента с разными кинетическими свойствами: постгепариновая липопротеидлипаза (ЛПЛ) и печеночная триглицеридгидролаза (ТГГ). Необходимость двух ферментов гидролиза Тг предопределена свойствами молекулы апоВ-100. Структурированная в ЛПОНП масса Тг функционально подразделена на 2 зоны: наружную и внутреннюю. Гидролиз Тг наружной (транспортной) зоны не приводит к конформационным изменениям молекулы апоВ-100; липолиз же во внутренней (структурной) зо-

не вызывает изменение формы молекулы апоВ-100. Тг наружной зоны ЛПОНП гидролизует постгепариновая ЛПЛ: гидролиз проходит в условиях избытка субстрата. В результате полного гидролиза Тг транспортной зоны формируются ЛППП. Конформация молекулы апоВ-100 в образующихся ЛППП не меняется; белком-вектором ЛППП по-прежнему является апоЕ [72].

В отличие от ЛПОНП гидролиз Тг в ЛППП происходит в специфических условиях эквивалентного замещения Тг на ЭХ. На этом этапе липолиза в ЛППП происходит замещение жидкокристаллической фазы из Тг на более гидрофобную фазу из ЭХ. В этих условиях гидролиз Тг в ЛППП зависит в первую очередь не от активности печеночной ТГГ, а от количества поступающих в ЛППП ЭХ. При этом печеночная ТГГ гидролизует Тг в условиях дефицита субстрата.

Замещение Тг на ЭХ происходит эквивалентно, ЭХ требуется много, поэтому в ЛППП переходит практически вся масса ЭХ, содержащихся в ЛППП-2а. В ходе этого перехода в ЛППП взамен жидкокристаллической фазы из Тг формируется более гидрофобная и меньшего размера фаза из ЭХ. Значительные изменения липидного состава ЛППП приводят к конформационным изменениям молекулы апоВ-100. При этом гидрофобная сторона молекулы апоВ-100 вынуждена соприкасаться со значительно меньшей по диаметру сферической гидрофобной фазой из ЭХ и вынуждена прогибаться в обратном направлении, окружая собой жидкокристаллическую фазу из ЭХ. При этом гидрофильная сторона молекулы апоВ-100 вместо вогнутой приобретает выпуклую форму. В результате этого расположенный на ней апоВ-100-домен-вектор впервые появляется на поверхности ЛП-частиц и становится способным взаимодействовать с апоВ-100-рецептором. В этот момент и образуются ЛПНП. Следовательно, для превращения ЛППП в ЛПНП, которые единственные из ЛП способны взаимодействовать с апоВ-100-рецептором клеток, необходимо поступление в ЛППП большого количества ЭХ. Переход ЭХ (переход, а не перенос) происходит из ЛПВП-2а [71].

Следует заметить, что в транспорте Тг переход ЭХ от ЛПВП-2а к ЛППП является *locus minoris resistantiae* и подвержен влиянию разных по этиологии патологических процессов. Если переход ЭХ к ЛППП нарушается, замещение Тг в ЛППП происходит не полностью. При этом сигнальный домен (лиганд) апоВ-100 не появляется на поверхности и взаимодействовать со специфичным рецептором клеток не может; в кровотоке накапливаются ЛППП [10]. При этом содержание ЭХ в массе ЛППП значительно увеличивается, но одновременно содержание ЭХ в каждом ЛП оказывается сниженным, а остаточное содержание Тг — повышенным. Если при IIa типе ГЛП нарушение взаимодействия ЛПНП—рецептор определено дефицитом рецепторов, то при ГЛП IIб типа оно обусловлено дефицитом лиганда. Следовательно, во всех ситуациях, когда остаточное содержание Тг в ЛПНП превышает физиологи-

чески допустимое, ЛПНП не могут взаимодействовать с рецепторами плазматической мембраны клеток. При блокаде переноса ЭХ от ЛПВП-2а к ЛППП для восстановления физиологического поглощения ЛПНП клетками необходимо всего-навсего заместить Тг в ЛПНП на более гидрофобную субстанцию. Это и делает Пб прямым и косвенным образом.

Действие Пб на удаление из ЛПНП остаточного количества Тг происходит следующим образом. С одной стороны, Пб, содержащийся в н-ЛПОНП, а позже и в ЛППП, уже сам по себе замещает часть Тг в ЛПНП. При этом наличие в жидкокристаллической фазе ЛПНП Пб, более гидрофобного, чем ЭХ, позволяет достичь необходимой для конформации апоВ-100 степени гидрофобности даже при некотором остаточном содержании Тг. Возросшая гидрофобность жидкокристаллической фазы ЛПНП заставляет молекулу апоВ-100 принять активную конформацию и восстанавливает процесс физиологической специфической интернализации ЛПНП клетками. С другой стороны, Пб активирует сам переход ЭХ от ЛПВП-2а к ЛППП. Это связано с тем, что Пб, содержащийся в ЛПВП-2а в виде фазы ЭХ + Пб, делает фазу значительно более гидрофобной. Возросшая гидрофобность фазы ЭХ + Пб и обеспечивает активный переход массы ЭХ от ЛПВП-2а к ЛППП. Следовательно, при IIб типе ГЛП Пб восстанавливает специфичный путь поглощения клетками ЛПНП. Однако влияние Пб является не более чем заместительным, так как оно не устраняет действия фактора(ов), блокирующего переход ЭХ на этапе от ЛПВП-2а к ЛППП.

Пб способен снизить содержание ЛПНП в крови у пациентов с гомо- и гетерозиготной ГЛП IIa типа, а также у кроликов линии Ватанабе [25, 75]. У животных этой линии в клетках снижено содержание апоВ-100-рецепторов и даже таковые отсутствуют. При IIa типе ГЛП липидный состав ЛПНП не нарушен и домен-вектор апоВ-100 всегда доступен для взаимодействия. При гомозиготной ГЛП и у кроликов линии Ватанабе Пб также активно включается в ЛПНП, но уже в жидкокристаллическую фазу из ЭХ. Присутствие Пб повышает гидрофобность фазы ЭХ + Пб в части ЛПНП выше физиологически оптимальной, что побуждает молекулу апоВ-100 принять нефизиологичную (патофизиологическую) конформацию. Следовательно, в результате присутствия Пб в ЛПНП в составе жидкокристаллической фазы из ЭХ ЛПНП становятся патологическими вследствие нарушения липидного состава и конформации апоВ-100. Однако при нарушении белковой или липидной структуры ЛПНП клетки также их активно поглощают, но уже путем неспецифического взаимодействия со сквенджер-рецепторами (рецепторами-мусорщиками) [18]. Таким образом, у пациентов со IIa типом ГЛП и кроликов линии Ватанабе гипохолестеринемическое влияние Пб связано с активацией неспецифичной интернализации ЛПНП [49]. Следовательно, у пациентов с полигенной ГЛП (IIб ти-

па) Пб активирует как специфичный, так и неспецифичный пути поглощения клетками ЛПНП, а у пациентов с семейной гомозиготной ГЛП IIa типа можно активизировать только неспецифичный путь поглощения. Это различие в действии Пб находит отражение и в его клинической эффективности [3, 25].

Следует, однако, заметить, что далеко не все клетки в организме способны поглощать ЛПНП. В принципе, неспецифичное поглощение ЛПНП свойственно далеко не тем клеткам, которые специфично поглощают ЛПНП при взаимодействии с апоВ-100-рецепторами. Таким образом, Пб в клинических ситуациях при IIa и Пб типе ГЛП способствует нормализации транспорта Тг, активируя поглощение клетками ЛПНП — пустых контейнеров от Тг. В обоих случаях ГЛП концентрация ЛПНП, содержание апоВ и Хс ЛПНП в крови пациентов понижаются, а содержание ЭХ в клетках возрастает. Нормализуя поступление в клетки ЛПНП, Пб, естественно, снижает в них синтез Хс.

Исходя из химического строения молекулы, Пб действительно является антиоксидантом [13, 55]. Однако в силу его выраженной гидрофобности и локализации в гидрофобной жидкокристаллической фазе из ЭХ, влияние Пб как антиоксиданта является минимальным. К тому же все генерированные клетками активные формы кислорода находятся в гидратированной гидрофобной среде плазмы крови. По нашему мнению, действие Пб как антиоксиданта в условиях *in vivo* является иным. Следует заметить, что во всех экспериментальных и клинических наблюдениях активность ПОЛ оценивали по накоплению продуктов реакции. При такой оценке сниженное образование продуктов реакции может в одинаковой степени быть следствием как инактивации Пб активных форм кислорода, так и его действия, направленного на снижение количества субстрата перекисного окисления. В условиях *in vivo* именно высокая степень гидрофобности Пб и составляет основу его антиоксидантного действия. Нормализуя липидный состав ЛПНП, снижая в кровотоке содержание ЛПНП с большим остаточным количеством Тг и активируя поглощение ЛПНП клетками, Пб “убирает” из кровотока ту фракцию ЛПНП, которая и является субстратом ПОЛ [27]. Чем менее зрелыми являются ЛПНП, чем больше в них остаточное количество Тг и выше их содержание, чем дольше они находятся в кровотоке, тем более активно происходит модификация ЛПНП путем компенсаторного повышения нейтрофилами и макрофагами продукции активных форм кислорода. Следовательно, повышение в таких условиях активности ПОЛ является компенсаторным процессом.

Само по себе ПОЛ, в том числе и в структуре ЛПНП, является физиологическим процессом. ПОЛ активируют макрофаги и нейтрофилы, и это является одной из сторон их физиологического действия [23]. Они реализуют его, в частности, и в процессе удаления из кровотока

слишком долго циркулирующих ЛПНП [24]. Следовательно, активация ПОЛ в условиях ГЛП является вторичным, компенсаторным процессом.

В результате активации физиологического превращения ЛППП → ЛПНП и восстановления поглощения их клетками процесс перекисного окисления оказывается лишенным своего субстрата; активность ПОЛ значительно снижается. Таким образом, в условиях *in vivo* Пб ингибирует ПОЛ путем понижения количества субстрата реакции. Доказательством сказанному являются наблюдения А. Н. Климова, в которых введение кроликам ЛПВП-2а, выделенных из крови здорового человека, снижало в крови активность ПОЛ [45]. Естественно, что ЛПВП-2а лишены возможности непосредственно воздействовать на активные формы кислорода. По сути же дела, ЭХ от ЛПВП-2а доноров быстро переходили в состав ЛППП, нормализовали их липидный состав и активировали поглощение клетками образцованных ЛПНП. Однако, если бы исследователи использовали фракцию ЛПВП-2а, полученную не от доноров, а от пациентов с Пб типом ГЛП, такого результата бы не было. Действие Пб на обмен липидов не связано с антиоксидантной защитой, поскольку такое действие не свойственно эндогенным антиоксидантам и витамину Е [12]. Следовательно, при Пб типе ГЛП, восстанавливая рецепторное поглощение клетками ЛПНП, Пб одновременно оказывает гипохолестеринемическое, антиоксидантное действие, снижает накопление в макрофагах модифицированных форм ЛПНП, ингибирует в клетках синтез Хс.

В результате поглощения клетками ЛПНП специфичным или неспецифичным путем в них формируются два пула внутриклеточного Хс: один — синтезированный *in situ de novo*, второй — транспортный, чуждый клетке пул Хс, поступивший в нее в составе ЛПНП. Транспорт из клетки второго пула Хс и составляет функциональную роль ЛПВП. Различие первичной структуры апоВ-100- и апоА-белков является основой того, что в переносе Хс от клеток участвуют несколько апобелков. В порядке возрастания степени гидрофобности апобелки задействованы в транспорте Хс от клетки: апоА-IV, апоА-II, апоА-I [71]. На первом этапе Хс диффундирует в гидратированную среду кровотока, где его акцептируют апоА-I БЛК (н-ЛПВП) или апоА-IV БЛК. Акцептировав Хс, апоА-IV БЛК ассоциируется с апоА-II БЛК и формируют ЛПВП-3. В составе ЛПВП-3 и происходит этерификация Хс; при этом образованные ЭХ накапливаются в ЛПВП-2а, которые сформированы апоА-I. Физиологически ЭХ, содержащиеся в ЛПВП-2а, предназначены для их перехода к ЛППП, т. е. для участия в транспорте Тг [70]. Следовательно, транспорт Хс в составе ЛПВП является функциональным звеном транспорта к клеткам Тг и частью функционального цикла кругооборота Хс в транспорте Тг [38, 80].

По нашему мнению, Хс в транспорте Тг выполняет вспомогательную роль, совершая кругооборот в функциональном цикле. В ходе этого цикла Хс совершает кругооборот по пути: ЛППП → ЛПНП → клетка → гидратированная среда кровотока → ЛПВП-3 → ЛПВП-2а → → ЛППП [79]. Активируя поглощение клетками ЛПНП, Пб осуществляет важную физиологическую функцию — он восстанавливает кругооборот Хс в функциональном цикле и, таким образом, нормализует транспорт Тг. Естественно, что в условиях восстановленного транспорта Тг нормализуются все процессы метаболизма ЛП. Именно восстановление циркуляции Хс в функциональном цикле и нормализация транспорта Тг объясняют столь широкий спектр влияния Пб.

В результате восстановления Пб циркуляции Хс на этапе ЛППП → ЛПНП → → клетка в ЛПВП также происходят существенные изменения. Для Пб является характерным снижение содержания Хс ЛПВП. Действительно, ускоряя кругооборот Хс в функциональном цикле, Пб тем не менее снижает содержание ЭХ только в ЛПВП-2а [33]. Это связано с тем, что именно из этого класса ЛП препарат активирует переход ЭХ к ЛППП [8].

Ускоряя кругооборот Хс в функциональном цикле, Пб активирует и процесс его этерификации в составе ЛПВП-3. Увеличивая поступление субстрата этерификации, Пб повышает образование ЭХ, которые накапливаются в ЛПВП-2а, контейнерах для ЭХ [68]. Увеличивая количество ЭХ, перешедших в ЛППП, Пб активирует в них липолиз, делая Тг ЛППП доступными для действия печеночной ТГГ. Пропорционально переходу ЭХ от ЛПВП-2а к ЛППП в обратном направлении, в более гидрофильную среду ЛПВП-2а, переходят не Тг, а продукты их липолиза в ЛППП, а именно ди- и моноацилглицериды [61]. В результате такого перехода в ЛПВП-2а возрастает содержание глицеридов и они превращаются в ЛПВП-2б. Далее с ЛПВП-2б ассоциируются апоС-III БЛК, после чего печеночная ТГГ гидролизует глицериды полностью [64]. По окончании гидролиза ЛПВП-2б распадаются с образованием апоС-III БЛК и н-ЛПВП. Следовательно, Пб усиливает кругооборот апоА-I в его малом функциональном цикле: н-ЛПВП → ЛПВП-3 → → ЛПВП-2а → ЛПВП-2б → н-ЛПВП, что в опытах *in vivo* с мечеными изотопами дает результаты, которые можно расценить как снижение синтеза апоА-I [39]. Одновременно высказано мнение, что снижение содержания в крови апоА-I является следствием усиления его катаболизма в ходе реверсивного транспорта Хс [39].

Функциональный цикл кругооборота Хс в транспорте Тг обязательно включает клетку. При этом в норме это только та клетка, которая имеет на плазматической мембране апоВ-100-рецепторы. Участие клетки в функциональном цикле необходимо потому, что на этапах ЛПВП-3 → → ЛПВП-2а → ЛППП → ЛПНП → клетка Хс циркулирует в форме ЭХ, а на этапах клетка → → н-ЛПВП → ЛПВП-3 — в форме свободного

Хс. Гидролиз же ЭХ является сложным процессом и может протекать только внутриклеточно.

В условиях активации функционального кругооборота Хс Пб увеличивает как поступление Хс в клетку, так и отток его из клетки [77]. Однако, будучи в клетке, по сути дела, инородным телом, каким же образом сам Пб покидает ее? Свободный Хс покидает клетку путем диффузии с мембраны в гидратированную среду кровотока. Для Пб это невозможно, так как растворимость его в плазме крови на порядок ниже, чем у Хс [1]. В силу этого Пб покидает клетку исключительно путем экзоцитоза. Однако даже внутри везикулы Пб продолжает пребывать в гидратированной среде. Поэтому, стремясь избавиться от Пб, клетка будет делать все возможное, чтобы снизить его гидрофобность. Этого можно достигнуть только одним путем: сформировать жидкокристаллическую фазу Пб + ЭХ. Естественно, что гидрофобность этой системы будет ниже, чем одного Пб. По нашему мнению, Пб покидает клетку путем экзоцитоза вместе с ЭХ. Следовательно, Пб как в норме, так и при патологии активирует отток Хс от клетки как в форме свободного стирола, так и ЭХ. Следует заметить, что Пб способен активно понижать уровень Хс и в крови здоровых кроликов и крыс и эффективность этого явления зависит от дозы препарата и длительности его скормливания [13, 62]. Эта способность фармакокинетики, свойственная только Пб, и определяет его способность резорбировать ранее образованные ксантомы [69].

Действительно, экспериментальные исследования показали, что Пб способен предотвращать формирование атеросклеротического поражения у кроликов, находящихся на атерогенной диете [44], и даже способствует регрессии ранее сформированных ксантом [78]. В клинических исследованиях у пациентов с ГЛП и ИБС Пб вызывал резорбцию атероматозных бляшек. Это действие проявлялось как у пациентов с ГЛП-IIa типа, так и у больных с полигенной формой ГЛП IIb типа [43], а также у кроликов линии Ватанабе [41].

В гидратированной среде кровотока комплекс Пб + ЭХ способен акцептировать только апоА-I и сформированные им н-ЛПВП. Оказавшись в структуре н-ЛПВП, Пб вместе с ЭХ последовательно перемещается по всем этапам функционального кругооборота Хс, а именно н-ЛПВП → ЛПВП-3 → ЛПВП-2а. Ключевым моментом в обмене ЛП являются накопление ЭХ в ЛПВП-2а и их переход к ЛППП. В условиях полигенной ГЛП IIb типа Пб не устраняет сам факт блокады перехода ЭХ от ЛПВП-2а к ЛППП, но значительно его облегчает. Это происходит в силу того, что в составе ЛПВП-2а гидрофобность фазы ЭХ + Пб значительно выше, чем одних ЭХ. В силу этого в момент соударения ЛППП и ЛПВП-2а в кровотоке более высокая гидрофобность фазы ЭХ + Пб позволяет преодолеть влияние блока и слиться с жидкокристаллической массой ЭХ + Пб в составе ЛППП. После ухода ЭХ в более гидрофильные условия ЛПВП-2а моно- и диацилглицериды переходят из не-

удобной для них гидрофобной среды ЛППП [61, 71]. Замещая собой ЭХ в ЛПВП-2а, Пб, естественно, способствует снижению содержания Хс ЛПВП. На это косвенно указывает изменение липидного состава ЛПВП, когда одновременно со снижением в них уровня Хс отношение фосфолипиды/белок в ЛПВП-2а не меняется [29, 78]. Однако основной причиной снижения содержания Хс ЛПВП является активизация перехода ЭХ от ЛПВП-2а к ЛППП. Чем более активно проходит этот процесс при действии Пб, тем в большей степени понижается содержание Хс ЛПВП. Возникает, с первого взгляда, парадоксальная ситуация: чем активнее идет обратное развитие ксантом, тем в большей степени понижается содержание Хс ЛПВП [57, 76]. Однако этот вопрос заслуживает отдельного обсуждения.

Замещая собой ЭХ в физико-химических белок-липидных взаимодействиях и ускоряя кругооборот Хс в функциональном цикле, Пб не оказывает влияния на метаболизм ЛП на этапах $n\text{-ХМ} \rightarrow \text{ХМ} \rightarrow n\text{-ЛПОНП} \rightarrow \text{ЛППП}$ [43, 67]. В силу этого при приеме препарата содержание в крови Тг практически не меняется или незначительно снижается за счет активации гидролиза Тг в ЛППП и глицеридов в ЛПВП-2б [40].

Восстанавливая функциональный кругооборот Хс и транспорт к клеткам Тг, Пб нормализует в них многие метаболические процессы, активация которых имеет компенсаторный характер [28, 39]. Так, при действии Пб у нейтрофилов и макрофагов отпадает необходимость активирования ПОЛ. Пб снижает адгезию мононуклеарных клеток крови на поверхности эндотелия [32, 34], ингибирует индуцированную митогенами активацию лимфоцитов, ослабляет процессы деструкции клеток и вторичную активацию в гепатоцитах синтеза интерлейкина-1 [14, 48]. Ускоряя кругооборот Хс в функциональном цикле, Пб активирует и процесс превращения Хс в желчные кислоты и способствует их экскреции [16].

В модельных системах показано прямое влияние Пб на процессы взаимодействия белок—липид. В системе с формированием дискообразных структур при взаимодействии апоС-III и димиристоилфосфатидилхолина Пб *in vitro* способствовал превращению дискоидальных структур в сферические [53]. Одновременно отмечено существенное различие в действии Пб *in vivo* и *in vitro*. Так, Nagano и соавт. [57, 58] считают, что гипохолестеринемическое действие препарата не удастся воспроизвести в экспериментах *in vitro*. Кроме того, отток Хс от клеток в экспериментах *in vivo* и *in vitro* оказывается различным [36]. Это косвенно указывает на то, что действие Пб в полной мере реализуется *in vivo*, когда он восстанавливает кругооборот Хс в его функциональном цикле. Косвенным подтверждением такого действия Пб является и то, что он не оказывает влияния на все процессы метаболизма липидов, не вовлеченные в функциональный кругооборот Хс.

Прямых данных, непосредственно указывающих на циркуляцию Пб в функциональном кругообороте Хс, пока нет. Однако в ранних ра-

ботах уже было обращено внимание на усиление при действии Пб клиренса ЛПНП. Вместе с тем в последнее время появились работы, которые косвенно подтверждают, что такая циркуляция вполне реальна. Так, у пациентов с врожденным отсутствием синтеза ЭХ, переносящего белок (ЭХПБ), не удается продемонстрировать никакие из сторон действия Пб [56]. В физиологических условиях именно ЭХПБ создает реальные условия для перехода ЭХ от ЛПВП-2а к ЛППП, стабилизируя ЭХ в гидратированной, гидрофобной среде ЛПВП-2а. Поэтому у всех пациентов и экспериментальных животных содержание ЭХПБ в крови при действии Пб оказывалось значительно повышенным. Последняя информация также подтверждает наше мнение, что функциональная роль ЭХ в транспорте Тг определена только высокой степенью их гидрофобности и заключается в модулировании конформационных изменений молекулы апоВ-100. Оказалось, что в структуре ЛПНП можно удалить все ЭХ и заменить их многоатомным полиненасыщенным спиртом до-лихолом. В условиях такой замены гидрофобного компонента функциональные свойства ЛПНП остаются нормальными [66]. Реконструированные ЛПНП подвержены специфичному рецепторному поглощению фибробластами доноров, и эти ЛПНП не поглощают фибробласты кожи пациентов с гомозиготной формой ГЛП. Несомненно, что такие же исследования будут проведены и с Пб.

Много лет назад Nestel и Billington [60] высказали мнение, что понимание механизма действия Пб будет иметь большое теоретическое значение. Это действительно так, поскольку для понимания механизма действия препарата мы вынуждены по-новому рассмотреть многие процессы транспорта липидов. Данные литературы косвенно подтверждают наше мнение о существовании функционального цикла Хс в транспорте Тг и о том, что действие Пб направлено на его активацию. Длительное присутствие Пб в кровотоке действительно зависит от его циркуляции между тканями и липопротеидами. Основа фармакологического гипохолестеринемического действия Пб объясняется высокой степенью гидрофобности. По нашему мнению, Пб является перспективным препаратом в плане профилактики нарушенного обмена ЛП. Пб поможет нам разобраться во многих процессах физико-химического взаимодействия белок—липид и липид—липид. Настоящий обзор является тому первым доказательством.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зайцева М. М., Лупанов В. П., Лякишев А. А., Титов В. П. // Фармация. — 1994. — № 3. — С. 12—15.
2. Ланкин В. З., Лупанов В. П., Лякишев А. А. и др. // Кардиология. — 1991. — № 6. — С. 87—89.
3. Лупанов В. П., Лякишев А. А., Творогова М. Г. и др. // Там же. — 1993. — № 4. — С. 19—22.
4. Мамбетисаева Э. Т., Косенков Е. И., Подрез Е. А. и др. // Биохимия. — 1994. — Т. 59, № 1. — С. 118—125.
5. Репин В. И. // Наука и жизнь. — 1993. — № 2. — С. 13—17.

6. Чернядьева И. Д., Тумов В. И. // Успехи соврем. биол. — 1987. — Т. 103, № 2. — С. 189—206.
7. Aburatani H., Matsumoto A., Kodama T. et al. // Amer. J. Cardiol. — 1988. — July 25. — P. 60B—65B.
8. Atmeh R. F., Shepherd J., Packard C. J. // Biochim. biophys. Acta. — 1983. — Vol. 751. — P. 175—188.
9. Atmeh R. F., Stewart J. M., Boag D. E. et al. // J. Lipid Res. — 1983. — Vol. 24. — P. 588—595.
10. Aviram M., Lund-Katz S., Phillips M. C. et al. // J. Biol. Chem. — 1988. — Vol. 263, N 32. — P. 1649—1655.
11. Balasubramaniam S., Beins D. M., Simons A. // Clin. Sci. — 1981. — Vol. 61. — P. 615—617.
12. Barnhart J. W., Li D. L., Cheng W. D. // Amer. J. Cardiol. — 1988. — Vol. 62. — P. 52B—57B.
13. Barnhart J. W., Sefranka J. A., McIntosh D. D. // Amer. J. clin. Nutr. — 1970. — Vol. 23. — P. 1229—1234.
14. Baumann D. S., Doblas M., Schonfeld G. et al. // Arterioscler. Thromb. — 1994. — Vol. 14, N 1. — P. 162—167.
15. Beaumont J. L., Jacotot B., Buxtorf J. D. et al. // Artery. — 1982. — Vol. 10, N 1. — P. 71—87.
16. Beynen A. C. // Atherosclerosis. — 1986. — Vol. 61. — P. 249—251.
17. Beynen A. C. // Artery. — 1987. — Vol. 14, N 2. — P. 113—126.
18. Brown M. S., Goldstein J. L. // Atheroscler. Rev. — 1988. — Vol. 18. — P. 85—93.
19. Carew T. T., Schwenke D. C., Steinberg D. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1987. — Vol. 84. — P. 7725—7729.
20. Chao-yuh Yang, Zi-Wei Gu, Shi-ai Weng et al. // Arteriosclerosis. — 1989. — Vol. 9, N 1. — P. 96—108.
21. Chao-yuh Yang, Zi-Wei Gu, Valentinova N. et al. // J. Lipid. Res. — 1993. — Vol. 34. — P. 1311—1321.
22. Chiesa G., Franceschini G., Sirtori C. R. // Biochim. biophys. Acta. — 1990. — Vol. 1045. — P. 302—304.
23. Chisolm G. M. III // Clin. Cardiol. — 1991. — Vol. 14, N 1. — P. 25—30.
24. Chisolm G. M. III, Morel D. W. // Amer. J. Cardiol. — 1988. — Vol. 62. — P. 20B—27B.
25. Cortese C., Marenah C. B., Miller N. E. et al. // Atherosclerosis. — 1982. — Vol. 44. — P. 319—320.
26. Dacht C., Jacotot B., Buxtorf J. C. // Ibid. — 1985. — Vol. 58. — P. 261—268.
27. de Graaf J., Hak-Lemmers H. L. M., Hectors M. P. C. et al. // Arterioscler. Thromb. — 1991. — Vol. 11, N 2. — P. 298—306.
28. del Rio M., Chulia T., Tejerina T. // European Atheroscler. Society Congress, 62-nd: Abstracts. — Jerusalem, 1993. — P. 111.
29. Durovic S., Krasnai C., Dieplinger H. et al. // Ibid. — P. 117.
30. Eder H. A. // Artery. — 1982. — Vol. 10, N 2. — P. 105—107.
31. Fellin R., Gasparotto A., Valerio G. et al. // Atherosclerosis. — 1986. — Vol. 59. — P. 47—56.
32. Ferns G. A. A., Forster L., Stewart-Lee A. et al. // Ibid. — 1993. — Vol. 100. — P. 171—181.
33. Franceschini G., Sirtori M., Vaccarino V. et al. // Arteriosclerosis. — 1989. — Vol. 9, N 4. — P. 462—469.
34. Fuki I., Bolhova L., Koshechkin V. et al. // European Atheroscler. Society Congress, 62-nd: Abstracts. — Jerusalem, 1993. — P. 117.
35. Fuki I., Poznahareva I., Malugin A. et al. // Ibid.
36. Goldberg R. B., Mendez A. // Amer. J. Cardiol. — 1988. — Vol. 62. — P. 57B—59B.
37. Gratsiansky N. A. // Kardiologiya. — 1994. — N 3. — P. 61—69.
38. Gwynne J. T. // Amer. J. Cardiol. — 1988. — Vol. 62. — P. 48B—51B.
39. Hayek T., Chajek-Shaul T., Walsh A. et al. // Arterioscler. Thromb. — 1991. — Vol. 11, N 5. — P. 1295—1302.
40. Homma Ya., Moriguchi E. N., Sakane H. et al. // Atherosclerosis. — 1991. — Vol. 88. — P. 175—181.
41. Ishii K., Kita T., Yokode M. et al. // J. Lipid. Res. — 1989. — Vol. 30. — P. 1—7.
42. Kalams A., Dacgist M., Kornett G. S. // Curr. Ther. Res. — 1971. — Vol. 12. — P. 692—694.
43. Kesäniemi Y. A., Grundy S. M. // J. Lipid Res. — 1984. — Vol. 25. — P. 780—790.
44. Kita T., Nagano Yu., Yokode M. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1987. — Vol. 84. — P. 5928—5931.
45. Klimov A. N., Gurevich V. S., Nikiforova A. A. et al. // Atherosclerosis. — 1993. — Vol. 100. — P. 13—18.
46. Knodel L. C., Talberg R. L. // Med. Toxicol. — 1987. — Vol. 2. — P. 10—32.
47. Kritchevsky D. // Artery. — 1982. — Vol. 10, N 1. — P. 1—6.
48. Ku G., Doherty N. S., Wolos J. A. et al. // Amer. J. Cardiol. — 1988. — Vol. 62. — P. 77B—81B.
49. Ku J., Schroeder K., Schmidt L. F. et al. // Atherosclerosis. — 1990. — Vol. 80. — P. 191—197.
50. Li J. R., Holets R. J., Kottke B. A. // Ibid. — 1980. — Vol. 36. — P. 559—565.
51. Lock D. R., Kuisk I., Gonen B. et al. // Ibid. — 1983. — Vol. 47. — P. 271—278.
52. Mambetisaeva E., Lakeev Yu., Kosenkov E. et al. // European Atheroscler. Society Congress, 62-nd: Abstracts. — Jerusalem, 1993. — P. 93.
53. McLean L. R., Hagaman K. A. // Biochim. biophys. Acta. — 1988. — Vol. 959. — P. 201—205.
54. McPherson R., Hogue M., Milne R. W. et al. // Arterioscler. Thromb. — 1991. — Vol. 11, N 3. — P. 476—481.
55. Mao S. J. T., Yates M. T., Parker R. A. et al. // Ibid. — N 5. — P. 1266—1275.
56. Matsuzawa Yu., Yamashita S., Funahashi T. et al. // Amer. J. Cardiol. — 1988. — Vol. 62. — P. 66B—72B.
57. Nagano Yu., Kita T., Yokode M. et al. // Arteriosclerosis. — 1989. — Vol. 9, N 4. — P. 453—461.
58. Nagano Yu., Nakamura T., Matsuzawa Yu. et al. // Atherosclerosis. — 1992. — Vol. 92. — P. 131—140.
59. Naruszewicz M., Carew T., Pittman R. C. et al. // J. Lipid Res. — 1984. — Vol. 25. — P. 1206—1213.
60. Nestel P. J., Billington T. // Atherosclerosis. — 1981. — Vol. 38. — P. 203—209.
61. Nichols A. V., Smith L. // J. Lipid Res. — 1965. — Vol. 6. — P. 206—210.
62. Oliveira H. C. F., Nilausen K., Meinertz H. et al. // Ibid. — 1993. — Vol. 34. — P. 1729—1737.
63. Parthasarathy S., Young S. G., Witztum J. L. et al. // J. clin. Invest. — 1986. — Vol. 77. — P. 641—644.
64. Patsch J. R., Prasad S., Gotto A. M. et al. // Ibid. — 1984. — Vol. 74. — P. 2017—2023.
65. Quinet E. M., Huerta P., Nancoo D. et al. // J. Lipid Res. — 1993. — Vol. 34. — P. 845—853.
66. Rip J. W., Blais M. M., Jiang L. W. // Biochem. J. — 1994. — Vol. 297. — P. 321—325.
67. Schwartz C. J. // Amer. J. Cardiol. — 1988. — Vol. 62. — P. 1B—5B.
68. Sirtori C. R., Sirtori M., Calabresi L. et al. // Ibid. — P. 73B—76B.
69. Steinberg D., Parthasarathy S., Carew T. E. // Ibid. — P. 6B—12B.
70. Titov V. N. // International Congress on Clinical Chemistry, 15-th: Abstracts. — Melbourne, 1993. — N 0438.
71. Titov V. N. // Ibid. — N 0440.
72. Titov V. N. // Ibid. — N 0441.
73. Titov V. N. // Ibid. — N 0442.
74. Titov V. N. // Ibid. — N 0439.
75. Watanabe Y. // Atherosclerosis. — 1980. — Vol. 36. — P. 261.
76. Yamamoto A., Hara H., Takaichi S. et al. // Amer. J. Cardiol. — 1988. — Vol. 62. — P. 31B—36B.
77. Yamamoto A., Takaichi S., Hara Y. et al. // Atherosclerosis. — 1986. — Vol. 62. — P. 209—217.
78. Yokoyama S., Yamamoto A., Kurasawa T. // Ibid. — 1988. — Vol. 70. — P. 179—181.
79. Zaitseva T. M., Titov V. N., Smirnov V. D. et al. // International Symposium on Atherosclerosis, 10-th: Abstracts. — Montreal, 1994. — N PF18.
80. Zambon S., Brazg R., Aviram M. et al. // Atherosclerosis. — 1992. — Vol. 94. — P. 51—60.

Н. Н. САМОВИЛОВА, Н. В. ПРОКАЗОВА

ПОИСК ЭНДОГЕННОГО ЛИГАНДА СИГМА-РЕЦЕПТОРОВ

Институт экспериментальной кардиологии Кардиологического научного центра РАМН, Москва

Несмотря на то что сигма-рецепторы подробно охарактеризованы фармакологически, их эндогенный лиганд до сих пор не известен, хотя в литературе имеются сведения о наличии в экстрактах мозга веществ, ингибирующих связывание меченых сигма-лигандов [6, 7, 15 — 17]. В предыдущей нашей работе [2] было показано наличие подобных веществ и в ткани печени, которая очень богата сигма-рецепторами [14]. Частичная очистка экстракта печени выявила ряд свойств этих ингибиторов: небольшую молекулярную массу (< 1000), термостабильность, устойчивость к обработке проназой, растворимость в воде и некоторых органических растворителях. Учитывая растворимость эндогенных ингибиторов сигма-рецепторов в органических растворителях, можно предположить, что они скорее всего являются липидами. Поэтому в данной работе для поиска эндогенного лиганда сигма-рецепторов мы использовали специальные методы, применяемые при выделении тканевых липидов.

Методика. 1. Экстракцию липидов печени свиньи проводили по методу Е. В. Дятловицкой [8]. Липидный экстракт промывали водой по методу Фолча [9] и исследовали на способность ингибировать связывание с сигма-рецепторами печени крыс [14]. Радиорецепторную активность (в дальнейшем просто активность) хроматографических фракций выражали в величинах IC_{50} (количество экстракта или липидного фосфора, ингибирующее связывание (+)- 3H SKF 10 047 с мембранами печени на 50%) или в процентах ингибирования.

2. Пересаживание фосфолипидов из гексанового раствора проводили по методу Барсукова и соавт. Осажденные фосфолипиды и ацетоновый супернатант высушивали и в них определяли содержание липидного фосфора по методу В. Е. Васковского и соавт. [18]. Осажденные фосфолипиды и липиды, содержащиеся в супернатанте, анализировали с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках с силикагелем Силуфол (фирма "Chemapol", Чехия), используя системы растворителей гексан:диэтиловый эфир:уксусная кислота (80:10:1; об.:об.:об.) и хлороформ:метанол:вода (65:25:4; об.:об.:об.), рекомендованные для анализа нейтральных липидов и фосфолипидов соответственно [1]. Хроматограммы окрашивали фосфомолибденовой кислотой (ФМК) [4], реактивом на фосфор (РФ)

[18] и нингидрином (НГ) [4]. В этих липидных фракциях также определяли активность.

3. Разделение ацетонрастворимых липидов проводили на колонке (2,5 × 50 см) с силикагелем 40-100 мкм (фирма "Chemapol", Чехия). Липиды элюировали хлороформом (400 мл) и смесями хлороформа с метанолом в следующих соотношениях: 98:2, 95:5, 93:7, 90:10, 80:20 по 200 мл и 60:40, 50:50, 30:70, 10:90, 5:95 по 300 мл. Скорость элюции составляла 2,5 мл/мин, объем фракций — 20 мл. Состав фракций анализировали с помощью ТСХ (см. условия в п. 2). Фракции имеющие одинаковый хроматографический состав, объединяли. В полученных фракциях (фракции 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7А и 8) определяли активность и содержание липидного фосфора.

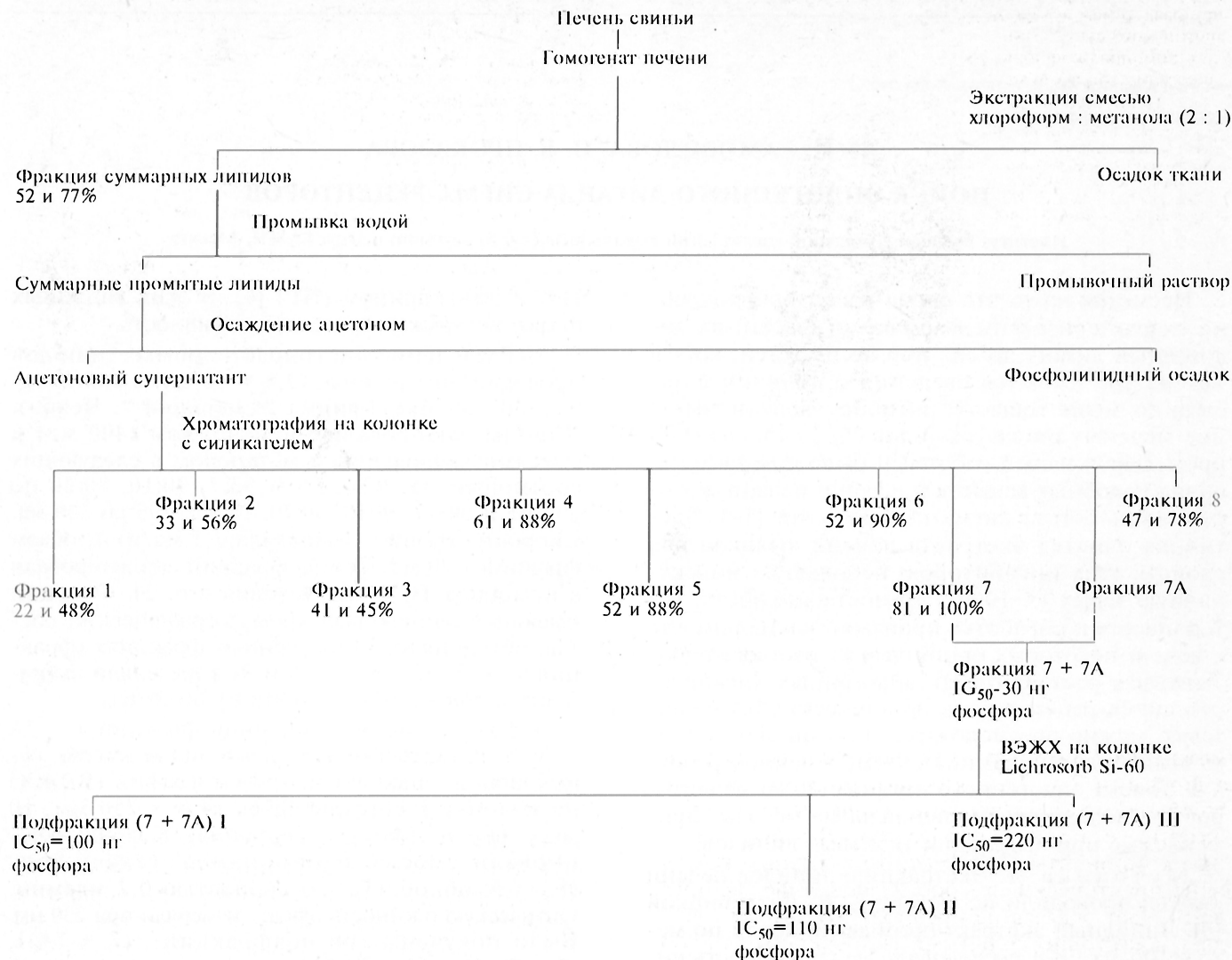
4. Разделение объединенной фракции 7 + 7А (см. п. 3) осуществляли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на колонке Lichrosorb Si-60 (4,6 × 250 мм, 10 мкм, фирма "Merck", Германия). Колонку элюировали смесью изопропанол:гексан:вода (8:6:1,5; об.:об.:об.) со скоростью 0,7 мл/мин. Оптическую плотность элюата измеряли при 230 нм. Были получены три подфракции: (7 + 7А)I, (7 + 7А)II и (7 + 7А)III, которые анализировали с помощью ТСХ (см. условия в п. 2); в них также определяли активность.

Подфракции (7 + 7А)I, (7 + 7А)II и (7 + 7А)III разделяли препаративной ТСХ на пластинке G-60 (фирма "Merck", Германия) в системе для ТСХ фосфолипидов (см. п. 2) и обнаруживали парами йода. Получили 6 хроматографических зон, каждую из которых использовали для определения липидного фосфора [18] и активности.

5. Ферментативное расщепление хроматографических фракций 7 + 7А и 8 (см. п. 3) проводили обработкой фосфолипазой A_2 из яда пчелы (фирма "Sigma") по методу [10] и фосфолипазой С из *Clostridium perfringens* (фирма "Sigma") по методу [11]. Продукты ферментализации анализировали ТСХ в системах, описанных в п. 2, и исследовали на наличие активности. В качестве контроля использовали фракцию, инкубированную без ферментов, но в условиях ферментативной обработки, и препараты ферментов, также подвергнутые инкубации и последующей обработке реакционной смеси.

Результаты и обсуждение. Компонент печени, способный ингибировать связывание (+)- 3H SKF 10 047 с сигма-рецепторами

Схема экстракции липидов печени свиньи



Примечание: Активность приведена в процентах ингибирования (67 и 200 мг сухого веса фракции).

(активный компонент), обладал гидрофобными свойствами, поскольку его можно было экстрагировать смесью хлороформ: метанол (2:1). Часть активности обнаруживалась также в водном промыточном растворе хлороформ-метанольного экстракта, что может свидетельствовать о наличии у активного компонента амфифильных свойств, характерных для ряда липидных веществ (лизолипидов, ганглиозидов) [9].

Для того чтобы определить, какому классу липидов может сопутствовать активность, фосфолипиды из суммарных липидов печени осаждали ацетоном (см. схему). При этом преобладающая часть активности концентрировалась в ацетоновом супернатанте.

Фосфолипидный осадок, образующийся при переосаждении суммарных липидов ацетоном, состоял из всех основных фосфолипидов печени и не содержал других липидов. Напротив, ацетоновый супернатант состоял преимущественно из нейтральных липидов (идентифицируемых с помощью стандартных веществ), а также из небольшого количества фосфолипидов и НГ-поло-

жительных компонентов (предположительно не-липидной природы). Фосфолипиды ацетонового супернатанта отличались от фосфолипидов осадка наличием компонента, хроматографическая подвижность которого была несколько больше, чем у фосфатидилэтаноламина (ФЭА).

При фракционировании ацетонового супернатанта адсорбционной хроматографией на силикагеле было получено девять фракций (рис.1), элюированных системами с повышающейся полярностью. Состав каждой полученной фракции анализировали с помощью ТСХ. Показано, что фракции 1, 2, 3 и 4 состояли в основном из веществ, хроматографическая подвижность которых совпадала с подвижностью стандартных триглицеридов, жирных кислот и холестерина, а подвижность фракции 8 - с подвижностью ФЭА (см. рис. 1). Основной материал фракции 5, 6, 7 и 7А не совпадал ни с одним из выбранных стандартных веществ. Фракции 5 и 6 окрашивались ФМК, но не давали положительной реакции с НГ и РФ. Фракции 7 и 7А обнаруживались ФМК, НГ и РФ. Таким образом, фракции 5 и 6

Рис. 1. ТСХ некоторых фракций, полученных при разделении липидов ацетонового супернатанта с помощью колоночной хроматографии на силикагеле.

Здесь и на рис. 2, 3 хроматографическая система хлороформ:метанол:вода (65:25:4; об.:об.:об.).

Обнаружитель — ФМК.

1 — фракция 7, 2 — фракция 7А, 3 — фракция 8, 4 — ФЭА, 5 — ФХ.

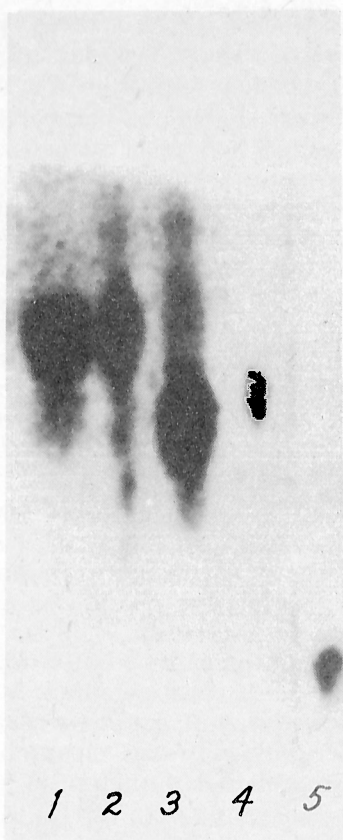
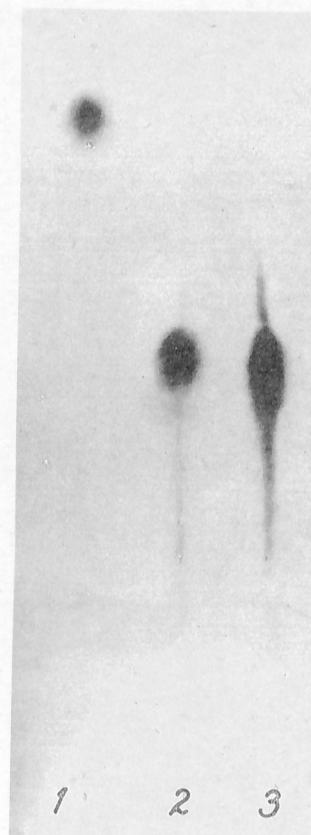


Рис. 2. Анализ с помощью ТСХ продуктов обработки фракций 7, 7А и 8 фосфолипазами.

1 — фракция 7 + 7А после обработки фосфолипазой А₂, 2 — фракция 7 + 7А после обработки фосфолипазой С, 3 — исходная фракция 7 + 7А



можно рассматривать как нейтральные липиды, а фракции 7 и 7А — как фосфоаминолипиды. Необходимо отметить, что в ацетоновом супернатанте остаются наиболее гидрофобные липидные компоненты. Тот факт, что активный компонент практически не соосаждался с фосфолипидами, дает основание предполагать, что он обладает достаточно сильными гидрофобными свойствами. С другой стороны, комиграция активного компонента с фосфолипидными компонентами, оставшимися в ацетоновом супернатанте, свидетельствует о том, что по своим физическим свойствам он близок к фосфолипидам.

Поскольку фракция 7 обладала наибольшей активностью (см. схему), а фракция 7А по составу была подобна ей (см. рис. 1), то в наших дальнейших экспериментах мы использовали объединенную фракцию 7 + 7А. Количественное содержание фракции 7 + 7А составляло примерно десятки доли процента от всех ацетонрастворимых липидов. Поскольку основной компонент фракции 7 + 7А был фосфолипидной природы, то в дальнейшем количественное определение этой фракции проводили по липидному фосфору.

Для того чтобы выяснить, является ли взаимодействие фракции 7 + 7А с сигма-рецепторами конкурентным, проводили анализ изотермы связывания (+)-[³H] SKF 10 047 в присутствии фракции 7 + 7А в количествах, близких к ее IC₅₀. Обнаружено уменьшение числа центров связывания (B_{max}) без изменения константы диссоциации комплексов (K_d), что свидетельствует о неконкурентном характере взаимодействия фракции 7 + 7А с сигма-рецепторами.

Для выявления возможной взаимосвязи активности во фракции 7 + 7А с фосфолипидами ее обрабатывали фосфолипазами А₂ и С. Для контроля аналогичным образом обрабатывали фракцию 8, состоящую преимущественно из ФЭА. Продукты, образующиеся при обработке фосфолипазами, анализировали с помощью ТСХ (рис. 2). Видно, что основные (фосфолипидные) пятна фракций 7 + 7А и 8 гидролизировались фосфолипазой А₂, в то время как фосфолипаза С, по-видимому, их не расщепляла. При этом стандартный ФХ обоими ферментами расщеплялся полностью. Интересно, что активность фракций 7 + 7А и 8 при обработке их фосфолипазами практически не изменялась, что указывает на отсутствие ее связи с интактными фосфолипидами.

Далее фракцию 7 + 7А с помощью ВЭЖХ разделили на три подфракции (7 + 7А)I, (7 + 7А)II и (7 + 7А)III (см. схему). При ТСХ подфракции (7 + 7А)III (рис. 3) на хроматограмме выявлялся лишь один компонент (фосфолипидная зона), хроматографическая подвижность которого была сходной с подвижностью основного компонента исходной фракции 7 + 7А. На хроматограммах подфракций (7 + 7А)I и (7 + 7А)II (см. рис. 3) также выявлялся этот фосфолипидный компонент, однако его содержание было соизмеримо с другими компонентами. Количественное соотношение фосфолипидных компонентов в подфракциях выглядело следующим образом: (7 + 7А)III >>> (7 + 7А)II > (7 + 7А)I. Напротив, активность в подфракциях (7 + 7А)I и (7 + 7А)II была выше, чем в подфракции (7 + 7А)III, что также свидетельствует о том, что активность во

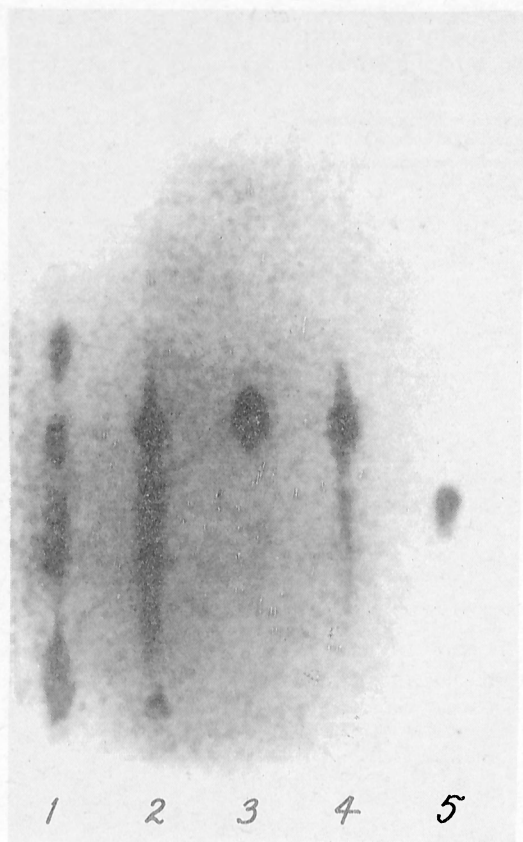


Рис. 3. ТСХ фракций, полученных при ВЭЖХ фракции 7 + 7А.

1 — фракция (7 + 7А)I, 2 — фракция (7 + 7А)II, 3 — фракция (7 + 7А)III, 4 — исходная фракция 7 + 7А, 5 — фракция 8.

фракции 7 + 7А не связана с ее основным фосфолипидным компонентом.

С помощью препаративной ТСХ подфракций (7 + 7А)I и (7 + 7А)II было получено 6 почти однородных хроматографических зон, в которых определяли содержание липидного фосфора и активность. Максимальная активность обнаруживалась в зонах с низким содержанием фосфора. Это также свидетельствует о том, что активность в этих подфракциях, возможно, не связана с фосфолипидами. Более того, в экспериментах по изучению влияния некоторых липидов с хроматографической подвижностью, близкой к фракции 7 + 7А (кардиолипина, фосфатидовой кислоты, лейкотриена В₄, фактора активации тромбоцитов, смесей ганглиозидов мозга и фосфолипидов эритроцитов), на связывание (+)-[³H] SKF 10 047 ни одно из этих веществ в концентрации 10 мкМ не давало заметного ингибирующего эффекта.

Таким образом, печень свиньи содержит гидрофобные вещества, взаимодействующие с сигма-рецепторами. Весьма приблизительная оценка возможного содержания активного материала в печени свиньи показала, что даже та фракция, с которой он комигрирует, составляет сотые доли процента в общей массе липидов печени. Чрезвычайно низкое содержание активного компонента не позволило нам очистить его, по

крайней мере до хроматографически чистого вещества. Исследование многокомпонентных фракций, полученных в ходе последовательных хроматографических разделений, показало, что активный материал только комигрирует с определенными минорными нейтральными и фосфолипидными компонентами, но на самом деле таковым не является. Кроме того, проверка ряда очищенных и коммерческих липидных препаратов на наличие активности дала отрицательный результат. Выявленный неконкурентный характер ингибирования связывания меченого сигма-лиганда активной фракцией позволяет сделать несколько предположений относительно механизма взаимодействия активной фракции с сигма-рецепторами.

В настоящее время достаточно популярной является аллостерическая модель сигма-рецептора [19]. Согласно этой модели, сигма-рецептор представляет собой два аллостерически сопряженных домена — сигма-1, связывающий (+)-бензоморфаны [например, (+)-SKF 10 047], и сигма-2, связывающий сигма-лиганды небензоморфановой природы (например, галоперидол). Неконкурентный характер ингибирования выделенной нами активной фракцией связывания (+)-[³H] SKF 10 047 может свидетельствовать о присутствии в ней эндогенного лиганда, который, взаимодействуя с сигма-2-подтипом рецептора, аллостерически ингибирует связывание (+)-[³H] SKF 10 047, что проявляется в уменьшении числа центров связывания меченого лиганда. Интересно, что неконкурентный характер ингибирования связывания (+)-[³H] SKF 10 047 отмечен и для галоперидола [12], взаимодействующего с сигма-рецепторами с высокой аффинностью [13].

W. D. Bowen и соавт. [5] продемонстрировали значительное повышение связывания (+)-[³H] SKF 10 047 после ультрафиолетового облучения мембран. Была выдвинута гипотеза о том, что обычно эндогенный лиганд оккупирует сигма-2-подтип рецептора и ингибирует связывание (+)-бензоморфанов с сигма-1-подтипом. При облучении разрушается только сигма-2-подтип, исчезает ингибирующее влияние и наблюдается увеличение связывания (+)- бензоморфанов. Таким образом, полученные нами данные могут рассматриваться в качестве подтверждения этой гипотезы.

С другой стороны, неконкурентный характер ингибирования выделенной нами активной фракцией может быть обусловлен и присутствием в ней липидов, которые способны встраиваться в цитоплазматические мембраны и изменять конформацию центров связывания меченого лиганда. Известно, что индуцируемые при этом эффекты в ряде случаев являются достаточно специфичными [20].

Исходя из вышеизложенных соображений, представляются целесообразными дальнейшая очистка активного материала выделенной нами фракции и установление его структуры.

1. Кеймс М. Техника липидологии: Пер. с англ. — М., 1975.
2. Нагорная Л. В., Самовилова Н. Н., Коробов Н. В., Виноградов В. А. // Бюл. экпер. биол. — 1988. — № 9. — С. 314 — 317.
3. Препаративная биохимия липидов / Бергельсон Л. Д., Дятловская Э. В., Молотковский Ю. Г. и др. — М., 1981.
4. Хроматография в тонких слоях / Под ред. Э. Шталя. — М., 1965.
5. Bowen W. D., Hellewell S. B., McGarry K. A. // Eur. J. Pharmacol. — 1989. — Vol. 163. — P. 309 — 318.
6. Contreras P. C., DiMaggio D. A., C'Donohue T. L. // Synapse. — 1987. — Vol. 1. — P. 57 — 61.
7. Contreras P. C., Monahan J. B., Lanthorn T. H. et al. // Mol. Neurobiol. — 1987. — Vol. 1. — P. 191 — 211.
8. Dyatlovskaya E. V. Lipid Biochemical Preparations. — Amsterdam, 1980.
9. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. H. // J. biol. Chem. — 1957. — Vol. 226. — P. 497 — 509.
10. Hanahan D. J., Rodbell M., Turner L. D. // Ibid. — 1954. — Vol. 206. — P. 431 — 441.
11. Haverkate F., Van Deenen L. L. M. // Biochim. biophys. Acta. — 1965. — Vol. 106. — P. 78 — 89.
12. Itzhak Y. // Eur. J. Pharmacol. — 1987. — Vol. 136. — P. 231 — 234.
13. Quirion R., Bowen W. D., Itzhak Y. et al. // Trends Neurosci. — 1992. — Vol. 13. — P. 85 — 86.
14. Samoilova N. N., Nagornaya L. V., Vinogradov V. A. // Eur. J. Pharmacol. — 1988. — Vol. 147. — P. 259 — 264.
15. Sonders M. S., Campbell B., Weber E. // Neurosci. Abstr. — 1986. — Vol. 12. — P. 172.

16. Su T.-P., London E. D., Jaffe J. H. // Science. — 1988. — Vol. 240. — P. 210 — 221.
17. Su T.-P., Vaupel D. B. // Soc. Neurosci. Abstr. — 1988. — Vol. 14. — P. 218 — 222.
18. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y., Vasendin I. M. et al. // J. Chromatogr. — 1975. — Vol. 114. — P. 129 — 141.
19. Walker J. M., Bowen W. D., Walker F. O. et al. // Pharmacol. Rev. — 1990. — Vol. 42. — P. 355 — 402.
20. Zvezdina N. D., Prokazova N. V., Vaver V. A. et al. // Biochem. Pharmacol. — 1978. — Vol. 27. — P. 2793 — 2801.

Поступила 02.12.94

SEARCH FOR ENDOGENOUS SIGMA-RECEPTOR LIGAND

N. N. Samoilova, N. V. Prokazova

Institute of Experimental Cardiology, Cardiology Research Center

Whether there is an endogenous ligand for sigma receptors remains unknown. A total lipid fraction was isolated from the porcine liver, which was then subjected to chromatographic separation, yielding nine chromatographic fractions eluted at various chloroform/methanol ratios: each fraction was tested for its capacity of inhibiting the binding of (+)-[³H]SKF 10047 to hepatic sigma-receptors. The chromatographic fraction 7+7A (eluted at chloroform/methanol ratios of 60:40-10:90) which consisted mainly of phospholipids was found to have the highest activity. However, a complex analysis of this fraction revealed no relationship of its sigma-inhibiting activity to phospholipids. It is suggested that the non-competitive inhibition of (+)-[³H]SKF 10047 binding by the isolated active fraction is due to its presence of an endogenous ligand which, interacting with sigma-2 receptor, allosterically inhibits the binding of the labelled (+)-benzomorphan.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1995

УДК 616.89-008.441.13-036.12-092-092.9-07

А. Г. ВЕРЕТИНСКАЯ, Н. Л. ВЕКШИНА, М. Н. КУЗНЕЦОВА, О. В. БЕЗНОС,
С. И. ТРОННИКОВ, Н. Б. ГАМАЛЕЯ, И. П. АНОХИНА

МЕДИАТОРНЫЕ СИСТЕМЫ В МЕХАНИЗМАХ РЕМИССИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛКОГОЛИЗМА И РЕЦИДИВА ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ВЛЕЧЕНИЯ К АЛКОГОЛЮ

Институт медико-биологических проблем наркологии Государственного научного центра наркологии (дир. — член-корр. РАН проф. И. П. Анохина) Минздравмедпром РФ, Москва

Одной из основных проблем наркологии является достижение стабильной терапевтической ремиссии и предупреждение развития рецидива алкоголизма.

Клиническая практика свидетельствует, что в основе синдрома зависимости лежит патологическое влечение к алкоголю с его клиническими проявлениями (соматовегетативными, аффективными, поведенческими).

Экспериментальными работами показана ведущая роль моноаминергических систем мозга, в частности катехоламиновой и серотониновой, в процессе формирования патологического влечения к алкоголю.

Подтверждением этому служат клинические исследования, свидетельствующие о том, что препараты, действующие на катехоламиновую и серотониновую системы, снижают патологическое влечение к алкоголю [1, 2].

Вместе с тем известно, что у больных алкоголизмом, находящихся в состоянии стойкой пост-терапевтической ремиссии, однократный прием

этанол провоцирует возобновление влечения к алкоголю, а актуализация патологического влечения способствует рецидиву заболевания.

Однако нейрохимические процессы, лежащие в основе ремиссии, как и механизмы, приводящие к рецидиву патологического влечения к алкоголю, практически не изучены.

В связи с этим целью настоящего исследования явилось изучение участия моноаминергической и опиатной систем мозга и крови в механизмах ремиссии и рецидивов экспериментального алкоголизма.

Методика. Эксперименты выполнены на 66 белых беспородных крысах-самцах.

Хроническую алкоголизацию 50 животных осуществляли путем принудительного предоставления животным 15% раствора этанола в качестве единственного источника жидкости в течение 7 мес. 16 животных составили контрольную группу.

Модель экспериментальной ремиссии создавали путем лишения хронически алкоголизи-

Таблица 1

КА в плазме крови (в нг/мл) хронически алкоголизованных крыс на фоне отмены этанола ($M \pm m$)

Группа животных	НА	А	ДА
1-я	$0,95 \pm 0,089$	$1,25 \pm 0,133$	$0,068 \pm 0,012$
2-я	$1,69 \pm 0,067$ $p_{2-1} < 0,05$	$1,40 \pm 0,210$	$0,094 \pm 0,017$
3-я	$1,72 \pm 0,031$ $p_{3-1} < 0,05$	$2,28 \pm 0,430$ $p_{3-1} < 0,05$	$0,156 \pm 0,017$ $p_{3-2} < 0,05$ $p_{3-1} < 0,001$
4-я	$1,43 \pm 0,130$ $p_{4-1} < 0,05$	$0,67 \pm 0,160$ $p_{4-1} < 0,05$ $p_{4-2} < 0,05$ $p_{4-3} < 0,001$	$0,09 \pm 0,014$ $p_{4-3} < 0,001$
5-я	$0,99 \pm 0,190$	$0,35 \pm 0,056$ $p_{5-3} < 0,05$	$0,14 \pm 0,048$
6-я	$1,11 \pm 0,187$	$0,72 \pm 0,058$ $p_{6-1} < 0,001$ $p_{6-3} < 0,001$	$0,07 \pm 0,034$ $p_{6-3} < 0,05$
7-я	$1,39 \pm 0,271$	$0,68 \pm 0,110$	$0,059 \pm 0,0076$

ванных крыс этанола на срок 24 ч (синдром отмены), 1 и 2 мес - длительная отмена (ремиссия).

Для изучения механизма рецидива патологического влечения к алкоголю на фоне 1-и 2-месячного лишения животных этанола однократно вводили алкоголь в дозе 2 г/кг 25% раствора внутривенно.

Соответственно задачам исследования животных разделили на 7 групп: 1-я группа - контроль (интактные животные), 2-я группа - хронически алкоголизованные (7 мес) животные, 3-я группа - хронически алкоголизованные животные, лишенные алкоголя на 24 ч, 4-я группа - хронически алкоголизованные животные, лишенные алкоголя на 1 мес, 6-я группа - хронически алкоголизованные животные, лишенные алкоголя на 2 мес, 5-ю и 7-ю группы составили животные, которым на фоне длительного лишения алкоголя (1 и 2 мес) однократно вводили раствор этанола в дозе 2 г/кг внутривенно.

Содержание свободных форм катехоламинов (КА) - норадреналина (НА), адреналина (А), дофамина (ДА) - в гипоталамусе и плазме крови, а также свойства серотониновых и опиатных рецепторов мозга хронически алкоголизованных животных исследовали при разных сроках отмены алкоголя и при введении этанола на фоне ремиссии.

Определение содержания КА проведено методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с электрохимической детекцией по Krstullovic [4]. Свойства серотониновых и опиатных рецепторов мозга исследовали радиометрическим методом по Peroutka [5] и Snyder [6].

Данные обработаны статистически по методу Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Анализ данных о содержании КА в плазме крови алкоголизованных животных (табл. 1) выявил статистически значимое повышение уровня НА и тенденцию к повышению ДА в плазме крови крыс в ответ на хроническое (7 мес) действие алкоголя.

Таблица 2

КА в гипоталамусе (в нг/г) хронически алкоголизованных крыс на фоне отмены этанола ($M \pm m$)

Группа животных	НА	А	ДА
1-я	$1438,6 \pm 96,1$	$61,7 \pm 6,5$	$376,8 \pm 32,5$
2-я	$1455,5 \pm 237,0$	$74,6 \pm 5,1$	$397,2 \pm 96,6$
3-я	$1002,1 \pm 106,1$ $p_{2-1} < 0,05$	$110,8 \pm 15,7$ $p_{3-1} < 0,01$	$438,8 \pm 90,2$
6-я	$1174,0 \pm 79,5$	$75,7 \pm 4,7$ $p_{6-3} < 0,05$	$276,1 \pm 27,7$ $p_{6-1} < 0,05$
7-я	$1410,9 \pm 37,7$ $p_{7-6} < 0,05$ $p_{7-3} < 0,01$	$71,3 \pm 3,8$	$348,7 \pm 36,3$

Так как в данном эксперименте хронически алкоголизованных животных забивали через 1 ч после последнего приема этанола, когда выброс КА в периферическое русло усилен [1], полученные данные о повышенном уровне КА у алкоголизованных животных не противоречат ранее опубликованным нами результатам о низком содержании КА в плазме крови алкоголизованных животных [2].

24-часовое лишение этанола (синдром отмены) вызывало у хронически алкоголизованных животных еще более выраженное (по сравнению с алкоголизацией без отмены) повышение содержания плазменных КА. При этом значимо повышалось содержание всех медиаторов катехоламинового ряда (ДА, НА, А).

Наиболее значимо повышался уровень ДА в плазме крови, который при синдроме отмены значительно превышал таковой в группе контрольных и хронически алкоголизованных крыс.

При более длительной отмене этанола (ремиссия 1 мес) у хронически алкоголизованных крыс повышенным (по сравнению с контролем) оставался лишь уровень НА в плазме крови. Наблюдалось выраженное снижение содержания А, которое сохранялось и при ремиссии длительностью 2 мес.

При отмене этанола на срок 2 мес уровень НА в плазме крови у хронически алкоголизованных крыс приближался к контрольным значениям.

Характеризуя КА гипоталамической области мозга, следует отметить, что в содержании КА в гипоталамусе хронически алкоголизованных крыс достоверных различий по сравнению с контрольной группой не отмечено (табл. 2).

При синдроме отмены в гипоталамусе алкоголизованных крыс выявлено значимое повышение содержания А при сниженном уровне НА.

Вызванные действием алкоголя и его 24-часовой отменой изменения в содержании КА в гипоталамусе не устранялись и при длительном лишении крыс этанола.

При 2-месячной отмене этанола в гипоталамусе хронически алкоголизованных крыс уровни НА и ДА были ниже контрольных значений.

Обобщая результаты полученных данных, следует подчеркнуть, что содержание КА в плазме

крови и гипоталамусе хронически алкоголизированных крыс, изменившееся при синдроме отмены этанола, не нормализовалось и при ремиссии сроком 1 и 2 мес.

Это согласуется с полученными нами ранее данными об отсутствии полного восстановления ряда показателей КА нейромедиации в условиях длительной ремиссии [3].

Однократная нагрузка этанолом (2 г/кг внутривентриально) восстанавливала до контрольных значений измененный хроническим действием алкоголя и его лишением уровень гипоталамических и плазменных КА.

Основные характеристики свойств серотониновых (5 - НТ₁) и опиатных рецепторов мозга у хронически алкоголизированных крыс в различные сроки ремиссии представлены в табл. 3.

Как видно из этой таблицы, наиболее значимые изменения в свойствах серотониновых и опиатных рецепторов мозга касаются числа мест связывания ($V_{\text{макс}}$).

При синдроме отмены этанола отмечена тенденция к увеличению $V_{\text{макс}}$ серотониновых рецепторов и достоверное повышение $V_{\text{макс}}$ опиатных рецепторов.

Отмена этанола на срок 1 и 2 мес вызывала у алкоголизированных крыс повышение $V_{\text{макс}}$ серотониновых рецепторов и $V_{\text{макс}}$ опиатных рецепторов (через 1 мес после отмены алкоголя).

Алкогольная нагрузка в виде однократной дозы этанола (2 г/кг внутривентриально) несомненно изменяла функциональную активность 5 - НТ₁ и опиатных рецепторов.

Так, для серотониновых рецепторов при ремиссии сроком 1 мес на фоне алкогольной нагрузки характерно увеличение $V_{\text{макс}}$ и K_d , при 2-месячной ремиссии - резко выраженное снижение этих показателей.

При однократной нагрузке алкоголем на фоне ремиссии сроком 1 мес основные характеристики опиатных рецепторов практически не менялись, при 2-месячной $V_{\text{макс}}$ и K_d значительно снижались (по сравнению с ремиссией без нагрузки).

Результаты проведенных исследований показали, что хроническая алкоголизация животных с последующим 24-часовым, 1- и 2-месячным лишением алкоголя сопровождается изменением уровня КА в плазме крови и гипоталамусе экспериментальных животных. Не происходит восстановления функциональных характеристик серотониновых и опиатных рецепторов.

Следовательно, перестроенная в условиях длительного поступления этанола катехоламиновая система гипоталамуса и плазмы крови не восстанавливается до нормы и при длительном прекращении приема алкоголя. И только однок-

Таблица 3

Свойства серотониновых рецепторов передних отделов коры и опиатных рецепторов стриатума у хронически алкоголизированных крыс на фоне отмены этанола ($M \pm m$)

Группа животных	Серотониновые рецепторы		Опиатные рецепторы	
	K_d , пМ	$V_{\text{макс}}$, фмоль на 1 мг белка	K_d , пМ	$V_{\text{макс}}$, фмоль на 1 мг белка
1-я	$10,0 \pm 1,8$	$51,0 \pm 5,0$	$5,0 \pm 4,3$	$45,0 \pm 11,3$
2-я	$7,0 \pm 1,4$	$200,0 \pm 31,0$	$11,0 \pm 0,74$	$72,2 \pm 3,8$
		$p_{2-1} < 0,01$		$p_{2-1} < 0,05$
3-я	$4,4 \pm 0,9$	$61,0 \pm 3,7$	$10,0 \pm 1,8$	$80,0 \pm 6,5$
	$p_{3-1} < 0,05$	$p_{4-1} < 0,01$		$p_{3-1} < 0,05$
		$p_{4-5} < 0,01$		
4-я	$9,0 \pm 1,8$	$76,0 \pm 3,5$	$15,0 \pm 8,0$	$150,0 \pm 10,0$
	$p_{4-5} < 0,001$			$p_{4-1} < 0,001$
5-я	$20,0 \pm 0,9$	$139,0 \pm 20,0$	$9,0 \pm 4,2$	$127,0 \pm 10,3$
		$p_{6-1} < 0,01$		$p_{5-1} < 0,05$
		$p_{6-7} < 0,001$		
6-я	$14,0 \pm 3,0$	$94,0 \pm 11,4$	$6,3 \pm 1,1$	$50,0 \pm 2,6$
	$p_{6-7} < 0,05$			$p_{6-7} < 0,05$
7-я	$3,1 \pm 1,1$	$34,0 \pm 3,3$	$3,3 \pm 1,8$	$33,0 \pm 6,0$

ратное введение этанола хронически алкоголизированным животным на фоне его длительной отмены сопровождалось восстановлением до контрольных значений уровней ДА, НА, А, что, вероятно, может служить одним из механизмов рецидива патологического влечения к алкоголю.

Возможность участия опиатных и серотониновых систем в генезе актуализации алкогольной мотивации в ремиссии требует дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анохина И. П. // Фармакол. и токсикол. — 1990. — № 4. — С. 4 — 9.
2. Анохина И. П., Коган Б. М. // Вopr. наркол. — 1990. — № 6. — С. 3 — 5.
3. Бондаренко Т. Т., Векшина Н. Л., Веретинская А. Г. и др. // Фармакол. и токсикол. — 1992. — № 3. — С. 67 — 70.
4. Krstulovic A. M. // Advances in Chromatography. — Houston, 1981. — P. 561 — 575.
5. Peroutka S. G. // Mol. Pharmacol. — 1979. — Vol. 16, № 3. — P. 687 — 699.
6. Snyder S. H. // Nature. — 1975. — Vol. 257, № 2. — P. 185 — 189.

Поступила 17.09.94.

NEUROTRANSMITTER SYSTEMS IN THE MECHANISMS OF REMISSION OF EXPERIMENTAL ALCOHOLISM AND RELAPSE OF PATHOLOGICAL CRAVING FOR ALCOHOLISM

A. G. Veretinskaya, N. L. Vekshina, M. N. Kuznetsova,
O. V. Beznos, S. I. Tronnikova, N. B. Gamaleya, I. P. Anokhina

Institute for Biomedical Problems of Narcology, State Drug-Abuse Research Center, Moscow

It is suggested that one of the mechanisms responsible for a relapse of pathological craving for alcoholism is normalization of alcohol-impaired cerebral and plasma catecholamine metabolism, which is caused by a single ethanol dose given to the alcoholized animals at remission.

А. М. МЕНДЖЕРИЦКИЙ, Н. И. УСКОВА, А. В. ЛЫСЕНКО,
А. Э. МАЦИОНИС, Е. А. САМЕЦКИЙ

СООТНОШЕНИЕ НЕЙРОМЕДИАТОРНЫХ АМИНОКИСЛОТ ПРИ СРАВНИТЕЛЬНОМ АНАЛИЗЕ СТРЕССПРОТЕКТОРНЫХ ЭФФЕКТОВ δ -СОНИНДУЦИРУЮЩЕГО ПЕПТИДА И ПИРАЦЕТАМА

Ростовский на-Дону государственный университет

В настоящее время отмечается повышенный интерес к изучению эффектов регуляторных пептидов в связи с перспективой их использования в медицине для коррекции функциональных сдвигов в центральной нервной системе при действии экстремальных факторов среды и при некоторых патологических состояниях.

δ -Сониндуцирующий пептид (ДСИП) известен как мощный адаптоген, повышающий устойчивость организма к разнообразным видам стрессового воздействия (холод, гипоксия, гипероксия) [3, 4, 8].

Перестройка метаболизма мозга при различных стрессовых воздействиях характеризуется изменением в балансе нейромедиаторов. В предыдущих исследованиях нами установлено, что инъекция ДСИП за 1 ч до начала стрессового воздействия не только приводит к повышению содержания в мозге основного тормозного нейромедиатора - ГАМК, но и нормализует соотношение тормозных и возбуждающих аминокислотных нейромедиаторов [5, 6]. Кроме того, в нашей лаборатории показана способность ДСИП уменьшать индуцированное стрессом повышение содержания в мозге промежуточного продукта перекисного окисления липидов — малонового диальдегида [5, 8].

В предварительных исследованиях совместного действия ДСИП и пирацетама на содержание аминокислотных нейромедиаторов (ГАМК, глутамат) в условиях гипербарооксигенации нами установлено, что антистрессорный и адаптогенный эффект пептида усиливается пирацетамом [7]. Таким образом, есть основания предполагать, что одним из эффективных способов коррекции метаболизма мозга в условиях экстремальных состояний является совместное применение ноотропов и пептидных модуляторов.

Целью нашей работы является выяснение молекулярных механизмов участия ДСИП и пирацетама в процессах адаптации для их совместного использования при коррекции метаболизма мозга в условиях экстремальных воздействий.

Методика. Эксперименты выполнены на 80 белых беспородных крысах-самцах массой 180-200 г, разделенных на следующие группы: 1-я - контроль - животные, которым внутрибрюшинно вводили физиологический раствор; 2-я - животные, которым в дозе 12 мкг/100 г массы внутрибрюшинно вводили ДСИП за 1 и 2 ч до декапитации [3]; 3-я - животные, которым внутрибрюшинно вводили пирацетам ежедневно в течение 3 сут до декапитации (30 мг на 1 кг массы) [7];

4-я - животные, которым пирацетам вводили внутрибрюшинно ежедневно в течение 3 сут (30 мг/кг), затем за 1 ч до декапитации внутрибрюшинно вводили ДСИП (12 мкг/100 г); 5-я - животные, которых помещали в условия часовой гипокинезии в пластиковых пеналах, резко ограничивающих подвижность [11]; 6-я - животные, которым за 1 ч до гипокинезии вводили ДСИП; 7-я - животные, которые ежедневно в течение 3 сут до гипокинезии получали пирацетам; 8-я - животные, которым ежедневно в течение 3 сут вводили пирацетам, а за 1 ч до гипокинезии — ДСИП.

Животных всех групп декапитировали и в коре головного мозга определяли содержание ГАМК, глутаминовой и аспарагиновой кислот и активность глутаматдекарбоксилазы (ГДК, КФ 4.1.1.15) методом высоковольтного электрофореза на бумаге [5]. У животных 1-4-й групп изучали ультраструктуру сенсомоторной коры головного мозга. Материал для электронно-микроскопического исследования обрабатывали общепринятыми методами [10]. Для выбора соответствующей зоны в сенсомоторной коре (зоны III-5) готовили полутонкие срезы, которые окрашивали метиленовым синим и азуром II - основным фуксином и просматривали в световом микроскопе. Ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме УМТП-6 и просматривали в электронном микроскопе ПЭМ-100. Статистическую обработку результатов биохимических исследований проводили с использованием критериев Шовене и Стьюдента [2].

Результаты и обсуждение. Нами установлено, что все исследованные показатели у интактных животных, содержащихся в условиях вивария, и животных, которым внутрибрюшинно вводили физиологический раствор, достоверно не различались.

Внутрибрюшинное введение ДСИП интактным животным показало, что через 1 и 2 ч не наблюдается существенных сдвигов в системе ГАМК - ГДК и содержании аспарагиновой кислоты в мозге крыс по сравнению с контролем. Обнаружено лишь достоверное, на 25%, снижение содержания глутаминовой кислоты (рис. 1, 2).

Проведенные параллельно у животных данной группы электронно-микроскопические исследования сенсомоторной коры показали, что через 1 ч после введения ДСИП заметных изменений ультраструктуры нервных и глиальных клеток, а также синаптического аппарата не происходит. Через 2 ч после введения ДСИП становится оче-

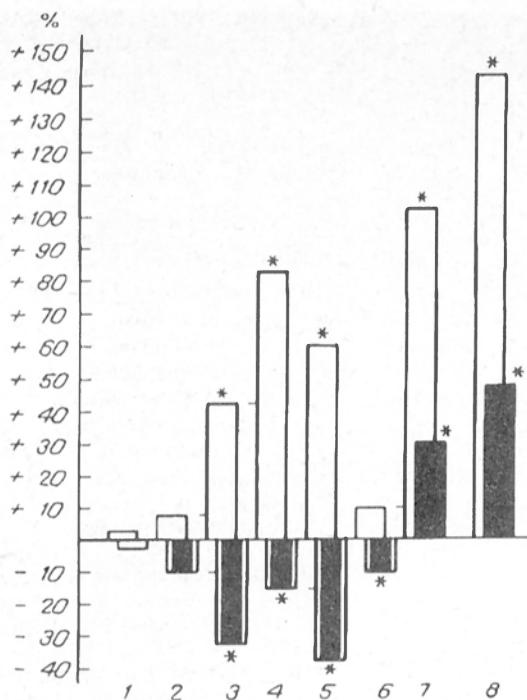


Рис. 1. Совместное действие δ -сонииндуцирующего пептида и пирацетама на содержание ГАМК и активность глутаматдекарбоксилазы (ГДК) в мозге крыс при часовой гипокинезии.

Светлые столбики — ГАМК, темные — ГДК; звездочка — достоверные по сравнению с контролем различия — $p < 0,05$.

По оси абсцисс: 1 — ДСИП 1 ч; 2 — ДСИП 2 ч; 3 — пирацетам 3 сут; 4 — пирацетам 3 сут + ДСИП 1 ч; 5 — гипокинезия 1 ч; 6 — ДСИП 1 ч + гипокинезия 1 ч; 7 — пирацетам 3 сут + гипокинезия 1 ч; 8 — пирацетам 3 сут + ДСИП 1 ч + гипокинезия 1 ч; по оси ординат: содержание ГАМК и активность ГДК (в % к контролю).

видной ультраструктурная перестройка прежде всего в нейронах и синапсах: происходит активация ядерного, белок-синтезирующего, энергетического аппарата нервных клеток, визуальными являются первые признаки активации тормозных аксосоматических синапсов сенсомоторной коры. Согласно современным представлениям, аксосоматические синапсы на телах пирамидных нейронов образованы тормозными терминалями ГАМКергических интернейронов [1]. Активность аксошипиновых синапсов по данным визуального анализа значительно снижена.

Введение пирацетама intactным животным в течение 3 сут изменяет соотношение глутамата и ГАМК в сторону увеличения последнего: уровень глутамата понижается на 30%, а ГАМК — увеличивается на 41%. Важно, что при наблюдаемой тенденции сдвига равновесия в сторону увеличения концентрации ГАМК активность ГДК понижается на 32%. Этот факт свидетельствует об альтернативном пути изменения концентрации аминокислот, предположительно через цикл трикарбоновых кислот. Существенные изменения обнаружены и в содержании аспарагиновой кислоты (+70%).

Электронно-микроскопически изменения метаболизма нейронов под влиянием пирацетама манифестируются активацией ядерного, белок-синтезирующего и энергетического аппаратов. Наблюдаются увеличение размеров ядрышек, из-

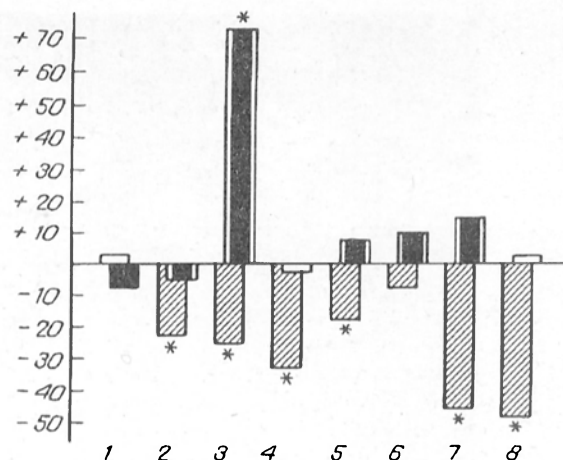


Рис. 2. Совместное действие δ -сонииндуцирующего пептида и пирацетама на содержание аспартата и глутамата в мозге крыс при часовой гипокинезии.

Заптрихованные столбики — глутамат, темные — аспартат; звездочка — достоверные по сравнению с контролем различия — $p < 0,05$.

По оси абсцисс: 1 — ДСИП 1 ч; 2 — ДСИП 2 ч; 3 — пирацетам 3 сут; 4 — пирацетам 3 сут + ДСИП 1 ч; 5 — гипокинезия 1 ч; 6 — ДСИП 1 ч + гипокинезия 1 ч; 7 — пирацетам 3 сут + гипокинезия 1 ч; 8 — пирацетам 3 сут + ДСИП 1 ч + гипокинезия 1 ч; по оси ординат: содержание аспартата и глутамата (в % к контролю).

вилистость кариолеммы, повышение содержания в нейтроплазме свободных и связанных рибонуклеопротеидных частиц, гипертрофия пластинчатого комплекса и компонентов шероховатого эндоплазматического ретикулума, а также агрегация укрупненных форм митохондрий на полюсах формирования клеточных отростков (рис. 3, а). Следовательно, полученные результаты хорошо согласуются с биохимическими данными и свидетельствуют о выраженной активации метаболизма нейронов под воздействием пирацетама.

Через 1 ч после введения ДСИП крысам, получавшим пирацетам в течение 3 сут. количество ГАМК достоверно увеличивается на 82%, уровень глутамата снижается на 34,4%, активность ГДК при этом практически не изменяется (происходит недостоверное снижение активности ГДК на 17,3% при $p > 0,05$). Следовательно, совместное действие 2 препаратов не приводит к наложению их специфических эффектов, а создает новое функциональное состояние, которое характеризуется увеличением уровня ГАМК в 2 раза по сравнению с действием одного пирацетама и сохранением активности фермента синтеза синапсоматального нейромедиаторного компартмента ГАМК. Одновременно резко снижается уровень основного предшественника ГАМК — глутаминовой кислоты. Эти результаты специфичны именно для совместного действия 2 препаратов и существенно отличаются от результатов исследования их эффектов на систему ГАМК при введении каждого из них отдельно (рис. 3, б).

Известно, что введение ДСИП приводит к активации и новообразованию тормозных аксосоматических синапсов сенсомоторной коры [9] и снижает активность возбуждающих аксошипиновых [4]. Введение одного пирацетама не вызывает, по нашим данным, существенных сдвигов в

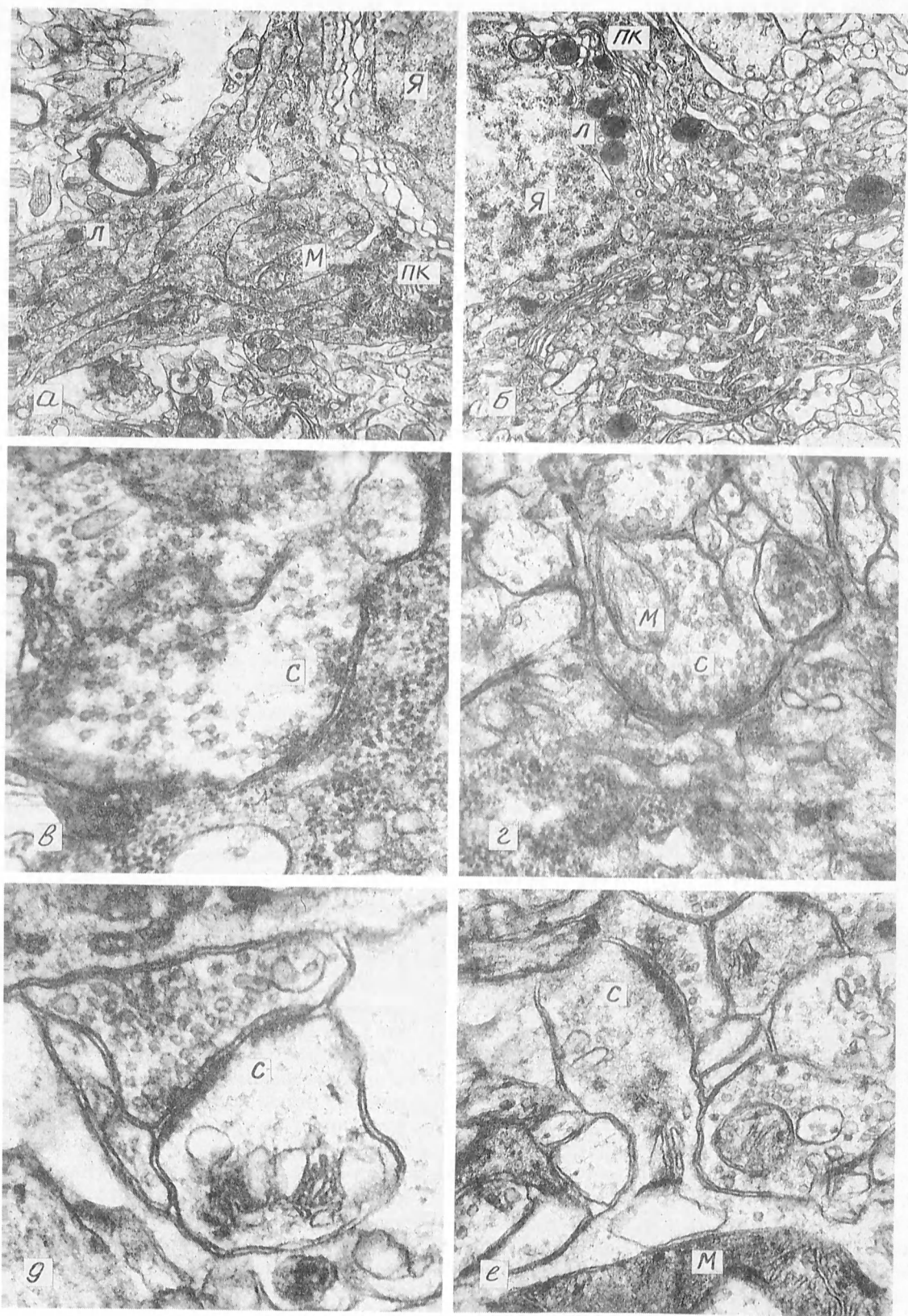


Рис. 3. Влияние ДСИП и пирацетама на ультраструктуру сенсомоторной коры крысы.

a — ультраструктура пирамидного нейрона при введении пирацетама. Ув. 10 000; *б* — ультраструктура пирамидного нейрона при совместном действии ДСИП и пирацетама. Ув. 8000; *в* — аксосоматический синапс при введении пирацетама. Ув. 45 000; *г* — аксосоматический синапс при совместном действии ДСИП и пирацетама. Ув. 30 000; *д* — аксопикиковый синапс при введении пирацетама. Ув. 60 000; *е* — аксопикиковый синапс при совместном действии ДСИП и пирацетама. Ув. 30 000. Я — ядро; ПК — плазматический комплекс; М — митохондрия; Л — лизосома; С — синапс.

ультраструктуре синаптического аппарата сенсомоторной коры. Совместное действие 2 препаратов приводит к очевидной активации аксосома-

тических синапсов и изменяет геометрические параметры и локализацию шипикового аппарата аксопикиковых синапсов. Однако в наших экс-

периментах отмечаются также пролиферация мембран шипикового аппарата и энергизация шипиков за счет появления многочисленных митохондрий, что, несомненно, связано с совместным действием 2 препаратов и является основой будущего эффективного функционирования синапсов этого типа. Следовательно, на основании электронно-микроскопического анализа получено подтверждение факта значительной активации тормозных процессов при совместном действии пирасетама и ДСИП и снижения процессов возбуждения. Выявленное резкое возрастание количества ГАМК происходит, по нашим данным, как за счет метаболической части этой аминокислоты, так и за счет ее нейромедиаторного компартмента, о чем свидетельствует активация тормозных синапсов (рис. 3, в-е).

Из данных, представленных на рис. 1 и 2, можно сделать вывод, что часовая гипокинезия сопровождается развитием тормозного состояния, для которого характерно накопление ГАМК и снижение содержания аспарагиновой и глутаминовой кислот при снижении активности ГДК на 40% по сравнению с контрольным уровнем. Введение ДСИП за 1 ч до гипокинезии приводило к нормализации соотношения указанных нейромедиаторов в мозге крыс. Напротив, ежедневное в течение 3 сут перед гипокинезией введение пирасетама приводило к одновременному значительному увеличению содержания ГАМК и активности ГДК при резком (на 45%) снижении содержания глутаминовой кислоты.

Одновременное использование ДСИП и пирасетама в условиях часовой гипокинезии дает другой тип регуляции исследуемой системы — наблюдается значительное (на 140%) увеличение содержания ГАМК и активности ГДК при снижении содержания глутаминовой кислоты и не отличающемся от контрольных значений уровне аспарагиновой кислоты.

Такой эффект совместного действия 2 препаратов обеспечивал поддержание такого баланса тормозных и возбуждающих аминокислотных нейромедиаторов (значительное, на 60%, увеличение концентрации ГАМК и снижение на 25% содержания глутаминовой кислоты по сравне-

нию с соответствующими показателями при стрессе), которое способствовало повышению адаптационных возможностей организма и усиливало антистрессорный эффект изученных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Карлов В. А. Эпилепсия. — М., 1990.
2. Кокунин В. А. // Укр. биохим. журн. — 1976. — Т. 47, № 6. — С. 770 — 776.
3. Крупенникова Е. Ю., Юханов Р. Ю., Михалева Н. И., Бондаренко Т. И. // Нейрохимия. — 1986. — Т. 5, № 2. — С. 190 — 193.
4. Мационис А. Э. Эффекты дельта-соннидирующего пептида при гипоксии мозга: Автореф. дис. канд. биол. наук. — Ростов-н/Д., 1992.
5. Менджерский А. М., Ускова Н. И., Чораян И. О. // Нейрохимия. — 1988. — Т. 7, № 2. — С. 312 — 313.
6. Менджерский А. М., Ускова Н. И., Чораян И. О., Михалева Н. И. // Там же. — 1990. — Т. 9, № 2. — С. 253 — 258.
7. Менджерский А. М., Ускова Н. И., Повилайтите П. Е. // Проблемы нейрохимии. — Л., 1991. — С. 38-43.
8. Менджерский А. М., Повилайтите П. Е., Буриков А. А. // Физиол. журн. СССР. — 1992. — Т. 78, № 3. — С. 99 — 104.
9. Менджерский А. М., Кураев Г. А., Михалева Н. И., Повилайтите П. Е. // Бюл. экпер. биол. — 1992. — № 2. — С. 202 — 203.
10. Райхлин П. Т., Давид Г., Ланиш К. Ультразвуковая структура опухолей человека. — М., 1981.
11. Федоров Н. В. Обмен веществ при гиподинамии. — М., 1982.

Поступила 19.09.94

THE NEUROTRANSMITTER AMINO ACIDS IN A COMPARATIVE ANALYSIS OF STRESS-PROTECTIVE EFFECTS

A. M. Mendezheritsky, N. I. Uskova, A. V. Lysenko, A. E. Matsionis, Ye. A. Sametsky

State University, Rostov-on-Don

The GABAergic system was adequately altered after simultaneous use of delta-sleeping peptide and pyracetam in intact animals: γ -butyric acid was accumulated unidirectionally by inhibiting brain glutamate decarboxylase activity. Administration of the peptide caused a slight decrease in the levels of aspartic acid, while pyracetam contributed to a marked accumulation of the amino acid. The antistressor and adaptive effects of each drug were augmented if they were given simultaneously before acute emotional stress developed in the animals during one-hour hypokinesia; these effects were expressed as stabilized balance of inhibitory and excitatory neurotransmitter amino acids.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1995

УДК 616.432-006-078.33

А. А. БУЛАТОВ, А. Г. КИСЕЛЕВА, Т. В. ГОРШКОВА,
Н. Б. АКОПОВА, Е. И. МАРОВА

АЛЬФА-СУБЪЕДИНИЦА ГЛИКОПРОТЕИНОВЫХ ГОРМОНОВ КАК БИОХИМИЧЕСКИЙ МАРКЕР ОПУХОЛЕЙ ГИПОФИЗА

Эндокринологический научный центр РАМН, Москва

Специализированные клетки гипофиза — тиреотрофы и гонадотрофы — секретируют в кровь 3 гликопротеиновых гормона — тиреотропный (ТТГ), лютеинизирующий (ЛГ) и фолликулостимулирующий (ФСГ), имеющих общую гетеродимерную схему строения [6]. Они состоят из 2

различных нековалентно-связанных субъединиц, одна из которых у 3 гормонов одинаковая (альфа-субъединица; АС). Бета-субъединицы у этих гормонов различны. Образую нековалентный комплекс с АС, они определяют специфическую физиологическую активность хормо-

нов. Альфа- и бета-субъединицы кодируются различными генами, локализованными на разных хромосомах [6, 10]. После раздельного синтеза полипептидных цепей на соответствующих матричных РНК и их гликозилирования в клетках происходит ассоциация субъединиц в гетеродимерные хологормоны, секретируемые в кровь под контролем гипоталамуса. Свободные субъединицы также могут высвобождаться в кровь, но в нормальных условиях лишь в незначительном количестве [4, 8], тогда как усиление секреции свободной АС возможно при различных опухолях гипофиза [4, 8, 10].

В настоящей работе с помощью специально сконструированной иммуноаналитической тест-системы изучали содержание свободной АС гликопротеиновых гормонов в сыворотке крови у 24 женщин с наиболее часто встречающимися опухолями гипофиза, секретирующими избыточное количество соматотропного гормона (СТГ, гормона роста), пролактина (Прл) или обоих гормонов, у 24 женщин с гормонально-неактивными, так называемыми клинически нефункционирующими опухолями гипофиза, а также влияние на уровень АС в сыворотке крови у этих больных гипоталамического пептидного гормона тиролиберина, стимулирующего секрецию гипофизом ТТГ. Кроме того, в опытах *in vitro* исследовали способность к секреции свободной АС монослойных культур клеток СТГ- и Прл-секретирующих аденом.

Методика. Содержание свободной АС гликопротеиновых гормонов, а также ТТГ, ЛГ, ФСГ и Прл в сыворотке крови или в среде культивирования опухолевых клеток определяли радиоиммунологическим методом с помощью тест-систем, разработанных в лаборатории на основе соответствующих высокоочищенных антигенов и моноспецифических антисывороток.

Свободная АС как ключевой реагент соответствующей тест-системы была получена из высокоочищенного препарата ТТГ, выделенного из постмортальных человеческих гипофизов [11]. Диссоциацию ТТГ на субъединицы и их разделение осуществляли с использованием метода противоточного распределения в системе, содержащей сульфат аммония, 0,2% дихлоруксусную кислоту, *n*-пропанол, этанол в соотношении 60:60:27:33 [9]. Свободную АС, находившуюся в нижней фазе системы, отделяли от остатков недиссоциировавшего хологормона гель-фильтрацией через сефадекс G-100 и использовали для йодирования йодогеном в качестве стандарта для калибровочной кривой и для получения специфической антисыворотки у кроликов. Наименьшее количество АС, измеряемое с помощью разработанной тест-системы, составляло 0,15 нг/мл. Коэффициент вариаций результатов определения не превышал 7%. Перекрестная реакция ТТГ в тест-системе для определения АС была 3,7%.

В тест-системах для радиоиммунологического определения гипофизарных гормонов в качестве рабочих стандартов при построении калибровочных кривых использовали высокоочищенные

препараты гормонов, аттестованные по соответствующим международным стандартам, полученным из Национального института биологических стандартов и контроля (Лондон). Содержание гормонов с целью сравнения с содержанием АС выражали в нанogramмах на 1 мл сыворотки крови или среды культивирования.

Клиническое обследование больных проводили в Институте клинической эндокринологии ЭНЦ РАМН. Возраст обследованных 18-36 лет. Опухоль гипофиза у больных была диагностирована на основании данных клинического исследования, гормонального анализа, рентгенологического исследования, компьютерной или магнитно-резонансной томографии области турецкого седла. При проведении фармакодинамического теста со стимулятором гипофизарной секреции тиролиберин для введения больным использовали его синтетический препарат. В качестве контроля определение АС в сыворотке крови было проведено у 12 женщин в возрасте 17-30 лет без признаков эндокринных заболеваний.

Методика получения и условия культивирования монослойных культур клеток опухоли подробно описаны ранее [1, 2]. Дезагрегацию ткани на отдельные клетки проводили воздействием 0,25% раствора трипсина ("Sigma", США). Суспензию клеток высевали на пластиковые панели фирмы "Flow" (Англия) по 100 тыс. клеток в лунку и культивировали в среде 199 с добавлением 10% сыворотки эмбрионов телят и 50 ЕД/мл пенициллина при 37°C в атмосфере воздуха с 5% CO₂. Функциональную активность клеток изучали на 5 - 6-дневных культурах. Аликвоты среды после 24-часовой инкубации клеток в свежей среде замораживали и хранили при -40°C до проведения гормонального анализа. В качестве ингибитора секреции гормонов в клеточных культурах использовали синтетический гипоталамический гормон соматостатин фирмы "Serva" (Германия).

Результаты и обсуждение. Большинство опухолей гипофиза являются гормонально-активными аденомами [5], при них отмечается гиперсекреция в кровь какого-либо гипофизарного гормона, наиболее часто СТГ (соматотропиномы), Прл (пролактиномы) или обоих этих химически и биологически родственных гормонов (смешанные опухоли). СТГ- и Прл-секретирующие опухоли клинически проявляются соответственно акромегалией, гипергонадизмом и галактореей у женщин или их сочетанием. 25-30% опухолей гипофиза относится к так называемым клинически нефункционирующим аденомам [3], которые не секретируют избыточное количество гормонов и поэтому не сопровождаются характерными эндокринными расстройствами.

На рис. 1 представлены результаты радиоиммунологического анализа АС в сыворотке крови у 24 женщин с гормонально-активными опухолями гипофиза, в том числе с СТГ-секретирующими аденомами и у 3 больных со смешанными Прл- и СТГ-секретирующими аденомами, у 24 женщин с нефункционирующими опухолями

Содержание гормонов в среде культивирования (в нг/мл) клеток СТГ- и Прл-секретирующих аденом гипофиза через 24 ч после смены среды

Больная	СТГ	Прл	АС	ТТГ	ЛГ	ФСГ
К.	3168 (1646)	1958 (509)	42,75 (14,75)	1,56	0,53	2,4
Б.	2532 (1220)	25000	236,5 (191,8)	0,06	0,13	0,68

Примечание. В скобках — в присутствии в среде соматостатина (0,1 нг/мл).

гипофиза, а также для сравнения у 12 здоровых женщин того же возраста без признаков эндокринной патологии.

В контрольной группе содержание свободной АС в сыворотке крови составляло $0,9 \pm 0,22$ нг/мл ($M \pm \sigma$) и практически не отличалось от нормального содержания АС в сыворотке крови у женщин до наступления менопаузы, установленного аналогичным радиоиммунологическим методом другими авторами [4, 8].

У обследованных нами больных как с гормонально-активными, так и с гормонально-неактивными опухолями гипофиза в большинстве случаев — соответственно 87 и 62% — базальное содержание свободной АС превышало ее среднее содержание в контрольной группе женщин более чем на величину 2σ . При этом у многих из обследованных больных с гормонально-активными опухолями оно было выше среднего контрольного уровня в 2 — 3 раза, а у отдельных больных — в 8 — 15 раз. У больных с нефункционирующими опухолями повышение содержания АС в целом было менее значительным, чем у больных с гормонально-активными опухолями. Лишь у одной больной с нефункционирующей опухолью содержание АС в сыворотке крови превысило среднюю контрольную величину примерно в 2,5 раза.

Существенное повышение содержания свободной АС в сыворотке крови у большинства обследованных больных с СТГ- и Прл-секретирующими и гормонально-неактивными аденомами гипофиза указывает на возможность продукции и секреции опухолевыми клетками этого незрелого продукта биосинтеза гликопротеиновых гормонов.

Отдельным больным с СТГ- и Прл-секретирующими аденомами гипофиза было произведено хирургическое удаление опухоли, что позволило получить культуры изолированных опухолевых клеток и исследовать секрецию АС и гипофизарных гормонов в опытах *in vitro*. Эти исследования подтвердили способность СТГ- и Прл-секретирующих опухолей гипофиза к одновременной секреции свободной АС.

Из данных, приведенных в таблице, видно, что в среде культивирования клеток опухолей определяется при низком содержании гликопротеиновых гормонов (ТТГ, ЛГ и ФСГ) довольно высокое содержание свободной АС. Показано, что гипоталамический гормон соматостатин, подавляющий высвобождение СТГ и Прл в среду, может при непосредственном контакте с опухо-

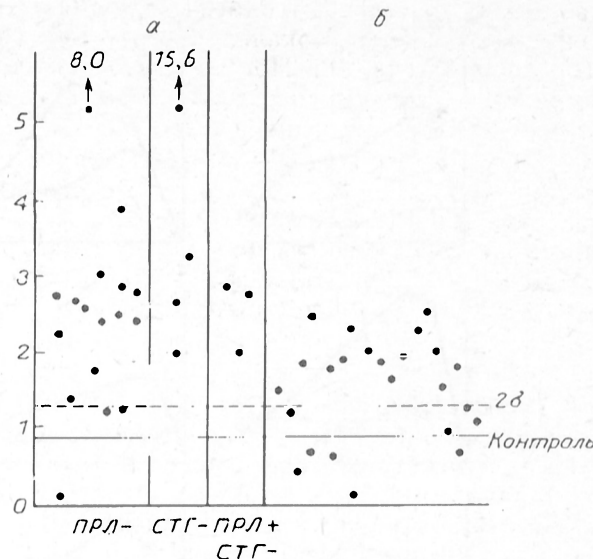


Рис. 1. Базальное содержание свободной альфа-субъединицы (АС) в сыворотке крови (ось ординат; в нг/мл) больных с гормонально-активными (24 больных; а) и нефункционирующими (24 больных; б) опухолями гипофиза.

левыми клетками угнетать и накопление в среде АС. Следует отметить, что L. J. Hofland и соавт. [7] в опытах на диспергированных клетках опухолей, полученных от больных с акромегалией, также продемонстрировали возможность сочетания секреции одними и теми же популяциями опухолевых клеток СТГ, Прл и свободной АС.

С целью изучения регуляции секреции свободной АС у больных с опухолями гипофиза и ее соотношения с секрецией гипофизом гликопротеиновых гормонов в условиях целого организма исследовали реакцию со стороны АС и ТТГ сыворотки крови на тиролиберин — специфический трипептидный стимулятор секреции ТТГ — у 12 больных с клинически нефункционирующими опухолями гипофиза и различным базальным уровнем АС. Для этого определяли содержание АС и ТТГ в сыворотке крови до и через 15–120 мин после внутривенного введения больным 500 мкг синтетического тиролиберина.

Как видно на рис. 2, у 11 из 12 больных тиролиберин вызывал быстрое многократное возрастание содержания ТТГ в сыворотке крови с максимумом эффекта через 15–30 мин после введения трипептида. К 120-й минуте содержание ТТГ в сыворотке крови почти возвращалось к базальному уровню. Иная ситуация наблюдалась со свободной АС. Ее содержание в сыворотке крови в отличие от содержания ТТГ и независимо от базальной величины слабо реагировало или совсем не отвечало на введение тиролиберина. Таким образом, данные фармакодинамического исследования с тиролиберином указывают на независимый от гипоталамической регуляции характер секреции свободной АС у больных с нефункционирующими опухолями гипофиза и позволяют предположить различное клеточное происхождение АС и ТТГ — соответственно опухолевое и неопухолевое у этих больных.

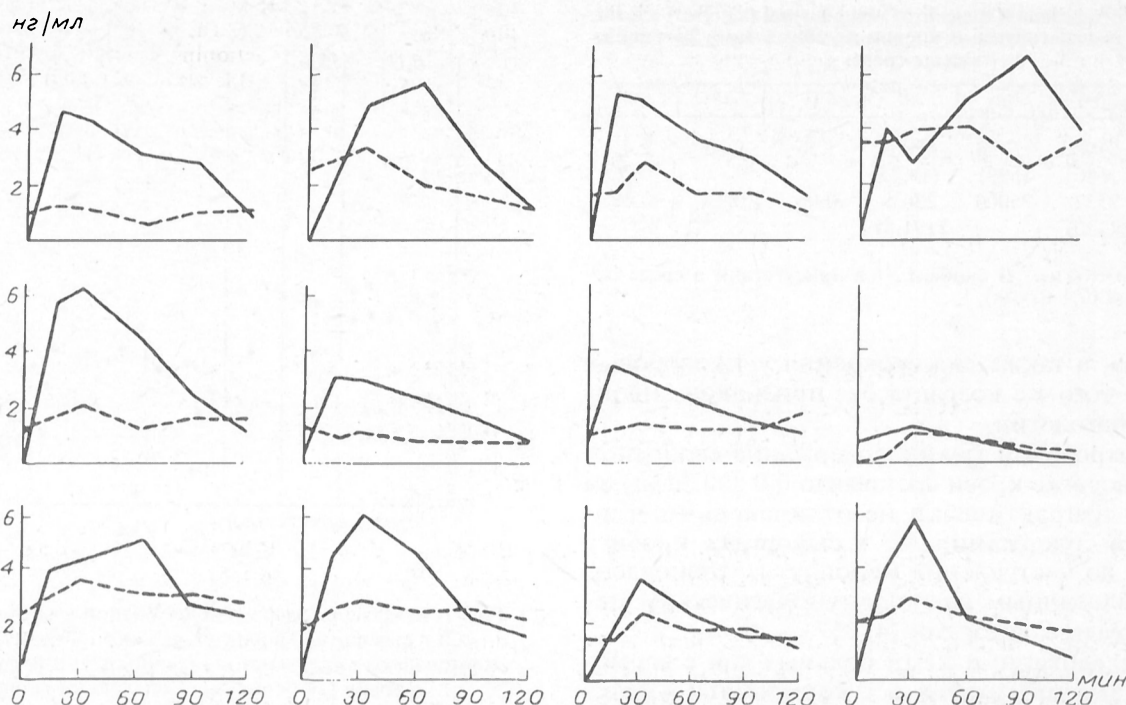


Рис. 2. Содержание ТТГ (сплошная линия) и свободной АС (пунктирная) в сыворотке крови (в нг/мл) у 12 больных с нефункционирующими аденомами гипофиза через 15–120 мин после введения тиролиберина.

Результаты исследования позволяют прийти к заключению, что в случае развития опухоли гипофиза дедифференцировка клеток или рост малодифференцированных стволовых клеток может приводить к активации несвойственной тому или иному типу специализированных клеток (например, соматотрофам или лактотрофам) экспрессии гена АС гликопротеиновых гормонов и, возможно, некоторых других генов, к неполноценному внутриклеточному процессингу соответствующих продуктов экспрессии, накоплению в клетках и усилению секреции ими свободной АС. При этом секреция свободной АС клетками опухоли в условиях целого организма может происходить автономно, независимо от гипоталамического контроля. Таким образом, свободная АС, секретируемая в кровь в значительном количестве вне зависимости от влияния гипоталамического стимулятора тиролиберина, может рассматриваться в качестве диагностического и прогностического биохимического маркера опухолей гипофиза. Это может относиться в первую очередь к гормонально-неактивным опухолям гипофиза, диагностика которых из-за отсутствия гиперсекреции полноценных биологически активных гормонов и соответствующих специфических клинических проявлений особенно затруднена. Стойкое снижение уровня АС в сыворотке крови после хирургического удаления опухоли или ее облучения может свидетельствовать об успешности проведенного лечения, а последующее его повышение может указывать на рост остаточной опухолевой ткани или повторное развитие опухоли.

Авторы выражают благодарность доктору мед. наук И. С. Комолову за помощь по получению культур клеток опухолей гипофиза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Булатов А. А., Комолов И. С., Смирнова Н. Б. и др. // Бюл. экстер. биол. — 1992. — № 4. — С. 406 — 409.
2. Комолов И. С., Булатов А. А., Трунин Ю. К. и др. // Там же. — С. 421 — 424.
3. Кушель Ю. В. // Пробл. эндокринол. — 1993. — № 4. — С. 59 — 62.
4. Assadian H., Shimatsu A., Koshiyama H. et al. // Acta endocrinol. — 1990. — Vol. 122. — P. 729 — 734.
5. Giannattasio G., Bassetti M. // J. Endocrinol. Invest. — 1990. — Vol. 13. — P. 435 — 454.
6. Hartree A. S., Renwick A. G. C. // Biochem. J. — 1992. — Vol. 287. — P. 665 — 679.
7. Hofland L. J., van Koetsveld P. M., Verleun T. M., Lamberts S. W. J. // Clin. Endocrinol. — 1989. — Vol. 30, N 6. — P. 601 — 611.
8. Oppenheim D. S., Kana A. R., Sangha J. S., Klibanski A. // J. clin. Endocrinol. Metab. — 1990. — Vol. 70, N 4. — P. 859 — 864.
9. Papkoff H., Samy T. S. A. // Biochim. biophys. Acta. — 1967. — Vol. 147. — P. 175 — 177.
10. Persani L., Beck-Peccoz P., Medri G. et al. // Neuroendocrinology. — 1991. — Vol. 53. — P. 411 — 415.
11. Sairam M. R., Li C. H. // Can. J. Biochem. — 1977. — Vol. 55 — P. 747 — 752.

Поступила 25.04.94

GLYCOPROTEIN HORMONE ALPHA-SUBUNIT AS A BIO-CHEMICAL MARKER OF PITUITARY TUMORS

A. A. Bulatov, A. G. Kiseleva, T. V. Gorshkova, N. B. Akopova,
Ye. I. Marova

National Research Center for Endocrinology, Russian Academy of Medical Sciences

Specific radioimmunoassay was developed for detection free glycoprotein hormone alpha-subunit (AS), by using AS prepared from highly purified human thyroid-stimulating hormone (TSH).

The assay showed that the basal content of free serum AS in the majority of 24 females with hormonally pituitary tumors secreting somatotrophic hormone (STH, growth hormone), prolactin or either and in 24 females with unfunctioning pituitary tumors was significantly higher the mean one in 12 females matched for the same age who had no endocrine diseases (control). The cultured cells of STH- and P-secreting tumors released excessive quantities

of free AS along with STH and P into the medium with low glycoprotein holo-hormone levels. The content of AS changed little in 12 patients with non-functioning pituitary tumors despite the greatly increased serum TSH levels in response to the hypothalamic stimulator thyroid-releasing hormone. The findings suggest that free AS secreted into blood in excess despite hypothalamic control may be regarded as a biochemical marker of pituitary tumors.

© Е. Л. ДОВЕДОВА, М. Ю. МОНАКОВ, 1995

УДК 616.831-092.9-02:615.214.31/-07

Е. Л. ДОВЕДОВА, М. Ю. МОНАКОВ

ВЛИЯНИЕ ТЕТРАПЕПТИДА ТАФЦИНА НА АКТИВНОСТЬ МОНОАМИНЕРГИЧЕСКИХ СИСТЕМ МОЗГА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ

НИИ мозга РАМН, Москва

По данным литературы, тетрапептид тафцин (Thr - Lys - Pro - Arg) оказывает как периферическое, так и центральное действие. Показано его стимулирующее влияние на эмоциональную и поведенческую сферы, двигательную активность, восприимчивость к болевому раздражителю, агрессивность [3, 9, 11-13]. Большое, возможно практическое, значение имеет выявление антидепрессантного эффекта, продемонстрированного на модели глубокой резерпиновой депрессии животных [1].

Молекулярные механизмы центрального действия тафцина во многом остаются неясными. Однако известна способность ряда коротких эндогенных пептидов, являющихся фрагментами пептидных гормонов и белков, модулировать нейромедиаторные процессы в мозге [2, 4]. В настоящее время показано, что ведущим нейрoхимическим в действии тафцина является его влияние на катехоламинергические системы, в частности на активность тирозингидроксилазы стриатума, а также на обратный захват биогенных аминов в синапсомальных препаратах мозга крыс [1]. В то же время в модельных экспериментах на животных при системном введении галоперидола возникают явления брадикинезии, характерной для такого заболевания, как паркинсонизм [8].

В работе, на фоне длительного введения животным галоперидола, мы исследовали влияние тафцина на состояние нейромедиаторных систем по содержанию моноаминов, их метаболитов и ферментативной активности в отдельных образованиях мозга на субклеточном уровне. В ряде эк-

спериментов использовали короткую экспозицию действия нейрoлептика.

Методика. Данные получены на половозрелых крысах линии Вистар массой 250-300 г, которых использовали в опытах по группам: контрольные животные (15 крыс), животные, получавшие ежедневно дозу (0,5 мг на 1 кг массы тела) галоперидола (фирмы "Рихтер") в течение 30 дней (15 крыс), а также животные, которым после последней внутрибрюшинной инъекции галоперидола вводили тафцин ("Serva", Германия) в дозе 300 мкг на 1 кг массы тела (15 крыс). В течение всего эксперимента следили за состоянием животных. Непосредственно после введения нейрoлептика на поведенческом уровне наблюдались признаки каталепсии, скованность движений, замирание животных в определенной позе. Длительное введение препарата приводило животных в состояние брадикинезии.

Через 30 мин после введения пептида животных декапитировали под легким эфирным наркозом и в субфракциях сенсомоторной коры и хвостатого ядра мозга (митохондрии, синапсомы) спектрофотометрически определяли содержание белка по Лоури, активность МАО (моноаминоксидазы) А [15], МАО В [5] и радиометрически - захват Ca^{2+} [14].

В гомогенате мозга флюориметрически определяли содержание дофамина (ДА), норадреналина (НА), серотонина, 5'-оксииндолуксусной кислоты (5'-ОИУК) [10].

Результаты в табл. 1 и 2 выражены в единицах удельной активности ферментов или пикограммах веществ ($M \pm m$). На рисунке (б, г) результа-

Таблица 1
Содержание (в пг на 1 г ткани) биогенных аминов и 5'-оксииндолуксусной кислоты (5'-ОИУК) в мозге крыс в норме (контроль) и в эксперименте ($M \pm m$)

Условия опыта	Моторная кора				Хвостатое ядро			
	ДА	НА	серотонин	5'-ОИУК	ДА	НА	Серотонин	5'-ОИУК
1 — контроль (100%)	717,7 ± 8,4	93,2 ± 9,0	160,1 ± 12,6	118,1 ± 10,0	2260,4 ± 94	347,2 ± 28	271,4 ± 15	350,5 ± 16
2 — галоперидол % 2/1	598,4 ± 30,4	74,3 ± 12	138,5 ± 22	120,7 ± 9,0	1310,6 ± 12,6	200,0 ± 3,5	274,5 ± 12,0	754,7 ± 8,4
	83,4	79,7	86,5	102,6	57,9	57,6	101,1	215,3
3 — галоперидол + тафцин % 3/1	645,8 ± 28	81,7 ± 10	156,9 ± 9,8	118,4 ± 9,4	2168,0 ± 50	235,3 ± 30,4	360,2 ± 9,8	508,5 ± 12,3
	89,9	87,6	98	100,3	95,9	67,7	132	145

Удельная активность МАО в субфракциях митохондрий мозга крыс в норме и в эксперименте

Условия опыта	Моторная кора		Хвостатое ядро	
	МАО А $\Delta E_{250}/мг$	МАО Б $\Delta E_{450}/мг$	МАО А $\Delta E_{250}/мг$	МАО Б $\Delta E_{450}/мг$
1 — контроль (100%)	$8,71 \pm 0,8$	$2,96 \pm 0,19$	$7,37 \pm 0,12$	$2,17 \pm 0,20$
2 — галоперидол % 2/1	$6,14 \pm 0,49$	$3,41 \pm 0,18$	$11,11 \pm 0,90$	$1,37 \pm 0,12$
	70,5	115,2	150	63,1
3 — галоперидол + тафцин % 3/1	$4,78 \pm 0,18$	$3,26 \pm 0,50$	$5,99 \pm 0,15$	$3,02 \pm 0,40$
	55,0	110,0	81,0	139

ты представлены в процентах изменения исследуемых показателей по отношению к контролю.

Результаты каждой серии опытов обрабатывали статистически по Стьюденту. В статье экспериментальные данные представлены и в процентах по отношению к контролю, которые принимали за 100%.

Результаты и обсуждение. Из представленных данных (см. табл. 1, 2) видно, что при длительном действии галоперидола (30 введений) происходят определенные сдвиги в показателях, характеризующих состояние нейромедиаторных систем в мозге. Так, во фракциях митохондрий хвостатого ядра наблюдается увеличение удельной активности МАО А (150%) и снижение активности МАО Б (63,1%). При этом соответственно обнаружено значительное увеличение содержания конечного продукта обмена серотонина — 5'-ОИУК (215%) и снижение до

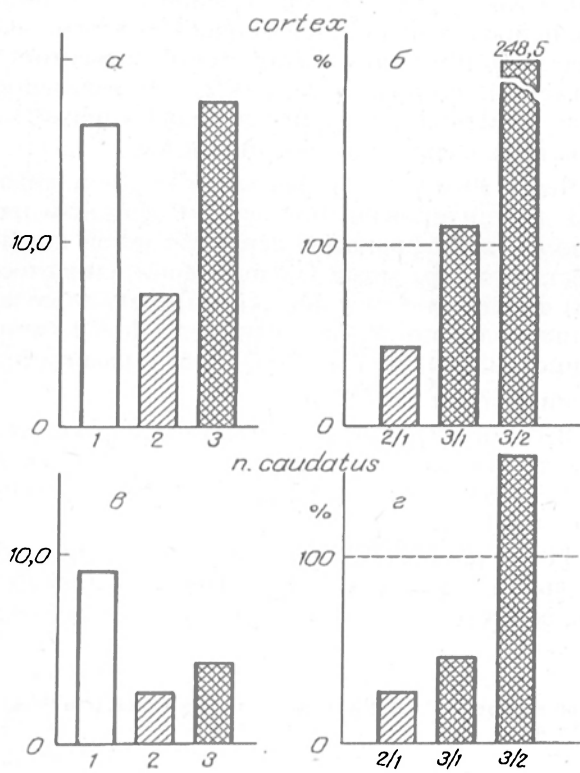
50% количества катехоламинов в этом образовании мозга. В моторной коре эти изменения менее выражены. В результате в коре соотношение катехоламинов и серотонина сохраняется нормальным, в то время как в хвостатом ядре соотношения серотонин/ДА и серотонин/НА резко уменьшаются, тем самым подтверждая представление об истощении катехоламинергической системы.

Одноразовое введение тафцина на фоне действия галоперидола приводит к реципрокным изменениям в содержании нейромедиаторов, направленных на нормализацию их уровня, и активности ферментной системы. Это прежде всего относится к содержанию ДА (95,9%) и активации МАО Б в стриатуме крыс. Отмечено некоторое ослабление (139%) серотонинергической системы, выраженное в снижении удельной активности МАО А (55 и 81,0% нормы) и накоплении медиатора (98 и 132%). Соответственно снижено и соотношение 5'-ОИУК /серотонин по сравнению с этим показателем при действии галоперидола (см. табл. 1).

Деполаризационно-зависимый Ca^{2+} -захват синапсосомами мозга под влиянием галоперидола значительно подавлен в обоих образованиях мозга — на 50 и 70% нормы. После введения тафцина этот процесс нормализуется в синапсосомах коры и значительно активизируется в хвостатом ядре (практически в 2 раза по сравнению с этим показателем при действии галоперидола; см. рисунок).

В настоящее время экспериментально установлено, что деполаризационно-зависимый захват Ca^{2+} синапсосомами мозга имеет определенное значение для процессов синаптической передачи [14]. Поскольку известно, что галоперидол является селективным блоком ДА-рецепторов, можно предположить, что снижение захвата Ca^{2+} синапсосомами мозга под влиянием этого вещества и восстановление этого процесса при последующем действии тафцина в наших экспериментах отражают в основном синаптическую активность, связанную ДА-медиацией, и подтверждают данные литературы о возможной точке приложения действия пептида в ДА-ергических нервных окончаниях [1, 3].

Можно думать, что эффекты тафцина и галоперидола при совместном их применении являются конкурентными в синапсах. В то же время имеются сведения об активации тирозингидроксилазы при действии тафцина *in vitro* [3]. Таким образом, увеличение уровня ДА и НА на ранних



Влияние тафцина на захват Ca^{2+} синапсосомами мозга крыс на фоне действия галоперидола.

По осям ординат на а и в — уровень Ca^{2+} (в нМ на 1 мг белка).

1 — незапатрихованные столбики — захват Ca^{2+} в норме; 2 — косая штриховка — захват Ca^{2+} при действии галоперидола; 3 — штриховка в клеточку — захват Ca^{2+} под влиянием тафцина на фоне галоперидола.

стадиях воздействия определяется суммарным действием этих веществ на метаболизм ДА. В дальнейшем при хроническом введении галоперидола происходит истощение катехоламинов, а под влиянием тафцина происходит нормализация уровня нейромедиаторов, и нарастание активности МАО Б при этом свидетельствует об активации ДА-системы в целом, особенно в хвостатом ядре. В этом, по-видимому, и состоит модулирующий эффект пептида.

Полученные результаты подтверждаются данными литературы о том, что введение тафцина компенсирует вызванное резерпином истощение катехоламинов, что может иметь значение при патологических состояниях центральной нервной системы, в первую очередь при паркинсонизме [1].

Реципрокное снижение активности МАО А под влиянием тафцина на фоне действия галоперидола также подтверждает предположение о восстановлении соотношений нейромедиаторных систем, нарушенных в условиях длительной экспериментальной патологии [6, 7].

По электрофизиологическим и поведенческим показателям изменяются также корково-подкорковые взаимоотношения в мозге и состояние животных от депрессивно-подобного при коротких экспозициях до явления брадикинезии при хроническом применении препарата. Введение тафцина приводит к изменению электроэнцефалографической активности и сглаживанию брадикинезии [8].

Полученные в работе материалы о нормализующем эффекте тафцина на ферментативную активность и содержание нейромедиаторов в условиях эксперимента позволяют высказать предположение, что регуляторное действие этого препарата на метаболизм биогенных аминов, в первую очередь ДА, по-видимому, опосредовано его влиянием на синаптическую передачу, что может привести к перестройкам мультисенсорных систем мозга, а на поведенческом уровне проявиться в широком спектре антипсихотических свойств.

Несомненно, что корково-подкорковые взаимоотношения в интегративно-пусковых структурах мозга сложные, однако, по современным представлениям, неостриатум выполняет роль подкоркового ассоциативного центра и контролирует процессы сенсомоторной интеграции. В то же время установлена зависимость двигательных автоматизмов от состояния ДА-ергических механизмов в п. caudatus. Наблюдаемые поведенческие эффекты на животных при введении тафцина, вероятно, связаны с этими изменениями.

Полученные экспериментальные биохимические данные указывают на то, что в короткие сроки после введения тафцин действует на обмен таких медиаторов, как катехоламины и серотонин. В отношении серотонинергической системы показано достоверное подавление уровня

утилизации серотонина, что может привести к накоплению данного медиатора.

Таким образом, тафцин довольно избирательно осуществляет модулирующие функции в отношении метаболизма биологически активных веществ в субклеточных структурах мозга. Поскольку изменения отдельных ферментных систем при введении нейропептида в организм суммируют ряд процессов, тонкий механизм его модулирующего действия требует дальнейшего выяснения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авдудов Н. А., Рожанец В. В. Фармакология нейропептидов. — М., 1982. — С. 40 — 45.
2. Ашмарин И. П. // Вопр. мед. химии. — 1984. — № 3. — С. 2 — 7.
3. Вальдман А. В., Козловская М. М., Ашмарин И. П. и др. // Бюл. экспер. биол. — 1981. — № 7. — С. 31 — 33.
4. Вальдман А. В. // Вопр. мед. химии. — 1984. — № 3. — С. 56 — 63.
5. Горкин В. Э., Веревкина И. В., Гряднева Л. И. и др. // Современные методы в биохимии. — М., 1968. — Ч. 2. — С. 155 — 161.
6. Доведова Л. Е., Ашмарин И. П. // Бюл. экспер. биол. — 1982. — № 5. — С. 56 — 58.
7. Доведова Л. Е. // Там же. — 1989. — № 4. — С. 440 — 442.
8. Доведова Л. Е., Попова Н. С. // Журн. невропатол. и психиатр. — 1993. — № 6. — С. 15 — 18.
9. Каменский А. А., Антонова Л. В., Самойлова Н. А. // Бюл. экспер. биол. — 1980. — № 7. — С. 43 — 45.
10. Коган Б. М., Печеев Н. В. // Лаб. дело. — 1979. — № 5. — С. 301 — 303.
11. Козловская М. П., Клуша В. Е., Бондаренко Н. А. // Нейрохимические основы психотропного эффекта. — М., 1982. — С. 95 — 105.
12. Лаврецкая Э. Ф., Ашмарин И. П., Калихевич В. П. // Фармакол. и токсикол. — 1981. — № 9. — С. 275 — 379.
13. Hochner B., Parnas H., Parnas J. // Nature. — 1989. — Vol. 342, N 6248. — P. 433 — 435.
14. Pecovic S., Rusic M., Veskov R., Rakic L. // Adv. Biol. Sci. — 1988. — Vol. 70. — P. 133 — 136.
15. Popov N., Roseler C., Thiemann C., Motties H. // Acta biol. med. germ. — 1971. — Bd 26, N 2. — S. 239 — 245.

Поступила 22.07.94

EFFECT OF THE TETRAPEPTIDE TUFTSIN ON THE ACTIVITY OF BRAIN MONOAMINERGIC SYSTEMS IN EXPERIMENTAL ABNORMALITIES

Ye. L. Dovedova, M. Yu. Monakov

Institute of Brain, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Single administration of the regulating peptide tuftsine Thr-Lys-Pro-Arg (300 µg/kg) was shown to affect the state of the transmitter systems in the brain of rats treated with the sedative drug haloperidol in a total dosage of 15 mg/kg within 30 days. Haloperidol therapy caused reciprocal alterations in the activity of monoamine oxidases A and B, in the levels of dopamine, noradrenaline, serotonin, and 5-hydroxyindolyl acetic acid, as well as a decrease in the rate of depolarization-dependent Ca^{2+} -capture in the synaptosomes of the rat brain cortex and neostriatum (N. caudatus); under these conditions tuftsine normalized the parameters studied to a certain extent, which was more pronounced in N. caudatus. The peptide appeared to activate synaptic transfer in the dopaminergic nerve endings and to contribute to balance restoration in the neurotransmitter systems (particularly in the neostriatum) impaired by abnormalities.

В. Е. НОВИКОВ, Н. Б. КОЗЛОВ, Л. А. КОВАЛЕВА

СОСТОЯНИЕ ПРОЦЕССОВ БИОЭНЕРГЕТИКИ В МОЗГОВОЙ ТКАНИ
В ДИНАМИКЕ ОСТРОЙ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ

Смоленская медицинская академия

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) составляет 30-50% от всех травм, летальность при ней - 36-70%. У 71% больных вскоре после ЧМТ возникает отек-набухание головного мозга (ОНГМ) [2, 9]. В посттравматический период в мозговой ткани происходят значительные изменения метаболических процессов. Особенно выражено изменяется углеводно-энергетический обмен [5, 13]. Некоторые авторы связывают развитие посттравматических расстройств с изменением процессов биоэнергетики в мозговой ткани [1]. В связи с этим представляло интерес изучить состояние процессов биоэнергетики в мозговой ткани в динамике ЧМТ.

Методика. Опыты проведены на 66 белых беспородных крысах обоего пола массой 150 — 220 г. ЧМТ наносили путем уколов иглой в мозговую ткань через трепанационное отверстие в черепе с помощью специальных приспособлений [3]. Операцию проводили под эфирным наркозом. Декапитировали животных через 1, 4 и 7 сут после нанесения травмы. Контролем служили интактные животные. В левой теменной доле мозга (травмированной) определяли содержание АТФ, АДФ, АМФ, пирувата и лактата с помощью стандартных тест-наборов фирмы "Boehringer Mannheim" (Германия). После определения уровня макроэргических фосфатов рассчитывали общий фонд адениловых нуклеотидов и вычисляли энергетический заряд системы АТФ - АДФ - АМФ (Е) по формуле: $E = (АТФ + 0,5 АДФ) / (АТФ + АДФ + АМФ)$ [7]. Используя показатели лактата и пирувата, рассчитывали коэффициент лактат/пируват, а также "избыточный лактат" (excess lactate) по формуле: $ХЛ = (L_o - L_k) - (P_o - P_k) \times L_k/P_k$, где ХЛ - "избыточный лактат", L_o и P_o - лактат и пируват в опыте, L_k и P_k - лактат и пируват в контроле [8].

Активность Na, K-АТФазы и Mg-АТФазы устанавливали по приросту количества неорганического фосфора, высвобождаемого из АТФ ферментом АТФазой за единицу времени [10]. Содержание неорганического фосфора в безбелковом фильтрате определяли по методу Shibuya и соавт. [12], белок в пробе — по Lowry [11].

Результаты и обсуждение. У интактных крыс в мозговой ткани содержится довольно высокий уровень макроэргических фосфатов. Общий фонд адениловых нуклеотидов и рациональное соотношение АТФ, АДФ и АМФ в единой энергетической системе обеспечивают высокий энергетический потенциал. Он у интактных крыс равен 0,88 (табл. 1).

Через 24 ч после травмы в мозге снижался уровень АТФ (на 27,6%), общий фонд адениловых нуклеотидов (на 15,1%). При этом возрастало (на 19,1%) количество АДФ и более чем вдвое повышался уровень АМФ. Е уменьшался на 9,1% и составлял 0,80. Резко возрастали концентрация молочной кислоты в мозговой ткани (на 39,3%) и соотношение лактат/пируват (на 60,1%), появлялся "избыточный лактат" в количестве 2,04 мкмоль/г. Через 4 сут после травматического воздействия сдвиги в энергетическом обмене сохранялись. Все показатели, кроме пирувата, достоверно отличались от нормы ($p < 0,01$), но по сравнению с 1-ми сутками отмечалась тенденция к увеличению уровня АТФ (на 8,6%), общего фонда адениловых нуклеотидов (на 7,1%) и Е (на 2,5%). При этом снижались концентрация лактата (на 1,6%), коэффициент лактат/пируват (на 9,2%), "избыточный лактат" (на 20,6%). Спустя 7 сут после травмы изученные показатели еще больше приближались к соответствующим значениям у интактных животных. Однако полностью восстанавливался лишь уровень АДФ. Остальные показатели отличались от нормы. Так, например,

Таблица 1

Показатели биоэнергетики мозговой ткани в динамике ЧМТ ($M \pm m$)

Группа животных	АТФ	АДФ	АМФ	АТФ + АДФ + АМФ	Е	Лактат	Пируват	Лактат/пируват	Избыточный лактат, мкМ/г
	мкмоль/г					мкмоль/г			
Интактная (n = 11)	2,10 ± 0,03	0,47 ± 0,02	0,07 ± 0,004	2,65 ± 0,029	0,88 ± 0,005	4,25 ± 0,122	0,143 ± 0,006	28,6 ± 0,91	
Опытная:									
травма, через 1 сут (n = 6)	1,52 ± 0,031	0,56 ± 0,019	0,16 ± 0,009	2,25 ± 0,022	0,80 ± 0,008	5,92 ± 0,254	0,130 ± 0,005	45,8 ± 1,22	2,04
p	<0,001	<0,02	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	>0,05	<0,001	
травма, через 4 сут (n = 6)	1,65 ± 0,04	0,60 ± 0,026	0,15 ± 0,008	2,41 ± 0,043	0,82 ± 0,006	5,81 ± 0,409	0,141 ± 0,011	41,6 ± 1,16	1,62
p	<0,001	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	>0,05	<0,001	
травма, через 7 сут (n = 6)	1,79 ± 0,034	0,50 ± 0,022	0,12 ± 0,007	2,40 ± 0,054	0,85 ± 0,003	5,08 ± 0,157	0,150 ± 0,008	34,2 ± 1,52	0,63
p	<0,001	>0,05	<0,001	<0,001	<0,01	<0,01	>0,05	<0,02	

количество АТФ было меньше нормы на 14,8%, общий фонд адениловых нуклетотидов - на 9,4%, Е - на 3,4%. Концентрация лактата в это время превышала норму на 0,83 мкмоль/г, "избыточный лактат" составлял всего 0,63 мкМ/г (см. табл. 1). Следовательно, к 7-м суткам посттравматического периода отмечается положительная динамика показателей биоэнергетики.

Значения АТФазной активности в мозговой ткани контрольных и подопытных животных представлены в табл. 2. Из нее следует, что ЧМТ заметно изменяет АТФазную активность. Так, например, через 1 сут после травмы активность общей АТФазы по сравнению с нормой снижалась на 51%, а активность Mg, Na, K-АТФаз уменьшалась соответственно на 55 и 43%. Через 4 сут после травматического воздействия активность АТФаз изменялась в положительную сторону. Активность общей и Na, K-АТФаз достоверно не отличалась от нормы, хотя и не достигала значений, определяемых у интактных животных. Через 7 сут после травмы лишь активность Mg-АТФазы оставалась несколько сниженной.

Приведенные результаты свидетельствуют о том, что в посттравматическом периоде развиваются выраженные изменения биоэнергетических процессов в мозговой ткани. Эти изменения наиболее значительны через 24 ч после травмы. По всей вероятности, данный факт свидетельствует о том, что нарушение процессов биоэнергетики в травмированном мозге предшествует развитию ОНГМ и является одной из причин его возникновения, так как, по нашим данным [3], максимальное развитие посттравматического ОНГМ происходит к 4-м суткам.

Повышение содержания лактата в мозговой ткани, вероятно, связано со снижением активности процессов окисления в клетках мозга после его травматического повреждения. Подтверждением тому могут служить наши предыдущие работы [6], в которых показано, что через 24 ч после травмы снижается скорость окисления субстрата в митохондриях мозга в различных метаболических состояниях. В наших экспериментах ЧМТ сопровождалась увеличением коэффициента лактат/пируват и появлением "избыточного лактата" в мозговой ткани. Это свидетельствует о тканевой гипоксии и преобладании гликолитических процессов над окислительными [5]. Известно, что избыточное накопление лактата в ткани является причиной метаболического ацидоза, развитие которого приводит к еще большему нарушению углеводно-энергетического метаболизма в мозге. Кроме того, в условиях метаболического ацидоза повреждаются другие виды обмена, возникают длительные расстройства ауторегуляции мозгового кровообращения, повышается сосудистая и мембранная проницаемость. Все эти факторы, несомненно, участвуют в патогенезе посттравматических патологических реакций, в том числе способствуют формированию ОНГМ [4, 5]. В травмированной мозговой ткани определяется глубокий энергетический де-

Таблица 2
Активность мембранной АТФазы в динамике острой ЧМТ ($M \pm m$)

Группа животных	Mg-АТФаза	Na, K-АТФаза	Общая АТФаза
	мкмоль Р ₁₁ за 1 ч на 1 мг белка		
Интактная (n = 10)	3,57 ± 0,18	1,57 ± 0,22	5,14 ± 0,38
Опытная:			
травма, через 1 сут (n = 10)	1,61 ± 0,22	0,89 ± 0,11	2,50 ± 0,27
p	<0,001	<0,02	<0,001
травма, через 4 сут (n = 8)	3,03 ± 0,07	1,35 ± 0,08	4,38 ± 0,13
p	<0,05	>0,05	>0,05
травма, через 7 сут (n = 8)	3,00 ± 0,21	1,78 ± 0,27	4,79 ± 0,45
p	>0,05	>0,05	>0,05

фицит. Недостаток энергетических ресурсов имеет важное значение в патогенезе посттравматических расстройств. Энергетический дефицит в мозговой ткани после ЧМТ, вероятно, в значительной степени обусловлен угнетением окислительных процессов. Снижение активности Na, K и Mg-АТФаз в посттравматическом периоде, на наш взгляд, можно рассматривать как результат изменения структуры мембран либо нарушения процессов синтеза белков, в том числе и белков-ферментов. Угнетение активности фермента, гидролизующего АТФ, ведет к нарушению работы транспортных систем клетки и изменению ионного равновесия и осмотического градиента. Эти причины могут инициировать ОНГМ или потенцировать его развитие.

Таким образом, в динамике острой ЧМТ происходят выраженные изменения в углеводно-энергетическом метаболизме мозга, что сопровождается накоплением лактата, появлением "избыточного лактата", уменьшением количества макроэргических фосфатов, снижением энергетического заряда системы АТФ - АДФ - АМФ; снижением активности Na, K и Mg-АТФаз. Эти изменения наиболее выражены через 1 сут после ЧМТ, характеризуют собой состояние глубокого энергодефицита в мозговой ткани, предшествуют развитию и занимают важное место в патогенезе многих посттравматических расстройств, в частности ОНГМ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Квитницкий-Рыжов Ю. П. Современное учение об отеке и набухании головного мозга. — Киев, 1988.
2. Клегуенко Е. П. Механизмы адаптации к тяжелой травме головного мозга и способы защиты мозга от гипоксии: Автореф. дис. д-ра. мед. наук. — М., 1991.
3. Повиков В. Е. Фармакология ГАМК-и опиоидергической систем при травматическом отеке-набухании головного мозга: Автореф. дис. д-ра мед. наук. — М., 1993.
4. Отек головного мозга: 5-й Международный симпозиум по мозговому кровообращению / Под ред. Г. И. Мчедlishvili. — Тбилиси, 1986.
5. Промислов М. III. Обмен веществ в мозге и его регуляция при черепно-мозговой травме. — М., 1984.
6. Шаров А. II., Повиков В. Е. // Вопр. мед. химии. — 1992. — № 5. — С. 24 — 26.
7. Atkinson D. E. // Biochemistry. — 1968. — Vol. 7. — P. 4030.
8. Huckabee W. E. // J. clin. Invest. — 1958. — Vol. 37. — P. 244 — 254.

9. Ito U., Tomita H., Yamazaki S. et al. // *Acta neurochir.* — 1986. — Vol. 79. — P. 120 — 124.
10. Kovachich G. B., Mishra O. P. // *J. Neurochem.* — 1981. — Vol. 36. — P. 333-335.
11. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // *J. biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193. — P. 265 — 275.
12. Shibuya L., Honda H., Maruo B. // *Agric. Biol. Chem.* — 1967. — Vol. 31. — P. 111 — 114.
13. Sutton L., Welsh F., Bruce D. // *J. Neurosurg.* — 1980. — Vol. 53. — P. 470 — 476.

Поступила 17.01.95

BIOENERGY IN BRAIN TISSUE OVER THE COURSE OF ACUTE BRAIN INJURY

V. Ye. Novikov, N. B. Kozlov, L. A. Kovaleva

Smolensk Medical Academy

Acute brain injury was simulated in rat experiments. Great changes were revealed in carbohydrate and energy metabolism over the course of the posttraumatic period. The changes are the most pronounced 1 day after injury and they showed deep energy deficiency in brain tissue and precede the development of and greatly contribute to the pathogenesis of many posttraumatic disorders, including brain edema-swelling.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1995

УДК 616.89-008.454-07:616.154:577.175.52

Т. Б. ДМИТРИЕВА, А. З. ДРОЗДОВ, И. В. МАНЬКОВСКАЯ,
Т. С. ФИЛАТОВА, Б. М. КОГАН

СООТНОШЕНИЕ СВОБОДНЫХ И КОНЬЮГИРОВАННЫХ ФОРМ КАТЕХОЛАМИНОВ ПРИ ДЕПРЕССИВНЫХ РАССТРОЙСТВАХ У ПСИХОПАТИЧЕСКИХ ЛИЧНОСТЕЙ

Государственный научный центр социальной и судебной психиатрии им. В. П. Сербского, Москва

Увеличение числа психогенных депрессивных расстройств, сопровождающихся усложнением клинических проявлений депрессий и патоморфозом клинической картины заболевания в целом, делает в настоящее время весьма актуальным изучение биохимических механизмов, лежащих в основе формирования и развития аффективных расстройств. В настоящее время не вызывает серьезных возражений положение о том, что нарушения функциональной активности основных звеньев катехоламиновой нейромедиаторной системы занимают особое место в патогенезе многих психических заболеваний [1, 2, 13]. До сих пор не потеряло актуальности выдвинутое в 60-х годах положение о дефиците медиаторов-катехоламинов в системах головного мозга как об основной причине появления депрессивных симптомов и об увеличении содержания катехоламинов в организме в период маниакального состояния [4, 13].

Вместе с тем результаты изучения особенностей обмена катехоламинов в периферических жидкостях человека при депрессиях весьма противоречивы, что затрудняет поиск надежных прогностических показателей, разработку патогенетических средств терапии и профилактики депрессивных расстройств. Так, например, при количественном определении содержания как самих катехоламинов, так и их ключевых метаболитов в моче, крови и спинномозговой жидкости пациентов установлено, что при депрессиях эти показатели могут быть увеличены, снижены или не изменены по сравнению с аналогичными показателями у здоровых людей [4, 9, 11].

Несмотря на большой интерес к данной проблеме во всем мире, до сих пор не установлены достоверные причины изменения содержания катехоламинов в крови и моче, мало известны принципы соотношения центральных и периферических пулов медиаторов, основных метаболи-

тов и метаболизирующих их ферментных систем, в единичных работах представлены результаты исследования состояния пре- и постсинаптических рецепторов и системы "вторичных нейротрансмиттеров" у больных, страдающих депрессивными расстройствами [5].

Постулат о том, что основными ферментными системами, регулирующими биохимическую деградацию катехоламиновых нейромедиаторов в организме, являются моноаминоксидаза и катехол-О-метилтрансфераза, ныне является общепризнанным. К настоящему времени накоплен обширный экспериментальный материал о состоянии этих систем при психических расстройствах, представленный в известных обзорных статьях [1, 5, 13], однако существует также третий путь инактивации катехоламинов — конъюгационные процессы с образованием их сульфо- и глюкуроновых эфиров [10, 12]. Изучению особенностей этого пути метаболизма катехоламинов уделялось значительно меньшее внимание исследователей, хотя многие теоретические факты о биохимии процессов образования и выведения конъюгатов известны сравнительно давно [7, 10, 12].

В организме присутствует большой пул конъюгированных молекул как самих катехоламинов, так и их метаболитов. Так, в крови человека 95—99% дофамина (ДА) находится в форме сульфатов, концентрация конъюгированных норадреналина (НА) и адреналина (А) в 3—4 раза превосходит показатели свободных форм [7, 12]. Сульфоконъюгаты составляют основную часть экскретируемых молекул катехоламинов (60—80%) и их метаболитов — 3,4-диоксифенилуксусная кислота (ДОФУК), гомованилиновая кислота (ГВК), ванилилминдальная кислота (ВМК), метанефрин (М), норметанефрин (НМ), метоксифенилэтиленгликоль (МОФЭГ). Кроме того, сульфоконъюгаты катехоламинов и их метаболитов составляют большую часть этих веществ в спин-

номозговой жидкости [12]. В то же время молекулы — предшественники катехоламинов в цепи биосинтеза активных медиаторов (ДОФА, тирозин) в меньшей степени подвержены реакциям конъюгирования. Таким образом, конъюгационные процессы представляют универсальный механизм превращения молекул, имеющих катехоламиновое кольцо, с образованием метаболитов неактивных молекул. Очевидно, что без глубокого изучения особенностей конъюгирования наряду с другими метаболическими системами катехоламинов при психических расстройствах трудно представить целостную патогенетическую картину формирования и развития заболеваний. До настоящего времени специальные исследования конъюгационных процессов при аффективных расстройствах практически не проводились. Этот факт наряду с чрезвычайно противоречивыми данными литературы о содержании катехоламинов и их метаболитов в биологических жидкостях пациентов, страдающих депрессивными расстройствами, и обусловил настоящее исследование.

Методика. Нами было обследовано 70 мужчин в возрасте от 18 до 55 лет, находившихся на стационарной судебно-психиатрической экспертизе в ГНЦ социальной и судебной психиатрии им. В. П. Сербского (18 человек), на обследовании и лечении в клинике пограничных состояний ГНЦ им. В. П. Сербского (12 человек) и в Московской городской специализированной больнице № 8 им. Соловьева (40 человек). Были выделены 3 группы лиц. 1-я — основная группа (50 пациентов) — включала психопатических личностей гиперстенического (28 человек) и гипостенического (22 человека) типа с психогенными депрессиями; 2-я — группа сравнения — состояла из 20 человек, также находившихся в условиях стационара, ее составили психопатические личности без депрессивных расстройств, из них гиперстенического типа было 12 человек и гипостенического типа — 8 человек; 3-я — контрольная группа — состояла из 11 здоровых психически гармоничных мужчин в возрасте 26—43 лет.

Астенодепрессивный синдром развивался у психопатических личностей в условиях пролонгированной субъективно значимой психогенно-травмирующей ситуации. Развитию депрессии предшествовало обострение облигатных личностных особенностей, занимающих затем большое место в структуре депрессивного синдрома. При постоянном воздействии субъективно неразрешимой психогении больные становились болезненно впечатлительными, капризными, раздражительными, слезливыми, нерешительными, мнительными, была выражена вегетативная лабильность. Астенический радикал независимо от типа психопатической почвы определял клиническую картину депрессии, преобладание элемента истощения во всех ее психопатологических проявлениях с подавленностью всех психических функций. Печаль сопровождалась унынием, усталостью, чувством безысходности, беспомощности перед обстоятельствами. При отсут-

ствии психомоторной заторможенности отмечалась невозможность на чем-либо сосредоточиться в связи с концентрацией на узком круге доминирующих представлений, непосредственно связанных с психогенией.

Тревожно-депрессивный синдром значительно чаще был представлен среди личностей тревожно-мнительных или астенических, возникал он в связи с событиями, угрожающими здоровью, благополучию или служебному положению. Эти больные всегда отличались мнительностью, боязливостью, склонностью к постоянным сомнениям, скрупулезному анализу своих поступков, готовностью к реакциям тревоги с состоянием внутреннего напряжения в ответ на незначительные, но субъективно значимые психогенные вредности. Развитию тревожно-депрессивного синдрома предшествовал период заострения присущих этим больным характерологических свойств, которые определяли особенности клинической картины депрессии. Ведущим компонентом этого состояния являлась тревога, состояние больных характеризовалось внутренним беспокойством, озабоченностью, напряженным ожиданием предстоящих неприятностей, связанных с психогенной ситуацией. В единичных наблюдениях тревожно-депрессивный синдром формировался в условиях остро возникшей психогенно-травмирующей судебно-следственной ситуации. У больных отмечалась выраженная аффективная лабильность, что особенно отчетливо проявлялось при необходимости проанализировать характер психогении, найти рациональный выход. Временами на тоскливо-тревожном фоне у больных возникали кратковременные состояния психомоторного возбуждения, при этом их высказывания отражали доминирующие переживания, связанные с актуальной психогенией.

Истерическая депрессия развивалась подросто, в условиях субъективно сложной психогенно-травмирующей ситуации, после короткого периода истерического возбуждения. Клиническая картина отличалась особой яркостью симптоматики, подвижностью, непосредственной зависимостью от ситуации, патетикой в преподнесении своих страданий. Тоскливое настроение сочеталось с раздражительностью, недовольством, угрюмостью. Больные активно стремились к контакту, требовательно, настойчиво и претенциозно излагали свои переживания, в основе которых всегда лежали внешнеобвиняющие тенденции, хотели вызвать к себе сочувствие.

Для выполнения задач исследования мы разработали единый методический комплекс определения свободных и конъюгированных форм катехоламинов в моче и крови [3]. Методика основана на известных принципах горячего кислотного гидролиза биологических жидкостей и распространения приемах выделения биогенных аминов из неочищенных биологических препаратов с последующим их определением с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимическим детектором [3].

Содержание свободных форм катехоламинов в моче (в мкг/сут)

Группа обследованных	НА	А	ДА
Контрольная ($n = 14$)	$37,7 \pm 4,5$	$3,54 \pm 0,6$	$201,5 \pm 18,8$
Группа сравнения ($n = 14$)	$45,8 \pm 11,4$	$3,57 \pm 0,7$	$255,2 \pm 45,3$
Основная:			
истеродепрессивный синдром ($n = 8$)	$34,1 \pm 7,9$	$4,07 \pm 1,8$	$204,2 \pm 29,6^a$
тревожно-депрессивный синдром ($n = 19$)	$24,3 \pm 4,3^a$	$4,74 \pm 1,9$	$180,8 \pm 31,4^a$
астенодепрессивный синдром ($n = 13$)	$13,3 \pm 3,3^{a,b}$	$2,49 \pm 0,7$	$93,13 \pm 17,5^a$

Примечание. Здесь и в табл. 2 статистически достоверные различия ($p < 0,05-0,001$): а — по сравнению с контролем, б — при сопоставлении с группой сравнения, в — по сравнению с показателем при астенодепрессивном синдроме.

Таблица 2

Содержание конъюгированных форм катехоламинов в моче (в мкг/сут)

Группы обследованных	НА	А	ДА
Контрольная ($n = 14$)	$46,8 \pm 6,3$ (55,4)	$3,22 \pm 1,0$ (47,0)	$274,3 \pm 36,9$ (57,7)
Группа сравнения ($n = 14$)	$131,9 \pm 33,9^a$ (74,2)	$9,01 \pm 3,8$ (71,0)	$724,9 \pm 207^a$ (74,0)
Основная:			
истеродепрессивный синдром ($n = 8$)	$28,4 \pm 7,9^b$ (45,4)	$7,33 \pm 2,5$ (64,3)	$311,9 \pm 81,1$ (60,4)
тревожно-депрессивный синдром ($n = 19$)	$33,3 \pm 6,0^b$ (57,8)	$10,30 \pm 3,9$ (68,0)	$465,3 \pm 158^b$ (72,0)
астенодепрессивный синдром ($n = 13$)	$30,2 \pm 7,5^b$ (69,4)	$5,18 \pm 0,8$ (67,0)	$327,7 \pm 66,8$ (77,9)

Примечание. В скобках — процент от суммы.

Таблица 3

Соотношение свободных и конъюгированных форм катехоламинов в моче

Группа обследованных	НА/НА-К	А/А-К	ДА/ДА-К
Контрольная	$0,84 \pm 0,09$ ($n = 13$)	$1,31 \pm 1,0$ ($n = 13$)	$0,71 \pm 0,07$ ($n = 12$)
Группа сравнения	$0,47 \pm 0,07^a$ ($n = 14$)	$0,55 \pm 0,09^a$ ($n = 12$)	$0,40 \pm 0,07^a$ ($n = 13$)
Основная:			
истеродепрессивный синдром	$1,36 \pm 0,20^{a,b,v}$ ($n = 7$)	$0,59 \pm 0,12^a$ ($n = 7$)	$0,61 \pm 0,10^b$ ($n = 6$)
тревожно-депрессивный синдром	$0,57 \pm 0,07^{a,\Gamma}$ ($n = 14$)	$0,34 \pm 0,06^{a,\Gamma}$ ($n = 15$)	$0,50 \pm 0,07$ ($n = 15$)
астенодепрессивный синдром	$0,46 \pm 0,09^a$ ($n = 11$)	$0,48 \pm 0,09^a$ ($n = 13$)	$0,34 \pm 0,06^a$ ($n = 12$)

Примечание. Статистически достоверные различия ($p < 0,05-0,001$): а — по сравнению с контролем, б — при сопоставлении с группой сравнения, в — по сравнению с показателями при астенодепрессивном синдроме, г — при истеродепрессивном синдроме.

Результаты и обсуждение. Группу сравнения составили психопатические лица и лица с акцентуациями характера, находящиеся в условиях неблагоприятного (психотравмирующего) внешнего окружения, однако без признаков депрессивных проявлений. Мы полагаем, что биохимическая картина обмена у этих пациентов должна в определенной мере соответствовать проявлениям острого или подострого стресса. Известно, что при стрессогенных воздействиях наблюдается как немедленное увеличение конъюгированных форм катехоламинов в крови, одновременное с увеличением концентрации свободных форм, так и более отсроченное увеличение содержания глюкуронидов, которое происходит уже после нормализации уровня активных нейромедиаторов [6]. Очевидно, что системы

инактивирования поддерживают гомеостатический баланс, выводя из циркуляции во многом опасные для организма гормональные молекулы, в результате чего и наблюдается увеличение концентрации связанных форм.

У пациентов группы сравнения, вероятно, вследствие их стрессорного состояния и гиперфункционирования симпатических механизмов выявлялось резкое увеличение содержания всех молекул катехоламинов — как свободных, так и конъюгированных. Однако скорость накопления последних превышала прирост уровня несвязанных молекул, поскольку непрерывно поступающие в циркуляцию катехоламины выводятся в более стабильную популяцию связанных форм.

Результаты дальнейшего исследования позволяют утверждать, что состояние изучаемых зве-

ньев катехоламинового метаболизма при депрессиях в значительной мере отличается от соответствующих показателей, полученных в контрольной группе и группе сравнения (табл. 1—3), причем спектр обнаруженных нами нарушений достаточно широк — от гиперфункциональных изменений с выраженным усилением секреторной, катаболической и синтетической активности до глубоких дефицитарных состояний. Тем не менее сочетание подбора клинических подгрупп и адекватных биохимических методологических подходов дало нам возможность представить, на наш взгляд, целостную картину нарушений катехоламинергических процессов с учетом состояния систем, обеспечивающих их сульфоконъюгирование, при различных депрессивных синдромах у психопатических личностей.

Так, при астеническом варианте депрессивного синдрома мы выявили выраженный дефицит активных медиаторов катехоламинового ряда (НА, ДА и А) по сравнению не только с группой сравнения, контрольной группой, но и с другими подгруппами депрессивных пациентов (см. табл. 1, 2). В то же время у больных этой группы установлено самое высокое относительное содержание конъюгированных форм НА и ДА в моче (см. табл. 3), что свидетельствует об интенсивной физиологической инактивации катехоламинов по пути образования сульфозэфиров.

Вполне вероятно, что формирование астенодепрессивного синдрома обусловлено комплексом биохимических особенностей, приводящих к угнетению активности основных этапов метаболизма катехоламинов со значительной декомпенсацией активности катехоламинергических процессов в организме. На наш взгляд, этими особенностями являются низкая скорость синтеза нейромедиаторов, высокая активность процессов окислительного дезаминирования и сульфо- и глюкуроноконъюгирования свободных форм катехоламинов. В результате взаимодействия этих особенностей на фоне хронической психотравмирующей ситуации у больных формируется состояние, которое можно назвать дефицитом свободных форм катехоламинов.

Не вызывает сомнений, что обнаруженные биохимические нарушения непосредственно связаны с клиническими проявлениями депрессивных расстройств, в первую очередь симптомов нервно-психического истощения, а также психомоторной заторможенности и вегетативной неустойчивости. При этом оказывается, что наиболее глубокие нарушения деятельности катехоламинергических систем соответствуют наиболее глубоким депрессивным расстройствам.

Состояние обмена моноаминов у группы депрессивных больных с выраженной тревожностью можно также оценить как относительную недостаточность медиаторных процессов (см. табл. 1, 2). Так, содержание НА и ДА в моче достоверно ниже, чем в группе сравнения, но выше, чем при астенодепрессивном синдроме (см. табл. 1). В отличие от остальных катехоламинов среднее содержание А (особенно его конъюгированных

формы) у данной группы в моче имеет тенденцию к увеличению при сравнении с этим показателем у всех других обследованных пациентов и здоровых людей, что подтверждает данные других авторов о связи тревоги и психического стресса с увеличением выброса А из надпочечников.

Таким образом, у лиц с тревожным вариантом депрессивного синдрома наблюдается угнетение функциональной активности нейромедиаторного звена катехоламиновой системы по сравнению с группой сравнения и контрольной группой, не достигающее, однако, глубины расстройств, обнаруженных нами при астенодепрессивном синдроме.

Обмен катехоламинов у истеродепрессивных больных по изученным в данной работе параметрам меньше отличается от метаболизма в группе сравнения и контрольной группе. Одной из особенностей катехоламинового обмена у больных данной подгруппы является снижение процессов сульфоконъюгирования по сравнению с больными с другими депрессивными синдромами (см. табл. 2, 3), что может быть одной из причин компенсированного состояния катехоламиновой медиации у данных испытуемых и даже может способствовать усилению физиологического действия НА после его выброса в синаптическую щель.

Обращает на себя внимание, что имеется корреляция между глубиной депрессивных расстройств и интенсивностью метаболизма катехоламинов. Возможно, что истощение катехоламинергических механизмов головного мозга и является одной из причин уменьшения энергетического потенциала, главного признака депрессий. Упрощенно рассматривая механизмы поддержания нормального статуса катехоламинергических медиаторных и гормональных систем, можно выделить 3 основные системы биохимической и физиологической инактивации (окислительное дезаминирование, О-метилирование и конъюгационные процессы) активных медиаторов, которые наряду с процессами биосинтеза и определяют уровень функционирования системы в целом. Одной из систем и является физиологическое конъюгирование катехоламинов, которое, как показывают наши результаты, может иметь непосредственное отношение к формированию аффективных расстройств.

Анализ результатов проведенного клинико-нейрохимического исследования свидетельствует о том, что соотношение свободных и конъюгированных форм катехоламинов в моче подчиняется определенным закономерностям. Нужно отметить, что в основном концентрация конъюгированных катехоламинов в биологических жидкостях совпадает с содержанием соответствующих свободных форм. Однако обращает на себя внимание тенденция к снижению коэффициента катехоламины/конъюгированные катехоламины (КА/КА—К), кроме А, в ряду выделенных синдромальных форм депрессий — от истеродепрессивной формы до астенодепрессивной

(см. табл. 3). В целом интенсивность конъюгационного инактивирования наибольшая в двух группах — при астеническом варианте депрессии и при психопатиях без депрессивной симптоматики (группе сопоставления). Данные литературы дают основание для естественного объяснения усиления метаболизма катехоламинов по конъюгационному пути в группе сравнения, но не при астенической депрессии.

Развитие депрессивного состояния, согласно нашим представлениям, означает качественно другое состояние адренергических механизмов, главным признаком которого является недостаточность и центральных, и периферических катехоламиновых систем, что, естественно, должно стимулировать биологические компенсаторные механизмы.

С этой точки зрения интересно проанализировать разнонаправленные тенденции изменения значений коэффициента КА/КА—К в подгруппах с астено- и истеродепрессией. Как видно из таблиц, коэффициенты для практически всех исследуемых веществ в подгруппе с истеродепрессией имеют тенденцию к превышению показателей у больных с другими формами депрессий и, зачастую, показателей во всех сформированных группах (см. табл. 3). Мы полагаем, что здесь действительно проявляются компенсаторные механизмы и недостаточность, обусловленная другими причинами, частично нейтрализуется снижением скорости конъюгирования. Вместе с тем при астенической депрессии, когда наблюдается наиболее глубокий дефицит катехоламиновых механизмов, темпы конъюгационных процессов, оцениваемые по коэффициенту КА/КА—К, почти не отличаются от таковых в группе сравнения (см. табл. 3) и усиленная скорость выведения биологически активных молекул еще более усугубляет имеющийся дефицит медиаторов и гормонов. Причинами этого факта может являться либо увеличенная активность сульфо- и глюкуронотрансфераз, либо нарушенные механизмы регуляции конъюгационных процессов. В любом случае очевидно, что чрезмерная способность организма к функциональному инактивированию катехоламинов по пути конъюгационных превращений может выступать в качестве одного из патогенетических звеньев развития тяжелых депрессивных расстройств.

Таким образом, можно предположить, что нарушения системы конъюгирования катехоламинов являются одним из нейрохимических механизмов, лежащих в основе формирования депрессивных синдромов, и весьма вероятно, что фармакологические препараты, ингибирующие активность трансфераз, благодаря своему влия-

нию на одно из патогенетических звеньев возникновения депрессивных расстройств в будущем смогут стать эффективными антидепрессивными веществами.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Дмитриева Т. Б.* Динамика психопатий (клинические варианты, биологические механизмы, принципы терапевтической коррекции): Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Л., 1990.
2. *Коган Б. М., Анохина Н. П.* // *Вопр. наркол.* — 1990. — № 4. — С. 3—5.
3. *Коган Б. М., Дроздов А. З., Маньковская Н. В., Филатова Т. С.* // *Клин. лаб. диагност.* — 1994.
4. *Синицкий В. И.* Депрессивные состояния. — Киев, 1986.
5. *Caldecott-Hazard S., Morgan D. G., DeLeon-Jones F. et al.* // *Synapse.* — 1991. — Vol. 9. — P. 251—301.
6. *Claustre J., Serusklat P., Peyrin L.* // *J. Neural Transm.* — 1983. — Vol. 56. — P. 265—278.
7. *Jonson C. A., Baker C. A., Smith R. T.* // *Life Sci.* — 1988. — Vol. 26. — P. 1591—1598.
8. *Kagedal B., Goldstein D. S.* // *J. Chromatogr.* — 1988. — Vol. 429. — P. 177—233.
9. *Koslow S. H., Maas J. W., Bowden C. L. et al.* // *Arch. gen. Psychiat.* — 1983. — Vol. 40. — P. 999—1010.
10. *Kuchel O., Buu N. T., Hamet P., Larochelle P.* // *Life Sci.* — 1982. — Vol. 30. — P. 603—609.
11. *Moleman P., Tulen J. H. M., Blankestijn P. J. et al.* // *Arch. gen. Psychiat.* — 1992. — Vol. 49. — P. 568—572.
12. *Roth J. A., Rivett J.* // *Biochem. Pharmacol.* — 1982. — Vol. 31, N 19. — P. 3017—3020.
13. *van Praag H. M., Asnis G. M., Kahn R. S. et al.* // *Brit. J. Psychiat.* — 1990. — Vol. 157. — P. 723—734.

Поступила 02.12.94

FREE/CONJUGATED CATECHOLAMINE RATIO IN DEPRESSIVE DISORDERS IN PSYCHOPATHIC PERSONALITIES

T. V. Dmitriyeva, A. Z. Drozdov, I. V. Mankovskaya, T. S. Filatova, B. M. Kogan

Serbsky National Research Center for Social and Forensic Psychiatry, Moscow

The study was undertaken to examine the content of free and conjugated forms of norepinephrine, dopamine, epinephrine in the daily urine and blood plasma of psychopathic patients during varying severity depressive disorders. To isolate the conjugated forms, hot acid hydrolysis was applied, catecholamines were measured by the procedures based on high performance liquid chromatography with electrochemical detection. Patients with the most marked clinical signs of depressions were found to have the most profound urinary and blood shortage of free forms of dopamine and norepinephrine, as compared with the controls, which was associated with the most intensive conjugation of these catecholamines. Thus, it may be supposed that disturbances of the catecholamine conjugation systems are one of the neurochemical mechanisms underlying the development of affective disorders.

М. Г. СТЕПАНОВ, А. В. АРУТЮНЯН, Э. К. АЙЛАМАЗЯН

НАРУШЕНИЕ ЦЕНТРАЛЬНОЙ РЕГУЛЯЦИИ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ ПОД ВЛИЯНИЕМ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ

Институт акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН, Санкт-Петербург

Репродуктивная система является одной из наиболее чувствительных систем организма, реагирующих на загрязнение окружающей среды, которое характеризуется большой длительностью и малой интенсивностью воздействия неблагоприятных факторов. Независимо от их природы они вызывают сходные нарушения нормального функционирования репродуктивной системы женского организма [1]. Проведенные недавно нами исследования показали, что характер реакции репродуктивной системы на присутствие в качестве загрязнителей окружающей среды различных химических и физических факторов (бензола, толуола, стирола, формальдегида, диоксана, свинца, электромагнитных полей и др.) неспецифичен. Это указывает на нарушение механизмов центральной регуляции репродуктивной функции под воздействием неблагоприятных факторов внешней среды независимо от их природы. В этой связи нами было проведено экспериментальное исследование их влияния на продукцию гонадолиберина в гипоталамусе крыс.

Гонадолиберин синтезируется главным образом в нейронах переднего гипоталамуса и преоптической области и поступает в гипофиз через срединное возвышение. Однако это не единственный путь его транспорта. В работах последних лет, в том числе и наших, доказано, что сосудистый орган концевой пластинки (СОКП), непосредственно связанный с преоптической областью, также принимает участие в процессе секреции гонадолиберина. Нами было установлено наличие половых различий в содержании гонадолиберина в СОКП. В норме у самок в отличие от самцов содержание гонадолиберина в СОКП в утренние часы крайне низкое, а к вечеру оно возрастает в несколько раз (табл. 1), достигая ве-

личины, наблюдаемой у самцов [1—3]. Таким образом, этот орган обеспечивает циркадный ритм секреции гонадолиберина у самок, который практически не зависит от стадии эстрального цикла.

Данные, представленные в табл. 1, показывают, что на уровень гонадолиберина в СОКП оказывают влияние некоторые химические загрязнители окружающей среды. В утренние часы его уровень возрастает вплоть до вечернего. Хроническое воздействие (2 мес) на крыс диоксана в концентрации 10 мг/м³ (предельно допустимая концентрация) приводит к значительному увеличению содержания гонадолиберина в СОКП. В то же время еще сохраняется разница между его утренним и вечерним уровнем. При более высокой концентрации диоксана (100 мг/м³) ритм полностью сбивается: в утренние часы содержание гонадолиберина увеличивается еще больше, а в вечерние снижается по сравнению с контролем. Следует отметить отсутствие столь выраженных изменений в других отделах гипоталамуса. Только небольшая тенденция к снижению вечернего уровня гонадолиберина наблюдается в преоптической области, в которой он синтезируется, и в еще меньшей степени — в срединном возвышении. Отмеченные изменения уровня гонадолиберина не являются исключительным проявлением влияния диоксана. Подобные закономерности обнаружены при воздействии в малых концентрациях толуола, бензола, стирола, свинца и др.

Таким образом, можно предположить, что изменения циркадного ритма секреции гонадолиберина являются одним из первых признаков нарушения нормального функционирования репродуктивной системы. Кроме того, наблюдается также изменение корреляционных связей между

Таблица 1

Уровень гонадолиберина в гипоталамусе крыс (в нг/фрагмент) в разные периоды суток в норме и при 2-месячном воздействии диоксана ($M \pm m$)

Область гипоталамуса	Контроль					Концентрация диоксана, мг/м ³			
	диэструс			проэструс		10		100	
	10-12 ч	13-15 ч	17-18 ч	10-12 ч	17-18 ч	диэструс 10-12 ч	проэструс 17-18 ч	диэструс 10-12 ч	проэструс 17-18 ч
СОКП	0,19 ± 0,05	0,93 ± 0,35	1,75 ± 0,39*	0,09 ± 0,05	2,43 ± 0,31*	0,57 ± 0,13**	1,65 ± 0,22	1,11 ± 0,26***	0,89 ± 0,30**
Преоптическая область	0,51 ± 0,12	0,43 ± 0,08	0,70 ± 0,19	0,16 ± 0,10	0,45 ± 0,08	0,46 ± 0,09	0,34 ± 0,09	0,36 ± 0,08	0,14 ± 0,04***
Срединное возвышение	8,56 ± 1,93	9,04 ± 0,75	8,36 ± 1,19	11,44 ± 3,05	10,10 ± 1,08	9,96 ± 1,75	6,75 ± 1,76	7,03 ± 1,62	6,01 ± 0,67***

Примечание. Звездочки — достоверность различий: одна — по сравнению с уровнем в 10-12 ч ($p < 0,001$), две — по сравнению с контролем ($p < 0,05$), три — по сравнению с контролем ($p < 0,001$).

Таблица 2
Уровень пролактина в крови самок крыс при холодовом стрессе и 2-месячной ингаляции толуола ($M \pm m$)

Условия эксперимента	Контроль	Ингаляция толуола, мг/м ³	
		50	500
Без охлаждения <i>p</i>	1,7 ± 0,8	27,2 ± 5,0 <0,001	13,6 ± 3,8 <0,05
С охлаждением <i>p</i>	13,7 ± 3,1 <0,05	15,6 ± 7,5 <0,05	15,5 ± 7,6 <0,05

Примечание. Достоверность различий (*p*) по сравнению с величиной у интактных животных в контроле.

гормональными и другими показателями (уровнями лютеинизирующего и фолликулостимулирующего гормонов, уровнем эстрогенов и массой матки и др.) [2].

Мы полагаем, что в норме циркадный ритм секреции гонадолиберина обусловлен ослаблением в вечернее время тормозных влияний аксонов, оканчивающихся в СОКП. В этом процессе наиболее вероятно участие таких факторов, как моноамины мозга и опиатные пептиды, поскольку СОКП богат соответствующими синапсами [8]. Ранние нарушения продукции гонадолиберина, возможно, связаны с изменениями нейромедиаторных систем. Мы предполагаем, что загрязнители окружающей среды могут вызвать значительные сдвиги во влиянии катехоламинов, серотонина и, возможно, других тормозных медиаторов (ГАМК, таурина и др.) на секрецию гонадолиберина. Косвенным подтверждением тому является увеличение продукции пролактина (табл. 2), поскольку известно, что продукция последнего в значительной степени контролируется серотонин- и дофаминергическими системами [1, 7]. Полученные данные о повышении уровня пролактина у крыс под воздействием различных неблагоприятных факторов внешней среды согласуются с клиническими наблюдениями, в которых была выявлена повышенная частота гиперпролактинемии у работниц химических предприятий [5, 6].

Неблагоприятные условия внешней среды могут вызвать скрытые изменения в регуляторных системах. Эти изменения проявляются при присоединении дополнительных подтверждающих факторов или при проведении функциональных проб. Например, при исследовании воздействия толуола мы не обнаружили повышения уровня

пролактина как нормальной реакции организма на воздействие низких температур (см. табл. 2). В табл. 3 представлены результаты изучения реакции организма на введение эстрадиола и холодовое воздействие, определяемой по изменению содержания гонадолиберина в СОКП. Выяснилось, что под влиянием толуола эта реакция изменяется. В норме в ответ на введение эстрадиола происходит увеличение уровня гонадолиберина в СОКП и эта реакция сохраняется при холодовом воздействии. Под влиянием толуола происходит значительное усиление этой реакции. Совместное воздействие толуола и холода приводит к ее срыву. При увеличении концентрации толуола происходит извращение реакции независимо от наличия холодового стресса.

Таким образом, на ранних этапах воздействия загрязнителей окружающей среды наблюдаются нарушения регуляторных механизмов репродуктивной функции. Обычно они не приводят к нарушению процесса овуляции и бесплодию и могут быть выявлены с помощью специальных тестов. Изменения в гипоталамо-гипофизарно-овариальной системе, обнаруживаемые вне беременности, могут сказываться на ее течении в ранние сроки, приводя к спонтанным абортam, фетоплацентарной недостаточности, поздним токсикозам, преждевременным родам.

Таким образом, результаты экспериментов позволяют заключить, что на первых этапах воздействия неблагоприятных факторов внешней среды имеет место неспецифическая реакция, затрагивающая центральные механизмы регуляции репродукции. Вызванные при этом изменения являются функциональными и легко обратимыми, однако они должны рассматриваться как первые признаки дисфункции репродуктивной системы. С учетом неспецифического характера этой реакции полученные данные могут быть использованы при оценке влияния глобальных загрязнений окружающей среды на репродуктивную систему. Однако с увеличением интенсивности и длительности воздействия неблагоприятных факторов внешней среды может проявляться их специфический характер, обусловленный прежде всего их непосредственным влиянием на гонады и другие органы репродуктивной системы.

Таблица 3
Уровень гонадолиберина в СОКП у крыс, подвергавшихся 4-месячному воздействию толуола, охлаждению и их сочетанному влиянию: реакция на введение эстрадиола ($M \pm m$)

Условия эксперимента	Контроль		Ингаляция толуола, мг/м ³			
	$E_2^{(-)}$	$E_2^{(+)}$	50		500	
			$E_2^{(-)}$	$E_2^{(+)}$	$E_2^{(-)}$	$E_2^{(+)}$
Без охлаждения	0,156 ± 0,040	0,238 ± 0,018*	0,180 ± 0,100	0,924 ± 0,300*	0,375 ± 0,152	0,184 ± 0,076
С охлаждением	0,200 ± 0,049	0,363 ± 0,051*	0,190 ± 0,051	0,080 ± 0,040*	0,360 ± 0,207	0,278 ± 0,093

Примечание. Звездочка — достоверное различие ($p < 0,05$) между группами с введением эстрадиола — $E_2^{(-)}$ и без его введения — $E_2^{(+)}$.

IMPAIRED CENTRAL REGULATION OF REPRODUCTIVE FUNCTION DUE TO UNFAVOURABLE ENVIRONMENTAL FACTORS

M. G. Stepanov, A. V. Arutyunyan, E. K. Ailamazyan

Rat experiments have established that early unfavourable environmental influences cause a non-specific response of the central link of reproductive function regulation as manifested by the impaired circadian rhythm of gonadoreleasing hormone through the vascular organ of the lamina terminalis. It is suggested that this is induced by changes in prolactin production. Under unfavourable environmental influences there were insidious changes in the neuroendocrine regulation of reproductive function, which emerge with the involvement of additional damaging factors or functional tests. They are easily reversible and functional, but they may be regarded as the first signs of reproductive dysfunction.

1. Виноградова Е. Г. // Актуальные вопросы физиологии и патологии репродуктивной функции женщины. — СПб., 1991. — С. 56—58.
2. Савченко О. Н., Арутюнян П. А., Степанов М. Г. Экспериментальное бесплодие: Эндокринологические аспекты. — СПб., 1992.
3. Степанов М. Г., Данилова О. А. // Грузинская респ. конф. андрологов, 3-я: Материалы. — Тбилиси, 1990. — С. 56—58.
4. Clements I. A., Sawjer B. D., Cerimle B. // Endocrinology. — 1977. — Vol. 100. — P. 629—638.
5. Jones E. E. // J. Reprod. Med. — 1989. — Vol. 34, N 2. — P. 117—126.
6. Kosheleva N. G., Stepanov M. G., Savchenko O. N. et al. // Reprod. Toxicol. — 1993. — Vol. 7. — P. 505—506.
7. Lopez F., Gonzales D., Aquilar D. // Horm. Res. — 1987. — Vol. 25, N 3. — P. 160—170.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1995

УДК 615.357:577.175.642].015.4:616.831-008.9]-092.9-07

Э. С. ГЕВОРКЯН, Ж. В. ЯВОРЯН, И. Г. АРЦРУНИ, Н. Р. АКОПЯН

ДЕЙСТВИЕ ЭСТРАДИОЛА НА СОСТАВ ФОСФОИНОЗИТИДОВ СИНАПТОСОМ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

Кафедра биофизики Ереванского университета

Функционирование фосфоинозитидного механизма в клетках головного мозга высших животных контролируется рядом физиологически активных агентов, передающих свою информацию с поверхности клеток внутрь посредством этой универсальной регуляторной системы. Хотя общеизвестно, что стероидные гормоны имеют внутриклеточный тип циторецепции, данные литературы [5, 8], а также результаты наших ранних исследований [2, 3] свидетельствуют о том, что стероиды способны воздействовать на инициацию и функционирование фосфоинозитидного механизма. Функционирование фосфоинозитидного механизма наряду с другими факторами во многом зависит от содержания и соотношения полифосфоинозитидов, которые могут изменяться в зависимости от функционального статуса мембран. С этой точки зрения, изучение состава полифосфоинозитидов при воздействии гормонов, способных опосредованно (посредством регуляции биосинтетических процессов) повлиять на функциональный статус мембран, представляет определенный интерес.

В настоящей работе приводятся результаты исследования содержания моно-, ди- и трифосфоинозитидов в синапсосах головного мозга крыс на разных этапах воздействия эстрадиола *in vivo*.

Методика. Эксперименты проводили на 30 беспородных крысах-самках массой 150—200 г. 17 β -Эстрадиол (фирма "Sigma", США) вводили внутривенно в концентрации 20 мкг на 100 г массы животного. Крыс декапитировали через 1, 4 и 24 ч после введения гормона под легким эфирным наркозом. Синапсосы из головного

мозга крыс выделяли центрифугированием в градиенте сахарозы по методу F. Hayos [6]. Полифосфоинозитиды синапсосом выделяли из остатка после экстракции фосфолипидов путем избирательной кислотной экстракции [1]. Фракционирование фосфоинозитидов проводили методом микротонкослойной хроматографии на пластинках с силикагелем КСК, импрегнированных оксалатом калия (размер пластинок 6 × 6 см, толщина слоя 5—7 мкм). Для разделения использовали систему растворителей хлоро-

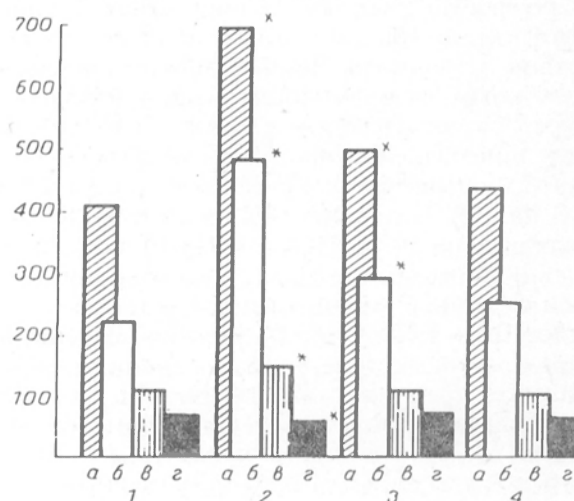


Рис. 1. Содержание фосфоинозитидов синапсосом головного мозга крыс в контроле и при воздействии эстрадиола.

1 — контроль, 2 — 1-часовое, 3 — 4-часовое, 4 — 24-часовое воздействие эстрадиола. а — общее количество фосфоинозитидов, б — монофосфоинозитиды, в — дифосфоинозитиды, г — трифосфоинозитиды. По оси ординат — содержание фосфоинозитидов (в мкг на 1 мг белка). Звездочка — $p < 0,05$.

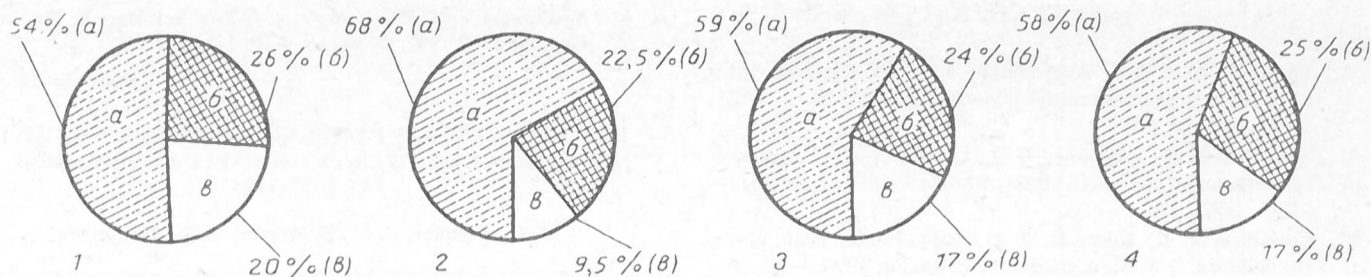


Рис. 2. Содержание отдельных фракций фосфоинозитидов в синапсосомах головного мозга крыс в контроле и при воздействии эстрадиола. Приведены средние значения из 3 серий экспериментов.

1 — контроль, 2 — 1-часовое, 3 — 4-часовое, 4 — 24-часовое воздействие эстрадиола. а — монофосфоинозитиды, б — дифосфоинозитиды, г — трифосфоинозитиды.

форм — метанол — 4N NH_4OH в соотношении 9:7:2 [1]. Количественное определение фосфоинозитидов проводили после минерализации по неорганическому фосфору [4]. Количество белка в пробах определяли по методу Lowry и соавт. [7]. Результаты экспериментов обрабатывали статистически.

Результаты и обсуждение. Наши ранние исследования [2] показали, что эстрадиол при воздействии *in vivo* (при экспозиции и концентрации, приводящих к активации биосинтетических процессов) способен повлиять на инициацию фосфоинозитидного механизма посредством изменения активности фосфатидилинозитолспецифичной фосфолипазы С. Вместе с тем хорошо известно, что инициация механизма осуществляется распадом не фосфатидилинозитола (монофосфоинозитида), а фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата (трифосфоинозитида), который образуется путем двухэтапного фосфорилирования. Следовательно, влияние гормона на иницируемость фосфоинозитидного механизма может затрагивать также его воздействие на состав полифосфоинозитидов в мембранах синапсом. На рис. 1 приведены результаты опытов, свидетельствующие о заметном изменении количества полифосфоинозитидов в синапсосомах головного мозга крыс при различных экспозициях воздействия эстрадиола. Значительное повышение общего количества фосфоинозитидов наблюдается через 1 ч после введения гормона (почти двукратное повышение содержания монофосфоинозитидов, повышение количества дифосфоинозитидов на 50%, снижение количества трифосфоинозитидов на 20%). При 4-часовой экспозиции действия гормона наблюдается повышение содержания монофосфоинозитидов и дифосфоинозитидов, в то время как 24-часовое воздействие не приводит к достоверным изменениям содержания всех трех фракций (см. рис. 1). Полученные результаты свидетельствуют о том, что воздействие эстрадиола как на первичном (1 ч), так и на раннем этапе (4 ч) приводит главным образом к повышению количества монофосфоинозитидов. Повышение содержания монофосфоинозитидов, проявляющееся ярче всего на первичном этапе воздействия эстрадиола, возникает не за счет снижения содержания ди- и трифосфоинозитидов, что, вероятно, свидетельствует об

активации синтетических процессов фосфолипидов стероидным гормоном. Наряду с этим необходимо отметить также достоверное снижение содержания трифосфоинозитидов после 1-часового воздействия гормона, что свидетельствует о заметном перераспределении полифосфоинозитидов в мембранах синапсом. На рис. 2 приведено процентное содержание полифосфоинозитидов в контроле и при различных экспозициях воздействия эстрадиола. Примечательно, что соотношение трифосфоинозитид/монофосфоинозитид снижается более чем в 2,5 раза на первичном этапе воздействия гормона, что не может не сказываться на иницируемости и функционировании фосфоинозитидного регуляторного механизма. Данное соотношение может быть своеобразным показателем статуса мембран в отношении функционирования фосфоинозитидного механизма. Полученные результаты показывают, что это соотношение в контрольных вариантах опытов составляет 0,35—0,37, в то время как при воздействии эстрадиола оно уменьшается до 0,14—0,16 (первичный этап) и до 0,27—0,28 (ранний этап).

ЛИТЕРАТУРА

1. Бергельсон Л. Д., Дятловицкая Э. В., Молотковский Ю. Г. // Препаративная биохимия липидов. — М., 1981. — С. 183—184.
2. Геворкян Э. С., Тадевосян Ю. В. // Биохимия. — 1990. — Т. 55, № 8. — С. 1381—1386.
3. Тадевосян Ю. В., Геворкян Э. С. // Укр. биохим. журн. — 1990. — Т. 62, № 4. — С. 103—106.
4. Ames B. N. // Meth. Enzymol. — 1966. — Vol. 8. — P. 115—118.
5. Grove R. J., Korach K. S. // Endocrinology. — 1987. — Vol. 121, N 3. — P. 1083—1088.
6. Hayas F. // Brain Res. — 1975. — Vol. 93, N 3. — P. 485—489.
7. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265—275.
8. Rutysky A. L., Crankshaw D. J. // Canad. J. Physiol. Pharmacol. — 1988. — Vol. 66, N 1. — P. 10—17.

Поступила 11.10.94

EFFECT OF ESTRADIOL ON RAT BRAIN SYNAPTOSOMAL PHOSPHOINOSITIDES

E. S. Gevorkyan, Zh. V. Yavroyan, I. G. Artsruni, N. R. Akopyan

Department of Biophysics, Yerevan University

The *in vivo* action of estradiol was shown to cause changes both in the total amount of phosphoinositides and their individual fractions of rat synaptosomes. The maximum elevated levels of phosphoinositides was revealed on 1-hour exposure to the hor-

М. Т. ГЕНГИН, А. Н. ВЕРНИГОРА, Н. Н. НИКИШИН, Н. В. МАКЕЕВА

ВЛИЯНИЕ КАПТОПРИЛА И РЕЗЕРПИНА НА АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ ОБМЕНА НЕЙРОПЕПТИДОВ

Кафедра химии Пензенского государственного педагогического института им. В. Г. Белинского

Каптоприл и резерпин широко используются в медицине как антигипертензивные средства. Однако механизм их действия различен. Каптоприл оказывает гипотензивное действие путем ингибирования активности ангиотензинпревращающего фермента (КФ 3.4.15.1) [9], что приводит к замедлению образования ангиотензина II [9] и к накоплению брадикинина [16], а резерпин — посредством угнетения катехоламинергической системы [17]. Оба вещества повышают уровень энкефалинов [6, 10], которые вовлекаются в регуляцию деятельности как катехоламинергической, так и пептидергических систем [8] и влияют на кровяное давление [5]. В обмене вышеуказанных пептидов, кроме ангиотензинпревращающего фермента, участвуют карбоксипептидазы Н (КФ 3.4.17.10) и N (КФ 3.4.12.7) [2].

Целью нашей работы было исследование влияния каптоприла и резерпина на активность ангиотензинпревращающего фермента, карбоксипептидаз Н и N в гипофизе, гипоталамусе, стриатуме и в сыворотке крови.

Методика. Опыты проводили на самцах белых беспородных крыс массой 150—200 г. В работе использовали 3 группы животных. Крысы 1-й группы служили контролем. Животные 2-й и 3-й групп получали в течение 10 сут с водой для питья каптоприл в дозе 25 мг/кг в сутки и резерпин в дозе 1 мг/кг в сутки соответственно.

Крыс декапитировали через 24 ч после прекращения воздействия, извлекали гипофиз, гипо-

таламус, стриатум и собирали кровь. Кровь инкубировали 30 мин при комнатной температуре и центрифугировали 20 мин при 1000 g. Низкомолекулярные нингидринположительные компоненты удаляли пропусканием сыворотки через колонку с сефадексом G-25. Отделы гомогенизировали в 50 объемах 10 mM натрий-ацетатного буфера pH 5,6, центрифугировали 60 мин при 20 000 g (4°C). Надосадочную жидкость использовали в качестве источника растворимой, а осадок (после ресуспендирования) — мембранно-связанной карбоксипептидазы Н. Активность ангиотензинпревращающего фермента определяли в гомогенате.

Активность карбоксипептидазы Н определяли по освобождению дансил—Phe—Leu из дансил—Phe—Leu—Arg при pH 5,6 как стимулируемую ионами кобальта [3]. Активность ангиотензинпревращающего фермента определяли по отщеплению Gly—Arg от карбобензоксиглицил—Gly—Gly—Arg при pH 7,6 для мозга и pH 8,2 для сыворотки как ингибируемую каптоприлом. Активность карбоксипептидазы N определяли по отщеплению аргинина от гиппурил—Arg в присутствии ионов кобальта при pH 7,6. Количество образовавшихся Gly—Arg и аргинина определяли по приросту свободных аминокетидных групп нингидриновым методом [14]. Белок определяли по Лоури [15]. Активность ферментов при воздействии резерпина и каптоприла выражали в процентах по отношению к норме.

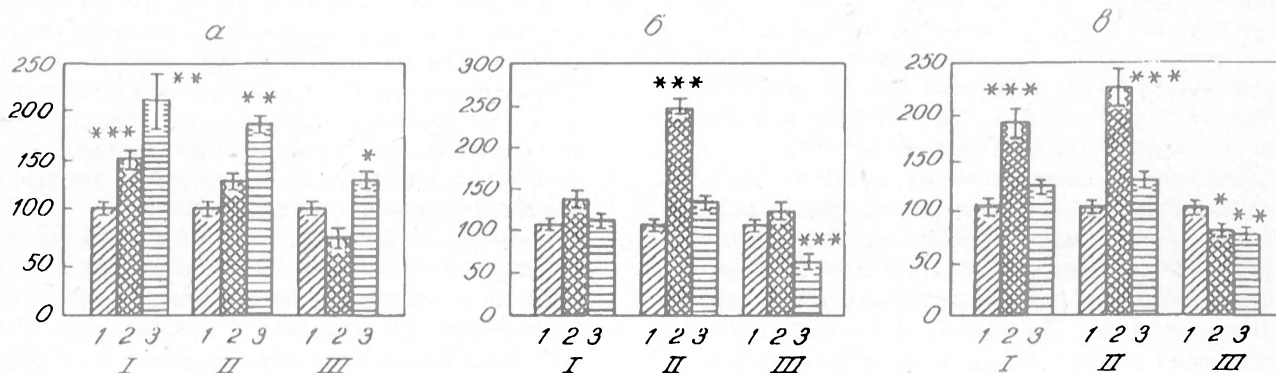


Рис. 1. Влияние каптоприла и резерпина на активность растворимой (I) и мембранно-связанной (II) форм карбоксипептидазы Н и ангиотензинпревращающего фермента (III) в гипофизе (а), гипоталамусе (б) и стриатуме (в) крыс.

Здесь и на рис. 2 по оси ординат — активность (в процентах к контролю, $M \pm m$, $n = 8-10$); 1 — контроль, 2 — резерпин, 3 — каптоприл. Одна звездочка — $p < 0,05$, две звездочки — $p < 0,01$, три звездочки — $p < 0,001$.

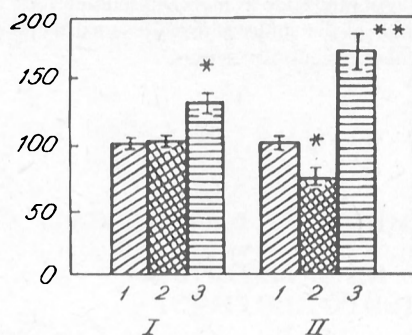


Рис. 2. Влияние каптоприла и резерпина на активность карбоксипептидазы N (I) и ангиотензинпревращающего фермента (II) в сыворотке крови крыс.

Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Активность ангиотензинпревращающего фермента при введении его высокоспецифичного ингибитора каптоприла в гипоталамусе и стриатуме снижалась по сравнению с нормой (рис. 1), в гипофизе и сыворотке — повышалась (см. рис. 1, 2). Повышение активности фермента в сыворотке и гипофизе может быть связано с тем, что при длительном потреблении каптоприла количество ангиотензинпревращающего фермента увеличивается [4], что, по-видимому, приводит к повышению его активности при отмене ингибитора.

В гипофизе при этом наблюдалось повышение активности и растворимой, и мембранно-связанной карбоксипептидазы H (см. рис. 1), а в сыворотке — повышение активности карбоксипептидазы N (см. рис. 2). *In vitro* каптоприл не оказывал влияния на активность этих ферментов (см. таблицу), т. е. влияние каптоприла на активность этих ферментов *in vivo* является опосредованным. Возможно, это связано с тем, что изменение активности ангиотензинпревращающего фермента может приводить к изменению уровня нейропептидов, в обмене которых он участвует: ангиотензина, энкефалинов, брадикинина и др. [13]. Известно, что энкефалины и брадикинин ингибируют активность соответственно карбоксипептидазы H [12] и карбоксипептидазы N [11] *in vitro*. Следовательно, изменение содержания этих биологически активных пептидов при введении каптоприла может приводить к изменению активности исследуемых ферментов.

Обращает на себя внимание сходство во влиянии каптоприла на активность ферментов в гипофизе и сыворотке, с одной стороны, и гипоталамусе и стриатуме — с другой. При этом между вышеуказанными группами наблюдались существенные отличия. Известно, что проникновение каптоприла в мозг затруднено гематоэнцефалическим барьером [1]. С другой стороны, кровоснабжение гипофиза в значительной степени отличается от кровоснабжения других отделов головного мозга, что и может объяснять выявленные отличия.

Влияние каптоприла и резерпина на активность ангиотензинпревращающего фермента и карбоксипептидаз H и N (в % к контролю) *in vitro*

Препарат	Ангиотензинпревращающий фермент	Карбоксипептидаза H	Карбоксипептидаза N
Каптоприл	0	99	106
Резерпин	86	103	93

Потребление резерпина вызывало снижение активности ангиотензинпревращающего фермента в стриатуме и сыворотке (см. рис. 1, 2). В стриатуме активность обеих форм карбоксипептидазы H была выше нормы, в гипофизе наблюдалось повышение активности растворимой формы карбоксипептидазы H, а в гипоталамусе — мембранной (см. рис. 1). *In vitro* резерпин не влиял на активность исследуемых ферментов (см. таблицу). Известно, что введение резерпина вызывает повышение содержания энкефалинов [10], т. е. снижение активности ангиотензинпревращающего фермента, участвующего в деградации энкефалинов [13], и повышение активности карбоксипептидазы H, участвующей в их образовании [2], могут способствовать повышению их уровня.

Интересно, что если в стриатуме резерпин оказывал примерно одинаковое влияние на активность растворимой и мембранно-связанной форм карбоксипептидазы H, то в гипофизе более существенно изменялась активность растворимой формы, а в гипоталамусе — мембранно-связанной. Предполагают, что растворимая и мембранно-связанная формы фермента могут выполнять различные функции и участвовать в процессинге различных пептидов [2]. В этом случае избирательное воздействие резерпина на активность растворимой и мембранно-связанной форм в различных отделах могло бы приводить к избирательному увеличению содержания тех или иных активных пептидов в этих отделах.

Таким образом, и каптоприл, и резерпин оказывают существенное влияние на активность различных ферментов обмена нейропептидов. Известно, что в регуляцию кровяного давления, кроме ангиотензина II и брадикинина, вовлекаются и другие нейропептиды, в том числе опиоидные и секреторимые пептиды гипофиза [5]. Изменение активности ферментов, участвующих в обмене этих пептидов, может приводить к изменению уровня активных форм этих пептидов в организме. Таким образом, представляется возможным, что в реализацию гипотензивного действия и каптоприла, и резерпина вовлекаются пептидергические системы, причем не только ренин-ангиотензиновая, но и другие, в частности энкефалинергическая. Однако во влиянии каптоприла и резерпина на активность исследуемых ферментов наблюдались и существенные отличия. Так, каптоприл оказывал более существенное воздействие на активность карбоксипептидазы H в гипофизе и ангиотензинпревращающего фермента, тогда как резерпин — на активность карбоксипептидазы H в гипоталамусе и стриатуме. В стриатуме и гипоталамусе содержание эн-

кефалинов, в образовании которых участвует карбоксипептидаза Н [2], существенно выше, чем в гипофизе [7], т. е. возможно, что резерпин преимущественно влияет на энкефалинергическую систему мозга, тогда как каптоприл — на ангиотензинергическую и систему секретируемых пептидов гипофиза, в обмене которых также участвует карбоксипептидаза Н [2].

ЛИТЕРАТУРА

1. Вальдман А. В., Медведев О. С. // Вестн. АМН СССР. — 1982. — № 5. — С. 14—23.
2. Вернигора А. Н., Генгин М. Т. // Укр. биохим. журнал. — 1993. — Т. 65, № 1. — С. 3—12.
3. Вернигора А. Н., Генгин М. Т., Никишин П. П. // Биохимия. — 1992. — Т. 57, № 11. — С. 1712—1719.
4. Кузнецкая Е. В., Елисеева Е. Ю., Павлихин Л. В. и др. // Бюл. экпер. биол. — 1987. — № 1. — С. 48—50.
5. Реттиг Р., Ланг Р. Е., Рауер У. и др. // Успехи физиол. наук. — 1983. — Т. 14, № 3. — С. 98—119.
6. Шварц Г. Я., Фаермарк Н. Ф. // Бюл. экпер. биол. — 1987. — № 6. — С. 692—694.
7. Янг Х.-Ю. Т., Хонг Дж. С., Фрамма В., Коста Е. // Эндорфины / Под ред. Э. Коста, М. Трабукки. — М., 1981. — С. 155—164.
8. Bloom F. E. // J. Immunol. — 1985. — Vol. 135, N 2. — P. 743—745.
9. Croog S. H., Levine S., Testa M. A. et al. // New Engl. J. Med. — 1986. — Vol. 314. — P. 1657—1664.
10. Eiden L. E., Giraud P., Affolter H. U. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1984. — Vol. 81. — P. 3949—3953.
11. Erdos E. G. Bradikinin, Kallidin and Kallikrein. — New York, 1979.
12. Hook V. Y. H., LaGamma E. F. // J. biol. Chem. — 1987. — Vol. 262, N 26. — P. 12583—12588.
13. Hooper N. M. // Int. J. Biochem. — 1991. — Vol. 16. — P. 641—647.
14. Lee P. V., Takahashi T. N. // Analyt. Biochem. — 1966. — Vol. 14, N 1. — P. 71—77.
15. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265—275.
16. McCaa R. E. // Clin. exp. Hypertens. — 1982. — Vol. A-4. — P. 1593—1594.
17. Viveros O. H., Arqueros L., Connett R. J., Kirahner N. // Mol. Pharmacol. — 1969. — Vol. 5. — P. 69—82.

Поступила 18.07.94

EFFECT OF CAPTOPRIL AND RESERPINE ON THE ACTIVITY OF SOME NEUROPEPTIDE METABOLIC ENZYMES

M. T. Gengin, A. N. Vernigora, N. N. Nikishin, N. V. Makeyeva

Department of Chemistry, V.G.Belinsky State Pedagogical Institute, Penza

Chronic consumption of the highly specific angiotension-converting enzyme inhibitor captopril was found to decrease the activity of the enzyme in the rat hypothalamus and striatum and to enhance it in the pituitary and blood serum. The agent also increased the activity of carboxypeptidase N in the serum and that of carboxypeptidase H in the pituitary. Reserpine, a catecholaminergic blocking agent, reduces the pituitary and serum activities of angiotension-converting enzyme and activates soluble carboxypeptidase H in the pituitary and striatum and membrane-bound carboxypeptidase in the hypothalamus and striatum. Possible mechanisms of action of captopril and reserpine on the activity of the enzymes in question, as well as a contribution of these enzymes to their anti-hypertensive effect are discussed in the paper.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1995

УДК 616.155.3-008.13-02:546.21]-074:543.426

В. Н. ПРОКОФЬЕВ, Л. В. МОГИЛЬНИЦКАЯ, А. И. ЛУКАШ

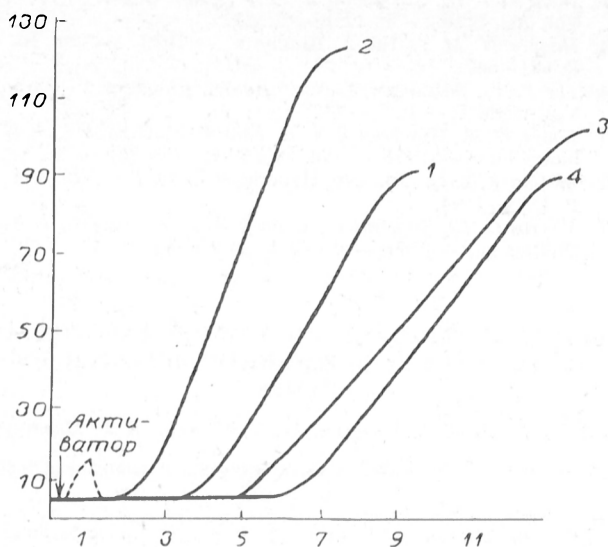
ДИНАМИКА ЛЮМИНОЛЗАВИСИМОЙ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ КРЫС ПРИ РАЗЛИЧНЫХ КИСЛОРОДНЫХ РЕЖИМАХ

НИИ биологии при Ростовском университете

В процессе фагоцитарного акта, включающего предварительную стимуляцию компетентных клеток и образование ионов гипохлорида — источника хемилюминесценции, вследствие активации мембранных фосфолипаз, выделения арахидоновой кислоты из фосфолипидов мембран и активации миелопероксидазной системы [1] происходит запуск внутриклеточных реакций по типу “дыхательного взрыва”. Внутриклеточные реакции активирования ксантиноксидаз, НАДН- и НАДФН-оксидаз и гексозомонофосфатного шунта окисления глюкозы приводят к повышенной продукции высокоактивных форм кислорода (супероксиданиона, гидроксильного радикала, синглетного кислорода, перекиси), являющихся также источниками хемилюминесценции [6]. Добавляя в систему люминол для увеличения квантового выхода реакции, регистрируют люминолзависимую хемилюминесценцию (ЛХЛ), которая достаточно адекватно отражает динамику функциональной активности лейкоцитов при фагоцитозе [16]. Образование кислородных радикалов является одним из основных механизмов, посредством которого фагоциты проявляют свою

антимикробную активность. Образующиеся в фагоцитирующей клетке активные радикалы кислорода поступают не только в фагоцитирующую вакуоль, но и в цитоплазму и наружу клетки [17, 19]. Однако их содержание регулируется специфическими и неспецифическими компонентами антиоксидантной системы крови. Признано, что плазма крови обладает довольно высокой ферментативной и неферментативной активностью [3].

Развитие процессов, сопровождающихся активацией систем образования активных форм кислорода, приводит к напряжению систем антиоксидантной защиты, в результате чего при наличии дополнительных внешних факторов могут возникать нарушения регуляции окислительных процессов. Мощное активирование свободнорадикальных процессов, сопровождающееся нарушением структуры и свойств биомембран, выявлено как при дыхании чистым кислородом под давлением — гипероксии [10], так и при его пониженной концентрации во вдыхаемом воздухе — гипоксии [15]. Представляет существенный практический интерес выяснение специфики от-



Динамика АХЛ цельной крови крыс.

1 — контроль, 2 — гипоксия, 3 — гипероксия, 4 — совместное действие гипоксии и гипероксии.

По оси абсцисс — время (в с · 10²); по оси ординат — высота вспышки (в мм).

вета клеточных элементов крови, ответственных и в норме за генерацию активированных кислородных метаболитов, как при избытке, так и при недостатке кислорода.

В связи с изложенным задачей данной работы явилось изучение показателей ЛХЛ цельной крови крыс после предварительного выдерживания животных в условиях гипо- и гипероксии, а также при их последовательном воздействии.

Методика. Объектом исследования служили 4 группы белых крыс массой 180—200 г. Гипоксическую гипоксию вызывали в камере проточного типа путем "подъема" животных на высоту 9000 м над уровнем моря (0,029 МПа) со скоростью компрессии и декомпрессии 0,005 МПа/мин, экспозиция — 3 ч (1-я группа). Повышенное давление чистого медицинского кислорода (0,3 МПа) создавали в барокамере, снабженной щелочным поглотителем углекислоты, при режиме компрессии и декомпрессии 0,1 МПа/мин, экспозиция — 2 ч (2-я группа). Каждые 15 мин барокамеру продували током кислорода. Животных 3-й группы сразу же после

сеанса гипоксии подвергали воздействию кислорода в том же режиме, что и 2-й группы. Животных контрольной (4-й) группы выдерживали аналогичные сроки в закрытых камерах при нормоксии.

Животных декапитировали и собирали оттекающую кровь в бюксы с гепарином (20 МЕ гепарина на 1 мл крови). 0,05 мл цельной крови переносили в силиконизированную кювету с системой для хемилюминесцентного анализа, содержащую 2,9 мл раствора Хенкса pH 7,4 без красителя с 0,1% глюкозой, 0,01 мл раствора люминола, 0,02 мл взвеси дрожжей. Люминол (5-амино-2,3-дигидрофалазиндион-1,4) марки х. ч. был очищен многократной перекристаллизацией в HCl и растворен в концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ М в 0,5% деметилсульфоксиде. Дрожжи (*Saccharomyces cerevisial*), предварительно инактивированные при 60°C в течение 1 ч, разводили раствором Хенкса до концентрации $2 \cdot 10^8$ кл/мл.

Подготовленные сх темпогра образцы помещали в термостатированное (37°C) кюветное отделение хемилюминесметра, разработанного в лаборатории на базе сцинтилляционного спектрометра 22028 (RFT, ГДР). В качестве детектора был применен ФЭУ-37, являющийся одним из наиболее пригодных для регистрации сверхслабой хемилюминесценции по заданной плотности излучения [4]. Выходной сигнал ФЭУ измеряли методом счета фотонов — наиболее эффективным методом регистрации световых потоков [14]. Измерение проводили при непрерывном перемешивании содержимого кюветы.

Динамику метаболических изменений клеток оценивали по следующим параметрам: длительности латентного периода до начала развития медленной вспышки (в с), светосумме медленной вспышки до достижения максимума свечения (в отн. ед.), высоте медленной вспышки (в мм), времени развития максимального уровня свечения от начала медленной вспышки (в с).

Полученные результаты обрабатывали статистически, используя критерий *t* Стьюдента [8].

Результаты и обсуждение. Результаты исследований активированной хемилюминесценции (АХЛ) крови представлены на рисунке и в таблице. Было выявлено, что в некоторых слу-

Показатели активированной дрожжами хемилюминесценции цельной крови крыс

Показатель	Контроль (1)	Гипоксия (2)	Гипероксия (3)	Гипоксия + гипероксия (4)
Длительность латентного периода, с	412,5 ± 51,7 (16)	237,5 ± 17,97 (16) $p_{1-2} < 0,01$	460,0 ± 51,5 (10) $p_{2-3} < 0,001$	668,18 ± 76,1 (11) $p_{1-4} < 0,01$ $p_{2-4} < 0,001$ $p_{3-4} < 0,05$
Светосумма медленной вспышки, отн. ед.	159,0 ± 30,8 (14)	163,1 ± 21,8 (14)	207,9 ± 19,2 (8)	170,5 ± 19,02 (10)
Высота вспышки, мм	88,8 ± 14,5 (14)	120,1 ± 17,9 (14)	97,7 ± 11,0 (9)	89,0 ± 9,9 (8)
Время выхода на пик свечения, с	900,0 ± 121,7 (16)	693,8 ± 54,4 (16)	1370,0 ± 112,6 (10) $p_{1-3} < 0,01$ $p_{2-3} < 0,001$	1245,5 ± 96,6 (11) $p_{1-4} < 0,05$ $p_{2-4} < 0,001$

Примечание. В скобках — число животных.

чаях через 1—2 мин после инициации хемилюминесцентного ответа на кривой появляется слабый первый пик свечения (на рисунке обозначен пунктиром). Однако интенсивность свечения в максимуме практически не выделялась на уровне фона. Подобная быстрая реакция, наступающая практически сразу после внесения активатора, обусловлена только стимуляцией мембранного метаболизма с образованием ионов гипохлорида как фактора свечения. Поскольку, по данным ряда авторов [1, 2, 7], она включается лишь в присутствии миелопероксидазы, можно полагать, что примененные нами в качестве активатора хемилюминесцентной реакции дрожжевые клетки являются менее эффективными на первой стадии активирования клеток, чем, например, опсонизированные частицы зимозана [1, 5].

Повторный, более длительный рост уровня свечения, выявленный нами на 5—10-й минуте контакта, следует рассматривать как результат активации внутриклеточных окислительных реакций, которые завершаются продукцией высокоактивных форм кислорода, являющихся источником свечения.

Нами установлено, что выдерживание животных в гипоксических условиях приводит к достоверному снижению (на 42%) длительности латентного периода. Поскольку 90% АХЛ определяются реактивностью нейтрофильных лейкоцитов [11], сокращение периода выхода на пик свечения может свидетельствовать об их активации. Однако достоверных изменений по остальным параметрам хемилюминесцентного ответа не выявлено (см. таблицу). Это хорошо согласуется с многочисленными биохимическими данными, свидетельствующими, что гипоксия является не патологическим процессом, а скорее адаптивной перестройкой метаболизма на другой уровень обмена [12].

Иная картина хемилюминесцентного ответа цельной крови выявлена при воздействии на крыс 0,3 МПа кислорода в течение 120 мин. Наряду с некоторым увеличением длины латентного периода (см. рисунок и таблицу), достоверным по отношению к гипоксии, на 52% увеличивается время выхода на пик свечения медленной вспышки. Запоздывание ответа нейтрофилов на стимуляцию дрожжевыми клетками при гипероксии свидетельствует о повышении порога их чувствительности к чужеродным агентам. Это может происходить за счет как возможной модификации структуры клеточной мембраны, так и изменения активности НАДФН-оксидантной системы [13]. Отсутствие достоверных изменений как в светосумме, так и в высоте медленной вспышки хемилюминесценции по отношению к контролю и гипоксической серии указывает на вовлечение в процесс всего пула фагоцитирующих нейтрофилов. Представляется маловероятным изменение структуры популяции клеток за столь короткий срок воздействия, поскольку максимальная активность пероксидазной системы выявлена лишь в зрелых лейкоцитах,

период созревания которых не менее 14 дней [18].

Особый интерес в теоретическом и практическом отношении представляет исследование фагоцитирующих клеток при последовательном воздействии на организм гипоксии и гипероксии. К настоящему времени установлены принципиальные различия в действии кислорода на здоровый и пребывающий в состоянии гипоксии организм. В последнем случае, который как раз и является главным показателем для проведения гипербарической оксигенации, возможно проявление эффектов реоксигенационной активации кислородзависимых свободнорадикальных процессов. Ранее было показано, что предварительное гипоксическое воздействие снижает токсический эффект кислорода, в то время как реоксигенация с использованием терапевтических режимов гипероксии сопровождается активацией свободнорадикальных процессов [9]. Нами установлено, что при последовательном воздействии гипоксии и гипероксии происходит резкое угнетение процесса активирования нейтрофильных лейкоцитов, проявляющееся в удлинении на 62% латентного периода и на 38% времени выхода на пик свечения (см. таблицу). По-видимому, на фоне гипоксии кислород под давлением оказывает более мощное повреждающее воздействие на фагоцитирующие клетки, блокируя процесс их активации.

Таким образом, поскольку реактивность организма тесно связана с функциональным состоянием клеток, ответственных за процесс инактивации чужеродных компонентов, показатели хемилюминесцентного ответа клеток крови при их активировании могут быть использованы для диагностики и коррекции проводимого лечения. Представленные данные указывают на необходимость учета возможности снижения фагоцитоза в случаях передозировки кислорода при гипербарической оксигенации и гипоксических состояниях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бакуев М. М., Саидов М. З., Зурхаева Р. З. // Иммунология. — 1993. — № 1. — С. 55—56.
2. Говорова М. Г. // Биохимия. — 1987. — № 6. — С. 1670—1676.
3. Дубинина Е. Е. // Укр. биохим. журн. — 1992. — Т. 64, № 2. — С. 3—15.
4. Жеребин Ю. П., Сава В. М. // Приборы и техника эксперимента. — 1980. — № 6. — С. 133—135.
5. Зенков П. К., Куликов В. Ю. // Бюл. Сиб. отд. АН СССР. — 1987. — № 5. — С. 107—108.
6. Калмыков С. В., Романовская В. Г., Фиалковский В. И. // Лаб. дело. — 1989. — № 11. — С. 72—73.
7. Караулов А. В. // Иммунология. — 1986. — № 6. — С. 75—76.
8. Лакин А. М. Биометрия. — М., 1968.
9. Левин А. М., Внуков В. В. // Науч. докл. высш. школы. Биол. науки. — 1986. — № 1. — С. 57—60.
10. Лукаш А. И., Внуков В. В., Прокофьев В. П. и др. // Физиол. журн. — 1991. — Т. 37, № 4. — С. 108—115.
11. Маянский А. П., Певмятуллин А. Л., Чеботарь И. В. // Журн. микробиол. — 1987. — № 6. — С. 109—115.

12. Пагнибеда П. П. // Адаптация и резистентность организма в условиях гор. — Киев, 1986. — С. 65—76.
13. Роговин В. В., Фролова В. М. // Цитология. — 1982. — № 9. — С. 1045—1049.
14. Серкиз Я. И., Дружинина Н. А., Хриенко А. П. Хемилиуминесценция крови при радиационном воздействии. — Киев, 1989.
15. Сутковой Д. А., Барабой В. А. // Адаптация и резистентность организма в условиях гор. — Киев, 1986. — С. 96—104.
16. Allen R. S. // Bioluminescence and Chemiluminescence / Eds M. A. DeLuca, W. D. Mc Elroy. — New York, 1986. — Pt B. — P. 449—492.
17. Babior B. M., Kipnes R. S., Curnutte Y. T. et al. // Clin. Res. — 1978. — Vol. 26, N 3. — P. 502A.
18. Cartwright G. E., Athens Y. W., Wintrobe M. U. // Blood. — 1964. — Vol. 24. — P. 780—803.
19. Roas D., Weening R. S. // Oxygen Free Radicals and Tissue Damage. — Amsterdam, 1979. — P. 225—262.

Поступила 26.06.94

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1995

УДК 615.212.015.2.07

Н. А. СТАНИСЛАВЧУК, А. А. ПЕНТЮК, В. К. ГОРШКОВ,
Н. А. ПЕНТЮК

ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ТИАМИНА И РИБОФЛАВИНА НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ МЕТАБОЛИЗМА КСЕНОБИОТИКОВ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ АНАЛЬГЕТИКОВ

Винницкий государственный медицинский университет им. Н. И. Пирогова

Метаболизм многих лекарственных веществ сопровождается изменением их фармакологической активности вследствие образования биологически неактивных или, напротив, реакционноспособных метаболитов. Активность ферментных систем, осуществляющих метаболизм ксенобиотиков, находится под контролем различных эндо- и экзогенных факторов. В ряде работ показано, что недостаточность или дополнительное введение некоторых витаминов, в том числе тиамин и рибофлавин, сопровождается изменением активности ферментов метаболизма ксенобиотиков и биотрансформации последних [1—3, 5, 7, 10]. Вместе с тем мало исследованы механизмы влияния рибофлавина и тиамина на ферменты метаболизма ксенобиотиков и неясно, в какой мере модулирование активности ферментов будет отражаться на биологической активности ксенобиотиков. Выяснение этих вопросов позволило бы более рационально использовать препараты тиамина и рибофлавина в качестве средств коррекции фармакологической активности лекарственных препаратов.

Целью работы явилось изучение влияния дефицита и дополнительного введения тиамина и рибофлавина на активность ферментов метаболизма ксенобиотиков и фармакологический эффект ортофена, индометацина, напроксена и трамала.

Методика. Опыты проведены на 432 крысах популяции Вистар массой 50—220 г. Для создания недостаточности витаминов крысы содержали на полусинтетическом тиаминдефицитном

TIME COURSE OF LUMINOL-DEPENDENT CHEMILUMINESCENCE OF RAT WHOLE BLOOD UNDER VARIOUS OXYGEN CONDITIONS

V. N. Prokofyev, L. V. Mogilnitskaya, A. I. Lukash

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

Chemiluminescence analysis was used to examine the yeast cell-activation of rat whole blood neutrophilic leukocytes in rats after their pre-exposure to 3-hour hypoxia (9,000 m above sea level) and two-hour hyperoxia (0.3 MPa), as well as their resultant effects. The hypoxia was found to cause a significant (42%) reduction in the length of the latent period, suggesting that it activates the phagocytic activity of neutrophilic leukocytes. At the same time hyperoxia leads to a delayed response of competent cells to yeast cell stimulation. On subsequent exposure to hypoxia and hyperoxia, drastic inhibition of drastic cellular activation occurred, which manifested itself by a 62% increase in the length of the latent period and by a 38% rise in the appearance time of luminescence peak. Thus, the findings suggest that it is essential to bear in mind the fact that phagocytosis can decrease if oxygen is overdosed during hyperbaric oxygenation and in hypoxic states.

или рибофлавиндефицитном рационе, как это было описано нами ранее [2, 3]. Избыток тиамина создавали пероральным введением в течение 15 дней тиамин-бромид в дозе 20 мг/кг. В отдельных опытах крысам вводили внутривенно тиаминдифосфат в дозе 10 мг/кг в течение 7 дней. Избыток рибофлавина и флавиномононуклеотида создавали их внутривенным введением в дозах 2 и 4 мг/кг в течение недели.

Методы выделения микросомной фракции печени и определения активности гидроксилазы, деметилазы, NADH-редуктазы (КФ 1.6.2.2) и NADPH-редуктазы (КФ 1.6.2.4) дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ), арилэстеразы (КФ 3.1.1.2) и алиэстеразы (КФ 3.1.1.1) описаны нами ранее [1, 2].

В опытах *in vitro* микросомную фракцию печени крыс инкубировали с тиамин-бромидом, тиаминмонофосфатом (ТМФ), тиаминдифосфатом (ТДФ), 4-метил-5β-оксиатазолом, флавиномононуклеотидом (ФМН) и флавинаденидинуклеотидом (ФАД) в течение 30 мин и после этого проводили определение активности фермента. Минимальные концентрации коферментных форм витаминов примерно соответствовали таковым в тканях.

Противовоспалительное действие ортофена, индометацина и напроксена оценивали на модели адъювантного артрита, который вызывали субплантарным введением 0,1 мл полного адъюванта Фрейнда, содержащего 0,5 мг убитой вакцины БЦЖ на вазелиновом масле с ланолином. Измеряли объем пораженной конечности и по-

Влияние дефицита и дополнительного введения тиамина и рибофлавина на активность (в нмоль/мин на 1 мг белка) ферментов метаболизма ксенобиотиков в микросомной фракции печени крыс ($n = 6-28$, $M \pm m$)

Состояние	Деметилаза	Гидроксилаза	NADH-редуктаза ДХФИФ	NADPH-редуктаза ДХФИФ	Арилэстераза	Алиэстераза
Контроль	3,91 \pm 0,22	0,49 \pm 0,013	61,5 \pm 3,4	44,3 \pm 2,4	919 \pm 38	253 \pm 20
Дефицит тиамина	5,31 \pm 0,29*	0,66 \pm 0,025*	62,7 \pm 2,7	53,3 \pm 1,6*	1164 \pm 51*	289 \pm 24
Избыток тиамина	3,38 \pm 0,36	0,31 \pm 0,027*	48,9 \pm 4,2*	33,2 \pm 2,3*	757 \pm 50*	209 \pm 24
Контроль	4,90 \pm 0,17	0,58 \pm 0,032	73,6 \pm 2,8	50,7 \pm 3,5	1170 \pm 45	348 \pm 8,4
Дефицит рибофлавина	5,24 \pm 0,53	0,41 \pm 0,015*	47,7 \pm 2,0*	35,4 \pm 2,6*	1039 \pm 39*	270 \pm 17,1
Избыток рибофлавина	6,09 \pm 0,31*	0,71 \pm 0,028*	95,6 \pm 3,0*	59,5 \pm 2,8	1354 \pm 45*	469 \pm 20,0*
Введение ФМН	6,21 \pm 0,27*	0,74 \pm 0,029*	94,3 \pm 4,7*	66,1 \pm 3,8*	1499 \pm 95*	511 \pm 26,0*

Примечание. Звездочка — различия по сравнению с соответствующим контролем достоверны.

рог болевой чувствительности [6]. Ортофен, индометацин, напроксен вводили внутривенно (в дозах 7, 5 и 50 мг/кг) один раз в сутки на протяжении 5 дней.

В работе использовали NADH, NADPH фирмы "Reanal", ФАД фирмы "Serva", 4-метил-5 β -окситиазол, ТМФ фирмы "Sigma". Остальные реактивы и препараты были производства стран СНГ.

Результаты и обсуждение. При дефиците тиамина активность деметилазы, гидроксилазы, редуктаз, эстераз (табл. 1) повышалась, а дополнительное его введение приводило к угнетению их активности. Дефицит рибофлавина, напротив, сопровождался падением активности указанных ферментов, тогда как дополнительное введение рибофлавина и ФМН повышало их активность. При этом эффект ФМН превосходил таковой рибофлавина.

Для выяснения механизма модифицирующего действия тиамина и рибофлавина на активность ферментов метаболизма ксенобиотиков проведено исследование *in vitro*. Тиамин и его производные оказывали ингибирующее влияние на активность гидроксилазы и деметилазы (табл. 2). В меньшей мере подавлялась активность NADH-редуктазы. Наиболее выраженное ингибирующее действие оказывали фосфорилированные формы тиамина — ТМФ и особенно ТДФ. Фрагмент молекулы тиамина 4-метил-5 β -окситиазол оказывал незначительное действие. Ингибирующее действие производных тиамина было более сильным в том случае, если они прибавлялись к микросомам, выделенным из печени тиаминдефицитных животных. Так, ТДФ в концентрации 150 нмоль/мл уменьшал активность деметилазы у контрольных крыс до 45,8 \pm 3,0%, а у тиаминдефицитных — до 36,6 \pm 2,9%.

Прибавление в инкубационную среду ФАД и ФМН вызывало дозозависимое повышение активности микросомальных ферментов. При этом оказалось, что эффект коферментов выражен в большей мере у рибофлавиндефицитных животных. Так, например, у контрольных крыс ФМН в концентрации 57,5 нмоль/мл повышал активность NADH-редуктазы на 27,7%, тогда как у рибофлавиндефицитных крыс — на 39,2%.

Таблица 2

Влияние производных тиамина и рибофлавина на активность микросомальных ферментов в опытах *in vitro* (в % к исходной активности, $n = 5-6$, $M \pm m$)

Концентрация, нмоль/мл	Деметилаза	Гидроксилаза	NADH-редуктаза
Контроль	100,0 \pm 3,0	100,0 \pm 1,6	100,0 \pm 2,0
<i>4-Метил-5β-окситиазол</i>			
13,8	101,0 \pm 0,9	100,4 \pm 0,9	100,9 \pm 1,2
138	95,9 \pm 1,3	88,7 \pm 1,6*	97,2 \pm 1,2
1380	85,9 \pm 3,9*	54,9 \pm 4,3*	94,1 \pm 1,1*
<i>Тиамин-бромид</i>			
13,8	99,5 \pm 0,8	93,6 \pm 1,4	99,0 \pm 1,4
138	88,5 \pm 3,3*	60,8 \pm 1,9*	90,5 \pm 2,6*
1380	37,4 \pm 3,3*	18,1 \pm 1,6*	63,5 \pm 7,2*
<i>ТМФ</i>			
13,8	99,2 \pm 1,3	88,9 \pm 2,0*	97,6 \pm 1,6
138	82,0 \pm 3,3*	50,5 \pm 2,6*	86,7 \pm 1,9*
1380	32,9 \pm 2,7*	12,2 \pm 1,4*	78,6 \pm 2,6*
<i>ТДФ</i>			
13,8	97,9 \pm 2,0	80,2 \pm 1,9*	95,5 \pm 1,1
138	64,0 \pm 3,5*	24,4 \pm 2,6*	82,6 \pm 0,7*
1380	9,8 \pm 1,3*	1,8 \pm 0,9*	53,8 \pm 5,7*
<i>ФМН</i>			
5,75	107,1 \pm 2,2	-	103,1 \pm 1,2
37,85	113,9 \pm 1,9*	110,0 \pm 1,8*	118,2 \pm 2,3
57,5	119,3 \pm 2,8*	-	127,7 \pm 3,8
<i>ФАД</i>			
5,75	107,2 \pm 2,9	-	104,9 \pm 2,0
37,85	116,7 \pm 2,4*	114,0 \pm 3,5*	112,0 \pm 1,3
57,5	118,9 \pm 2,5*	-	113,8 \pm 2,3

Примечание. Звездочка — различия по отношению к контролю достоверны.

Возможно, коферментные формы тиамина выполняют роль отрицательного аллостерического регулятора активности мембранно-связанных ферментов метаболизма ксенобиотиков. По-видимому, этим можно объяснить активацию ферментов при дефиците тиамина и снижение активности при его дополнительном введении.

Таблица 3

Влияние дефицита тиамина и рибофлавина и дополнительного введения их коферментных форм (ТДФ и ФМН) на противовоспалительный эффект ортофена у крыс ($M \pm m$)

Условия исследования	Динамика адьювантного артрита, %	
	отек конечности	болевая чувствительность
Артрит	119 \pm 1,6	164 \pm 4,5
Артрит + ортофен	95 \pm 1,0	106 \pm 3,0
Артрит + ТДФ	111 \pm 1,8	143 \pm 4,2
Артрит + ТДФ + ортофен	81 \pm 1,4*	82 \pm 3,0*
Артрит + ФМН	114 \pm 1,5	146 \pm 6,2
Артрит + ФМН + ортофен	94 \pm 1,4	104 \pm 4,3
Артрит	121 \pm 1,7	170 \pm 6,5
Артрит + ортофен	93 \pm 1,3	102 \pm 2,5
Артрит + дефицит тиамина	121 \pm 2,0	180 \pm 7,5
Артрит + дефицит тиамина + ортофен	99 \pm 1,5*	126 \pm 4,2*
Артрит + дефицит рибофлавина	119 \pm 1,6	188 \pm 8,5
Артрит + дефицит рибофлавина + ортофен	85 \pm 1,8*	88 \pm 2,4*

Примечание. Звездочка — различия по отношению к соответствующей группе "артрит + ортофен" достоверны; объем конечности и болевая чувствительность до лечения приняты за 100%.

Исследования *in vitro* подтвердили наличие у производных тиамин ингибирующего действия по отношению к исследуемым ферментам и выявили, что максимальный тормозящий эффект дает коферментная форма — ТДФ, а наименьший — фрагмент молекулы тиамин. Падение активности микросомальных монооксигеназ и редуктаз у рибофлавиндефицитных животных объясняется тем, что рибофлавин является предшественником ФМН и ФАД, которые служат коферментами NADH- и NADPH-редуктаз, а эти ферменты обеспечивают функционирование микросомальных монооксигеназ. Повышение активности NADH-редуктазы при добавлении ФМН и ФАД в инкубационную среду можно объяснить насыщением апофермента недостающим коферментом с образованием активной молекулы фермента. Повышение функциональной активности редуктаз в свою очередь облегчает работу монооксигеназного комплекса. Не исключено, что причина активирующего действия ФМН и ФАД по отношению к деметилазе и гидроксилазе объясняется тем, что флавины легко и даже без участия ферментов образуют с молекулярным кислородом гидропероксиды [8], которые являются гидроксилирующими агентами в реакциях, катализируемых цитохромом P-450. Влияние дефицита рибофлавина и дополнительного введения рибофлавина и ФМН на активность эстераз, для которых этот витамин не выполняет коферментных функций, вероятно, реализуется через модулирование гидрофобного окружения ферментов, поскольку рибофлавин контролирует липидный состав мембран [9].

Как известно, ортофен (диклофенак натрия) в организме подвергается гидроксилированию с образованием фармакологически неактивных метаболитов. Как оказалось, введение животным ТДФ или ФМН незначительно тормозило разви-

тие адьювантной болезни у крыс, а дефицит тиамин и рибофлавина несколько его усиливал. Введение ТДФ потенцировало, а дефицит тиамин ослаблял противовоспалительное и анальгетическое действие ортофена (табл. 3). Введение ФМН ослабляло эффект ортофена, в то же время дефицит рибофлавина повышал его противовоспалительную активность. Потенцирование фармакологического действия ортофена под влиянием ТДФ или дефицита рибофлавина совпадает со снижением активности микросомальных монооксигеназ и обусловлено замедлением превращения ортофена в неактивные метаболиты. Это предположение было подтверждено определением в крови неизменной (фармакологически активной) формы ортофена у животных, получавших ТДФ [4]. Что же касается ФМН, то введение животным этого кофермента ускоряет элиминацию активной формы ортофена из крови крыс. Так, например, через 6 ч после внутрижелудочного введения 30 мг/кг ортофена в крови контрольных крыс содержание неизменной формы ортофена составляло $1,3 \pm 0,17$ мкг/мл, а у крыс, получавших ФМН, — только $0,6 \pm 0,11$ ($p < 0,05$). Период полужизни ортофена возрос в 1,5 раза.

Ненаркотический анальгетик и нестероидные противовоспалительные препараты индометацин и напроксен объединены общими путями биотрансформации. Все препараты подвергаются деметилированию, а их деметильные метаболиты лишены фармакологической активности.

Введение ТДФ усиливало противовоспалительную активность индометацина и напроксена у крыс с адьювантным артритом. Причем, потенцирующий эффект в большей степени проявлялся в отношении индометацина, что, вероятно, связано с более коротким периодом полувыведения препарата, удлинение которого под влиянием ТДФ и обеспечило усиление его активности. Аналогичную направленность имела и динамика анальгетического эффекта трамала под влиянием ТДФ.

Таким образом, дефицит тиамин и рибофлавина, как и введение витаминов или их коферментных форм, оказывает разнонаправленное влияние на активность ферментов метаболизма ксенобиотиков, что отражается на фармакокинетике и фармакологическом эффекте лекарственных веществ, метаболизм которых протекает с участием этих ферментов. Проведенные исследования создают экспериментальную основу для рационального использования витаминных препаратов в качестве средств целенаправленной коррекции фармакологического эффекта анальгетиков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Богданов Н. П., Пендюк А. А., Гуцол В. И., Луцук Н. Б. // Биохимия. — 1986. — Т. 51, № 2. — С. 242—248.
2. Лычик Г. З., Пендюк А. А., Луцук Н. Б. // Укр. биохим. журн. — 1987. — Т. 59. — № 5. — С. 55—60.

3. Личко А. П., Пентюк А. А., Луцкий П. Б. // Там же. — № 1. — С. 44—49.
4. Пентюк А. А., Станиславчук П. А., Борисенко Б. А. // Фармакол. и токсикол. — 1989. — № 4. — С. 61—64.
5. Пентюк А. А., Яковлева О. А., Коновалова Г. Г., Ланкин В. З. // Биохимия. — 1987. — Т. 52, № 6. — С. 1009—1012.
6. Тринус Ф. П. Нестероидные противовоспалительные средства. — Киев, 1975.
7. Ichikawa W., Hamamoto T., Arijoshi T., Mitsuc A. // J. Pharm. Dyn. — 1984. — Vol. 7, N 4. — P. 73—82.
8. Muller P. // Radicals in Biochemistry. — Berlin, 1983. — P. 71—107.
9. Taniguchi M., Yamamoto T., Nakamura M. // J. Nutr. Sci. Vitaminol. — 1978. — Vol. 24, N 4. — P. 363—381.
10. Wang T., Niller K. W., Tu J., Yang C. S. // J. nat. Cancer Inst. — 1985. — Vol. 74, N 6. — P. 1291—1297.

Поступила 10.12.94

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1995

УДК 616.36+616.831-018.1-02:577.175.444]-092.9-07

Я. Х. ТУРАКУЛОВ, С. Н. ДАЛИМОВА, И. Р. КАМАЛИЕВА,
П. П. ПАТХИТДИНОВ, Ф. К. АБДУРАЗЗАКОВА

РЕГУЛЯЦИЯ ТИРОКСИНОМ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ И ГОЛОВНОГО МОЗГА РАЗВИВАЮЩИХСЯ КРЫС И УЧАСТИЕ В ЭТОМ ПРОЦЕССЕ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ БЕЛКОВЫХ ФАКТОРОВ

Институт биохимии АН Республики Узбекистан, Ташкент

В настоящее время общепризнано, что регуляция клеточного метаболизма, осуществляемая гормонами щитовидной железы, связана с их влиянием как на генетический аппарат клеток, так и на процессы, протекающие в митохондриях. Имеется большое количество работ, посвященных действию тироксина и трийодтиронина на окислительное фосфорилирование, транспорт ионов, некоторые реакции обмена [7, 13] и на АТФазную активность митохондрий [6], причем установлено, что действие тиреоидных гормонов на митохондрии опосредовано специфическими гормонсвязывающими белками, локализованными в цитоплазме [8]. Одним из таких белков является обнаруженный и выделенный нами ранее [2, 3] белок из цитоплазмы печени и головного мозга взрослых крыс, условно названный модулятором действия тироксина — МДТ₄ (в связи со способностью модулировать ряд эффектов гормона). С помощью метода гель-фильтрации, электрофоретических методов и анализа аминокислотного и липидного состава модулятор был идентифицирован как гликопротеин с молекулярной массой 24 кДа, способный связывать меченный ¹²⁵I Т₄ в чрезвычайно низких концентрациях (K_d $1,3 \cdot 10^{10}$ М⁻¹) [4]. Было установлено [5] участие модулятора в стимуляции тироксином активности РНК-полимеразы ядер клеток печени и головного мозга крыс в ранние сроки постнатального периода их жизни.

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния физиологической (10^{-8} М) кон-

THE EFFECTS OF THIAMINE AND RIBOFLAVIN DERIVATIVES ON THE ENZYMATIC ACTIVITY OF XENOBIOTIC METABOLISM AND THE PHARMACOLOGICAL EFFECT OF ANALGETICS

N. A. Stanislavchuk, A. A. Pentyuk, V. K. Gorshkov, N. A. Pentyuk

N. I. Pirogov State Medical University, Vinnitsa

Riboflavin deficiency decreases the activity of rat hepatic microsomal enzymes, addition of riboflavin and flavin mononucleotide stimulates their activity. At the same time thiamine deficiency induces xenobiotic metabolic enzymes and excessive addition of thiamine, thiamine diphosphate in particular, suppresses their activity. Flavin mononucleotide and thiamine diphosphate considerably modify the pharmacological effect of the agents which are actively metabolized by the hepatic microsomal system. Thiamine diphosphate enhances the pharmacological activities of ortophen, indomethacin, and tramal while flavin mononucleotide slightly diminishes them.

центрации тироксина (Т₄) и МДТ₄ на синтез белков, дыхание и параметры окислительного фосфорилирования митохондрий печени и головного мозга развивающихся крыс.

Методика. Опыты проводили на 7, 20, 90-дневных крысах линии Вистар. Митохондрии и МДТ₄ из печени и головного мозга интактных и гипертиреоидных крыс различного возраста выделяли по ранее описанным методам [2, 3]. Гипертиреоидное состояние у 7-дневных крыс вызывали введением L-тироксина (фирма "Reanal", Венгрия) в дозе 0,5 мкг/г на 13-й день беременности в течение 7 дней. Гипертериоз у 20- и 90-дневных крыс вызывали введением гормона в течение недели в дозе 1 мкг/г за 7 дней до забоя. О синтезе белков в митохондриях печени и головного мозга судили по включению ¹⁴C-L-лейцина в белки митохондрий. Изолированные митохондрии (1—2 мг/мл) инкубировали с 250 мкл белоксинтезирующей смеси, содержащей 4 мМ трис-НСl pH 6,9, 30 мМ KCl, 20 мМ калий-фосфатного буфера, 20 мМ MgCl₂, 10 мМ фосфоэнолпирувата, 60 мкг/мл пируваткиназы, 10 мМ α-кетоглутарата, 120 мМ маннитола, 2 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 4 мМ АТФ, 0,2 мМ смеси немеченых аминокислот, 0,01 мкКи/мл ¹⁴C-L-лейцина и 100 мкг (100 мкл) МДТ₄. Время инкубации 50 мин при 36°C. После инкубации во все пробы добавляли по 500 мкл 10% охлажденной трихлоруксусной кислоты (ТХУК), затем осадки переносили на миллипоровые фильтры (фирма "Synpor", Чехословакия),

Таблица 1
Влияние T_4 и $МДТ_4$ на синтез (включение ^{14}C -лейцина в белки, имп/мин на 1 мг белка) белков митохондрий печени и головного мозга крыс разного возраста ($n=10$; $M \pm m$)

Условия эксперимента	День развития		
	7-й	20-й	90-й
Головной мозг			
Контроль	1945 \pm 29	2097 \pm 101	2639 \pm 175
T_4	2107 \pm 93	2369 \pm 95	2876 \pm 143
$МДТ_4$	4862 \pm 230*	4802 \pm 175*	2770 \pm 102
Печень			
Контроль	2294 \pm 145	2867 \pm 190	3310 \pm 245
T_4	2501 \pm 101	3225 \pm 201	3674 \pm 314
$МДТ_4$	3785 \pm 174*	6021 \pm 254*	8857 \pm 359*

Примечание. Звездочка — достоверность различий по сравнению с контролем ($p < 0,001$).

после промывания фильтров 5% ТХУК и 85% этанолом подсчитывали радиоактивность проб на сцинтилляционном счетчике LKB (Швеция), Rack Beta-1217. В качестве контроля на отсутствие загрязнения препаратов митохондрий блоксинтезирующей системы цитоплазмы использовали циклогексимид (0,5 мМ) и пурамицин (50 мМ). Белок в пробах определяли по методу Лоури [12].

Скорость потребления кислорода митохондриями измеряли полярографическим методом на полярографе КСП-4 с помощью вращающегося платинового электрода в стандартных условиях при 25°C. Отношение АДФ/О и дыхательного коэффициента (ДК) выражали по Чансу—Вильямсу. В качестве среды инкубации для митохондрий использовали: для печени — 120 мМ KCl, 5 мМ KH_2PO_4 , 10 мМ трис-HCl (pH 7,4); для головного мозга — 0,15 М сахараза, 5 мМ KH_2PO_4 , 5 мМ трис-HCl (pH 7,4), 5 мМ KCl. В

качестве субстрата окисления использовали сукцинат.

Результаты и обсуждение. В табл. 1 представлены результаты влияния свободного T_4 (10^{-8} М) и $МДТ_4$ на синтез белков митохондрий печени и головного мозга 7, 20, 90-дневных крыс. Из табл. 1 видно, что гормон в свободном виде почти не влияет на включение меченого лейцина в белки митохондрий печени и головного мозга крыс во все исследованные сроки развития. В серии экспериментов, в которой изолированные митохондрии печени крыс инкубировали с модулятором, наблюдалась прямая корреляция между повышением синтеза белков и возрастом животных. В митохондриях головного мозга стимуляция включения метки в белки обнаружена только в ранние сроки (7-й и 20-й дни) постнатальной жизни крыс, у 90-дневных крыс синтез белков митохондрий мозга при действии $МДТ_4$ снижался и находился на уровне контроля. Эти данные совпадают с ранее полученными результатами по изменению активности РНК-полимеразы ядер клеток печени и головного мозга крыс в эти же сроки развития [5].

Следующим этапом исследования было изучение параметров дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий печени (табл. 2). За время постнатального развития скорость поглощения кислорода в присутствии АДФ (V_3) увеличивается больше, чем в отсутствие АДФ (V_4), что свидетельствует об увеличении эффективности дыхания, сопряженного с синтезом АТФ. О большей сопряженности неонатальных митохондрий говорят увеличивающиеся с возрастом скорость разобщенного дыхания ($V_{днф}$), а также показатель степени сопряженности окислительного фосфорилирования — дыхательный контроль (ДК).

Тироксин в концентрации 10^{-8} М на 7-й день развития слегка увеличивает скорость дыхания митохондрий в состоянии 3 и не влияет на дыха-

Таблица 2
Влияние T_4 и $МДТ_4$ на дыхание и фосфорилирование митохондрий печени крыс различного возраста ($n = 5$)

Условия эксперимента	Скорость дыхания, нг атом O_2 /мин на 1 мг белка				
	V_3	V_4	$V_{днф}$	ДК	АДФ/О
7-дневные крысы					
Контроль	118,4 \pm 4,0	62,4 \pm 1,8	80,4 \pm 2,2	1,94 \pm 0,08	1,43 \pm 0,07
T_4	125,4 \pm 3,4	60,4 \pm 1,9	55,4 \pm 2,6	2,06 \pm 0,14	1,54 \pm 0,1
$МДТ_4$	151,6 \pm 4,0***	59,7 \pm 1,4	48,0 \pm 1,9***	2,54 \pm 0,17	1,84 \pm 0,09***
20-дневные крысы					
Контроль	127,5 \pm 2,8	63,8 \pm 2,2	106,0 \pm 1,1	2,10 \pm 0,09	1,42 \pm 0,06
T_4	135,6 \pm 1,8**	65,4 \pm 1,6	99,0 \pm 1,4**	2,07 \pm 0,11	1,47 \pm 0,09**
$МДТ_4$	179,0 \pm 5,3***	57,4 \pm 3,4	44,6 \pm 0,6***	3,12 \pm 0,13	1,68 \pm 0,01*
90-дневные крысы					
Контроль	165,7 \pm 4,5	67,8 \pm 2,8	130,5 \pm 2,2	2,50 \pm 0,12	1,53 \pm 0,2
T_4	179,9 \pm 3,0*	69,5 \pm 2,4	127,0 \pm 3,4	2,26 \pm 0,1	1,38 \pm 0,04
$МДТ_4$	298,3 \pm 6,4***	66,3 \pm 3,1	123,5 \pm 0,7**	4,50 \pm 0,14***	2,88 \pm 0,09**

Примечание. Здесь и в табл. 3 одна звездочка — $p < 0,05$, две — $p < 0,01$, три — $p < 0,001$ при сравнении с контрольными значениями.

Влияние T_4 и МДТ $_4$ на дыхание и фосфорилирование митохондрий головного мозга крыс разного возраста ($n = 5$)

Условия эксперимента	Скорость дыхания, $\mu\text{г атом O}_2/\text{мин на 1 мг белка}$				
	V_3	V_4	$V_{\text{ДФ}}$	ДК	АДФ/О
<i>7-дневные крысы</i>					
Контроль	$70,0 \pm 4,5$	$30,3 \pm 0,8$	$59,2 \pm 3,8$	$2,21 \pm 0,1$	$1,90 \pm 0,08$
T_4	$71,8 \pm 4,2$	$35,8 \pm 1,2^{**}$	$61,8 \pm 4,6$	$2,00 \pm 0,09$	$2,08 \pm 0,09$
МДТ $_4$	$98,0 \pm 6,7^{**}$	$24,2 \pm 0,6^{**}$	$75,2 \pm 3,4^{***}$	$4,04 \pm 0,12^{***}$	$2,35 \pm 0,09^{**}$
<i>20-дневные крысы</i>					
Контроль	$107,2 \pm 6,6$	$45,8 \pm 2,6$	$84,1 \pm 5,2$	$2,40 \pm 0,09$	$1,42 \pm 0,07$
T_4	$109,8 \pm 5,6$	$47,1 \pm 2,0$	$86,9 \pm 5,8$	$2,31 \pm 0,11$	$1,45 \pm 0,09$
МДТ $_4$	$180,0 \pm 8,8^{***}$	$37,9 \pm 2,2^*$	$107,8 \pm 7,5^*$	$4,72 \pm 0,13^{***}$	$2,28 \pm 0,1$
<i>90-дневные крысы</i>					
Контроль	$128,0 \pm 9,5$	$50,4 \pm 3,9$	$89,1 \pm 6,2$	$2,63 \pm 0,13$	$1,68 \pm 0,12$
T_4	$129,0 \pm 8,5$	$56,1 \pm 3,2$	$91,5 \pm 7,2$	$2,30 \pm 0,14$	$1,73 \pm 0,18$
МДТ $_4$	$133,5 \pm 10,0$	$57,5 \pm 4,6$	$93,5 \pm 7,6$	$2,40 \pm 0,09$	$1,75 \pm 0,46$

ние в состоянии 4, эта закономерность сохраняется и для митохондрий 20- и 90-дневных крыс. Прочность сопряжения, как и АДФ/О, во все исследованные сроки практически не меняется.

Замена тироксина МДТ $_4$ приводит к повышению у 7, 20 и 90-дневных крыс скорости АДФ-зависимого и небольшому снижению АДФ-независимого дыхания митохондрий, что способствует увеличению ДК, который у 90-дневных крыс возрастает примерно на 80%.

Функциональная активность митохондрий головного мозга в процессе постнатального развития представлена в табл. 3. Сроки исследования, дозы T_4 и модулятора были такими же, как и при исследовании печени. Как видно, скорость дыхания и ДК митохондрий во всех метаболических состояниях повышаются с возрастом. Результаты экспериментов при инкубации митохондрий мозга со свободным T_4 , а также модулятором показали неоднозначную возрастную реакцию митохондрий мозга. Тироксин в свободном виде почти не влиял на параметры дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий крыс всех исследованных возрастов, тогда как модулятор повышал интенсивность дыхания митохондрий в состоянии 3 у 7-дневных и особенно у 20-дневных крыс и существенно не влиял на АДФ-зависимое дыхание у 90-дневных животных. АДФ-независимое дыхание при этом во все сроки слегка снижалось при действии модулятора, что приводило к значительному увеличению ДК у 7, 20-дневных крыс и к статистически недостоверному снижению его у 90-дневных крыс.

Следовательно, на митохондриях головного мозга в отличие от печени МДТ $_4$ только в ранние сроки постнатальной жизни крыс стимулировал фосфорилирующее дыхание и повышал прочность сопряжения, о чем свидетельствует увеличение $V_{\text{ДФ}}$. Полученные в этой серии экспериментов данные аналогичны результатам, полученным при изучении синтеза белков митохондрий печени и головного мозга развивающихся крыс и вполне согласуются с результатами на-

ших исследований [1, 14], в которых отмечалось повышение дыхания митохондрий мозга в состоянии 3 и ДК в ранние сроки неонатального развития крыс при введении тироксина в небольших дозах.

Анализ полученных результатов показывает, что гормоны щитовидной железы неоднозначно регулируют постнатальные изменения функциональной активности митохондрий органов, чувствительных и не чувствительных к их действию, и в этой регуляции активное участие принимает специфический тироксинсвязывающий белок — МДТ $_4$. Поскольку критерием чувствительности к гормонам является калоригенный эффект, осуществляемый на уровне митохондрий, мы отчетливо установили, что в печени во все сроки онтогенетического развития эффект модулятора совпадает с калоригенным действием тироксина. Митохондрии мозга активно реагируют на модулятор, а следовательно, и гормон в течение короткого периода — первые 2—3 нед постнатальной жизни крыс. Имеются сообщения [9, 11] о том, что в этот период введение тиреоидных гормонов приводит к усилению активности ферментов дыхательной цепи и ферментов наружной мембраны митохондрий, что свидетельствует о важности гормональной регуляции дифференцировки внутренней и внешней мембраны митохондрий, причем регуляция синтеза митохондриальных ферментов происходит, очевидно, как на уровне самих органелл, так и на уровне ядра [10]. Отсутствие эффекта модулятора у 90-дневных крыс указывает на то, что зависимость от гормона функциональная дифференцировка митохондрий завершена и, так же как митохондрии взрослых крыс, они не реагируют на гормон.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абляева Н. Х., Шулакова-Коваль Т. Ю., Хамидов Д. Х. // Онтогенез. — 1981. — Т. 12, № 1. — С. 46—50.
2. Туракулов Я. Х., Далимова С. Н. // Пробл. эндокринологии. — 1990. — № 5. — С. 71—75.

3. Туракулов Я. Х., Далимова С. Н., Умарова Г. Д., Атаханова Б. А. // Докл. АН СССР. — 1990. — Т. 313, № 3. — С. 744—746.
4. Туракулов Я. Х., Далимова С. Н., Камалиева И. Р. // Докл. АН. — 1992. — № 12. — С. 47—51.
5. Туракулов Я. Х., Далимова С. Н., Камалиева И. Р., Умарова Г. Д. // Бюл. экпер. биол. — 1993. — № 7. — С. 87—91.
6. Atkinson D. I., Atterwill C. K., Balars P. et al. // Brit. J. Pharmacol. — 1982. — Vol. 77. — P. 435—442.
7. Bronk I. R. // Biochim. biophys. Acta. — 1963. — Vol. 69. — P. 375—383.
8. Corrigan J., Tselentis B., Mondray J. // Europ. J. Biochem. — 1984. — Vol. 141. — P. 435—440.
9. Fellous A., Lenon A. M., Francon I. // Ibid. — 1979. — Vol. 101. — P. 365—376.
10. Gadair M. N., Renis M., Serra J., Minervini G. R. // Ital. J. Biochem. — 1980. — Vol. 29. — P. 474—476.
11. Legrand I. // J. Physiol. — 1983. — Vol. 78. — P. 603—615.
12. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
13. Nakamura H., De Groot L. // Endocrinology. — 1983. — Vol. 112, N 6. — P. 670—678.
14. Rabinowitz M., Switt H. // Physiol. Rev. — 1970. — Vol. 50. — P. 376—427.

Поступила 30.01.94

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1995

УДК 615.2/.3.074:535.379

М. Т. НАНАЕВА, А. З. ЗУРДИНОВ, Т. С. САБИРОВА,
Т. Б. АТАНАЕВ, Т. А. КУДАЙБЕРГЕНОВА

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА АКТИВИРОВАННОЙ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Киргизский государственный медицинский институт, Бишкек

Метод регистрации сверхслабых свечений биосубстратов позволяет приблизиться к пониманию физико-химической сущности биоэнергетических и обменных процессов в клетке и в организме в целом. Как указывает А. И. Журавлев [1], уровень хемилюминесценции (ХЛ) сыворотки крови является квантово-механической характеристикой гомеостаза. ХЛ биосубстратов и биологических жидкостей в первую очередь характеризует интенсивность свободнорадикального окисления тканевых липидов, особенности липидного обмена и в настоящее время служит одним из основных тестов в комплексной оценке свободнорадикальных процессов. Анализ изменения параметров биохемилюминесценции дает возможность произвести оценку деструкции клеток тканей организма при воздействии повреждающих факторов (ионизирующей радиации, стресса и др.), в том числе и лекарственных веществ.

Целью настоящей работы явилась оценка возможностей использования метода активированной ХЛ в фармакологических исследованиях на примере изучения влияния водяного экстракта из надземных частей растения *Radix Grajana palim* в субтоксических дозах на показатели ак-

THYROXINE REGULATION OF MITOCHONDRIAL FUNCTIONAL ACTIVITY IN THE LIVER AND BRAIN OF DEVELOPING RATS WITH INVOLVEMENT OF CYTO- PLASMIC PROTEIN FACTORS

Ya. Kh. Turakulov, S. N. Dalimova, I. R. Kamaliyeva,
P. P. Patkhitdinov, F. K. Abdurazzakova

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Republic
Uzbekistan, Tashkent

The physiological (10^{-8} M) concentration of free thyroxine (T_4) and specific thyroxine-binding protein (a thyroxine action modulator - MDT_4) was studied for its effect on protein synthesis, respiration and oxidative phosphorylation of mitochondria in the liver and brain of developing rats. Free T_4 was demonstrated to affect the studied parameters in the mitochondria of the liver and brain of the developing rats very rarely, if at all. In the liver MDT_4 stimulated mitochondrial functional activity during all the studied developmental periods whereas in the brain mitochondria the modulator stimulated the synthesis of proteins and phosphorylating respiration only in early postnatal life. In the following periods of development there was a modulator-induced decrease in protein incorporation of labelled leucine, respiration, and conjugation strength of brain mitochondria. The findings suggest that thyroidal hormones ambiguously regulate the functional status of mitochondria in the liver and brain of the developing rats and the specific hormone-binding protein MDT_4 takes an active part in this regulation.

тивированной ХЛ сыворотки крови крыс в условиях хронического эксперимента.

Методика. Эксперименты выполнены на 60 нелинейных крысах-самцах массой 120—200 г. Животные были разделены на 5 групп: 1, 2, 3-я группы — животные, получавшие перорально по 1 мл на 100 г массы водного экстракта изучаемого растения, приготовленного фармакопейным методом в соотношении сырья к извлекателю 1:30. Животные 1-й группы получали препарат 1 мес, 2-й группы — 2 мес, 3-й группы — 3 мес, 4-я группа — интактные животные, получавшие по 1 мл на 100 г массы перорально воды для инъекций, 5-я группа — животные, содержащиеся в обычных условиях вивария.

Для оценки уровня свободнорадикального окисления в сыворотке крови животных использовали метод регистрации ХЛ, активированной родамином Ж, в присутствии ионов двухвалентного железа [5]. Крыс декапитировали, брали кровь, отстаивали ее в течение 24 ч при 4°C, затем отделяли сыворотку крови, которую и использовали для определения показателей ХЛ. К 100 мкл сыворотки крови добавляли 5 мл фосфатного буфера (20 мМ KH_2PO_4) pH 7,7 и 0,1 мл 1 мМ раствора родамина Ж. Значение pH брали

Группа животных	ХЛ, $\cdot 10^3$ квант/с $\cdot 4$ п			Время индукции, мин	
	h	H	H _{ст}	t ₁	t ₂
1-я	33,6 \pm 0,71***	22,3 \pm 0,67**	9,76 \pm 0,25*	3,4 \pm 0,21	12,6 \pm 0,1*
2-я	37,2 \pm 1,18***	18,2 \pm 1,39**	10,0 \pm 0,59*	5,2 \pm 0,29*	14,9 \pm 0,59*
3-я	18,5 \pm 0,69***	21,8 \pm 1,46**	21,1 \pm 2,0**	4,2 \pm 0,25*	15,8 \pm 1,39*
4-я	4,99 \pm 0,85	14,4 \pm 1,03	12,13 \pm 2,57	3,14 \pm 0,29	10,6 \pm 2,07
5-я	3,8 \pm 0,34	14,4 \pm 1,48	17,9 \pm 2,59	6,56 \pm 0,45	15,4 \pm 0,58

Примечание. Звездочки — значения, статистически значимо отличающиеся от соответствующих в контроле: одна — $p < 0,05$, две — $p < 0,01$, три — $p < 0,001$.

таким, чтобы при добавлении закисленного раствора соли двухвалентного железа в кювету значение pH смеси стало равным 7,4. Кювету со смесью помещали в темную камеру хемилюминометра. Включали мешалку и в течение 1 мин инкубировали при закрытой шторке при 37°C, затем открывали шторку и инкубировали смесь еще в течение 1 мин. Не нарушая светоизоляции темновой камеры, по трубочке в кювету вводили 0,5 мл 25 мМ раствора $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Конечная концентрация ионов двухвалентного железа составляла 2,5 мМ. Возникала вспышка ХЛ, на кривой которой определяли амплитуду быстрой (h), медленной (H) и стационарной (H_{ст}) вспышек.

В экспериментах использовали установку для регистрации ХЛ КШДА-01 со спектральной чувствительностью 300—600 нм. ХЛ оценивали в 10^5 квант/с $\cdot 4$ п.

Результаты и обсуждение. Результаты экспериментов показали (см. таблицу), что уровень гидроперекисей липидов в сыворотке крови животных, получавших водный экстракт изучаемого растения в течение 1 и 2 мес, оцененный по изменению параметров быстрой вспышки ХЛ, значительно возрастал ($33,6 \pm 0,71 \cdot 10^3$ квант/с $\cdot 4$ п через 1 мес введения препарата и $37,2 \pm 1,18 \cdot 10^3$ квант/с $\cdot 4$ п через 2 мес против $4,99 \pm 0,85 \cdot 10^3$ квант/с $\cdot 4$ п в контроле). К концу 3-го месяца введения животным исследуемого препарата этот показатель снижался в 2 раза по сравнению с таковым у животных, получавших препарат в течение 2 мес, хотя параметры быстрой вспышки ХЛ у животных 3-й группы все же превышали показатели контрольной группы почти в 5 раз. У животных 1, 2, 3-й групп интенсивность медленной вспышки ХЛ, по которой, как известно, можно судить о содержании биоантиокислителей, тоже достоверно повышалась по сравнению с контролем, хотя и не в такой степени, как интенсивность быстрой вспышки. Уровень стационарного свечения ХЛ после введения препарата в течение 1 мес значительно снизился ($8,76 \pm 0,25$ против $12,13 \pm 2,57$ в контроле, $p < 0,05$), однако при дальнейшем введении препарата животным уровень стационарного свечения ХЛ возрастал и к концу 3-го месяца введения препарата сравнивался с параметрами стационарного свечения ХЛ в контрольной группе.

Для полноты анализа мы также учитывали время достижения максимума медленной и стационарной вспышек ХЛ, которые отражают, по мнению многих авторов, состояние антиокси-

дантных систем организма. Установлено, что через месяц введения препарата имело место снижение этих показателей, но с увеличением срока введения изучаемого экстракта продолжительность 1-го и 2-го латентных периодов увеличивалась и к концу эксперимента сравнивалась с показателями контрольной группы.

Известно, что уровень ХЛ биологических систем является отражением подвижного равновесия, объективным интегральным показателем соотношения интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активности биоантиоксидантных (БАО) систем организма. В норме процесс свободнорадикального ПОЛ удерживается на минимальном стационарном уровне благодаря функции БАО-систем организма, реализующейся на субклеточном (биомембраны), клеточном, тканевом, органном уровнях и на уровне организма, т. е. существует определенное динамическое равновесие $\text{ПОЛ} \rightleftharpoons \text{БАО}$, обеспечивающее оптимальную жизнедеятельность на фоне минимальной интенсивности ПОЛ.

Временная, обратимая активация ПОЛ под влиянием изучаемого препарата в субтоксических дозах, с одной стороны, может рассматриваться как физиологический механизм разрушения избытка митохондриальных мембран эндоплазматического ретикулума, синтезирующихся в организме в ответ на введение ксенобиотика [8]. После перевода всех попавших в организм ксенобиотиков в растворимые формы и израсходования субстрата гидроксилирования НАДФ \cdot Н-оксидазы начинают генерировать избыток O_2^- . Тем самым запускается свободнорадикальное окисление и накопившиеся его продукты (альдегиды, кетоны) “разваливают” избыток мембран эндоплазматического ретикулума [2].

В наших исследованиях наряду с активацией процессов ПОЛ в начале эксперимента наблюдалось снижение функции БАО-систем организма, которое уменьшалось с увеличением срока введения препарата, а к концу 3-го месяца введения показатели, характеризующие состояние БАО-систем, не отличались от контрольных. Отсюда следует, что активация процессов ПОЛ под влиянием изучаемого препарата приводит, по-видимому, к мобилизации эндогенных фондов БАО-систем организма и динамическое равновесие $\text{ПОЛ} \rightleftharpoons \text{БАО}$ устанавливается на новом функциональном уровне.

С другой стороны, активация процессов ПОЛ под влиянием изучаемого экстракта может

зависеть и от увеличения в сыворотке крови животных субстрата, в первую очередь ответственного за инициированное железом свечение сыворотки крови. По данным Э. Ф. Малюгина и соавт. [3], из 3 фракций сыворотки крови, разделенных с помощью гель-фильтрации, максимальным уровнем ХЛ при добавлении железа обладала фракция 2, состоящая из α -, β -глобулинов, α -липопротеинов и небольшого количества альбуминов. Для подтверждения этого тезиса необходимо дальнейшее изучение влияния данного препарата на показатели белкового и жирового обмена.

Увеличение продуктов ПОЛ в сыворотке крови животных опытных групп, оцениваемое по изменениям параметров быстрой вспышки ХЛ, можно связать и непосредственно с иммуномодулирующими свойствами изучаемого препарата. Как было показано нами, под влиянием водных вытяжек из надземных частей *Padus Grajana* maxim происходит увеличение количества Т- и В-лимфоцитов, повышение киллерной активности В-клеток. Известно, что у фагоцитирующей клетки происходит резкая активация гексозомонофосфатного шунта, генерирующего НАДФ \cdot Н. НАДФ \cdot Н используется для восстановления молекулярного кислорода, связанного с мембранным цитохромом, что вызывает бурное потребление кислорода. В результате образуются надпероксидный анион, пероксид водорода, синглетный кислород и гидроксильные радикалы — все они являются мощными бактерицидными агентами [4].

По данным, приведенным в работах G. D. Albred и соавт. [6] и В. К. Моокеее и соавт. [7], фагоцитоз микроорганизмов и вирусов лейкоцитами сопровождается вспышкой спонтанной ХЛ на фоне увеличения скорости поглощения кислорода и накопления избытка малонового диальдегида, H_2O_2 и O_2 , т. е. продукты свободнорадикального ПОЛ оказались одним из основных факторов фагоцитоза, одним из первичных факторов воздействия клетки на чужеродные мембраны.

Таким образом, применение метода активированной биохемилюминесценции является весьма полезным и перспективным при изучении фармакологических свойств биологически активных веществ. Информация, полученная с помощью хемилюминесцентного метода, позволяет оценить степень воздействия лекарственных веществ на клеточные структуры, уточнить отдельные стороны механизма действия препаратов, следить за эффективностью проводимой фармакотерапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Журавлев А. И. // Сверхслабые свечения в медицине и сельском хозяйстве. — М., 1971. — С. 9—11.
2. Журавлев А. И. // Биохемилюминесценция. — М., 1983. — С. 3—32.
3. Малюгин Э. Ф., Владимиров Ю. А., Беляков Н. А. // Экспериментальные основы лечения печеночной недостаточности. — М., 1975. — С. 19—25.
4. Ройт А. Основы иммунологии: Пер. с англ. — М., 1991.
5. Шерстнев М. П., Атанаяев Т. Б., Владимиров А. Ю. // Биофизика. — 1989. — Т. 34, № 4. — С. 684—687.
6. Allred G. D., Margetts J., Hill R. H. // Biochim. biophys. Acta. — 1980. — Vol. 631, N 2. — P. 380—385.
7. Mookerjee B. K., Ferber E., Ernst M. et al. // Immunol. Commun. — 1980. — Vol. 9, N 3. — P. 653—676.
8. Wills E. D. // Biochem. J. — 1969. — Vol. 113. — P. 315—324.

Поступила 10.11.94

USE OF ACTIVATED CHEMILUMINESCENCE TECHNIQUE IN INVESTIGATING THE PHARMACOLOGICAL PROPERTIES OF DRUGS

M. T. Nanayeva, A. Z. Zurdinov, T. S. Sabirova, T. B. Atanayev

Kyrgyz State Medical Institute, Bishkek

When given to non-inbred male rats during 1, 2, and 3 months, aqueous extract from the above-ground *Padus Grajana* maxim parts was tested for its effects on the parameters of chemiluminescence-activated rat serum. The tested agent was found to increase the rate of rapid and slow chemiluminescence flashes. The level of steady-state glow considerably declined after the agent was given for a month; however, its longer use increased the steady-state chemiluminescence and by the end of the 3rd month it was equal to that of control animals. Whether the activated chemiluminescence technique can be used to evaluate the effect of biologically active substances on cell structures, to refine some aspects of the mechanism of action of drugs is discussed on in terms of the findings.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1995

УДК 613.2:615.277.4.015.44]-07

А. Д. ДУРНЕВ, А. В. ОРЕЩЕНКО, А. В. КУЛАКОВА, Н. Ф. БЕРЕСТЕНЬ

АНАЛИЗ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПИЩЕВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ

ГОО "Дисер—Москва", НИИ фармакологии РАМН, Москва

В состав современных пищевых продуктов и напитков входят различные пищевые добавки: сахарозаменители, красители, ароматизаторы, эмульгаторы и пр. Эти вещества, подобно другим природным и синтетическим соединениям, могут обладать мутагенными свойствами, следовательно, способны представлять реальную опасность для генофонда человеческой популяции и здоровья отдельных индивидуумов [1, 2, 9]. Суще-

ствуют экспериментальные данные, прямо свидетельствующие о мутагенности некоторых пищевых добавок, в частности сахарина [5] и ряда азокрасителей [7, 8]. Подобное положение определяет необходимость детальной оценки мутагенности уже применяющихся пищевых добавок, поскольку ранее, как следует из материалов ВОЗ [3], этому аспекту токсикологических исследований не уделялось специального внимания. Сви-

Мутагенная активность пищевых красителей, исследованная методом учета хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей C57BL/6

Пищевой краситель, мг/кг	Количество клеток	Мутагенная активность (на 100 клеток)				Всего поврежденных метафаз, %	Уровень значимости
		гепы	одиночные фрагменты	парные фрагменты	обмены		
Контроль	500	0,8	0,6	-	-	1,4 ± 0,5	
Тартразин (E102)							
0,5	500	0,6	1,0	-	-	1,6 ± 0,6	>0,05
5	500	-	1,0	-	-	1,0 ± 0,5	>0,05
Индигокармин (E132)							
1,4	500	0,2	1,0	-	-	1,2 ± 0,5	>0,05
14	400	0,3	1,3	-	-	1,5 ± 0,6	>0,05
Сансет желтый (E110)							
0,17	500	-	0,6	-	-	0,6 ± 0,3	>0,05
1,7	500	-	0,6	-	-	0,6 ± 0,3	>0,05
Кохениловый красный (E124)							
0,63	500	1,0	0,6	-	-	1,6 ± 0,6	>0,05
6,3	500	-	1,8	-	-	1,8 ± 0,6	>0,05
Азорубин (E122)							
1	500	1,0	0,8	-	-	1,8 ± 0,6	>0,05
10	500	0,2	2,2	-	-	2,2 ± 0,7	>0,05
Патентованный голубой (E131)							
0,08	500	0,2	1,8	-	-	2,0 ± 0,6	>0,05
0,8	500	0,2	2,2	-	-	2,4 ± 0,7	>0,05

детельством чего является отсутствие каких-либо требований, регламентирующих процедуру изучения мутагенной активности пищевых добавок или иных пищевых компонентов. С этой целью допускается использование принципов и методов тестирования, сложившихся в смежных дисциплинах, в том числе в области изучения генотоксической активности лекарственных средств [3].

Одним из наиболее информативных и верифицированных методов изучения мутагенных свойств фармакологических средств является цитогенетический анализ *in vivo*, позволяющий оценить влияние изучаемого соединения и его метаболитов на уровень хромосомных aberrаций в клетках костного мозга млекопитающих [4], что определило его использование в настоящей работе, посвященной изучению цитогенетической активности 6 пищевых красителей, применяемых в производстве безалкогольных напитков.

Методика. Исследование выполнено на мышах линии C57BL/6 в возрасте 8–12 нед, массой 18–20 г (питомник “Светлые горы” РАМН), которых содержали в стандартных условиях вивария на брикстированном комбикорме при свободном доступе к воде.

Красители вводили животным перорально ежедневно на протяжении 5 дней в дозах, соответствующих максимально допустимым для суточного потребления человеком и десятикратно превышающих их: тартразин (E102) — 0,5 и 5 кг/кг, индигокармин (E132) — 1,4 и 14 мг/кг, сансет желтый (E110) — 0,17 и 1,7 мг/кг, кохениловый красный (E124) — 0,63 и 6,3 мг/кг, азорубин (E122) — 1 и 10 мг/кг и патентованный голубой (E131) — 0,08 и 0,8 мг/кг.

С целью накопления метафазного материала мышам внутрибрюшинно инъецировали 0,025% раствор колхицина (фирма “Serva”, Германия) по 0,01 мл на 1 г массы за 2 ч до забоя, который

осуществляли через 6 ч после последнего введения красителя.

Для цитогенетического анализа готовили препараты костного мозга животных согласно методу В. J. Dean [6], позволяющему учитывать повреждения хромосом, окрашенных азури-эозином, на стадии метафазы. При цитогенетическом анализе регистрировали ахроматические пробелы (гепы), одиночные и парные фрагменты, хроматидные и хромосомные обмены.

Исследовали по 100 метафазных клеток от каждого животного, в каждую контрольную группу или опытную группу включали 5 мышей, при цитогенетическом анализе использовали микроскоп Standart-20 (ув. 10 × 100).

Результаты и обсуждение. В таблице представлены результаты, полученные при испытании пищевых красителей — тартразина, индигокармина, сансета желтого, кохенилового красного, азорубина и патентованного голубого — на мутагенную активность методом учета хромосомных повреждений в клетках костного мозга мышей.

Изучение 500 метафаз контрольной серии опытов позволило выявить 1,4 ± 0,5% аномальных клеток. На каждые 100 исследованных метафаз установлено 0,8 клетки с ахроматическими пробелами, 0,6 клетки с одиночными фрагментами. Парных фрагментов и aberrаций обменного типа не выявлено. Результат, полученный в контрольной группе эксперимента, практически совпадает с данными, характеризующими спонтанный уровень мутирования у интактных животных использованной линии [4].

В следующей серии эксперимента исследовали мутагенные свойства тартразина. Изучение этого красителя, известного также под названием “пищевой желтый № 4”, выполнялось ранее в экспериментах с CHL-клетками, микроядерном

тесте, при этом получены противоречивые результаты. Повреждающее действие этого красителя было зарегистрировано у прокариот и эукариот *in vitro*, но не в тесте на индукцию микроядер [7]. В данной работе цитогенетический анализ влияния тартразина, применяемого из расчета 0,6 мг/кг, 5 дней, ежедневно, позволил зарегистрировать $1,6 \pm 0,6\%$ aberrантных метафаз. Спектр хромосомных повреждений был представлен ахроматическими пробелами (0,6 на каждые 100 исследованных клеток) и одиночными фрагментами (1,0 на каждые 100 клеток). При испытании соединения в дозе, в 10 раз превышающей указанную, получен сходный результат — $1,0 \pm 0,5\%$ поврежденных клеток. Однако в этом случае в спектре хромосомных повреждений присутствовали только одиночные фрагменты. Сравнение полученных результатов с контрольными значениями не выявило между ними статистически достоверных различий. Таким образом, собственные результаты и данные литературы позволяют говорить об отсутствии у тартразина мутагенных свойств в опытах на млекопитающих.

Анализ 500 метафазных пластинок, полученных после 5-дневного применения индигокармина в дозе 1,4 мг/кг, позволил выявить $1,2 \pm 0,5\%$ аномальных клеток. Наряду с одиночными фрагментами (1,0 на каждые 100 клеток) были зафиксированы гены (0,2 на каждые 100 клеток). При испытании соединения в дозе 14 мг/кг было исследовано 400 клеток и выявлено 0,3 и 1,3 гена и одиночных фрагмента соответственно на каждые 100 исследованных клеток. Всего было установлено $1,5 \pm 0,6\%$ аномальных метафаз. Статистическая обработка полученных данных не выявила статистически достоверных различий между результатами, характеризующими уровень мутирования в контрольной и опытных группах. Этот результат позволяет отрицать наличие у исследуемого красителя мутагенных свойств и подтверждается ранее полученными данными, свидетельствующими, что индигокармин не влияет на уровни мутирования у *Sal. typhimurium* в CHL-клетках в условиях присутствия и отсутствия микросомальной фракции млекопитающих [7].

Сансет желтый в дозе 0,17 мг/кг также не индуцировал статистически значимого увеличения числа клеток с хромосомными повреждениями. Всего было установлено $0,6 \pm 0,4\%$ поврежденных клеток. В спектре хромосомных повреждений обнаружены только одиночные фрагменты — 0,6 на 100 исследованных клеток. Аналогичный результат был зарегистрирован после применения препарата из расчета 1,7 мг/кг. Отсутствие у этого красителя мутагенных свойств подтверждается данными, полученными при исследовании в тесте Эймса [7]. Вместе с этим известна способность сансета желтого в концентрациях 2—6 мг/мл индуцировать увеличение уровня цитогенетических повреждений в культуре CHL-клеток [7]. Обращает внимание, что концентрация красителя, использованного в этих экспериментах, чрезвычайно велика и при ориентировочном пересчете составляет не менее 2 г на 1 кг массы тела, что на 5 порядков превышает допустимую суточную дозу его потребления.

Цитогенетическое изучение 500 клеток после применения кохенилового красного из расчета 0,63 мг/кг позволило обнаружить 0,6 одиночных фрагмента и 1,0 гена хромосом на каждые 100 метафаз. Общее количество поврежденных метафазных пластинок составило $1,6 \pm 0,6\%$. Равный объем цитогенетического материала, проанализированный после применения красителя в дозе 6,3 мг/кг, позволил выявить $1,8 \pm 0,6\%$ аномальных метафаз, в которых были зарегистрированы исключительно одиночные фрагменты хромосом. Оба результата статистически достоверно не отличаются от данных, полученных в контрольной серии исследования.

Азорубин в дозах 1 и 10 мг/кг также не оказал мутагенного действия, оба выявленных результата несколько выше, чем значения в контроле и в других сериях эксперимента, однако статистически достоверно не отличаются от контрольных значений.

После 5-дневного перорального введения патентованного голубого в дозе 0,08 мг/кг обнаружено $2,0 \pm 0,6\%$ поврежденных клеток, в дозе 0,8 мг/кг — $2,4 \pm 0,7\%$ аномальных метафаз. В спектре хромосомных повреждений выявлены гены и одиночные фрагменты. Более сложных категорий повреждений хромосом не обнаружено. Оба результата статистически достоверно не отличаются от контроля, хотя последний близок к границе 95% вероятности.

Таким образом, исследованные пищевые красители — тартразин (E102) в дозах 0,5 и 5 мг/кг, индигокармин (E132) — 1,4 и 14 мг/кг, сансет желтый (E110) — 0,17 и 1,7 мг/кг, кохениловый красный (E124) — 0,63 и 6,3 мг/кг, азорубин (E122) — 1 и 10 мг/кг и патентованный голубой (E131) — 0,08 и 0,8 мг/кг — не вызывают увеличения спонтанного уровня хромосомных повреждений в клетках костного мозга при 5-дневном пероральном введении лабораторным животным. В соответствии с общими принципами экстраполяции данных, принятыми в области генетической токсикологии, следует заключить, что применение исследованных пищевых красителей в указанных диапазонах доз не представляет генетической опасности для человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бочков Н. П., Шрамм Р. Я., Кулешов Н. П. и др. // Генетика. — 1975. — № 10. — С. 157—168.
2. Дубинин Н. П. Новое в современной генетике. — М., 1986.
3. Принципы оценки безопасности пищевых добавок и контаминантов в продуктах питания (ВОЗ. Гигиенические критерии состояния окружающей среды. № 70). — М., 1991.
4. Середенин С. Б., Дурнев А. Д. Фармакологическая защита генома. — М., 1992.
5. Arnold D. L., Boyes B. G. // Mutat. Res. — 1989. — Vol. 221. — P. 69—132.
6. Dean B. J. // Lab. Anim. — 1969. — Vol. 3. — P. 157—174.
7. Ishidate M. Date Book of Chromosomal Aberration Test in Vitro. — Amsterdam, 1988.
8. Loprieno N. Chemical Toxicology of Food. — Amsterdam, 1978.
9. Susanne C. // Mutagenicity, Carcinogenes and Teratogenicity Individual Pollutants. — New York, 1984. — P. 1—4.

Поступила 03.04.95

ANALYSIS OF THE CYTOGENETIC ACTIVITY OF FOOD DYES

A. D. Durnev, A. V. Oreshchenko, A. V. Kulakova, N. F. Beresten
Deler-Moskva Ltd, Research Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences.

The cytogenetic activity of food dyes was examined in the experiments on male C57B1/6 mice which were orally given during

5 days the following daily doses: Tartrazine (E102), 0.5 and 5.0 mg/kg; Indigo carmine (E132), 1.4 and 14 mg/kg; Canset yellow (E110), 0.17 and 1.7 mg/kg; Cochenillerot A (E124), 0.63 and 6.3mg/kg; Azorubin (E122), 1 and 10 mg/kg and Patentblau V (E131), 0.08 and 0.8 mg/kg. Five hundred metaphase slides each were analyzed in the control and experimental test series. The findings may conclude that the dyes tested within the above dose ranges do not induce any increase in the level of cells with chromosomal damages in the inbred animals.

© 3. Т. АСТАХОВА, 1995

УДК 616.153.915-057-02:613.632]-07

3. Т. АСТАХОВА

ОСОБЕННОСТИ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА У РАБОЧИХ НЕФТЕХИМИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА

Кафедра госпитальной терапии (зав. — проф. Л. М. Мосин) Северо-Осетинского государственного медицинского института

В условиях научно-технического прогресса и кризисной экологической ситуации изучение влияния производственных факторов на организм человека имеет чрезвычайно важное значение.

Исследования состояния липидного обмена у лиц, испытывающих в процессе производственной деятельности длительное, многолетнее влияние химических агентов, имеют поэтому не только важное теоретическое, но и большое практическое значение. В ряде фундаментальных обзоров и монографий [1, 6—8] наряду с известными факторами риска особое значение придается атерогенным сдвигам в липидном и липопротеидном спектрах плазмы крови [4, 9, 10], раннее выявление и оценка которых может способствовать разработке и проведению профилактических мероприятий у лиц с высоким риском развития ИБС и других связанных с атеросклерозом заболеваний. Вместе с тем значение многих производственных факторов химической природы в возникновении и развитии атеросклероза до сих пор изучено недостаточно [1]. Имеющиеся в литературе данные по этому вопросу [3, 5] в ряде случаев противоречивы, и поэтому требуется дальнейшее углубленное исследование проблемы.

Основной задачей данного исследования было изучение показателей липидов и липопротеинов сыворотки крови у рабочих основных цехов нефтехимического предприятия, длительно подвергающихся воздействию производственных влияний, в том числе комплекса ароматических углеводородов (бензол, гипериз, этаноловая фракция и др.) в диапазоне их предельно допустимых концентраций, для оценки степени неблагоприятного воздействия этих химических агентов на организм рабочих и уточнения значения сдвигов в липидном спектре сыворотки крови как факторов, способствующих созданию благоприятных условий для развития атеросклеротического процесса.

Методика. Обследован 501 рабочий основных цехов (производства фенола, полиэтилена низкого давления и синтетического спирта)

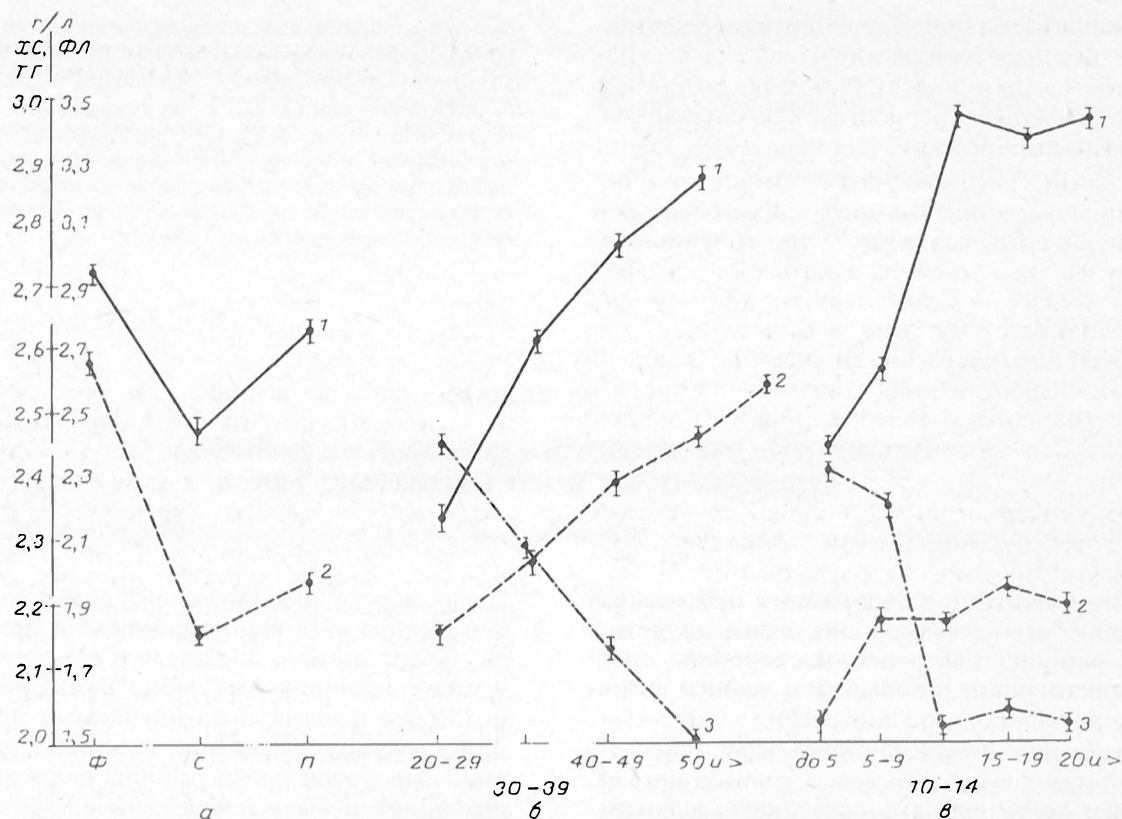
Грозненского химзавода и 100 человек контрольной группы. Для наблюдения были отобраны лица, не имевшие в анамнезе и не пораженные в момент исследования заболеваниями, которые могли бы повлиять на изучаемые показатели. Для изучения содержания липидов и липопротеинов сыворотки крови рабочих нефтехимических предприятий были применены два метода — метод тонкослойной хроматографии (лаборатория липидов Центральной научно-исследовательской лаборатории Московского государственного медицинского университета) и метод иммунофелометрии (лаборатория липопротеинов Научно-исследовательского института профилактики неинфекционных заболеваний Всероссийского научно-исследовательского центра профилактической медицины Минздравмедпрома Российской Федерации).

Транспортные формы липидов — липопротеинов изучали методом высоковольтного диск-электрофореза в полиакриламидном геле с использованием реактивов фирмы "Реанал" (Венгрия). Для более точной количественной оценки полученные фракции липопротеинов исследовали с помощью денситометрии в проходящем свете на приборе ЕР1-65М фирмы "Карл-Цейс-Йена" (Германия) с использованием специаль-

Таблица 1

Содержание липидов и липопротеинов в сыворотке крови рабочих нефтехимического предприятия ($M \pm m$)

Липиды и липопротеины	Рабочие химических цехов	Контрольная группа	p
Холестерин (ХС)			
общий	2,67 ± 0,12	1,99 ± 0,12	0,001
свободный	0,96 ± 0,12	0,7 ± 0,04	0,01
эстерифицированный	1,71 ± 0,12	1,29 ± 0,12	0,001
Триглицериды (ТГ)	2,33 ± 0,22	1,8 ± 0,1	0,01
Фосфолипиды (ФЛ)	1,92 ± 0,09	2,12 ± 0,35	0,05
Пре-β-липопротеины (ЛПОНП)	1,68 ± 0,09	0,41 ± 0,09	0,01
β-липопротеины (ЛПНП)	5,12 ± 0,13	3,82 ± 0,14	0,01
α-липопротеины	2,49 ± 0,35	3,82 ± 0,29	0,01
Индекс	2,02 ± 0,11	1,1 ± 0,16	0,001
ЛпоА	123,6 ± 4,68	125,8 ± 5,91	0,05
ЛпоВ	118,9 ± 4,29	89,8 ± 3,96	0,001
ЛпоВ/лпоА	1,11 ± 0,35	0,8 ± 0,29	0,01



Динамика изменений липидного спектра сыворотки крови у рабочих основных цехов нефтехимического предприятия.

1 — ХС, 2 — ФЛ, 3 — ТГ. По оси абсцисс: а — профессиональные группы (Ф — производство фенола, С — спирта, П — полиэтилена); б — возрастные группы, годы; в — стажные группы, годы; по оси ординат: справа — ФЛ, слева — ХС, ТГ, г/л.

ного устройства, закрепляющего трубочки. Соотношение липопротеинов оценивали по площадям соответствующих типов денситограмм.

Содержание аполипопротеинов А1 и В (апоА1 и апоВ соответственно) в сыворотке крови определяли методом иммунонефелометрии на автоанализаторе "Behring Nephelometer-Analyser" (Германия). Оценку результатов проводили по калибровочной кривой, полученной при определении концентрации аполипопротеинов в стандартном растворе.

Результаты и обсуждение. Данные о состоянии липидного и липопротеидного спектров сыворотки крови в обследованных группах людей представлены в табл. 1.

Видно, что у рабочих нефтехимической промышленности имеется определенная тенденция к перестройке биохимической структуры сыворотки крови, выражающаяся в нарушении динамического равновесия между содержанием в крови атерогенных (ХС, ТГ, ЛПОНП, ЛПНП) и неатерогенных (ФЛ, липопротеидов высокой плотности — ЛПВП) липидов и липопротеинов в сторону статистически достоверного повышения первых и снижения последних, повышении содержания апоВ относительно апоА, увеличении коэффициентов атерогенности (ХС/ФЛ, (ЛПОНП + ЛПНП)/ЛПВП, апоВ/апоА). Хотя в абсолютном большинстве случаев перечисленные выше изменения отмечались не порознь, а в

различных сочетаниях, тем не менее каждый компонент липидного и липопротеидного спектра сыворотки крови вносит свой вклад в общие механизмы развития атеросклеротического процесса.

Так, содержание ХС в сыворотке крови у рабочих основных цехов нефтехимического предприятия значительно выше контрольных величин (см. табл. 1). Более выраженное повышение уровня ХС отмечено у лиц, занятых производством фенола, менее выражено оно у лиц, занятых в цехах по производству полиэтилена низкого давления и синтетического спирта. Причем характерным является факт более выраженного повышения ХС, как свободного, так и эстерифицированного, в сыворотке крови старших стажных групп по сравнению с этими величинами в других возрастных группах (см. рисунок). Полученные результаты дают основание для заключения, что содержание ХС в сыворотке крови рабочих основных цехов нефтехимического предприятия, вероятнее всего, определяется и зависит от продолжительности воздействия на организм производственных химических агентов.

У 39,5% обследованных рабочих производства фенола, полиэтилена низкого давления и синтетического спирта концентрация ХС в сыворотке крови хотя и колебалась в пределах нормы, однако у части лиц отмечались триглицеридемия липопротеинемия — снижение уровня липопроте-

инов в сыворотке крови. У 60,4% обследованных нами рабочих предприятия определялась статистически достоверная холестеринемия, которую в 56,3% случаев можно расценить как умеренную, в 4,7% — как выраженную.

Содержание ТГ в сыворотке крови рабочих нефтехимического предприятия также оказалось выше контрольных величин. Чаще триглицеридемия отмечается у рабочих, занятых в производстве фенола, реже — у лиц, занятых в цехе полиэтилена низкого давления и синтетического спирта. У 59,7% обследованных определялась статистически достоверная триглицеридемия. В 53,6% случаев данную триглицеридемию можно расценить как умеренную, в 6,1% — как выраженную.

Вопрос о содержании ФЛ в крови, их соотношение с другими липидами, в частности с ХС, имеет принципиально важное значение. Известно, что несоответствие содержания ФЛ уровню ХС повышает атерогенные свойства сыворотки крови. У рабочих нефтехимического предприятия статистически достоверному повышению ХС в сыворотке крови не соответствует статистически достоверное повышение содержания ФЛ, имеется лишь тенденция к его увеличению. В 12% случаев холестеринемия сопровождалась повышенным, в 20% — нормальным и в 68% — сниженным уровнем ФЛ. Коэффициент ХС/ФЛ для рабочих основных цехов составил 1,26 (в контроле 0,8—0,98).

Уровень пре- β -липопротеинов в сыворотке крови рабочих основных производств нефтехимического предприятия по сравнению с таковым в контрольной группе статистически достоверно повышен (см. рисунок). Отмечено, что содержание ЛПОНП нарастает с увеличением стажа работы более 10 лет, причем это увеличение носит статистически достоверный характер, тогда как возраст на содержание ЛПОНП в крови влияет гораздо меньше.

β -Липопротеинемия у обследуемых рабочих в 63% случаев сочеталась с изменениями других показателей липидного и липопротеидного спектров сыворотки крови.

Достаточный уровень в крови ЛПВП препятствует развитию атеросклероза в артериальной стенке, а при снижении их уровня наблюдается ускоренное развитие атеросклероза. Содержание ЛПВП в сыворотке крови рабочих основной группы по сравнению с контрольной статистически достоверно снижено. Этот факт имеет принципиально важное значение в общих механизмах расстройств липидного и липопротеидного спектров сыворотки крови, особенно в условиях холестеринемии и β -липопротеинемии. Если при достоверной холестеринемии имеется лишь тенденция к повышению уровня ФЛ, то достоверная β -липопротеинемия сопровождается также достоверной α -липопротеинемией, что значительно повышает атерогенные свойства сыворотки крови рабочих основных цехов нефтехимического предприятия. Индекс β/α для всей группы составил 2,06, что достоверно выше ана-

Таблица 2

Типы ГЛП по классификации Фредриксона у рабочих предприятия нефтехимической промышленности

Тип ГЛП	% выявляемости	
	основная группа	контрольная группа
I	-	-
IIA	29,2	10
IIB	48,1	6
III	-	-
IV	20,0	6
V	2,7	2

логичного показателя в контрольной группе. Снижение содержания α -липопротеидов в сыворотке крови чаще отмечалось у рабочих, занятых в производстве фенола, и реже — у лиц, занятых в цехе синтетического спирта.

Аполипопротеины представляют собой белковые компоненты липопротеинов. Предполагается, что апоA1 и апоB являются более точными, чем уровни ХС, ЛПВП и ЛПНП, прогностическими признаками развития ИБС [6]. Наиболее информативным показателем, связанным с наличием ИБС и атеросклероза, является отношение апоB/апоA1 выше единицы.

У подавляющего большинства обследованных рабочих имели место комбинированные нарушения липидного обмена. Проведенное фенотипирование выявило несколько типов гиперлипидотемий (ГЛП) по классификации Фредриксона (табл. 2).

Как видно, у рабочих нефтехимического предприятия характерны атеросклеротические типы ГЛП — IIA, IIB и IV.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что для рабочих нефтехимических цехов характерна высокая выявляемость холестеринемии, триглицеридемии при снижении концентрации в сыворотке крови ФЛ и α -липопротеинов. Обращает на себя внимание четкая зависимость выраженности этих изменений от характера производства, возраста и, что особенно важно, стажа работы в нефтехимической промышленности.

Наиболее выраженные нарушения липидного и липопротеидного обмена отмечаются у рабочих производства фенола, менее значительные — у лиц, занятых выработкой полиэтилена низкого давления и синтетического спирта. Определяется закономерное плавное нарастание содержания ХС, ТГ, ЛПОНП, ЛПНП и снижение уровня ФЛ и ЛПВП в возрастных группах от младших к старшим и резкие, скачкообразные одноименные изменения, перекрывающие по степени выраженности возрастные сдвиги, при стаже работы 10—14 лет с незначительными последующими колебаниями, хотя средний возраст рабочих этих групп составил только 35,7 года.

Таким образом, полученные результаты дают всекое основание считать, что влияние на организм производственных химических агентов (группа ароматических углеводородов) создает благоприятные условия для развития атеросклеротического процесса (а возможно, и иницииру-

ЛИТЕРАТУРА

1. Ильинский Б. В. Профилактика, ранняя диагностика и лечение атеросклероза. — М., 1977.
2. Климов А. И., Никульчева Н. Г. Липопротеиды, дислипидемии и атеросклероз. — Л., 1984.
3. Кончаловская Н. М. Сердечно-сосудистая система при действии профессиональных факторов. — М., 1976.
4. Никульчева Н. Г. Характеристика дислипидемий в популяции мужчин Ленинграда и у больных ИБС: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Л., 1984.
5. Саноцкий Н. В., Фоменко В. И. Отдаленные последствия влияния химических соединений на организм. — М., 1979.
6. Томпсон Г. Р. Руководство по гиперлипидемии. — 1991.
7. Чазов Е. И., Смирнов В. И. и др. // Липопротеиды высокой плотности и атеросклероз. — М., 1983. — С. 47—58.
8. Ross R., Glomset J. A. // New Engl. J. Med. — 1976. — Vol. 295. — P. 369—377; 420—425.
9. Ross R., Harker L. // Science. — 1976. — Vol. 193. — P. 1094—1100.

LIPID METABOLIC FEATURES OF WORKERS ENGAGED IN PETROCHEMICAL INDUSTRY

Z. T. Astakhova

Department of Hospital Therapy, Northern-Ossetian State Medical Institute

The serum levels of lipids and lipoproteins were measured in 501 workers engaged in petrochemical industry and 100 control men. Highly elevated cholesterolemia, triglycerolemia with decreased serum phospholipid and lipoprotein concentrations are strictly characteristic in petrochemical industrial workers. There was a clear-cut relation of these changes to the nature of the type of production, age, especially to the length of service in petrochemical industry. The findings suggest that the nature of a chemical agent, the time of a lesion might play a significant role in the development of an atherosclerotic process in workers engaged in petrochemical industry.

КЛИНИКО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1995

УДК 616.33/.342-002.44-005.1-085

А. С. ЕРМОЛОВ, Г. В. ПАХОМОВА, Л. Ф. ТВЕРИТНЕВА, П. П. ГОЛИКОВ,
Н. Ю. НИКОЛАЕВА

СТРЕССЛИМИТИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ ЗОНТАКА ПРИ ЯЗВЕННЫХ ГАСТРОДУОДЕНАЛЬНЫХ КРОВОТЕЧЕНИЯХ

НИИ скорой помощи им. Н. В. Склифосовского, Москва

Язвенные гастродуоденальные кровотечения до настоящего времени остаются одной из наиболее сложных проблем неотложной абдоминальной хирургии и сопровождаются высокой летальностью, колеблющейся от 10 до 30% [5, 6, 8, 16].

Многочисленные исследования позволили установить ряд основополагающих патогенетических механизмов, принимающих участие в ulcerogenesis [1, 19, 21]. На этой основе разработаны и внедрены в клиническую практику препараты, воздействующие на важнейшие звенья ulcerogenesis: периферические холинолитики, блокаторы H_2 -рецепторов гистамина, блокаторы H^+K^+ -АТФазы париетальных клеток [21]. Из антисекреторных препаратов наиболее выраженный эффект при язвенных гастродуоденальных кровотечениях дают блокаторы H_2 -рецепторов гистамина [13, 22]. Блокаторы H_2 -рецепторов гистамина не только подавляют секрецию соляной кислоты, индуцированную гистамином или гастрином, но и способствуют заживлению язв [22, 23], что позволяет нередко избежать хирургического вмешательства или подготовить больных к операции [38].

К числу ulcerogenic факторов относят глюкокортикоиды [15]. Глюкокортикоиды нередко вызывают повреждение стенки кровеносных сосудов желудка или двенадцатиперстной кишки, что сопровождается гастродуоденальными кровотечениями [11].

В механизме возникновения гастродуоденальных язв существенную роль играет стресс [7, 20], патогенетическую основу которого составляют глюкокортикоиды [9]. Язвенные гастродуоденальные кровотечения сопровождаются выраженной стресс-реакцией [17]. В механизмах реализации глюкокортикоидного эффекта важное место занимает кортикостероидсвязывающий глобулин [25, 29]. Снижение его уровня в крови при стрессе приводит к повышению концентрации свободных глюкокортикоидов, которые реализуют метаболический эффект в тканях-мишенях. Снижение уровня кортикостероидсвязывающего глобулина в крови вызвано его высоким потреблением в месте воспаления [30]. Мы предположили, что лечебный эффект ингибиторов H_2 -рецепторов гистамина при язвенном желудочно-кишечном кровотечении обусловлен не только его специфическим влиянием на секреторную функцию желудка, но и антистрессорным эффектом.

Влияние зонтика на физико-химические препараты кортикостероидсвязывающего глобулина и содержание кортизола и инсулина в сыворотке крови больных с язвенными гастродуоденальными кровотечениями

День исследования больных после кровотечения	Число мест связывания кортизола кортикостероидсвязывающего глобулина		$K_a \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$	$K_d \cdot 10^{-9} \text{ M}$	Кортизол, нмоль/л	Инсулин, мкЕд/мл	Кортизол/инсулин
	абсолютное, $\cdot 10^{-9} \text{ M}$	относительное, $\cdot 10^{-12}$ моль на 1 мг белка					
Контроль	$2,13 \pm 0,04$	$1,20 \pm 0,02$	$0,66 \pm 0,03$	$1,50 \pm 0,07$	292 ± 19	$20,0 \pm 1,5$	14,6
1-й							
Н	$1,96 \pm 0,14$	$1,46 \pm 0,08$	$0,46 \pm 0,01$	$2,17 \pm 0,06$	470 ± 40	$18,4 \pm 1,8$	25,5
З	$1,96 \pm 0,10$	$1,35 \pm 0,05$	$0,60 \pm 0,04^*$	$1,67 \pm 0,12^*$	515 ± 42	$18,5 \pm 2,4$	27,8
3-й							
Н	$1,84 \pm 0,13$	$1,46 \pm 0,08$	$0,44 \pm 0,02$	$2,27 \pm 0,12$	511 ± 52	$20,7 \pm 2,9$	24,7
З	$2,08 \pm 0,13$	$1,31 \pm 0,06$	$0,55 \pm 0,04^*$	$1,82 \pm 0,11^*$	459 ± 26	$33,4 \pm 6,9$	13,7
7-й							
Н	$2,36 \pm 0,20$	$1,69 \pm 0,15$	$0,38 \pm 0,02$	$2,63 \pm 0,13$	493 ± 30	$17,0 \pm 2,2$	29,0
З	$1,96 \pm 0,13$	$1,26 \pm 0,08^*$	$0,54 \pm 0,02^*$	$1,85 \pm 0,10^*$	472 ± 29	$31,7 \pm 7,0$	14,9
14-й							
Н	$3,02 \pm 0,22$	$2,10 \pm 0,13$	$0,28 \pm 0,02$	$3,57 \pm 0,20$	478 ± 15	$14,0 \pm 1,9$	34,2
З	$1,97 \pm 0,13^*$	$1,21 \pm 0,09^*$	$0,52 \pm 0,03^*$	$1,92 \pm 0,08^*$	464 ± 35	$21,0 \pm 5,0$	22,1

Примечание. Звездочка — статистически достоверные различия между группами больных, леченных и не леченных зонтак. Н — больные, не леченные зонтак, З — больные, леченные зонтак.

Целью данного исследования явилось изучение стресслимитирующего эффекта блокатора H_2 -рецепторов гистамина зонтак у больных с гастродуоденальными кровотечениями.

Методика. В исследование включены 64 больных язвенной болезнью желудка (20) и двенадцатиперстной кишки (44), осложненной кровотечением. Возраст больных колебался от 21 года до 80 лет. В соответствии с классификацией А. И. Горбашко [4], у больных в основном была кровопотеря средней степени тяжести. Из 64 больных в экстренном порядке на 2—7-е сутки от момента первого кровотечения оперированы 15 больных язвенной болезнью желудка (5) и двенадцатиперстной кишки (10) по поводу рецидива кровотечения. Всем оперированным больным предварительно проводили эндоскопический гемостаз.

Больным в зависимости от степени тяжести кровопотери проводили комплексное медикаментозное лечение, включающее трансфузионную терапию, направленную на коррекцию развивающейся гиповолемии, анемии, нарушений белкового и водно-электролитного обмена. Для устранения анемии и гипопротейнемии использовали кровь, эритромассу, плазму крови и 10—20% раствор альбумина. В качестве дезагрегантной терапии внутривенно вводили реополиглюкин в смеси с глюкозой. По показаниям проводили сеансы гипербарической оксигенации (ГБО), курсы лечения иммуномодуляторами, направленную противоязвенную терапию, включающую сеансы эзофагогастродуоденоскопии с облучением язвы гелий-неоновым лазером.

В процессе лечения формировали 2 рандомизированные группы больных с язвенными гастродуоденальными кровотечениями. При этом одна группа больных язвенной болезнью желудка (11) и двенадцатиперстной кишки (22), осложненной кровотечением, получала вышеуказанное лечение, а другая группа больных язвенной болезнью желудка (9) и двенадцатиперстной кишки

(22), осложненной кровотечением, дополнительно получала блокатор H_2 -рецепторов гистамина зонтак по схеме: внутривенно по 50 мг 3 раза в сутки в течение первых 3 дней и перорально таблетки по 150 мг 2 раза в сутки в последующие 3 нед. Схема послеоперационного лечения больных зонтак включала внутривенное введение препарата в течение 5 сут по 50 мг 3 раза в сутки, а начиная с 6-х суток, при благоприятном течении заболевания в послеоперационном периоде, больные получали перорально зонтак в таблетках по 150 мг 2 раза в сутки в течение 2 нед. Учитывался синдром отмены препарата. Общим контролем для больных, леченных и не леченных зонтак, служила группа доноров (20).

Физико-химические параметры кортикостероидсвязывающего глобулина сыворотки крови определяли по ранее опубликованной методике [3]. Число мест связывания меченного тритием кортизола на специфическом глобулине, константы ассоциации (K_a) и диссоциации (K_d) определяли с помощью построения графика Скэтчарда [31]. Содержание эндогенного кортизола и инсулина в сыворотке крови определяли с помощью радиоиммунологических кит-наборов (Франция). Исследования биохимических препаратов проводили на 1, 3, 7 и 14-е сутки с момента первого кровотечения. Статистическую обработку данных проводили с помощью анализа вариации и t -теста.

Результаты и обсуждение. Исследования показали (см. таблицу), что абсолютное число мест связывания кортизола кортикостероидсвязывающего глобулина сыворотки крови больных, не леченных зонтак, на 1-е и 3-и сутки с момента кровотечения было достоверно снижено по сравнению со значениями в контрольной группе. В последующие сроки наблюдалось увеличение абсолютного числа мест связывания кортизола кортикостероидсвязывающего глобулина. Относительное число мест связывания

вания кортизола кортикостероидсвязывающего глобулина у больных, не леченных зонтаксом, во все сроки наблюдения было значительно больше, чем у доноров. Из этих данных можно сделать вывод о повышении специфической функции глюкокортикоидсвязывающего глобулина у больных с язвенным гастродуоденальным кровотечением, не леченных зонтаксом. Однако анализ данных, характеризующих аффинитет кортикостероидсвязывающего глобулина к меченому кортизолу, свидетельствует об обратном. Так, уже на 1-е сутки состоявшейся кровопотери K_d комплекса меченый кортизол—кортикостероидсвязывающий глобулин была в 1,4 раза, на 3-и сутки — в 1,5 раза, на 7-е сутки — в 1,8 раза, на 14-е сутки — в 2,4 раза ниже, чем в группе доноров. K_d этого комплекса в те же сроки соответственно была увеличена (см. таблицу). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что у больных с язвенными гастродуоденальными кровотечениями, не леченных зонтаксом, функция кортикостероидсвязывающего глобулина характеризуется повышением связывания лиганда и резким снижением специфической ассоциативной способности, что способствует более активному потреблению глюкокортикоидов тканями-мишенями и усилению метаболического эффекта глюкокортикоидов, уровень которых в крови этих больных существенно увеличен. Хотя абсолютные значения концентрации инсулина в крови больных, не леченных зонтаксом, во все сроки исследования, исключая 14-е сутки, существенно не изменялись, коэффициент кортизол/инсулин был резко увеличен (на 1-е сутки — в 1,7 раза, на 3-и сутки — в 1,7 раза, на 7-е сутки — в 2,0 раза, на 14-е сутки — в 2,3 раза), что указывает на значительное усиление процессов катаболизма [10].

Под влиянием зонтакса абсолютное и относительное число мест связывания кортизола кортикостероидсвязывающего глобулина в сыворотке крови больных с язвенными гастродуоденальными кровотечениями во все сроки исследования не отличалось от значений этих параметров в группе доноров, что свидетельствует о нормализующем влиянии зонтакса на связывающую способность кортикостероидсвязывающего глобулина. Нормализующее влияние зонтакса на относительное число мест связывания кортизола кортикостероидсвязывающего глобулина максимально проявлялось на 7-е и 14-е сутки исследования (см. таблицу).

Изучение влияния зонтакса на аффинную способность кортикостероидсвязывающего глобулина с лигандом показало, что препарат достоверно повышал K_d и снижал K_d комплекса во все сроки наблюдения по сравнению с аналогичными параметрами в группе больных, не леченных зонтаксом. При этом под влиянием зонтакса параметры K_d и K_d комплекса не отличались от таковых в группе доноров, что также свидетельствует о нормализующем влиянии зонтакса на специфическую функцию кортикостероидсвязывающего глобулина. Повышение сродства кортикостероидсвязывающего глобулина к кортизолу под влия-

нием зонтакса является основным механизмом снижения потребления свободного кортизола тканями-мишенями, в результате чего ослабевает и метаболический эффект эндогенного глюкокортикоида. У больных, леченных зонтаксом, обнаруживается тенденция к снижению концентрации кортизола и повышению концентрации инсулина в сыворотке крови во все сроки наблюдения, исключая 1-е сутки. Под влиянием зонтакса коэффициент кортизол/инсулин значительно снижался по сравнению со значениями коэффициента в группе больных, не леченных зонтаксом (на 3-и сутки — в 1,8 раза, на 7-е сутки — в 1,9 раза, на 14-е сутки — в 1,5 раза), и достигал значений в контрольной группе доноров. Все это указывает на снижение катаболического эффекта кортизола под влиянием зонтакса.

Таким образом, проведенные исследования показали, что под влиянием зонтакса у больных с язвенными гастродуоденальными кровотечениями происходит нормализация нарушенной функции кортикостероидсвязывающего глобулина, выполняющего важную роль в процессе активации стресса, наблюдается тенденция к снижению концентрации кортизола и повышению концентрации инсулина в крови.

В группе больных, леченных зонтаксом, оперированы 2 с язвой желудка, 3 с язвой двенадцатиперстной кишки, тогда как в группе больных, не леченных зонтаксом, оперированы 7 с язвой желудка, 3 с язвой двенадцатиперстной кишки. Лечение зонтаксом во всех случаях приводило к полному рубцеванию язвы; рецидивов кровотечений не было. Пребывание в стационаре больных, леченных зонтаксом, было менее длительным (22 койко-дня), чем больных, не леченных зонтаксом (23,1 койко-дня).

Обнаруженные в наших исследованиях повышение уровня кортизола и снижение сродства кортизола к кортикостероидсвязывающему глобулину сыворотки крови больных с язвенными гастродуоденальными кровотечениями имеют важное значение в патогенезе ulcerogenesis. Так, многочисленными исследованиями установлено, что глюкокортикоиды вызывают увеличение секреции пепсина, уропепсина, соляной кислоты в желудке [15, 33, 36]. Особенно интенсивно глюкокортикоиды стимулируют секреторную функцию желудка у больных язвенной болезнью [17]. Глюкокортикоиды увеличивают биосинтез гистамина в желудке [32]. При этом глюкокортикоиды значительно усиливают и секрецию желудочного сока, стимулированную гистамином [24]. Стимуляция желудочной секреции гистамином реализуется через воздействие на H_2 -рецепторы гистамина париетальных клеток [35]. При этом гистамин стимулирует аденилатциклазную систему и повышает содержание цАМФ [37]. Поскольку глюкокортикоиды усиливают секрецию желудочного сока, стимулированную гистамином, то можно полагать, что в данном случае происходит одновременно и стимуляция продукции ацетилхолина, так как ваготомия устраняет ulcerogenный эффект глюкокортикоидов [26]. Вполне возможно, что глюкокортико-

иды оказывают стимулирующее влияние на рецепторы гистамина, ацетилхолина и гастрина париетальных клеток, секретирующих соляную кислоту. Подтверждением этого служат данные о том, что блокаторы H_2 -рецепторов гистамина резко подавляют секрецию соляной кислоты париетальными клетками в ответ на введение ацетилхолина, гастрина или гистамина [22].

Повышение уровня глюкокортикоидов в крови подавляет продукцию поликлональных иммуноглобулинов мононуклеарами [25]. Снижение клеточного и гуморального иммунитета способствует контаминации кампилобактерами поверхностного эпителия желудка энтерального и пилорического отделов желудка [14]. Установлено, что грамотрицательные бактерии кампилобактеры играют важную роль в патогенезе язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки — они вызывают разрушение липидного слоя клеточных мембран слизистой желудка с помощью секретируемой кампилобактерами липазы [28, 34].

Обнаруженное в наших исследованиях выраженное влияние зонтак (ранитидина) на функцию кортикостероидсвязывающего глобулина следует рассматривать как проявление антиглюкокортикоидного и антистрессорного эффекта препарата. Подтверждением этого служат данные о том, что чем выше K_2 комплекса кортикостероидсвязывающий глобулин — кортизол в крови, тем менее активен трансмембранный транспорт свободного кортизола в клетки тканей-мишеней [18]. Механизм стресслимитирующего действия зонтак у больных с язвенными гастродуоденальными кровотечениями может быть связан с прямым влиянием этого препарата на специфический глюкокортикоидсвязывающий локус молекулы кортикостероидсвязывающего глобулина. Недавно было установлено, что нестероидные препараты способны изменять функцию глюкокортикоидных рецепторов II и III типов, которые по физико-химическим характеристикам весьма близки к кортикостероидсвязывающему глобулину [2, 12, 27].

ЛИТЕРАТУРА

1. Георгадзе А. К., Фомин В. Б., Булгаков С. А. // Хирургия. — 1990. — № 3. — С. 39—43.
2. Голиков П. П., Кладиев А. А., Николаева Н. Ю. // Вестн. АМН СССР. — 1989. — № 7. — С. 20—28.
3. Голиков П. П., Николаева Н. Ю., Кладиев А. А. // Пат. физиол. — 1989. — № 4. — С. 19—22.
4. Горбашко А. Н. Диагностика и лечение кровопотери. — М., 1982.
5. Гринберг А. А., Ермолов А. С., Затевакин И. И. и др. // Хирургия. — 1990. — № 2. — С. 81—84.
6. Луцевич Э. В., Бахшалиев Б. Р. // Там же. — 1988. — № 12. — С. 41—46.
7. Луцевич Э. В., Горбинов В. П., Наумов Б. П., Гуськова И. И. // Там же. — 1990. — № 2. — С. 149—154.
8. Магидов Т. Ш., Кузнецов В. Д., Шипилов В. А. и др. // Там же. — 1991. — № 3. — С. 39—43.
9. Меерсон Ф. З., Пшенникова М. Г. Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам. — М., 1988.
10. Панин Л. Е., Маянская П. П. Лизосомы: роль в адаптации и восстановлении. — Новосибирск, 1987.
11. Пихлак Э. Г. // Тер. арх. — 1961. — № 12. — С. 83—85.
12. Поздеев Е. В., Петраченко И. Е., Ахмеджанова Н. М. // Бюл. экпер. биол. — 1994. — № 1. — С. 271—274.
13. Помелов В. С., Булгаков Т. А. // Хирургия. — 1990. — № 2. — С. 84—89.

14. Преображенский В. П., Климов П. П., Дегоева Б. А. // Тер. арх. — 1991. — № 4. — С. 126—128.
15. Рабдиль О. С., Вайнштейн С. Г. Эндокринная система желудка. — М., 1973.
16. Розанов В. Е. // Хирургия. — 1991. — № 3. — С. 27—30.
17. Рысс С. М., Рысс Е. С. Язвенная болезнь. — М., 1968. — С. 24—98.
18. Селезнев Ю. М. // Пробл. эндокринологии. — 1982. — № 2. — С. 73—79.
19. Сытник А. П., Горбунов В. П., Наумов Б. А. // Хирургия. — 1994. — № 2. — С. 50—54.
20. Хорев А. П. // Там же. — 1993. — № 9. — С. 6—12.
21. Шентулин А. А. // Клини. мед. — 1994. — № 1. — С. 12—15.
22. Andersen D. K. // Ann. Surg. — 1989. — Vol. 210. — P. 685—703.
23. Bonfils S., Mingnon M., Graffon J. // J. Surg. — 1979. — Vol. 3. — P. 579—604.
24. Cooke A., Grossman M. // Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.). — 1966. — Vol. 123. — P. 704—708.
25. Faict D., Geuppens J. L., De Moor P. // J. Steroid Biochem. — 1985. — Vol. 23. — P. 553—555.
26. Kelly J. L., Regan W. G. // Amer. J. Surg. — 1966. — Vol. 111. — P. 664—667.
27. Lowy M. T. // Neuroendocrinology. — 1990. — Vol. 51. — P. 190—196.
28. Marshall B. J. // J. Gastroenterol. Hepatol. — 1991. — Vol. 6. — P. 121—124.
29. Mickelson K. E., Forsthoepelg J., Westphal U. // Biochemistry. — 1988. — Vol. 20. — P. 6211—6218.
30. Savu L., Lombart Ch., Nunez E. // FEBS Lett. — 1980. — Vol. 113. — P. 102—106.
31. Scatchard T. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1949. — Vol. 51. — P. 660—665.
32. Scayer R. W. // Perspectiv. Biol. Med. — 1967. — Vol. 10. — P. 409—411.
33. Shay H. // Amer. J. Dig. Dis. — 1959. — Vol. 4. — P. 846—849.
34. Slomiany B. L., Kosinathan C. // Amer. J. Gastroenterol. — 1989. — Vol. 84. — P. 273—277.
35. Soll A. H., Grossman M. I. // Amer. Rev. Med. — 1978. — Vol. 29. — P. 495—507.
36. Spellberg A. M. // Amer. J. Gastroenterol. — 1956. — Vol. 26. — P. 342—346.
37. Wollin A., Soll A. H., Samloff L. M. // Amer. J. Physiol. — 1979. — Vol. 237. — P. 437—443.
38. Wolfe M., Jensen R. T. // J. Med. — 1987. — Vol. 317. — P. 1200—1209.

Поступила 07.07.94

STRESS-LIMITING EFFECT OF ZONTAC IN ULCERATIVE GASTRODUODENAL HEMORRHAGES

A. S. Yermolova, G. V. Pakhomova, L. F. Tveritneva, P. P. Golikov, N. Yu. Nikolayeva

N. V. Sklifosovsky Emergency Care Institute, Moscow

Two randomized groups of patients with ulcerative gastroduodenal hemorrhage were studied. One group of patients with bleeding-accompanied ulcerative disease of the stomach ($n = 11$) and the duodenum ($n = 22$) received the routine therapy, another group, including those of the same diseases ($n = 9$ and $n = 22$, respectively) had additionally the histamine H_2 -receptor blocking agent zontac by the following schedule: intravenously, 50 mg thrice a day within the first 3 days, and orally, 150-mg tablets twice a day within the following 3 weeks. Donors ($n = 20$) served as a control group for the zontac-treated and untreated patients. The stress-limiting effect of zontac was evaluated by the physico-chemical parameters of corticosteroid-binding globulin, serum cortisol and insulin concentrations which were measured on days 1, 3, 7, and 14 following the first hemorrhage. In the zontac-treated group, the association constant of the blood cortisol-corticosteroid-binding globulin increased, while the dissociation constant decreased. At the same time the absolute and relative number of sites for binding of cortisol by means of corticosteroid-binding globulin also dropped to the values seen in the group of donors. Zontac caused a reduction in the cortisol/insulin ratio. This all suggests that zontac produces its stress-limiting effect in patients with ulcerative gastroduodenal hemorrhage. Zontac therapy decreased the need for surgical arrest of bleeding by 50% and the average day/bed.

АРТУР АНАНЬЕВИЧ КАРЕЛИН (к 60-летию со дня рождения)



15 ноября 1995 г. исполнилось 60 лет руководителю клинко-биохимической лаборатории Института хирургии им. А. В. Вишневского РАМН профессору Артуру Ананьевичу Карелину.

В начале своей научной деятельности, работая на кафедре биологической химии I Московского медицинского института им. И. М. Сеченова, А. А. Карелин занимался вопросами клинической энзимологии, внедрением методов энзимодиагностики в клиническую практику.

В 1965 г. А. А. Карелиным впервые в мировой литературе было сообщено, что в сыворотке крови и моче у подавляющего большинства больных с различными поражениями почек обнаруживается трансамидиназа (L-аргинин:глицин-амидинотрансфераза) — специфический почечный фермент, играющий важную роль в биосинтезе креатина у млекопитающих. В то же время у здоровых людей трансамидиназная активность не обнаруживается ни в крови, ни в моче.

В дальнейшем им был разработан и внедрен в клиническую практику ряд других “органоспецифических” сывороточных ферментных проб на выявление поражения печени (бетаин-гомоцистеин-метилтрансфераза), сочетанного поражения печени и поджелудочной железы (гуанидинацетат-метилтрансфераза). Это положило начало новому направлению отечественной диагностической энзимологии — исследованию в клинике так называемых органоспецифических ферментов и изоферментов, т. е. ферментов, строго ло-

кализированных только в одном или двух органах и отсутствующих в других органах и тканях, а также в сыворотке крови. Поэтому появление таких ферментов в крови при наличии клинических признаков болезни с очевидностью решает вопрос об источнике их происхождения, а следовательно, повышает точность диагноза и прогноза заболевания.

А. А. Карелин один из первых в нашей стране начал изучение роли циклического 3',5'-аденозинмонофосфата (цАМФ) в регуляции клеточного метаболизма. В 1972—1974 гг. им была установлена роль цАМФ в регуляции биосинтеза креатина и ресинтеза метионина в клетках печени и поджелудочной железы.

В 1978 г. А. А. Карелин, возглавляя лабораторию биохимии Института хирургии им. А. В. Вишневского, занимается изучением особенностей биохимических нарушений регуляции обмена при ожоговой и раневой патологии. В частности, им было изучено состояние аденилатциклазы при острой ожоговой травме, определена роль цГМФ и имидазола в стимуляции ранозаживления.

Международную известность А. А. Карелину принесло открытие в 1981 г. новой физико-химической реакции на плазматической мембране животной клетки — аэробного образования АТФ из АДФ и неорганического фосфата, сопряженное с переносом электронов в ответ на опосредуемые рецепторами сигналы к росту, клеточной пролиферации и хемотаксису. Было установлено, что одной из ключевых стадий трансмембранной передачи митогенного сигнала, инициированного факторами роста, является быстрое, в течение 1 мин, образование на плазматических мембранах клеток-мишеней АТФ, пригодного для активации мембранно-связанных киназ.

Как оказалось, аэробный синтез АТФ из АДФ и неорганического фосфата на плазматических мембранах в отличие от “протонных” мембран (митохондрии, хлоропласты) происходил за счет $\Delta\mu\text{Na}^+$ в ходе Na^+/H^+ -обменного ионтранслоцирующего фосфорилирования. Предположительно он был сопряжен с одноэлектронным механизмом восстановления молекулярного кислорода при окислении NADH. Синтез АТФ на плазматических мембранах не стимулировали полипептидные гормоны, действие которых опосредуется через цАМФ.

Под руководством А. А. Карелина в Институте хирургии им. А. В. Вишневского РАМН на основе криопреципитата, комплекса протеинов плазмы крови создан биологический клей РАБРОМ, который успешно используется уже в