

А. В. Труфанов

ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ ДЕЙСТВИЕ РЕТИНОЛА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ (РЕТИНОИДОВ)

Институт экспериментальной патологии и терапии АМН СССР, Сухуми

Известно, что витамин А необходим для поддержания роста, зрения, размножения и дифференциации эпителиальной ткани. При его недостаточности нормальный цилиндрический эпителий, снабженный ресничками и образующими слизь клетками (например, в трахее), предохраняющими от инфекции и других вредных агентов, заменяется чешуйчатыми клетками, лишенными ресничек и не продуцирующими слизь. Степень этой чешуйчатой метаплазии всегда параллельна тяжести и продолжительности недостаточности витамина А. Метапластические изменения при последней подобны тем, которые предшествуют неоплазии эпителия кожи, бронхов, трахеи, кишечника, желудка, матки и протока поджелудочной железы [1, 2]. Это указывает на возможность применения высоких доз витамина А при профилактике и устранении неопластических изменений [3, 4].

Проведенные опыты показали, что высокие пероральные дозы витамина А (ретиноилпальмитата) предупреждали и тормозили развитие у хомяков карциномы желудка [5], у мышей папилломы кожи [6], вызванных 7,12-диметилбензантраценом, или папилломы Шонппа у кроликов, обусловленной вирусом [7]. Однако высокие дозы витамина А сильно вредят развитию эмбриона [8]. Избыток этого витамина вызывает в эпидермисе повышенную кератинизацию и превращение фолликулов волос в железы, выделяющие слизистые вещества, а также быструю потерю ими гликогена [9]. В печени крыс с гипервитаминозом повышено содержание гликогена [10] и общих липидов [11]. Токсические явления при избытке витамина А отмечены многими исследователями.

Клинические исследования показали, что пациентов с установленным кератозом кожи или карциномой основных клеток можно успешно излечить местным применением витамин А кислоты (ретиноевой кислоты) [12]. Процесс кератинизирующей чешуйчатой метаплазии эпителия трахеи и бронхов с потерей секретирующих слизь клеток, обнаруживаемый у крыс и хомяков с недостаточностью витамина А, также очень близок к вызванному некоторыми химическими канцерогенами [2]. Однако не все эпителии реагируют на недостаток витамина А одинаково: эпидермис становится ороговевшим, а слизистая оболочка кишечника не проявляет кератинизации и теряет часть своих бокаловидных клеток. Тем не менее систематическое введение витамина А восстанавливает способность того и другого эпителия нормально функционировать.

Значение связи ретиноидов с белками. Для проникновения в клетки ретиноиды, так же, как и другие витамины и гормоны, требуют связывания с ренентором (специфическим белком). Белок, связывающий и транспортирующий ретинол (РСБ), был выделен из сыворотки человека. В свою очередь он образует комплекс с преальбумином. Молекулярная масса этого комплекса оказалась равной 85 000, преальбумина 64 000, а белка, свя-

зывающего ретинол, 21 000 [13]. Преальбумин стабилизирует РСБ в сыворотке [14]. Транспортный белок сыворотки, связывающий ретинол, почти также эффективно связывал ретиноевую кислоту [15]. В тканях крыс тоже был найден специфический РСБ [16]. Он отличался от сывороточного РСБ и тканевого белка, связывающего ретиноевую кислоту как по молекулярной массе, так и по распределению в тканях. Молекулярная масса тканевого РСБ 14 000, а тканевого белка, связывающего ретиноевую кислоту, оказалась равной 14 500. Кишечник, почки, печень, легкое и селезенка содержат РСБ, но лишены белка, связывающего ретиноевую кислоту. Конкуренционные опыты показали, что ретинол не вытесняет радиоактивной ретиноевой кислоты из связанного с белком состояния и наоборот, эта кислота не вытесняет меченого ретинола, связанного со специфическим РСБ [16]. Это указывало на различия этих тканевых белков. Установлен параллелизм между способностью цис-изомеров ретинола связываться с клеточным (тканевым) РСБ и стимулировать рост крыс с недостаточностью витамина А [17].

Давно отмечена связь витамина А с образованием и распадом белков. Применение тканевых культур для изучения влияния этого витамина на обмен нуклеиновых кислот показало, что добавление его к культуре эпидермальных клеток новорожденных мышей резко повышало синтез РНК [18]. Недостаточность витамина А не только понижала содержание РНК, но и изменяла свойства образованной РНК. Например большинство молекул РНК, образованных в эпителии трахеи хомячков с недостаточностью витамина А, имели более высокую электрофоретическую подвижность, чем РНК трахеи нормальных хомячков [19].

Повышение количества РНК, ДНК и белка в культуре эпидермальных клеток мыши и трахеи хомячков, вызванное добавлением витамина А или его производных, протекало параллельно уменьшению процента клеток с кератином и кератогиалиновыми гранулами в культуре [20].

Из трех типов культуры клеток: лимфоцитов человека, эпидермальных клеток морской свинки и фибробластов морской свинки ретиноевая кислота стимулировала синтез ДНК только в культуре эпидермальных клеток [21].

Специфический белок, связывающий ретиноевую кислоту, был найден в ряде нормальных тканей и опухолей. Хотя видовой вариабельности в распределении такого белка не обнаружено, однако в тканях молодых животных, особенно в эмбрионах, содержание белка, связывающего ретиноевую кислоту, выше, чем в тканях взрослых. Так, белок, связывающий ретиноевую кислоту, выявлен в изобилии в мозге эмбрионов и молодых животных, но не определяется в мозге взрослых крыс и мышей. Этот белок обнаружен в небольших количествах в мочевом пузыре, предстательной железе, матке, трахее и молочной железе крыс и мышей [22].

Хотя белок, связывающий ретиноевую кислоту, в здоровом легком отсутствовал, его находили в карциноме легкого и молочной железы человека [23].

Способностью связываться с этим специфическим белком обладают только ретиноевая кислота и ее аналоги со свободной карбоксильной группой. На эпителии кожи плюсны 13-дневного эмбриона цыпленка установлено, что среди аналогов ретиноевой кислоты наиболее активен циклопентениловый, так как он наиболее активно конкурировал за связывающее место на белке и обладал наибольшей активностью в предупреждении чешуйчатой метаплазии [24]. Менее активные α -ретиноевая кислота и триметилметоксифениловый аналог слабее связывались со специфическим белком [25]. Таким образом, антиопухольная активность зависела от связывания ретиноевой кислоты со специфическим белком.

Антиканцерогенная активность различных ретиноидов. Снижение у крысы содержания витамина А в слизистой оболочке кишечника с трансплантированной адеинокарциномой ее [26] показывает, что недостаток этого

витамина оказывает непосредственное влияние на образование и развитие опухоли.

Несмотря на установленное терапевтическое действие ретиноидов, использование их в предупреждении пренеоплазии и неоплазии ограничено вследствие их токсического побочного действия. Это побудило синтезировать аналоги природных ретиноидов, которые бы эффективно предупреждали пренеоплазию и были лишены токсичности. В качестве исследуемого объекта использовали культуру органа предстательной железы мыши [27], эксплантат эпителия кожи эмбриона цыпленка [28] или пролиферат мышечных L_{299} -клеток [29]. Наиболее приемлемой оказалась культура предстательной железы мыши с гиперплазией, вызванной N-метил-N¹-нитро-N-нитрозогуанидином (МННГ), на которой исследовалась антигиперпластическая активность β -ретиноевой кислоты и 9 синтезированных аналогов (ретиноидов) [27]. Через 8—10 дней, когда большинство трансплантатов обнаружило гиперплазию, карциноген удаляли и трансплантат инкубировали в контрольной среде и среде, содержащей разные концентрации ретиноида. Антимитотическую активность ретиноида, введенного в культуру, сравнивали с активностью ретиноевой кислоты (табл. 1). Метилкетоцикло-

Т а б л и ц а 1
Сравнительная антигиперпластическая активность различных ретиноидов [27]

Исследуемое соединение	Доза, моль в промытой среде	Митотическая активность ($M \pm m$)			
		после введения ретиноида		в контроле, обработанном 1 мкг МННГ/мл среды	
		через 10 дней	через 12 дней	через 10 дней	через 12 дней
β -Ретиноевая кислота	$1,7 \times 10^{-9}$	44 ± 9	56 ± 6	216 ± 28	216 ± 28
Метилкетоциклопентениловый аналог ретиноевой кислоты	$6,1 \times 10^{-7}$	123 ± 20	62 ± 36	216 ± 28	216 ± 28
1-Метоксиэтилциклопентениловый аналог ретиноевой кислоты	$6,1 \times 10^{-7}$	72 ± 25	166 ± 37	216 ± 28	216 ± 28
Ретинил-метиловый эфир	$3,3 \times 10^{-6}$	132 ± 78	100 ± 40	459 ± 100	554 ± 113
Триметилметоксифениловый аналог ретиноевой кислоты	$3,1 \times 10^{-6}$	151 ± 65	83 ± 34	218 ± 45	325 ± 50
N-ацетил-ретиниламин	$3,1 \times 10^{-6}$	216 ± 28	230 ± 72	459 ± 109	554 ± 113
Ретиналацетилгидразон	$3,1 \times 10^{-6}$	206 ± 81	153 ± 49	368 ± 83	312 ± 58
Ретинальоксим	$3,3 \times 10^{-6}$	92 ± 47	244 ± 62	368 ± 83	312 ± 58
Хлоротриметилфениловый аналог ретиноевой кислоты	$3,1 \times 10^{-6}$	202 ± 49	190 ± 78	236 ± 56	318 ± 69
α -Ретинилацетат	$3,1 \times 10^{-6}$	170 ± 45	290 ± 52	283 ± 102	225 ± 27

пентениловый и 1-метоксиэтил-циклопентениловый аналоги ретиноевой кислоты были примерно в 50 раз активнее, чем ретиноевая кислота, в устранении гиперплазии, вызванной N-метил-N¹-нитро-N-нитрозогуанидином. Триметилметоксифениловый аналог ретиноевой кислоты и ретинилметиловый эфир были значительно более активны, чем ретиноевая кислота. Три аналога: N-ацетилретиниламин, ретиналацетилгидразон и ретинальоксим обладали одинаковой с ретиноевой кислотой активностью. Хлоротриметилфениловый аналог проявил меньшую активность, чем β -ретиноевая кислота, а α -ретинилацетат оказался полностью неспособным тормозить митоз [27].

При оценке антиопухолевой активности аналогов витамина А по торможению дифференциации и кератинизации эпителия кожи плюсны 13-дневного эмбриона цыпленка в культуре ткани (которое можно рассматривать

как премалигнизацию) установлено отношение активностей, близкое к указанному в табл. 1 (табл. 2).

Из всех исследованных ретиноидов метилкетациклопентениловый аналог ретиноевой кислоты при испытании в обеих культурах (предстательной железы мыши и эпителии кожи плюсны эмбриона цыпленка) оказался наиболее активным, а α -ретинилацетат наименее активным.

Кроме указанных ретиноидов, синтезированы полностью транс-9-(4-метокси-2,3,6-триметил-фенил)-3,7-диметил — 2,4,6,8-нонатетраеновая кислота и ее эфиры. Этиловый эфир этой кислоты, названный ароматическим ретиноидом (Ro10-9359), сравнивали по антиопухоловой и гипervитаминозной (токсической) активности с ретиноевой кислотой [30]. Антиопухоловая активность определялась дозой, вызывающей 50% устранение кожных папиллом (и карцином), вызванных у мышей смазыванием кожи смесью 7,12-диметилбензантраценом и кротоновым маслом.

Таблица 2

Торможение премалигнизации кожи плюсны 13-дневного эмбриона цыпленка разными ретиноидами [28]

Исследуемое соединение	Концентрация, моль	% Эксплантатов, обнаруживших			% эксплантатов, обнаруживших изменение дифференциации	Концентрация ретиноида, требуемая для торможения 80% кератиноза, моль
		кератиноза	увеличение уровня кератина и муцина	металлазию слизистой оболочки		
β -Ретиноевая кислота	$4,3 \times 10^{-6}$	14	57	29		
β -Ретиноевая кислота	$1,7 \times 10^{-5}$	0	0	100	100	$4,3 \times 10^{-6}$
α -Ретиноевая кислота					100	$2,2 \times 10^{-6}$
Метилретиноат					100	$1,1 \times 10^{-6}$
Метилкетациклопентениловый аналог ретиноевой кислоты					100	$5,5 \times 10^{-7}$
Триметилметоксифениловый аналог ретиноевой кислоты					100	$3,0 \times 10^{-6}$
β -Ретинилацетат	$1,6 \times 10^{-5}$	29	—	50	71	$1,6 \times 10^{-5}$
Ретинол	$1,8 \times 10^{-5}$	23	54	14	78	$1,8 \times 10^{-5}$
α -Ретинилацетат	$3,3 \times 10^{-5}$				0	$1,3 \times 10^{-4}$

Терапевтическая активность ароматического ретиноида оказалась в 10 раз выше, чем β -ретиноевой кислоты.

Отмечено, что этерификация ретиноидов значительно понижает их токсические свойства [31], а следовательно, повышает терапевтическое значение. Это видно на примере более высокой терапевтической активности метилретиноата по сравнению с ретиноевой кислотой, (см. табл. 2) и метилового или бутилового эфира ретинола по сравнению со свободным ретинолом [31]. Однако, как будет указано в следующем разделе, при двухстадийном канцерогенезе ретиноловые эфиры оказались слабо активными. Терапевтического эффекта не обнаружено также при местном применении ретинопальмитата в период прогрессирующей стадии развития опухоли [32] или при пероральном введении высоких доз ретинилацетата после введения канцерогена [33].

Механизм антиопухолового действия ретиноидов. Местное применение ретиноидов вызывает через 2 дня в опухолях кожи (кератоакантоме) образование соединений клеточных полостей, которое затем расширяется. Соединение полостей наступает, когда увеличено количество грубых поверхностей эндоплазматического ретикулаума и цистерн Гольджи. Это раннее

появление соединительных полостей облегчает метapлазию слизистой оболочки и способствует ей [34].

Цистерны Гольджи служат местом образования веществ, создающих слизь [35], и синтеза гликопротеинов. Количество слизи ограничено в нормальном эпителии и очень заметно в опухоли. В кишечнике ретиноиды требуются для образования бокаловидных клеток, секретирующих слизь [36].

Биохимические исследования метapлазии кератоакантомы уха кролика показали, что местное применение ретиноевой кислоты через 48 ч стимулировало в 2—3 раза включение C^{14} -глюкозамина и в 10 раз включение H^3 -фукозы в гликопротеины [37]. Синтез содержащих фукозу гликопротеинов особенно важен, так как фукоза характерна для секретируемых гликопротеинов и не обменивается с другими сахарами [38]. В то же время уменьшение размеров папилломы при внутрибрюшинном введении ароматического ретиноида приписывают потере отростков и образованию некрозов в опухоли. В противоположность неспособности повышать синтез ДНК в папилломе ароматический ретиноид стимулировал синтез ДНК в нормальной коже [39].

Наиболее приемлемым механизмом антиопухолевого действия ретиноидов является торможение активности орнитиндекарбоксилазы (КФ4,1,1,17), образующей токсический диамин — путресцин [40]. Предпосылками для этого служат следующие факты. В клетках и тканях с вызванной пролиферацией активность энзимов, образующих полиамины, повышена [41, 42]. Малигнизация повышает активность этих энзимов и содержание продуктов их деятельности: путресцина, спермидина и спермина [43].

Известно, что кротонное масло служит хорошим активатором кожных опухолей, вызванных низкими дозами канцерогена [44]. Из этого масла выделены 12,13-дифиры форбола [45], из которых 12-0-тетрадеcanoилфорбол-13-ацетат наиболее активно стимулировал образование кожной опухоли [46] и в то же время синтез РНК, белка и ДНК в эпидермисе кожи мыши [47]. В то же время активация энзимов, образующих полиамины, и увеличение их концентрации в клетках являются необходимой особенностью пренеоплазии кожи мыши [48]. Однократное местное применение 12-0-тетрадеcanoилфорбол-13-ацетата вызывало быстрое и значительное (примерно в 250 раз) повышение активности орнитиндекарбоксилазы, тогда как активность другого фермента биосинтеза полиаминов — S-аденозил-1-метиониндекарбоксилазы возрастала слабо и медленно [49]. Установлена хорошая согласованность между способностью форболовых эфиров активировать опухоли кожи *in vivo* и стимулировать синтез ДНК, а также индуцировать активность орнитиндекарбоксилазы в клетках эпителия *in vitro* [50]. Высокие канцерогенные дозы углеводов вызвали такую же высокую активность орнитиндекарбоксилазы и слабо влияли на S-аденозил-1-метиониндекарбоксилазу, как и 12-0-тетрадеcanoилфорбол-13-ацетат. Наоборот, гиперпластические агенты почти не повышали активности орнитиндекарбоксилазы, но увеличивали активность S-аденозил-1-метиониндекарбоксилазы [49]. Местное применение ретиноевой кислоты приводило к сильному торможению активности орнитиндекарбоксилазы в эпителии мыши, вызванной 12-0-тетрадеcanoилфорбол-13-ацетатом. Степень торможения зависела от дозы и длительности применения ретиноевой кислоты. При этом активность S-аденозил-1-метиониндекарбоксилазы не угнеталась. Испытание других ретиноидов показало, что наибольшей эффективностью как в снижении активности орнитиндекарбоксилазы, так и в торможении образования папиллом у мышей обладала ретиноевая кислота и наименьшей — ретиниловые эфиры [40].

Применение ретиноидов в профилактике и терапии опухолей. Профилактику и терапию опухолей кожи, вызванных канцерогенами, успешно проводили ретиноевой кислотой и ее аналогами [51]. Применение фторураци-

ла в комбинации с ретиноевой кислотой вызывало более активное разрушение кожной опухоли, чем раздельное их использование [52].

Для устранения раздражения кожи при местном применении ретиноидов и токсичности их в высоких дозах разработан метод создания повышенных отложений витамина А в организме. Это достигалось ежедневными инъекциями взрослой крысы по 50 000 МЕ ретинилпальмитата в течение 12 дней [53]. Крысы с таким высоким запасом витамина А, отложенным в печени, были устойчивы к воздействию 7,12-диметилбензантрацена на кожу. Эпидермальная гистология после воздействия ретинилпальмитата и 7,12-диметилбензантрацена была подобна таковой в областях, подверженных действию одного ретинилпальмитата. Кератинизация оказалась заторможенной, клеточной атинии и повреждения клеток с метаплазией слизи не отмечено [54].

Ретиноиды тормозят возникновение не только опухолей кожи и эпителия, но и новообразований других органов, в частности молочной железы. Экспериментальные злокачественные опухоли молочной железы возникают в 100% случаев при внутрибрюшинном введении 20 мг 7,12-диметилбензантрацена 50—65-дневной крысе-самке. Включение в рацион ежедневно по 2,5 мг ретинилацетата крысам, начиная с 7-го дня после внутрибрюшинной инъекции 2,5,5 или 15 мг 7,12-диметилбензантрацена снижало частоту возникновения доброкачественной опухоли молочной железы соответственно на 37, 30 и 31%. Частота заболеваний аденокарциномой молочной железы, индуцируемой 7,12-диметилбензантраценом, снижалась с введением 2,5 мг ретинилацетата на 52% [55]. Однако последний обладал большой токсичностью, поэтому был синтезирован менее токсичный метиловый эфир ретинола, который можно применять в более высоких дозах [56].

З а к л ю ч е н и е

Антиопухолевое противодействие ретиноидов химическим канцерогенам и их активаторам не дает основания считать это действие конкурентным или цитостатическим. Установлено, что ретинилметилат более активен и менее токсичен, чем ретинилацетат, хотя оба эфира имеют одинаковый ретиноловый остаток. Неясно также, почему циклопентеновые аналоги ретиноевой кислоты сильнее тормозят кератинизацию эпителия кожи и гиперплазию предстательной железы, чем сама ретиноевая кислота, и почему антиопухолевая активность триметилметоксифенилового аналога ретиноевой кислоты и его этилового эфира (ароматического ретиноида) выше, чем самой кислоты. В данном случае структурное родство имеет мало отношения к антиопухолевой активности. А-витаминная активность также не коррелирует с антиопухолевой, поскольку ароматический ретиноид, в котором β -иононное кольцо заменено бензольным, лишен витаминной, но обладает сильной антиопухолевой активностью, а ретиноевая кислота, не способная поддерживать зрение и размножение, обладает более сильной антиопухолевой активностью, чем ретинол.

Связан ли механизм антиопухолевого действия ретиноидов с торможением активности орнитиндекарбоксилазы или с устранением другого фактора — в настоящее время еще не выяснено.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Wong Y., Buck R. — *Lab. Invest.*, 1971, v. 24, p. 55—56. — 2. Harris C. C., Sporn M. B., Kaufman D. G. et al. — *J. nat. Cancer Inst. (Wash.)*, 1972, v. 48, p. 743—761. — 3. Sporn M. B., Dunlop N. M., Newton D. L. et al. — *Fed. Proc.*, 1976, v. 35, p. 1332—1338. — 4. Bollag W. — *Europ. J. Cancer*, 1972, v. 8, p. 689—693. — 5. Chu E. W., Malignen R. A. — *Cancer Res.*, 1965, v. 25, p. 884—895. — 6. Davies R. E. — *Ibid.*, 1967, v. 27, p. 237—241. — 7. McMichael H. — *Ibid.*, 1965, v. 25, p. 947—952. — 8. Morriss G. M., Steele C. E. — *J. Embryol. exp. Morph.*, 1974, v. 32, p. 505—514. — 9. Bellows C. G., Hardy M. H. — *Anat. Rec.*, 1977, v. 187, p. 257—

271. — 10. Kumar M., Misra U. K., Venkatasubramanian T. A. — *Naturwissenschaften*, 1965, Bd 52, S. 39—40. — 11. Singh V. N., Singh M., Venkatasubramanian T. A. — *J. Lipid. Res.*, 1969, v. 10, p. 395—401. — 12. Bollag W., Ott F. — *Cancer Chemother. Rep.*, 1971, v. 55, p. 59—60. — 13. Peterson P. A. — *J. biol. Chem.*, 1971, v. 246, p. 34—43. — 14. Peterson P. A. — *Ibid.*, p. 44—49. — 15. Goodman De W. S., Raz A. — *J. Lipid Res.*, 1972, v. 13, p. 338—347. — 16. Ong D. E., Chytil F. — *J. biol. Chem.*, 1975, v. 250, p. 6113—6117. — 17. Ong D. E., Chytil F. — *Nature*, 1975, v. 255, p. 74. — 18. Sporn M. B., Dunlop N. M., Yuspa S. H. — *Science*, 1973, v. 182, p. 722—723. — 19. Kaufman D. G., Baker M. S., Smith J. M. et al. — *Ibid.*, 1972, v. 177, p. 1105—1108. — 20. Sporn M. B., Clamon G. H., Dunlop N. M. et al. — *Nature*, 1975, v. 253, p. 47—50. — 21. Christophers E., Langner A. — *Arch. dermat. Forsch.*, 1974, Bd 251, S. 147—153. — 22. Sani B. P., Corbett T. H. — *Cancer Res.*, 1977, v. 37, p. 201—213. — 23. Ong D. E., Page D. L., Chytil F. — *Science*, 1975, v. 190, p. 609—611. — 24. Sani B. P., Hill D. L. — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1974, v. 61, p. 1276—1282. — 25. Sani B. P., Hill D. L. — *Cancer Res.*, 1976, v. 36, p. 409—413. — 26. Sundaresan P. R., DeLuca L. M. — *J. nat. Cancer Inst. (Wash.)*, 1977, v. 58, p. 1643—1645. — 27. Chopra D. P., Wilkoff L. J. — *Ibid.*, 1976, v. 56, p. 583—587; 1977, v. 58, p. 923—929. — 28. Wilkoff L. J., Peckham J. C., Dulmage E. A. et al. — *Cancer Res.*, 1976, v. 36, p. 964—972. — 29. Dion L. D., Blalock J. E., Gifford G. E. — *J. nat. Cancer Inst. (Wash.)*, 1977, v. 58, p. 795—800. — 30. Bollag W. — *Experientia (Basel)*, 1974, v. 30, p. 1198—1199. — 31. Sporn M. B., Dunlop N. M., Newton D. L. et al. — *Nature*, 1976, v. 263, p. 110—113. — 32. Polliack A., Levij J. S. — *Cancer Res.*, 1969, v. 29, p. 327—332. — 33. Smith D. M., Rogers A. E., Herndon B. J. et al. — *Cancer Res.*, 1975, v. 35, p. 11—16, 1485—1488. — 34. Prutkin L. — *Ibid.*, 1975, v. 35, p. 364—369. — 35. Neutra M., Leblond C. P. — *J. Cell Biol.*, 1966, v. 36, p. 137—150. — 36. DeLuca L., Seumacher M., Nelson D. P. — *J. biol. Chem.*, 1971, v. 246, p. 5762—5765. — 37. Levinson S. S., Wolf G. — *Cancer Res.*, 1972, v. 32, p. 2248—2252. — 38. Melchers F. — *Biochem. J.*, 1971, v. 125, p. 241—247. — 39. Frigg M., Torhorst J. — *J. nat. Cancer Inst. (Wash.)*, 1977, v. 58, p. 1365—1371. — 40. Verma A. K., Boutwell R. K. — *Cancer Res.*, 1977, v. 37, p. 2196—2201. — 41. Raina A., Jänne J., Hannonen P. et al. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1970, v. 171, p. 697—708. — 42. Russell D. H., McVicker T. A. — *Biochim. biophys. Acta*, 1971, v. 244, p. 85—93. — 43. Bachrach U. — *Ital. J. Biochem.*, 1976, v. 25, p. 77—93. — 44. Boutwell R. K. — *Progr. Exp. Tumor Res.*, 1964, v. 4, p. 207—250. — 45. Bresch H., Kreibich G., Kubinyi H. et al. — *Z. Naturforsch.*, 1968, Bd 23b, S. 538—546. — 46. Paul D., Hecker E. — *Cancer Res.*, 1969, v. 29, p. 1218—1225. — 47. Paul D., Hecker E. — *Z. Krebsforsch.*, 1969, Bd 73, S. 149—163. — 48. Baird W. M., Sedgwick J. A., Boutwell R. K. — *Cancer Res.*, 1971, v. 31, p. 1434—1439. — 49. O'Brien T. G., Sinsiman R. C., Boutwell R. K. — *Ibid.*, 1975, v. 35, p. 2426—2433. — 50. O'Brien T. G. — *Ibid.*, 1976, v. 36, p. 2644—2653. — 51. Yuspa S. H., Lichti U., Ben T. et al. — *Nature*, 1976, v. 262, p. 402—404. — 52. Bollag W. — *Europ. J. Cancer*, 1974, v. 10, p. 731—737; 1975, v. 11, p. 721—724. — 53. Prutkin L. — *Cancer Res.*, 1973, v. 33, p. 128—133. — 54. Brown J. V., Lane B. P. — *Am. J. Path.*, 1971, v. 64, p. 155—164. — 55. Brown J. V., Lane B. P., Pearson J. — *J. nat. Cancer Inst. (Wash.)*, 1977, v. 58, p. 1347—1355. — 56. Moon R. C., Grubbs C. J., Sporn M. B. — *Cancer Res.*, 1976, v. 36, p. 2626—2630. — 57. Grubbs C. J., Moon R. C., Sporn M. B. et al. — *Ibid.*, 1977, v. 37, p. 599—602.

Поступила 2/1 1978 г.

THE ANTITUMORAL EFFECT OF RETINOL AND ITS DERIVATIVES (RETINOIDS)

A. V. Trufanov

Institute of Experimental Pathology and Therapy, Academy of Medical Sciences of the USSR, Sukhumi

Morphologic alterations in epithelium, caused by incompetency of retinoids in a diet, were similar to those, obtained after treatment with chemical carcinogens. This suggests to use various derivatives of nature retinoids for treatment of epithelial tumors in skin and other tissues. Cultures of mouse prostatic gland and skin epithelium from metatarsus of chicken embryo were used for study of antitumoral activity of various synthetic retinoids. The most active preparations proved to be cyclopentenyl- and trimethyl methoxyphenyl ethyl ester derivatives of retinoic acid. The antitumoral effect of retinoic acid and its derivatives appears to involve a tight binding of the preparations with specific protein and inhibition of ornithine decarboxylase in tumor. The enzyme is well known to be related to synthesis of DNA, RNA and protein.

Г. В. Троицкий, К. Ф. Селиванова, О. В. Глушкова, Н. В. Корниенко,
В. П. Завьялов

ИЗУЧЕНИЕ СУБФРАКЦИОННОГО СОСТАВА И СТРУКТУРНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ИММУНОГЛОБУЛИНОВ G ПРИ НЕКОТОРЫХ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ

Кафедра биологической химии и кафедра факультетской терапии лечебного факультета
Крымского медицинского института, Симферополь

Представлены результаты изучения физико-химических свойств γ -глобулиновой фракции и иммуноглобулинов G сыворотки крови методом дифференциальной температурно-пертурбационной спектрофотометрии и ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе у двух групп больных. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при токсическом зобе и хронической пневмонии наблюдаются уменьшение числа пертурбируемых температурой тирозинов и увеличение доли щелочной субфракции иммуноглобулинов G, более выраженные при нарушении функции щитовидной железы.

Ранее нами были обнаружены изменения структурных характеристик γ -глобулиновой фракции белков сыворотки крови при нарушении функции щитовидной железы и сахарном диабете [1—5]. Эти изменения заключались в увеличении спектрополяриметрической константы уравнения Моффита b_0 |6| до значения $+132 \pm 22$ ($P < 0,001$) при патологии, в то время как у γ -глобулиновой фракции сыворотки крови здоровых людей эта величина была близка к нулю. Исследование изоэлектрических фракций иммуноглобулина G (IgG) человека и животных в норме показало значительные отличия дисперсии оптического вращения отдельных фракций по сравнению с суммарным IgG. Эти отличия наблюдались как при исследовании дисперсии оптического вращения в видимой части спектра, так и в дальнем УФ-свете в области эффекта Коттона. Так, например, величина b_0 для отдельных фракций варьировала от -50 до $+60$ [7—10], но в среднем b_0 была равна ± 20 . Положительные величины b_0 были характерны для фракций со щелочными изоэлектрическими точками, а отрицательные — для фракций с кислыми изоэлектрическими точками. Исходя из полученных данных, ранее обнаруженные изменения структурных характеристик γ -глобулиновой фракции при патологии только частично можно было объяснить изменением субфракционного состава и приходилось допустить изменения структуры иммуноглобулинов. Предположение это имеет тем больший интерес, что известную роль в развитии некоторых заболеваний щитовидной железы играет тиреостимулирующий IgG [11].

В данной работе нами проведено изучение субфракционного состава и дальнейшей характеристики структурных изменений γ -глобулиновой фракции и IgG, выделяемых электрофорезом и ионообменной хроматографией в норме и при некоторых патологических состояниях (нарушениях функции щитовидной железы и хронических воспалениях легких). Для характеристики возможных структурных изменений иммуноглобулинов использован метод дифференциальной температурно-пертурбационной спектрофотометрии (ДТПС), который оказался весьма чувствительным к изменению доступности хромофоров, особенно тирозина и триптофана [12—16], что позволяет оценивать жесткость или лабильность структуры этих белков в области, соответствующей антигенсвязывающему центру [17—18].

М е т о д и к а

Получение γ -глобулиновой фракции. γ -Глобулин из сыворотки крови получали методом препаративного электрофореза в 1% агаровом геле. Разделение белков проводили в 0,075 М вероналовом буфере pH 8,6 при силе тока 10 мА/см в течение $3\frac{1}{2}$ —4 ч [19].

Получение IgG и его субфракций методом ионообменной хроматографии. ДЭАЭ-целлюлозу (фирма «Whatman», Англия) уравнивали 0,005 М фосфатным буфером pH 8,0. Сыворотку крови диализировали против этого же буфера. Собирали две фракции: щелочную, не адсорбирующуюся на ДЭАЭ-целлюлозе в 0,005 М фосфатном буфере pH 8,0, и кислую, элюируемую 0,0175 М фосфатным буфером pH 6,3. В каждой фракции спектрофотометрически определяли содержание белка по поглощению при 280 нм, принимая $A_{280}^{1\%}$, равной 14,0. Соотношение субфракций рассчитывали в процентах.

Контроль гомогенности. Гомогенность выделенных препаратов проверяли диск-электрофорезом в среднепористом полиакриламидном геле (7,5%) при pH 8,6 по методу Раймонда и Дэвиса, пользуясь рекомендациями Маурера [20]. Для исследования применяли только гомогенные в полиакриламидном геле препараты (γ -глобулины, IgG).

Дифференциальные температурно-пертурбационные спектры записывали на двухлучевом спектрофотометре «Specord UV VIS» (фирма «Carl Zeiss», ГДР) в одноосантиметровых термостатируемых кюветках при концентрации белка 0,106% в 0,01 М фосфатном буфере pH 7,35 в интервале температур 10—27 и 38—50°C. Известно, что модельный спектр тирозина [15, 16] имеет максимум при 287 нм. Длинноволновое смещение максимума поглощения IgG по сравнению с модельной смесью может быть связано с определенным вкладом хромофоров, находящихся в среде с низкой полярностью. Поэтому в качестве модели мы использовали раствор тирозина в 40% этиленгликоле с максимумом поглощения спектра при 280 нм и раствор триптофана в 60% этиленгликоле с максимумом при 295 нм. Исследуемые спектры имели два абсорбционных максимума при 294 и 287 нм. Для количественной оценки доступности хромофоров использовали предложенный Демченко и Зима инкремент экстинкции [15, 16]:

$$\chi_{\lambda} = \frac{1}{E_{280}} \cdot \frac{\Delta E_{\lambda}}{\Delta t^{\circ}},$$

где $\lambda = 285—288$ или $293—295$ нм.

Инкремент экстинкции не зависит от температурного интервала и абсолютной абсорбции для $E_{280}^{1\%} \leq 3$. Инкремент экстинкции зависит от полярности окружения хромофора [16]. Расчет числа остатков тирозина и триптофана, доступных раствори-

телю, производили по следующим формулам: % доступных тирозинов = $\frac{\chi_{288}^{IgG}}{\chi_{288}^{Tyr}}$;

$$\% \text{ доступных триптофанов} = \frac{\chi_{295}^{IgG}}{\chi_{295}^{Trp}}.$$

Характеристика обследуемых групп. Обследовано 118 больных с нарушением функции щитовидной железы, находившихся на лечении в эндокринологическом отделении Областной больницы им. Семашко. У 60 больных была среднетяжелая форма диффузного токсического зоба, у 33 больных — тяжелая форма, 25 больных страдали гипотиреозом. Больные были преимущественно в возрасте 30—50 лет. Продолжительность заболевания составляла от 1 года до 5 лет. Диагноз токсического зоба и гипотиреоза подтверждался, помимо клинических данных, исследованием функции щитовидной железы по поглощению радиоактивного йода (^{131}I), основного обмена (методом спирографии), холестерина крови, электрокардиографией. При среднетяжелой форме тиреотоксического зоба поглощение ^{131}I через 24 ч в среднем по группе составило —51,2% при основном обмене —36%. Тяжелая форма заболевания характеризовалась 58% поглощения ^{131}I через 24 ч и основным обменом —45%. У больных гипотиреозом содержание ^{131}I в щитовидной железе через 24 ч составило 5%. Из 28 больных хронической пневмонией у 18 регистрировался бронхоспастический синдром, у 8 — бронхоэктазы, у 2 — врожденная гипоплазия легких. Больные были в возрасте от 22 до 67 лет. Активность воспалительного процесса подтверждалась общеклиническими данными и инструментально-лабораторными исследованиями. Рентгенологически выявлялись интерстициальные и инфильтративно-деструктивные изменения в легких. При бронхологическом обследовании обычно наблюдалась картина деформирующего бронхита, эндобронхита различной степени интенсивности воспаления, бронхоэктазы. Наиболее часто встречающейся патогенной флорой были стрептококки и стафилококки. Дыхательная недостаточность развивалась преимущественно по обструктивному типу.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования γ -глобулиновой фракции и субфракций IgG здоровых доноров методом ДТПС представлены в табл. 1 и 2. Как видно из табл. 1, доступность хромофоров γ -глобулиновой фракции составила для тирозина 37,2%, для триптофана — 52,8%, или в расчете на число доступ-

ных хромофоров для тирозина — 20,8, для триптофана — 15,4, исходя из того, что в среднем в IgG содержится 56 остатков тирозина и 22 остатка триптофана [21]. Изучение щелочной субфракции IgG здоровых доноров методом ДТПС позволило обнаружить следующее число доступных хромофоров: тирозины 39,3%, триптофаны 61,8%. При этом число доступных остатков тирозина и триптофана соответственно было равно 22,9 и 14,1.

Т а б л и ц а 1

Сравнение доступности тирозинов и триптофанов по данным ДТПС для γ -глобулиновой фракции из сыворотки крови здоровых доноров и больных с нарушением функции щитовидной железы и хронической пневмонией

Обследуемые	Статисти- ческий по- казатель	Доступность тирозинов		Доступность триптофанов	
		%	абсолютное ко- личество остат- ков	%	абсолют- ное коли- чество ос- татков
Здоровые	<i>M</i>	37,2	20,8	52,8	15,4
	$\pm m$	2,03	1,15	3,73	1,47
Больные диффузным токсическим зобом	<i>M</i>	27,4	15,4	45,3	10,0
	$\pm m$	2,8	1,6	6,8	0,9
	<i>P</i>	$<0,05 > 0,02$	$<0,05 > 0,02$	$>0,1$	$>0,1$
Больные гипотиреозом	<i>M</i>	35,6	20,0	54,8	12,0
	$\pm m$	2,3	1,3	3,6	0,8
	<i>P</i>	$>0,1$	$>0,1$	$>0,1$	$>0,1$
Больные хронической пневмонией	<i>M</i>	29,3	16,44	39,7	8,96
	$\pm m$	3,3	1,8	9,0	1,8
	<i>P</i>	$<0,01$	$<0,01$	$<0,05$	$<0,05$

Результаты исследования IgG и субфракций методом ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе представлены в табл. 3. Как видно из табл. 3, содержание IgG в сыворотке крови составило $11,8 \pm 0,7$ мг/мл, что соответствует данным литературы [22]. Соотношение субфракций было следующим: щелочная $56,4 \pm 1,2\%$, кислая $43,6 \pm 1,2\%$.

Т а б л и ц а 2

Сравнение доступности тирозинов и триптофанов по данным ДТПС для щелочной субфракции IgG из сыворотки крови здоровых доноров и больных диффузным токсическим зобом и хронической пневмонией

Обследуемые	Число обследо- ванных	Доступность тирозинов		Доступность триптофанов	
		%	абсолютное количество остатков	%	абсолютное количество остатков
Здоровые	50	39,3	22,0	61,8	13,6
Больные диффузным то- ксическим зобом	10	$28,4 \pm 2,9$	$15,9 \pm 1,9$	$47,9 \pm 4,0$	$10,4 \pm 0,9$
Больные хронической пневмонией	9	$35,1 \pm 5,1$	$19,7 \pm 2,8$	$44,2 \pm 5,9$	$9,7 \pm 1,3$

П р и м е ч а н и е. Цифры для здоровых доноров относятся к объединенным фракциям всех обследованных, так как содержание щелочной субфракции у отдельных лиц невелико. При статистической обработке видна существенная разница между токсическим зобом и хронической пневмонией по доступности тирозина.

При исследовании ДТПС γ -глобулиновой фракции больных диффузным токсическим зобом (см. табл. 1) оказалось, что доступность хромофоров уменьшается для тирозина до 27,4%, для триптофана до 45,3%, что соответствует числу доступных остатков 15,4 и 10,0. У больных гипотиреозом процент доступных остатков составлял 35,6 для тирозина и 54,8 для триптофана, а число доступных остатков было равно 20 и 12 соответственно.

Анализ результатов исследований доступности хромофоров щелочной субфракции IgG у больных диффузным токсическим зобом практически совпадает с данными, полученными для γ -глобулиновой фракции: процент доступных тирозинов равен 28,4, триптофанов — 47,9, что соответствует следующему числу аминокислотных остатков: тирозина 15,9, триптофана 10,4.

Таблица 3

Соотношение кислой и щелочной субфракций IgG у здоровых доноров и больных с нарушением функции щитовидной железы и хронической пневмонией

Обследуемые	Статистический показатель	Ig G			
		абсолютное количество, мг/мл	содержание, %		
			щелочной фракции	кислой фракции	
Здоровые	<i>M</i>	11,8	56,4	43,6	
	$\pm m$	0,7	1,2	1,2	
Больные диффузным токсическим зобом:	тяжелой формы	<i>M</i>	10,6	82,7	17,3
		$\pm m$	0,6	0,8	0,8
		<i>P</i>	>0,1	<0,01	<0,01
	среднетяжелой формы	<i>M</i>	9,8	72,7	23,7
		$\pm m$	0,44	0,65	0,65
		<i>P</i>	>0,1	<0,01	<0,01
Больные гипотиреозом	<i>M</i>	11,5	71,2	28,8	
	$\pm m$	0,9	1,65	1,65	
	<i>P</i>	<0,3>0,2	<0,01	<0,01	
Больные хронической пневмонией	<i>M</i>	10,56	71,0	29,0	
	$\pm m$	1,0	1,7	1,7	
	<i>P</i>	<0,4	<0,01	<0,01	

Примечание. Количество белка определяли по поглощению при 280 нм, принимая $A_{280}^{1\%}$, равной 14,0.

Изучение IgG и субфракций методом ионообменной хроматографии у больных диффузным токсическим зобом обнаружило изменение соотношений субфракционного состава, находящееся в зависимости от степени тяжести заболевания (см. табл. 3). Закономерно наблюдающееся увеличение щелочной субфракции IgG (достоверное по сравнению с нормой) было наиболее выражено у больных с тяжелой формой заболевания ($82,7 \pm 0,8\%$). Соответственно содержание кислой субфракции было уменьшенным. Что касается общего количества IgG, то уровень его в крови больных диффузным токсическим зобом был в пределах нормальных величин. Понижение функции щитовидной железы характеризовалось нормальным содержанием в крови IgG ($11,8 \pm 0,9$ мг/мл) при увеличенном количестве щелочной субфракции — $71,2 \pm 1,65\%$.

Исследование ДТПС γ -глобулиновой фракции больных хронической пневмонией (см. табл. 1) также позволяет выявить достоверное уменьшение доступности хромофоров: для тирозина до 29,3%, для триптофана до 39,7%, что соответствует числу доступных остатков соответственно 16,4 и 8,9. При изучении доступности хромофоров щелочной субфракции IgG у этой группы больных обнаружено, что в среднем процент доступных тирозинов составил 35,1, триптофанов — 44,2 при числе доступных остатков соответственно 19,7 и 9,7.

Результаты исследования иммуноглобулинов G и субфракций методом ионообменной хроматографии представлены в табл. 3. Как видно из табл. 3, общее содержание IgG равнялось 11,8 мг/мл, соотношение субфракций было следующим: щелочная 71%, кислая 29% (по сравнению со здоровыми различия статистически достоверны; $P < 0,01$). Таким образом, для хрониче-

ской пневмонии также характерно увеличение щелочной субфракции IgG, находящееся в определенной зависимости от длительности заболевания.

Как было отмечено выше, многочисленные исследования показали, что при ряде заболеваний наблюдается изменение спектрополяриметрических характеристик γ -глобулиновой фракции сыворотки крови по сравнению с нормой [1—5]. Одним из объяснений этого наблюдения может быть изменение сложного фракционного состава γ -глобулина. С этой целью были предприняты исследования изоэлектрических фракций IgG человека и некоторых животных (быка и лошади) [7—10]. Действительно, IgG из сыворотки крови здорового донора оказались чрезвычайно гетерогенными по изоэлектрическим свойствам. Исследование дисперсии оптического вращения позволило установить значительные отличия между отдельными изоэлектрическими фракциями по качественному характеру кривой ее, а также по величине оптического вращения в области максимумов. Более щелочные фракции с изоэлектрическими точками 8,6, 8,23, 7,97, 7,88, 7,74, 7,27 имели значительно меньшую величину оптического вращения в области 225—227 нм по сравнению с изоэлектрическими фракциями с pI 7,07 и 6,85 (1550—1850 и 2300° соответственно). Исследование изоэлектрических фракций IgG, выделенных из сыворотки крови быка методом электродекантации [8, 10], также показало, что изоэлектрические фракции значительно отличаются по амплитуде максимума в области 227—228 нм. Как и в случае изоэлектрических фракций IgG человека, фракция с изоэлектрической точкой 6,88 имела значительно большую амплитуду максимума оптического вращения в области 227—228 нм по сравнению с более щелочными фракциями — pI 7,37 и 7,79 [8, 10]. Кроме того, было отмечено, что щелочные фракции IgG из сыворотки крови быка имеют меньшую чувствительность к изменению температуры вблизи физиологических пределов — от 20 до 37°C. Значительно отличаются щелочные фракции (pI 7,9, 7,4, 7,35, 7,3) от более кислых (pI 6,75) и по величине параметра уравнения Моффита [8] b_0 . Если для щелочных фракций характерны положительные или близкие к нулю значения b_0 , то для кислых фракций эта величина колеблется от —40 до —60 [8, 10]. Эти данные показывают, что величина b_0 отдельных IgG может изменяться в пределах от —60 до +60. Накопление какой-либо фракции при патологическом процессе в принципе могло бы объяснить те изменения, которые наблюдались ранее [1—5] по данным спектрополяриметрии.

Как показывают результаты настоящих исследований (см. табл. 2), субфракции IgG отличаются и по данным ДТПС. Необходимо сказать несколько слов об интерпретации результатов этого метода. Дифференциальный температурно-пертурбационный спектр IgG имеет максимум в области 288 и 295 нм. В то же время известно [15, 16], что модельные смеси тирозина в водном растворе имеют максимум в области 287 нм, а триптофана — в области 292—293 нм. Расположение этих максимумов для IgG в области более длинных волн может быть связано с тем, что данные хромофоры, пертурбируемые температурой в белке, не являются полностью доступными растворителю, а расположены в среде с более низкой полярностью (в частично гидрофобных щелях молекулы или даже в ее гидрофобном ядре). Наблюдаемый для IgG спектр хорошо описывается модельным раствором тирозина в 40% этиленгликоле и раствором триптофана в 60% этиленгликоле. Таким образом, этот факт является свидетельством того, что тирозины, вносящие вклад в дифференциальный температурно-пертурбационный спектр IgG, расположены в частично гидрофобном окружении, например в частично гидрофобных щелях молекулы. Пертурбируемые температурой триптофаны находятся в среде с более низкой полярностью, чем тирозины. Действительно, данные рентгеноструктурного анализа показывают, что большинство тирозинов в иммуноглобулинах расположено в области контактов между доменами. Особенно много тирозинов сосредоточено в частично гидрофобной полости между переменными доменами, участвующими в

образовании антигенсвязывающего центра [23, 24]. Наши собственные исследования [18] изолированных протеолитических фрагментов IgG показывают, что из 31 тирозина, пертурбируемого в целой молекуле иммуноглобулина, около 28 расположены в Fab-фрагментах и только 2 — в Fc'-фрагментах. В белке Бенс-Джонса, являющемся по данным рентгеноструктурного анализа [23, 25] хорошей моделью Fab-фрагментов, из 8 пертурбируемых тирозинов только 1 расположен в константной части. Следовательно, в случае IgG тирозины являются хорошей естественной меткой на доступность полости между вариабельными доменами (область антигенсвязывающего центра) для молекул растворителя и на жесткость структуры этой части молекулы.

Проведенные исследования обнаружили, что суммарный IgG из сыворотки крови доноров имеет в $1\frac{1}{2}$ раза больше пертурбируемых температурой тирозинов по сравнению со щелочной фракцией. Кроме того, у суммарного IgG наблюдается конформационный переход в области от 25 до 35°C, сопровождаемый экранированием значительной части хромофоров. В то же время для щелочной фракции подобного перехода не наблюдается.

С целью проверки обнаруженного ранее эффекта изменения физико-химических свойств γ -глобулиновой фракции при патологии [1—5] мы исследовали γ -глобулиновые фракции доноров и больных методом ДТПС. Полученные результаты (см. табл. 1) свидетельствуют о том, что как при тиреотоксикозе, так и при хронической пневмонии наблюдается статистически достоверное уменьшение числа пертурбируемых температурой тирозинов, в то время как изменения для пертурбации триптофанов статистически не достоверны. Таким образом, данные дифференциальной спектрофотометрии подтверждают обнаруженный ранее факт изменения физико-химических свойств γ -глобулиновой фракции при некоторых видах патологии.

Следующим этапом работы было изучение возможности изменения фракционного состава IgG при ряде патологических состояний по сравнению с нормой. Полученные результаты (см. табл. 3) свидетельствуют, что как при хронических воспалительных заболеваниях легких, так и при нарушении функции щитовидной железы наблюдается статистически достоверное увеличение доли щелочных субфракций без изменения суммарного количества IgG. Особенно большие изменения наблюдаются при токсическом зобе, причем прослеживается статистически достоверная корреляция изменений с тяжестью заболевания. Вместе с тем результаты определения IgG методом ионообменной хроматографии и электрофореза, по-видимому, не всегда совпадают. Так, при работе этим методом мы не наблюдали увеличения γ -глобулиновой фракции при нарушении функции щитовидной железы [5].

Возникло предположение, что наблюдающиеся качественные изменения могут быть результатом изменения количественных соотношений кислой и щелочной субфракций IgG. У больных хронической пневмонией наблюдаются аналогичные закономерности, что позволяет предположить неспецифичность наблюдаемых изменений во фракционном составе IgG при токсическом зобе и воспалительном процессе. Для выяснения вопроса специфичности наблюдаемых изменений мы исследовали щелочные субфракции IgG в норме и при патологии. Оказалось, что по данным дифференциальной спектрофотометрии доступность тирозинов γ -глобулиновой фракции практически совпадает со щелочной фракцией IgG. Вместе с тем данные табл. 2 свидетельствуют, что понятие «щелочная фракция» неоднозначно при токсическом зобе и воспалительном процессе.

Таким образом, указанные выше патологические процессы характеризуются увеличением доли щелочных субфракций IgG. В связи с тем что в IgG тирозины являются хорошей естественной меткой на доступность полости между вариабельными доменами (область антигенсвязывающего центра), можно сделать вывод, что щелочная субфракция при токсическом зобе характеризуется большей жесткостью и не исключается возможность изменения структурных свойств этой субфракции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Троицкий Г. В., Селиванова К. Ф., Гордеев Ю. Н., Каминская Г. А. — *Вопр. мед. химии*, 1970, № 5, с. 463—469. — 2. Селиванова К. Ф., Гордеев Ю. Н., Троицкий Г. В. — *Укр. біохім. ж.*, 1970, № 1, с. 39—43. — 3. Косик О. Г., Сербинова Г. А., Мерзлов В. П. и др. — *Вопр. мед. химии*, 1972, № 6, с. 597—603. — 4. Селиванова К. Ф. — В кн.: Молекулярная биология (Киев), 1972, вып. 8, с. 112—115. — 5. Селиванова К. Ф. Некоторые клинико-биохимические аспекты патологии щитовидной железы. Автореф. дис. докт. Симферополь, 1973. — 6. Moffit W., Yen Tsi Jan g. — *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, 1959, v. 42, p. 596—603. — 7. Кириухин И. Ф., Троицкий Г. В., Мерзлов В. П. и др. — *Вопр. мед. химии*, 1973, № 4, с. 375—378. — 8. Troitsky G. V., Zav'yalov V. P., Kirjukhin I. F. — *Biochim. biophys. Acta*, 1973, v. 322, p. 53—61. — 9. Кириухин И. Ф., Троицкий Г. В., Ажицкий Г. Ю. — *Вопр. мед. химии*, 1969, № 6, с. 610—614. — 10. Кириухин И. Ф., Троицкий Г. В., Завьялов В. П. — *Молекулярная биол.*, 1972, № 2, с. 196. — 11. Wellby M. L. — *Advanc. clin. Chem.*, 1976, v. 18, p. 144—145. — 12. Wellby Y. — *Biochemistry (Wash.)*, 1969, v. 8, p. 4542. — 13. Wellby Y. — *Ibid.*, 1970, v. 9, p. 3562—3571. — 14. Leach S. Y., Smith Y. A. — *Int. J. Protein. Res.*, 1972, v. 4, p. 11—18. — 15. Демченко А. П., Зима В. Л. — *Укр. біохім. ж.*, 1974, т. 46, с. 345—350. — 16. Demchenko O. P., Zima V. L. — *Stud. biophys.*, 1975, v. 52, p. 209—221. — 17. Zav'yalov V. P., Troitsky G. V., Demchenko A. P. et al. — *Biochim. biophys. Acta*, 1975, v. 386, p. 155—167. — 18. Zav'yalov V. P., Demchenko A. P., Suchomudrenko A. G. et al. — *Ibid.*, 1977, v. 491, p. 7—15. — 19. Гордеев Ю. Н. — *Лабор. дело*, 1970, № 4, с. 248—252. — 20. Маурер Г. — *Диск-электрофорез*. М., 1971. — 21. Окулов В. И. — *Успехи биол. химии*, 1971, т. 12, с. 28—61. — 22. Незлин Р. С. — *Строение и биосинтез антител*. М., 1972, с. 50. — 23. Epp O., Lattman E. E., Schiffer M. et al. — *Biochemistry (Wash.)*, 1975, v. 14, p. 4943—4952. — 24. Edmudson A. B., Ely K. R., Girling R. L. et al. — *Ibid.*, 1974, v. 13, p. 3816—3827. — 25. Poljak K. J., Amzel L. M., Chen B. L. et al. — *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, 1974, v. 71, p. 3440—3444.

Поступила 8/II 1978 г.

STUDIES ON SUBFRACTIONAL COMPOSITION AND STRUCTURAL PROPERTIES OF IMMUNOGLOBULINS G IN SOME PATHOLOGICAL STATES

G. V. Troitsky, K. F. Selivanova, O. V. Glushkova, M. N. Kornienko, V. P. Zav'yalov

Chairs of Biochemistry and Therapy, Crimean Medical School, Simpheropol

Physico-chemical properties of γ -globulin fraction and immunoglobulins G (IgG) were studied, using temperature-perturbational differential spectrophotometry and ion exchange chromatography on DEAE cellulose, in blood serum of 118 patients with impairments of thyroid gland and of 28 patients with chronic pneumonia. Amount of tyrosine residues, perturbed by temperature, was decreased and an alkaline subfraction was increased in IgG of patients with toxic goiter and chronic pneumonia; the increase in the alkaline subfraction was more distinct in impairments of thyroid gland. The data obtained suggest that the alkaline subfraction is characterized by an increased rigidity and apparently by altered structural properties in toxic goiter. The tyrosine residues in IgG enable to evaluate effectively the availability of a cavity between variable domains (antigen-antibody site) of the immunoglobulin.

УДК 577.152.421.038

Б. В. Покровский

ПОЛУЧЕНИЕ КРИСТАЛЛИЧЕСКОЙ L-ТРЕОНИН(СЕРИН)-ДЕГИДРАТАЗЫ ИЗ ПЕЧЕНИ КРЫС

Институт экспериментальной эндокринологии и химии гормонов АМН СССР, Москва

Описан метод выделения в препаративном масштабе кристаллических препаратов пиридоксальфосфатзависимой треониндегидратазы (ответственной за дезаминирование треонина) из печени крыс. Основные этапы очистки включали дробное высаливание сульфатом аммония, двукратное дробное осаждение ацетоном, гель-фильтрацию, ионообменную хроматографию, повторное дробное высаливание в более узком диапазоне сульфата аммония и кристаллизацию. Соотношение активности треонин- и сериндегидратазы на этапах очистки колебалось незначительно; активность обеих дегидратаз проявлялась одинаково при сорбции и элюции с колонки анионита, что

дает возможность предполагать, что в печени крыс за дегидративное дезаминирование обеих оксиаминокислот ответствен один и тот же фермент. Выход кристаллической треонин(серин)дегидратазы составил около 3%, степень очистки порядка 1500—1800 раз.

Изучение регуляции гормонами активности ферментов [1] требует в ряде случаев получения соответствующего фермента в гомогенном состоянии. Эта проблема возникает, в частности, при исследовании гормонального влияния на биосинтез иРНК ферментов [2]. Треониндегидратаза печени крыс [L-треонин гидролизаза (дезаминирующая)] принадлежит к биодegradативному подклассу этих ферментов; конечным результатом реакции является отщепление от молекулы треонина аммиака, происходящее спонтанно после энзиматической дегидратации [3]. Фермент печени крыс является типичным пиридоксальвым ферментом в отличие от соответствующего фермента из печени овец, где в качестве кофактора недавно идентифицирована α -кетомасляная кислота [4]. Ранее были выделены частично очищенные препараты треониндегидратазы из печени крыс и изучено изменение их активности под влиянием глюкокортикоидов [5]. В настоящей работе получены (в препаративном масштабе) кристаллические препараты треониндегидратазы.

М е т о д и к а

Активность треонин- и сериндегидратаз определяли инкубацией при 37°C в течение 5 мин (после 5 мин преинкубации без субстрата) в смеси 0,1 М фосфат калия — 1 мМ ЭДТА — 0,05 мМ пиридоксаль-фосфат (ПФ) pH 8,0 с соответствующей аминокислотой (50 мкмоль/мл). После осаждения 5% ТХУ определяли количество образовавшегося α -кетобутирата или пирувата колориметрическим методом [6]. Калибровочную кривую строили с натриевой солью α -кетомасляной кислоты¹; при расчетах образования пирувата вносили соответствующую поправку на разницу в молекулярной массе. За единицу активности принимали количество фермента, которое катализировало образование 1 мкмоль соответствующей кетокислоты за 1 мин. Белок определяли по реакции с кумасси (поглощение при 595 нм) или спектрофотометрически (поглощение при 280 нм); последний метод использовали при колонном фракционировании.

Использованные методы выделения представляли собой комбинацию методов, ранее примененных в лаборатории для выделения треониндегидратазы, с методами выделения сериндегидратазы (КФ 4.2.1.13) [7].

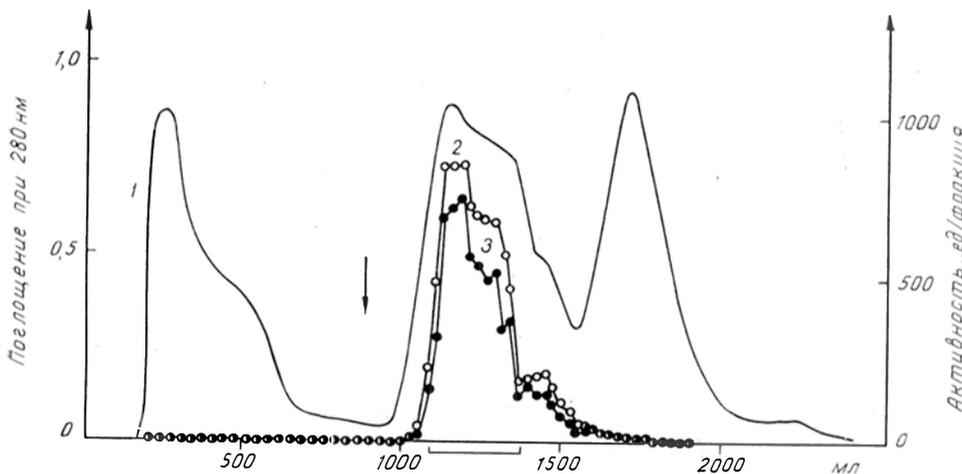
Выделение фермента проводили из печени крыс-самцов, которых после 12-часового голодания содержали в течение 6 дней на диете, 91% по казеину (при этом достигалась примерно 5-кратная индукция активности треониндегидратазы). Печень от 140 крыс гомогенизировали в блендере (порциями по 100 г) в 3 объемах смеси 0,05 М калий-фосфатный буфер — 0,14 М КСl — 1 мМ ЭДТА — 0,1 мМ ПФ — 0,5 мМ дитиотреитол. Гомогенат центрифугировали при 3000 об/мин в течение 60 мин, после чего проводили дробное высаливание надосадочной жидкости добавлением сухого $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в диапазоне 25—45% насыщения (при постоянном подщелачивании до pH 7,5). В некоторых опытах после этого (или после однократного осаждения 20% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) проводили температурное фракционирование (прогревание при 55°C в течение 1—5 мин с последующим быстрым охлаждением и удалением денатурированных белков центрифугированием [8]); треониндегидратазу затем осаждали 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Однако тепловая обработка не вела к сколько-нибудь существенному увеличению удельной активности фермента при одновременном снижении (до 40%) выхода общей активности.

Препарат диализовали в течение ночи против исходного буфера, после чего медленно добавляли при постоянном перемешивании охлажденный до —30°C ацетон (марки «Для УФ-спектроскопии») до конечной концентрации 40% (по объему). Перемешивали в течение 10 мин и после центрифугирования (при —10°C) вновь добавляли к надосадочной жидкости охлажденный до —30°C ацетон до конечной концентрации 67%. Осадок собирали центрифугированием, растворяли в исходном буфере (с увеличением концентрации ПФ до 0,5 мМ) и проводили второе дробное осаждение ацетоном в интервале 42—67% (в отдельных опытах оба фракционирования ацетоном проводили в более широком интервале — 37,5—69% [8] с практически теми же результатами). Конечный осадок растворяли в минимальном объеме смеси 0,01 М калий-фосфатный буфер — 1 мМ ЭДТА — 0,5 мМ ПФ — 1 мМ дитиотреитол pH 7,8 и после просветления центрифугированием при 10 000 г в течение 10 мин наносили на колонку с Ссфадекса G-25 (тонкий); фильтрацию вели тем же буфером без дитиотреито-

¹ Стандарт любезно предоставлен А. И. Дорожко (Всесоюзный научно-исследовательский витаминный институт).

ла. Во фракции белкового пика добавляли ПФ и дитиотреитол (до 0,5 и 1 мМ соответственно) и наносили со скоростью 20—25 мл/ч на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой (ДЕ-32; перед каждым использованием ее обрабатывали 0,25 н. HCl и 0,25 н. NaOH и уравнивали 0,01 М калий-фосфатным буфером pH 7,8 с 1 мМ ЭДТА; брали 300 см³ целлюлозы на 1,0 г белка). Колонку промывали со скоростью 30—35 мл/ч до снижения поглощения элюата при 280 нм, после чего элюировали градиентом 0,01—0,25 М калий-фосфатного буфера pH 7,8 (с 1 мМ ЭДТА).

Незадерживающиеся анионитом примеси частично очищенных препаратов треониндегидратазы выходят с колонки большим пиком с плечом в нисходящей части; фермент в примененных условиях адсорбируется ионообменником полностью (см. рисунок). Увеличение концентрации фосфата ведет к элюции фермента пиком, в котором можно отличить два больших и один малый компонент. Два первых больших компо-



Очистка треонин(серин)дегидратазы хроматографией на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой. Колонку диаметром 3,0 см уравнивали смесью 10 мМ калий-фосфатный буфер pH 7,8—1 мМ ЭДТА. Элюцию фермента осуществляли градиентом того же буфера до 250 мМ концентрации; начало градиента указано стрелкой. 1 — поглощение при 280 нм; 2 — активность сериндегидратазы; 3 — активность треониндегидратазы.

нента, по-видимому, представляют собой изоимные формы [9]. Нас особенно интересовал вопрос возможного разделения активности треонин- и сериндегидратазы при ионообменной хроматографии. Соответствующие исследования (ранее не проводимые при выделении треонин- или сериндегидратазы) позволили установить, что активность обеих дегидратаз проявлялась практически одинаково при ионообменной хроматографии. Эти данные, а также тот факт, что валовое соотношение активности треонин- и сериндегидратазы изменяется при всех этапах очистки незначительно, позволяют со значительной долей уверенности говорить о том, что за дегидративное дезаминирование обеих оксиаминокислот ответствен один и тот же фермент. По-видимому, в настоящее время целесообразнее описывать эти пиридоксальзависимые активности печени крыс одним шифром классификации ферментов.

После ионообменной хроматографии объединяли фракции с максимальной удельной активностью (добавляя в них при этом ПФ и дитиотреитол). Суммарная активность этих фракций составляла не менее 70% от количества нанесенного фермента; удельная активность препаратов увеличивалась после концентрирования с помощью ДЭАЭ-целлюлозы в 3—13 раз (см. таблицу). Характерной особенностью препаратов треониндегидратазы со стадии ДЭАЭ-целлюлозы и далее является повышение их стабильности. Так, пиковые фракции элюата с ДЭАЭ-целлюлозы сохраняют 100% активности в течение 5 дней при 4°C. Для частично очищенных, без применения ионообменной хроматографии препаратов характерно быстрое снижение их активности: на 30—40% за 1 нед хранения [5].

Концентрирование фермента после ионообменной хроматографии осуществляли лиофилизацией либо осаждением 50% (NH₄)₂SO₄ с последующим диализом в течение ночи против 200 объемов смеси 0,05 М калий-фосфатный буфер — 1 мМ ЭДТА — 0,1 мМ ПФ — 1 мМ дитиотреитол pH 7,5. Раствор фермента затем медленно доводили до 20% насыщения добавлением сухого сульфата аммония, размешивали 1 ч на магнитной мешалке и центрифугировали при 15 000 g 45 мин. В этих условиях происходит осаждение фермента с максимальной удельной активностью. В интервале 20—30% насыщения (NH₄)₂SO₄, использованном в работе [7], удельная активность высаливаемого препарата, как правило, ниже, хотя его общая активность достигает 1/4—1/3 от всей исходной активности (после осаждения 30% сульфатом аммония в исходном растворе остается не более 6—25% активности).

Полученные препараты растворяли в буфере рН 7,5 так, чтобы конечная концентрация белка была не менее 5 мг/мл. Если фермент оставляли кристаллизоваться самопроизвольно (в закрытой пробирке при 4°C), то через 2—3 нед выпадали тонкие игольчатые кристаллы длиной около 1 см. Если кристаллизацию индуцировали добавлением мелкодисперсного сульфата аммония (перекристаллизованного) до легкой турбулентности раствора, то за несколько дней образовывались мелкие крупинчатые кристаллы. Полученные кристаллические препараты имели удельную активность порядка 250—300 и 450—500 ед. на 1 мг белка по отношению к дезаминированию треонина и серина соответственно. Выход кристаллической треонин- и сериндегидратазы от 140 крыс составлял около 3 мг при кратности очистки, достигающей 2000. Ранее выделенные в аналитическом масштабе препараты треониндегидратазы печени крыс [5] имели кратность очистки порядка 200—500. Полученные препараты могут быть использованы в рамках иммунохимического исследования контроля гормонами биосинтеза треонин(серин)дегидратазы и ее иРНК.

Характеристики препаратов треонин(серин)дегидратазы печени крыс на основных этапах очистки

Стадия выделения	Опыт	Общий белок, мг	Активность		Сериндегидратаза (треониндегидратаза)	Кратность очистки	Выход, %
			общая, ед.	удельная, ед. на 1 мг белка			
Гомогенат	А	203 280	42 690	0,24	1,61	1	100
	Б	148 416	44 640	0,30	1,23		
Осаждение (NH ₄) ₂ SO ₄	А	1 148	10 960	9,55	1,41	45	26
	Б	644	6 944	10,6	1,40	35	16
ДЭАЭ-целлюлоза, концентрирование	А	153	5 027	32,9	1,58	137	12
	Б	65	9 152	142	1,50	473	20
Осаждение 0—20% (NH ₄) ₂ SO ₄	А	10,4	2 943	283	1,78	1179	6,9
	Б	7,8	3 024	388	1,68	1293	6,8
Кристаллизация	А	3,2	1 410	446	1,88	1858	3,3
	Б	1,5	746	500	1,60	1667	1,7

Примечание. Приведены результаты двух независимых опытов; опыт А — самопроизвольная, опыт Б — индуцированная (NH₄)₂SO₄. Активность приведена по пирувату.

Приносим искреннюю благодарность Т. Н. Протасовой за консультацию по тестированию и выделению треониндегидратазы и М. Б. Лебедевой за помощь в проведении ряда этапов работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Юдаев Н. А., Покровский Б. В., Протасова Т. Н. — В кн.: Биохимия гормонов и гормональной регуляции. М., 1976, с. 326—373.
2. Roewekamp W., Hofer E., Sekeris C. — *Europ. J. Biochem.*, 1976, v. 70, p. 259—268.
3. Umbarger H. — *Advanc. Enzymol.*, 1973, v. 37, p. 349.
4. Карке G., Davis L. — *Biochemistry (Wash.)*, 1976, v. 15, p. 3745—3749.
5. Протасова Т. Н., Юдаев Н. А. — *Биохимия*, 1976, т. 41, с. 124—132.
6. Протасова Т. Н. — *Пробл. эндокринолог.*, 1975, № 4, с. 91—95.
7. McLaughlin C., Pitot H. — *Biochemistry (Wash.)*, 1976, v. 15, p. 3550—3556.
8. Morris J., Peraino C. — *J. biol. Chem.*, 1976, v. 251, p. 2571—2579.
9. Ikehara Y., Pitot H. — *J. Cell. Biol.*, 1973, v. 59, p. 28—44.

Поступила 23/1 1978 г.

ISOLATION OF CRYSTALLINE L-THREONINE (SERINE) DEHYDRATASE FROM RAT LIVER

B. V. Pokrovskiy

Institute of Experimental Endocrinology and Hormone Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Isolation on a preparative scale of crystalline pyridoxal phosphate-dependent threonine dehydratase (responsible for threonine deamination) from rat liver tissue is described. The enzyme was purified by stepwise salting out with (NH₄)₂SO₄, two precipitations with acetone,

gel filtration through Sephadex G-25, chromatography on DEAE cellulose, reprecipitation with ammonium sulfate and crystallization. The ratio of threonine to serine dehydratase activities was altered only slightly through all the steps of the purification procedure. Both enzymes proved to be similar in their chromatographic properties; this suggests that a single enzyme is responsible for dehydrative deamination of both hydroxyamino acids in rat liver tissue. Stability of the enzyme preparations was distinctly increased after DEAE cellulose chromatography. The yield of crystalline threonine (serine) dehydratase was about 3%; the enzyme was purified 1500-1800-fold.

УДК 612.117.5

В. А. Шестаков, Н. О. Бойчевская, М. П. Шерстнев

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ПЛАЗМЫ КРОВИ В ПРИСУТСТВИИ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА

Клиника факультетской хирургии II Московского медицинского института им Н. И. Пирогова

При инкубации разведенной плазмы крови с перекисью водорода возникает вспышка сверхслабого свечения. Развивается характерная картина хемилюминесценции: быстрый подъем, медленный спад, переходящий в стационарное свечение. Увеличение интенсивности сверхслабого свечения связано с повышением содержания в плазме крови как инициаторов перекисного окисления, так и активаторов хемилюминесценции. Между кинетикой свечения и изменением концентрации кислорода в среде параллелизма не отмечается.

В настоящее время многими исследователями ведется интенсивная разработка различных вариантов метода хемилюминесценции биологических жидкостей и суспензий в теоретическом и научно-прикладном направлении. Измерение хемилюминесценции, которая возникает в результате протекания реакций рекомбинации свободных радикалов, является удобным методом для изучения кинетики и механизма цепного окисления в организме в норме и при патологии, а также для диагностики различных заболеваний [1]. Наряду с изучением спонтанной хемилюминесценции [2] широко изучается хемилюминесценция, инициированная двухвалентным железом [3].

С целью изучения перекисного окисления также используется хемилюминесценция, инициированная перекисью водорода [4]. Методику с перекисью водорода применили для изучения изменения свечения нормальных и измененных при лейкозе клеток тимуса мышей [5]. Однако авторы отмечают, что механизм развития хемилюминесценции при введении перекиси водорода недостаточно ясен.

Целью настоящего исследования является рассмотрение механизма возникновения и изучение природы вспышки свечения после добавления перекиси водорода к раствору плазмы крови.

М е т о д и к а

В работе изучали хемилюминесценцию плазмы крови 9 больных с различными заболеваниями. Из них 4 больных были после операции по поводу эмболии магистральных артерий конечностей в разные сроки после операции (от 1 до 37 дней). У 3 был острый венозный илиофemorальный тромбоз, у 1 — ранние артерии, у 1 — опухоль желудка; 1 был донором. Забор крови производили из локтевой вены по общепринятой методике с помощью иглы Дюфо. В качестве антикоагулянта применяли цитрат натрия в концентрации 10 мг на 1 мл крови. До проведения исследования кровь хранили в холодильнике в течение не более 48 ч при температуре 2—3°C. Плазму крови получали центрифугированием при 2,4 g в течение 10 мин. Все манипуляции с плазмой крови осуществляли при температуре 20°C. Непосредственно перед исследованием кювета с раствором плазмы помещалась на водяную баню на 5 мин при температуре 20°C.

Для регистрации хемилюминесценции использовали установку, собранную на базе счетной стойки для дифрактометра ССД-1. Установка состояла из блоков питания БП-2 и БП-3, стабилизированного выпрямителя ВСВ-2с, усилителя слабых импуль-

сов VIII-1, автоматического дифференциального дискриминатора АДД-1, пересчетного блока ПС-1, измерителя скорости счета ИСС-1, автоматического потенциометра КСП4 и фотоумножителя ФЭУ-35 с максимальной чувствительностью в области спектра 380—420 нм. Чувствительность фотокаода 52 мкА/лм. Фотоумножитель работал без охлаждения при температуре 20°C.

Измерение хемилюминесценции производили следующим образом. В кювету вводили 1 мл плазмы крови. Затем к этому количеству плазмы добавляли 3 мл 134 мМ фосфатного буфера рН 7,4. Кювету с полученным раствором плазмы помещали в темновую камеру установки над торцом фотоумножителя. Через стенку темновой камеры внутрь ее были проведены две резиновые трубки. Одна служила для введения в кювету перекиси водорода, другая — для введения раствора соли двухвалентного железа. В зависимости от условий опыта в кювету опускали или трубку для введения перекиси водорода, или трубку для введения соли двухвалентного железа. Темновую камеру закрывали и включали установку. После измерения фонового свечения раствора в кювете в нее по трубке вводили перекись водорода или раствор соли двухвалент-

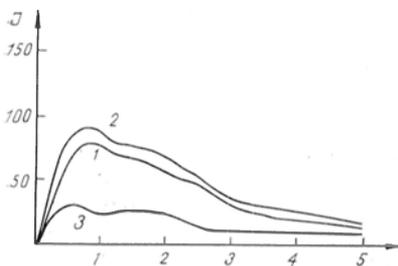


Рис. 1. Влияние плазмы крови на интенсивность свечения, инициированного перекисью водорода.

Здесь и на рис. 1—4: по оси абсцисс — время от момента введения перекиси водорода (в мин); по оси ординат — интенсивность хемилюминесценции (в имп/с). 1 — усредненная кривая хемилюминесценции; 2 — высокая интенсивность хемилюминесценции; 3 — низкая интенсивность хемилюминесценции. Начало координат совпадает с моментом введения перекиси водорода.

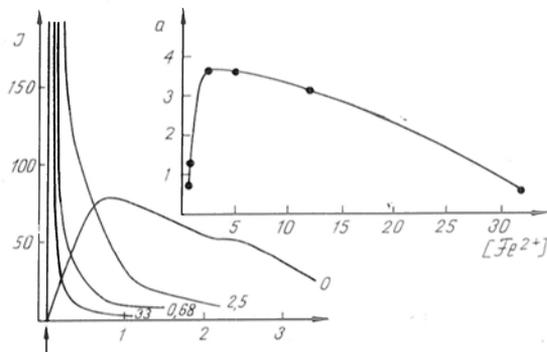


Рис. 2. Влияние различных концентраций соли двухвалентного железа на интенсивность свечения при добавлении перекиси водорода.

Здесь и на рис. 3: 0 — усредненная кривая хемилюминесценции плазмы крови без добавления железа. Момент введения перекиси водорода обозначен стрелкой. *a* — светосумма вспышки свечения (в усл. ед.); Fe^{2+} — концентрация добавленного железа (в мМ).

ного железа. Возникала вспышка хемилюминесценции, которая регистрировалась на диаграммной ленте автоматического потенциометра. Конечная концентрация в кювете как перекиси водорода, так и соли двухвалентного железа была одинаковой и составляла 5 мМ.

Параллельно для изучения газового состава и рН среды в две другие пробы одной и той же плазмы в тех же соотношениях вводили или перекись водорода, или соль двухвалентного железа. Исследование проводили на аппарате фирмы «Radiometer», тип ВМ3 тремя электродами: стеклянными рН- и pCO_2 -электродами и полярографическим pO_2 -электродом. Напряжение газов в растворе регистрировалось в миллиметрах ртутного столба.

Результаты и обсуждение

При добавлении к раствору плазмы крови перекиси водорода развивалась вспышка хемилюминесценции (рис. 1), форма которой напоминает форму кривой вспышки свечения при добавлении перекиси водорода к суспензии нормальных и раковых клеток [5]. Во всех случаях можно выделить быстрый подъем хемилюминесценции, медленный спад и стационарный уровень свечения. Следует заметить, что при введении перекиси водорода в одних случаях наблюдалась весьма низкая интенсивность хемилюминесценции, в других — более высокая.

Увеличение или уменьшение хемилюминесценции плазмы крови при добавлении перекиси водорода свидетельствует о зависимости этого процесса от наличия или отсутствия ингибиторов [1] и инициаторов перекисного окисления, или активаторов хемилюминесценции.

Для изучения влияния инициаторов перекисного окисления в кювету до введения перекиси водорода к фосфатному буферу без плазмы крови добавляли раствор соли двухвалентного железа в различных концентрациях. Наиболее интенсивное свечение наблюдалось при концентрации Fe^{2+} в кювете, равной 2,5 мМ (рис. 2). При нахождении в кювете двухвалентного железа форма кривых изменялась следующим образом: резко увеличивался угол наклона начальной части кривой, увеличивалась высота максимального значения интенсивности хемилюминесценции, отмечался более быстрый спад свечения, уровень стационарного свечения снижался.

Возрастание светосуммы хемилюминесценции при добавлении железа в концентрациях до 2,5 мМ и затем уменьшение ее при увеличении концентрации двухвалентного железа были объяснены его триггерными свойствами [6].

В настоящей работе лабораторный контроль за гемолизом не производился. Учитывая то, что для иницирования хемилюминесценции двухвалентным железом его концентрация составляла 5 мМ, а концентрация железа в сыворотке крови человека колеблется от 0,13 до 0,22 мМ [7], следует ожидать, что с увеличением содержания железа в плазме крови светосумма хемилюминесценции, инициированной железом, будет уменьшаться. В противоположность этому светосумма хемилюминесценции, инициированной перекисью

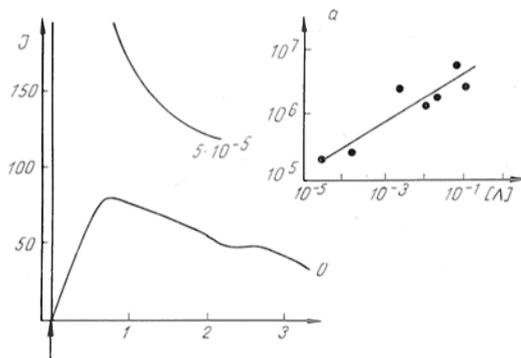


Рис. 3. Влияние различных концентраций люминола на интенсивность свечения при добавлении перекиси водорода.

Цифра у кривой — концентрация добавленного люминола (в мМ); 0 — усредненная кривая хемилюминесценции плазмы крови без добавления люминола. Л — концентрация люминола (в мМ).

водорода, будет возрастать. Следовательно, если содержание железа в плазме крови существенно влияет на хемилюминесценцию, то нужно ожидать между хемилюминесценцией, инициированной двухвалентным железом, и хемилюминесценцией, инициированной перекисью водорода, сильную обратную коррелятивную связь. При n , равном 18, коэффициент корреляции между светосуммами равен $-0,10$ ($P > 0,05$). Между начальной скоростью нарастания вспышки хемилюминесценции, инициированной перекисью водорода, и светосуммой хемилюминесценции, инициированной железом, коэффициент корреляции равен $-0,29$ ($P < 0,05$). Начальная скорость нарастания вычислялась как отношение половины максимальной высоты вспышки к времени, за которое произойдет нарастание интенсивности хемилюминесценции до половины максимального значения. Таким образом, видно, что, конечно, повышение концентрации железа в плазме приводит к увеличению интенсивности свечения, но это влияние в большей степени сказывается на скорости нарастания вспышки и в меньшей (статистически недостоверно) — на светосумме хемилюминесценции, инициированной перекисью водорода.

Для изучения действия активаторов на хемилюминесценцию, инициированную перекисью водорода, использовали люминол, который, как и в большинстве гидразидов флюоресцирующих карбоксильных кислот, эффективно излучает в основных средах [8, 9].

При добавлении люминола в кювету, содержащую раствор буфера без плазмы крови, уже при незначительной концентрации ($5 \cdot 10^{-5}$ мМ) интенсивность хемилюминесценции резко возрастает (рис. 3). Форма кривой похожа на кривую при добавлении двухвалентного железа — так же увеличен угол наклона начальной части вспышки. Свечение мгновенно возрастает до максимального уровня.

Повышение содержания в плазме крови активаторов хемилюминесценции будет приводить к повышению светопродукции вспышки, инициированной перекисью водорода. Однако, что в основном превалирует в образовании более крутой вспышки — инициаторы или активаторы, пока не совсем ясно.

После достижения максимального значения интенсивность хемилюминесценции снижается, что также может быть связано с несколькими причинами: со снижением концентрации кислорода, который участвует в образовании пероксирадикалов RO_2 , или со снижением концентрации свободных радикалов биологических молекул $R\cdot$.

Для выяснения этого вопроса изучался газовый состав плазмы после введения перекиси водорода. Оказалось, что после введения перекиси во-

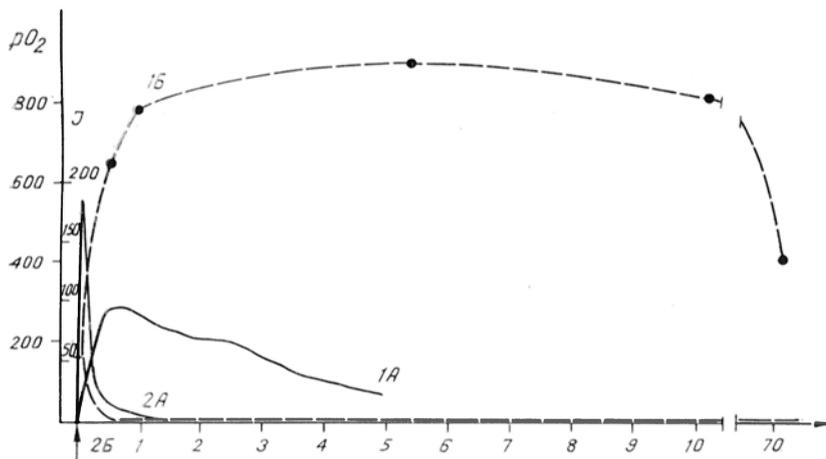


Рис. 4. Изменение хемилюминесценции и напряжения кислорода после добавления перекиси водорода или соли двухвалентного железа к раствору плазмы крови. По оси ординат — pO_2 — напряжение кислорода в растворе плазмы крови (в мм рт. ст.); I — интенсивность хемилюминесценции (в имп/с). $1A$ — хемилюминесценция, инициированная перекисью водорода; $2A$ — хемилюминесценция, инициированная ионами Fe^{2+} ; $1B$ — напряжение кислорода после введения перекиси водорода; $2B$ — напряжение кислорода после введения ионов Fe^{2+} . Момент введения иницирующих веществ обозначен стрелкой.

дорода в кювету с раствором плазмы крови напряжение кислорода повышалось и оставалось на высоком уровне в течение длительного времени (рис. 4). Значение рН раствора немного увеличивалось (до 7,5—7,6) и оставалось примерно на том же уровне. Напряжение углекислого газа соответствовало изменению рН, как это предсказывает уравнение Хендерсон — Хассельбальха [10].

Отсюда можно заключить, что снижение хемилюминесценции, инициированной перекисью водорода, не связано с недостаточным содержанием кислорода в системе. Важно подчеркнуть, что хемилюминесценция в данном случае не зависит от образующегося из перекиси водорода кислорода, который является лишь пусковым фактором, а определяется внутренними механизмами перекисного свободнорадикального окисления биологического субстрата. Уровень перекисного окисления и определяет кинетику и интенсивность хемилюминесценции, инициированной перекисью водорода. Причиной спада хемилюминесценции является, по-видимому, недостаточное поступление в систему окисления свободных радикалов биологических молекул $R\cdot$. Последние образуются в реакции взаимодействия с радикалами HO_2 и $HO\cdot$, снижение концентрации которых, очевидно, и является фактором, определяющим кинетику хемилюминесценции на данном этапе.

При сравнении напряжения кислорода в растворе плазмы крови после добавления перекиси водорода в образцах с высоким уровнем свечения и

в образцах с низким уровнем свечения было обнаружено, что при высоких значениях светосуммы напряжение кислорода меньше, чем в другой группе (табл. 1).

Это было объяснено следующим образом. Образующийся при разложении перекиси водорода кислород вступает в реакцию со свободными радикалами биологических молекул R^{\cdot} с выходом пероксирадикалов RO_2^{\cdot} , в результате рекомбинации которых высвечиваются кванты хемиллюминесценции. Таким образом, чем больше потребляется кислорода для образования пероксирадикалов, тем, естественно, ниже содержание кислорода в системе и тем выше интенсивность хемиллюминесценции.

Т а б л и ц а 1

Напряжение кислорода в образцах плазмы крови при повышенном и при пониженном уровне хемиллюминесценции относительно средней светосуммы

Время исследования, с	Светосумма свечения ниже средней		Светосумма свечения выше средней		P
	число проб	pO ₂ , мм рт. ст	число проб	pO ₂ , мм рт. ст	
До иницирования	4	165±4,42	6	172±2,21	>0,05
25	4	727±71,0	1	535	
75	2	993±52,0	4	637±48,8	<0,05
330	1	1352	1	671	
660	4	918±58,1	4	668±35,6	<0,05
1140	2	1018±238	3	664±73,7	>0,05
1755	3	727±75,3	2	624±59,0	>0,05
2725	2	653±103	1	649	
4155	2	570±17,0	2	257±100	<0,05

Если при иницировании хемиллюминесценции перекисью водорода кислород в растворе плазмы находится в достаточном количестве, то при добавлении двухвалентного железа к раствору плазмы крови и появлении

Т а б л и ц а 2

Изменение светосуммы хемиллюминесценции, иницированной перекисью водорода, в зависимости от характера заболевания и у донора

Обследованные	Число обследований	Светосумма, имп
Больные:		
после операции по поводу эмболии магистральных артерий конечности	4	8540±2230
с опухолью желудка	1	6705
с венозным тромбозом	3	5030±1340
с ранением артерий	1	3210
Донор	1	2870

вспышки хемиллюминесценции напряжения кислорода резко снижается, соответствуя форме кривой свечения (см. рис. 4). Это согласуется с данными других авторов [11, 12]. При добавлении железа почти вся вспышка сверхслабого свечения приходится в первые 30 с после его введения, в то время как при добавлении перекиси водорода за этот промежуток происходит только нарастание вспышки хемиллюминесценции.

Таким образом, в основе быстрой вспышки хемиллюминесценции, иницированной двухвалентным железом, и вспышки, иницированной перекисью водорода, лежат, очевидно, механизмы перекисного окисления, несколько отличающиеся друг от друга.

Результаты определения интенсивности хемиллюминесценции, иницированной перекисью водорода у больных и донора, представлены в табл. 2. Как видно из табл. 2, наибольшая интенсивность хемиллюминесценции наблюдается у оперированных больных, у которых до операции была ишемия конечности, причем 3 из них обследованы через 1—9 сут после опера-

ции. Светосумма хемилюминесценции у них в среднем составляет $10050 \pm \pm 1940$ имп, а у 1 больного, который был обследован через 37 сут после операции, — 4035 имп, т. е. уровень ее был ближе к таковому у донора (2870 имп).

У 3 больных илиофemorальным венозным тромбозом уровень хемилюминесценции снизился с увеличением срока заболевания и нормализацией клинической картины под действием консервативной терапии. Так, например, у больного, который был обследован при поступлении, светосумма составила 6825 имп, у другого больного, которого лечили консервативно в течение 5 сут, — 5400 имп, у третьего больного, которого лечили в течение 8 сут, — 2905 имп.

Уровень хемилюминесценции у практически здорового человека, который случайно получил ранение артерии, незначительно превышал таковой у донора и в 2—3 раза был ниже, чем у больных, заболевание которых было связано с теми или иными нарушениями в системе гомеостаза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю. А., Арчаков Л. И. — Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972.
2. Журавлев А. И., Журавлева Л. И. Сверхслабое свечение сыворотки крови и его значение в комплексной диагностике. М., 1975.
3. Владимиров Ю. А. и др. — Вопр. мед. химии, 1976, № 2, с. 216—223.
4. Закарян А. К., Бабок Ю. В. — В кн.: Сверхслабые свечения в медицине и сельском хозяйстве. М., 1974, с. 83—88.
5. Говорун А. К. и др. — Биофизика, 1974, т. 19, с. 100—102.
6. Суслова Т. Б. и др. — Там же, 1970, т. 15, с. 622.
7. Миралиев Л. М. — К обмену железа у больных вирусным гепатитом. Ташкент, 1976.
8. White E. H., Roswell D. F. — Accounts chem. Res., 1970, v. 3, p. 54.
9. White E. H., Gindrett R. B. — Chemiluminescence and Bioluminescence. New York, 1973, p. 231—244.
10. Робинсон Дж. Р. Основы регуляции кислотно-щелочного равновесия. М., 1969.
11. Владимиров Ю. А. и др. — Биофизика, 1969, т. 14, с. 836.
12. Суслова Т. Б. и др. — Там же, с. 510.

Поступила 23/1 1978 г.

CHEMOLUMINESCENCE OF BLOOD PLASMA IN PRESENCE OF HYDROGEN PEROXIDE

V. A. Shestakov, N. O. Boytchevskaya, M. P. Sherstniev

Clinic of Surgery, N. I. Pirogov II Medical School, Moscow

Chemoluminescence arised after incubation of diluted blood plasma with hydrogen peroxide. A typical pattern of the luminescence development, similar to that obtained on addition of H_2O_2 to other biological objects, was observed: quick increase and gradual decrease to a steady-state chemoluminescence level. The increase in chemoluminescence, which was noted in some experiments, might be due to elevation in content of both initiators of peroxidation and activators of the chemoluminescence in blood plasma. Kinetics of the chemoluminescence did not correlate with concentration of oxygen in media.

УДК 577.164.11.044:577.152.359

С. С. Пузач, Ю. М. Островский

АНТИВИТАМИННАЯ АКТИВНОСТЬ ТИАМИНАЗЫ ИЗ *V. thiaminolyticus* ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБАХ ВВЕДЕНИЯ ФЕРМЕНТА В ОРГАНИЗМ ЖИВОТНОГО

Отдел регуляции обмена веществ Академии наук Белорусской ССР, Гродно

Изучено действие бактериальной тиаминазы в опытах *in vivo* после подкожного и внутрижелудочного введения фермента или суспензии интактных и убитых антибиотиком бактериальных клеток — продуцентов тиаминазы. На 2-е и 7-е сутки после однократной подкожной инъекции 0,015 МЕ фермента активность тиаминзависимых ферментов (транскетолазы и α -кетоглютаратдегидрогеназы) достоверно снижалась в печени и почке. Введение фермента ежедневно в течение 4 сут в желудок подав-

ляет активность тиаминзависимых ферментов и в других органах и тканях (сердце, селезенка, мышца и кровь). Интактные бактериальные клетки, введенные в желудок мышей, снижают активность тиаминзависимых ферментов в органах и тканях (печень, почка, сердце, селезенка, мозг, мышца и кровь) в большей степени, чем убитые. Старые животные к введению суспензии живых бактерий чувствительнее молодых. Полученные данные показывают, что, помимо известного разрушающего действия бактериальной тиаминазы в просвете кишечника на тиамин пищи, парентерально введенный фермент активно функционирует в тканях животного.

Недостаточность витамина В₁ может развиваться вследствие самых различных причин [1—6], в том числе и в связи с появлением в желудочно-кишечном тракте бактерий, продуцирующих тиаминазу — фермент, специфическим образом разрушающий витамин путем замещения в его молекуле тиазолового компонента любым азотистым основанием [7, 8]. Описана особая тиаминазная болезнь, протекающая как проявление хронического гиповитаминоза В₁ [9]. В некоторых областях Японии частота тиаминазной болезни составляет около 7% [10].

Сходное заболевание у овец и крупного рогатого скота, эффективно поддающееся лечению инъекциями тиамина, описано в Англии [11, 12]. В связи с тем что тиаминазы повсеместно распространены в природе, особенно среди бактерий, нередко живущих в просвете кишечника человека и животных [13], а также в некоторых [14—19] продуктах питания (рыбы, моллюски, растения), изучение действия фермента на организм заслуживает серьезного внимания.

Ранее нами [20] было показано, что тиаминазы, выделенная из двусторчатых пресноводных моллюсков, введенная в организм животных парентерально, активно вмешивается в обмен витамина В₁, разрушая тиаминдифосфат в печени подопытных животных и угнетая активность тиаминзависимых ферментов. В настоящем сообщении приводятся результаты аналогичных опытов с тиаминазой 1 (КФ 2.5.1.2), интенсивно продуцируемой *B. thiaminolyticus*. Фермент проявляет максимальную активность в условиях, близких к физиологическим для животных тканей [21], и в качестве кофакторов, замещающих тиазол в молекуле витамина, легко использует такие природные соединения, как никотинат, цистенин, таурин и др. [22—24].

Большинство работ посвящено выделению и изучению физических свойств фермента [9, 12, 25, 26] или описанию последствий усиленного размножения бактерий, продуцирующих тиаминазу в кишечнике или преджелудке некоторых животных [23, 27]. Как правило, все авторы допускают, что действие бактериальной тиаминазы осуществляется только в желудочно-кишечном тракте, и не придают значения возможности проникновения фермента в кровь и ткани носителя микробов. Показанная в последние годы [28, 29] возможность всасывания из кишечника многих белков, в том числе и ферментов в неизменном активном виде, в кровь дает основание для серьезного изучения и этой второй возможности. По существу следует рассмотреть саму вероятность активного действия бактериальной тиаминазы, введенной парентерально искусственным путем или посредством всасывания в кровь из кишечника. В связи с этим мы поставили несколько вариантов опытов: в желудок мышей вводили как источник тиаминазы живую и убитую взвесь бактерий — продуцентов фермента — или фермент в частично очищенном состоянии; выделенный фермент вводили также в отдельном опыте подкожно.

М е т о д и к а

Штамм *B. thiaminolyticus* ВКМ В-437 был получен из отдела типовых культур Института микробиологии АН СССР. Штамм выращивали в течение 5 дней при 37°C на синтетической питательной среде [30] следующего состава: 10 г глутамата натрия, 20 г глицерина, 5 г цитрата натрия, 1 г хлористого натрия, 0,7 г MgSO₄·7H₂O, 0,03 г FeSO₄·7H₂O, 100 мг тиамин-хлорида, 50 мл 1/15 М K₂HPO₄, 50 мл 1/15 М KН₂PO₄, до 1 л дистиллированной воды, рН 6,8. Ферментный препарат получали при об-

работке культуральной среды после 5-дневного роста клеток ацетоном и центрифугированием при 35 000 г в течение 10 мин на холоду [31, 32], активность тиаминазы определяли тioxромным методом (фосфатный буфер pH 6,8, температура 37°C, время инкубации 10 мин) [33—35] и выражали в международных единицах. Суспензия бактерий, вводимая на одну мышшь, содержала $7,5 \cdot 10^{-16}$ интактных или такое же количество убитых клеток. Эксперименты проводили на белых мышьях-самцах, которых содержали на обычном рационе вивария, обеспечивающем нормальную потребность в тиамине.

В одном из вариантов опыта животные были разделены на 4 группы: 1-я — внутрижелудочное введение интактных бактериальных клеток; 2-я — внутрижелудочное введение убитых бензилпенициллином клеток (2,5 мг на вводимую дозу); 3-я — введение только антибиотика в той же дозе; 4-я — внутрижелудочное введение физиологического раствора.

Бактериальную суспензию готовили на 0,5% растворе хлористого натрия. Клетки убивали инкубацией с антибиотиком в течение 30 мин при комнатной температуре. Контролем на стерильность являлся высев бактерий на агар после воздействия антибиотика.

В одном из опытов частично очищенный ферментный препарат вводили однократно (по 0,015 МЕ) подкожно или внутрижелудочно ежедневно в течение нескольких дней (контрольным животным делали инъекции изотонического раствора хлористого натрия).

Животных декапитировали в разные сроки после последней инъекции (от 1 до 7 сут). В крови, печени, почке, сердце, селезенке, мозге и скелетных мышьях определяли активность транскетолазы (ТК) [36], в гомогенатах мозга, печени и почек — активность α -кетоглутаратдегидрогеназы (α -КГДГ) [37].

Т а б л и ц а 1

Активность ТК (в мкмоль седогептулозо-7-фосфата на 1 г ткани за 1 ч или нмоль на 1 млн эритроцитов за 1 ч) в органах и тканях белых мышья после однократного подкожного введения им 0,015 МЕ тиаминазы из *B. thiaminolyticus*

Орган и ткань	Контроль	Активность ТК					
		в 1-е сутки	<i>P</i>	на 2-е сутки	<i>P</i>	на 7-е сутки	<i>P</i>
Печень	300±8,47	298±9,58	>0,10	242±12,80	<0,01	259±19,53	>0,10
Почка	238±8,34	250±7,18	>0,10	160±14,30	<0,01	198±9,42	<0,02
Сердце	24±1,12	28±1,07	<0,05	24±1,60	—	23±0,89	>0,10
Селезенка	313±11,15	365±11,5	<0,02	301±21,80	>0,10	364±15,40	<0,05
Мозг	66±3,09	67±4,70	>0,10	58±2,18	>0,10	60±3,51	>0,10
Мышца	30±3,00	38±2,09	>0,10	32±2,89	>0,10	59±4,39	<0,001
Кровь	2,22±0,18	2,92±0,27	>0,10	2,4±0,10	>0,10	2,7±0,36	>0,10

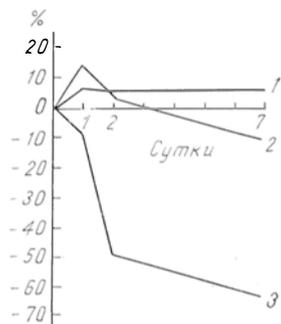
Результаты и обсуждение

После однократного подкожного введения бактериальной тиаминазы через 24 ч только в сердце и селезенке мышья было выявлено некоторое повышение активности ТК, в других органах и тканях отклонений от нормы отмечено не было. Активность α -КГДГ находилась в пределах нормы. Спустя 2 сут снижалась активность ТК в печени и почке и α -КГДГ только в почке. Сходные закономерности были отмечены нами ранее и в опытах с тиаминазой из пресноводных моллюсков [20]. На 7-е сутки только в почке снижалась активность обоих тиаминзависимых ферментов (табл. 1, см. рисунок).

Значительное и устойчивое снижение активности тиаминзависимых ферментов в почке после введения тиаминазы можно объяснить тремя механизмами: 1) тиаминаза, введенная в организм извне, активно выделяясь почками, избирательно обедняет витаминные ресурсы органа; 2) в результате тиаминазной реакции в организме накапливается фосфорилированный тиазол (тиаминаза расщепляет тиамин и тиаминдифосфат по метиленовому мостику), который, выделяясь почками, как конкурентный ингибитор [24] вытесняет тиаминдифосфат из ферментов. Константа ингибирования ТК фосфорилированным тиазолом $5,4 \cdot 10^{-6}$ М [38]; 3) в организме под действием тиаминазы могут образовываться новые соединения [22], которые, являясь метаболитами тиаминна, способны проявить собственное антимаболитное действие.

Печень, также активно участвующая в рециркуляции витамина [39] в организме, выступая в качестве выделительного органа, как и почки, подвержена действию всех перечисленных факторов.

Полученные данные хорошо согласуются с известными результатами в отношении распределения и характера действия других парегитерально вводимых ферментов [28, 29], хотя в этом случае мы не определяли активность тиаминазы в тканях животных, а лишь регистрировали последствия специфического ее действия в отношении тиаминдифосфата в составе двух других ферментов.



Изменение активности α -КГДГ (в %) в мозге (1), печени (2) и почке (3) мышей в разное время после однократного введения подкожного введения 0,015 МЕ тиаминазы из *B. thiaminolyticus*.

Действительно, в опытах с другими мечеными ферментами показано, что после введения *per os* они проходят через стенку кишечника и проявляют свои каталитические свойства в крови и тканях животных. Органами, в которых проявляется наибольшая активность принятых *per os* ферментов, являются печень и почки [40].

Бактериальная тиаминидаза, введенная внутривенно однократно (0,015 МЕ), не вызвала заметных сдвигов в активности исследуемых ферментов (табл. 2 и 3). Только после введения препарата ежедневно в течение 4 дней активность ТК была снижена во всех исследуемых органах и тканях, за исключением мозга; активность α -КГДГ была достоверно снижена во всех исследуемых органах (табл. 4 и 5).

Из полученных данных нельзя сделать вывод о проницаемости гематоэнцефалического барьера для тиаминазы, так как последствия ее действия на оба исследованных фермента могли быть опосредованы через изменение

Таблица 2

Активность ТК (в мкмоль седогептулозо-7-фосфата на 1 г ткани за 1 ч) в органах белых мышей после однократного внутривенного введения 0,015 МЕ тиаминазы из *B. thiaminolyticus*

Орган	Контроль	Активность ТК					
		в 1-е сутки	<i>P</i>	на 2-е сутки	<i>P</i>	на 7-е сутки	<i>P</i>
Печень	355±9,73	329±11,80	>0,10	324±13,65	>0,10	350±13,86	>0,10
Почка	239±6,25	266±19,10	>0,10	248±8,33	>0,10	259±13,87	>0,10
Селезенка	310±12,95	380±27,60	>0,10	313±17,10	>0,10	308±15,60	>0,10

Таблица 3

Активность α -КГДГ (в мкмоль на 1 г ткани за 15 мин) в органах белых мышей после однократного внутривенного введения 0,015 МЕ тиаминазы из *B. thiaminolyticus*

Орган	Исходная активность	Активность α -КГДГ					
		в 1-е сутки	<i>P</i>	на 2-е сутки	<i>P</i>	на 7-е сутки	<i>P</i>
Мозг	286	258	>0,10	261	>0,10	321	>0,10
Печень	294	299	>0,10	309	>0,10	288	>0,10
Почка	309	288	>0,10	438	<0,001	288	>0,10

содержания витамина в крови и могли проявиться в дальнейшем на основе различий в сродстве ферментов к тиаминдифосфату: K_m для ТК $3 \cdot 10^{-7}$, для α -КГДГ $8,21 \cdot 10^{-6}$ [38].

Мы уже отмечали, что бактерии пищеварительного тракта — продуценты тиаминазы — активно влияют на обмен витамина В₁ в организме человека и животного [11, 22, 23]. В одних из опытов в связи с этим было проведено определение активности тиаминзависимых ферментов на 4-е сутки после однократного внутрижелудочного введения суспензии ($7,5 \cdot 10^{15}$ живых или убитых антибиотиком (бензилпенициллином) клеток *B. thiaminolyticus*).

Как видно из табл. 6 и 7, живые клетки действовали более сильно, чем убитые, т. е. можно было предполагать, что они не погибли в желудке, а, проникая в кишечник и размножаясь там, становились источником (продуцентом) дополнительного количества тиаминазы. Полученные результаты можно объяснить следующим образом:

во-первых, введенные *per os* интактные бактериальные клетки могут в желудочно-кишечном тракте размножаться и продуцировать экзогенную тиаминазу [41, 42], которая способна вмешиваться в обмен тиамин в организме животных; во-вторых даже в случае гибели *B. thiaminolyticus*, видимо, может в некоторой степени, проявляться действие эндогенной тиаминазы введенных бактериальных клеток [43]. Из полученных данных также следует, что сам антибиотик заметно влияет на активность тиаминзависимых ферментов. На ингибирующую

Таблица 4

Активность ТК (в мкмоль седогентулозо-7-фосфата на 1 г ткани за 1 ч или нмоль на 1 млн. эритроцитов за 1 ч) в органах и тканях молодых мышей после ежедневного в течение 4 дней внутрижелудочного введения 0,015 МЕ тиаминазы из *B. thiaminolyticus*

Орган и ткань	Контроль	Опыт	P
Печень	403±16,33	338±10,30	<0,01
Почка	304±10,78	252±7,52	<0,01
Сердце	29±1,04	25±1,22	<0,05
Мозг	360±20,68	302±9,25	<0,05
Селезенка	74±2,44	66±3,00	>0,10
Мышца	59±3,48	42±2,10	<0,01
Кровь	3,2±0,18	2,6±0,22	<0,001

Таблица 5

Активность α-КГДГ (в мкмоль на 1 г ткани за 15 мин) в органах белых мышей после ежедневного в течение 4 дней внутрижелудочного введения 0,015 МЕ тиаминазы из *B. thiaminolyticus*

Орган	Контроль	Опыт	P
Мозг	282±16,67	237±5,61	<0,05
Печень	294±22,00	180±15,22	<0,01
Почка	309±16,11	234±12,16	<0,01

Таблица 6

Активность ТК (в мкмоль седогентулозо-7-фосфата на 1 г ткани за 1 ч или нмоль на 1 млн. эритроцитов за 1 ч) в органах и тканях белых мышей после однократного внутрижелудочного введения им суспензии бактериальных клеток *B. thiaminolyticus* ($7,5 \cdot 10^{15}$ клеток)

Орган и ткань	Исходная активность	Активность фермента после введения суспензии бактериальных клеток		Исходная активность + антибиотик	Активность фермента после введения суспензии бактериальных клеток совместно с антибиотиком (бензилпенициллином)	
		на 4-е сутки	P		на 4-е сутки	P
Печень	403±16,33	230±11,62	<0,001	343±18,78	259±26,67	<0,05
Почка	304±10,78	200±10,40	<0,001	232±6,67	187±9,16	<0,01
Сердце	29±1,04	23±1,75	<0,02	25±2,00	19±1,36	<0,05
Селезенка	360±20,68	234±14,20	<0,01	295±17,31	236±21,33	>0,10
Мозг	74±2,44	53±2,14	<0,001	53±4,48	36±1,54	<0,01
Мышца	59±3,48	39±2,04	<0,01	38±4,06	30±2,92	>0,10
Кровь	3,2±0,18	2,6±0,12	<0,05	2,8±0,35	2,6±0,22	>0,10

щее действие пенициллина уже указывали и другие авторы [44—46]. Не совсем ясно пока, почему антибиотик активизирует α -КГДГ в мозге и почке.

Косвенным подтверждением размножения в организме мыши введенных *per os* продуцентов тиаминазы можно считать и различия, выявленные нами (табл. 8 и 9) у молодых и старых животных. У последних, как известно, заторможено желчеобразование [47], а это благоприятствует росту

Таблица 7

Активность α -КГДГ (в мкмоль на 1 г ткани за 15 мин) в органах белых мышей на 4-е сутки после однократного внутрижелудочного введения суспензии живых и убитых бактериальных клеток *B. thiaminolyticus* совместно с антибиотиком (бензилпенициллином) и без него

Орган	Живые клетки			Убитые клетки		
	контроль	опыт	<i>P</i>	контроль	опыт	<i>P</i>
Мозг	282±16,67	234±9,00	<0,05	369±33,70	234±22,51	<0,02
Печень	294±22,00	228±14,96	>0,10	294±26,10	207±21,90	<0,05
Почка	309±16,11	252±11,00	<0,02	447±46,70	339±13,00	>0,10

Таблица 8

Активность ТК (в мкмоль седогентулозо-7-фосфата на 1 г ткани за 1 ч или нмоль на 1 млн эритроцитов за 1 ч) в органах и тканях молодых и старых мышей после однократного внутрижелудочного введения им суспензии убитых и интактных бактериальных клеток *B. thiaminolyticus* ($7,5 \cdot 10^{15}$ клеток)

Орган и ткань	Исходная активность	Активность фермента после введения суспензии бактериальных клеток молодым мышам		Исходная активность	Активность фермента после введения суспензии бактериальных клеток старым мышам	
		на 7-е сутки	<i>P</i>		на 7-е сутки	<i>P</i>
		Печень	403±16,33		274±8,00	<0,001
Почка	304±10,78	205±7,73	<0,001	238±8,32	158±4,60	<0,001
Сердце	29±1,04	32±0,71	<0,05	24±1,11	20±0,83	<0,05
Селезенка	360±20,68	340±13,53	>0,10	313±11,15	268±15,14	<0,05
Мозг	74±2,44	73±3,44	>0,10	66±3,10	35±2,12	<0,001
Мышца	59±3,48	49±2,04	<0,05	30±2,93	35±1,51	>0,10
Кровь	3,2±0,18	2,7±0,21	<0,001	2,2±0,17	2,5±0,22	<0,01

Таблица 9

Активность α -КГДГ (в мкмоль на 1 г ткани за 15 мин) в органах молодых и старых мышей после однократного внутрижелудочного введения суспензии живых бактериальных клеток *B. thiaminolyticus* ($7,5 \cdot 10^{15}$ клеток)

Орган	Молодые мыши			Старые мыши		
	исходная активность	на 7-е сутки	<i>P</i>	исходная активность	на 7-е сутки	<i>P</i>
Мозг	282±16,67	261±15,42	>0,10	299±11,05	246±22,51	>0,10
Печень	294±22,00	186±21,61	<0,01	240±10,59	237±21,90	>0,10
Почка	309±16,11	207±25,23	<0,001	687±31,2	312±12,88	<0,001

бактерий в кишечнике; кроме того, активность α -КГДГ в печени и почке прогрессивно снижалась (см. табл. 3, 7 и 9) в течение недели после однократного введения в желудок суспензии живых клеток. Это подтверждают экспериментальные данные других авторов [18, 41, 42].

Отмеченные изменения в активности ТК и α -КГДГ после введения тиаминазы убитых и интактных бактериальных клеток (продуцентов тиаминазы) удовлетворительно объясняются показанным нами ранее действием аналогичного фермента, выделенного из моллюсков, разрушающего витамин B_1 и снижающего таким путем уровень тиаминдифосфата в тканях

[20]. Заслуживающей внимания представляется также показанная нами возможность использования тиаминазы для «чистого» быстрого моделирования состояний, характерных для недостаточности тиамина (гиповитаминоз, авитаминоз).

Данные других авторов и наши собственные [9, 20, 22, 23] показывают также, что бактерии пищеварительного тракта, продуцирующие тиаминазу, оказывают на макроорганизм, по-видимому, двойственное действие: обедняют пищевые запасы тиамина путем расщепления его в пищеварительном тракте и разрушают тиамин и тиаминдифосфат непосредственно в тканях за счет всасывания тиаминазы в кровь.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kimura R., Hayashi R. — *Vitamins*, 1950, v. 3, p. 153. — 2. Kuno Y. — *Proc. Jap. Acad.*, 1957, v. 27, p. 362. — 3. Kimura R., Liao T. H., Hayashi R. et al. — *Vitamins*, 1952, v. 5, p. 521. — 4. Kimura R., Liao T. H. — *Proc. Jap. Acad.*, 1953, v. 29, p. 132. — 5. Ogata J. — *Vitamins*, 1958, v. 14, p. 371. — 6. Kimura R., Liao T. — *Ibid.*, 1953, v. 6, p. 721. — 7. Рысс С. М. Витамин. Л., 1963, с. 52. — 8. Крицман М. Г. — *Биохимия*, 1943, т. 8, с. 85. — 9. Pill A. H. — *J. Vet. Rec.*, 1967, v. 81, p. 178. — 10. Hayashi R. — *J. nutr. Rev.*, 1957, v. 15, p. 65. — 11. Benevenga N. J., Gronning M. — *Hilgardia*, 1965, v. 36, p. 333. — 12. Fujita A. — *J. Vitaminol.*, 1972, v. 18, p. 67. — 13. Оно Т., Нагатаки Н. — *Vitamins*, 1960, v. 19, p. 306. — 14. Deutsch E. H., Hasler A. D. — *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 1943, v. 53, p. 63. — 15. Fujita A., Kozuka J., Yamanishi K. et al. — *Seikagaku*, 1950, v. 22, p. 207. — 16. Sealock R. R., Livermore A. H., Evans C. A. — *J. Am. chem. Soc.*, 1943, v. 63, p. 935. — 17. Fujita A. — *Advanc. Enzymol.*, 1954, v. 15, p. 391. — 18. Murata K. — In: *Review of Japanese Literature on Beriberi and Thiamine*. Tokyo, 1965. — 19. Kündig H., Sotogri J. C. — *Int. Z. Vitaminforsch.*, 1964, Bd 34, S. 135. — 20. Пузач С. С., Островский Ю. М. — *Вопр. мед. химии*, 1976, т. 22, с. 769. — 21. Chang S. — *Vitamins*, 1950, v. 2, p. 174. — 22. Edwin E. E., Jackman R. — *Nature*, 1970, v. 228, p. 772. — 23. Murata K., Hase S., Ikehata H. et al. — *J. Vitaminol.*, 1961, v. 7, p. 141. — 24. Jančarič A. — *Vitam. Horm. (Lpz.)*, 1957, Bd 7, S. 430. — 25. Kimura R., Liao T. H. — *Proc. Jap. Acad.*, 1952, v. 29, p. 132. — 26. Aoki F. — *Vitamins*, 1955, v. 9, p. 53. — 27. Edwin E. E., Jackman R. — *J. Sci. Food Agric.*, 1974, v. 25, p. 357. — 28. Smyth R. D. et al. — *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 1962, v. 136, p. 230. — 29. Kobacoff B. L. et al. — *Nature*, 1963, v. 199, p. 819. — 30. Ikehata H. — *J. gen. appl. Microbiol.*, 1960, v. 6, p. 30. — 31. Fujita A., Tashiro T. — *J. biol. Chem.*, 1952, v. 196, p. 305. — 32. Lynn Wang, Lirth R. L. — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1967, v. 27, p. 325. — 33. Kozuka S. — *Seikagaku*, 1951, v. 23, p. 154. — 34. Fujita A., Nose Y., Kozuka S. et al. — *J. biol. Chem.*, 1952, v. 196, p. 289. — 35. Ulrich J. *Habitatationschrift*. Freiburg, 1969. — 36. Bruns F., Dünwald E., Noltmann E. — *Biochem. Z.*, 1958, Bd 330, S. 497. — 37. Gubler C. J. — *J. biol. Chem.*, 1961, v. 236, p. 3112. — 38. Кочетов Г. А., Изотова А. Е. — *Биохимия*, 1973, т. 38, с. 954. — 39. Гасман В., Кетц К. — В кн.: *Международн. биохимический конгресс. 5-й. Рефераты секционных сообщений*. М., 1961, т. 1, с. 487. — 40. Seligman A. M. et al. — *Angiology*, 1962, v. 13, p. 508. — 41. Matsukawa D., Chang S., Fujimiyama M. et al. — *J. Vitaminol.* 1954, v. 1, p. 43. — 42. Matsukawa D., Chang S., Fujimiyama M. et al. — *Ibid.*, p. 53. — 43. Agee C. Soc., Wilkins Judy H., Lirth R. L. — *J. Bact.*, 1973, v. 115, p. 949. — 44. Лчаркан А. С. — *Тер. арх.*, 1951, № 3, с. 63. — 45. Смирнова Л. Н. — В кн.: *Экспериментальные и клинические исследования по антибиотикам*. Л., 1958, с. 401. — 46. Васюточкин В. М. — *Труды Воен.-морск. мед. акад.*, 1950, т. 24, с. 103. — 47. Hamada K. — *Vitamins*, 1954, v. 7, p. 70.

Поступила 28/II 1978 г.

ANTIVITAMINE ACTIVITY OF THIAMINASE FROM *B. THIAMINOLYTICUS* UNDER CONDITIONS OF DIFFERENT WAYS OF THE ENZYME ADMINISTRATION INTO ANIMALS

S. S. Puzach, Yu. M. Ostrovskiy

Department of Metabolic Regulation, Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Grodno

Effect of bacterial thiaminase was studied in vivo after subcutaneous and intragastric administration of either the enzyme or of suspensions of intact and inactivated with an antibiotic bacterial cells, producing thiaminase. Activity of the thiamin-dependent enzymes

(transketolase and α -ketoglutarate dehydrogenase) was distinctly decreased in liver and kidney tissues within 2 and 7 days after a single subcutaneous administration of 0.015 IU of the enzyme. Repeated administration of the enzyme within 4 days inhibited activity of thiamin-dependent enzymes in other tissues (heart, spleen, muscle and blood). Activity of thiamin-dependent enzymes in liver, kidney, heart, spleen, brain, muscles and blood was decreased more distinctly after administration of intact bacterial cells into mice stomach as compared to the effect of inactivated cells. Old animals were more sensitive to administration of intact bacterial cells than the young ones. The data obtained suggest that, besides the known thiamin-degrading effect of bacterial thiaminase in the intestinal contents, the enzyme exhibits functional activity within the animal tissues after the parenteral administration.

УДК 616-006-07:616.633.922-074

Л. М. Берштейн, Е. В. Цырлина, В. Ф. Семиглазов, Е. А. Валдина,
Е. Г. Львович

ВЗАИМОСВЯЗЬ ЭКСКРЕЦИИ ХОЛЕСТЕРИНА С МОЧОЙ У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ С НЕКОТОРЫМИ ГОРМОНАЛЬНО-МЕТАБОЛИЧЕСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ И ВЛИЯНИЕ НА ЭТОТ ПРОЦЕСС ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Научно-исследовательский институт онкологии им. Н. Н. Петрова Министерства здравоохранения СССР, Ленинград

У здоровых людей, больных раком молочной железы, больных фиброаденоматозом, больных раком легкого и больных с доброкачественными процессами в легких изучали экскрецию холестерина с мочой методом газовой хроматографии. Не обнаружено увеличения экскреции холестерина при упомянутых злокачественных новообразованиях. Показано, что больным раком молочной железы и раком легкого свойственно нарушение нормальных коррелятивных взаимоотношений между экскрецией холестерина с мочой и содержанием липопротеинов, связанного с белком йода и 11-оксикортикостероидов в крови и экскреции циклического АМФ с мочой. Нагрузка эуфилином сопровождалась снижением холестеринурии у больных фиброаденоматозом и отсутствием динамики этого показателя у больных раком молочной железы. Лечение последних феноформином приводило к достоверному снижению, а лечение мисклероном — к умеренному повышению экскреции холестерина с мочой.

Имеются многочисленные наблюдения, свидетельствующие о резком усилении синтеза холестерина в опухолевых клетках, об увеличении частоты опухолей у животных, которым в корм добавляли различные липиды и, напротив, об уменьшении числа опухолей у животных, которые находились на диете с низким содержанием холестерина [1—3]. Изучение особенностей продукции последнего у онкологических больных и разработка доступных средств наблюдения за данным процессом приобретает все большую важность. Наиболее известным и широко применяемым в этом отношении в клинике параметром является определение уровня холестерина в крови [4]. Однако выраженность холестеринемии определяется несколькими процессами: эндогенным синтезом холестерина, его катаболизмом (в том числе превращением в желчные кислоты) и поступлением холестерина с пищей [3, 5]. При ряде онкологических процессов отмечается повышение экскреции холестерина с мочой [6—8]. Поскольку этот показатель представляет определенный интерес как возможный критерий эндогенного биосинтеза холестерина и стероидных гормонов в организме [6, 7], а факторы, определяющие величину экскреции холестерина, заслуживают специального анализа, то целью настоящей работы явилось: изучение экскреции холестерина с мочой методом газовой хроматографии у здоровых людей и у больных с доброкачественной и злокачественной патологией молочных желез и легких; сопоставление данных об экскреции холестерина с содержанием холестерина, фосфолипидов и липопротеинов, а также связанного с белком йода и 11-оксикортикостероидов в крови и с величиной экскреции 17-оксикортикостероидов и циклического аденозин-3', 5'-монофосфата (цАМФ) с мочой; изучение влияния на экскрецию холестерина с

мочой лечения антидиабетическим (фенформин) и гипохолестеринемическим (мисклерон) препаратами, а также нагрузок ингибитором фосфоидэстеразы цАМФ эуфиллином.

М е т о д и к а

Всего было обследовано более 120 человек. Определение холестерина в суточной моче осуществляли по методу [6]. Газовую хроматографию проводили на хроматографе «Paskard», модель 878 (США), колонка 2 м×4 мм, жидкая фаза — QF1 — 2%. Методы, использованные для определения липидов крови, связанного с белком йода, стероидных гормонов, цАМФ и креатинина, приводятся в работах, опубликованных нами ранее [9, 10]. Результаты обрабатывали методами вариационной статистики с подсчетом критериев *t* и *P*. При сопоставлении величины экскреции холестерина с мочой и величины некоторых гормонально-метаболических показателей вычисляли коэффициент корреляции рангов по Спирмену [11].

Р е з у л ь т а т ы и о б с у ж д е н и е

Как видно из табл. 1, экскреция холестерина с мочой (в миллиграммах на 1 г креатинина) больными раком молочной железы и раком легкого не отличалась существенно по средним данным от таковой у больных фиброаденоматозом, с доброкачественными процессами в легких и у здоровых людей (*P* во всех случаях $>0,05$). Не отмечалось также достоверной зависимости результатов от возраста обследованных и клинической стадии заболевания. У мужчин с патологией легких несколько чаще наблюдали более высокие значения холестеринурии, что может быть, однако, связано с известными половыми различиями в экскреции холестерина с мочой [7, 8]. Если на основании обследования здоровых людей в качестве верхней границы нормы для величины экскреции холестерина с мочой принять 1,0 мг на 1 г креатинина, то случаи гиперэкскреции холестерина распределились бы следующим образом: рак молочной железы — 2 человека, фиброаденоматоз — ни одного, рак легкого — 2, доброкачественные процессы в легких — 3.

Не приводя в настоящей работе сведений об абсолютной величине изучавшихся гормонально-метаболических показателей и ограничившись представлением коэффициентов, характеризующих их связь с уровнем холестеринурии (табл. 2), можно констатировать, что больным раком молочной железы и раком легкого свойственно нарушение нормальных коррелятивных взаимоотношений между этими параметрами. Наиболее отчетливо это проявлялось при сопоставлении экскреции холестерина с содержанием липопротеинов, связанного с белком йода и 11-оксикортикостероидов в крови и экскрецией цАМФ, где свойственный доброкачественным процессам знак коррелятивных связей сменялся на противоположный при раке.

Лечение радикально оперированных больных раком молочной железы антидиабетическим бигуанидом фенформин (50—100 мг в день) приводило к достоверному снижению экскреции холестерина с мочой. При отмене препарата этот показатель возвращался к прежним значениям (см. рисунок). Применение мисклерона (как одного, так и в комбинации с фенформином), напротив, сопровождалось некоторым увеличением выделения холестерина с мочой и умеренным снижением холестеринурии при отмене лечения¹. При приеме эуфиллина (по 0,6 г в день в течение 6—7 дней) не изменялось выведение холестерина с мочой у 7 больных раком молочной железы (до приема $0,39 \pm 0,08$ мг, после приема $0,38 \pm 0,06$ мг), у 4 больных фиброаденоматозом этот показатель снижался от 0,62, 0,21, 0,68 и 0,58 до 0,40, 0,05, 0,55 и 0,32 мг соответственно.

В работах [6—8] экскреция холестерина с мочой первоначально рассматривалась как показатель его эндогенной продукции. Авторы показали,

¹ Эти различия в действии двух препаратов на холестерин мочи наблюдались, несмотря на более выраженный (по сравнению с фенформин) эффект мисклерона на холестерин крови.

Экскреция холестерина с мочой у обследованных

Обследованные	Средний возраст, годы	Холестерин мочи, мг на 1 г креатинина				
		у всех обследованных	у лиц моложе 50 лет	у лиц 50 лет и старше	у лиц с I—II кли- нической стадией	у лиц с III—IV клинической ста- дией
Больные:						
раком молочной железы	49±1,4	0,49±0,05 (0,12—1,18) (26)	0,53±0,05 (0,21—0,68) (11)	0,47±0,07 (0,12—1,18) (15)	0,49±0,14 (0,21—1,18) (11)	0,52±0,07 (0,23—0,94) (12)
фиброаденоматозом	50±2,6	0,44±0,08 (0,21—0,85) (8)	0,43±0,12 (0,21—0,85) (4)	0,45±0,12 (0,23—0,67) (4)	—	—
раком легкого	51±1,2	0,50±0,09 (0,10—1,95) (30)	0,40±0,11 (0,16—0,80) (5)	0,52±0,12 (0,10—1,95) (25)	0,55±0,17 (0,10—1,50) (11)	0,44±0,13 (0,16—1,95) (18)
с доброкачественными процессами в легких	52±1,9	0,77±0,29 (0,12—3,12) (11)	0,58±0,16 (0,12—1,02) (5)	1,02±0,43 (0,19—3,25) (6)	—	—
Здоровые женщины *	43±3,5	0,49±0,11 (0,15—0,80) (6)	—	—	—	—
Здоровые мужчины	45±3,3	0,46±0,09 (0,24—0,77) (6)	—	—	—	—

* У 2 здоровых девочек 5 и 11 лет экскреция холестерина с мочой равнялась 0,52 и 0,35 мг на 1 г креатинина соответственно, а у женщины 26 лет на 32-й неделе беременности — 3,2 мг на 1 г креатинина, что соответствует данным литературы [6].

П р и м е ч а н и е. В скобках представлены минимальные и максимальные значения изучавшегося показателя и число обследованных.

что гиперэкскреция холестерина наблюдается при опухолях «стероидпродуцирующих» желез (яичники, тестикулы) и их основных органов-мишеней (матка, молочная и предстательная железа) [7, 8, 12]. Увеличение экскреции холестерина с мочой при раке предстательной железы было констатировано и другими исследователями [13].

Т а б л и ц а 2

Сопоставление данных об экскреции холестерина с мочой с величиной некоторых гормонально-метаболических показателей у обследованных

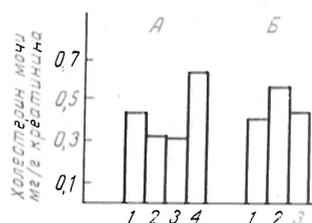
Обследованные	Холестерин крови	Фосфолипиды	Липопротеины	17-Кетостероиды	17-Оксикортикостероиды	11-Оксикортикостероиды	Связанный с белком йод	цАМФ
Больные:								
раком молочной железы	-0,29	0,30	-0,09	-0,34	0,23	-0,20	-0,03	0,36
фиброаденоматозом	0,40	0,31	0,19	0,15	-0,04	0,60	0,22	-0,27
раком легкого с доброкачественными процессами в легких	0,19	0,16	-0,23	0,34	0,02	-0,14	-0,29	0,23
	-0,35	0,30	0,42	-0,12	0,29	0,14	0,56	-0,40

П р и м е ч а н и е. Представлены коэффициенты корреляции рангов (ρ) по Спирмену [11], рассчитанные для: холестерин мочи/соответствующий гормонально-метаболический параметр.

Отсутствие повышения экскреции холестерина у больных раком легкого, обнаруженное в настоящей работе, соответствует известным данным литературы [7]. Расхождение результатов в отношении больных раком мо-

Экскреция холестерина с мочой на фоне лечения больных раком молочной железы фенформинном и мисклероном.

А — лечение фенформинном по 50—100 мг в день ($n=10$), 1 — до лечения, 2 — 2—3 мес лечения, 3—4—6 мес лечения, 4 — через 4—6 мес после отмены препарата; $P_1/P_2, 3 < 0,05$; Б — лечение мисклероном по 1—1,5 г в день (в 3 из 8 случаев в комбинации с фенформинном ($n=8$)): 1 — до лечения, 2 — 3—6 мес лечения; 3 — через 2—3 мес после отмены препарата.



лочной железы, возможно, связано с тем, что в отличие от нас другие авторы обследовали неоперабельных больных с инфильтративно-отечной формой опухоли [9]. Хотя при изучавшихся нами видах злокачественных новообразований не было обнаружено усиления экскреции холестерина с мочой, при сопоставлении последнего показателя с величиной некоторых гормонально-метаболических параметров у больных раком молочной железы и раком легкого отмечалось нарушение коррелятивных взаимоотношений, свойственных больным с соответствующей доброкачественной патологией. Одним из характерных примеров в этом отношении является сопоставление экскреции холестерина и цАМФ с мочой, что в совокупности с результатами нагрузок эуфиллином косвенным образом свидетельствует об утрате цАМФ присущих этому циклическому нуклеотиду [14] ингибиторных свойств в отношении биосинтеза холестерина при раке. Несмотря на этот факт и на то, что выведение холестерина с мочой резко возрастает при беременности [6] (см. табл. 1), когда синтез отдельных фракций липидов существенно усилен [15], некоторые данные, полученные в настоящем исследовании, не позволяют с уверенностью утверждать, что процесс экскреции холестерина с мочой отражает лишь состояние эндогенной про-

дукции его в организме. В первую очередь это относится к результатам терапии ингибитором биосинтеза холестерина мисклероном. Необходимо иметь в виду, что назначение мисклерона больным с гиперлипопротеинемией приводило к увеличению выведения холестерина с фекалиями [16]. В том случае, если выводы, полученные в отношении этого препарата, справедливы, потребуются дополнительные исследования, чтобы решить, в какой степени пул экскретируемого холестерина определяется, с одной стороны, характером продукции последнего и, с другой, — особенностями дальнейшего метаболизма холестерина в организме. Высказано предположение о том, что гиперэкскреция холестерина с мочой не обязательно является отражением усиления его биосинтеза в вовлеченных в процесс клетках, а может быть проявлением повышенной продукции в опухолях специфического белка, с которым холестерин связывается и выводится с мочой [12].

ЛИТЕРАТУРА

1. Dilmann V. M. — *Lancet*, 1971, v. 1, p. 1211—1219. — 2. Дильман В. М. — *Вопр. онкол.*, 1976, № 8, с. 3—16. — 3. Яворский Я. З. — *Успехи совр. биол.*, 1974, т. 77, с. 331—347. — 4. Дильман В. М., Бобров Ю. Ф. — В кн.: *Современные проблемы онкологии*. Л., 1966, с. 76—80. — 5. Bortz W. M. — *Metabolism*, 1973, v. 22, p. 1507—1524. — 6. Vela V. A., Acevedo H. F. — *J. clin. Endocr.*, 1969, v. 29, p. 1251—1258. — 7. Acevedo H. F., Campbell E. A., Frisch J. C. et al. — *Cancer (Philad.)*, 1974, v. 34, p. 1727—1736. — 8. Acevedo H. F., Campbell E. A., Saier E. L. et al. — *Ibid.*, 1973, v. 32, p. 196—205. — 9. Дильман В. М., Берштейн Л. М., Цырлина Е. В. и др. — *Вопр. онкол.*, 1975, № 11, с. 33—39. — 10. Дильман В. М., Немировский В. С., Остроумова М. Н. и др. — Там же, 1976, № 2, с. 13—17. — 11. Поляков Л. Е. (ред.). *Статистические методы исследования в медицине и здравоохранении*. Л., 1971. — 12. Acevedo H. F., Campbell E. A., Frisch J. C. et al. — *Cancer (Philad.)*, 1975, v. 36, p. 1459—1469. — 13. Chu T. M., Shuhler S. K., Mittelman A. — *Urology*, 1975, v. 6, p. 291—294. — 14. Bricker L. A., Levey G. S. — *J. biol. Chem.*, 1972, v. 247, p. 4914—4915. — 15. Knorr R. H., Boroush M. A., O'Sullivan J. B. — *Metabolism*, 1975, v. 24, p. 481—494. — 16. Grundy S. M., Ahrens E. H., Salen G. — *J. Lipid Res.*, 1972, 13, 531—551.

Поступила 18/1 1978 г.

INTERRELATIONSHIP BETWEEN EXCRETION OF CHOLESTEROL WITH URINE IN ONCOLOGIC PATIENTS AND SOME HORMONE-METABOLIC PATTERNS AS WELL AS EFFECT OF DRUGS ON THESE PROCESSES

L. M. Bernstein, E. V. Tsyrlina, V. F. Semiglazov, E. A. Valdina, E. G. L'vovich

N. N. Petrov Institute of Oncology, Ministry of Public Health of the USSR, Leningrad

Excretion of cholesterol with urine was studied using gas chromatography in healthy persons, in patients with cancer of mammary glands, fibroadenoma, lung carcinoma and in patients with benign processes in lungs. Cholesterol excretion was not increased in patients with the malignant tumors studied. In patients with the cancer of mammary glands and lung carcinoma normal correlation was altered between excretion of cholesterol with urine and content of lipoproteins, protein-bound iodine, 11-hydroxycorticosteroids in blood as well as excretion of cyclic AMP with urine. Treatment with ephylline was accompanied by a decrease in cholesteroluria in patients with fibroadenoma but the drug had no comparable effect on patients with the cancer of mammary glands. In patients with the cancer of mammary glands phenphormine caused distinct decrease and miscalerone — moderate increase in excretion of cholesterol with urine.

М. Г. Шафран

ВЫДЕЛЕНИЕ И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЫ КОСТНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

Лаборатория медицинской генетики Института экспериментальной медицины АМН СССР,
Ленинград

Из посмертного костного мозга человека выделен с помощью колоночной хроматографии на ДЭАЭ-Сефадексе, КМ-целлюлозе и гель-фильтрации на Сефадексе G-100 препарат миелопероксидазы. Степень чистоты 0,76, выход 16%. Полученный фермент является высокоочищенным по данным повторной гель-фильтрации, степени чистоты и иммунохимическому критерию. Молекулярная масса миелопероксидазы, по данным гель-фильтрации на Сефадексе G-100, составляет около 150 000.

Для того чтобы подойти к изучению патологических состояний человека, связанных с наследственной недостаточностью той или иной бактерицидной системы организма, требуется в первую очередь выделить очищенный препарат этого бактерицидного белка и получить на него специфическую кроличью антисыворотку. Объектом нашего исследования явилась миелопероксидаза (МПО) (донор: H_2O_2 -оксидоредуктаза; КФ 1.11.1.7). Как известно, этот фермент наряду с функцией разрушения неорганических и органических перекисей является одной из ведущих бактерицидных систем организма. Ранее были получены очищенные препараты МПО из многих источников, в том числе из экссудата туберкулезной эмпиемы и лейкоцитов крови человека [1—11]. Наиболее доступным материалом для получения МПО человека в достаточно больших количествах может явиться посмертный костный мозг скоропостижно умерших в результате несчастных случаев, травм, некоторых заболеваний, исключаящих наличие инфекционных и злокачественных процессов. В настоящей работе приводятся результаты исследования по выделению МПО из посмертного костного мозга человека.

М е т о д и к а

Источником для выделения фермента являлись клетки посмертного костного мозга губчатых костей, любезно предоставленные лабораторией консервации органов и тканей (зав. — проф. П. М. Медведев) Ленинградского института гематологии и переливания крови. Костный мозг получали не позднее 6 ч после смерти. Ребра и грудину резецировали, освобождали от посторонних тканей, измельчали особым резактом и клетки костного мозга вымывали физиологическим раствором. Взвесь клеток отделяли от обломков костной ткани фильтрованием через капроновый фильтр, затем центрифугировали при 400 g в течение 20 мин. Осадок клеток промывали физиологическим раствором и снова центрифугировали при тех же условиях. Жизнеспособность клеток костного мозга определяли методом люминесцентной микроскопии с акридиновым оранжевым [12].

Фракционирование клеток костного мозга проводили в несколько этапов. Сначала клетки гемолизировали [8]. Для этого их суспендировали в 15 мл 0,9% NaCl, при помешивании вносили 45 мл воды. Спустя 30 с к суспензии клеток добавляли 15 мл 3% NaCl, центрифугировали при 400 g в течение 10 мин и полученный осадок использовали для дальнейшего фракционирования. Для лучшего гемолиза эту стадию повторяли дважды. Осадок суспендировали в 0,9% NaCl и подсчитывали количество клеток. Для этой цели использовали камеру Горяева.

Обогащенную лизосомальную фракцию получали методом дифференциального центрифугирования [8]. Гемолизированные клетки костного мозга суспендировали в 0,25 M сахарозе и гомогенизировали в слабопритертом стеклянном гомогенизаторе. Степень разрушения клеток контролировали под световым микроскопом. Гомогенат центрифугировали при 400 g в течение 10 мин. Осадок подвергали повторной экстракции с добавлением 0,25 M сахарозы и затем центрифугировали при описанных выше условиях. Надосадочную жидкость после двух экстракций объединяли и центрифугировали для осаждения митохондриальной фракции при 2000 g в течение 30 мин; полученную надосадочную жидкость центрифугировали при 39 000 g в течение 20 мин. Этим достигается осаждение обогащенной лизосомальной фракции. Осадок суспендировали в 0,1 M фосфатном буфере pH 7,0. При отработке метода дифференциального центрифугирования на каждом этапе фракционирования проводили энзиматический

контроль за активностью некоторых маркерных ферментов лизосом и других структур (табл. 1). Выделение и очистку МПО из обогащенной лизосомальной фракции проводили по ранее описанной методике [11]. При очистке фермента в качестве ионообменников использовали КМ-целлюлозу (фирма «Reanal», Венгрия) и ДЭАЭ-Сефадекс А-50 (фирма «Pharmacia»). Гель-фильтрацию проводили на колонках с сефадексами G-100 и G-200 (фирма «Pharmacia»). Все этапы выделения и очистки были проведены при температуре 4—5°C. Активность пероксидазы определяли методом [13], перекиси водорода — колориметрическим методом [17]. Спектральный анализ проводили на спектрофотометре «Уnicam SP-8000».

Т а б л и ц а 1

Активность некоторых ферментов на разных стадиях дифференциального центрифугирования

Стадия центрифугирования	МПО	Лизоцим	Малатде- гидроге- наза	Глюкозо-6- фосфатде- гидрогеназа	6-Фосфо- глюконатде- гидрогеназа
	ед. на 1 мг белка		м/мл/мг		
Гомогенат клеток костного моз- га	794,1	40,5	51,3	$5,5 \cdot 10^{-3}$	$2,2 \cdot 10^{-3}$
Осадок после центрифугирова- ния при 400 g	150,0	17,2	—	—	—
То же при 2000 g	357,0	35,0	150,0	$125,0 \cdot 10^{-3}$	$50,0 \cdot 10^{-3}$
То же при 39 000 g	1323,0	117,0	8,3	—	—
Надосадочная жидкость после центрифугирования при 39 000 g	—	—	394,0	$20,0 \cdot 10^{-3}$	$12,0 \cdot 10^{-3}$
Методика определения	[13]	[14]	[15]	[16]	[16]

П р и м е ч а н и е. Для определения активности указанных выше ферментов полученные осадки суспендировали в 0,1 М фосфатном буфере рН 7,0 и осветляли центрифугированием при 1500 g в течение 10 мин.

Результаты и обсуждение

Выделение и очистку МПО проводили методом, представляющим собой сочетание предложенных ранее приемов для выделения этого фермента из некоторых источников [6, 8, 11]. Предварительные опыты показали, что ферментные элементы посмертного костного мозга губчатых костей, взятого спустя 4—6 ч после смерти, имели жизнеспособность не ниже 60—70%.

Т а б л и ц а 2

Очистка МПО из костного мозга человека

Стадия очистки	Количе- ство бел- ка, мг	Удельная активность МПО, ед. на 1 мг белка	Степень чистоты	Степень очистки	Выход. %
Гомогенат лизосом	696,0	362,0	—	—	—
Инкубация с 6% NaCl	160,2	3033,7	—	8,3	100
Диализ	111,6	3279,5	—	9,0	75
Хроматография на ДЭАЭ-Се- фадексе	79,2	3583,3	0,2—0,34	10,0	58
Хроматография на КМ-целлю- лозе	10,0	17548,3	0,5—0,6	48,4	36
Гель-фильтрация на сефадексе G-100	4,3	18309,0	0,76	50,5	16

Результаты одного из опытов по выделению и очистке фермента представлены в табл. 2. Материал клеток костного мозга был получен спустя 6 ч после смерти из 18 ребер и грудины. Жизнеспособность клеток по данным люминесцентной микроскопии составляла 64%.

Исходный материал форменных элементов костного мозга, полученных после их промывки и гемолиза, составлял $2,0 \cdot 10^{10}$ клеток. Из них путем дифференциального центрифугирования в 0,25 М сахарозе была получена обогащенная лизосомальная фракция [8]. Эту фракцию подвергали гомогенизации и находящиеся в ней ферменты переводили в растворимое состояние путем инкубации с 6% NaCl в течение 16 ч при температуре 4—5°C. Затем суспензию центрифугировали при 39 000 г в течение 10 мин. Образовавшийся осадок подвергали повторной экстракции в 0,1 М фосфатном буфере pH 7,0—6% NaCl, инкубировали в течение 16 ч при указанной выше температуре и центрифугировали при 39 000 г в течение 10 мин. Полученные надосадочные жидкости после первой и второй экстракции диализовали против 0,1 М фосфатного буфера pH 7,0 в течение 20 ч, диализат центрифугировали при 1500 г в течение 30 мин и надосадочную жидкость напосили на колонку с ДЭАЭ-Сефадексом А-50 (рис. 1). После элюции с колонки фракции с активностью пероксидазы собирали и подвергали разделению на колонке с КМ-целлюлозой. Элюцию фермента с колонки вели линейным гра-

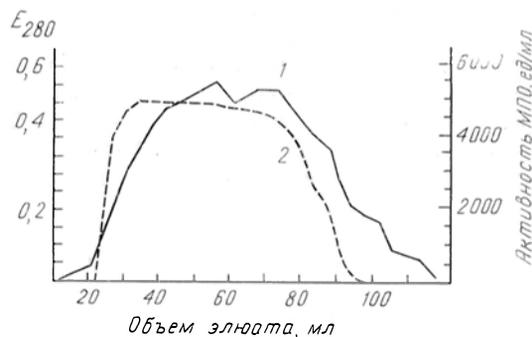


Рис. 1. Ионообменная хроматография белков лизосом костного мозга на ДЭАЭ-сефадексе А-50. Колонку (2,0×25 см) уравнивали и элюировали 0,1 М фосфатным буфером pH 7,0. Скорость элюции 20 мл/ч. 1 — E_{280} ; 2 — активность МПО в 1 мл.

диентом 0,1 М фосфатного буфера pH 7,0 — раствором этого же буфера с 1,0 М NaCl. Фермент выходил в виде двух пиков (рис. 2), обладающих активностью пероксидазы. Степень чистоты фермента (E_{430}/E_{280}) на этой стадии 0,5—0,6, выход 36%.

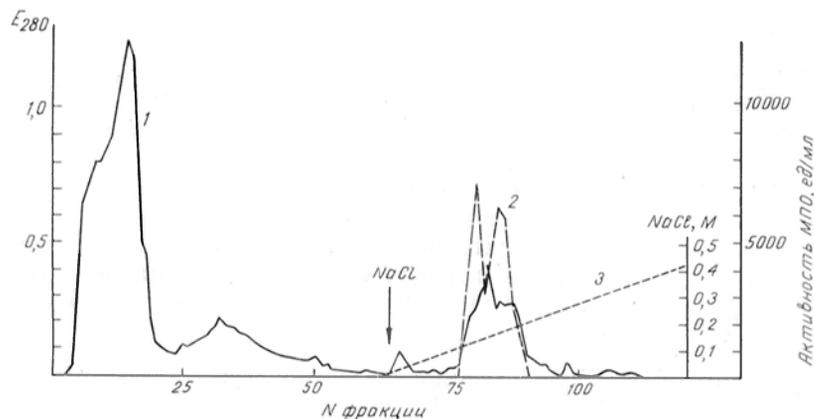


Рис. 2. Ионообменная хроматография МПО на КМ-целлюлозе.

Колонку (1,8×10 см) уравнивали 0,05 М фосфатным буфером pH 7,0. Элюцию фермента вели линейным градиентом 0,1 М фосфатного буфера pH 7,0—0,1 М фосфатный буфер pH 7,0 с 1,0 М NaCl. Объем резервуара и смесителя по 200 мл в каждом сосуде. Скорость элюции 8 мл/ч, объем фракции 3 мл. 1 — E_{280} , 2 — активность МПО в 1 мл. Начало градиента (3) обозначено стрелкой.

диентом 0,1 М фосфатного буфера pH 7,0 — раствором этого же буфера с 1,0 М NaCl. Фермент выходил в виде двух пиков (рис. 2), обладающих активностью пероксидазы. Степень чистоты фермента (E_{430}/E_{280}) на этой стадии 0,5—0,6, выход 36%.

Так как аналогичные два пика активности пероксидазы после очистки на КМ-целлюлозе были получены ранее [8] и авторы показали присутствие двух различных пероксидаз, то нами был проведен анализ спектров поглощения полученных фракций фермента (рис. 3). Исходя из этого критерия, было найдено присутствие только одной пероксидазы. Спектры поглощения фермента, согласно данным, полученным для МПО ранее [1, 4, 7], соот-

ветствовали МПО. Присутствия же пероксидазы эозинофилов на этой стадии обнаружено не было. Возможно, это объясняется природой используемого источника лейкоцитов.

В заключение полученные фракции с активностью МПО подвергали очистке на сефадексе G-100. Профиль элюции одной из фракций препарата представлен на рис. 4. Степень чистоты (E_{430}/E_{280}) фермента на этой стадии 0,76, выход 16%.

Полученный препарат МПО посмертного костного мозга по данным повторной гель-фильтрации, степени чистоты и иммунохимическому критерию был нами охарактеризован как фермент, имеющий высокую степень очистки. При повторной гель-фильтрации на сефадексе G-200 фермент вы-

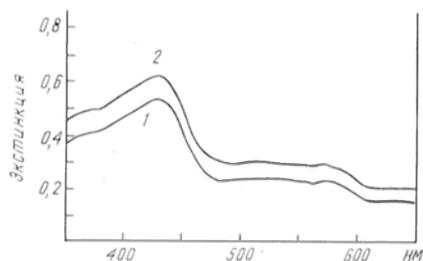


Рис. 3. Спектры поглощения МПО. 1 — первый пик фермента после очистки на колонке с КМ-целлюлозой, концентрация белка 0,4 мг/мл; 2 — второй пик фермента, концентрация белка 0,49 мг/мл.

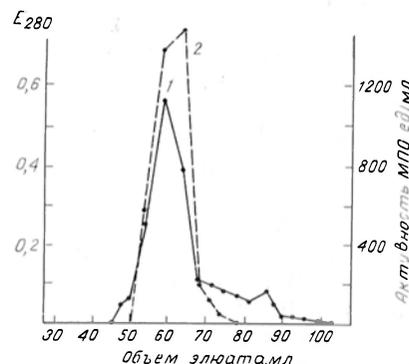


Рис. 4. Гель-фильтрация МПО на сефадексе G-100.

Колонку (1,8×80 см) уравнивали и элюировали 0,1 М фосфатным буфером pH 7,0 с 0,1 М NaCl. Скорость элюции 8 мл/ч. 1 — E_{280} ; 2 — активность МПО в 1 мл.

ходил в виде фракции, характеризующейся одним пиком. Степень чистоты (E_{430}/E_{280}), равная 0,76, вполне согласуется с этим критерием у ранее полученных препаратов фермента, у которых это отношение было в пределах 0,76—0,85 [2, 4, 6—11]. В качестве иммунохимического критерия степени очистки полученного препарата МПО рассматривали реакцию иммунопреципитации и иммуноэлектрофорез в агаре [18]. Предварительно по ранее разработанной схеме иммунизации [19] на очищенный фермент была полу-

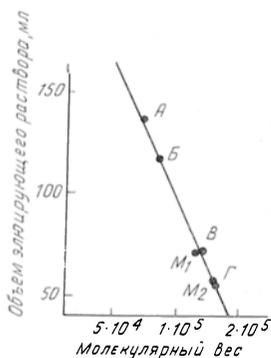


Рис. 5. Определение молекулярной массы МПО методом гель-фильтрации на сефадексе G-100.

A — бычий сывороточный альбумин (молекулярная масса 67 000); B — креатинкиназа (молекулярная масса 81 000); B — лактатдегидрогеназа (молекулярная масса 135 000); Г — алкогольдегидрогеназа (молекулярная масса 150 000); M₁ — МПО мышей (молекулярная масса около 135 000); M₂ — МПО костного мозга человека (молекулярная масса около 150 000).

чена специфическая кроличья антисыворотка. Показано, что в обоих случаях препарат МПО образует с выработанной на этот белок антисывороткой только одну дугу преципитации.

Молекулярная масса МПО, определенная методом гель-фильтрации на сефадексе G-100, была около 150 000 (рис. 5). Эти значения близки к ранее полученным данным, согласно которым молекулярная масса препарата МПО человека в зависимости от метода определения варьировала в пределах 120 000—161 000 [4, 7, 20].

Таким образом, использование посмертного костного мозга человека с выживаемостью клеток не ниже 60—70% возможно для выделения и очистки некоторых лейкоцитарных ферментов, в частности для МПО. Получен-

ный фермент по исследуемым свойствам вполне соответствует ранее полученным препаратам МПО лейкоцитов крови и экссудата туберкулезной эмпиемы человека [1, 4, 6, 7, 10].

ЛИТЕРАТУРА

1. Agner K. — Acta physiol. scand., 1941, v. 2, Suppl. 8, p. 1. — 2. Agner K. — Acta chem. scand., 1958, v. 12, p. 89. — 3. Schultz J., Gordon A., Shay H. — J. Am. chem. Soc., 1957, v. 79, p. 1632. — 4. Schultz J., Shmukler H. W. — Biochemistry (Wash.), 1964, v. 3, p. 1234. — 5. Newton N., Morrell D. B., Clarke L. — Biochim. biophys. Acta, 1965, v. 96, p. 463. — 6. Rohrer G. F., von Warlburg J. P., Lebi H. — Biochem. Z., 1966, Bd 344, S. 478. — 7. Zgliczynski J. M., Stelmaszynska T., Ostrowski W. et al. — Europ. J. Biochem., 1968, v. 4, p. 540. — 8. Himmelhoch S. R., Evans W. H., Mage M. G. et al. — Biochemistry (Wash.), 1969, v. 8, p. 914. — 9. Odajima T., Yamazaki I. — Biochim. biophys. Acta, 1970, v. 206, p. 71. — 10. Malmquist J. — Scand. J. Haematol., 1972, v. 9, p. 311. — 11. Шафран М. Г., Лызлова С. Н. — Вopr. мед. химии, 1975, т. 21, с. 561. — 12. Лаврик С. С. Консервирование костного мозга. Киев, 1975. — 13. Клебанов С. J. — Endocrinology, 1965, v. 76, p. 301. — 14. Дорофейчук В. Г. — Лабор. дело, 1968, № 1, с. 28. — 15. Мильман Л. С., Кровицкий Ю. Г., Ермолаева Л. П. — В кн.: Методы биологии развития. М., 1974, с. 346. — 16. Глоск Г. Е., МсЛеан Р. — Biochem. J., 1953, v. 55, p. 400. — 17. Bonet-Maugu P. — C. R. Acad. Sci. (Paris), 1944, v. 218, p. 117. — 18. Ouchterlony O. — In: Handbook of Experimental Immunology. Ed. D. M. Weir. Oxford, 1967, p. 655. — 19. Шафран М. Г., Шабанова Л. Ф., Ашмарин И. П. — Биохимия, 1976, т. 41, с. 496. — 20. Odajima T., Yamazaki I. — Biochim. biophys. Acta, 1972, v. 284, p. 360.

Поступила 1/II 1978 г.

ISOLATION AND SOME PROPERTIES OF MYELOPEROXIDASE FROM HUMAN BONE MARROW

M. G. Shafran

Laboratory of Medical Genetics, Institute of Experimental Medicine, Academy of Medical Sciences of the USSR, Leningrad

A preparation of myeloperoxidase was isolated from human bone marrow by column chromatography on DEAE-Sephadex, CM cellulose and gel filtration on Sephadex G-100. The enzyme was purified to 0.76 purity with a 16% yield. The repeated gel filtration, E_{430}/E_{280} ratio and immunchemical study confirm the high degree of purification. Molecular weight of the enzyme, determined by gel filtration on Sephadex G-100, was 150000.

УДК 616.37-002.2-07:616.633.455-074

В. К. Городецкий, Э. С. Исакова

КЕТОСАХАРА В МОЧЕ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ПАНКРЕАТИТОМ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Центральный научно-исследовательский институт гастроэнтерологии, Москва

В моче больных хроническим панкреатитом с поражениями печени, вызванными алкогольным отравлением, было найдено наряду с фруктозой и сахарозой 5 олигосахаридов, содержащих остаток фруктозы и обладающих восстанавливающей способностью; 4 из них были трисахаридами, состоящими из остатка фруктозы и двух остатков глюкозы, и 1 — тетрасахарид, содержащий остаток фруктозы и три остатка глюкозы. Во всех олигосахаридах остаток фруктозы занимал концевое положение. Все олигосахариды мочи больных различались по типу связи между остатками глюкозы и между остатками фруктозы и глюкозы. Олигосахариды мочи обладали различной хроматографической подвижностью.

Изучение олигосахаридов, появляющихся в моче больных при ряде нарушений углеводного обмена, представляет большой интерес. Анализ состава и строения этих олигосахаридов дает возможность определить характер возникших нарушений, что имеет основное значение для диагности-

ки заболевания. Ранее нами было показано, что при диффузных поражениях поджелудочной железы нарушается обмен кетосахаров, что приводит к резкому выраженной сахарозурии [1, 2]. В настоящей работе приведены результаты исследования кетосахаров мочи больных хроническим панкреатитом, находившихся на стационарном лечении в Институте гастроэнтерологии в 1976—1977 гг. Всего было обследовано около 100 больных хроническим панкреатитом различной этиологии, осложненным различными сопутствующими заболеваниями (холецистит, гастрит, рак поджелудочной железы, киста поджелудочной железы, дуоденит, язва двенадцатиперстной кишки и др.).

Методика

Мочу для анализа собирали у больных натощак до завтрака или брали суточную пробу. В качестве антисептика использовали хлороформ. Содержание суммы кетосахаров в пробе (в пересчете на фруктозу) определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой [3], количество кетосахаров, не обладающих восстанавливающей способностью, — этим же методом после щелочной дегградации всех сахаров, обладающих восстанавливающей способностью. Концентрацию сахарозы рассчитывали по разнице между количеством кетосахаров, не обладающих восстанавливающей способностью, и содержанием кетосахаров, полученных после их гидролиза дрожжевой инвертазой и последующей щелочной обработки. Кроме того, сахара мочи анализировали методом нисходящей хроматографии на бумаге. Для этого пробу предварительно обрабатывали в объеме активированным животным углем карболеном, а затем — ионообменными смолами дауэкс-1 $[\text{HCO}_3^-]$ и дауэкс-50 $[\text{H}^+]$. После сгущения проб на ротаторном испарителе при 37°C на хроматографическую бумагу фильтрэк № 7 наносили обработанную пробу мочи из расчета 0,5—0,75 мл исходной мочи в пятно. Часть пробы мочи с высоким содержанием сахарозы и кетосахаров, не обладающих восстанавливающей способностью, подвергали после обработки воздействию инвертазы (на 1 мл мочи 0,1 мл 0,1% водного раствора инвертазы, инкубация в течение 1 ч при 37°C) и также наносили на бумагу. Хроматографию проводили в системе растворителя ацетон — н-бутанол — вода в соотношении 7 : 2 : 1, а хроматограммы проявляли анилинофтальтатом и специфичным на кетосахара димсдоновым проявителем [3].

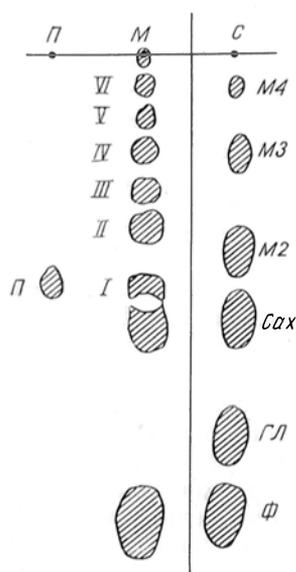
Для установления состава и строения кетосахаров производили более тщательную очистку мочи больных, разделяли сахара методом хроматографии на бумаге и выделяли каждый сахар для анализа. Для этого суточную пробу мочи после фильтрования упаривали на ротаторном испарителе при 37°C примерно в 7 раз. Сгущенную мочу фильтровали и к фильтрату добавляли 2 объема метанола. Выпавший осадок удаляли центрифугированием при 6000 об/мин. Надосадочную жидкость снова упаривали и растворяли в воде (конечный объем составлял примерно 5% от исходного объема мочи). К раствору добавляли карболен (около 2% от исходного объема мочи), встряхивали в течение 1 ч при комнатной температуре, а затем центрифугировали. Как правило, концентрированная проба мочи была интенсивно окрашена, обладала вязкой консистенцией и полностью не обесцвечивалась даже после повторной обработки карболеном. Надосадочную жидкость после обработки углем смешивали с 4 объемами метанола, выпавший осадок отфильтровывали, а фильтрат выпаривали. Выпаренный фильтрат растворяли в воде (конечный объем около 3% от исходного объема мочи) и обессоливали в объеме на смолах дауэкс-1 $[\text{HCO}_3^-]$ (30 мл суспензии на 80 мл обрабатываемого раствора) и дауэкс-50 $[\text{H}^+]$ (25 мл) на стеклянном фильтре. Сахара элюировали со смол 500 мл воды, весь элюат объединяли и выпаривали. Осадок легко растворялся в метаноле, после чего к нему добавляли примерно 10-кратное количество ацетона, при этом из раствора выпадал обильный белый хлопьевидный осадок. Осадок быстро собирали, растворяли в 20 мл воды (конечный объем раствора 54 мл, что составляет 2% от исходного объема мочи), от раствора отбирали 10 мл и повторно обессоливали на колонках со смолами дауэкс-1 $[\text{HCO}_3^-]$ (50 мл) и дауэкс-50 $[\text{H}^+]$ (41 мл). Сахара с колонок элюировали 270 мл воды, элюаты объединяли и выпаривали.

Обессоленный элюат пробы необходимо было очистить от мочевины. Попытка очистить кетосахара в виде боратных комплексов на ионообменной колонке со смолой дауэкс-1 оказалась малоэффективной, поэтому для очистки кетосахаров и разделения их мы использовали препаративную хроматографию на бумаге. Упаренный элюат растворяли в 5 мл метанола (объем пробы был 7,9 мл) и наносили полосой на хроматографическую бумагу фильтрэк № 7 из расчета 0,5 мл на 15 см стартовой линии. Условия проведения препаративной хроматографии были аналогичны условиям аналитической хроматографии. После разделения сахаров края хроматограмм отрезали и проявляли. Зоны хроматографического листа, содержащие кетосахара, вырезали и элюировали дистиллированной водой (1,5 мл воды на 1 см² листа). Элюат выпаривали досуха и анализировали.

В каждом элюате определяли содержание сахаров по фенолсернокислотному методу, содержание кетосахаров — по реакции с тиобарбитуровой кислотой, кетосахаров, не обладающих восстанавливающей способностью, — по реакции с тиобарбитуровой кислотой после щелочной дегградации, а количество сахарозы — по убыли кетосахаров после обработки инвертазой и щелочью. Все выделенные олигосахариды подвергали ферментативному гидролизу инвертазой, частичному кислотному гидролизу в 0,2 н. HCl при 100°C в течение 5, 10, 15 и 20 мин и более полному кислотному гидролизу в 1 н. HCl при 100°C в течение 60 и 90 мин. Гидролизаты анализировали с помощью бумажной хроматографии. Хроматограммы проявляли тремя проявителями — анилин-фталатом, димедоном и щелочным раствором азотнокислого серебра. В исходных пробах и в пробах после гидролиза определяли содержание глюкозы глюкозооксидазным методом.

Результаты и обсуждение

Общее содержание кетосахаров в утренней порции мочи больных хроническим панкреатитом значительно колеблется (от 9 до 100 мг%), причем количество сахарозы, а также кетосахаров, обладающих восстанавливаю-



Хроматограмма кетосахаров мочи больного Б.

Хроматограмма проявлена димедоном, полосы с сахарами-свидетелями — анилин-фталатом. С — сахара-свидетели; Ф — фруктоза; Гл — глюкоза; Сах — сахароза; М2 — мальтоза; М3 — мальтотриоза; М4 — мальтотетраоза; П — палатиноза; М — проба мочи; I—VII — кетосахара мочи.

Кетосахара в моче больных

Больной	Сахароза, мг%	Кетосахары, обладающие восстанавливающей способностью (в пересчете на фруктозный остаток), мг%
Б.	50	30
С.	30	28
К.	12	5
М.	15,5	5
С-в	11	5
К-п	10	4
Б-в	17	6
В.	19	4

щей способностью, варьирует в одних и тех же пределах, т. е. 2—50 мг%. Четкой зависимости между содержанием кетосахаров, обладающих восстанавливающей способностью и не обладающих ей, у больных обнаружено не было. Концентрация кетосахаров в моче больных мало отличалась от таковой у здоровых, и нам не удалось наблюдать резко выраженную сахарозурию или фруктозурию у исследованных больных.

При хроматографическом анализе сахаров 8 больных мы обнаружили в моче наряду с фруктозой и сахарозой целую группу олигосахаридов, обладающих восстанавливающей способностью и содержащих остатки

кетосахаров. Количество этих олигосахаридов не превышало содержания сахарозы (см. таблицу). Обнаруженные олигосахариды на хроматограммах располагались в области ди-, три- и тетрасахаридов. Всего найдено в моче больных 6 кетоолигосахаридов (см. рисунок).

В связи с тем что хроматографическому разделению олигосахаридов мешала примесь солей и мочевины (хроматографическая подвижность которых близка к подвижности сахарозы), мы отобрали суточные пробы мочи больного Б., в которых содержалось самое высокое количество кетосахаров, обладающих восстанавливающей способностью, и подвергли их более тщательной очистке. Всего было обработано 2800 мл мочи, содержание сахарозы в ней было равно 50 мг%, а кетосахаров, обладающих восстанавливающей способностью, — 30 мг%.

Олигосахарид I, элюированный с хроматограммы, имел R_f , немного меньшую, чем R_f сахарозы. Этот кетосахар не обладал восстанавливающей способностью и являлся дисахаридом, легко подвергался гидролизу кислотой и инвертазой; при этом образовывались фруктоза и глюкоза. После щелочной обработки и дополнительной очистки на ионообменниках дисахарид подвергали рехроматографии. Хроматографическая подвижность рехроматографированного дисахарида соответствовала подвижности сахарозы. Следовательно, олигосахарид I являлся сахарозой.

Олигосахариды II—VI имели ряд сходных свойств. Все они состояли из остатков глюкозы и фруктозы, что подтверждалось хроматографическим анализом после кислотного гидролиза. Эти сахара обладали восстанавливающей способностью и не расщеплялись инвертазой. При частичном кислотном гидролизе от олигосахаридов быстро отщеплялась фруктоза, оставшиеся негидролизованые олигосахариды димедоном не окрашивались, т. е. не содержали кетогрупп, что указывает на концевое положение остатков фруктозы. По мере уменьшения хроматографической подвижности олигосахаридов и с увеличением их молекулярной массы возрастала их резистентность к кислоте. При кислотном гидролизе олигосахаридов глюкозы образовывалось в несколько раз больше, чем фруктозы.

Олигосахарид II обладал несколько меньшей хроматографической подвижностью, чем мальтоза. После частичного гидролиза от него отщеплялся остаток фруктозы и образовывался дисахарид с R_f , сходной с R_f мальтозы. При дальнейшем кислотном гидролизе дисахарид распадался до глюкозы. Это дает возможность предположить, что остатки глюкозы в трисахариде соединены 1—4-связью. В моче больного содержание трисахарида II было не менее 0,3 мг%.

Олигосахарид III на хроматограмме обнаруживался между мальтозой и мальтотриозой, R_f его была меньше, чем R_f олигосахарида II. По своим свойствам он близок к трисахариду II, но после частичного гидролиза и отщепления концевой фруктозы из трисахарида III образовывалось небольшое количество дисахарида с величиной R_f , свойственной пигерозе, дисахариду, состоящему из остатков глюкозы, соединенных α -1,3-связью. Содержание трисахарида III в моче больного Б. было около 0,4 мг%.

Олигосахарид IV по своей хроматографической подвижности был сходен с мальтотриозой, но продвигался на хроматограмме медленнее, чем олигосахарид III. При кислотном гидролизе он давал дисахарид, сходный с мальтозой. Содержание этого трисахарида в моче было около 0,4 мг%.

Олигосахарид V также состоял из глюкозы и фруктозы. Хроматографическая подвижность его была меньше, чем у трисахарида IV. Гидролиз этого олигосахарида происходил значительно медленнее, чем гидролиз описанных выше олигосахаридов; при этом образовывались глюкоза, фруктоза, дисахарид, сходный с мальтозой, и глюкофруктозид с подвижностью между сахарозой и палатиозой. По-видимому, олигосахарид V являлся трисахаридом, и содержание его в моче было около 0,3 мг%.

Последний олигосахарид, который мы пытались анализировать, а именно олигосахарид VI, двигался на хроматограммах, как мальтотетраоза. Олигосахарид состоял из остатка фруктозы и трех остатков глюкозы, при гидролизе из этого тетрасахарида образовывался трисахарид, сходный с мальтотриозой, и дисахарид типа мальтозы. Концентрация тетрасахарида в моче составляла около 0,5 мг%. По-видимому, в моче исследованных больных имелись также высокомолекулярные кетосахара, которые обладали очень низкой хроматографической подвижностью в выбранной нами системе растворителей и практически не двигались со старта хроматограммы. |

Таким образом, исследованная нами серия олигосахаридов из мочи больных панкреатитом весьма близка по своему составу и по целому ряду свойств, но, по-видимому, эти олигосахариды имеют различные типы глюкозидных связей. Можно считать установленным, что все они построены

лю одному типу: к остатку фруктозы в различных положениях (исключая второй атом углерода) присоединен остаток глюкозы, к которому присоединяются следующие остатки глюкозы. Как мы видели, связь между глюкозными остатками в некоторых трисахаридах была одинаковой (олигосахариды II, IV, V), однако эти олигосахариды обладали различной хроматографической подвижностью. Это возможно только в том случае, если связь между фруктозным и глюкозным остатком в этих трисахаридах различна. Следовательно, многообразие олигосахаридов в моче является следствием присоединения к фруктозе различного числа глюкозных остатков, а также определяется типом глюкозидной связи между глюкозными остатками и типом связи между фруктозой и глюкозой. Если в сахарозе С-1 глюкозы связан с С-2 фруктозы (что дает дисахарид, не обладающий восстанавливающей способностью), то в сахарах из мочи больных панкреатитом эта связь может осуществляться с любым иным углеродным атомом фруктозы, поскольку все олигосахариды (кроме сахарозы), выделенные из мочи, обладали восстанавливающей способностью.

Ранее нами было показано [4], что в почках животных и человека возможно образование из сахарозы путем трансглюкозилирования трисахаридов, не обладающих восстанавливающей способностью, состоящих из сахарозы и глюкозного остатка, присоединенного α -связью к глюкозе сахарозы (эрлоза и трисахарид Z). В настоящей работе мы установили, что в моче больных со сходной патологией — хронический рецидивирующий панкреатит с диффузным поражением печени, вызванными алкогольным отравлением, имеются кетоолигосахариды другого типа строения. В других группах больных холецистопанкреатитом иной этиологии и у здоровых людей подобных олигосахаридов мы не обнаружили. По-видимому, аномальный синтез кетоолигосахаридов, обладающих восстанавливающей способностью, может происходить в печени, и, возможно, вызван поражением как печени, так и поджелудочной железы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зарубина Н. А. и др. — Клин. мед., 1967, № 8, с. 119. — 2. Городецкий В. К. и др. — Там же, 1970, № 8, с. 167. — 3. Городецкий В. К., Михайлов В. И. — В кн.: Современные методы в биохимии. М., 1977, т. 3, с. 120. — 4. Городецкий В. К., Михайлов В. И., Розенфельд Е. Л. — Докл. АН СССР, 1972, т. 204, № 3, с. 730.

Поступила 5/11 1978 г

KETOSUGARS IN URINE OF PATIENTS WITH CHRONIC PANCREATITIS

V. K. Gorodetsky, Z. S. Isakova

Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Central Institute of Gastroenterology, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

Simultaneously with fructose and sucrose, five oligosaccharides, containing fructose residue and exhibiting reducing properties, were found in urine of patients with chronic pancreatitis and with liver impairments caused by ethanol intoxication. Four of the oligosaccharides were trisaccharides, containing fructose residue and two residues of glucose as well as one tetrasaccharide, comprising a residue of fructose and three residues of glucose. The fructose residue occupied the terminal position in all the oligosaccharides. The oligosaccharides found in urine of the patients were dissimilar in the types of link between residues of glucose and between residues of fructose and glucose; these oligosaccharides exhibited different chromatographic mobility.

И. А. Пушкарев, Л. Н. Гусева, Л. Л. Борисов

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МОНОКЛОНОВЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ МЕТОДОМ ИММУНОФИКСИРОВАННОГО ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА НА АЦЕТАТЦЕЛЛЮЛОЗНЫХ ПЛЕНКАХ И В АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ

Рижский медицинский институт

Апробирован метод иммунофиксированного электрофореза в геле агарозы и на ацетатцеллюлозных пленках для идентификации моноклоновых иммуноглобулинов, т. е. для определения класса тяжелых и типа легких цепей. Установлены оптимальные условия проведения иммунофиксации. Выявлены достоинства иммунофиксированного электрофореза по сравнению с иммуноэлектрофорезом. Предлагается использовать иммунофиксированный электрофорез на ацетатцеллюлозных пленках в качестве скрининг-теста для идентификации моноклоновых иммуноглобулинов.

В 1955—1956 гг. А. Е. Гурвичем был предложен электрофорез-преципитатный метод для идентификации сывороточных белков после электрофореза на бумаге [1, 2].

В последние годы комбинация электрофореза с последующей избирательной фиксацией белка при помощи моноспецифической антисыворотки под названием иммунофиксированного электрофореза (ИФЭ) нашла применение при использовании других носителей: геля агарозы [3—7], ацетатцеллюлозной пленки [8], полиакриламидного геля [9]. Во всех этих случаях антисыворотку наносят непосредственно на носитель в зоне локализации идентифицируемого белка. Таким образом до минимума сведена диффузия, так как антисыворотка диффундирует на очень короткое расстояние, взаимодействуя с антигеном и образуя преципитирующий комплекс антиген—антитело. Упомянутый факт обуславливает высокую чувствительность метода.

ИФЭ был применен для идентификации и исследования полиморфизма некоторых белков — Gc-глобулина, комплемента, церулоплазмينا, α_1 -титринисина и др. [3—5]. Для идентификации моноклоновых иммуноглобулинов был применен ИФЭ в геле агарозы [6, 7].

Целью настоящей работы было апробировать метод иммунофиксированного электрофореза в геле агарозы и на ацетатцеллюлозных пленках, а также оценить возможности применения ИФЭ на данных носителях для идентификации моноклоновых иммуноглобулинов.

М е т о д и к а

В качестве исследуемого материала были использованы сыворотки крови больных миеломной болезнью и макроглобулинемией Вальденстрема (парапротеинемическими гемобластозами), находившихся на лечении в Гематологическом центре Латвийской ССР.

Электрофорез на ацетатцеллюлозных пленках осуществляли микрометодом [10, 11], применяя пленки производства Всесоюзного научно-исследовательского института синтетических смол (г. Владимир). На пленку 90×90 мм наносили 6 образцов; одну электрофореграмму окрашивали для выявления зоны локализации исследуемого белка, остальные 5 были использованы для иммунофиксации. Как для окрашивания электрофореграммы на все белки сыворотки, так и для иммунофиксации наносили образцы по 1 мкл, но для иммунофиксации сыворотку разводили изотоническим раствором NaCl в зависимости от содержания в ней исследуемого белка до 200 раз.

Электрофорез в агарозном геле проводили по методу [11] с некоторыми изменениями. Использовали агарозу марки А производства «Биохимреактив» (Олайн, Латвийская ССР). На пластинку геля 90×120 мм наносили 10 исследуемых образцов. Применяли две параллельные пластинки, одну из которых окрашивали на белки сыворотки, другую использовали для иммунофиксации. На пластинку, предназначенную для окрашивания, наносили сыворотку, разведенную изотоническим раствором NaCl в соотношении 1 : 1 в объеме 4 мкл. Для иммунофиксации сыворотку разводили до конечной концентрации исследуемого антигена 0,1—0,5 мг/мл.

Иммунофиксация на ацетатцеллюлозных пленках. Из неокрашенной пленки вырезали полоски 5×10 мм, соответствующую зоне локализации исследуемого белка, выявленной на окрашенной протеинограмме. Полоски погружали в моноспецифи-

ческие антисыворотки на 30 мин при комнатной температуре. От непреципитированных белков их отмывали изотоническим раствором NaCl и окрашивали для выявления иммунопреципитатов раствором амидо черного 10В.

Иммунофиксация в агарозном геле. Сразу после электрофореза непосредственно нагель в зоне локализации исследуемого белка накладывали полоски фильтровальной бумаги 5×20 мм, пропитанные соответствующими моноспецифическими антисыворотками. Затемгель с антисыворотками для образования иммунопреципитатов инкубировали во влажной камере в течение 2 ч при комнатной температуре. После удаления бумажных полосок поверхность геля покрывали слоем фильтровальной бумаги, тщательно удалив пузырьки воздуха, дополнительно покрывали 10 слоями бумаги или лигнина и выдерживали под грузом (2 кг) в течение 10 мин. От непреципитированных белковгель отмывали в течение 1/2—1 ч изотоническим раствором NaCl и дистиллированной водой, а затемгель высушивали при комнатной температуре или при 60°C. Для выявления иммунопреципитатовгель окрашивали 1% раствором амидо черного 10В в 7% уксусной кислоте или 0,5% раствором кумасси голубого.

Для иммунофиксации были использованы моноспецифические сыворотки против иммуноглобулинов человека Института эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР (ИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи) и Горьковского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии; сыворотки против легких цепей иммуноглобулинов были любезно предоставлены доктором мед. наук Е. В. Чернохвостовой и сотрудниками (ИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи) и доктором биол. наук К. Л. Шаханиной и сотрудниками (ИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи).

Результаты и обсуждение

Метод ИФЭ был использован нами для выявления и идентификации (т. е. для определения класса) тяжелых и типа легких цепей моноклоновых иммуноглобулинов. При проведении иммунофиксации одним из главных факторов является правильный выбор оптимальных условий для образования нерастворимых иммунопреципитатов антиген — антитело, т. е. концентрации антигена и времени инкубации с антисывороткой.

Известно, что необходимы эквивалентные количества антигена и антител или некоторый избыток антител. Если же имеется избыток антигена, то иммунопреципитат частично или полностью растворяется. На избыток антигена указывает светлое пятно в центре преципитата после окрашивания.

Нами установлено, что при иммунофиксации как в агарозе, так и на ацетатцеллюлозе оптимальным было разведение сыворотки до конечной концентрации антигена (моноклонового иммуноглобулина) 0,1—0,5 мг/мл, что практически согласуется с результатами других авторов [6, 7], исследовавших моноклоновые иммуноглобулины методом ИФЭ в агарозном геле.

Мы убедились, что при проведении ИФЭ на ацетатцеллюлозных пленках полное образование иммунопреципитатов занимает не более 40 мин при комнатной температуре. Что касается иммунофиксации в агарозе, то нами установлено, что для завершения иммунофиксации требуется 2 ч,

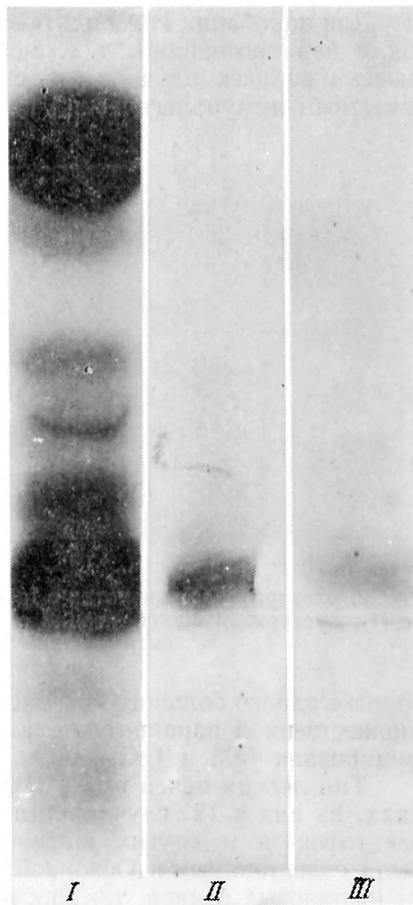


Рис. 1. Электрофорез сыворотки крови с IgM (x)-моноклоновым иммуноглобулином в агарозном геле (I), иммунофиксация с анти-IgM- (II) и анти-x-(III)-сыворотками.

хотя, по данным литературы [3, 6, 7], оптимальное время инкубации до 1 ч.

Таким образом, оптимальные условия иммунофиксации всегда подбираются опытным путем и зависят от многих факторов, в частности от носителя, используемого для электрофореза исследуемых белков и применяемых антисывороток.

Для иммунофиксации желательнее использование антисывороток высокого титра, так как при низких концентрациях антигена (больших разведениях) окрашенные иммунопреципитаты могут не всегда четко выделяться на несколько окрашенном фоне.

Для апробации ИФЭ в агарозном геле (рис. 1) были выбраны 40 сывороток с парапротеинами, т. е. моноклоновыми иммуноглобулинами. Практически во всех случаях мы смогли установить или подтвердить ранее известный иммунологический класс (18—IgM, 15—IgG, 6—IgA). В сы-

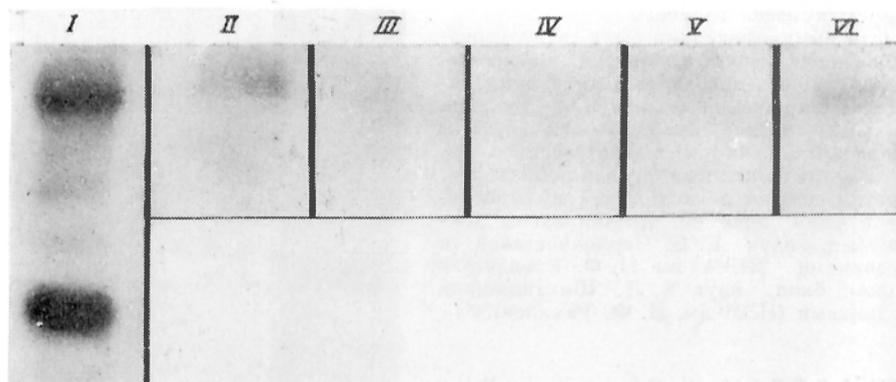


Рис. 2. Электрофорез сыворотки с IgG (λ)-парапротеином на ацетатцеллюлозной пленке (I), проверка иммунофиксации с анти-IgG- (II), анти-IgA- (III), анти-IgM- (IV), анти- κ - (V) и анти- λ - (VI) сыворотками.

воротке одного больного при электрофорезе в агаре было показано наличие множественной парапротеинемии. Иммунофиксация в этом случае идентифицировала IgM и IgG — моноклоновые иммуноглобулины.

Тип легких цепей путем ИФЭ в агарозном геле определили в 28 случаях, из них в 12 случаях тип был определен также с помощью иммуноэлектрофореза и других иммунологических приемов, причем результаты были сопоставимыми. Основной акцент мы сделали на типировании IgM-моноклоновых белков, так как известно, что часто невозможно определить тип легких цепей IgM-парапротеинов методом иммуноэлектрофореза. Идентификацию затрудняет присутствие молекул IgG того же типа (umbrella effect) [2]. Практически для всех 18 IgM-парапротеинов при иммунофиксированном электрофорезе в агарозном геле был определен типа легких цепей (13— κ , 5— λ). Тип легких цепей был расшифрован также в упомянутом выше случае множественной парапротеинемии [IgG (κ) и IgM (κ)].

Метод ИФЭ на ацетатцеллюлозе (рис. 2) был использован нами для определения класса тяжелых цепей 20, а тип легких цепей 26 — моноклоновых иммуноглобулинов. Результаты идентификации иммунологического класса полностью согласовывались с данными, полученными при помощи других методов (10—IgG, 7—IgA, 2—IgM). Среди типированных при иммунофиксации на ацетатцеллюлозе 26 моноклоновых иммуноглобулинов у 13 тип не был ранее известен в связи с трудностями типирования их при иммуноэлектрофорезе, что в основном относится к IgA- и IgM-парапротеинам. Из 8 типированных IgA тип легких цепей был определен для всех — 4— κ и 4— λ .

Таким образом, в результате проведенных исследований нами были установлены оптимальные условия проведения иммунофиксации как в агарозном геле, так и на ацетатцеллюлозных пленках — степень разведения исследуемой сыворотки и время инкубации с антисыворотками. Следует подчеркнуть, что при выбранных нами оптимальных условиях, применяя указанные выше антисыворотки, путем ИФЭ удалось определить иммунологический класс тяжелых цепей и тип легких цепей у всех исследованных моноклоновых иммуноглобулинов. В тех случаях, когда иммунологический класс и тип моноклоновых иммуноглобулинов был уже ранее установлен другими методами, путем ИФЭ было получено полное подтверждение иммунологической идентификации.

Таким образом, ИФЭ на ацетатцеллюлозных пленках ввиду быстроты и простоты исполнения может быть рекомендован как один из скрининг-тестов в лабораторной диагностике парапротеинемий. Для распознавания более сложных вариантов парапротеинемии, в частности с наличием множественных парапротеинов в сыворотке, можно рекомендовать ИФЭ в геле агарозы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гурвич А. Е. — Биохимия, 1955, т. 20, с. 550—553. — 2. Гурвич А. Е., Карсаевская Н. Г. — Там же, 1956, т. 21, с. 746. — 3. Lippert C. A., Johnson A. M. — Vox Sang, 1969, v. 17, p. 445. — 4. Ritchie R. F., Smith R. — Clin. Chem., 1976, v. 22, p. 497. — 5. Johnson A. M. — J. Lab. clin. Med., 1976, v. 87, p. 152. — 6. Ritchie R. F., Smith R. — Clin. Chem., 1976, v. 22, p. 1982. — 7. Cawley L. P., Minard B. J., Tourtelotte W. W. et al. — Ibid., 1976, v. 22, p. 1262. — 8. Chang Ch.-H., Inglis N. R. — Clin. chim. Acta, 1975, v. 65, p. 91. — 9. Маконкавквуон S., Накуе R. — Analyt. Biochem., 1970, v. 36, p. 422. — 10. Пушкарев И. А., Зариньш Э. В., Гусева Л. Н. и др. — Лабор. дело, 1977, № 10, с. 633. — 11. Johansson B. G. — Scand. J. clin. Lab. Invest., 1972, v. 29, Suppl. 124, p. 7.

Поступила 1/11 1978 г.

IDENTIFICATION OF MONOCLONIC IMMUNOGLOBULINS USING IMMUNOFIXATING ELECTROPHORESIS ON ACETATE CELLULOSE FILMS AND AGAROSE GEL

I. A. Pushkarev, L. N. Guseva, L. L. Borisov

A method of immunofixating electrophoresis is used for identification of monoclonic immunoglobulins, i. e. for estimation of heavy chain classes and of light chain types. Optimal conditions for immunofixation were developed. Advantages of immunofixating electrophoresis compared with immunoelectrophoresis were established. Immunofixating electrophoresis on acetate cellulose films is recommended as a screening test for monoclonic immunoglobulins.

УДК 616.348-002.2-07:616.37-008.6-072.7

Т. А. Цагикян, А. П. Нестерова, И. А. Фролова

СОСТОЯНИЕ ВНЕШЕСЕКРЕТОРНОЙ ФУНКЦИИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЭНТЕРОКОЛИТОМ

Институт питания АМН СССР, Москва

Изучена внешнесекреторная функция поджелудочной железы у больных хроническим энтероколитом в возрасте от 20 до 54 лет. Активность основных панкреатических ферментов, а также ингибитора трипсина определяли в сыворотке крови, дуоденальном содержимом и моче. Комплексное исследование панкреатических ферментов в сочетании с ингибитором трипсина дает достаточное представление о состоянии внешнесекреторной функции поджелудочной железы у больных хроническим энтероколитом. Полученные данные свидетельствуют о нарушении внешнесекреторной функции поджелудочной железы при хроническом энтероколите.

Состояние внешнесекреторной функции поджелудочной железы у больных хроническим энтероколитом является предметом многочисленных исследований [1—8]. Однако данные по этому вопросу противоречивы,

так как в большинстве случаев проводилось избирательное исследование активности отдельных ферментов дуоденального содержимого или сыворотки крови. Поэтому лишь комплексное исследование энзиматической активности сыворотки, мочи и дуоденального содержимого, полученного с применением соответствующих раздражителей, может дать более или менее полную информацию о внешнесекреторной функции поджелудочной железы. Известно, что при нарушениях функционального состояния и морфологической структуры поджелудочной железы меняется нормальное поступление в просвет кишечника и кровь не только ферментов данного органа, но и ингибитора трипсина. Сочетанное определение активности ферментов и их ингибиторов позволяет судить как о степени поражения, так и о компенсаторных возможностях органа [9, 10]. Установлено, что внешнесекреторная функция поджелудочной железы подвержена значительным изменениям при ряде заболеваний желудка и печени [11—14].

В настоящей работе приводятся данные комплексного исследования активности панкреатических ферментов у больных хроническим энтероколитом.

М е т о д и к а

Обследовано 96 мужчин и женщин в возрасте 20—54 лет, больных хроническим энтероколитом различной степени тяжести (легкой — 42, средней — 34, тяжелой — 20 больных) без клинических признаков сопутствующего панкреатита. В дуоденальном содержимом, сыворотке крови и моче определяли активность амилазы, липазы, трипсина и его ингибитора. Активность амилазы определяли методом [15], в сыворотке — методом [16], в моче и в дуоденальном содержимом — методом [17]. Активность липазы определяли методом [18], активность трипсина — методом Эрлангера в модификации В. А. Шатерникова [19, 20], активность ингибитора трипсина — методом [20]. Дуоденальное содержимое исследовали натощак (1-я порция), а также после введения 0,2% раствора соляной кислоты (2-я порция) и подсолнечного масла (3-я порция). Контролем служили данные, полученные при обследовании здоровых людей.

Р е з у л ь т а т ы и о б с у ж д е н и е

У больных хроническим энтероколитом повышена базальная экскреция амилазы (568% по сравнению с контролем; табл. 1), липазы (386%) и ингибитора трипсина (2495%); последнее при неизменной активности трипсина свидетельствует об удовлетворительном состоянии компенсации повышения протеолитической активности (см. табл. 1). Резко снижено соотношение трипсин/ингибитор.

В ответ на введение раздражителей (2-я и 3-я порции дуоденального содержимого) наблюдалась парадоксальная реакция железы. Так, если после введения соляной кислоты у здоровых людей отмечается повышение активности амилазы, липазы, трипсина и его ингибитора соответственно на 25, 52, 35 и 1423% по сравнению с их активностью в 1-й порции, то у обследованных больных активность трипсина по сравнению с базальной не была изменена, а активность амилазы, липазы и ингибитора трипсина была снижена на 27, 44 и 71% соответственно. Введение растительного масла сопровождалось у больных энтероколитом еще большим снижением активности амилазы и ингибитора трипсина и снижением активности трипсина. Снижения активности липазы после введения подсолнечного масла практически не наблюдалось (см. табл. 1). Таким образом, несмотря на то что абсолютные значения активности амилазы и липазы во всех трех порциях дуоденального содержимого были у больных, как правило, выше, чем в тех же порциях у здоровых людей, повышения активности ферментов в ответ на раздражители, что характерно для здоровых людей, не наблюдалось. Активность трипсина и его ингибитора по сравнению с базальной после введения раздражителей также снижалась, а не повышалась. Объем полученного дуоденального содержимого во всех трех порциях у больных был незначительно повышен.

Применение такого сильного физиологического раздражителя, как подсолнечное масло, помогает выявить скрытое угнетение ферментовыделительной функции железы [21], компенсаторные способности которой очень велики [22]. Вероятно, нарушение ферментовыделительной функции железы при хроническом энтероколите обусловлено в основном нарушением структуры слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки и проксимального отдела тощей кишки, когда снижено освобождение интестинальных гормонов (секретина и панкреозимина) в ответ на введение соляной кислоты и растительного масла [8,23—25]. Нельзя забывать и о роли энтерокиназы, активирующей трипсиноген. Активность энтерокиназы изменяется в зависимости от стадии и степени тяжести воспалительного процесса. Обычно в начальных стадиях его активность энтерокиназы (и трипсина) значи-

Т а б л и ц а 1

Активность панкреатических ферментов и ингибитора трипсина в дуоденальном содержимом больных хроническим энтероколитом и здоровых

Группа обследованных	Порция дуоденального содержимого	Амилаза, ед/мл	Липаза, мкмоль/мл	Трипси, мед/мл	Ингибитор трипсина, мед/мл	Трипси/Ингибитор
Больные хроническим энтероколитом (42)	1-я	3328±909	1648±681	231±76	218±60	1,05
	<i>P</i>	<0,01	<0,1	>0,5	<0,01	
	2-я	2449±1012	931±202	232±64	63±24,8	3,68
	<i>P</i>	<0,1	<0,05	<0,5	<0,2	
	<i>P'</i>	<0,2	<0,1	>0,5	0,05	
	3-я	1772±906	1533±145	125±28,9	7,25±6,2	17,2
<i>P</i>	<0,5	<0,001	<0,001	<0,001		
<i>P'</i>	<0,1	>0,5	<0,1	<0,01		
Контроль (здоровые лица) (31)	1-я	498±42,1	339±22,3	222±16,2	8,4±4,7	26,4
	2-я	626±45	516±25	301±15,8	128±37,6	2,35
	<i>P</i>	<0,05	<0,001	<0,001	<0,01	
	3-я	706±58	772±37	859±106	491±63,6	1,75
	<i>P</i>	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001	

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3 в скобках — число обследованных. *P* дано по сравнению с той же порцией в контрольной группе, *P'* — по сравнению с 1-й порцией в данной группе.

тельно возрастает. По мере развития атрофических процессов в слизистой оболочке секреция энтерокиназы снижается, что в свою очередь отражается на активности трипсина [26—29]. Видимо, этим и следует объяснять обнаруживаемые явления «диспанкреатизма» у больных хроническим энтероколитом. Следует помнить и о нарушении нервной и гормональной регуляции экзокринной секреции поджелудочной железы [30]. Определенное значение имеет регуляция секреции поджелудочных ферментов биогенными аминами [31], уровень которых при хронических заболеваниях кишечника претерпевает значительные и разнонаправленные изменения [32].

В сыворотке крови больных хроническим энтероколитом также выявляются изменения нормальной активности панкреатических ферментов (табл. 2), хотя и не столь резко выраженные, как в дуоденальном содержимом. Так, активность амилазы и трипсина была повышена в 1,5, а активность липазы — в 2,2 раза по сравнению с активностью в сыворотке здоровых людей. Активность ингибитора трипсина имела незначительную тенденцию к повышению. Соотношение трипси/ингибитор, равное в контрольной группе 1 : 166, повышалось у больных до 1 : 112. Нерезко выраженная гиперферментемия может быть в данном случае обусловлена как повышенной продукцией ферментов в железе, так и незначительным нарушением проницаемости паренхиматозных элементов пораженного органа.

Повышение соотношения трипсин/ингибитор в сыворотке и еще более выраженное повышение его в дуоденальном содержимом могут быть в определенной мере обусловлены дефицитом белка, необходимого для компенсаторного синтеза ингибитора. Последнее особенно резко выражено при тяжелой форме заболевания и, видимо, в значительной мере обусловлено нарушением белкового обмена, изменениями нормального аминокислотного состава крови и тканей.

Т а б л и ц а 2

Активность панкреатических ферментов и ингибитора трипсина в сыворотке крови больных хроническим энтероколитом и здоровых

Группа обследованных	Амилаза, ед/мл	Липаза мкмоль/мл	Трипсин, мед/мл	Ингибитор трипсина, мед/мл
Больные хроническим энтероколитом (96) <i>P</i>	116,4±5,4 <0,001	17,3±3,2 <0,01	4,43±0,75 <0,05	495,3±34,7 >0,5
Контрольная (здоровые лица) (31)	77,3±3,3 12	7,8±1,6 22	2,89±0,12 55	480,0±7,0 57

Наблюдалась корреляция между степенью тяжести клинического течения заболевания и степенью выраженности изменений ферментативной активности, что согласуется с данными других авторов [24, 33, 34].

Т а б л и ц а 3

Активность панкреатических ферментов и ингибитора трипсина в моче больных хроническим энтероколитом и здоровых

Группа обследованных	Амилаза, ед/мл	Липаза, мкмоль/мл	Трипсин, мед/мл	Ингибитор трипсина, мед/мл
Больные хроническим энтероколитом (28) <i>P</i>	122,0±2,9 <0,001	10,8±1,96 >0,5	0,79±0,11 <0,02	148,7±27,6 <0,001
Контрольная (здоровые лица) (10)	16,0±3,09	6,98±2,6	0,41±0,11	3,63±7,9

Обнаруженные изменения ферментативной активности в сыворотке крови больных хроническим энтероколитом сходны с таковыми при хроническом панкреатите [10]. Этого нельзя сказать о ферментативной активности дуоденального содержимого больных хроническим энтероколитом, когда базальная экскреция амилазы и липазы повышена очень резко, а после введения соляной кислоты наблюдается выраженное снижение активности этих ферментов, чего не наблюдается при хроническом панкреатите. Активность трипсина и его ингибитора при хроническом панкреатите более высока в 1-й порции дуоденального содержимого по сравнению с таковой у больных энтероколитом. В ответ на введение раздражителей активность трипсина и ингибитора не снижается, а возрастает. Соотношение трипсин/ингибитор во всех трех порциях дуоденального содержимого больных хроническим панкреатитом остается одинаково низким [10], точно так же как и у больных энтероколитом. Введение раздражителей, особенно растительного масла, в значительной степени повышает эту величину.

В моче больных хроническим энтероколитом активность всех изучаемых ферментов, в особенности амилазы, была повышена по сравнению с контролем в 1,5—7 раз (табл. 3). В норме в моче активность панкреатических ферментов незначительна [35—39], и лишь при некоторых патологических состояниях проницаемость почечного барьера для них повышается. Установлено, что повышение активности ингибитора трипсина в моче свидетельствует о наличии в организме хронической инфекции [40]. Повы-

шенная активность панкреатических ферментов и ингибитора трипсина в моче может быть обусловлена хроническим воспалительным процессом в кишечнике.

Полученные данные свидетельствуют о нарушении внешнесекреторной функции поджелудочной железы у больных хроническим энтероколитом. Изменения активности ферментов и ингибитора трипсина могут быть обусловлены такими причинами, как дисфункция секреторных процессов в железе вследствие воспалительных и атрофических изменений в кишечнике, нарушение белкового обмена, нарушение нейрогуморальной регуляции и др.

Результаты комплексного исследования внешнесекреторной функции поджелудочной железы необходимо учитывать при диагностике и лечении хронических воспалительных заболеваний кишечника.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алиева В. И., Михлин С. Я. — Мед. ж. Узбекистана, 1962, № 3, с. 38.
2. Шамсутдинова Р. К. Функциональное состояние поджелудочной железы и ферментовыделительная деятельность кишечника. Автореф. дис. канд. Ташкент, 1965.
3. Губергриц А. Я., Линевский Ю. В. — Тер. арх., 1967, № 12, с. 59.
4. Сивохина И. К. Функциональное состояние поджелудочной железы у больных хроническим энтероколитом с преимущественным поражением тонкого кишечника. Автореф. дис. канд. М., 1967.
5. Горанская С. В. Состояние поджелудочной железы и некоторые вопросы пристепоного пищеварения при хроническом энтероколите. Автореф. дис. канд. Петрозаводск, 1970.
6. Губергриц А. Я. — В кн.: Ферментовыделительная деятельность пищеварительных желез и ее регуляция. Ташкент, 1974, с. 74.
7. Малиш Ф., Фридрих — Чехословацк. мед. обозрение, 1974, № 1, с. 20.
8. Leberthal E., Antopowicz J., Schwachman H. — Gastroenterology, 1976, v. 70, p. 508.
9. Шатерников В. А. Исследование ферментов поджелудочной железы и их ингибиторов в норме и при ряде заболеваний органов пищеварительного тракта. Автореф. дис. докт. М., 1970.
10. Цагикян Т. А. Состояние внешнесекреторной функции поджелудочной железы при хронических заболеваниях пищеварительной системы. Автореф. дис. канд. М., 1974.
11. Анибал де Оливейра Валенса. — Врач. дело, 1976, № 6, с. 89.
12. Лоранская Т. И., Фролова И. А., Цагикян Т. А. и др. — Вопр. питания, 1972, № 3.
13. Gladisch R., Maiwald L. — Med. Klin., 1976, Bd 71, S. 373.
14. Lee S. P., Lai K. S. — Am. J. Gastroent., 1976, v. 65, p. 244.
15. Smith B. W., Roe J. H. — J. biol. Chem., 1957, v. 227, p. 357.
16. Глушкина В. М. — Лабор. дело, 1966, № 12, с. 744.
17. Фомина Л. С. — В кн.: Вопросы клинической лабораторной диагностики. М., 1969, с. 169.
18. Шатерников В. А., Савчук Л. А. — Лабор. дело, 1966, № 2, с. 81.
19. Erlanger V. F., Kowalsky N., Cohen W. — Arch. Biochem., 1961, v. 95, p. 271.
20. Шатерников В. А. — Вопр. мед. химии, 1966, № 1, с. 105.
21. Schay H. — Am. J. Gastroent., 1967, v. 2, p. 81.
22. Janowitz H. D. — Am. J. Gastroent., 1962, v. 38, p. 246.
23. Фролькис А. В. Функциональная диагностика заболеваний кишечника. М., 1973, с. 225.
24. Фролькис А. В. Хронические энтероколиты. Л., 1975.
25. Геллер Л. И., Казимирчик А. П., Булгакова О. С. и др. — Сов. мед., 1977, № 2, с. 16.
26. Бахадыров К. Б. Клиническое значение ферментных показателей кишечника при разной степени его недостаточности. Автореф. дис. канд. М., 1963.
27. Власова М. М. — В кн.: Современные методы исследований в гастроэнтерологии. М., 1971, с. 174.
28. Силакова В. В., Полытрев С. С. — В кн.: Ферментовыделительная деятельность пищеварительных желез и ее регуляция. Ташкент, 1974, с. 251.
29. Nissen K. H., Schmidt K., Bragmann G. — Mschr. Kinderheilk., 1973, Bd 121, S. 49.
30. Meldolesi J. — Pharmacol. Res. Commun., 1976, v. 8, p. 1.
31. Alm P., Carlsson B., Danielsson A. et al. — Med. Biol., 1976, v. 54, p. 210.
32. Борисова Л. И., Никифорова Г. Д. и др. — В кн.: Всесоюзная конф. «Научные основы питания здорового и больного человека. 1-я. Материалы. Алма-Ата, 1975, т. 2, с. 260.
33. Жуков Н. А. — В кн.: Актуальные вопросы гастроэнтерологии. Омск, 1975, с. 77.
34. Кравченко Л. Ф., Сыровацкая Э. П. — Тер. арх., 1975, № 9, с. 39.
35. Щеклик Э. Клиническая ферментология. Варшава, 1966.
36. Northan M. M., Pratt J. H., Callow A. D. — Arch. intern. Med., 1957, v. 100, p. 221.
37. Faarvang H. J., Sauritsen D. S. — Scand. J. clin. Lab. Invest., 1964, v. 16, p. 165.
38. Abadi D. M. — Enzymol. biol. clin., 1969, v. 10, p. 131.
39. Novis B. H., Bank S., Marks J. N. — Am. J. Dig. Dis., 1972, v. 17, p. 489.
40. Faarvang H. J. — Acta endocr. (Kbh.), 1959, v. 30, p. 285.

Поступила 1/111 1978 г.

THE STATE OF EXOCRINIC FUNCTION OF PANCREAS IN PATIENTS WITH CHRONIC ENTEROCOLITIS

T. A. Tsagikyan, A. P. Nesterova, I. A. Frolova

Institute of Nutrition, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Activities of main pancreatic enzymes as well as activity of trypsin inhibitor were studied in blood serum, duodenal contents and urine in course of investigations of the exocrinic function of pancreas in patients. The exocrinic function of pancreas was found to be impaired in chronic enterocolitis. The impairment of the gland secretion, caused by inflammatory and atrophic alterations in intestine, might be one of the factors responsible for alterations in the enzymatic activity and in activity of trypsin inhibitor. Complex examination of the pancreatic enzymes and of trypsin inhibitor supplied an adequate information on the state of exocrinic function of pancreatic gland in the patients with chronic enterocolitis.

УДК 577.164.111.02:577.124

М. Г. Величко, Р. В. Требухина, Ю. М. Островский, В. Г. Петушок,
А. Н. Бородинский

ВЛИЯНИЕ ОКСИТИАМИНА НА ОБМЕН ПИРУВАТА И ЛАКТАТА В ТКАНЯХ КРЫС

Отдел регуляции обмена веществ АН Белорусской ССР, Гродно

Исследованы соотношения двух субстратов — пирувата и лактата, активность причастных к их превращениям ферментов в тканях печени, скелетной мышцы и крови на фоне введения окситиамина в дозах, вызывающих состояние гиповитаминоза В₁. Показано, что окситиамин, специфически тормозит активность тиаминзависимых ферментов (транскетолазы и пируватдегидрогеназы), изменяет также обмен триозофосфатов, пирувата и лактата, вызывает одновременно сдвиги в активности других ферментов, связанных с превращениями названных субстратов.

Особенности обмена пирувата, связанные с изменением активности пируватдегидрогеназы на фоне введения окситиамина, были исследованы неоднократно [1, 2]. Накопление кетокилот в крови при этом является одним из характерных признаков. Поскольку пируват известен как субстрат и продукт широкого круга ферментов, можно полагать, что вызванные окситиамином метаболические сдвиги в той или иной мере скажутся на активности широкого круга ферментов (аланин-аминотрансфераза, лактатдегидрогеназа, пируваткиназа, α -глицерофосфатдегидрогеназа). Имеющиеся на этот счет данные весьма немногочисленны и касаются преимущественно действия высоких доз антивитамина на активность вышеуказанных ферментов [3, 4]. Исследований подобного рода при гиповитаминозе В₁ мы не обнаружили, хотя эта патология ближе к возникающей при лечебном применении антивитамина. В связи с этим изучали уровень пирувата и лактата, изоферменты лактатдегидрогеназы, активность пируваткиназы, α -глицерофосфатдегидрогеназы, пируватдегидрогеназы, транскетолазы и других ферментных систем в различных тканях на фоне кратковременного введения относительно невысоких доз окситиамина.

Методика

Опыты проведены на 48 крысах-самках массой 120—150 г, содержащихся на обычном рационе вивария. Половине животных этой группы проводили подкожные инъекции окситиамина в дозе 12,5 мг/кг массы. Животных забивали на 4, 8 и 12-е сутки от начала опыта. На исследование брали печень, мышцы и кровь. Для оценки количества лактата и пирувата в печени, крови и скелетной мышце при помощи лактатдегидрогеназы [5] ткань помещали в жидкий азот через 30 с после декапитации животного и затем готовили гомогенат на 6% хлорной кислоте. Растворимую фракцию гомогената печени и мышц получали измельчением ткани на холоду в 0,02 М трис-буфере рН 7,6 (разведение 1 : 20) и центрифугированием в течение 1 ч при 105 000 g на центрифуге VAC-601. В полученном супернатанте исследовали активность пируваткиназы [6], прямой и обратной лактатдегидрогеназы [6], аланинтрансмина-

зы [7], фосфофруктокиназы [8], глюкозо-6-фосфатазы [9], α -глицерофосфатдегидрогеназы [10]. В гомогенатах печени и мышцы определяли активность транскетолазы [11], глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [12], пируватдегидрогеназы [13]. Изоферменты лактатдегидрогеназы разделяли электрофоретически в 7,5% полиакриламидном геле [14]. Все реактивы фирмы «Reanal» (Венгрия). Гель после электрофореза инкубировали в течение 1 ч при 37°C по описанному ранее методу [15]. Количественную оценку активности изоферментов проводили денситометрически и выражали в процентах по отношению к суммарной активности всех фракций фермента. Материал обрабатывали статистически [16]. Каждая приведенная величина представляет собой среднюю арифметическую и ошибку средней из 8 определений.

Результаты и обсуждение

В изученных органах уровень пирувата и лактата под действием окситиамина различен, что, возможно, связано с разной направленностью метаболизма этих соединений в тканях.

Таблица 1

Содержание субстратов в исследуемых тканях после введения окситиамина в дозе 12,5 мг на 1 кг массы

Объект исследования	День опыта	Пируват, мкмоль на 1 г ткани		Лактат, мкмоль на 1 г ткани	
		контроль	опыт	контроль	опыт
Печень	4-й	0,091±0,01	0,108±0,009	3,32±0,25	1,73±0,25 $P < 0,001$
	8-й	0,083±0,01	0,102±0,01	3,38±0,23	2,06±0,2 $P < 0,001$
	12-й	0,097±0,01	0,100±0,03	3,10±0,25	2,64±0,54
Мышца	4-й	0,133±0,015	0,113±0,018	6,50±0,28	8,41±0,53 $P < 0,001$
	8-й	0,127±0,013	0,126±0,008	6,33±0,23	6,73±0,6
	12-й	0,134±0,012	0,145±0,01	6,25±0,23	7,18±0,4 $P > 0,05$
Кровь	4-й	0,110±0,012	0,149±0,01	1,62±0,18	2,11±0,2
	8-й	0,110±0,016	0,144±0,02	1,62±0,14	1,71±0,2
	12-й	0,106±0,016	0,136±0,013	1,62±0,18	2,02±0,21

В мышце увеличение содержания молочной кислоты отмечается во все исследуемые сроки (табл. 1). Активность ферментов, участвующих в образовании пирувата (пируваткиназа) и активно потребляющих этот метаболит (пируватдегидрогеназа и аламинтрансаминаза), не изменяется (табл. 2). Однако накопление лактата в мышцах, возможно, связано с активацией окислительных этапов пентозофосфатного цикла (см. табл. 2). Образованный при этом восстановленный НАДФ·Н₂, возможно, активно утилизируется в лактатдегидрогеназной реакции [17], изменяя тем самым активность изоферментов ЛДГ₁ и ЛДГ₂ в сторону увеличения. Низкая активность α -глицерофосфатдегидрогеназы (см. табл. 2) способствует аэробному образованию лактата за счет переключения обмена триозофосфатов вследствие измененного соотношения НАД·Н/НАД и повышенного использования НАДФ·Н₂ в лактатдегидрогеназной реакции [17]. Активность пируватдегидрогеназы (табл. 2) не изменяется, а торможение активности транскетолазы проявляется во все исследуемые сроки. Отличия в поведении тиаминзависимых ферментов (транскетолазы и пируватдегидрогеназы) можно объяснить различными взаимоотношениями между коферментом (или антикоферментом) и апоферментами. Так, сродство окситиаминдифосфата к апопируватдегидрогеназе примерно такое же, как к тиаминдифосфату,

в то время как окситиаминдифосфат обладает во много раз большим сродством к апотранскетолазе, чем кофермент [1].

После введения окситиамина величина отношения лактат/пируват в печени и уменьшается во все исследуемые сроки более чем в $1\frac{1}{2}$ раза, что связано с изменением содержания лактата в этой ткани (см. табл. 1).

Т а б л и ц а 2

Активность ферментов в скелетной мышце после введения окситиамина в дозе 12,5 мг на 1 кг массы

Ферменты	Контроль	День опыта		
		4-й	8-й	12-й
Лактатдегидрогеназа прямая (субстрат — пируват натрия, мкмоль НАД на 1 г ткани в 1 мин <i>P</i>	180,0±5,0	190,0±5,0	135,0±12,0 <0,001	165,0±17,0
Лактатдегидрогеназа обратная (субстрат — лактат натрия), мкмоль НАД на 1 г ткани в 1 мин	69,0±8,0	83,0±16,0	62,0±4,0	59,0±3,0
Пируваткиназа, мкмоль НАД на 1 г ткани в 1 мин	17,6±3,8	14,7±3,5	16,9±2,3	14,8±1,8
Аланинтрансминаза, мкмоль пирувата на 1 г ткани в 1 мин <i>P</i>	0,189±0,01	0,17±0,01	0,25±0,01 <0,001	0,192±0,016
Пируватдегидрогеназа, мкмоль $KF_3e(CN)_6$ на 1 г ткани в 1 мин	1,48±0,11	1,48±0,11	1,38±0,18	1,04±0,16
Глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа, мкмоль НАДФ·Н ₂ на 1 г белка за 15 мин <i>P</i>	13,0±0,82	17,5±1,67 0,05	15,0±1,21	33,0±1,95 <0,001
Транскетолаза, мкмоль С-7-Ф на 1 г ткани за 1 ч <i>P</i>	7,3±0,13	6,5±0,23 <0,01	6,3±0,13 <0,002	5,6±0,22 <0,01
α-Глицерофосфатдегидрогеназа, мкмоль НАДФ·Н ₂ на 1 мг белка за 1 ч <i>P</i>	0,26±0,02	0,17±0,04 <0,05	0,13±0,04 >0,001	0,22±0,2

Примечание. Здесь и в табл. 3 С-7-Ф — седогеупулозо-7-фосфат.

Активность пируватдегидрогеназы и транскетолазы в ткани печени снижается по мере увеличения срока воздействия окситиамина, однако зависимость торможения от дозы и времени введения препарата для первого фермента имеет более выраженный линейный характер (табл. 3).

В связи с тем что окислительному декарбоксилированию в печени подвергается меньшее количество пирувата, можно было ожидать накопления этого метаболита. Уровень кетокислоты, однако, существенно не изменяется (см. табл. 1). Мы не можем достаточно точно объяснить это. Можно лишь предположить, что значительное регулирующее влияние на уровень пирувата в печени оказало подавление активности пируваткиназы, транскетолазы и фосфофруктокиназы (см. табл. 3). Указанные ферменты контро-

лируют как уровень триозсфосфатов — предшественников пирувата, так и обмен других промежуточных субстратов гликолиза, являющихся эффективными аллостерическими эффекторами в узловых пунктах распада углеводов [18].

Уменьшение содержания лактата в ткани печени может рассматриваться в связи с относительно постоянной активностью α -глицерофосфатдегидрогеназы (см. табл. 3), что способствует утилизации пирувата через реакции глюконеогенеза. Об этом же свидетельствуют угнетение окситиамином на начальных этапах углеводного обмена, на уровне фосфофруктокиназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, и активация глюкозо-6-фосфатазы и трансаминазы в ткани печени (см. табл. 3).

Т а б л и ц а 3

Активность ферментов в печени после введения окситиамина в дозе 12,5 мг на 1 кг массы

Ферменты	Контроль	День опыта		
		4-й	8-й	12-й
Лактатдегидрогеназа прямая (субстрат — пируват натрия), мкмоль НАД на 1 г ткани в 1 мин	19,0±1,0	16,0±1,0	14,0±1,2	16,0±1,3
Лактатдегидрогеназа обратная (субстрат — лактат натрия), мкмоль НАД на 1 г ткани в 1 мин	15,0±1,0	15,0±1,0	14,0±2,0	16,0±1,0
Пируваткиназа, мкмоль НАД на 1 г ткани в 1 мин <i>P</i>	5,9±0,9	3,89±0,7 >0,05	4,1±0,4	3,85±0,37 <0,001
Трансаминаза, мкмоль пирувата на 1 г ткани в 1 мин	1,72±0,09	1,58±0,12	2,0±0,08	1,65±0,13
Пируватдегидрогеназа, мкмоль $K_3Fe(CN)_6$ на 1 г ткани в 1 мин <i>P</i>	1,15±0,19	1,11±0,17 >0,001	0,89±0,07	0,74±0,05 <0,001
Глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа, мкмоль НАДФ·Н ₂ на 1 г белка за 15 мин <i>P</i>	259±12	305±13,7 <0,01	186±9,7 0,01	246±9,6 >0,5
Транскетолаза, мкмоль С-7-Ф на 1 г ткани за 1 ч <i>P</i>	347±8,4	274±11,9 <0,01	293±25,4 0,01	141±10,2 <0,001
Фосфофруктокиназа, мкмоль НАДФ·Н ₂ на 1 мг белка в 1 мин <i>P</i>	8,9±0,4	5,8±0,4 <0,001	7,17±0,4 <0,02	7,17±0,8
Глюкозо-6-фосфатаза, мкмоль неорганического Р на 1 мг белка за 30 мин <i>P</i>	0,32±0,027	0,42±0,029	0,56±0,05 >0,001	0,50±0,06 >0,02
α -Глицерофосфатдегидрогеназа, мкмоль НАДФ·Н ₂ на 1 мг белка за 1 ч	1,44±0,08	1,14±0,13	1,45±0,12	1,30±0,05

Наблюдаемые сдвиги в обмене можно рассматривать и как компенсаторные реакции, устраняющие избыточное поступление в печень пирувата и лактата из других тканей. Внешним суммарным проявлением адаптационного характера рассматриваемых сдвигов можно считать стабильность гликемии (96,97 и 121 % от исходного уровня в соответствующие сроки исследования). Сдвиг соотношения субстратов в сторону преобладания пирувата согласуется также с увеличением количества изоэнзимных фракций ЛДГ₂ на 16 % и ЛДГ₃ на 52 % на 4-е сутки опыта. Направленность изменений в изоферментном спектре сохраняется и в последующие сроки опыта.

В исследованных тканях (печень, мышца) отмечается прямая зависимость между уровнем лактата и активностью окислительных ферментов пентозофосфатного цикла (см. табл. 1—3). Аналогичные данные получены для сердечной мышцы, в которой происходит полное окисление НАДФ·Н, внесенного либо образованного в процессе глюкозо-6-фосфатдегидрогеназ-

ной реакции с образованием эквивалентного количества молочной кислоты [17].

Изменения в уровне субстратов и активности ферментов в тканях печени и мышце нельзя оценить без учета количества пирувата и лактата в крови. Уровень пирувата в крови после введения окситиамина повысился во все исследуемые сроки (см. табл. 1). Некоторые причины, объясняющие наблюдаемую картину, уже рассматривались выше. Следует остановиться еще на действии антивитамина на клетки крови. Активность транскетолазы эритроцитов угнетается наполовину уже в самые короткие сроки после введения антивитамина ($8,5 \pm 0,21$, $3,28 \pm 0,13$ мкмоль/г/ч; $P < 0,001$), чем существенно нарушается сбалансированное соотношение между пентозным циклом и гликолизом. Окситиамин может также подавить активность пируватдегидрогеназы в лейкоцитах [19]. Вряд ли указанные две причины достаточно объясняют наблюдаемую стабильность пируватемии, в связи с чем, по-видимому, представление о решающей роли крови в транспорте пирувата и лактата к печени от других тканей следует признать правильным.

Результаты проведенных исследований показали, что окситиамин, специфически тормозя активность тиаминзависимых ферментов (транскетолазы и пируватдегидрогеназы), нарушает обмен триозофосфатов, пирувата и лактата и вызывает одновременно сдвиги в активности других ферментов, связанных с превращениями названных субстратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Островский Ю. М. Активные центры и группировки в молекуле тиамина. Минск, 1975, с. 173, 186.— 2. Горенштейн Б. И. Характеристика острых авитаминозов В₁, вызываемых окситиамином и пиритиамином. Дис. канд. Гродно, 1971.— 3. Аленин А. Е., Никишкин И. А., Земская Г. А.— В кн.: Биохимическая конференция Прибалтийских республик и Белорусской ССР. 5-я. Материалы. Таллин, 1976, т. 1, с. 124.— 4. Мажуль А. Г. О возможном характере взаимодействия производных тиамина с пиридоксальными ферментами. Автореф. дис. канд. Вильнюс, 1969.— 5. Асатиани В. С. Новые методы биохимической фотометрии. М., 1965, с. 327; 333.— 6. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. М., 1971, с. 109, 189.— 7. Reitmann S., Frankel S.— Am. J. clin. Path., 1957, v. 28, p. 56.— 8. Underwood A. H., Newscholme E. A.— Biochem. J., 1965, v. 95, p. 868.— 9. Swanson H. A.— Meth. Enzymol., 1955, v. 2, p. 241.— 10. Kennedy E. P.— Ibid., 1962, v. 5, p. 476.— 11. Gruns F. H., Dunwald E.— Biochem. L., 1958, Bd 330, S. 497—508.— 12. Асатиани В. С. Ферментные методы анализа. М., 1969, с. 596.— 13. Gubler C. J.— J. biol. Chem., 1961, v. 236, p. 3112.— 14. Маурер Г. Диск-электрофорез. М., 1971, с. 189.— 15. Fritz P. J., Morrison W. J., White E. L.— Analyt. Biochem., 1970, v. 36, p. 443.— 16. Монцевичюте-Эритене Е.— Пат. физиол., 1964, № 4, с. 71.— 17. Головацький У. Д., Красневич Л. Я., Колотницький А. Г.— Укр. біохім. ж., 1977, т. 49, № 3, с. 35—38.— 18. Дегли С., Никольсон Д. Метаболические пути. М., 1973, с. 52.

Поступила 1/III 1978 г.

EFFECT OF HYDROXYTHIAMIN ON METABOLISM OF PYRUVATE AND LACTATE IN RAT TISSUES

M. G. Velichko, R. V. Trebukhina, Yu. M. Ostrovsky, V. G. Petushok, A. N. Borodinsky

Department of Metabolic Regulation, Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Grodno

The ratio of two substrates (pyruvate and lactate), activity of enzymes, responsible for their turnover in liver tissue, skeletal muscles and blood, were studied simultaneously in experiments on the effect of hydroxythiamin, which was administered at doses, causing a state of hypovitaminosis В₁. Hydroxythiamin was shown to inhibit specifically the activity of thiamin-dependent enzymes (transketolase and pyruvate dehydrogenase). It affected also the metabolism of triose phosphates, pyruvate and lactate. At the same time, hydroxythiamin was responsible for changes in activities of other enzymes, participating in turnover of the substrates studied.

К. А. Кожевникова

ВЛИЯНИЕ ИНСУЛИНА И ГИДРОКОРТИЗОНА НА ПИРУВАТКИНАЗУ ИЗ МОЗГОВОГО И КОРКОВОГО СЛОЕВ ПОЧЕК КРОЛИКОВ

Отдел атеросклероза им. Н. Н. Аничксова Научно-исследовательского института экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград

Исследовали активность пируваткиназы типа M_2 из мозгового слоя почек кроликов при диабете, голодании в течение 1 и 10—16 сут, при длительном голодании кроликов с введением им глюкозы, а также при инъекции гидрокортизона и протамин-цинк-инсулина. Обнаружено повышение активности фермента при диабете и снижение ее при длительном голодании и введении инсулина. Установлена связь между низкой активностью пируваткиназы в мозговом слое почек при длительном голодании кроликов и недостаточным субстратным обеспечением фермента. Результаты, полученные при исследовании на мозговом и корковом слоях почек, свидетельствуют о различной адаптации клеток коркового и мозгового слоев к регулирующему действию гормонов на активность в них пируваткиназы.

Пируваткиназа — ПК (КФ 2.7.1.40) — один из ключевых ферментов гликолиза, играющий важную роль в динамическом балансе между гликолизом и глюконеогенезом. Печень и корковый слой почки, основные глюконеогенные ткани, содержат две различные молекулярные формы ПК — типов L и M_2 [1—7]. Мозговой слой почек крыс и кроликов характеризуется интенсивно протекающим гликолизом и содержит лишь один изофермент ПК, близкий по своим кинетическим свойствам к ПК типа M_2 из коркового слоя [2,5—7].

Показано, что «регуляторным» изоферментом ПК является тип L. Его активность изменяется под влиянием ряда метаболитов—фруктозо-1,6-дифосфата (Ф-1,6-ДФ), аденозинтрифосфата (АТФ), аминокислот (аланина, цистеина и др.) [2,3,6,8]. Количественно преобладающий тип M_2 ПК из коркового слоя почек имеет менее выраженные регуляторные свойства: его активность ингибируется в значительной степени фенилаланином, аланином и другими аминокислотами и в меньшей степени АТФ и не изменяется под влиянием Ф-1,6-ДФ [2, 3, 6].

Гормональная регуляция активности изоферментов ПК в корковом и мозговом слоях почек изучена недостаточно. Голодание крыс в течение 2—3 сут и кроликов в течение 10—16 сут не вызывало существенных изменений активности и изоферментного состава ПК в целой почке и ее корковом слое [9—12]. При аллоксановом диабете не изменялась активность ПК в целой почке крыс [13] и корковом слое почек крыс и кроликов при расчете на 1 мг ткани [9, 14], тогда как при расчете на белок активность ПК в корковом слое почек крыс повышалась [11]. Не было найдено существенных изменений активности ПК из коркового слоя почек кроликов и при введении им гидрокортизона в течение 1, 3 и 5 сут [9]. Однако при диабете, кратковременном голодании кроликов и введении им в течение 5 сут гидрокортизона наблюдались значительные сдвиги в изоферментном спектре ПК в корковом слое почек: снижалась активность типа L и повышалась активность типа M_2 [9].

Данных о влиянии гормонов на активность ПК из мозгового слоя почек в литературе мы не обнаружили. В наших предыдущих исследованиях было показано, что при аллоксановом диабете повышается активность ПК в мозговом слое почек, тогда как при голодании кроликов в течение 10—16 сут она значительно снижается [13]. Также различие в реакции ПК из мозгового слоя почек на длительное голодание и диабет могло быть связано с различным субстратным обеспечением фермента при этих состояниях. Выяснение этого вопроса являлось одной из задач данной работы. С целью изучения причин активации ПК из мозгового слоя при диабете были проведе-

ны эксперименты на кроликах с введением им гидрокортизона и протамин-цинк-инсулина. Представлялось целесообразным также сопоставить результаты исследований активности ПК в корковом и мозговом слоях почек при различных патологических состояниях.

М е т о д и к а

В работе использовали взрослых кроликов-самцов массой 2,5—3 кг. Животные были лишены пищи (без ограничения воды) в течение 1 или 10—16 сут. Часть животных содержали на голодной диете в течение 6 сут, после чего в последующие 5 сут голодания животным вводили внутривенно 40% глюкозу из расчета 4 мл на 1 кг массы тела 2 раза в день. Аллоксановый диабет вызывали внутривенным введением аллоксана из расчета 170 мг на 1 кг массы тела. В опыт брали кроликов с содержанием сахара в крови 300—600 мг% через 12—15 сут после инъекции аллоксана. Протамин-цинк-инсулин (Минский завод эндокринных препаратов) вводили по 12 ЕД на 1 кг массы тела 2 раза в день в течение 3 сут. Гидрокортизон (фирмы «Гедеон Рихтер», Венгрия) вводили по 25 мг на 1 кг массы тела 2 раза в день в течение 1, 3 и 5 сут. После деканитации у животных извлекали корковый и мозговой слои почек и гомогенизировали соответственно в 1, 5 и 3 объемах 0,01 М трис-НСl-буфера рН 7,5, содержащего 0,001 М ЭДТА. Гомогенаты центрифугировали в течение 60 мин при 45 000 g. Надосадочную жидкость (растворимая фракция) использовали для выделения изоферментов ПК из коркового слоя почек путем хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе [5, 6] или из мозгового слоя разводили в 15 раз и определяли активность ПК и содержание белка. Все процедуры выполняли при 2—4°C. Активность ПК определяли колориметрическим методом с 2,4-динитрофенилгидразином [5, 6]. Активность измеряли в микромолях пировиноградной кислоты, образованной за 1 ч при 30°C в расчете на 1 мг белка или на 1 г ткани для мозгового слоя и на 1 мл фракции для коркового слоя. Белок определяли спектрофотометрически в щелочном растворе при 280 nm.

Р е з у л ь т а т ы и о б с у ж д е н и е

В табл. 1 представлены результаты исследований активности ПК в мозговом слое почек кроликов при диабете и голодании. При аллоксановом диабете наблюдалось достоверное повышение активности ПК в мозговом слое почек кроликов при расчете на 1 г ткани (на 21 %) и несколько большее при расчете на 1 мг белка (на 32 %).

Т а б л и ц а 1

Активность ПК в мозговом слое почек кроликов контрольной группы с аллоксановым диабетом, голодавших и после введения им глюкозы

Условия опыта	Активность, мкмоль на 1 г ткани за 1 ч	P	Активность, мкмоль на 1 мг белка за 1 ч	P
Контроль	2604±180 (7)		67,7±7,9 (7)	
Диабет	3165±107 (7)	<0,05	89,6±3,4 (7)	<0,05
Контроль	1878±146 (7)		55,6±5,9 (7)	
Голодание в течение 1 сут	2044±144 (8)	>0,4	64,7±4,3 (8)	>0,2
Контроль	2315±112,8 (7)		86,5±9,2 (7)	
Голодание в течение 10—16 сут	1741±182,0 (6)	<0,02	49,6±2,7 (6)	<0,01
Контроль	3200±87,9 (7)		127,6±14,0 (7)	
Голодание в течение 11 сут	2390±59,0 (5)	<0,05	73,3±3,9 (5)	<0,01
Голодание + глюкоза	2806±201,0 (5)	>0,05	116,2±9,9 (5)	>0,5

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2 в скобках — число животных. Опыты на животных проводили в разное время года.

Известно, что скорость глюконеогенеза в мозговом слое почек незначительна и несколько возрастает при диабете [16]. Скорость гликолиза, достаточно высокая в норме, еще больше увеличивается в мозговом слое почек при диабете. При этом важным источником образования лактата, помимо глюкозы, поступающей в почки из крови или при обратном всасы-

нии из первичной мочи, являются, по-видимому, метаболиты возросшего глюконеогенеза, в частности фосфоэполлиурват (ФЕП) [17]. Увеличение активности ПК в мозговом слое почек кроликов с диабетом свидетельствует в пользу этого предположения.

Повышение активности ПК типа M_2 наблюдалось и в корковом слое почек кроликов с диабетом, тогда как активность ПК типа L существенно снижалась (см. рисунок). Значительное снижение активности ПК типа L способствует, по-видимому, резкому увеличению глюконеогенеза в корковом слое почек при диабете, повышение же активности ПК типа M_2 может способствовать повышению гликолиза [17].

Таким образом, при аллоксановом диабете значительно повышается активность ПК типа M_2 как в мозговом, так и в корковом слое почек. При этом важным источником гликоля в обеих тканях, помимо глюкозы, являются и метаболиты возросшего глюконеогенеза, в первую очередь ФЕП.

В опытах на голодающих кроликах было показано, что изменения активности изоферментов ПК в корковом слое почек при голодании в течение 1 сут такие же, как при диабете, хотя они менее выражены: снижение активности ПК типа L и незначительное, но достоверное повышение активности ПК типа M_2 (см. рисунок).

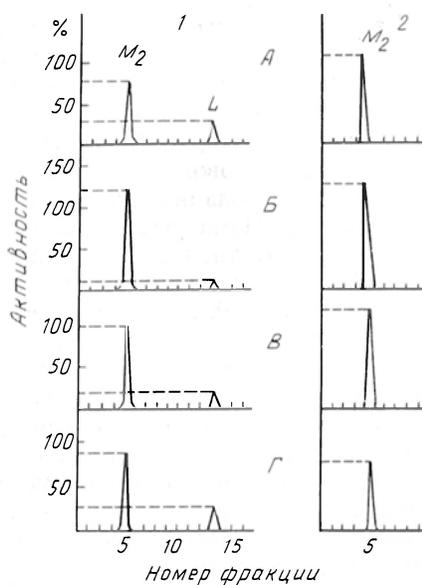
При голодании кроликов в течение 1 сут в мозговом слое почек достоверных изменений активности ПК типа M_2 не отмечалось (см. табл. 1 и рисунок).

При кратковременном голодании, как известно, увеличивается глюконеогенез за счет мобилизованных главным образом из мышц аминокислот, в том числе аланина [18]. Показано, что аланин не утилизируется корковым слоем почек как субстрат глюконеогенеза [19]. Вместе с тем он стимулирует глюконеогенез в этой ткани путем ингибирования ПК [19, 20], в частности ПК типа L коркового слоя почек (см. рисунок).

ПК типа M_2 в меньшей степени чувствительна к аланину [2, 6]. Кроме того, при повышении концентрации ФЕП аланин полностью утрачивает свое ингибирующее влияние на этот изофермент [21]. Этим, по-видимому, и можно объяснить отсутствие заметных изменений в активности ПК типа M_2 как в корковом слое почек, так и в мозговом слое при кратковременном голодании (см. табл. 1 и рисунок).

При голодании кроликов в течение 10–16 сут активность изоферментов ПК в корковом слое почек не изменялась (см. рисунок), тогда как в мозговом слое снижалась (на 25% при расчете на 1 г ткани и на 43% при расчете на 1 мг белка) (см. табл. 1 и рисунок).

При длительном голодании продукция глюкозы почками возрастает [18]. При этом главным фактором увеличения глюконеогенеза в почках является, вероятно, ацидоз [18]. Показано, что при ацидозе наблюдается увеличение в почках содержания ФЕП, Ф-1,6-ДФ, значительное снижение



Изоферменты ПК коркового и мозгового слоев почек кроликов при диабете и голодании.

1 — корковый слой; 2 — мозговой слой;
 А — контроль; Б — аллоксановый диабет;
 В — голодание в течение 1 сут; Г — голодание в течение 10–16 сут.

концентрации аланина без существенных изменений содержания аденин-нуклеотидов [22].

Отсутствие снижения активности ПК типа L в корковом слое почек при возросшем в условиях длительного голодания глюконеогенезе связано, возможно, с уменьшением концентрации аланина и устранением его ингибирующего действия Ф-1,6-ДФ [21]. Создается впечатление, что в условиях глюконеогенеза активность ПК типа L остается незаторможенной, что маловероятно. Однако имеется и другое предположение. *In vitro* показано, что ПК типа L существует в двух формах с различными кинетическими свойствами, которые могут быть взаимопревращаемы [23]. Одна из форм фермента обладает большим сродством к ФЕП и полностью активна при низкой концентрации Ф-1,6-ДФ. Другая форма фермента имеет малое сродство к ФЕП, активность его достигает максимума лишь при высоких концентрациях Ф-1,6-ДФ. Было высказано предположение, что *in vivo* ПК типа L также может существовать в двух взаимопревращаемых формах [23].

Возможно, что при длительном голодании ПК типа L коркового слоя почек находится в форме с низким сродством к субстрату, и ФЕП используется для глюконеогенеза.

По аналогии с диабетом можно было ожидать, что ускорение глюконеогенеза в корковом слое почек и в меньшей степени в мозговом слое при длительном голодании кроликов будет сопровождаться активированием ПК типа M_2 . Нами установлено, что при голодании в течение 10—16 сут активность ПК типа M_2 в корковом слое почек кроликов не изменяется (см. рисунок), в мозговом слое наблюдается снижение активности этого изофермента (см. табл. 1 и рисунок).

Различие в реакции со стороны ПК типа M_2 в корковом и мозговом слоях почек на длительное голодание и диабет могло быть вызвано меньшим субстратным обеспечением гликолиза в этих тканях при длительном голодании. Главным фактором при этом является отсутствие поступления глюкозы извне в организм голодающего животного.

Действительно, в экспериментах на голодающих в течение 11 сут кроликах с введением в последние 5 сут голодания глюкозы не было обнаружено достоверного снижения активности ПК типа M_2 в мозговом слое почек (см. табл. 1).

Дополнительным субстратом для конечных этапов гликолиза в обеих тканях является ФЕП, синтезируемый в значительных количествах при длительном голодании в корковом слое почек и в меньшей степени в мозговом слое.

Различие в глюконеогенной способности обеих тканей может объяснять неоднозначный ответ на длительное голодание изофермента ПК типа M_2 из коркового и мозгового слоев почек (см. рисунок).

Как было показано нами, при диабете наблюдается повышение активности ПК в мозговом слое почек (см. табл. 1 и рисунок). Это могло быть связано как с инсулиновой недостаточностью, так и с преобладающим действием глюкокортикоидов.

В табл. 2 представлены результаты опытов по изучению активности изоферментов ПК из коркового и мозгового слоев почек кроликов после введения им гидрокортизона и протамин-цинк-инсулина.

При введении кроликам в течение 1,3 и 5 сут гидрокортизона существенных изменений в активности ПК в мозговом слое почек не наблюдалось (снижение активности фермента при введении гормона в течение 5 сут было также недостоверным) (см. табл. 2).

В корковом слое почек отмечались заметные сдвиги в изоферментном спектре ПК при введении животным глюкокортикоида (см. табл. 2). Снижение активности ПК типа L происходило уже через 4 ч после инъекции гидрокортизона [9] и сохранялось на таком же пониженном уровне при двукратной инъекции гормона (см. табл. 2). ФЕП, образующийся в большом количестве в ходе глюконеогенеза в корковом слое почек в первые дни после

введения гидрокортизона, способствует в дальнейшем активированию ПК типа M_2 (активность этого изофермента увеличивалась после введения гормона в течение 3 сут) (см. табл. 2). При введении глюкокортикоида в течение 5 сут, возможно, происходит адаптация организма к гормону с небольшим снижением активности ПК типа L и повышением активности изофермента M_2 (см. табл. 2).

Таким образом, отсутствие активирования ПК типа M_2 в мозговом слое почек при любых сроках введения гидрокортизона можно объяснить недостаточным субстратным обеспечением этого изофермента.

Инсулин слабо воздействовал на изоферменты ПК из коркового слоя почек, но ингибировал на 23 % активность ПК типа M_2 в мозговом слое (см. табл. 2).

Т а б л и ц а 2

Активность изоферментов ПК из коркового и мозгового слоев почек кроликов контрольной группы после введения им гидрокортизона и инсулина

Условия опыта	Мозговой слой почки, мкмоль на 1 г ткани за 1 ч	Корковый слой почки, мкмоль на 1 мл фракции за 1 ч	
	ПК тип M_2	ПК тип M_2	ПК тип L
Контроль	1355±102,8 (13)	38,8±3,36 (5)	18,3±2,49 (5)
Гидрокортизон в течение 1 сут	1117±144,0 (7)	30,0±4,9 (6)	11,4±0,73 (6)
<i>P</i>	>0,2	>0,1	<0,05
Контроль	1663±153,0 (7)	52,9±2,88 (5)	17,0±1,2 (5)
Гидрокортизон в течение 3 сут	1657±242,0 (5)	71,6±7,6 (5)	19,5±2,1 (5)
<i>P</i>	—	<0,05	>0,3
Контроль	1720±176,0 (8)	38,5±1,28 (6)	16,6±1,38 (6)
Гидрокортизон в течение 5 сут	1364±154,0 (10)	44,8±1,8 (6)	13,3±0,41 (6)
<i>P</i>	>0,1	<0,02	<0,05
Контроль	3322±205,0 (6)	93,5±5,6 (6)	28,0±2,2 (6)
Протамин-цинк-инсулин	2585±218,0 (6)	86,9±4,9 (6)	38,5±6,8 (6)
<i>P</i>	<0,05	>0,3	>0,1

Представляется вероятным, что увеличение активности ПК в мозговом слое почек кроликов при диабете связано главным образом с инсулиновой недостаточностью, тогда как резкие изменения в изоферментном спектре ПК в корковом слое почек зависят от избытка глюкокортикоидов и в меньшей мере от дефицита инсулина.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Итамига К., Такака Т.— *J. Biochem. (Tokyo)*, 1972, v. 71, p. 1043.— 2. Costa L., de Asua L. J., Rosengurt E. et al.— *Biochim. biophys. Acta*, 1972, v. 289, p. 128.— 3. Carbonell J., Feliu J. E., Marco R. et al.— *Eur. J. Biochem.*, 1973, v. 37, p. 148.— 4. Middleton M. C., Walker D. G.— *Biochem. J.*, 1972, v. 127, p. 721.— 5. Кожевникова К. А.— *Биохимия*, 1973, № 4, с. 670.— 6. Ильин В. С., Кожевникова К. А.— Там же, 1974, № 1, с. 158.— 7. Ibsen K., Krueger E.— *Arch. Biochem.*, 1973, v. 157, p. 509.— 8. Кожевникова К. А.— *Вопр. мед. химии*, 1977, № 5, с. 658.— 9. Кожевникова К. А.— Там же, 1976, № 6, с. 773.— 10. Osterman J., Fritz P. J., Wuntch Th.— *J. Biol. Chem.*, 1973, v. 248, p. 1101.— 11. Anderson J. W., Stowring L.— *Am. J. Physiol.*, 1973, v. 224, p. 930.— 12. Sandoval J. V., Carbonell J.— *Biochim. biophys. Acta*, 1973, v. 315, p. 343.— 13. Coulson R., Anderson J.— *Nature*, 1967, v. 215, p. 981.— 14. Joseph P. K., Subramanyam K.— *Biochem. J.*, 1972, v. 128, p. 1293.— 15. Кожевникова К. А.— *Вопр. мед. химии*, 1975, № 3, с. 332.— 16. Ильин В. С., Балябина М. Д.— *Биохимия*, 1970, № 1, с. 109.— 17. Ильин В. С.— В кн.: *Проблемы медицинской эндокринологии*. М., 1970, с. 40.— 18. Epton J. H.— *Metabolism*, 1972, v. 21, p. 945.— 19. Friedrichs D., Schoner W.— *Biochim. biophys. Acta*, 1974, v. 343, p. 341.— 20. Krebs H. A., Be-

- nett D. A. H., de Gasquet P. et al.— Biochem. J., 1963, v. 86, p. 22.—
21. Ibsen K. H., Trippet P.— Arch. Biochem., 1974, v. 163, p. 570.—
22. Hems D. A., Brosman J. T.— Biochem. J., 1971, v. 123, p. 391.—
23. Van Berkel J. C., Koster J. F., Hülsman W. C.— Biochim. biophys. Acta, 1973, v. 293, p. 118.

Поступила 1/11 1978 г.

EFFECT OF INSULIN AND HYDROCORTISONE ON PYRUVATE KINASE FROM MEDULLAR AND CORTICAL LAYERS OF RABBIT KIDNEY

К. А. Козhevnikova

Institute of Experimental Medicine, Academy of Medical Sciences of the USSR, Leningrad

Activity of M_2 -pyruvate kinase from medullar layer of rabbit kidney was studied in diabetes, in starvation within 1 day and 10-16 days and in long-term starvation of rabbits after administration of glucose or hydrocortisone and protamine-Zn-insulin. The enzymatic activity was increased in diabetes and decreased in long-term starvation and after administration of insulin. A correlation was observed between low activity of pyruvate kinase in kidney medulla under conditions of long-term starvation of rabbits and deficiency of the enzyme substrate. The data, obtained after study of the enzymatic activity in kidney medulla as compared with that of rabbit kidney cortex, demonstrate various adaptability of cells from these kidney layers to regulatory effects of hormones on the pyruvate kinase activity.

УДК 616.13-004.6-06:616.13-008.939.6'15-074

А. В. Попов, А. С. Кузнецов

ИЗУЧЕНИЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ ЛИПОПРОТЕИДОВ В СОСУДИСТОЙ СТЕНКЕ МЕТОДОМ УЛЬТРАЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ ЭКСТРАКТА АОРТЫ В СТУПЕНЧАТОМ ГРАДИЕНТЕ ПЛОТНОСТИ

Отдел биохимии липидов и атеросклероза им. Н. Н. Анчикова Института экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград

Изучено распределение радиоактивности в липопротеидах аортальной стенки после перфузии изолированной аорты кролика радиоактивными липопротеидами очень низкой или низкой плотности. При ультрацентрифугировании в ступенчатом градиенте плотности экстракта аорты найдено, что перераспределение радиоактивности липопротеидов происходит в направлении как большей, так и меньшей плотности по сравнению с распределением радиоактивности в липопротеидах перфузата. Из экстракта аорты человека выделены липопротеиды, содержащие апопротеин В как в плотности 1,006—1,063, так и в плотности, большей 1,063. Эти данные, а также данные модельных опытов по изучению распределения комплексов липопротеидов с гликозаминогликанами в градиенте плотности свидетельствуют о том, что формирующие комплексы с компонентами соединительнотканного матрикса является одним из важных звеньев, ответственных за превращение атерогенных липопротеидов в сосудистой стенке.

Направление развития патологического процесса при атеросклерозе во многом определяется характером превращения липопротеидов (ЛП), проникших в стенку сосуда. Изучение свойств атерогенных ЛП сосудистой стенки ограничивается главным образом анализом фракций ЛП, флотирующихся в плотности 1,006 и 1,063 [1—5], что не дает полного представления о динамике превращения ЛП в артериальной стенке. Характер изменений, происходящих с ЛП при взаимодействии их с клетками и с компонентами соединительнотканного матрикса, в настоящее время изучен недостаточно.

С целью выяснения направленности превращения атерогенных ЛП в сосудистой стенке в настоящей работе проведено изучение распределения радиоактивной метки ЛП, выделенных из аорты кролика, после перфузии ее радиоактивными ЛП очень низкой плотности (ЛПОНП) или ЛП низкой плотности (ЛПНП).

Методика

Изучение ЛП, проникающих в сосудистую стенку, проведено в опытах *in vitro* с перфузией аорт кроликов радиоактивными ЛПОНП и ЛПНП, а также на материале 5 аорт, взятых от людей в возрасте 50—70 лет не позже 24 ч после смерти. Модель-

ные опыты *in vitro* по изучению взаимодействия глюкозаминогликанов (ГАГ) и ЛП были предприняты для выяснения возможного участия ГАГ в превращениях ЛП в сосудистой стенке.

Для перфузии использовали аорты 5 нормальных кроликов и 5 кроликов с атеросклерозом массой около 3 кг: 8 аорт в опытах с перфузией ^{14}C -ЛП и 2 аорты в опытах с перфузией ^{125}I -ЛП. Результаты, полученные в параллельных экспериментах с аортами нормальных кроликов и кроликов с атеросклерозом, были объединены, так как направленность изменений в распределении радиоактивности ЛП в стенке их аорт была сходна. Атеросклероз у кроликов вызывали путем добавления в корм 1 г холестерина на 1 кг массы тела в течение 4 мес. Перфузию проводили по методу, описанному ранее [6]. Перфузионной средой служил 5% раствор бычьего альбумина на среде Игла, в который добавляли меченые ЛПОНП (конечная концентрация 220—500 мг%) и ЛПНП (конечная концентрация 440—1140 мг%). ^{14}C -ЛП были получены путем ультрацентрифугирования [7] сыворотки крови кролика с экспериментальной гиперхолестеринемией, которому внутривенно вводили 2 мКи солюбилизованного в физиологическом растворе ^{14}C -холестерина [8] и внутримышечно 10 мКи ^{14}C -гидролизата белка хлореллы за 10 ч до взятия крови. Применение двух радиоактивных предшественников позволило получить ЛП, содержащие диффузно распределенную метку в липидной и белковой части с высокой общей удельной радиоактивностью — 400 000—790 000 имп/мг. ЛП, меченные *in vitro* ^{125}I с использованием монойодхлоридного метода [9], содержали метку преимущественно в белковой части. Их удельная радиоактивность составляла $1 \cdot 10^6$ — $1,5 \cdot 10^6$ имп/мг. Перфузию проводили последовательно в течение 4 ч перфузатом, содержащим радиоактивные ЛП, а затем в течение 4 ч перфузатом без ЛП. В контрольных опытах аорты 4 кроликов, вывернутые эндотелием наружу, инкубировали с радиоактивными ЛП при 4°C в течение 4 ч.

После окончания опыта аорту отмывали от среды физиологическим раствором. Затем аорту разрезали вдоль, отделяли адвентицию, ткань интимы — меди измельчали и помешали в 0,05 М трис-глициновый буфер рН 8,3 и проводили экстракцию ЛП из ткани аорты в электрическом поле [10]. Полученный экстракт использовали для ультрацентрифугирования в ступенчатом градиенте плотности раствора КВг, стабилизированного сахарозой и фиколом [11]. Соотношение липид/белок в ЛП устанавливали, определяя радиоактивность белковой и липидной их части после делипидирования в системе хлороформ — метанол в соотношении 1 : 1. Анализ радиоактивности меченых ЛП проводили с использованием сцинтилляционного счетчика «Mark II» фирмы «Nuclear Chicago», США [6, 12]. С целью исключения возможного влияния на результаты обмена свободного холестерина между различными классами ЛП аликвоту липидного экстракта ЛП использовали для разделения липидов на фракции с помощью тонкослойной хроматографии на силикагеле. Это позволило рассчитать суммарную радиоактивность липидной части ЛП без учета радиоактивности свободного холестерина. Сопоставление распределения радиоактивности ЛП, экстрагированных из аорты, по плотности проведено с распределением радиоактивности ЛП перфузата до и после перфузии.

Для экстракции ЛП из аорты человека интиму аорты измельчали ножницами и проводили экстракцию 4 объемами 0,15 М NaCl, содержащего 0,001 М ЭДТА и 0,005 М трис-HCl рН 7,4 в течение 24 ч при 4°C . Полученный экстракт после концентрации в полиэтиленгликоле использовали для ультрацентрифугирования в ступенчатом градиенте плотности. Фракции ЛП аорты человека, выделенные ультрацентрифугированием [7], анализировали с помощью диск-электрофореза [13] и реакции коагпреципитации с антителами к ЛПНП сыворотки крови человека [14]. В опытах *in vitro* по изучению взаимодействия ГАГ с ЛП ГАГ выделяли из аорты человека [15], а ЛПОНП и ЛПНП получали от кролика с экспериментальной гиперхолестеринемией. ГАГ и ^{125}I -ЛП в физиологическом растворе смешивали в соотношении 1 : 5 (г/г) и затем после экспозиции в течение 24 ч при 4°C подвергали ультрацентрифугированию в ступенчатом градиенте плотности с последующим изучением распределения радиоактивности комплекса ЛП — ГАГ по плотности. Комплекс ЛП — ГАГ выделяли из пробы путем его осаждения 0,025 М CaCl_2 .

Результаты и обсуждение

В опытах по изучению превращения радиоактивных ЛП в сосудистой стенке после ее перфузии было показано, что в экстракте из ткани аорты при ультрацентрифугировании его в ступенчатом градиенте плотности распределение радиоактивности ЛП, проникших в аорту, отличалось от распределения радиоактивности ЛП перфузата (табл. 1). Так, при перфузии аорты ЛПОНП в экстракте аорты перераспределение метки происходило в направлении ЛП большей плотности. При перфузии аорт ЛПНП в экстракте аорты выявлено перераспределение метки в направлении ЛП как большей, так и меньшей плотности.

Анализ особенностей распределения радиоактивности липидных и белковых компонентов ЛП в экстрактах из аорт при ультрацентрифугировании в ступенчатом градиенте плотности показал, что увеличение радиоактивности в плотности, меньшей 1,006, происходило преимущественно за счет липидной части ЛП, а увеличение радиоактивности в плотности 1,063—

Таблица 1

Распределение радиоактивности ЛП в перфузате и в экстракте аорты по данным ультрацентрифугирования в ступенчатом градиенте плотности

ЛП	Источник ЛП и время их анализа	Распределение радиоактивности ЛП в градиенте плотности, %			
		< 1,006	1,006—1,063	1,063—1,250	> 1,250
¹⁴ C-ЛПОНП	Перфузат:				
	до перфузии	94,2±2,0	4,7±1,7	0,8±0,1	0,3±0,1
	после перфузии	89,8±3,2	8,2±2,2	1,4±0,6	0,4±0,1
	Аорта	46,8±12,7	34,7±10,6	13,4±4,5	5,0±2,1
¹⁴ C-ЛПНП	Перфузат:				
	до перфузии	0,3±0,1	97,8±0,4	0,4±0,1	1,5±0,3
	после перфузии	0,5±0,2	97,9±0,3	0,7±0,2	0,6±0,3
	Аорта	42,4±14,1	17,1±2,5	30,5±7,6	9,7±3,3
¹²⁵ I-ЛПНП	Перфузат:				
	до перфузии	0	87,8±2,1	7,7±1,4	4,4±0,8
	после перфузии	0,4±0,3	85,4±0,7	10,3±0,05	3,8±0,2
	Аорта	0,5±0,5	47,0±23,2	28,8±12,0	23,5±11,6

Примечание. Перфузию аорты проводили мечеными ЛП.

1,250 и 1,300—преимущественно за счет белковой части ЛП (табл. 2). В табл. 2 приведены данные о распределении радиоактивности липида без учета радиоактивности свободного холестерина. Опыты по инкубации аорт

Таблица 2

Распределение радиоактивности ¹⁴C-белка и ¹⁴C-липиды ЛП в перфузате и в экстракте аорты по данным ультрацентрифугирования в ступенчатом градиенте плотности после перфузии аорты ¹⁴C-ЛП

ЛП	Положение метки	Источник ЛП	Распределение радиоактивности ЛП в градиенте плотности, %			
			< 1,006	1,006—1,063	1,063—1,250	> 1,250
¹⁴ C-ЛПОНП	Белок	Перфузат	83,5±3,7	8,4±2,6	3,8±0,8	4,2±0,6
		Аорта	22,3±6,5	11,7±4,2	30,9±4,9	30,2±1,6
	Липид	Перфузат	87,3±3,3	10,2±3,1	2,1±0,9	0,4±0,008
		Аорта	34,6±18,7	26,4±11,2	25,7±12,1	13,0±3,4
¹⁴ C-ЛПНП	Белок	Перфузат	0,85±0,32	91,4±0,5	3,5±0,2	3,9±0,3
		Аорта	9,2±4,8	10,8±1,5	45,2±6,6	32,5±7,6
	Липид	Перфузат	1,0±0,3	97,7±0,5	0,7±0,2	0,27±0,008
		Аорта	32,5±6,9	25,1±11,5	31,5±10,2	10,6±3,9

кроликов с мечеными ЛПОНП и ЛПНП при 4°C выявили сходную направленность в изменении распределения радиоактивности ЛП в экстрактах из аорт (табл. 3).

Данные литературы о способности водорастворимых экстрактов аорты формировать комплексы с атерогенными ЛП [16, 17], а также многочисленные исследования о взаимодействии ГАГ с ЛП [2, 18—20] позволили нам предположить, что наблюдаемое в наших опытах перераспределение радиоактивности ЛП в экстракте аорты при ультрацентрифугировании в градиенте плотности по крайней мере отчасти обусловлено взаимодействием

атерогенных ЛП с компонентами соединительнотканного матрикса, в частности с ГАГ и протеогликанами.

В опытах *in vitro* по изучению распределения ^{125}I -ЛПОНП и ЛПНП при ультрацентрифугировании в градиенте плотности после добавления к раствору липопротеидов ГАГ, выделенных из нормальной аорты человека, была предпринята попытка проверить сделанное предположение об участии ГАГ в изменении свойств ЛП в сосудистой стенке. Данные этих экспериментов, представленные в табл. 4, указывают на наличие комплекса

Таблица 3

Распределение радиоактивности ЛП в экстракте из аорты по данным ультрацентрифугирования в ступенчатом градиенте плотности после инкубации ЛП с аортой при 4°C

ЛП	Источник ЛП	Распределение радиоактивности ЛП в градиенте плотности, %			
		< 1,006	1,006—1,063	1,063—1,250	> 1,250
^{14}C -ЛПОНП	Инкубационная среда	98,2	0,8	0,7	0,3
	Аорта нормальная	11,6	2,8	74,4	11,0
^{125}I -ЛПОНП	Аорта атеросклеротическая	3,6	2,0	10,8	83,6
	Инкубационная среда	88,2	5,1	6,7	0
^{125}I -ЛПНП	Аорта нормальная	3,9	48,9	9,9	37,3
	Инкубационная среда	2,2	92,1	5,7	0
	Аорта атеросклеротическая	9,4	12,5	54,0	24,2

ЛП—ГАГ во всем диапазоне применяемых плотностей независимо от того, какой класс ЛП был использован в опыте (см. табл. 4). При этом способность ЛПОНП сыворотки крови кроликов с гиперхолестеринемией форми-

Таблица 4

Распределение радиоактивности ^{125}I -ЛП по данным ультрацентрифугирования в ступенчатом градиенте плотности после их взаимодействия с ГАГ *in vitro*

ЛП	Исследуемый материал	Распределение радиоактивности ЛП в градиенте плотности, %			
		< 1,006	1,006—1,063	1,063—1,250	> 1,250
^{125}I -ЛПОНП	Исходные ЛП	76,5	3,1	4,7	15,7
	Комплекс ЛП—ГАГ	49,7	37,5	12,6	0,05
^{125}I -ЛПНП	Исходные ЛП	9,2	88,0	0,9	1,9
	Комплекс ЛП—ГАГ	47,6	37,4	9,9	4,3

Примечание. Приведены средние величины 2 опытов.

ровать комплекс с ГАГ была выражена значительно сильнее, чем у ЛПНП тех же животных. Так, комплекс, осаждаемый ионами кальция, в опытах с ЛПОНП содержал 87 % радиоактивности исходных ЛП, а в опытах с ЛПНП—только 12 %.

При изучении свойств аорты ЛП человека методом ультрацентрифугирования было установлено наличие преципитирующего в присутствии ионов кальция материала во всем диапазоне применяемых плотностей (т. е. в плотности 1,006, 1,063, 1,250, 1,300). Выделенные комплексы после растворения в 5 % NaCl, содержащем 5 мМ ЭДТА, и последующего диализа против физиологического раствора, также содержащего 5 мМ ЭДТА, обладали электрофоретической подвижностью при диск-электрофорезе в полиакриламидном геле и занимали область на границе с 3,6 % гелем в виде одной полосы (положение пре-β-ЛП). Комплекс выявляли при окраске на липиды

(суданом черным), на ГАГ (альциановым синим) и на белок (амидо черным). Реакция кольцепреципитации ЛП сосудистой стенки, выделенных в плотности, равной или большей 1,063, была положительной. Эти данные свидетельствуют об иммунологической идентичности ЛП сыворотки крови и ЛП, выделенных из аорты не только в плотности 1,063, но и в плотности, большей 1,063.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что взаимодействие ЛП, проникших в стенку сосуда, с ГАГ является одним из важных звеньев, ответственных за превращение ЛП в сосудистой стенке. Характер превращения атерогенных ЛП, проникших в сосудистую стенку, по-видимому, во многом определяется судьбой сформировавшегося комплекса ЛП—ГАГ. Выявленная в наших опытах гетерогенность комплекса ЛП—ГАГ по плотности может, с одной стороны, отражать динамику превращения комплекса в стенке аорты, а с другой — может быть результатом взаимодействия ЛП с различными ГАГ и протеогликанами, природа которых определяется стадией развития патологического процесса. Увеличение гидратированной плотности ЛП может быть результатом присоединения к ЛП частице достаточно большого количества ГАГ или протеогликанов с высокой плотностью ($d > 1,4$) [21]. Уменьшение гидратированной плотности ЛП при взаимодействии с ГАГ, по-видимому, связано с агрегацией ЛП, если взаимодействие последних произошло при меньшем молярном соотношении низкомолекулярных ГАГ к ЛП.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hanig M., Shainoff I. R., Lowy A. D.— Science, 1956, v. 124, p. 176—177.— 2. Srinivasan S. R., Dolan P.— Atherosclerosis, 1972, v. 16, p. 95—104.— 3. Денисенко А. Д., Климов А. Н.— Бюлл. экпер. биол., 1975, № 6, с. 44—47.— 4. Климов А. Н., Попов А. В.— Кардиология, 1976, № 2, с. 30—37.— 5. Hoff H. F., Heideman C. L., Gaubatz J. W. et al.— Circulat. Res., 1977, v. 40, p. 56—64.— 6. Попов А. В., Герчикова Е. А.— Пат. физиол., 1974, № 3, с. 79—81.— 7. Havel R. J., Eder H. A., Bragdon I. H.— J. clin. Invest., 1955, v. 34, p. 1345—1352.— 8. Wherret A. F., Staple E.— Arch. Biochem., 1960, v. 90, p. 224—228.— 9. Helinkamp R. W., Contreras M. A., Izzo M. J.— Int. J. Appl. Radiat., 1967, v. 18, p. 747—757.— 10. Попов А. В., Кузнецов А. С., Андреева Л. И.— Вопр. мед. химии, 1975, № 6, с. 657—660.— 11. Попов А. В., Андреева Л. И., Кузнецов А. С.— Там же, № 4, с. 434—437.— 12. Виноградов А. Г., Алкснис Е. Г., Попов А. В. и др.— Кардиология, 1976, № 2, с. 37—41.— 13. Маграчева Е. Я.— Вопр. мед. химии, 1973, № 6, с. 625—630.— 14. Дэвени Т., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды и белки. М., 1976, с. 123.— 15. Schiller S., Slover G. A., Dorfman A.— J. biol. Chem., 1961, v. 236, p. 983—987.— 16. Samejo G., Mateu L., Lalaguna F., Padrón R. et al.— Artery, 1976, v. 2, p. 79—97.— 17. Samejo G., Waich S., Guintero G. et al.— Atherosclerosis, 1976, v. 24, p. 341—354.— 18. Bihari-Varga M., Végh M.— Biochim. biophys. Acta, 1967, v. 144, p. 202—210.— 19. Geró S., Gergely J., Dévengyi T. et al.— Nature, 1960, v. 187, p. 152—154.— 20. Hollander W.— Exp. molec. Path., 1976, v. 25, p. 106—120.— 21. Mashburn T. A., Hoffman Ph., Hsu Dar— San.— Biochim. biophys. Acta, 1974, v. 362, p. 366—374.

Поступила 21/III 1978 г.

STUDY OF LIPOPROTEIN CONVERSIONS IN BLOOD VESSEL WALL USING ULTRACENTRIFUGATION OF AORTA EXTRACT IN STEPWISE DENSITY GRADIENT

A. V. Popov, A. S. Kuznetsov

N. N. Anichkov Department of Lipid Biochemistry and of Atherosclerosis, Institute of Experimental Medicine, Academy of Medical Sciences of the USSR, Leningrad

As shown by stepwise density gradient ultracentrifugation, atherogenic lipoproteins penetrating into aorta wall, underwent conversions, which were accompanied by alterations in their hydration density. The data obtained suggest that complex formation of lipoproteins with components of connective tissue matrix is one of important steps responsible for conversion of atherogenic lipoproteins in vessel wall.

Л. Ф. Панченко, Т. Ламчингийн, А. М. Герасимов, Ю. С. Суханов,
Л. А. Коноплина

АКТИВНОСТЬ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ КРОВИ ДЕТЕЙ С ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНЫМИ АНЕМИЯМИ

Кафедра биохимии медико-биологического факультета II Московского медицинского института им. Н. И. Пирогова, 1-я гематологическая клиника Центрального института гематологии и переливания крови Министерства здравоохранения СССР, Москва

Исследована активность супероксиддисмутазы в крови детей с различными формами железодефицитных анемий. Установлено, что при всех формах железодефицитных анемий (типичная анемия, инфекционная анемия недоношенных) наблюдается повышение активности фермента, наиболее отчетливо выявляемое при расчете на 1 мг гемоглобина или на 1 млн. эритроцитов. Изменение активности супероксиддисмутазы и содержания гемоглобина в крови при исследованных формах анемии имеют противоположную направленность. Выявлена коррекция между изменением активности супероксиддисмутазы и снижением гемоглобина в крови при анемиях недоношенных.

Недостаточность ферментов, обуславливающих защиту эритроцита от окислительного повреждения так называемыми активными формами кислорода (супероксидным анионом, перекисями, гидроксильным радикалом и др.), рассматривается в настоящее время как возможная причина внутрисосудистого гемолиза или ускоренного разрушения эритроцитов в ретикулоэндотелиальной системе [1, 2]. Наиболее убедительно это доказано в отношении ряда гемолитических анемий, возникающих при генетически обусловленной недостаточности ферментов метаболизма глутатиона [3]. Наряду с этим при наследственной акаталазии не выявлено выраженных гематологических проявлений [4]. Супероксиддисмутаза является одним из главных ферментов антиокислительной защиты клетки [5]. В эритроците этот фермент выполняет специфическую функцию регуляции скорости обратимого превращения оксигемоглобина в метгемоглобин [6]. Можно предполагать, что недостаточность супероксиддисмутазы в эритроцитах должна привести к серьезным нарушениям их структуры, метаболизма и функции. Не исключено, что генетический дефект супероксиддисмутазы является причиной анемий с еще невыясненной этиологией. В литературе отсутствуют сообщения о снижении активности супероксиддисмутазы крови при какой-либо экспериментальной или клинической патологии, за исключением хронической кислородной интоксикации [7] и алиментарной недостаточности меди [8]. Целью настоящей работы было исследование обеспеченности эритроцитов супероксиддисмутазой при различных формах железодефицитных анемий.

М е т о д и к а

Обследовано 85 детей, больных железодефицитными анемиями, в возрасте от 2 мес до 15 лет. Учитывая данные анамнеза, особенности клинического течения настоящего заболевания, а также результаты лабораторного обследования (подсчет гемограмм, гематокритной величины, общего и фракционного содержания белков сыворотки крови методом электрофореза на бумаге), выделяли различные клинические варианты железодефицитных анемий. Среди детей грудного возраста у 32, согласно классификации Л. М. Казаковой [9], была анемия недоношенных, у 37 — инфекционный вариант железодефицитной анемии и у 11 — типичная форма; у 5 детей диагностирована анемия старшего школьного возраста (по классификации Е. Н. Мосьгиной) [10]. Одновременно нами обследованы 2 группы здоровых детей: 9 детей грудного возраста и 8 школьников 14 лет. Активность супероксиддисмутазы определяли, как описано ранее [11]. Определение содержания сывороточного железа и гемоглобина проводили с помощью наборов химических реактивов, выпускаемых фирмой «Ляхема» (ЧССР) и «Реахим» (СССР) соответственно. Корреляцию между величинами отклонения от нормы активности супероксиддисмутазы и содержанием гемоглобина в одной пробе крови оценивали по коэффициенту Спирмена [12].

Результаты и обсуждение

При всех клинических формах заболевания (анемии недоношенных, типичной, инфекционном варианте) наблюдается повышение активности супероксиддисмутазы по сравнению с группой здоровых детей (табл. 1).

Таблица 1

Активность супероксиддисмутазы в крови детей с различными формами железодефицитной анемии

Обследованные дети	Активность фермента			
	на 1 мл крови	на 1 мг гемоглобина	на 1 мл эритроцитов	на 1 млн. эритроцитов
Здоровые	167±8,7 (9)	1,5±0,06 (9)	355±28,2 (9)	23±3,7 (9)
Больные: анемией недоношенных	180±14,9 (32)	2,35±0,12*** (32)	498±54,0* (20)	42±2,1*** (20)
с инфекционным вариантом анемии	212±11,5** (37)	2,14±0,13*** (37)	596±39,0** (18)	55±3,3** (18)
типичной анемией	181±19,8 (11)	2,50±0,11*** (11)	620±79,0** (5)	59±9,2*** (5)

Примечание. Здесь и в табл. 2 одна звездочка — отличие от нормы достоверно при $P < 0,05$, две звездочки — при $P < 0,01$, три звездочки — при $P < 0,001$. В скобках — число обследованных.

Различные способы расчета активности показывают, что при железодефицитных анемиях отмечается не кажущееся повышение, связанное с уменьшением уровня гемоглобина, а истинное, поскольку оно выявляется и при

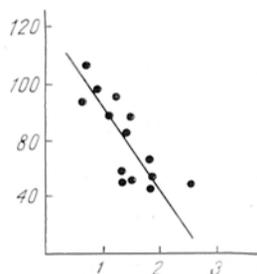
Таблица 2

Активность супероксиддисмутазы в крови детей, больных анемией, в зависимости от ее формы

Форма анемии	Содержание гемоглобина, г%	Число обследованных	Активность фермента	
			на 1 мл крови	на 1 мг гемоглобина
Анемия недоношенных	до 8	22	171±11	2,60±0,20***
	8—9	6	198±36	2,30±0,17*
	>9—10	5	173±43	1,84±0,51
	>10	3	183	1,65
Типичная анемия	до 8	8	203±23	3,0±0,60*
	8—9	4	197±42	2,5±0,15**
	>9—10	4	375	2,0
	>10	4	186±39	1,82
Инфекционная анемия	до 8	11	237±19***	3,50±0,18***
	8—9	8	137±26	1,60±0,30
	>9—10	16	217±22**	2,1±0,02***
	>10	38	225±12***	1,84±0,12

расчете на 1 мл или 1 млн. эритроцитов. Это позволяет заключить, что эритроцит при исследованных формах анемий лучше обеспечен супероксиддисмутазой, чем у здоровых людей. Статистически достоверной разницы между показателями активности фермента при различных клинических вариантах железодефицитных анемий не обнаружено. Удалось выявить зависимость между выраженностью изменения активности супероксиддисмутазы и содержанием гемоглобина (табл. 2). Видно, что взаимосвязь между названными показателями носит обратный характер и отчетливо проявляется при сопоставлении содержания гемоглобина и активности супероксиддисмутазы, рассчитанной на 1 мг гемоглобина. При этом разница активности

супероксиддисмутазы, определяемая на фоне анемии средней тяжести (гемоглобин менее 8 г %), была статистически достоверна во всех группах обследованных больных по сравнению с аналогичным показателем при легкой степени анемии (гемоглобин более 10 г %). Коэффициент ранговой корреляции между величиной разницы активности супероксиддисмутазы у больного от такового в норме и индивидуальным отклонением содержания гемоглобина от нормального значения (11,6 %) в группе детей с анемией недоношенных равнялся 0,45 ($P < 0,005$). Однако при других формах анемий не удалось выявить достоверной по критерию Спирмена корреляции между изменением активности фермента и снижением содержания гемоглобина.



Зависимость между содержанием сывороточного железа и активностью супероксиддисмутазы у детей с инфекционным вариантом анемии.

По оси ординат — содержание железа в сыворотке крови (в мкг %); по оси абсцисс — активность супероксиддисмутазы в расчете на 1 мг гемоглобина.

детей с различными вариантами анемий (инфекционной, недоношенных, типичной) — $87,3 \pm 7,8$, $51,1 \pm 11$, $40,0 \pm 5,7$ мкг % соответственно. Как видно на рисунке, при инфекционной анемии наблюдается обратная зависимость между содержанием сывороточно-

Т а б л и ц а 3

Активность супероксиддисмутазы в крови здоровых детей и у школьников с железодефицитной анемией

Обследованные дети	Содержание гемоглобина, г%	Активность фермента	
		на 1 мл крови	на 1 мг гемоглобина
Здоровые	12,5—14,0	$170 \pm 10,6$	$1,38 \pm 0,012$
Больные железодефицитной анемией	9,4—11,0	$187 \pm 8,49$	$1,97 \pm 0,490$

го железа и активностью супероксиддисмутазы в крови. Исследование активности супероксиддисмутазы у школьников с железодефицитной анемией потребовало введения специальной контрольной группы, для того чтобы исключить возрастные изменения. При сравнении со здоровыми детьми (табл. 3) активность супероксиддисмутазы у больных с этой формой анемии оказалась несколько повышенной.

При железодефицитных состояниях продолжительность жизни эритроцита значительно сокращается [13]. Эритроциты детей с железодефицитными анемиями более чувствительны к гемолизу, индуцируемому перекисью водорода [14], что указывает на наличие при этой патологии определенных нарушений внутриклеточной системы антиокислительной защиты. Действительно, при железодефицитных анемиях снижается активность каталазы и глутатионпероксидазы крови, уменьшается содержание α -токоферола [15, 16]. Наряду с этим активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, глутатионредуктазы и содержание глутатиона повышается [16]. В наших исследованиях выявлено, что железодефицитные эритроциты имеют более высокую активность супероксиддисмутазы. Из этого следует, что недостаточность железа в организме вызывает дисбаланс мощностей компонентов системы антиокислительной защиты клетки. Снижение активности глутатионпероксидазы и каталазы, сочетающееся с повышением активности супероксиддисмутазы, ускоряющей образование перекиси водорода, следует рассматривать как предпосылку к более вероятному повреждению клетки перекисями. Подобное заключение согласуется с повышенной чувствительностью эритроцитов к перекиси водорода *in vitro*, но еще не позволяет рассматривать перекисный механизм повреждения патогенети-

ческим механизмом сокращения жизни эритроцита при железодефицитных состояниях. С другой стороны, высокая активность супероксиддисмутазы эритроцитов со сравнительно укороченным периодом жизни противоречит гипотезе [15] о зависимости продолжительности жизни клеток от их обеспеченности этим ферментом.

Механизм повышения активности супероксиддисмутазы при железодефицитных анемиях неясен. Поскольку кровь перед анализом обрабатывали смесью хлороформа и этанола для удаления гемоглобина, который мешает определению активности супероксиддисмутазы, можно исключить влияние его или каких-либо высокомолекулярных ингибиторов, присутствующих, например, в плазме крови [17]. Также очень маловероятно влияние низкомолекулярных веществ, поскольку кровь для исследования супероксиддисмутазы приходится разводить в сотни раз. Возможность активации супероксиддисмутазы за счет неактивного предшественника не исследована, и такой механизм не может быть исключен. Истинная индукция супероксиддисмутазы в эритроците невозможна в связи с отсутствием в зрелой клетке биосинтеза белков. Наиболее вероятно, что повышение активности супероксиддисмутазы в крови при железодефицитных состояниях обусловлено изменением возрастного состава эритроцитов в сторону преобладания молодых форм, в частности при анемии недоношенных.

Некоторые гемопропротеиды обладают активностью супероксиддисмутазы [18]. Если допустить, что в физиологических условиях в эритроците определенная часть O_2^- обезвреживается гемопропротеидами, то повышение активности супероксиддисмутазы при недостаточности железа в организме представляется функционально выгодной реакцией адаптации клетки к условиям дефицита железосодержащих ферментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Carrell R. W., Winterbourn C. C., Rachmilewitz E. A.—Brit. J. Haemat., 1975, v. 30, p. 259.— 2. Gutteridge J. M. C.—Ann. clin. Biochem., 1976, v. 13, p. 393.— 3. Arnold H., Blume K. G., Lohr G. W.—Haematologia, 1974, v. 8, p. 135.— 4. Takahara S.—In: Genetically Determined Abnormalities of Red Cell Metabolism. New York, 1968, p. 21.— 5. Fridovich I.—Advanc. Enzymol., 1974, v. 41, p. 35.— 6. Winterbourn C. C., McGrath B. M., Carrell R. W.—Biochem. J., 1976, v. 155, p. 493.— 7. Михайлов Ю. Е., Герасимов А. М., Гусев В. А., Брусов О. С.—Бюлл. exper. биол., 1976, т. 82, с. 959.— 8. Williams D. M., Lynch R. E., Lee G. R. et al.—Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1975, v. 149, p. 534.— 9. Казакова Л. М. Железодефицитные анемии у детей раннего возраста г. Кемерово. Автореф. дис. докт. Омск, 1975.— 10. Мосягина Е. Н. Анемия детского возраста. М., 1969.— 11. Брусов О. С., Герасимов А. М., Панченко Л. Ф.—Бюлл. exper. биол., 1976, № 1, с. 33.— 12. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. Л., 1973, с. 44.— 13. Weintraub L. R.—Blood, 1971, v. 37, p. 725.— 14. Melhorn D. K., Gross S., Lake G. A. et al.—Ibid., 1971, v. 37, p. 438.— 15. Maedougall L. G.—J. Pediat., 1972, v. 80, p. 775.— 16. Rodvien R., Gillum A., Weintraub L. R.—Blood, 1974, v. 43, p. 281.— 17. Winterbourn C. C., Hawkins R. E., Brian M. et al.—J. Lab. clin. Med., 1975, v. 85, p. 337.— 18. Kovacs K., Matkovic B.—Enzyme, 1975, v. 20, p. 1.

Поступила 21/III 1978 г.

ACTIVITY OF SUPEROXIDE DISMUTASE IN BLOOD OF CHILDREN WITH IRON DEFICIENCY ANEMIA

L. F. Panchenko, T. Lamchingiy, A. M. Gerasimov, Yu. S. Sukhanov, L. A. Konoplina

Chair of Biochemistry, Medico-Biological Faculty, N. I. Pirogov II Medical School,
1 Hematological Clinic, Central Institute of Hematology and Blood Transfusion,
Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

Activity of superoxide dismutase was studied in blood of children with various types of iron deficiency anemia. The enzymatic activity was increased in all the types of iron deficiency anemia studied (typical form, infectious anemia of premature children). This increase

was especially distinct, when calculation was made per 1 mg of hemoglobin or 1 billion of erythrocytes. Alterations in superoxide dismutase activity and in content of blood hemoglobin were reciprocal in the anemias studied. Correlation was observed between the alteration in the enzymatic activity and a decrease in content of hemoglobin in prematurely born children with anemia.

УДК 612.123/.124.015.3

*Н. В. Перова, Е. Н. Герасимова, Н. П. Чернышева, Н. А. Никитина,
И. А. Щербакова, С. И. Гаджалова, С. Н. Сучкова, В. П. Зыкова,
А. А. Задоя*

ИЗМЕНЕНИЕ АПОПРОТЕИНОВ ЛИПОПРОТЕИДОВ ОЧЕНЬ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ ПЛАЗМЫ КРОВИ ПРИ ГИПЕРТРИГЛИЦЕРИДЕМИИ

Всесоюзный кардиологический научный центр АМН СССР, Москва

Проведено исследование отдельных показателей белково-липидного состава липопротеидов очень низкой плотности при увеличении их концентрации в плазме крови. Количество высокомолекулярного аполипопротеина В и низкомолекулярных аполипопротеинов определяли после фракционирования методами колоночной хроматографии и селективной преципитации тетраметилмочевинной. Показано, что у обследованных мужчин 40—59 лет при гипертриглицеридемии наряду с увеличением количества частиц липопротеидов очень низкой плотности в плазме изменяется их состав: увеличивается содержание низкомолекулярных полипептидов, триглицеридов и холестерина в расчете на весовую единицу апопротеина В. Вместе с тем увеличивается абсолютное содержание в плазме апопротеина В и низкомолекулярных апопротеинов липопротеидов очень низкой плотности. Наибольшие изменения соотношения аполипопротеинов в липопротеидах очень низкой плотности наблюдались при снижении содержания в плазме крови тестостерона — активатора липопротеидлипазы.

Известно, что транспорт липидов в организме, который осуществляется липопротеидами плазмы крови, обусловлен во многом специфической способностью белковых компонентов липопротеидов — апопротеинов — связывать определенные липиды [1, 2]. Поэтому внимание исследователей было обращено на изучение состава, структуры, функциональных свойств аполипопротеинов и их взаимосвязи с нарушениями обмена отдельных классов липопротеидов [3—5]. Особое значение приобретает изучение этих вопросов при нарушениях обмена липопротеидов у лиц с гиперлипидемиями, которые являются патогенетическим звеном атеросклероза. Это обусловлено также появлением данных о том, что характер взаимодействия липопротеидов плазмы с сосудистой стенкой в значительной степени определяется составом их аполипопротеинов. Обнаружено, что белок, входящий в состав липопротеидов низкой плотности (ЛПНП— β -ЛП), и липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП—пре- β -ЛП),—апопротеин В— [6] связывается со специфическими рецепторами на поверхности клеток, а также со специфическими факторами, содержащимися в интиме и меди артерий [7, 8]. При этом холестерин переходит из липопротеидов в состав тканевых мембран и накапливается в них, способствуя последующей пролиферации мембран клеток, в том числе гладких мышечных клеток [9]. Последнее рассматривается в настоящее время как раннее проявление атеросклероза [10].

Удаление холестерина из тканей, в частности из сосудистой стенки, осуществляют липопротеиды высокой плотности (ЛПВП— α -ЛП), белковый состав которых характеризуется отсутствием апопротеина В и наличием апопротеина А в качестве основного белкового компонента [11, 12].

Низкомолекулярные полипептиды группы С входят в состав как ЛПОНП, так и ЛПВП. В процессе метаболизма липопротеидов в плазме крови апопротеины С переходят от ЛПОНП к ЛПВП и в обратном направлении, что соответственно сопряжено с липопротеидлиполизом и поступлением в плазму вновь синтезированных ЛПОНП. Частицы ЛПОНП после ряда

метаболических превращений в кровотоке трансформируются в ЛПНП. вместе с тем весь апопротеин в ЛПОНП переходит в состав ЛПНП [3—5],

Как видно из приведенных данных литературы, обмен апопротеинов ЛПОНП тесно связан с метаболизмом других классов липопротеидов плазмы, в связи с чем целью настоящей работы явилось выяснение особенностей состава апопротеинов ЛПОНП и их соотношения с липидными компонентами при повышении концентрации этих липопротеидов в плазме крови.

М е т о д и к а

Исследованы липопротеиды плазмы 124 мужчин 40—59 лет, проходивших амбулаторное обследование с целью выявления гиперлипидемии. При этом не учитывались эпидемиологические критерии репрезентативности подвыборки, так как в задачу исследования не входило изучение распространенности изменений белкового состава липопротеидов в популяции.

Кровь брали утром после 14—16 ч голодания из локтевой вены в пробирки, содержащие сухую ЭДТА (1 мг на 1 мл крови). Препараты липопротеидов различных классов выделяли методом последовательного препаративного ультрацентрифугирования из 5 мл плазмы крови каждого обследуемого [13].

Содержание общего холестерина и триглицеридов определяли на автоанализаторе АА II фирмы «Техникон» в плазме и в препаратах ЛПОНП, выделенных ультрацентрифугированием. Уровень холестерина α -ЛП в плазме определяли после осаждения β - и пре- β -ЛП гепарином в присутствии хлористого марганца [14].

В отсутствие хиломикронов уровень триглицеридов плазмы отражает преимущественно содержание ЛПОНП. В соответствии с нормами [15] для мужчин старше 40 лет границей между нормальным и повышенным содержанием триглицеридов был принят уровень 160 мг на 100 мл плазмы. Спектр липопротеидов плазмы исследовали методом электрофореза в полиакриламидном геле — в двухслойном варианте (модификация метода Е. Я. Маграчевой) [16].

О содержании липопротеидов отдельных классов судили по уровню холестерина, входящего в состав этого класса липопротеидов в расчете на 100 мл плазмы.

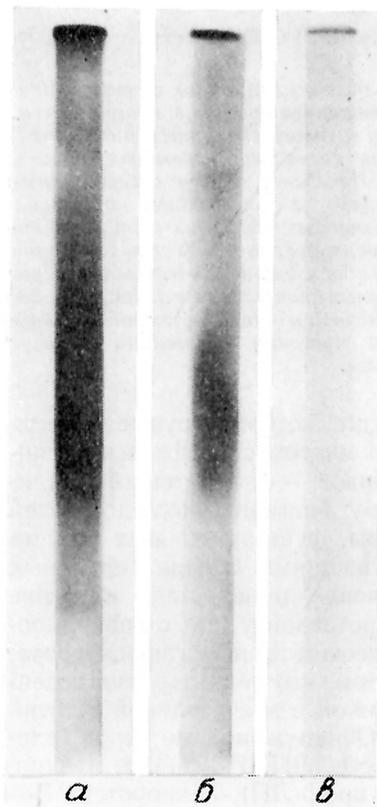


Рис. 1. Диск-электрофореграммы апопротеинов. а — первая фракция элюата белков ЛПОНП; б — делипидированный органическими растворителями апопротеин В из ЛПНП (свидетель); в — первая фракция элюата белков ЛПОНП, обработанных ТММ.

В первой части работы мы использовали классический метод колоночной хроматографии для фракционирования апопротеинов ЛПОНП, с тем чтобы выяснить вопрос, меняется ли при повышении концентрации в плазме ЛПОНП их белковый состав. В связи с поставленной целью перед фракционированием мы объединяли апопротеины ЛПОНП, выделенные от лиц с нормальным содержанием триглицеридов (менее 160 мг на 100 мл плазмы), в первый препарат (I), а апопротеины ЛПОНП от лиц с гипертриглицеридемией (триглицеридов более 160 мг на 100 мл плазмы) — во второй препарат (II).

Апопротеины ЛПОНП выделяли делипидированием органическими растворителями (хлороформ : метанол в соотношении 1 : 1) препаратов ЛПОНП, составленных из 10—20 индивидуальных образцов. Были исследованы три пары (серии А, Б, В) таких смешанных препаратов апопротеинов ЛПОНП. Препараты апопротеинов I и II фракционировали параллельно на двух одинаковых колонках 1,2×100 см с сфадексом G-150 по [17]. Апопротеины элюировали 0,2 М трис-НСl-буфером с добавлением 0,002 М додецилсульфата натрия рН 8,2, скорость элюции 2—4 мл/ч. При этом были получены две основные белковые фракции, качественная идентификация которых была проведена методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле [18, 19] (рис. 1).

В качестве свидетеля апопротеина В служил препарат, полученный делипидацией органическими растворителями ЛПОНП, выделенных в границах плотности $1,019 < d < 1,063 \text{ г/см}^3$, поскольку известно, что 95% его белка представлено апопротеином В [20]. В качестве свидетелей апопротеинов С были использованы стандартные препараты апопротеинов С-I, С-II и С-III, любезно предоставленные нам директором Института сердца и легких США доктором Леви.

Было найдено, что первая элюируемая с колонки белковая фракция дает одну широкую полосу в верхней (начальной) части геля, идентифицируемую как апопротеин В (см. рис. 1, а, б). Подтверждением того, что в первой фракции элюирован апопротеин В, является отсутствие полосы на электрофореграммах препаратов, предварительно обработанных тетраметилмочевинной (ТММ), осаждающей этот белок (см. рис. 1, в). При сравнении диск-электрофореграмм второй элюированной с колонки фракции с диск-электрофореграммами стандартных препаратов апопротеинов С-II и С-III, а также с диск-электрофореграммами делипидированных ТММ-растворимых белков ЛПОНП было показано, что в ее состав входят преимущественно апопротеины группы С (рис. 2).

Во второй части работы исследовали соотношения апопротеинов ЛПОНП, выделенных методом селективной преципитации из ЛПОНП каждого из 124 обследованных мужчин.

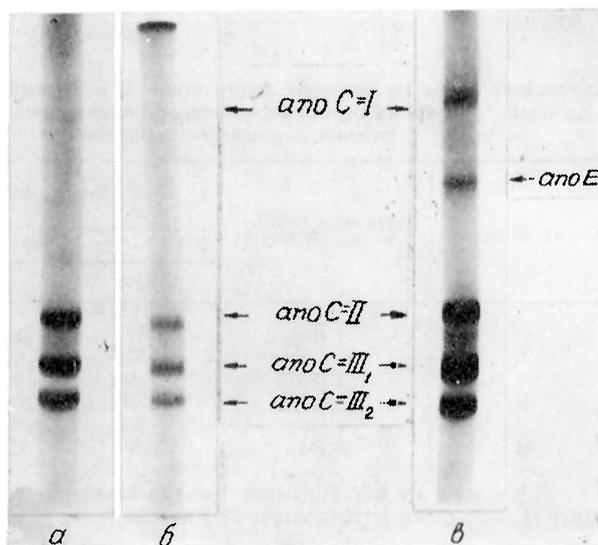


Рис. 2. Диск-электрофореграммы апопротеинов. а — вторая фракция элюата белков ЛПОНП; б — стандарты апопротеинов С-II и С-III; в — делипидированные ТММ-растворимые апопротеины ЛПОНП.

Кроме того, были охарактеризованы при гипертриглицеридемии количественные изменения содержания в плазме апопротеинов отдельных групп, входящих в состав ЛПОНП, а также соотношения этих апопротеинов с липидными компонентами ЛПОНП. Содержание апопротеинов определяли методом Кейна [18, 19], который основан на способности ТММ делипидировать липопротеиды и одновременно селективно осаждают высокомолекулярный апопротеин В. Определение белка в препаратах ЛПОНП, делипидированных хлороформом, дает количество суммарных белков — апопротеинов ЛПОНП, после обработки ТММ — количество растворимых в ТММ низкомолекулярных апопротеинов группы С и обогащенного аргинином апопротеина Е вместе, а разность между результатами этих двух определений есть количество апопротеина В.

В третьей части работы выясняли роль одного из известных активаторов липопротеидлиполиза — тестостерона — в изменении белково-липидного состава ЛПОНП и возможную связь уровня тестостерона в плазме с метаболическими путями развития гиперпребеталинопротеидемии. Содержание тестостерона определяли в плазме 20 мужчин, отобранных из обследованных групп методом случайной выборки (10 мужчин с нормальным уровнем триглицеридов и 10 с гипертриглицеридемией). Тестостерон в плазме крови определяли радиоиммунологическим методом с помощью коммерческих стандартных наборов фирмы «Сорин» (Франция — Италия).

Результаты и обсуждение

Данные по качественной оценке двух основных полученных нами хроматографических фракций апопротеинов ЛПОНП показали, что в первой из них содержится апопротеин В, а во второй — апопротеины группы С.

В табл. 1 представлены результаты количественного определения белка в препаратах апопротеина В и апопротеинов группы С, полученных методом колоночной хроматографии.

При сравнении результатов исследования белкового состава ЛПОНП, полученных в каждой из трех серий колонок, видно, что при гипертриглицеридемии (препараты II) процентное содержание в ЛПОНП апопротеинов С выше, а апопротеина В ниже, чем в ЛПОНП, выделенных из плазмы крови с нормальным уровнем триглицеридов (препараты I). Таким образом, результаты, полученные при исследовании объединенных препаратов апопротеинов ЛПОНП, показали, что гипертриглицеридемия у обследованных мужчин 40—59 лет сопровождается изменением процентного состава апопротеинов В и С в ЛПОНП.

В следующей части работы объектом исследования были апопротеины ЛПОНП, выделенные из плазмы каждого обследованного мужчины. При этом было определено не только процентное соотношение апопротеинов В

Т а б л и ц а 1

Содержание белка во фракции апопротеина В и фракции апопротеина С, элюированных с колонок, при хроматографическом исследовании апопротеинов ЛПОНП плазмы крови мужчин с различным содержанием триглицеридов

Серия колонок	Препарат апопротеинов ЛПОНП	Белок, мг		Содержание от суммарного элюированного белка, %	
		фракция апопротеина			
		В	С	В	С
А	I (10)	1,41	1,86	43	57
	II (13)	2,74	4,75	36	64
Б	I (18)	2,19	4,91	31	69
	II (17)	2,39	10,71	18	82
В	I (20)	5,20	4,63	53	47
	II (14)	3,59	6,00	40	60

П р и м е ч а н и е. Препарат I — триглицериды плазмы <160 мг на 100 мл, препарат II — триглицериды плазмы >160 мг на 100 мл. В скобках — число обследованных.

и С в ЛПОНП, но и содержание апопротеинов, входящих в состав ЛПОНП в расчете на 100 мл плазмы, а также белково-липидные соотношения в ЛПОНП. Из табл. 2 следует, что у мужчин 2-й группы (триглицериды плазмы более 160 мг %) средний уровень общих триглицеридов плазмы в 3,2 раза и холестерина ЛПОНП в 3,4 раза выше, чем у мужчин 1-й группы.

У мужчин с гипертриглицеридемией по сравнению с таковыми контрольной группы было обнаружено снижение содержания холестерина ЛПВП. У обследованных не отличались средний уровень холестерина (ХС) плазмы крови и холестерина ЛПНП, вычисленный по формуле:

$$ХС_{ЛПНП} = ХС_{плазмы} - (ХС_{ЛПОНП} + ХС_{ЛПВП}).$$

В контрольной группе уровень холестерина ЛПНП равнялся 157 мг на 100 мл плазмы, в группе мужчин с гипертриглицеридемией—150 мг на 100 мл плазмы. Различия в спектре липопротеидов плазмы крови в обследованных группах мужчин, выявленные при определении уровней холестерина ЛПОНП и ЛПВП, подтверждаются результатами денситометрии диск-электрофореграмм: в группе мужчин с гипертриглицеридемией процент пре-β-ЛП был выше, в процент α-ЛП — ниже, чем в контрольной.

Таким образом, при использовании селективного осаждения ТММ апопротеина В в каждом образце плазмы обнаружено снижение процента высокомолекулярного апопротеина В и увеличение процента низкомолекулярных ТММ-растворимых полипептидов в составе апопротеинов ЛПОНП у мужчин с гипертриглицеридемией. Аналогичные данные получены при исследовании объединенных препаратов апопротеинов ЛПОНП методом колоночной хроматографии.

Поскольку абсолютное содержание апопротеина В в каждой липопротеидной частице ЛПОНП и ЛПНП есть величина постоянная, то изме-

нение содержания апопротеина В ЛПОНП на 100 мл плазмы отражает изменение именно количества частиц ЛПОНП [20, 21].

Можно полагать, что увеличение содержания апопротеина В ЛПОНП в плазме в группе мужчин с гипертриглицеридемией до $15,5 \pm 1,14$ мг на 100 мл против $8,3 \pm 0,84$ мг на 100 мл в контроле свидетельствует об увеличении количества частиц ЛПОНП в 1,9 раза.

Кроме того, из табл. 2 следует, что в группе с гиперлипопротеинемией имеются нарушения белково-липидного состава ЛПОНП: увеличено отношение холестерина к апопротеину В (в 1,22 раза) и триглицеридов к апопротеину В (в 1,29 раза).

Т а б л и ц а 2

Белково-липидный состав ЛПОНП мужчин 40–59 лет при различном содержании триглицеридов в плазме крови

Показатели концентрации и белково-липидного состава ЛПОНП	1-я группа (77)	2-я группа (47)
Липиды, мг на 100 мл плазмы:		
триглицериды плазмы	$93 \pm 3,6$	$300 \pm 30,3$ $P < 0,001$
холестерин плазмы	$235 \pm 4,7$	$252 \pm 7,1$ $P > 0,1$
холестерин ЛПОНП	$20 \pm 1,0$	$68 \pm 7,8$ $P < 0,001$
холестерин ЛПВП	$58 \pm 2,3$	$34 \pm 1,5$ $P < 0,001$
Спектр липопротеидов, %:		
пре- β -ЛП	$16 \pm 1,1$	$31 \pm 2,1$ $P < 0,01$
β -ЛП	$46 \pm 1,4$	$41 \pm 2,2$ $P > 0,05$
α -ЛП	$38 \pm 1,3$	$28 \pm 1,4$ $P < 0,001$
Белки ЛПОНП:		
апопротеин В, %	$45 \pm 1,5$	$37 \pm 1,23$ $P < 0,001$
ТММ-растворимые аполипопротеины, %	$55 \pm 1,5$	$63 \pm 1,1$ $P < 0,001$
апопротеин В, мг на 100 мл плазмы	$8,3 \pm 0,84$	$15,5 \pm 1,14$ $P < 0,001$
ТММ-растворимые аполипопротеины, мг на 100 мл плазмы	$10,9 \pm 1,38$	$29,1 \pm 3,05$ $P < 0,001$
Отношение липидов к белкам в ЛПОНП:		
триглицериды/апопротеин В	$15,8 \pm 1,12$	$20,5 \pm 1,18$ $P < 0,01$
холестерин/апопротеин В	$3,5 \pm 0,27$	$4,3 \pm 0,28$ $P < 0,05$
триглицериды/ТММ-растворимые аполипопротеины	$12,6 \pm 0,84$	$12,2 \pm 0,82$ $P > 0,1$
холестерин/ТММ-растворимые аполипопротеины	$2,8 \pm 0,19$	$2,6 \pm 0,2$ $P > 0,1$
Отношение ТММ-растворимых белков к апопротеину В в ЛПОНП	$1,4 \pm 0,09$	$1,9 \pm 0,11$ $P < 0,01$

Примечание. Здесь и в табл. 3 в скобках — число обследованных.

Полученные результаты об увеличении при гипертриглицеридемии отношения триглицеридов к апопротеину В в ЛПОНП соответствуют ранее полученным данным [22], что у лиц с IIб и IV типами гиперлипопротеидемии это отношение возрастает до 18,6 и 21,5 против 16,1 в норме, при этом уровень апопротеина В, входящего в состав ЛПОНП, увеличивается до 14,1 и 16,6 на 100 мл плазмы соответственно.

Изменения белково-липидных соотношений в липопротеидах тесно связаны со сложными метаболическими превращениями липопротеидов в плаз-

ме, нарушения которых ведут, в частности, к развитию гиперлипопротеидемии. В плазме крови липопротеидные частицы разных классов обмениваются между собой белковыми компонентами, вместе с которыми переносятся и липиды. В печени и кишечнике синтезируются ЛПОНП, содержащие в качестве белкового компонента макромолекулярный апопротеин В и неполное количество полипептидов группы С [23—25]. В плазме крови к вновь синтезированным ЛПОНП переходят апопротеины С от ЛПВП [26—28]. В кровяном русле происходит гидролиз триглицеридов ЛПОНП под действием фермента липопротеидлипазы периферических тканей, при этом апопротеины С ЛПОНП возвращаются к ЛПВП [21, 28]. Образовавшиеся после гидролиза триглицеридов промежуточные липопротеидные частицы катаболизируют в кровяном русле при участии печеночной липопротеидлипазы и превращаются в ЛПНП, основным белковым компонентом которых является апопротеин В [15, 20, 29].

Обнаруженные нами изменения количества и состава ЛПОНП могут быть следствием как увеличения синтеза обогащенных липидами частиц ЛПОНП, так и абсолютного или относительного снижения процессов трансформации ЛПОНП, которые происходят в кровотоке с участием липопротеидлипаз периферических тканей и печени. Выявленное увеличение относительного содержания апопротеина С наряду с увеличением относительного содержания триглицеридов в ЛПОНП позволяет предполагать, что у мужчин с гиперлипопротеидемией имеется недостаточность первичного гидролиза триглицеридов в ЛПОНП под действием липопротеидлипазы и сопряженная с ней недостаточность перехода апопротеина С от ЛПОНП к ЛПВП. Однако обнаруженное наряду с этим относительное увеличение холестерина в ЛПОНП свидетельствует о накоплении в плазме в границах плотности ЛПОНП также промежуточных липопротеидных частиц, обогащенных холестерином, по-видимому, вследствие недостаточности их катаболизма в печени.

Вероятно, нарушение целого ряда метаболических путей ведет к развитию гипертриглицеридемии, однако одной из очевидных причин является относительная или абсолютная недостаточность активности липопротеидлипазы периферических тканей и печени.

Одним из известных активаторов липопротеидлипазы как периферических тканей, так и печеночной является тестостерон [30]. В предыдущем исследовании [31], проведенном у 227 мужчин 40—59 лет, было показано, что гипертриглицеридемия и соответственно гиперлипопротеидемия встречаются как при низком (менее 465 нг на 100 мл), так и при среднем (от 465 до 750 нг на 100 мл) содержании тестостерона в плазме, хотя при низком уровне тестостерона гипертриглицеридемия была выявлена у большего числа обследованных мужчин (44%), чем при среднем содержании этого гормона (29%).

Определение содержания тестостерона наряду с изучением белково-липидного состава ЛПОНП, проведенного у 10 мужчин с гипертриглицеридемией, показало, что 6 из них имели средние величины содержания тестостерона в плазме крови, а 4 — низкие (табл. 3). Как видно из табл. 3, при гипертриглицеридемии на фоне среднего уровня тестостерона (такого же, как и в контроле) содержание апопротеина В ЛПОНП на 100 мл плазмы было увеличено в 3 раза, тогда как показатели состава ЛПОНП — соотношение холестерина и триглицеридов и белковых компонентов, а также соотношение апопротеинов между собой — оказались неизменными.

Очевидно, в этом случае гипертриглицеридемия является следствием накопления нормальных по составу частиц ЛПОНП, скорее всего из-за их избыточного синтеза в печени.

Напротив, гипертриглицеридемия при низком содержании тестостерона не сопровождалась увеличением содержания в плазме апопротеина В, находящегося в составе ЛПОНП. Следовательно, количество частиц ЛПОНП не было увеличено. Но относительное содержание холестерина и триглице-

ридов, а также низкомолекулярных ТММ-растворимых полипептидов на единицу белка апопротеина В оказалось увеличенным более чем в 2 раза по сравнению с таковым в норме. По всей вероятности, причиной гипертриглицеридемии при низком уровне тестостерона в плазме является недостаточность катаболизма ЛПОНП как на стадии первичного гидролиза триглицеридов, так и на стадии катаболизма промежуточных липопротеидов в пе-

Т а б л и ц а 3.

Белково-липидный состав ЛПОНП мужчин 40—59 лет при различном содержании тестостерона и триглицеридов в плазме крови

Показатели концентрации белково-липидного состава ЛПОНП	1-я группа (10)	2-я группа (6)	3-я группа (4)
Тестостерон, мг на 100 мл плазмы	503±51,1	530±49,0	272±47,3 0,05<P ₁ <0,1 P ₂ <0,01
Липиды, мг на 100 мл плазмы:			
триглицериды плазмы	103±11,7	312±50,5 P ₁ <0,01	311±19,3 P ₁ <0,001
холестерин плазмы	236±13,8	258±37,3	243±3,3
холестерин/ЛПОНП	20±2,4	62±15,5 P ₁ <0,05	67±12,3 P ₁ <0,01
холестерин ЛПВП	69±10,7	35±5,7 P ₁ <0,02	38±3,7 P ₁ <0,02
Спектр липопротеидов, %			
пре-β-ЛП	37±3,7	30±1,8	23±4,9 P ₁ <0,05
β-ЛП	45±4,1	40±5,7	41±3,6
α-ЛП	18±3,6	30±5,7 0,05<P ₁ <0,1	36±6,5 P ₁ <0,05
Белки ЛПОНП, мг на 100 мл плазмы:			
апопротеин В	7,2±1,4	21,1±3,6 P ₁ <0,01	9,0±2,1 P ₁ <0,05
ТММ-растворимые аполипопротеины	8,0±1,6	22,7±6,3 P ₁ <0,05	25,8±6,9 P ₂ <0,05
Отношение липидов к белкам в ЛПОНП:			
триглицериды/апопротеин В	17,0±1,6	13,0±4,5	40,8±11,0 0,05<P ₁ <0,1 0,05<P ₂ <0,1
холестерин/апопротеин В	3,4±0,6	2,7±0,5	8,4±1,3 P ₁ <0,01 P ₂ <0,01
триглицериды/ТММ-растворимые аполипопротеины	17,3±2,2	14,3±4,8	13,7±2,9
холестерин/ТММ-растворимые аполипопротеины	3,1±0,4	2,9±0,5	2,7±0,5
Отношение ТММ-растворимых белков к апопротеину В в ЛПОНП	1,1±0,16	0,9±0,15	3,0±0,6 P ₁ <0,02 P ₂ <0,02

П р и м е ч а н и е. P₁ — достоверность различий по сравнению с 1-й группой. P₂ — достоверность различий по сравнению со 2-й группой.

чени вследствие снижения количества в крови тестостерона—мощного активатора липопротеидлипазы. Следует обратить внимание, что особая роль обогащенных холестерином промежуточных субфракций ЛПОНП в атерогенезе доказана рядом экспериментальных исследований [9, 32].

Таким образом, проведенный анализ белково-липидного состава ЛПОНП не только характеризует способность этих липопротеидов при различном уровне в плазме переносить холестерин или триглицериды в определенных количествах, но и позволяет охарактеризовать те ступени, на которых произошло нарушение транспорта липидов в каждом конкретном слу-

чае. В соответствии с этим по результатам исследований белково-липидного состава липопротеидов можно наметить пути направленного корректирующего воздействия на синтез или отдельные этапы катаболизма ЛПОНП и в соответствии с этим проводить комплекс лечебных мероприятий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Forte T., Gong E., Nichols A. V.—*Biochim. biophys. Acta*, 1974, v. 337, p. 169—183.— 2. Morrisett J. D., Jackson R. L., Gotto A. M.—*Ann. Rev. Biochem.*, 1975, v. 44, p. 183—207.— 3. Fredrickson D. S.—*Harvey Lect.*, 1974, v. 68, p. 185—237.— 4. Jackson R. L., Morrisett J. D., Gotto A. M.—*Physiol. Rev.*, 1976, v. 52, p. 259—316.— 5. Kane J. P.—In: *Lipid Metabolism in Mammals*. Ed. F. Snyder. New York, 1977, v. 1, p. 209—257.— 6. Alaupovic P.—*Atherosclerosis*, 1971, v. 13, p. 141—146.— 7. Goldstein J. L., Brown M. S.—*Arch. Path.*, 1975, v. 99, p. 181—184.— 8. Camejo G., Waich S., Mateu L. et al.—*Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1976, v. 275, p. 153—168.— 9. Bierman E. L., Eisenberg S., Stein O. et al.—*Biochim. biophys. Acta*, 1973, v. 329, p. 163—169.— 10. Jackson R. L., Gotto A. M.—*Atheroscler. Rev.*, 1976, v. 1, p. 1—21.— 11. Stein O., Stein Y.—*Biochim. biophys. Acta*, 1973, v. 326, p. 232—244.— 12. Carew T. E., Koschinsky T., Hayes S. B. et al.—*Lancet*, 1976, v. 19, p. 1315—1317.— 13. Havel R. J., Eder H. A., Bragdon J. H.—*J. clin. Invest.*, 1955, v. 34, p. 1345—1353.— 14. Burstein M., Scholnick H. R.—*Advanc. Lipid Res.*, 1973, v. 11, p. 68—105.— 15. Fredrickson D. S., Levy R. J.—In: *Metabolic Basis of Inherited Disease*. Ed. J. B. Stanbury et al. New York, 1972, p. 545—614.— 16. Маграчева Е. Я.—*Вопр. мед. химии*, 1973, № 6, с. 652—655.— 17. Bown W. V., Levy R. J., Fredrickson D. S.—*J. biol. Chem.*, 1969, v. 244, p. 5687—5694.— 18. Kane J. P.—*Analyt. Biochem.*, 1973, v. 53, p. 350—364.— 19. Kane J. P., Satta T., Hamilton R. L. et al.—*J. clin. Invest.*, 1975, v. 56, p. 1622—1634.— 20. Sigurdsson G., Nicoll A., Levis B.—*Ibid.*, 1975, v. 56, p. 1481—1490.— 21. Eisenberg S.—*Atheroscler. Rev.*, 1976, v. 1, p. 23—63.— 22. Bautovich G. J., Simons L. A., Williams P. F. et al.—*Atherosclerosis*, 1975, v. 21, p. 217—234.— 23. Hamilton R. L.—*Advanc. exp. Med. Biol.*, 1972, v. 26, p. 7—27.— 24. Hamilton R. L., Kayden H. J.—In: *The Liver: Normal and Abnormal Functions (Biochemistry of Disease, v. 5)*. Ed. F. F. Becker. New York, 1974, p. 532—572.— 25. Alexander C. A., Hamilton R. L., Havel R. J.—*J. Cell. Biol.*, 1976, v. 69, p. 241—263.— 26. Eisenberg S., Bilheimer D. W., Levy R. J.—*Biochim. biophys. Acta*, 1972, v. 280, p. 94—104.— 27. Rubinstein B., Rubinstein D.—*J. Lipid Res.*, 1972, v. 13, p. 317—324.— 28. Havel R. J., Kane J. P., Kashyap M. L.—*J. clin. Invest.*, 1973, v. 52, p. 32—38.— 29. Lee D. M., Alaupovic P.—*Atherosclerosis*, 1974, v. 19, p. 501—520.— 30. Ehnholm C., Huttlunen J. K., Kinnunen P. J. et al.—*New Engl. J. Med.*, 1975, v. 292, p. 1313—1317.— 31. Герасимова Е. Н., Бодрова Е. А., Зыкова В. П. и др.—*Кардиология*, 1978, № 3, с. 60—65.— 32. Zilver-smit D. B.—*Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1976, v. 275, p. 138—144.

Поступила 23/III 1978 г.

ALTERATION OF APOPROTEINS OF VERY LOW DENSITY LIPOPROTEINS FROM BLOOD PLASMA IN HYPERTRIGLYCERIDEMIA

N. V. Perova, E. N. Gerasimova, N. P. Chernysheva, N. A. Nikitina, I. A. Scherbakova, S. A. Gadzhalova, S. N. Suchkova, V. P. Zyкова, A. A. Zadaya

All-Union Cardiologic Research Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Some properties of very low density lipoproteins were studied under conditions causing an increase of their concentration in blood plasma. Content of high molecular apolipoprotein B and low molecular lipoproteins were estimated after fractionation using column chromatography and selective precipitation with tetramethylurea. In 216 men (40-59 years old) with hypertriglyceridemia the increase in content of particles of very low density lipoproteins was accompanied by simultaneous alteration in their composition in blood plasma: content of low molecular polypeptides, triglycerides and cholesterol was increased per a weight unit of apoprotein B. At the same time, the absolute content of apoprotein B and of low molecular apoproteins of very low density lipoproteins was increased in blood plasma. The most distinct alteration in the ratio of apolipoproteins to very low density lipoproteins was observed, if content of testosterone — activator of lipoprotein lipase — was decreased in blood plasma.

Н. Ф. Правдина, В. М. Шобухов, Т. В. Веселовская, Н. Р. Смирнова,
Г. А. Галегов

ВЛИЯНИЕ МЕТОТРЕКСАТА НА АКТИВНОСТЬ ДНК-ЗАВИСИМЫХ РНК-ПОЛИМЕРАЗ (А И В) В СЕЛЕЗЕНКАХ МЫШЕЙ, ЗАРАЖЕННЫХ ВИРУСОМ ЛЕЙКОЗА РАУШЕРА, И НА РАЗВИТИЕ ВИРУСИНДУЦИРОВАННОГО ЛЕЙКОЗА

Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского АМН СССР, Москва

Изучено действие метотрексата на развитие лейкоза Раушера и динамику изменения активности РНК-полимераз А и В. Установлено, что метотрексат замедляет течение лейкоза и рост селезенки. Исследование активности ДНК-зависимых РНК-полимераз А и В показало, что в первые дни развития лейкоза активность РНК-полимеразы В увеличивается в 2 раза. При дальнейшем развитии лейкоза наблюдается увеличение РНК-полимеразы А в 5 раз. Метотрексат задерживает активизацию РНК-полимеразы в лейкемических селезенках. На основании корреляции между массой селезенки и уровнем активности РНК-полимераз А и В делается вывод о том, что активность РНК-полимераз является показателем развития лейкоза.

Образование онкорнавирусов является ДНК-зависимым процессом. Это связано с синтезом вирусспецифичной комплементарной ДНК с помощью обратной транскриптазы и функционированием клеточной ДНК-зависимой РНК-полимеразы В, осуществляющей синтез вирионной РНК онкорнавирусов на матрице ДНК [1]. Эти факты обосновывают применение ингибиторов синтеза ДНК для изучения их влияния на продукцию онкорнавирусов клетками и течение вирусиндуцированного лейкоза. Ранее нами были получены данные, указывающие на способность метотрексата (ингибитора антиметаболического типа) подавлять образование вируса лейкоза Раушера в культуре клеток [2]. На этой же вирусной модели *in vivo* нами было показано, что развитие вирусного лейкоза сопровождается прогрессирующим усилением активности ДНК-зависимых РНК-полимераз А и В в изолированных ядрах селезенки. Тем самым было установлено, что возрастающая активность этих энзимов является показателем развития вирусного лейкоза [3, 4].

В связи с этим мы исследовали действие метотрексата на течение вирусного лейкоза Раушера у мышей, динамику активизации РНК-полимераз А и В и влияние метотрексата на активность этих энзимов.

Методика

Работу проводили на модели вируса лейкоза Раушера [3]. Источником вирусосодержащего материала являлся экстракт 10% гомогената селезенки мышей, больных лейкозом. В 1 мл исходной суспензии вируса содержалось 10^7 ЛД₅₀ для мышей линии BALB/c в возрасте 3—4 нед. В опытах с метотрексатом последовательные 10-кратные разведения вируса в растворе Хенкса вводили в объеме 0,3 мл внутрибрюшинно мышам линии BALB/c в возрасте 10 нед.

Исходный маточный раствор метотрексата содержал 5 мг препарата в 2 мл. Препарат вводили внутрибрюшинно в объеме 0,3 мл или подкожно в объеме 0,1 мл. Разовую дозу определяли из расчета 2,5 мкг на 1 г массы. Основная (первая) схема введения была двухразовой: первое введение производили в день заражения внутрибрюшинно, второе — через 3 сут подкожно. Была также испытана вторая схема позднего введения метотрексата: через 3, 6 и 10 сут после заражения подкожно. Оценка действия препарата проводили по проценту мышей, заболевших лейкозом, а также по степени развития лейкозного процесса; с этой целью у зараженных животных определяли медианное время (ЕТ₅₀) пальпации увеличенных селезенки и их массу. Срок наблюдения за животными 4 мес. Статистическую обработку результатов проводили по [5]. РНК-полимеразы А и В были выделены из нормальных и зараженных мышей по методу Шварца и Редера [6] и фракционированы на колонке с ДЭАЭ-сефадексом. Активность РНК-полимеразы определяли в присутствии и отсутствие α-аманитина, низкие концентрации которого (0,5 мкг/мл) специфически ингибируют РНК-полимеразу В.

Состав стандартной пробы (60 мкл): 0,05 М трис-НСl-буфер рН 7,9, 1,7 мМ $MnCl_2$, 1 мМ дитиотреитол, 1 мкКи 3H -ГТФ, по 0,5 мМ УТФ, АТФ, ЦТФ, 100 мкг/мл ДНК, 1 мг/мл бычьего альбумина и $(NH_4)_2SO_4$ в оптимальной концентрации. 20 мкл исследуемого препарата фермента добавляли к 40 мкл раствора субстрата и смесь инкубировали в течение 15 мин при 37°C. По окончании инкубации пробы охлаждали до 4°C, отбирали 50 мкл и наносили на хроматографическую бумагу ватман 3ММ. Радиоактивный предшественник удаляли с помощью нисходящей хроматографии в 5% ТХУ [7]. Счет радиоактивных осадков проводили в толуоловом сцинтилляторе в счетчике «Паккард» (США). За единицу активности фермента принимали включение 1 пмоль 3H -ГМФ в РНК за 15 мин.

В работе были использованы следующие реактивы: метотрексат (фирма «Ледерле», США), АТФ, ЦТФ, УТФ, ДНК, α -аманитин, дитиотреитол (фирма «Калбиохем», США) 3H -ГТФ (удельная активность 2 Ки/ммоль) (фирма «Амершам», Англия), ДЭАЭ-сефадекс А-25 (фирма «Фармация», Швеция).

Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены результаты опытов по испытанию действия метотрексата на развитие лейкоза Раушера. Из табл. 1 видно, что при низкой множественности заражения (разведение вируса 10^{-3} и 10^{-4}) введение ме-

Т а б л и ц а 1
Влияние метотрексата на развитие вирусного лейкоза Раушера у мышей линии BALB/c

Разведе- ние ви- руса	Схема вве- дения мето- трексата	Число мышей		Число заболе- вших, %	Средний срок ги- бели		ET ₅₀ пальпации	
		зараженных	заболевших		дни	P, %	дни	P, %
10 ⁻¹	Контроль	50	50	100	32,5		8,2	—
	Первая	15	15	100	39,0	<95	10,5	<95
10 ⁻²	Контроль	50	50	100	36,8		11,5	—
	Первая	30	30	100	47,5	<95	16,2	<95
10 ⁻³	Контроль	50	50	100	47,4		18,7	—
	Первая	53	51	96,2	54,2	<95	26,5	>95
10 ⁻⁴	Вторая	10	10	100	48	<95	17,3	<95
	Контроль	50	46	92	59,6		28	—
	Первая	40	30	75	65,5	<95	43,4	>95

тотрексата вызывало снижение числа заболевших животных, однако это различие оказалось несущественным. При всех испытанных дозах вируса метотрексат вызывал задержку развития лейкоза, что выражалось как в удлинении периода выживания животных, так и в увеличении инкубационного периода заболевания (ET₅₀ пальпации увеличенных селезенки). Однако различия в сроках гибели животных также оказались недостаточно достоверными ($P < 95\%$).

Существенными оказались различия в продолжительности инкубационного периода лейкоза у животных контрольной группы и у животных, которым вводили метотрексат при низкой множественности заражения (10^{-3} и 10^{-4}). Обращает на себя внимание тот факт, что удлинение ET₅₀ было тесно связано ($r > 0,7$) с дозой вируса: от 2,3 дня при 10^{-1} до 15,4 дня при 10^{-4} . Интересно, что позднее введение метотрексата (через 3, 6 и 10 сут после заражения) не оказывало влияния на сроки развития лейкоза у мышей.

Для оценки влияния метотрексата на увеличение массы селезенки при лейкозе Раушера был поставлен опыт на мышках, которым вводили вирус в разведении 10^{-3} . Мышей для декапитации брали наугад (без предварительной пальпации). Результаты опыта представлены в табл. 2. Из табл. 2 видно, что при испытанной дозе вируса введение метотрексата сопровождалось существенным замедлением развития лейкоза. Во все указанные сроки

(на протяжении 3 нед от момента заражения) масса селезенки мышей, которым вводили метотрексат, была в 2—2¹/₂ раза меньше таковой у мышей контрольной группы.

Ранее нами было показано, что существует корреляция между массой инфицированных селезенок и активностью ДНК-зависимой РНК-полимеразы [3]. Представляло интерес выяснить, сохраняется ли такая зависимость в условиях экспериментально замедленного развития лейкоза, вызванного метотрексатом. С этой целью были исследованы мыши 4 групп. Мыши 1-й группы (контрольной) были незараженными. Мыши 2, 3 и 4-й групп были заражены вирусом лейкоза Раушера. Мышам 4-й группы вводили

Т а б л и ц а 2

Влияние метотрексата на увеличение массы селезенок мышей, зараженных вирусом лейкоза Раушера

День после заражения	Условия эксперимента	Число селезенок	Средняя масса селезенок, г	P, %
11-й	Контроль	10	0,77	>95
	Введение метотрексата	18	0,31	
16-й	Контроль	10	0,95	>95
	Введение метотрексата	10	0,53	
21-й	Контроль	10	1,35	>95
	Введение метотрексата	10	0,55	

П р и м е ч а н и е. Использовали первую схему введения.

метотрексат по первой схеме введения. Через 5 дней после заражения мыши 2-й группы были забиты, к этому времени масса селезенок достигала 0,3—0,35 г. Мыши 3-й и 4-й групп были забиты на 11-й день после заражения, при этом средняя масса селезенок достигала 0,8 и 0,31 г соответственно. Результаты фракционирования РНК-полимераз, выделенных у мышей всех групп, показаны на рисунке и в табл. 3.

В селезенках незараженных мышей (см. рисунок, а) были обнаружены 3 пика активности РНК-полимеразы. Первые 2 пика элюируются с колонки при близких значениях концентрации сульфата аммония (0,11 и 0,14 М), вследствие чего не удается достигнуть их полного разделения. Оба пика нечувствительны к действию α -аманитина и поэтому относятся к РНК-полимеразам класса А (А_I и А_{II} соответственно). Третий четко выраженный пик элюируется при концентрации сульфата аммония 0,23 М. Активность этого фермента полностью подавляется α -аманитином, и фермент может быть отнесен к РНК-полимеразам класса В. Из табл. 3 видно, что в селезенках незараженных мышей РНК-полимеразы А (А_I и А_{II}) и В имеют практически одинаковую активность.

На рисунке б видно, что на ранних стадиях развития лейкоза, через 5 дней после заражения, при массе селезенок 0,3 г (2-я группа) не наблюда-

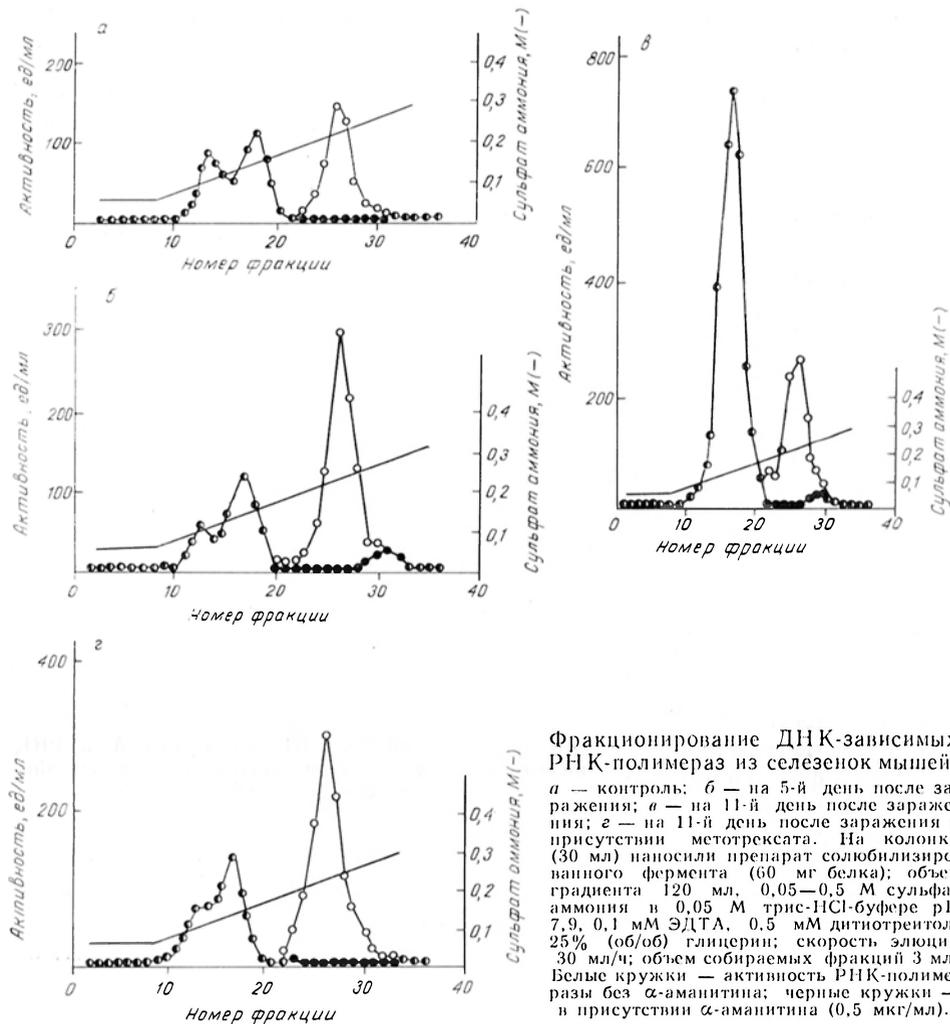
Т а б л и ц а 3

Суммарная активность РНК-полимеразы А и РНК-полимеразы В (в % от общей активности), выделенных на разных стадиях развития лейкоза

Группа животных	День после заражения	РНК-полимераза А	РНК-полимераза В
1-я (контрольная)	1-й	52,9	47,1
2-я (зараженные)	5-й	35,9	64,1
3-я (зараженные)	11-й	75,8	24,2
4-я (зараженные в присутствии метотрексата)	11-й	38,7	61,3

ются изменений хроматографических свойств РНК-полимераз; снова обнаруживаются 3 пика активности — A_I , A_{II} и В. Однако активность РНК-полимеразы В увеличивается почти в 2 раза по сравнению с нормой, составляя около 63% от суммарной активности РНК-полимераз А и В (см. табл. 3). Активность РНК-полимеразы А в этот период не изменяется.

При дальнейшем развитии лейкоза, на 11-й день после заражения, когда масса селезенки достигает 0,8 г (3-я группа, см. рисунок, в), выявля-



Фракционирование ДНК-зависимых РНК-полимераз из селезенки мышей.
а — контроль; *б* — на 5-й день после заражения; *в* — на 11-й день после заражения в присутствии метотрексата. На колонку (30 мл) наносили препарат солиubilизованного фермента (60 мг белка); объем градиента 120 мл, 0,05—0,5 М сульфат аммония в 0,05 М трис-НСI-буфере рН 7,9, 0,1 мМ ЭДТА, 0,5 мМ дитиотреитол, 25% (об/об) глицерин; скорость элюции 30 мл/ч; объем собираемых фракций 3 мл. Белые кружки — активность РНК-полимеразы без α -аманитина; черные кружки — в присутствии α -аманитина (0,5 мкг/мл).

ются всего 2 пика активности. Первый, резистентный к α -аманитину пик элюируется при концентрации сульфата аммония 0,14 М. При этом активность РНК-полимеразы А в 5 раз превышала суммарную активность пиков A_I и A_{II} в селезенках мышей контрольной группы. В этот период на РНК-полимеразу А приходилось уже 75,8% от общей активности. При рехроматографии пика А выявляются обе РНК-полимеразы— A_I и A_{II} , однако 80% от активности приходится на форму A_{II} . По-видимому, на более поздней стадии развития лейкоза наблюдается значительное увеличение активности этого изофермента. Второй пик, который элюируется при фракционировании фермента из селезенки мышей 3-й группы, соответствует РНК-полимеразе В (0,23 М). Активность этого фермента равна активности РНК-полимеразы В на ранней стадии развития лейкоза, т. е. выше в 2 раза по сравнению с нормой и составляет 24,2% от общей активности.

У мышей 4-й группы, которым в день заражения и затем через 3 дня вводили метотрексат, масса селезенок на 11-е сутки после заражения достигала всего 0,31 г (у зараженных мышей, которым не вводили метотрексат, — 0,8 г). В условиях экспериментально замедленного развития лейкоза можно было ожидать, что активность ферментов будет соответствовать таковой на более ранней стадии развития лейкоза. Действительно, элюционный профиль активности РНК-полимеразы в селезенках мышей, которым вводили метотрексат (см. рисунок, *з*), полностью соответствует профилю, который был получен при анализе ферментов из селезенок зараженных мышей на 5-й день инфекции (2-я группа, см. рисунок, *б*). Обнаруживается гетерогенный пик РНК-полимеразы А (A_1 и A_{11}) и увеличенный в 2 раза по сравнению с контролем пик РНК-полимеразы В. Активность РНК-полимеразы А резко отличается от активности этого фермента в селезенках зараженных мышей (см. рисунок, *в*) в тот же срок развития лейкоза.

Однако уменьшение уровня РНК-полимеразы А при введении метотрексата не является результатом его ингибирующего действия на активность фермента. В опытах *in vitro* нами было показано, что при добавлении метотрексата в инкубационную смесь включение 3H -ГМФ в РНК оставалось неизменным.

Таким образом, полученные нами результаты подтверждают и дополняют наши предыдущие исследования о наличии прямой зависимости между массой селезенок и активностью РНК-полимеразы при вирусном лейкозе. Активность РНК-полимеразы В, продуктом синтеза которой наряду с клеточными мРНК является вирусная РНК [1], увеличивается в 2 раза уже на ранних стадиях развития лейкоза. Активность РНК-полимеразы А, синтезирующая рРНК, повышается в 5 раз на более поздних стадиях развития лейкоза. Активизацию этого фермента связывают с интенсивной пролиферацией клеток. Введение метотрексата (ингибитора дигидрофолатредуктазы) вызывает угнетение синтеза тимидиловых нуклеотидов [8]. Таким образом, нарушается синтез ДНК, что влияет как на уровень РНК-синтезирующих ферментов, так и на развитие лейкоза.

На основании изложенных выше результатов наших исследований можно констатировать, что активность РНК-полимераз А и В является показателем развития вирусного лейкоза у мышей, а повышение активности РНК-полимераз в процессе лейкемогенеза связано с усилением синтеза этих ферментов в тканях животных, зараженных онкорнавирусами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rymo L., Coffin J. M., Parsons J. J. et al.— Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1974, v. 71, p. 2782—2786.— 2. Шобухов В. М., Галегов Г. А.— Бюлл. эксп. биол., 1974, № 7, с. 85—86.— 3. Правдина Н. Ф., Шобухов В. М., Никишина В. И. и др.— Биохимия, 1974, № 5, с. 952—955.— 4. Веселовская Т. В., Правдина Н. Ф., Галегов Г. А. и др.— Вопр. вирусол., 1976, № 1, с. 57—62.— 5. Лшмарин И. П., Воробьев А. А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л., 1962.— 6. Schwartz L. B., Sklar V. E. F., Jaehning J. A. et al.— J. biol. Chem., 1974, v. 249, p. 5889—5897.— 7. Weinstein B. J., Bardwaj N., Li H. G.— Analyt. Biochem., 1975, v. 68, p. 62—69.— 8. Bertino J. R.— Cancer Res., 1963, v. 23, p. 1286.

Поступила 4/IV 1978 г.

EFFECT OF METHOTREXATE ON THE ACTIVITY OF DNA-DEPENDENT RNA POLYMERASES A, B IN SPLEEN OF MICE, INFECTED WITH RAUSHER'S LEUKOSIS VIRUS AS WELL AS ON DEVELOPMENT OF VIRUS-INDUCED LEUKOSIS

N. F. Pravdina, V. M. Shobukhov, T. V. Veselovskaya, N. R. Smirnova, G. A. Galegov

D. I. Ivanovsky Institute of Virology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Methotrexate was shown to inhibit development of Rausher's leukosis and growth of spleen. Activity of DNA-dependent RNA polymerases A and B was distinctly altered. The activity of RNA polymerase B was increased two-fold within the first days of the leukosis

development; RNA polymerase A was activated five-fold in the course of subsequent progression of the impairment. Methotrexate inhibited the RNA polymerase activity in leukemic spleens. As suggested by correlation between weight of the spleen and the activity of RNA polymerases A and B, the enzymatic activity may be considered as a marker of the leukosis development.

УДК 616.13-004.6-092.9-07:616.127-008.931:577.152.143

Е. Г. Брусова, Р. С. Кривченкова

НАРУШЕНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ДЕЗАМИНИРОВАНИЯ БИОГЕННЫХ АМИНОВ В СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЕ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ

Лаборатория биохимии аминов и других азотистых оснований Института биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

При экспериментальном атеросклерозе в митохондриальных фракциях сердечной мышцы кроликов и крыс обнаружено статистически достоверное торможение реакций окислительного дезаминирования ряда биогенных аминов. Чувствительность реакций окислительного дезаминирования триптамина к тормозящему действию хлоргиллина не изменялась. После обработки митохондриальных фракций сердечной мышцы здоровых животных препаратами линолевой и линоленовой кислот отмечалось торможение скорости реакций окислительного дезаминирования биогенных аминов.

Реакция окислительного дезаминирования, катализируемая митохондриальными моноаминоксидазами [амин : кислородоксидоредуктаза (дезаминирующая), флавиносодержащая] (КФ 1.4.3.4), является одним из основных путей инактивации биогенных аминов, участвующих в регуляции важнейших функций центральной нервной системы [1]. Нарушения процессов обмена биогенных аминов имеют важное значение в основных патогенетических звеньях развития атеросклеротического процесса (изменение сосудистой проницаемости, развитие гиперлипотеидемии) [2]. В литературе имеются немногочисленные данные, указывающие на снижение активности моноаминоксидазы (субстрат тирамин) в печени, сердце и аорте при экспериментальном атеросклерозе у кроликов [3].

В настоящей работе исследована активность моноаминоксидазы в сердечной мышце животных с различными формами экспериментального атеросклероза.

М е т о д и к а

Опыты проведены на кроликах-самцах породы шиншилла массой 2,5—3,5 кг и беспородных крысах-самцах массой 160—200 г. Сердца животных с экспериментальным атеросклерозом были предоставлены сотрудниками лаборатории биохимии атеросклероза Всесоюзного кардиологического научного центра АМН СССР Е. А. Базановым, В. З. Ланкиным и И. Н. Озеровой.

Кроликов для получения экспериментального атеросклероза содержали на холестеринной диете, проводили электрокоагуляцию ядер гипоталамуса и сочетали эти воздействия [4]. В одной из экспериментальных групп И. Н. Озерова исследовала защитный эффект индуктора микросомальных ферментов — 3-ацетат-16- α -изоотиоцианопрегненолона (АТИЦП) [5]. У крыс гиперхолестеринемию вызывали добавлением к корму холестерина, витамина D₂ и сочетанием холестеринной диеты с витамином D₂ [6].

В опытах были использованы фрагменты митохондриальных мембран, выделенные из замороженных и оттаянных сердец кроликов и крыс в 0,25 М сахарозе, приготовленной на 0,01 М калий-натрий-фосфатном буфере pH 7,4 [7, 8]. Отмытые от части балластных белков [9] 0,01 М калий-натрий-фосфатным буфером митохондриальные фрагменты хранили до начала опытов при —20°C. Содержание белка определяли по методу Лоури с кристаллическим сывороточным альбумином в качестве стандарта.

Для определения активности моноаминоксидазы использовали разработанный нами [10] высокочувствительный флюоресцентный метод, основанный на тушении флюоресценции скополетина (6-метокси-7-окси-кумарин; длина волны возбуждения

350 нм, флюоресценции 460 нм) перекисью водорода, выделяющейся в ходе реакции окислительного дезаминирования аминов в присутствии пероксидазы. Опытные пробы содержали фрагменты митохондриальных мембран сердца кролика или крысы (0,25—1,0 мг белка в зависимости от субстрата и вида животного), пероксидазу (0,05 мг) и 0,1 М калий-натрий-фосфатный буфер рН 7,4 (конечный общий объем проб 5 мл). Пробы преинкубировали в течение 10 мин при 37°C с периодическим покачиванием и охлаждали на льду. Затем добавляли амины в оптимальных концентрациях (см. примечание к табл. 1 и 2) и скополетин (3,4 мкмоль в объеме 0,2 мл); реакцию останавливали погружением проб на ледяную баню. Флюоресценцию проб измеряли на флюориметре, сконструированном на основе ФЭҚ-56 [11].

В опытах по изучению действия ненасыщенных жирных кислот митохондриальные фракции обрабатывали водными дисперсиями линолевой и линоленовой кислот. Предварительно кислоты подвергали окислению путем интенсивного перемешивания кислоты в тонком слое на магнитной мешалке в течение 24 ч при аэробных условиях, затем диспергировали в 0,1 М калий-натрий-фосфатном буфере рН 7,4 (9,0 мл линолевой и 0,9 мг линоленовой кислоты на 1 мл буфера). В экспериментальные пробы (общий объем 5—10 мл) на 1 мг белка митохондрий добавляли 0,84 мкмоль окисленной линолевой или 0,16 мкмоль окисленной линоленовой кислоты. Пробы инкубировали в течение 10 мин при 37°C, затем диализовали против 10-кратного объема 0,01 М калий-натрий-фосфатного буфера рН 7,4 в течение 4 ч, сменяя буферный раствор трижды. В обработанных таким образом митохондриальных фракциях определяли скорость окислительного дезаминирования аминов.

В работе были использованы субстраты: хлоргидраты триптамина (фирма «Шухардт», ФРГ), бензиламина и β-фенилэтиламина (отечественного производства); ингибиторы моноаминоксидазы: N-(2,4-дихлорфенокси)-пропил-N-метил-2-пропиниламин·НСl (фирма «Хлоргилин, Мей и Бейкер», Англия), N-1-фенил-изопропил-N-метил-2-пропинил-амин·НСl (депренил, предоставлен д-ром Кноллем, Венгрия); скополетин (фирма «Флюка», Швейцария); пероксидаза из хрена (фирма «Реанал», Венгрия); линолевая и линоленовая кислоты (отечественного производства).

Результаты и обсуждение

После содержания кроликов на холестериновой диете в течение 90 дней удается обнаружить статистически достоверное снижение активности митохондриальных моноаминоксидаз в сердечной мышце при использовании в качестве субстрата триптамина (табл. 1, группа 2); в опытах с β-фенилэтиламином и бензиламином в качестве субстратов активность моноаминоксидазы изменена не была (см. табл. 1, группы 2 и 5). Электрокоагуляция ядер гипоталамуса вызывала аналогичные изменения (см. табл. 1, группа 3). При сочетании холестериновой диеты с электрокоагуляцией ядер гипоталамуса отмечалось статистически достоверное снижение скорости окислительного дезаминирования всех исследованных аминов (см. табл. 1, группа 4). Наблюдаемое снижение скорости окислительного дезаминирования аминов в митохондриальной фракции сердечной мышцы связано, по-видимому, в первую очередь с нарушением проницаемости мембран, отмечающимся при самых различных воздействиях на животных, например при скармливании им холестерина [12] или при электрокоагуляции ядер гипоталамуса [4].

Введение АТЦП не влияло на скорость реакции окислительного дезаминирования аминов (см. табл. 1, группа 6). Известно, что индуктор микросомальных ферментов АТЦП снижает содержание холестерина в крови животных при гиперхолестеринемии [5]. В связи с этим можно было предположить, что введение АТЦП животным, находящимся на холестериновой диете, могло бы защитить их от развития атеросклеротического процесса и нормализовать нарушенные процессы окислительного дезаминирования аминов. Однако в наших опытах сочетание холестериновой диеты с введением АТЦП вызвало резкое снижение скорости окислительного дезаминирования аминов (см. табл. 1, группа 7). Возможные причины этого явления в настоящей работе изучены не были.

При содержании крыс на холестериновой диете в течение 30 дней скорость окислительного дезаминирования β-фенилэтиламина, бензиламина и триптамина в сердечной мышце статистически достоверно снижалась (табл. 2, группа 2). Такое же снижение скорости окислительного дезаминирования аминов отмечено при содержании крыс на диете с ви-

Т а б л и ц а 1

Нарушение окислительного дезаминирования аминов в митохондриальной фракции сердечной мышцы кроликов при экспериментальном атеросклерозе

№ группы животных	Условия опыта	Скорость окислительного дезаминирования аминов			
		β -фенилэтиламин	бензиламин	триптамин	гистамин
1	Контроль	$7,1 \pm 0,4$ (5)	$0,46 \pm 0,05$ (5)	$0,18 \pm 0,02$ (5)	—
2	Холестериновая диета (добавление холестерина к корму по 0,2 мг/кг в течение 90 дней)	$6,6 \pm 0,6$ (6)	$0,36 \pm 0,04$ (6)	$0,1 \pm 0,02$ (6)	—
3	Р Электрокоагуляция ядер гипоталамуса [4]	$7,0 \pm 1,2$ (4)	$0,37 \pm 0,05$ (4)	$0,11 \pm 0,02$ (4)	—
4	Р Сочетание холестериновой диеты с электрокоагуляцией ядер гипоталамуса	$5,3 \pm 0,6$ (5)	$0,29 \pm 0,03$ (5)	$0,09 \pm 0,02$ (5)	—
	Р	$< 0,05$	$< 0,05$	$< 0,05$	
1а	Контроль	$2,5 \pm 0,04$ (4)	$0,1 \pm 0,01$ (4)	$0,12 \pm 0,009$ (4)	0,15, 0,28 (2)
5	Холестериновая диета (добавление холестерина к корму по 0,2 мг/кг в течение 90 дней)	$2,5 \pm 0,02$ (3)	$0,08 \pm 0,009$ (3)		0 (2)
6	Введение АТЦП (водная эмульсия 150 мг/мл, перерыв в течение 5 дней, перерыв 7 дней, курс 3 мес)	$2,6 \pm 0,2$ (4)	$0,09 \pm 0,009$ (4)	$0,13 \pm 0,01$ (4)	0,19, 0,1 (2)
7	Сочетание холестериновой диеты с введением АТЦП	$0,77 \pm 0,1$ (4)	$0,06 \pm 0,004$ (4)	$0,02 \pm 0,01$ (4)	0 (2)
	Р	$< 0,001$	$< 0,05$	$< 0,01$	

Примечание. Здесь и в табл. 2: 1—контроль к группам 2—4, 1а — контроль к группам 5—7. Скорость окислительного дезаминирования аминов выражена в наномолях H_2O_2 на 1 мг белка за 1 мин (в опытах с β -фенилэтиламином и гистамином — за 12 мин). Состав проб: 0,2—0,3 мг белка митохондрий в опытах с β -фенилэтиламином ($1 \cdot 10^{-4}$ М) и бензиламином ($5 \cdot 10^{-3}$ М), 0,4—0,6 мг с триптамином ($1 \cdot 10^{-4}$ М), 1,0 мг с гистамином ($5 \cdot 10^{-4}$ М). Длительность инкубации 12, 10, 6 и 12 мин соответственно. Здесь и в табл. 2 в скобках — число опытов.

Таблица 2

Нарушение окислительного дезаминирования аминов в митохондриальной фракции сердечной мышцы крыс при гиперхолестеринемии

№ группы животных	Условия опыта	Скорость окислительного дезаминирования аминов				
		β -фенилэтиламин	бензиламин	триптамин	гистамин	путресцин
1	Контроль	6,1±0,5 (8)	0,08±0,006 (8)	0,64±0,06 (7)	—	—
2	Холестериновая диета (добавление к корму 0,5% холестерина в течение 30 дней) P	3,0±0,3 (4) <0,001	0,03±0,004 (4) <0,001	0,38±0,04 (7) <0,01	—	—
3	Диета с добавлением витамина D ₂ (60 000 ME) P	3,3±0,5 (8) <0,01	0,05±0,007 (5) <0,05	0,45±0,007 (8) <0,01	—	—
4	Сочетание холестеринной диеты (группа 2) с витамином D ₂ P	2,5±0,05 (5) <0,001	0,06±0,003 (4)	0,42±0,004 (8) <0,01	—	—
1a	Контроль	3,0±0,35 (4)	0,022±0,002 (4)	0,34±0,04 (4)	0,2±0,03 (8)	0,123±0,08 (6)
5	Холестериновая диета (добавление к корму 0,5% холестерина в течение 15—20 дней) P	2,65±0,22 (4)	0,025±0,004 (4)	0,25±0,04 (4) <0,005	0,14±0,05 (8) >0,05	0 (6)
6	Диета с добавлением витамина D ₂ (60 000 ME) P	1,78±0,33 (6) <0,05	0,025±0,002 (6)	0,22±0,03 (6) <0,05	0,19±0,05 (10)	0 (8)
7	Сочетание холестеринной диеты (группа 5) с витамином D ₂ P	2,7±0,04 (4)	0,033±0,003 (4) <0,05	0,33±0,04 (4)	0,19±0,07 (8)	0 (6)

Примечание. Скорость окислительного дезаминирования аминов выражена в наномолях H₂O₂ на 1 мг белка за 1 мин (в опытах с β -фенилэтиламином, гистамином и путресцином — за 12 мин). Состав проб: 0,2—0,3 мг белка митохондрий в опытах с β -фенилэтиламином ($1 \cdot 10^{-4}$ M), 0,4—0,5 мг с триптамином ($5 \cdot 10^{-4}$ M), 1 мг с бензиламином ($1 \cdot 10^{-3}$ M), гистамином ($5 \cdot 10^{-4}$ M) и путресцином ($5 \cdot 10^{-4}$ M). Длительность инкубации 12, 6, 10, 12 и 12 мин соответственно.

Т а б л и ц а 3
Влияние линолевой и линоленовой кислот на скорость окислительного дезаминирования аминокислот в митохондриальных фракциях сердечной мышцы кролика и крысы

Амин	Контроль крысы	В присутствии кислоты		Контроль кролик	В присутствии кислоты	
		линолевой	линоленовой		линолевой	линоленовой
β -Фениламин	4,9±0,4 (25)	2,6±0,22 (21)	5,1±0,06 (5)	10,7±0,98 (8)	6,9±1,3 (4)	8,4±0,46 (4)
Бензиламин	0,13±0,02 (5)	<0,001 0,08±0,009 (5)	0,075, 0,098 (2)	0,6±0,07 (6)	<0,05 0,47±0,1 (4)	<0,1 0,36, 0,35 (2)
Триптамин	0,82±0,1 (5)	<0,05 0,55±0,016 (4)	0,77, 0,8	0,23±0,02 (6)	>0,1 0,15±0,015 (4)	0,2, 0,18 (2)
Гистамин	0,18±0,11 (8)	>0,1 0 (8)	0,22, 0,29	0,23±0,02 (8)	<0,02 0,17±0,06 (4)	0 (4)
Путресцин	0,1±0,005 (12)	0 (12)	0 (5)	—	>0,1 —	—

Примечание. Состав проб и условия проведения опытов см. в методике, величины, в которых выражена скорость окислительного дезаминирования аминокислот, — в примечании к табл. 1 и 2.

тамином D₂ (см. табл. 2, группа 3) и при сочетании холестериновой диеты с витамином D₂ (см. табл. 2, группа 4). Добавление витамина D₂ к диете приводит к увеличению содержания триглицеридов и фосфолипидов в плазме [13], индуцирует свободнорадикальные процессы в мембранах [6], что способствует развитию атеросклеротического процесса.

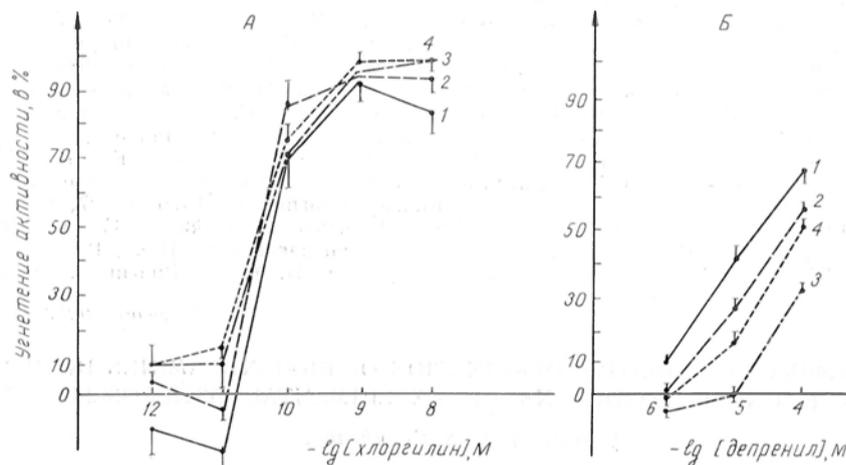
На более ранних стадиях развития атеросклеротического процесса (холестериновая диета в течение 15—20 дней) дезаминирование аминов, являющихся субстратами моноаминоксидазы, снижалось в сердечной мышце менее резко (см. табл. 2, группы 5 и 6), а при сочетании холестериновой диеты с добавлением витамина D₂ (см. табл. 2, группа 7) отмечалась стимуляция окислительного дезаминирования бензиламина.

Таким образом, по нашим данным, лишь уже развившийся атеросклеротический процесс у крыс и кроликов сопровождался снижением активности моноаминоксидазы (субстраты — β -фенилэтиламин, бензиламин, триптамин) в сердце.

Как следует из данных, представленных в табл. 1 и 2, митохондрии сердечной мышцы кролика в норме обладают свойством дезаминировать гистамин, а митохондрии сердца крысы — дезаминировать гистамин и путресцин, хотя скорость этих реакций очень незначительна и составляет 4—8% от скорости реакции окислительного дезаминирования β -фенилэтиламина. В пробах с кадаверином в качестве субстрата в присутствии митохондрий сердца кролика и крысы нерегулярно обнаруживалась лишь следовая активность. При экспериментальном атеросклерозе у кроликов свойство дезаминировать гистамин митохондриальными фрагментами сердечной мышцы было подавлено полностью (см. табл. 1, группы 5 и 7).

При гиперхолестеринемии у крыс дезаминирование путресцина митохондриальными фрагментами сердечной мышцы было подавлено полностью, а скорость дезаминирования гистамина изменена не была (см. табл. 2, группы 5—7).

В соответствии с данными, изложенными выше, находятся результаты, которые были получены нами в опытах *in vitro* после обработки митохондриальных мембран сердечной мышцы кролика и крысы водными дисперсиями окисленных линолевой и линоленовой кислот, тканевая концентрация которых при атеросклерозе возрастает [2]. Наряду с торможением указанными высшими непредельными жирными кислотами реакций окислительного дезаминирования β -фенилэтиламина, бензиламина и трипта-



Торможение хлоргилином и депренилом активности моноаминоксидаз митохондриальных мембран сердца крыс с экспериментальной гиперхолестеринемией.

Из тканей сердечной мышцы выделяли митохондриальные фракции и хранили при -20°C . Пробы (конечный объем 5 мл) содержали 0,4—0,5 мг белка митохондрий, 0,05 мг пероксидазы, хлоргелин в различных концентрациях и 0,1 М калий-натрий-фосфатный буфер pH 7,4. После 10 мин преинкубации при 37°C в пробы добавляли триптамин ($5 \cdot 10^{-4}$ М) и скополетин (3,4 нмоль в объем 0,2 мл) и инкубировали в течение 6 мин при 37°C . После охлаждения на льду в пробах измеряли интенсивность флуоресценции. А — действие хлоргилина; Б — действие депренила. 1 — контроль; 2 — холестериновая диета (см. табл. 2, группа 2); 3 — диета с добавлением витамина D_2 (см. табл. 2, группа 3); 4 — холестериновая диета + витамин D_2 (см. табл. 2, группа 4). Представлены арифметические значения и средние ошибки средних арифметических по данным 4 опытов.

мина отмечалось торможение реакций дезаминирования гистамина и путресцина при их инкубации в присутствии митохондрий сердечной мышцы кролика и крысы (табл. 3).

Помимо исследований активности митохондриальных моноаминоксидаз в сердечной мышце (субстраты — β -фенилэтиламин, бензиламин, триптамин) у крыс с экспериментальной гиперхолестеринемией, у этих же животных *in vitro* было изучено действие двух избирательных необратимых ингибиторов моноаминоксидаз — хлоргилина и депренила. Как известно, использование этих ингибиторов позволило выявить наличие двух типов моноаминоксидаз в тканях. Моноаминоксидазы типа А высокочувствительны к тормозящему действию хлоргилина, моноаминоксидазы типа Б более чувствительны к тормозящему действию депренила [14, 15]. Митохондриальные фрагменты сердечной мышцы крысы содержат в основном моноаминоксидазы типа А [10, 16]. В проведенных нами опытах показано, что по чувствительности к тормозящему действию хлоргилина митохондриальные моноаминоксидазы из сердечной мышцы крыс с гиперхолестеринемией не отличались от моноаминоксидаз митохондриальной фракции из сердечной мышцы контрольных животных (см. рисунок, А). Таким образом, несмотря на снижение активности моноаминоксидазы при гипер-

холестеринемии, свойства моноаминоксидаз сердечной мышцы, характеризующие их принадлежность к моноаминоксидазам типа А, изменены не были. Торможение депренилом активности моноаминоксидаз в сердечной мышце животных с экспериментальным атеросклерозом выражено несколько слабее по сравнению с таковой в норме (см. рисунок, Б).

ЛИТЕРАТУРА

1. Горкин В. З.— Ж. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева, 1971, т. 16, № 4, с. 454—461.— 2. Герасимова Е. Н.— Вопр. мед. химии, 1975, № 5, с. 563—576.— 3. Кароог Н. К., Nityanand S.— Indian J. exp. Biol., 1970, v. 8, p. 273—274.— 4. Чернышева Г. В., Марцевич М. С., Лебедева Л. Н. и др.— Пат. физиол., 1976, № 5, с. 35—40.— 5. Салганик Р. И., Мананкова Н. М., Семенова Л. А.— Вопр. мед. химии, 1977, № 4, с. 468—473.— 6. Спиричев В. Б., Газдаров А. К., Баркова Л. В. и др.— В кн.: Биоантиокислители. М., 1975, с. 92—95.— 7. Maistergergen M., Comte G., Gautheron D. C.— Biochim. biophys. Acta, 1974, v. 367, p. 115—126.— 8. Schneider W. S.— J. biol. Chem., 1948, v. 176, p. 259—266.— 9. Горкин В. З., Веревкина И. В.— Вопр. мед. химии, 1963, № 3, с. 315—317.— 10. Кривченкова Р. С., Бруслова Е. Г.— Там же, 1977, № 6, с. 834—840.— 11. Пеккель В. А.— Лабор. дело, 1977, № 5, с. 313—314.— 12. Ланкин В. З., Котелевцева К. В., Тихазе А. К. и др.— Вопр. мед. химии, 1976, № 4, с. 513—517.— 13. Testa R., Canestrini S., Olbani S.— J. Pharm. Pharmacol., 1975, v. 27, p. 699—700.— 14. Johnston G. P.— Biochem. Pharmacol., 1968, v. 17, p. 1285—1297.— 15. Jang H. J., Neff N. H.— J. Pharmacol. exp. Ther., 1973, v. 187, p. 365—371.— 16. Lyles G. A., Callingham B. A.— J. Pharm. Pharmacol., 1975, v. 27, p. 682—691.

Поступила 10/IV 1978 г.

IMPAIRMENT OF OXIDATIVE DEAMINATION OF BIOGENIC AMINES IN HEART MUSCLE UNDER CONDITIONS OF EXPERIMENTAL ATHEROSCLEROSIS

E. G. Brusova, R. S. Krivchenkova

Laboratory of Biogenic Amines and Other Nitrogenous Bases, Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Statistically significant inhibition of oxidative deamination of several biogenic amines was found in mitochondrial fraction of heart muscle from rabbits and rats with experimental atherosclerosis and hypercholesterolemia, caused by various methods. Sensitivity of oxidative deamination of tryptamine to inhibitory effect of clorgyline (selective inhibitor of mitochondrial monoamine oxidases) was unaltered in rats with experimental hypercholesterolemia. The rate of oxidative deamination of β -phenyl ethylamine, tryptamine, benzylamine as well as histamine and putrescine was inhibited after treatment of the mitochondrial fragments from healthy rabbit and rat heart muscles with preparations of oxidized linoleic and linolenic acids, concentration of which was increased in tissues under conditions of atherosclerosis.

УДК 612.128:577.152.31

И. Б. Солитернова, Н. Г. Никульчева

АКТИВНОСТЬ ПОСТГЕПАРИНОВОЙ ЛИПОПРОТЕИДЛИПАЗЫ ПЛАЗМЫ КРОВИ КРОЛИКОВ

Отдел биохимии липидов и атеросклероза им. Н. Н. Аничкова Института экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград

В опытах на кроликах изучали активность липопротеидлипазы плазмы крови кроликов после введения гепарина в дозе 50 ЕД на 1 кг массы. Для дифференциации ее от печеночной триглицеридлипазы добавляли NaCl в инкубационную среду в конечной концентрации 1 М. Установлено, что NaCl оказывает сильное ингибирующее влияние на липолитическую активность постгепариновой плазмы крови кроликов, иногда устраняя ее полностью. Это свидетельствует о преобладании в общей липолитической активности постгепариновой плазмы крови кроликов липопротеидлипазы, чувствительной к NaCl. В исследованиях на кроликах, получавших с кормом холестерин, были обнаружены незначительные изменения в величине общей липолитической активности и таковой, обусловленной липопротеидлипазой. В этих условиях не происходило также заметного повышения уровня триглицеридлипазы, устойчивой к NaCl.

Известно, что катаболизм хиломикронов и липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП), являющихся основной транспортной формой экзогенных и эндогенных триглицеридов, осуществляется липолитическими ферментами, прежде всего липопротеидлипазой — ЛПЛ (КФ 3.1.1.3) [1—4]. Этот фермент, впервые подробно охарактеризованный Корном [5, 6], а затем — и другими авторами [7—10], содержится главным образом в жировой ткани, скелетных и сердечных мышцах, лактирующей молочной железе. Исходная активность ЛПЛ в плазме крови низка, и она значительно возрастает в ответ на введение гепарина в связи с освобождением мембраносвязанного энзима и выходом его в кровь. При этом возрастает активность и других липаз, в том числе печеночной триглицеридлипазы (ПТГЛ), которая открыта сравнительно недавно [11—18]. Некоторые авторы рассматривают ЛПЛ и ПТГЛ как изоферменты триглицеридлипазы (ТГЛ) [19, 20], однако ЛПЛ и ПТГЛ существенно различаются как оптимумом рН и субстратной специфичностью, так и отношением к активаторам и ингибиторам. Так, ЛПЛ активируется добавлением либо сыворотки, либо апопротеина С-II, в то время как ПТГЛ активна и в их отсутствии [21]. ЛПЛ действует преимущественно на триглицериды интактных хиломикронов и ЛПОНП, субстратом же для ПТГЛ являются так называемые ремнантные частицы, образующиеся после воздействия ЛПЛ на хиломикроны и ЛПОНП. В отличие от последней ПТГЛ слабо действует на интактные хиломикроны и ЛПОНП [11, 22, 23].

К настоящему времени активность указанных энзимов постгепариновой плазмы крови, а также тканей человека и некоторых видов животных изучена достаточно подробно как в норме, так и при патологии. Однако в доступной нам литературе мы не нашли характеристики ЛПЛ плазмы кроликов. Между тем выяснение этого вопроса представляет определенный интерес с точки зрения изучения биохимических механизмов развития гиперлипидемии у кроликов при скормливании им холестерина, поскольку именно эта модель нашла широкое применение для изучения морфо- и патогенеза атеросклероза в условиях эксперимента.

Целью данного исследования явилось изучение активности ЛПЛ постгепариновой плазмы кроликов. Известно, что активность ЛПЛ в отличие от ПТГЛ избирательно тормозится высокими концентрациями NaCl (0,75 и 1 М) [9, 12, 21, 24]. Это свойство фермента было использовано в данной работе для определения активности истинной ЛПЛ в постгепариновой плазме кроликов.

М е т о д и к а

Опыты проводили на кроликах-самцах массой 2,5—3,5 кг. Животные получали обычный рацион. Кровь брали утром патошак до и через 10 мин после внутривенного введения гепарина кроликам, голодавшим в течение 16—17 ч. Кровь собирали в пробирки, содержащие 1% раствор цитрата натрия. Как известно, для активации липолитических энзимов применяются различные дозы гепарина (от 10 до 100 ЕД и более на 1 кг массы). Нами были испытаны на кроликах дозы гепарина, равные 20, 50 и 100 ЕД на 1 кг массы. Оказалось, что эффект от применения гепарина в дозе 20 ЕД/кг был не очень стабильным, а введение 50 и 100 ЕД/кг давало сходные результаты. В связи с этим в дальнейших опытах использовали гепарин в дозе 50 ЕД/кг.

Активность ЛПЛ определяли по методу [25] с некоторыми модификациями: общий объем инкубационной среды был уменьшен до 1,1 мл, но с сохранением соотношения основных ингредиентов среды (2 объема 20% альбумина, 1 объем 0,7 М трис-буфера рН 8,2, 1 объем смеси интралипида с сывороткой крысы в отношении 1 : 1, 1 объем дистиллированной воды). К 1,0 мл среды добавляли 0,1 мл цитратной плазмы крови. Для определения незэтерифицированных жирных кислот (НЭЖК) отбирали 0,05 мл инкубационной среды. Интралипид предварительно инкубировали с сывороткой крови крысы в течение 30 мин при 37°C при постоянном встряхивании. Липолитическую активность определяли в пробах до и после инкубации их в течение 1 ч при 37°C по приросту количества НЭЖК и выражали в микромолях НЭЖК на 1 мл плазмы за 1 ч. Концентрацию НЭЖК определяли по [26]. Об активности ЛПЛ судили по разнице между общей липолитической активностью плазмы без NaCl и после его добавления до конечной концентрации 1 М. Так как некоторые

авторы для дифференцирования ЛПЛ и ПТГЛ использовали протамина сульфат [14, 15, 27], то в некоторых опытах наряду с NaCl был применен протамина сульфат в конечной концентрации 5 мг/мл.

В качестве стандарта при определении НЭЖК использовали 2 мМ раствор стеариновой кислоты. Измерение против контрольных проб проводили при 550 нм на СФ-16.

Результаты и обсуждение

На рисунке видно, что в плазме крови кроликов определяется достаточно высокая общая липолитическая активность после введения гепарина ($14,82 \pm 1,47$ мкМ НЭЖК на 1 мл/ч), которая значительно превышает исходную активность, определенную в плазме до введения гепарина ($0,66 \pm 0,14$ мкМ НЭЖК на 1 мл/ч).

Если в среду инкубации вводится NaCl, то в большинстве опытов активность снижается очень резко, во многих случаях до нуля. Интересно отметить, что при меньшей концентрации NaCl наблюдается и более слабое ингибирующее влияние.

Как видно из рисунка, при концентрации NaCl 0,5 М в инкубационной среде остаточная активность равна $0,70 \pm 0,18$ мкМ/мл/ч, что составляет в среднем только 4,7 % от общей липолитической активности. Ингибирующее действие протамина сульфата проявляется также отчетливо и статистически значимо, но оно выражено в более слабой степени, чем у NaCl.

Полученные данные позволяют говорить о том, что практически вся липолитическая активность постгепариновой плазмы кроликов обусловлена ЛПЛ, так как именно активность этого энзима угнетается 1 М NaCl. С целью сравнения мы провели аналогичные исследования с постгепариновой плазмой человека, активность ТГЛ которой обусловлена в основном двумя ферментами — ЛПЛ и ПТГЛ. В этих опытах использовали постгепариновую плазму больных ишемической болезнью сердца, полученную утром натощак через 14—16 ч после последнего приема пищи. Гепарин вводили внутривенно в дозе 20 ЕД/кг за 10 мин до взятия крови. Результаты этих определений также представлены на рисунке.

Влияние NaCl и протамина сульфата на липолитическую активность постгепариновой плазмы крови кролика и человека. 1 — липолитическая активность плазмы крови до введения гепарина; 2 — то же после введения гепарина; 3 — то же после введения гепарина при добавлении NaCl (конечная концентрация 1 М); 3а — то же после введения гепарина при добавлении NaCl (конечная концентрация 0,5 М); 4 — то же после введения гепарина при добавлении протамина сульфата (5 мг/мл).

Из рисунка видно, что после добавления NaCl в среду инкубации (конечная концентрация 1 М) липолитическая активность в среднем по группе обследованных лиц снижалась в 6 раз, тогда как у кроликов — в 80 раз. После добавления протамина сульфата липолитическая активность у людей уменьшилась в 4 раза, в то время как у кроликов — в 11 раз.

Таким образом, в этих опытах выявилось различное по эффективности действие NaCl и протамина сульфата на липолитическую активность постгепариновой плазмы кролика и человека. Добавим к этому, что величина остаточной активности в плазме крови человека после добавления NaCl ($2,63 \pm 0,35$ мкМ НЭЖК на 1 мл/ч) почти в 14 раз превышала таковую у кроликов ($0,19 \pm 0,08$ мкМ НЭЖК на 1 мл/ч). Эти данные свидетельствуют о различных соотношениях в крови кроликов и человека липазы, чувствительной к NaCl и протамину сульфату и устойчивой к их дей-

ствиям. Полученные данные позволяют говорить о том, что практически вся липолитическая активность постгепариновой плазмы кроликов обусловлена ЛПЛ, так как именно активность этого энзима угнетается 1 М NaCl. С целью сравнения мы провели аналогичные исследования с постгепариновой плазмой человека, активность ТГЛ которой обусловлена в основном двумя ферментами — ЛПЛ и ПТГЛ. В этих опытах использовали постгепариновую плазму больных ишемической болезнью сердца, полученную утром натощак через 14—16 ч после последнего приема пищи. Гепарин вводили внутривенно в дозе 20 ЕД/кг за 10 мин до взятия крови. Результаты этих определений также представлены на рисунке.

ствию. Особенно наглядно это видно при сравнении общей липолитической активности и активности ЛПЛ, выраженной в процентах, в каждом отдельном случае (табл. 1). Из табл. 1 видно, что у большинства кроликов активность ЛПЛ практически приближается к общей липолитической активности плазмы, составляя в среднем 97,6% от последней; в то же время у человека активность ЛПЛ заметно ниже, и на ее долю приходится в среднем 84,5% от общей липолитической активности.

Т а б л и ц а 1

Сравнение липолитической активности постгепариновой плазмы крови кролика и человека

Кролик			Человек		
общая активность	активность ЛПЛ	ЛПЛ, % от общей активности	общая активность	активность ЛПЛ	ЛПЛ, % от общей активности
22,0	22,0	100,0	21,98	18,83	85,6
12,29	11,45	93,2	16,71	14,14	84,6
22,77	21,85	95,9	19,02	15,43	81,1
16,33	16,33	100,0	23,03	19,55	84,9
11,37	11,37	100,0	25,49	23,53	92,3
11,19	—	—	13,50	8,26	61,2
14,61	14,31	97,7	10,33	8,26	79,9
18,82	18,43	97,9	13,06	11,60	88,8
12,08	—	—	11,76	10,56	89,8
13,11	12,95	98,8	9,37	8,16	87,1
14,22	14,22	100,0	11,87	11,03	92,9
10,89	—	—	15,35	12,40	80,8
Среднее...	14,97±1,20	97,6	15,96±1,53	13,48±1,43	84,5

Примечание. Здесь и в табл. 2 активность выражена в микромолях НЭЖК на 1 мл плазмы за 1 ч.

Различие между кроликом и человеком было обнаружено и при исследовании содержания НЭЖК в ответ на введение гепарина. Так, у кролика концентрация НЭЖК в плазме до введения гепарина составляла $0,415 \pm 0,040$ мкМ/мл (средние данные 7 опытов), после внутривенного введения гепарина — $1,51 \pm 0,34$ мкМ/мл. У человека эти величины были равны соответственно $0,409 \pm 0,053$ и $2,80 \pm 0,42$ мкМ/мл (средние данные 12 опытов). Видно, что если у человека содержание НЭЖК в ответ на введение гепарина увеличилось почти в 6 раз, то у кроликов — только в $2\frac{1}{2}$ раза от исходного уровня.

Вероятно, у кроликов гепарин в более слабой степени активизирует не только ПТГЛ (устойчивую к NaCl и протамину сульфату), но и другие липолитические ферменты — ди- и моноглицеридлипазы, фосфолипазу, холестеринэстеразу и др.

Показано, что у кроликов при кормлении их холестерином происходит накопление липопротеидных частиц, напоминающих по электрофоретической подвижности ЛПОНП, но содержащих значительно больше холестерина [28]. Последние, как уже указывалось, являются субстратом для действия ПТГЛ, устойчивой к NaCl. Поскольку нами обнаружена сравнительно небольшая доля такой ТГЛ (2,4% от общей активности постгепариновой плазмы крови кроликов), то представлялось интересным изучить соотношение липолитических ферментов у этих животных при развитии у них экспериментальной гиперхолестеринемии.

Опыты проведены на 6 кроликах, получавших холестерин с овощами в дозе 1 г в день в течение 3 мес. Кровь для анализа брали через 1, 2 и 3 мес кормления холестерином.

Результаты опытов, представленные в табл. 2, показывают, что общая липолитическая активность постгепариновой плазмы через 1 мес

несколько снизилась, а через 2 и 3 мес незначительно повысилась по сравнению с начальным уровнем.

Однако эти изменения были статистически недостоверны. Обращает на себя внимание то, что на долю ЛПЛ по-прежнему приходилась основная липолитическая активность. Если у интактных кроликов она составляла 98,5% от общей, то через 1 мес кормления равнялась 97,4%, через 2 мес — 97,2% и через 3 мес — 94,4%.

Таким образом, развитие гиперлипидемии у кроликов не сопровождалось существенным изменением соотношения чувствительной и устойчивой к NaCl ТГЛ.

Т а б л и ц а 2

Липолитическая активность постгепариновой плазмы крови кроликов при развитии у них экспериментальной гиперхолестеринемии

Время кормления	Число животных	Содержание холестерина, мг%	Общая липолитическая активность			Активность ЛПЛ	ЛПЛ, % от общ. ф. активности
			до введения гепарина	после введения гепарина	после добавления NaCl		
До начала кормления	6	63,2±5,6	0,61±0,23	13,36±3,0	0,19±0,08	13,17±3,0	98,5
1-й месяц	6	249,40±53,83	0,87±0,32	9,75±2,03	0,31±0,13	9,50±2,04	97,4
2-й »	6	448,60±85,75	0,62±0,17	15,68±3,53	0,36±0,13	15,25±3,53	97,2
3-й »	6	471,0±54,0	1,07±0,29	16,33±2,07	0,76±0,31	15,42±2,06	94,4

В заключение можно сказать, что у кроликов липолитическая активность постгепариновой плазмы обусловлена почти полностью ЛПЛ. Согласно данным литературы и результатам наших исследований, кролики в этом отношении отличаются от человека и некоторых видов животных, например крыс, у которых активность постгепариновой плазмы представлена в основном суммой двух ферментов — ЛПЛ и ПТГЛ. На основании наших опытов пока трудно говорить о величине истинной активности ПТГЛ плазмы кроликов, так как активность ТГЛ измерялась в условиях, оптимальных для ЛПЛ. Для окончательного решения вопроса о наличии или отсутствии ПТГЛ в плазме крови кроликов необходимо использовать более специфические методы ее определения, что и явится предметом наших дальнейших исследований. Однако хотелось бы подчеркнуть, что данные, полученные на кроликах, получавших холестерин, показывают, что у этих животных не происходит выраженного нарастания устойчивой к NaCl ТГЛ под влиянием нагрузки холестерином. Этот факт представляет определенный интерес с точки зрения уточнения одного из возможных механизмов развития холестериновой гиперлипидемии у кроликов и, в частности, причин накопления у них липопротеидных частиц необычного состава.

По всей вероятности, накопление в плазме кроликов при развитии у них гиперхолестеринемии обогащенных холестерином ЛПОИП объясняется, с одной стороны, тем, что последние являются плохим субстратом для действия ЛПЛ, а с другой — низким уровнем активности ПТГЛ.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Fredrickson D. S., Levy R. I.— In: The Metabolic Basis of Inherited Disease. Eds J. B. Stanbury, J. B. Wyngaarden, D. S. Fredrickson. New York, 1972, p. 31.— 2. Климов А. Н., Никульчева Н. Г.— Кардиология, 1972, № 6, с. 133.— 3. Eisenberg S.— Atheroscler. Rev., 1976, v. 1, p. 23.— 4. Климов А. Н.— В кн.: Липиды. Структура, биосинтез, превращения и функции, М., 1977, с. 57.— 5. Kohn E. D.— J. biol. Chem., 1955, v. 215, Pt 1, p. 15.— 6. Kohn E. D.— Meth. Biochem. Analys., 1959, v. 7, p. 145.— 7. Robinson D. S.— Advanc. Lipid. Res., 1963, v. 1, p. 133.— 8. Robinson D. S.,

Wing D. R.— In: Adipose Tissue. Regulation and Metabolic Functions. Eds A. Jeanrenaud, D. Hepp. Stuttgart, 1970, p. 41.— 9. Fielding C. J., Fielding P. E.— J. Lipid. Res., 1976, v. 17, p. 248.— 10. Fielding C. J., Havel R. J.— Arch. Path., 1977, v. 101, p. 225.— 11. La Rosa J. C., Levy R. I., Windmueller H. G. et al.— J. Lipid. Res., 1972, v. 13, p. 356.— 12. Fielding C. J.— Biochim. biophys. Acta, 1972, v. 280, p. 569.— 13. Gretten H., Levy R. I., Faler H. et al.— Ibid., 1970, v. 210, p. 39.— 14. Krauss R. M., Windmueller H. G., Levy R. I. et al.— J. Lipid Res., 1973, v. 14, p. 286.— 15. Krauss R. M., Levy R. I., Fredrickson D. S.— J. clin. Invest., 1974, v. 54, p. 1107.— 16. Huttunen J. K., Ehnholm C., Kekki M. et al.— Clin. Sci., 1976, v. 50, p. 249.— 17. Assman G., Krauss R. M., Fredrickson D. S. et al.— J. biol. Chem., 1973, v. 248, p. 1992.— 18. Baginsky M. L., Brown W. V.— J. Lipid Res., 1977, v. 18, p. 423.— 19. Augustin J., Freeze H., Boberg N. et al.— In: Lipolytic Enzymes., 1976, p. 7.— 20. Brown W. V., Shaw W., Baginsky M. et al.— Ibid., p. 1.— 21. Gretten H., Walter B., Brown W. V.— FEBS Letters, 1972, v. 27, p. 306.— 22. Redgrave T. G.— J. clin. Invest., 1970, v. 49, p. 465.— 23. Gardner R. S., Mayes P. A.— Biochem. Soc. Trans., 1976, v. 4, p. 715.— 24. Datta D. V., Wiggins H. S.— Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1964, v. 115, p. 788.— 25. Riley S. E., Robinson D. S.— Biochim. biophys. Acta, 1974, v. 369, p. 371.— 26. Falholt K., Lund B., Falholt W.— Clin. chim. Acta, 1973, v. 46, p. 105.— 27. Glueck G. J., Gartside P., Fallat R. W. et al.— Metabolism, 1976, v. 25, p. 625.— 28. Shore V. G., Shore B., Hart R. G.— Biochemistry (Wash.), 1974, v. 13, p. 1579.

Поступила 12/IV 1978 г.

ACTIVITY OF POSTHEPARIN LIPOPROTEIN LIPASE FROM RABBIT BLOOD PLASMA

I. B. Soliternova, N. G. Nikul'cheva

N. N. Anichkov Department of Lipid Biochemistry and of Atherosclerosis, Institute of Experimental Medicine, Academy of Medical Sciences of the USSR, Leningrad

Activity of lipoprotein lipase was studied in rabbit blood plasma after administration of heparin at a dose 50 un/kg into animals. NaCl was added to incubation mixture at final concentration 1 M to differentiate the enzyme from liver triglyceride lipase. The salt inhibited strongly (sometimes completely) the lipolytic activity in rabbit postheparin blood plasma. These data suggest predominance of lipoprotein lipase, sensitive to NaCl, in total lipolytic activity of rabbit postheparin blood plasma. Only slight alterations in the value of total lipolytic activity and in activity, depending on lipoprotein lipase, were observed in rabbits maintained at high cholesterol diet. Under these conditions distinct increase in activity of triglyceride lipase, stable to NaCl, was not found.

УДК 612.115.3

Л. А. Ляпина, Б. А. Кудряшов

ТРОМБОТИЧЕСКИЕ ОСЛОЖНЕНИЯ ПРИ БЛОКИРУЮЩЕМ ВЛИЯНИИ ПРОТАМИНСУЛЬФАТА НА НЕФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ФИБРИНОЛИЗ В КРОВИ ЖИВОТНЫХ ПРИ ВОЗБУЖДЕНИИ ПРОТИВОСВЕРТЫВАЮЩЕЙ СИСТЕМЫ

Лаборатория физиологии и биохимии свертывания крови Московского университета им. М. В. Ломоносова

Протаминсульфат не только *in vitro*, но и *in vivo* блокирует неферментативный фибринолиз путем связывания гепарина и диссоциации его комплексных соединений, являющихся важнейшими гуморальными компонентами противосвертывающей системы. Достаточно полная блокада гуморальных агентов противосвертывающей системы, вызываемая или однократным внутривенным введением больших доз протаминсульфата, или хроническим внутривенным введением в течение 14 дней протаминсульфата в умеренных дозах, вызывала гибель животных от тромботических осложнений при дополнительном появлении в кровотоке тромбина. При этом в коронарных сосудах обнаружены тромбы. Экстракты из тканей легких, ушков сердца и печени подопытных животных, получавших протаминсульфат, в отличие от контрольных, после инъекции физиологического раствора, не обладали неферментативным фибринолитическим действием.

В ранних исследованиях было установлено, что после введения тромбина или тромбопластина в кровотоки животных, а также при различных стрессовых ситуациях наблюдается активация функционального состояния противосвертывающей системы, сопровождающаяся резким повышением неферментативной фибринолитической активности крови [1—3]. Однако известно также, что протаминсульфат, прочно связывающий гепарин с образованием неактивного комплекса протаминсульфат — гепарин, блокирует неферментативную фибринолитическую активность комплексных соединений гепарина *in vitro* [4]. Показано, что внутривенное введение крысам протаминсульфата подавляет активацию противосвертывающей системы, вызываемую стрессом (30-минутной иммобилизацией) у животных. При этом интенсивность клиренса ^{131}I -тромбина при иммобилизационном стрессе значительно снижается и достигает уровня, наблюдаемого у животных, не подвергавшихся стрессу [5]. Экспериментально установлено также, что гипокоагуляция и высокий фибринолиз, возникающие у крыс после внутривенного введения тромбина, устраняются последующим введением протаминсульфата и ϵ -аминокапроновой кислоты [6].

Целью настоящего исследования являлось изучение изменений в функциональном состоянии противосвертывающей системы у животных при введении в организм протаминсульфата, диссоциирующего комплексные соединения гепарина в кровотоке.

М е т о д и к а

В опытах использовано 58 белых крыс-самцов массой 220—240 г, содержащихся на полноценном лабораторном рационе. Применяли тромбин Каунасского завода бактериальных препаратов. Тромбопластин получали из мозга крыс общепринятым методом. В экспериментах использован протаминсульфат фирмы «Спофа» (ЧССР). Подопытным крысам (опыт 1) вводили внутривенно по 0,5 мл раствора тромбина (60 вроцлавских ед.) или тромбопластин (опыт 2) в дозе 0,6 мл на 200 г массы. Тромбопластин обладал активностью, равной 15 с. Контролем 1 служили животные, которым внутривенно вводили 0,5 мл 0,85% физиологического раствора. Через 10 мин после введения указанных препаратов у животных брали по 1,5 мл крови, после чего дополнительно инъецировали по 0,5 мл 0,6% раствора протаминсульфата на 200 г массы или по 0,5 мл 0,85% раствора NaCl (контроль 2). Взятие крови и внутривенное введение препаратов производили через *v. jugularis*. Кровь брали с 3,8% цитратом натрия спустя 5 и 15 мин после внутривенного введения последнего препарата (двум группам подопытных животных и одной группе контрольных, контроль 3) — протаминсульфата, а другой группе контрольных крыс — физиологического раствора — контроль 2.

Определяли суммарную фибринолитическую активность плазмы и ее неферментативную фибринолитическую активность на нестабилизированных пластинах фибрина [7, 8]. Концентрацию фибриногена определяли методом Бидвелла [9] в модификации Андреевко [10]. Антитромбиновую активность плазмы устанавливали общепринятым методом. Тромбоэластограммы плазмы крови были получены на тромбоэластографе «Тромб-2».

Через 5 и 15 мин после введения протаминсульфата крыс забивали, быстро извлекали ткани печени, легких, почек, сердца и селезенки и исследовали на наличие в них тромбов, а затем в экстрактах этих тканей определяли неферментативный фибринолиз по методу [7], нанося на пластину нестабилизированного фибрина по 0,05 мл 1% экстрактов указанных выше тканей в физиологическом растворе в присутствии ϵ -аминокапроновой кислоты в конечной концентрации 3%.

Р е з у л ь т а т ы и о б с у ж д е н и е

Как видно из табл. 1, внутривенное введение тромбина крысам 1-й опытной группы или тромбопластина крысам 2-й опытной группы вызывает возбуждение противосвертывающей системы, о чем свидетельствует увеличение суммарной фибринолитической активности в 2,2 раза после введения тромбина и в 1,8 раза после введения тромбопластина. Неферментативная фибринолитическая активность возрастала в 3,8 раза после введения тромбина и в 3 раза после введения тромбопластина. При этом концентрация фибриногена в плазме была достоверно снижена ($P < 0,01$) по

Т а б л и ц а 1

СФА, НФ, АТ активность плазмы, Ф, показатели R и К тромбоэластограммы крови животных после внутривенного введения тромбина и последующего введения протаминсульфата

Условия опыта	СФА, мм ²	НФА, мм ²	Ф, мг%	Показатели тромбоэластограммы, с		АТА, с
				R	K	
До опыта	39,3±2,4 (10)	13,5±1,6 (10)	358±7,0 (10)	60±2 (6)	85±4,0 (6)	40±0,8 (10)
Через 10 мин после введения тромбина — опыт 1 (1-я группа)	89,2±9,2 (10)	52,2±10,0 (10)	291±14,0 (10)	Более 5 мин нет сгустка (6)	Более 5 мин нет сгустка (6)	Более 5 мин нет сгустка (10)
<i>P</i>	<0,001	<0,001	<0,01	<0,001		<0,001
Через 10 мин после введения тромбластина — опыт 2 (2-я группа)	70,7±3,1 (11)	40,5±4,4 (11)	307±7,7 (10)	Более 5 мин нет сгустка (5)	Более 5 мин нет сгустка (5)	Более 5 мин нет сгустка (7)
<i>P</i>	<0,001	<0,001	<0,01	<0,001		<0,001
Через 10 мин после введения 0,85% NaCl — контроль 1 (3-я группа)	41±1,8 (7)	12,9±3,1 (7)	364±8,8 (7)	57±3,0 (4)	83±1,7 (4)	40±1,0 (5)
Через 5 мин после следующего за тромбином введения протаминсульфата (1-я группа)	29,2±2,2 (10)	0,8±0,01 (10)	399±7,0 (10)	50±0,9 (6)	71±1,1 (6)	34±1,0 (5)
<i>P</i>	<0,05	<0,001	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Через 5 мин после следующего за тромбластином введения протаминсульфата (2-я группа)	24,6±1,8 (8)	1,8±0,3 (8)	410±12,7 (8)	51±1,1 (4)	68±2,1 (4)	35±0,8 (5)
<i>P</i>	<0,05	<0,001	<0,05	<0,05	<0,01	<0,05
Через 15 мин после следующего за тромбином введения протаминсульфата (1-я группа)	25,3±2,3 (8)	0 (8)	399±5,5 (8)	—	—	30±1,5 (8)
<i>P</i>	<0,01	<0,01	<0,05			<0,01
Через 5 мин после следующего за NaCl введения NaCl — контроль 2	38±1,7 (7)	12,0±0,9 (7)	349±12,2 (7)	—	—	40±0,9 (7)
<i>P</i>	>0,5	>0,5	>0,5			>0,5
Через 5 мин после следующего за NaCl введением протаминсульфата — контроль 3	20±0,8 (7)	0,6±0,9 (7)	384±9,7 (7)	—	—	34±2,4 (7)
<i>P</i>	<0,05	<0,01	>0,5			<0,05

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2 СФА — суммарная фибринолитическая, НФА — неферментативная фибринолитическая, АТА — антитромбиновая активность плазмы, Ф — концентрация фибриногена. Статистические показатели рассчитаны относительно исходного уровня. В скобках — число животных.

Эффект хронического внутривенного введения протаминсульфата

Таблица 2

Условия опыта	СФА, мм ²	НФА, мм ²	Ф, мг%	Показатели тромбоэластограммы, с			АТА, с
				R	K		
До опыта							
Через 7 дней после хронического введения протаминсульфата	49,9±3,1 (10)	12,4±1,0 (10)	315±2,4 (10)	70±3 (6)	90±1,5 (6)	40±1,1 (10)	
<i>P</i>	23,6±2,7 (10) <0,01	2,5±0,7 (10) <0,01	450±10,0 (10) <0,001	50±1,5 (5) <0,01	80±2,7 (5) <0,01	35±2,1 (10) <0,01	
Через 14 дней после хронического введения протаминсульфата	23,8±1,8 (5) <0,01	2,0±1,0 (5) <0,01	436±15,9 (5) <0,001	—	—	35±1,0 (5) <0,01	
Через 7 дней после хронического введения NaCl	47,1±2,8 (10) >0,5	15,9±3,0 (10) >0,5	305±10,0 (10) >0,5	71±1,3 (6) >0,5	91±0,8 (6) >0,5	40±0 (6) >0,5	
Через 14 дней после хронического введения раствора NaCl	45,9±3,4 (10) >0,5	14,1±2,4 (10) >0,5	302±12,7 (10) >0,5	—	—	40±2 (10) >0,5	

сравнению с контролем. Кроме того, установлено увеличение антитромбиновой активности плазмы как после введения тромбина, так и после введения тромбопластина (не наблюдалось образования сгустка в течение более чем 5 мин). У контрольных крыс, получавших инъекцию физиологического раствора, сгусток образовался в пределах 40 с. По данным тромбоэластограммы установлено значительное увеличение показателя *R* тромбоэластограммы у подопытных животных по сравнению с контрольными, получавшими инъекцию физиологического раствора (см. табл. 1).

Через 5 мин после введения протаминсульфата животным 1-й и 2-й опытных групп, предварительно получавшим внутривенные инъекции тромбина или тромбопластина, изученные показатели свертывающей и противосвертывающей систем свидетельствовали о наличии состояния гиперкоагуляции. Так, суммарная фибринолитическая активность плазмы у крыс 1-й и 2-й опытных групп была ниже по сравнению с таковой у контрольных ($P < 0,05$), неферментативный фибринолиз полностью исчезал. Показатели *R* и *K* тромбоэластограммы свидетельствуют об относительной гиперкоагуляции.

При вскрытии животных 1-й и 2-й опытных групп через 6 мин после введения им протаминсульфата были обнаружены в 30 % случаев небольшие тромбы в коронарных сосудах сердца. В легких, печени, селезенке и почках тромбы визуально обнаружены не были. При исследовании экстрактов из перечисленных органов не установлена их неферментативная фибринолитическая активность, за исключением очень низкой неферментативной фибринолитической активностью (24—28 мм²). У контрольных животных, не получавших инъекций протамин-

сульфата, в тканях легких была обнаружена значительная неферментативная литическая активность — 125—140 мм².

Через 15 мин после введения подопытным животным 1-й группы протаминсульфата у них возникала хорошо выраженная гиперкоагуляция крови. При этом суммарная фибринолитическая активность плазмы была достоверно снижена ($P < 0,01$) в 1,5 раза по сравнению с контрольными животными, получавшими вместо протаминсульфата 0,85 % раствор NaCl. Неферментативный фибринолиз в плазме подопытных крыс снизился до нуля, антитромбиновая активность уменьшилась на 10 с ($P < 0,01$) по сравнению с контрольными. Концентрация фибриногена несколько повысилась.

При вскрытии животных через 15 мин после введения протаминсульфата на фоне ранее введенного тромбина были обнаружены небольшие тромбы в коронарных сосудах в 90 % случаев. При этом неферментативная фибринолитическая активность не была обнаружена ни в тканях ушков сердца, ни в тканях легких, печени и селезенки.

Полученные результаты позволили допустить, что достаточно полная блокада гуморальной функции противосвертывающей системы, вызываемая внутривенным введением больших доз протаминсульфата, должна приводить животных к гибели от тромботических осложнений.

С целью проверки этого предположения был проведен следующий эксперимент. На фоне внутривенного введения тромбина крысам был инъецирован 0,6 % раствор протаминсульфата в дозе 4,5 мг (0,75 мл) на 200 г массы тела. В этих условиях в 60 % случаев животные погибали от тромбоза. При аутопсии тромбы были обнаружены в коронарных сосудах. Таким образом, связывание протаминсульфатом гепарина в его комплексных соединениях с белками крови и аминами в процессе их возникновения в кровотоке при возбуждении тромбином противосвертывающей системы явилось основной причиной тромботических осложнений, приведших животных к гибели.

Хроническое внутривенное введение 0,1 мл 1 % раствора протаминсульфата животным уже через 7 дней вызывало у них снижение суммарной фибринолитической активности плазмы в 2,2 раза, неферментативного фибринолиза — в 5 раз, увеличение концентрации фибриногена на 145—135 мг % и снижение антитромбиновой активности плазмы крови на 5 с. К 14-му дню опыта после ежедневного введения протаминсульфата суммарная фибринолитическая активность плазмы была снижена более чем в 1,5 раза, неферментативный фибринолиз — более чем в 5 раз, концентрация фибриногена повышена на 134 мг % по сравнению с показателями у контрольных животных, которым внутривенно вводили физиологический раствор (0,85 % NaCl) (табл. 2). При проведении тромбиновой пробы на 15-й день после хронического опыта, т. е. при внутривенном однократном введении животным опытной группы 60 ед. тромбина на 200 г массы тела, наблюдалась гибель в 50 % случаев. В контрольной группе после внутривенного введения той же дозы тромбина все животные выжили.

Таким образом, на основании полученных экспериментальных данных можно заключить, что протаминсульфат не только *in vitro*, но и *in vivo* блокирует неферментативный фибринолиз путем связывания гепарина и диссоциации его комплексных соединений, являющихся важнейшими гуморальными компонентами противосвертывающей системы. Достаточно полная блокада гуморальной функции противосвертывающей системы, вызываемая внутривенным введением больших доз протаминсульфата, приводила к гибели животных от тромботических осложнений в коронарных сосудах. Внутривенное однократное введение умеренной дозы тромбина животным, в течение 14 дней получавших протаминсульфат, также вызывало гибель животных от тромбоза в коронарных сосудах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кудряшов Б. А. Биологические проблемы регуляции жидкого состояния крови и ее свертывания. М., 1975.— 2. Kudryashov B. A. (Кудряшов Б. А.) — *Folia haemat. (Lpz.)* 1972, Bd 98, S. 391—396.— 3. Kudryashov B. A. (Кудряшов Б. А.) *Proc. int. Un. Physiol. Sci. (Internat. Congress. 26th)*, 1974, v. 11, Abstr. 69.— 4. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А.— *Вестн. Московского ун-та. Сер. биол.*, 1973, № 4, с. 3—25.— 5. Кудряшов Б. А., Шаниро Ф. Б., Ульянов Л. М.— *Физиол. ж. СССР*, 1977, т. 63, № 9, с. 1295—1301.— 6. Калишевская Т. М., Почукаева Л. С.— *Науч. докл. высш. школы. Биол. науки*, 1976, № 10, с. 69—75.— 7. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А. *Лабор. дело*, 1971, № 6, с. 326—329.— 8. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А., Баскова И. П. *Вестн. Московск. ун-та. Сер. биол.*, 1974, № 5, с. 41—45.— 9. Bidwell E.— *Biochem. J.*, 1953, v. 55, p. 497—506.— 10. Андреев Г. В. *Лабор. дело*, 1962, № 5, с. 3—7.

Поступила 12/IV 1978 г.

THROMBOTIC COMPLICATIONS IN BLOCKING EFFECT OF PROTAMINE-SULFATE ON NON-ENZYMATIC FIBRINOLYSIS IN ANIMAL BLOOD UNDER CONDITIONS OF ACTIVATION OF ANTICOAGULATION SYSTEM

L. A. Lyapina, B. A. Kudryashov

Laboratory of Physiology and Biochemistry of Blood Coagulation, M. V. Lomonosov State University, Moscow

Protamine-sulfate blocked non-enzymatic fibrinolysis not only in vitro but also in vivo through binding of heparin and disociation of its complexes, which are of great importance as humoral components of the anticoagulation system. Almost complete blocking of humoral agents of the anticoagulation system, caused either by a single intravenous administration of protamine-sulfate at large doses or by repeated administration of the substance at moderate doses within 14 days, led to death of the animals as a result of thrombotic complications related to appearance of additional thrombin in blood circulation. In these cases thrombosis occurred into coronary blood vessels. The non-enzymatic fibrinolytic effect was not observed in extracts from lungs, auricula atrii and liver tissue of experimental animals, treated with protamine-sulfate, as compared with the controls, administered with physiologic solution.

УДК 612.649-085.23:577.152.321

И. В. Цветкова, Т. В. Золотухина, Е. Л. Розенфельд, И. С. Розовский

АКТИВНОСТЬ ГЛИКОЗИДАЗ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК АМНИОТИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Всесоюзный научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии Министерства здравоохранения СССР, Москва

Представлены данные об активности в культуре клеток амниотической жидкости человека гликозидаз, недостаточность которых лежит в основе наследственных болезней накопления. Полученные данные по активности гликозидаз в норме могут служить в качестве контрольных величин при проведении пренатальной диагностики наследственных гликолипидозов и гликопротеинозов. Приводится пример использования культуры клеток амниотической жидкости для пренатальной диагностики болезни Тея — Сакса.

Определение активности ферментов в культуре клеток амниотической жидкости (АЖ) необходимо для осуществления пренатальной диагностики ряда наследственных заболеваний, в частности гликолипидозов и гликопротеинозов [1]. В основе последних лежит недостаточность какой-либо гликозидазы или одной из ее форм, участвующих в катаболизме гликолипидов и гликопротеинов. В результате происходит накопление этих биополимеров в клетках и как следствие нарушение физиологических функций клеток. В случае заболевания плода недостаточность того или иного фермента обнаруживается и в клетках АЖ. Однако определение активности ферментов в некультивированных клетках АЖ осложняется, во-первых, недоста-

точным их количеством и, во-вторых, наличием среди живых клеток различного количества мертвых клеток, ферментативная активность которых может быть изменена. Поэтому для оценки активности ферментов клеток АЖ используют их культуру. Естественно, что для выявления недостаточности фермента необходимо знать его активность в норме. В литературе имеется ряд работ по выявлению активности гликозидаз как в некультивируемых клетках АЖ [2], так и в культуре клеток АЖ [3, 4]. Однако данные, полученные разными авторами, иногда значительно отличаются друг от друга, что связано, вероятно, с особенностями методических приемов, в частности с условиями культивирования клеток. Поэтому исследователи, занимающиеся проблемой пренатальной диагностики наследственных энзимопатий, должны располагать собственными данными по активности соответствующих ферментов в культуре клеток АЖ в норме. Ниже представлены результаты определения активности нескольких гликозидаз, недостаточность которых лежит в основе наследственных гликолипидозов и гликопротеинозов, в культуре клеток АЖ человека.

М е т о д и к а

Метод культивирования клеток АЖ. Первичную культуру клеток АЖ получали по методу Нельсона [5] с некоторыми модификациями. Образец АЖ, полученной аминоцентезом на 16—22-й неделе беременности, центрифугировали в течение 10 мин в стерильных пробирках. Клетки ресуспендировали в 1 мл эмбриональной телячьей сыворотки и переносили в пластиковый флакон площадью 25 см² (форма «Falcon»). Через 20—30 мин, когда клетки прикреплялись к дну культурального сосуда, добавляли 5 мл питательной среды Хем F-10 (фирма «Flow Lab»), содержащей 20% эмбриональной телячьей сыворотки, 500 мкг/мл гентамицина и 20 мкг/мл фунгизона. Начальная концентрация жизнеспособных клеток составляла 600—800 клеток в 1 мл. Флаконы, неплотно закрытые крышками, помещали в термостат (фирма «Flow Lab») во влажную атмосферу с подачей CO₂ при 37°C. Первую смену среды производили через 72 ч от начала инкубации, последующие смены — через каждые 6—7 дней. Инкубация длилась 13—24 дня. Контроль роста культуры осуществляли при анализе культуральных матрасов под инвертированным микроскопом «Telaval» (фирма «К. Цейс», ГДР). Рост считался достаточным при достижении рыхлого монослоя или появления около 10 колоний диаметром 3—12 мм. Морфологически культура характеризовалась смешанным типом роста (эпителлоидным, фибробластоподобным и переходным между этими двумя типами) с разной степенью преобладания клеток каждого типа в отдельных культурах.

Обработка культуры клеток. В разные сроки культивирования при достижении достаточной степени роста клетки удаляли следующим образом. После сливания среды матрас отмывали 2 раза небольшим количеством смеси, состоящей из 0,9% раствора NaCl и 0,1 М фосфатного буфера рН 7,0 в соотношении 9 : 1. Затем клетки снимали механически в небольшом объеме указанной смеси. В некоторых случаях матрас предварительно обрабатывали 0,25% раствором трипсина при 37°C в течение 2 мин. Суспензию клеток центрифугировали в течение 5 мин при 2000 об/мин. Если клетки снимали с помощью трипсина, то после центрифугирования их отмывали указанной выше смесью и центрифугировали еще раз. Осадок клеток в той же центрифужной пробирке гомогенизировали в 0,2—0,5 мл воды (в зависимости от количества клеток). Часть гомогената брали на определение активности β-D-гликозидазы по методу Петерса [6], а к остальной части добавляли тритон X-100 до конечной концентрации 0,1% и через 1 ч при помощи центрифугирования получали экстракт клеток, в котором определяли активность остальных гликозидаз. В ряде опытов в качестве источника фермента использовали и нецентрифугированный гомогенат, содержащий тритон X-100.

Определение активности гликозидаз. Для определения активности β-D-гликозидазы к 20 мкл гомогената добавляли 10 мкл 6% раствора таурохолат-натрия, тщательно перемешивали, добавляли 100 мкл 3,5 мМ 4-метилумбеллиферил-β-D-глюкопиранозид, приготовленный на 0,1 М ацетатном буфере рН 5,0. Пробы инкубировали в течение 1 ч. Для определения других гликозидаз использовали экстракт или гомогенат клеток в количестве от 5 до 40 мкл (от 2 до 25 мкг белка), к которому добавляли 50—100 мкл раствора субстрата на соответствующем буфере и инкубировали при 37°C в течение 30—60 мин. Относительное содержание гексозаминидазы А определяли методом тепловой инактивации [7]. В качестве субстратов использовали 4-метилумбеллиферилгликозиды (фирма «Koch-Light»), растворы которых готовили на 0,1 М цитратно-фосфатном буфере рН 4,5, за исключением субстрата для β-D-глюкуронидазы, который готовили на 0,1 М ацетатном буфере рН 5,0. Ниже приводятся условия определения активности гликозидаз (концентрация субстрата, количество фермента и время инкубации): β-D-галактозидаза — 1,25 мМ, 5 мкл, 30 мин; α-D-галактозида-

за — 2,2 мМ, 30 мкл, 60 мин; β -D-гексозаминидаза — 1,5 мМ, 5 мкл, 30 мин; α -L-фукозидаза — 1,25 мМ, 20 мкл, 60 мин; α -D-маннозидаза — 2,5 мМ, 10 мкл, 60 мин; β -D-глюкуронидаза — 1 мМ, 10 мкл, 60 мин; α -D-глюкозидаза — 1 мМ, 20 мкл, 60 мин.

После инкубации к пробам добавляли 0,4 М глициновый буфер рН 10,5 до конечного объема 1,5 мл и измеряли флюоресценцию с помощью флюориметра, изготовленного на основе фотоколориметра ФЭК-56 [8]. Количество отщепившегося 4-метилумбеллиферона оценивали по стандартному раствору в концентрации от 0,022 до 0,352 мкг на 1,5 мл. Активность гликозидаз выражали в наномолях отщепившегося 4-метилумбеллиферона на 1 мг белка за 1 ч. Белок определяли по методу Лоури [9].

Для определения арилсульфатазы А использовали в качестве субстрата нитрокатехолсульфат (фирма «Koch-Light») в концентрации 10 мМ, растворенный в 0,5 М ацетатном буфере рН 5,5, содержащем $5 \cdot 10^{-4}$ М пиродифосфат натрия и 10% NaCl. Пробу, содержащую 20—40 мкл экстракта или гомогената и 100 мкл раствора субстрата, инкубировали в течение 2 ч при 37°C, добавляли 1 н. NaOH до объема 1,5 мл и измеряли поглощение при 515 нм. Количество отщепившегося п-нитрокатехола оценивали по стандартному раствору и выражали в наномолях п-нитрокатехола на 1 мг белка за 1 ч.

Результаты и обсуждение

В табл. 1 и 2 представлены данные об активности гликозидаз в экстрактах и гомогенатах культуры клеток АЖ.

Таблица 1

Активность гликозидаз (в нмоль/мг/ч) в экстрактах культуры клеток АЖ

Фермент	$M \pm m$	Пределы колебаний
β -D-галактозидаза	451 ± 106	557—303
α -D-галактозидаза	$37 \pm 7,4$	44—28
α -L-фукозидаза	240 ± 123	397—90
α -D-маннозидаза	135 ± 58	251—75
β -D-глюкуронидаза	95 ± 9	104—38
Арилсульфатаза А	208 ± 117	433—121
β -D-гексозаминидаза общая	1782 ± 750	3040—940

Полученные нами данные согласуются с данными Баттерворса, который приводит примерно такие же величины активности с такими же пределами колебаний [3]. В некоторых случаях определение активности гликозидаз мы проводили в гомогенатах, содержащих тритон X-100, поскольку при работе с культурой клеток АЖ часто приходится иметь дело с очень малым количеством материала. Оказалось, что гомогенаты культуры клеток АЖ являются не менее пригодным объектом для определения активности гликозидаз. В табл. 2 представлены полученные данные.

Из табл. 2 следует, что средняя активность гликозидаз в гомогенатах культуры клеток АЖ такая же, как и в экстрактах. Активность некоторых ферментов, например α -D-маннозидазы, β -D-глюкуронидазы и арилсульфатазы А, в экстрактах и гомогенатах примерно одинакова. Активность β -D-галактозидазы и β -D-гексозаминидазы выше в гомогенатах, а активность α -L-фукозидазы — в экстрактах клеток. Необходимо отметить, что активность β -D-глюкозидазы в наших экспериментах была значительно выше, чем в исследованиях других авторов, в частности Баттерворса [3]. Это связано, вероятно, с тем, что для определения активности β -D-глюкозидазы нами был использован метод Петерса [6], в котором в качестве детергента используется таурохолат, солибилизирующий этот фермент наиболее эффективно.

На основе полученных нами данных по активности гликозидаз в культуре клеток АЖ в норме предполагается проводить анализы АЖ с целью пренатальной диагностики таких наследственных болезней, как ганглиозидозы, болезнь Гоше, болезнь Фабри, метахроматическая лейкодистрофия и др. В качестве примера такой диагностики можно привести анализ культуры клеток АЖ пациентки Э. с отягощенной по болезни:

Тея — Сакса наследственностью. В табл. 3 приведены данные об активности гексозаминидазы А (недостаточность которой лежит в основе заболевания) в АЖ, в ее клетках и в культуре клеток АЖ у пациентки Э. Кроме того, представлены данные об активности гексозаминидазы А в лейкоцитах родившегося ребенка.

Т а б л и ц а 2

Активность гликозидаз (в нмоль/мг/ч) в гомогенатах культуры клеток АЖ

Фермент	$M \pm m$	Пределы колебаний
β -D-галактозидаза	675 \pm 228	1022—287
α -D-галактозидаза	42 \pm 21	80—17,5
α -L-фукозидаза	168 \pm 91	363—77
α -D-маннозидаза	134 \pm 85	291—52
β -D-глюкуронидаза	75 \pm 36	158—38
β -D-глюкозидаза	67 \pm 30	112—37
α -D-глюкозидаза	29 \pm 17	55—10
Арилсульфатаза А	206 \pm 48	266—107
β -D-гексозаминидаза общая	2478 \pm 556	3065—1309
% формы А	60	80—40

Представленные в табл. 3 данные позволили считать, что в данном случае болезнь плода исключена, что и подтвердилось при последующем определении активности гексозаминидазы А в плаценте и лейкоцитах ребенка.

Т а б л и ц а 3

Определение активности гексозаминидазы А (в % от общей активности) с целью пренатальной диагностики болезни Тея — Сакса

Объект исследования	Контроль	Пациентка Э.	Данные литературы для контроля [10]
АЖ	18 (12—29)	17,6 27	21 (11—26)
Клетки АЖ	31 (17—46)		38 (30—47)
Культура клеток АЖ	44—80	43—50	63—81
Плацента	67	48	—
Лейкоциты ребенка	55—68	60	—

П р и м е ч а н и е. В скобках — пределы колебаний.

При проведении пренатальной диагностики наследственных дефектов обмена необходимо учитывать возможность диагностических ошибок из-за перекрытия активности ферментов в норме и при гетерозиготности и, что особенно важно, активности у гетерозигот и больных гомозигот. Такие ошибки, связанные, по-видимому, с использованием для диагностики культур, отличающихся по условиям культивирования от контрольных, описаны в литературе [11]. Поэтому абсолютным требованием при проведении пренатальной диагностики является строгое соблюдение стандартных условий выращивания клеток (время культивирования, число пассажей и др.), методов обработки и определения активности ферментов в контроле и в исследуемом материале.

Вторым важным условием диагностики является обследование семьи с отягощенной по тому или иному заболеванию наследственностью. Задачей такого обследования является выявление особенностей активности

фермента, характерных для данной семьи. Дело в том, что недавно описаны случаи наследственных гликолипидозов, когда среди родственников большого ребенка имелись практически здоровые лица с очень низкой активностью соответствующей гликозидазы [12—14]. С другой стороны, у некоторых больных детей с выраженными признаками заболевания обнаруживали высокую остаточную активность гликозидазы [15]. В связи с этим обследование членов семьи при пренатальной диагностике заболеваний, обусловленных недостаточностью гликозидаз, крайне важно, поскольку может облегчить интерпретацию результатов анализа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Burton B. K., Gerbie A. R., Nadler H. L.— *Am. J. Obstet Gynec.*, 1974, v. 118, p. 718.— 2. Den Tandt W. R.— *Clin. chim. Acta*, 1972, v. 40, p. 199.— 3. Butterworth J., Sutherland G. R., Broadhead D. M. et al.— *Ibid.*, 1973, v. 44, p. 295.— 4. Butterworth J., Sutherland G. R., Broadhead D. M. et al.— *Ibid.*, 1974, v. 53, p. 239.— 5. Nelson M. M., Emery A. E. H.— *Brit. med. J.*, 1970, v. 1, p. 523.— 6. Peters S. P., Lee R. E., Glew R. H.— *Clin. chim. Acta*, 1975, v. 60, p. 391.— 7. O'Brien J. S., Okada S., Chen A. et al.— *New Engl. J. Med.*, 1970, v. 283, p. 15.— 8. Пеккель В. А.— *Лабор. дело*, 1977, № 5, с. 313.— 9. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. et al.— *J. biol. Chem.*, 1951, v. 193, p. 265.— 10. O'Brien J. S., Okada S., Filleur D. L. et al.— *Science*, 1971, v. 172, p. 61.— 11. Niermeijer M. E., Koster J. E., Jagodova M. et al.— *Pediat. Res.*, 1975, v. 9, p. 408.— 12. Wenger J. A., Riccardi V. M.— *J. Pediat.*, 1976, v. 88, p. 76.— 13. Dreyfus J. C., Peenaru L., Svennerholm L.— *New Engl. J. Med.*, 1975, v. 292, p. 61.— 14. Dubois G., Harzer K., Baumann N.— *Am. J. hum. Genet.*, 1977, v. 29, p. 192.— 15. Oriti T., Sukegawa K., Minami R. et al.— *Pediatrics*, 1977, v. 60, p. 764.

Поступила 15/IV 1978 г.

ACTIVITY OF GLYCOSIDASES IN CELL CULTURE OF HUMAN AMNIONIC FLUID

I. V. Tsvetkova, T. V. Zolotukhina, E. L. Rosenfeld, I. S. Rosovsky

Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, All-Union Research Institute of Obstetrics and Gynecology, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

Deficiency of glycosidases is a fundamental feature of the hereditary diseases of glycoconjugate accumulation. The data obtained on activity of glycosidases in cell culture of normal amnionic fluid might be used as standards in prenatal diagnostics of hereditary glycolipidoses and glycoproteinoses. Use of cell culture of amnionic fluid for prenatal diagnosis of Tay-Sachs disease is described.

УДК 612.354.3.001.57

*Г. Ф. Журнов, М. В. Изотов, И. И. Карузина, Ю. М. Лопухин,
А. И. Арчаков*

МОДЕЛИРОВАНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ ДЕТОКСИЦИРУЮЩЕЙ ФУНКЦИИ ПЕЧЕНИ С ПОМОЩЬЮ РЕАКЦИЙ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО ОКИСЛЕНИЯ

Научно-исследовательский центр II Московского медицинского института
им. Н. И. Пирогова

Предложена электрохимическая система, позволяющая моделировать окислительные реакции, протекающие на цитохроме р-450. Предполагается, что подобная система в комплексе с диализатором может быть использована для окисления и выведения из организма животных и человека различных токсичных гидрофобных веществ экзогенного и эндогенного происхождения.

На окисление самых разнообразных по своей природе химических соединений, попадающих в организм извне, а также ряда эндогенных суб-

стратов расходуется кислород, активированный в ферментной системе, состоящей из НАДФ-Н-специфического флавопротеида и цитохрома *p*-450. Локализована она в мембранах эндоплазматического ретикулула клеток печени [1]. Способность цитохрома *p*-450-гидроксилазной системы печени превращать неполярные соединения в полярные позволяет рассматривать ее в качестве основной системы, выполняющей детоксицирующую функцию по отношению к гидрофобным веществам в организме животных и человека. В результате гидроксилазных реакций, протекающих на цитохроме *p*-450, продукты окисления становятся более гидрофильными

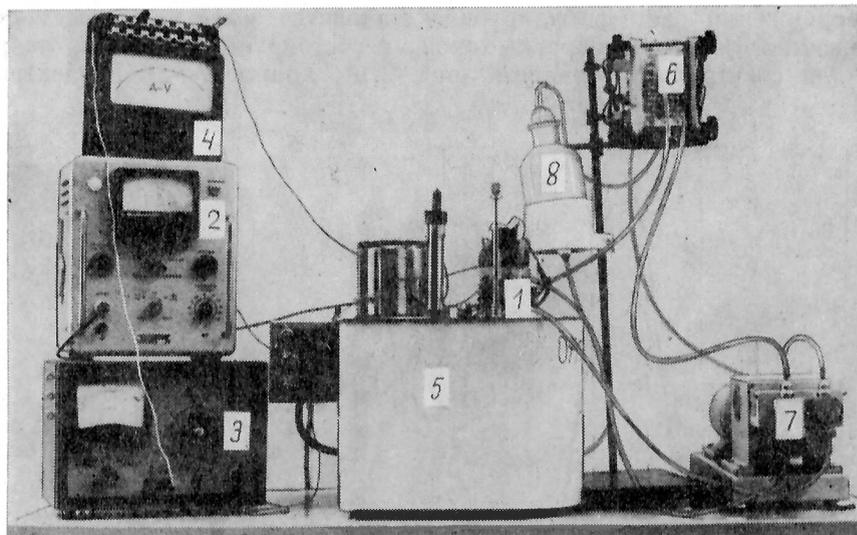


Рис. 1. Электрохимическая установка.

1 — электрохимическая ячейка; 2 — катодный вольтметр ЛПУ-01; 3 — стабилизирующий источник питания; 4 — миллиамперметр; 5 — термостат; 6 — диализатор; 7 — насос; 8 — сосуд для диализационной жидкости.

и, следовательно, в отличие от их неполярных предшественников могут быть легко удалены из мембран клетки в водную фазу [1].

В настоящем исследовании была предпринята попытка моделировать в простой электрохимической системе гидроксилазные реакции, протекающие на цитохроме *p*-450. Продукты окисления предполагалось удалять помощью диализа.

Методика

Реакции электрохимического окисления проводили на установке, представленной на рис. 1. В электрохимическую ячейку объемом 150 мл помещали вибрирующую с частотой 20 Гц и амплитудой 2 мм пару электродов. Анодом служила платиновая проволока диаметром 0,3 мм и длиной 32 мм, катодом — никелевая пластинка длиной 55 мм, шириной 55 мм и толщиной 0,3 мм. Потенциал подавали от стабилизированного источника питания постоянного тока фирмы «Labog» (Венгрия). Потенциал катода 650 мВ относительно насыщенного каломельного электрода измеряли катодным вольтметром ЛПУ-01. Силу тока регистрировали миллиамперметром. Продукты окисления, образованные в электрохимической ячейке, удаляли в диализационной камере фирмы «Labog» (Венгрия). Скорость протекания через диализационную систему диализата была равна 10 мл/мин, диализующего раствора — 80 мл/мин. Скорость окисления билирубина определяли по изменению его абсолютного спектра поглощения при 290—600 нм. Для стабилизации билирубина в раствор добавляли бычий сывороточный альбумин из расчета 1 г белка на 16 мг билирубина [2]. Скорость окисления паранитроанизола (пНА) в паранитрофенол (пНФ) измеряли по изменению оптической плотности при 395 нм. По количеству образовавшегося формальдегида определяли скорость деметилирования амидопирина (1-фенил-2,3-диметил-4-диметиламинопиразолон-5) (АП) [3]. Скорость окисления анилина (АН) измеряли по образованию *p*-аминофенола [3]. Скорость гемолиза измеряли по изменению оптической плотности при

545 нм [4]. Все измерения оптической плотности при окислении и удалении окисленных производных субстратов проводили на спектрофотометре «Hitachi-124». Реакцию в электрохимической ячейке, а также удаление окисленных продуктов в диализационной камере проводили при температуре 37°C.

Результаты и обсуждение

Реакция окисления билирубина сопровождается переходом его в биливердин, дальнейшее окисление которого происходит с образованием бесцветных продуктов [5]. Подобное превращение наблюдается в растворе билирубина, помещенном в электрохимическую ячейку. Через 15 мин ярко-оранжевый раствор билирубина становится зеленым, а затем обесцвечивается. Изменение окраски хорошо регистрируется в пробах, отобранных для спектрального анализа (рис. 2, А, кривые 1—5). В электрохи-

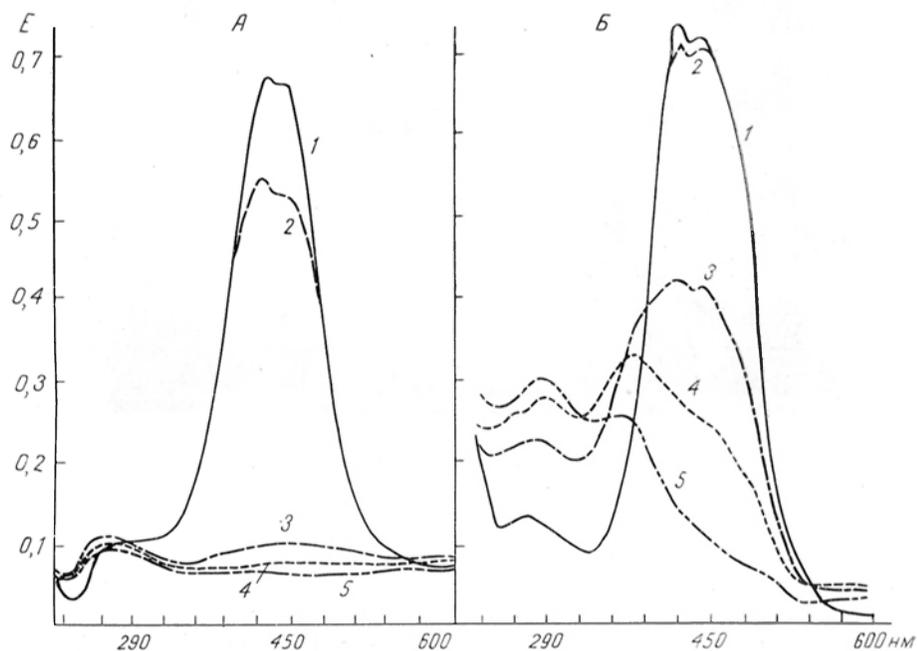


рис. 2. Окисление в электрохимической системе свободного (А) и связанного с альбумином (Б) билирубина.

Среда объемом 150 мл содержала 20 мМ фосфатный буфер рН 7,4, 150 мМ NaCl и $2 \cdot 10^{-6}$ М билирубин. В случае Б в среду инкубации добавляли 250 мг альбумина. 1 — свежеприготовленный раствор билирубина; 2 — самоокисление билирубина в течение 120 мин. Окисление билирубина при v 650 мВ и i 12 мА; 3 — 15 мин; 4 — 30 мин; 5 — 45 мин.

мической системе удается окислить не только свободный билирубин, но и билирубин, стабилизированный альбумином. Видно, что в присутствии альбумина реакция замедляется и полное обесцвечивание раствора наблюдается через 45 мин (см. рис. 2, Б, кривые 1—5). Продукты окисления билирубина не имеют четко выраженных максимумов поглощения в УФ- и видимой области (290—600 нм), что не позволяет спектрофотометрически идентифицировать их в диализационной жидкости. Накопление в диализационной жидкости окисленных продуктов удается проследить при использовании в качестве субстратов окисления пНА, АП и АН. Реакция пНА хорошо изучена в микросомах печени. В результате окисления метильной группы пНА превращается в пНФ, который можно легко регистрировать по поглощению в области 395 нм [1]. Было обнаружено (рис. 3, кривая а), что включение тока инициирует образование пНФ и в электрохимической ячейке. Реакцию заканчивали через 3 ч, когда

концентрация окисленного продукта выходила на стационарный уровень. Хорошо видно, что после выключения тока и подключения диализационной системы пНФ начинает выходить в диализационную жидкость (см. рис. 3, кривые *a* и *b*).

Аналогичные результаты можно получить, окисляя в электрохимической ячейке АП. По данным, представленным на рис. 4 (кривые 1 и 2),

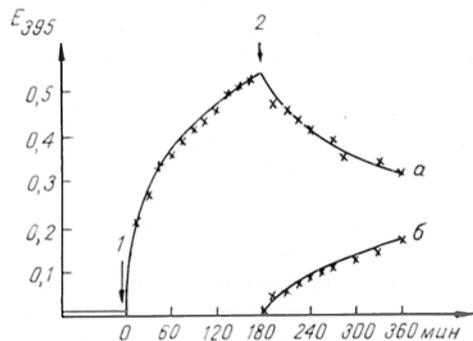


Рис. 3. Скорость образования и диализ пНФ.

Диализат объемом 350 мл содержал 20 мМ фосфатный буфер рН 7,4, 150 мМ NaCl и 10^{-3} М пНА. Диализационная жидкость объемом 350 мл содержала 20 мМ фосфатный буфер рН 7,4 и 150 мМ NaCl. Окисление пНА проводили при $v = 650$ мВ и $I = 12$ мА. Стрелка 1 — включение тока; стрелка 2 — начало диализа. Кривая *a* — накопление пНФ в диализате; *b* — накопление пНФ в диализационной жидкости.

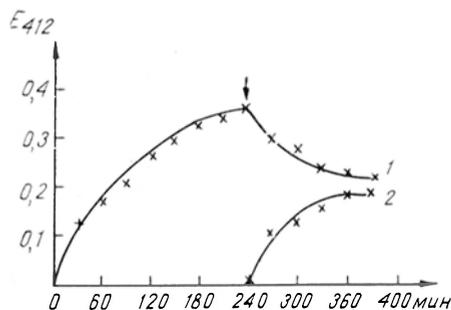


Рис. 4. Окисление АП и диализ образовавшегося при этом формальдегида.

Диализат (1) объемом 350 мл содержал 20 мМ фосфатный буфер рН 7,4, 150 мМ NaCl, 10 мМ АП. Диализационная жидкость (2) объемом 350 мл содержала 20 мМ фосфатный буфер рН 7,4 и 150 мМ NaCl. Окисление АП проводили при $v = 650$ мВ и $I = 12$ мА. Стрелкой указан момент начала диализа.

можно судить о скорости накопления, а затем удаления с помощью диализа формальдегида, образовавшегося при деметилировании АП.

С наибольшей скоростью в электрохимической ячейке окислялся АН. На рис. 5 приведены данные, из которых можно заключить, что *p*-амино-

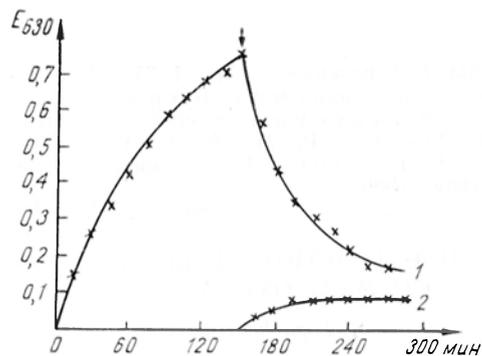


Рис. 5. Окисление анилина и диализ *p*-аминофенола.

Диализат (1) объемом 350 мл содержал 20 мМ фосфатный буфер рН 7,4, 150 мМ NaCl и 1 мМ анилин. Диализационная жидкость (2) объемом 350 мл содержала 20 мМ фосфатный буфер рН 7,4 и 150 мМ NaCl. Окисление проводили при $v = 650$ мВ и $I = 14$ мА. Стрелкой указан момент начала диализа.

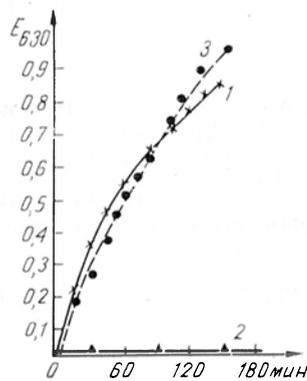


Рис. 6. Скорость окисления анилина в электрохимической ячейке.

Инкубационная смесь объемом 150 мл содержала 20 мМ фосфатный буфер рН 7,4, 150 мМ NaCl и 1 мМ анилин. 1 — окисление анилина при вынесении катода при $v = 9,5$ В и $I = 14$ мА; 2 — при вынесении анода при $v = 650$ мВ и $I = 14$ мА; 3 — контрольное окисление анилина при $v = 650$ мВ и $I = 14$ мА.

фенол, образовавшийся в диализате при пропускании тока через раствор АН (см. рис. 5, кривая 1), начинает удаляться в диализационную жидкость после выключения тока и подсоединения диализационной камеры (см. рис. 5, кривая 2).

Было проведено дополнительное исследование с одним из окисляемых субстратов анилином для выяснения места его окисления в электрохимической системе. С этой целью из нее выносили либо катод, либо анод. Их помещали в стеклянную трубочку, наполненную насыщенным раствором КСl, которая соединялась с ячейкой через агаровый мостик. Судя по кривым, приведенным на рис. 6, отчетливо видно, что АН окисляется на аноде (см. рис. 6, кривая 1). Однако при вынесении катода п-аминофенол начинал образовываться при более высоком потенциале. Потенциал его относительно насыщенного каломельного электрода устанавливался таким образом, чтобы сила тока была та же (14 мА), что и в случае, когда из электрохимической ячейки анод и катод не выносили.

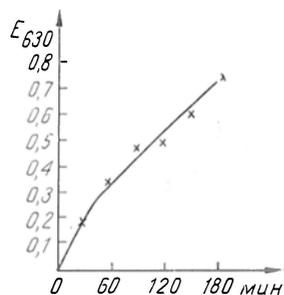


Рис. 7. Окисление анилина в гепаринизированной крови собаки.

Инкубационная смесь содержала 150 мл крови собаки, 2000 ЕД гепарина и 5 мМ анилин. Окисление анилина проводили при $v = 1$ В и $i = 14$ мА.

Электрохимическая система способна окислять АН и в крови. Кривая, изображенная на рис. 7, характеризует скорость образования п-аминофенола в гепаринизированной крови собаки. Так как сила тока при пропускании его через кровь снижается в связи с высоким ее сопротивлением, то потенциал катода необходимо было увеличить до -1 В. Окисление АН в п-аминофенол в такой системе не сопровождалось гемолизом эритроцитов, измеренным по поглощению при 545 нм.

Таким образом, электрохимическая система способна окислять различные соединения, что делает ее похожей на цитохром *p*-450-гидроксилазную систему мембран эндоплазматического ретикулума печени. В результате электролиза неполярные субстраты гидроксирования становятся более гидрофильными, и их удаётся удалить с помощью диализа. Весьма вероятно, что дальнейшая разработка и усовершенствование подобных установок позволяет создать модельную систему, способную выполнять окислительную детоксицирующую функцию печени.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арчаков А. И. Микросомальное окисление. М., 1975.— 2. Чёрт С. И. Транспортная функция сывороточного альбумина. Бухарест, 1975.— 3. Арчаков А. И., Карузина И. И., Кокарева И. С. et al.— *Biochem. Pharmacol.*, 1974, v. 23, p. 1053—1063.— 4. Pfeiffer P. M., McCauley P. B.— *J. Biol. Chem.*, 1971, v. 246, p. 6401—6408.— 5. Тодоров И. Клинические лабораторные исследования в педиатрии. София, 1960.

Поступила 15/IV 1978 г.

SIMULATION OF OXIDATIVE DETOXICATING FUNCTION OF LIVER TISSUE USING REACTIONS OF ELECTROCHEMICAL OXIDATION

G. F. Zhirnov, M. V. Izotov, I. I. Karuzina, Yu. M. Lopukhin, A. I. Archakov

Research Centre, N. I. Pirogov II Medical School, Moscow

An electrochemical system is developed, which permits to simulate oxidative reactions, processing in presence of cytochrome P-450. This system, combined with a dialyzing apparatus, may be used for oxidation and elimination of various hydrophobic substances of exo- and endogenous origin from animal and human organisms.

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

- Труфанов А. В. Противоопухолевое действие ретинола и его производных (ретиноидов) 115
- Троицкий Г. В., Селиванова К. Ф., Глушкова О. В., Корниенко Н. В., Завьялов В. П. Изучение субфракционного состава и структурных характеристик иммуноглобулинов G при некоторых патологических состояниях 122
- Покровский Б. В. Получение кристаллической L-треонин (серин)-дегидратазы из печени крыс 128
- Шестаков В. А., Бойчевская Н. О., Шерстнев М. П. Хемилюминесценция плазмы крови в присутствии перекиси водорода 132
- Пузач С. С., Островский Ю. М. Антивитаминная активность тиаминазы из *B. thiaminolyticus* при различных способах введения фермента в организм животного 137
- Берштейн Л. М., Цырлина Е. В., Семглазов В. Ф., Валдина Е. А., Львович Е. Г. Взаимосвязь экскреции холестерина с мочой у онкологических больных с некоторыми гормонально-метаболическими параметрами и влияние на этот процесс некоторых лекарственных препаратов 144
- Шафран М. Г. Выделение и некоторые свойства миелопероксидазы костного мозга человека 149
- Городецкий В. К., Исакова З. С. Кетосахара в моче больных хроническим панкреатитом 153
- Пушкарев И. А., Гусева Л. Н., Борисов Л. Л. Идентификация моноклоновых иммуноглобулинов методом иммунофиксированного электрофореза на ацетатцеллюлозных пленках и в агарозном геле 158
- Цагикян Т. А., Нестерова А. П., Фролова И. А. Состояние внешнесекреторной функции поджелудочной железы у больных хроническим энтероколитом 161
- Величко М. Г., Требухина Р. В., Островский Ю. М., Петушок В. Г., Бородинский А. Н. Влияние окситиамина на обмен пирувата и лактата в тканях крыс 166
- Кожевникова К. А. Влияние инсулина и гидрокортизона на пируваткиназу из мозгового и коркового слоев почек кроликов 171
- Trufanov, A. V.: The Antitumora Effect of Retinol and Its Derivatives (Retinoids) 115
- Troitsky, G. V., Selivanova, K. F., Glushkova, O. V., Kornienko, N. V., Zav'yalov, V. P.: Studies on Subfractional Composition and Structural Properties of Immunoglobulins G in Some Pathological States 122
- Pokrovsky, B. V.: Isolation of Crystalline L-threonine (Serine) Dehydratase from Rat Liver 128
- Shestakov, V. A., Boytchevskaya, N. O., Sherstnev, M. P.: Chemoluminescence of Blood Plasma in Presence of Hydrogen Peroxide 132
- Puzach, S. S., Ostrovsky, Yu. M.: Antivitamin Activity of Thiaminase from *B. thiaminolyticus* under Conditions of Different Ways of the Enzyme Administration into Animals 137
- Berstein, L. M., Tsyrlina, E. V., Semglazov, V. F., Valdina, E. A., Lvovich, E. G.: Interrelationship Between Excretion of Cholesterol with Urine in Oncologic Patients and Some Hormone-Metabolic Patterns as well as Effect of Drugs on These Processes 144
- Shafraan, M. G.: Isolation and Some Properties of Myeloperoxidase from Human Bone Marrow 149
- Gorodetsky, V. K., Isakova, Z. S.: Ketosugars in Urine of Patients with Chronic Pancreatitis 153
- Pushkarev, I. A., Guseva, L. N., Borisov, L. L.: Identification of Monoclonic Immunoglobulins Using Immunofixating Electrophoresis on Acetate Cellulose Films and Agarose Gel 158
- Tsagikyan, T. A., Nesterova, A. P., Frolova, I. A.: The State of Exocrine Function of Pancreas in Patients with Chronic Enterocolitis 161
- Velichko, M. G., Trebukhina, R. V., Ostrovsky, Yu. M., Petushok, V. G., Borodinsky, A. N.: Effect of Hydroxythiamin on Metabolism of Pyruvate and Lactate in Rat Tissues 166
- Kozhevnikova, K. A.: Effect of Insulin and Hydrocortisone on Pyruvate Kinase from Medullar and Cortical Layers of Rabbit Kidney 171

- Попов А. В., Кузнецов А. С. Изучение превращения липопротеидов в сосудистой стенке методом ультрацентрифугирования экстракта аорты в ступенчатом градиенте плотности 176
- Панченко Л. Ф., Ламчингийн Т., Герасимов А. М., Суханов Ю. С., Коноплина Л. А. Активность супероксиддисмутазы крови детей с железодефицитными анемиями 181
- Перова Н. В., Герасимова Е. Н., Чернышева Н. П., Никитина Н. А., Щербаклова И. А., Гаджалова С. И., Сучкова С. Н., Зыкова В. П., Задога А. А. Изменение апопротеинов липопротеидов очень низкой плотности плазмы крови при гипертриглицеридемии 185
- Правдина Н. Ф., Шобухов В. М., Веселовская Т. В., Смирнова Н. Р., Галегов Г. А. Влияние метотрексата на активность ДНК-зависимых РНК-полимераз (А и В) в селезенках мышей, зараженных вирусом лейкоза Раушера, и на развитие вирусиндуцированного лейкоза 193
- Брусова Е. Г., Кривченкова Р. С. Нарушение окислительного дезаминирования биогенных аминов в сердечной мышце при экспериментальном атеросклерозе 198
- Солитернова И. Б., Никольцева Н. Г. Активность постгепариновой липопротеидлипазы плазмы крови кроликов 204
- Ляпина Л. А., Кудряшов В. А. Тромботические осложнения при блокирующем влиянии протаминсульфата на ферментативный фибринолиз в крови животных при возбуждении противосвертывающей системы 209
- Цветкова И. В., Золотухина Т. В., Розенфельд Е. Л., Розовский И. С. Активность гликозидаз в культуре клеток амниотической жидкости 214
- Жирнов Г. Ф., Изотов М. В., Карузина И. И., Лопухин Ю. М., Арчаков А. И. Моделирование окислительной детоксигирующей функции печени с помощью реакций электрохимического окисления 218
- Popov, A. V., Kuznetsov, A. S.: Study of Lipoprotein Conversions in Blood Vessel Wall Using Ultracentrifugation of Aorta Extract in Stepwise Density Gradient 176
- Panchenko, L. F., Lamchingiyun, T., Gerasimov, A. M., Sukhanov, Yu. S., Konoplina, L. A.: Activity of Superoxide Dismutase in Blood of Children with Iron Deficiency Anemia 181
- Perova, N. V., Gerasimova, E. N., Chernysheva, N. P., Nikitina, N. A., Scherbakova, I. A., Gadzhalova, S. I., Suchkova, S. N., Zyкова, V. P., Zadoya, A. A.: Alteration of Apoproteins of Very Low Density Lipoproteins from Blood Plasma in Hypertriglyceridemia 185
- Pravdina, N. F., Shobukhov, V. M., Veselovskaya, T. V., Smirnova, N. R., Galegov, G. A.: Effect of Methotrexate on the Activity of DNA-Dependent RNA Polymerases A and B in Spleen of Mice, Infected with Rauscher's Leukosis Virus as Well as on Development of Virus-Induced Leukosis 193
- Brusova, E. G., Krivchenkova, R. S.: Impairment of Oxidative Deamination of Biogenic Amines in Heart Muscle under Conditions of Experimental Atherosclerosis 198
- Soliternova, I. B., Nikul'cheva, N. G.: Activity of Postheparin Lipoprotein Lipase from Rabbit Blood Plasma 204
- Lyapina, L. A., Kudryashov, V. A.: Thrombotic Complications in Blocking Effect of Protamine-Sulfate on Non-Enzymatic Fibrinolysis in Animal Blood under Conditions of Activation of Anticoagulation System 209
- Tsvetkova, I. V., Zolotukhina, T. V., Rosenfeld, E. L., Rosovsky, I. S.: Activity of Glycosidases in Cell Culture of Human Amniotic Fluid 214
- Zhirnov, G. F., Izotov, M. V., Karuzina, I. I., Lopukhin, Yu. M., Archakov, A. I.: Stimulation of Oxidative Detoxifying Function of Liver Tissue Using Reactions of Electrochemical Oxidation 218

Техн. редактор Н. К. Арибжанова

Корректор В. С. Юрчук

Сдано в набор 4.01.79. Подписано к печати 14.02.79. Формат бумаги 70×108¹/₁₆
печ. л. 7,0 (условных 9,80 л.) уч.-изд. л. 10,73 Бум. тип. № 1 Тираж 2041 экз.

Издательство «Медицина», Москва, Петроввергский пер. 6/8
Заказ 28 Чеховский полиграфический комбинат Союзполиграфпрома
Государственного комитета СССР
по делам издательств, полиграфии и книжной торговли
г. Чехов Московской области