

Архив журнала

Вопросы медицинской химии

ISSN 0042-8809

1986

Внимание! Распознавание текста проведено в автоматическом режиме для облегчения работы поисковых систем. Будьте внимательны при копировании, возможны ошибки и неточности. Используйте сканированный графический вариант.

Archive of journal

Voprosy meditsinskoi khimii

ISSN 0042-8809

1986

Attention! OCR has been performed automatically for search engines only. Be careful when copying, errors are possible. Use scanned picture as standard.

<http://pbmc.ibmc.msk.ru>

ТОМ XXXII

ВЫПУСК 2

МАРТ—АПРЕЛЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



МОСКВА · МЕДИЦИНА · 1986

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. И. МАЗУРОВ (зам. главного редактора), Т. Т. БЕРЕЗОВ, Е. Н. ГЕРАСИМОВА,
В. З. ГОРКИН, И. Б. ЗБАРСКИЙ, А. Н. КЛИМОВ, Б. Ф. КОРОВКИН, Л. А. ЛОК-
ШИНА, В. Н. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАНЧЕНКО, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ, Е. Л. РО-
ЗЕНФЕЛЬД, Ю. А. РОМАКОВ (ответственный секретарь), В. А. САКС, С. Е. СЕ-
ВЕРИН, В. Б. СПИРИЧЕВ

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

БАЕВ А. А. (Москва)
БЕЛИЦЕР В. А. (Киев)
БЫЧКОВ С. М. (Москва)
КОНСТАНТИНОВ А. А. (Хабаровск)
КУДРЯШОВ Б. А. (Москва)
ЛЯХОВИЧ В. В. (Новосибирск)
ПАСХИНА Т. С. (Москва)

ТРОИЦКИЙ Г. В. (Симферополь)
ТУРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)
ТЯХЕПЫЛЬД Л. Я. (Тарту)
УТЕВСКИЙ А. М. (Харьков)
ШАПОТ В. С. (Москва)
ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)
ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)



Адрес редакции журнала:

Москва, Солянка, 14

АМН СССР

Тел. 297-16-44

Зав. редакцией Л. А. Фирсова

CONTENT OF ETHANOL, MALONIC DIALDEHYDE AND ACTIVITY OF THE ETHANOL-OXIDIZING SYSTEM IN BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH ALCOHOLISM TREATED WITH ANTABUSE

I. D. Mansurova, M. S. Istankulov

Laboratory of Human and Animal Biochemistry,
Department of Nature Protection, Academy of
Sciences of the Tadzhik SSR, Republican
Narcologic Department, Ministry of Public
Health of the Tadzhik SSR, Dushanbe

222 patients with chronic alcoholism (the second step of the disease) at the state of abstinence and in the period of alcohol con-

sumption were studied. In the course of treatment the patients received about 0.5 g of teturam per day within 4 months. In blood serum of the patients content of ethanol, malonic dialdehyde and activity of ethanol-oxidizing system (EOS) were estimated. In practically healthy persons, consuming no ethanol, no activity of EOS was noted as a rule. But in the patients with chronic alcoholism activity of EOS was 100-fold increased with simultaneous elevation in ethanol and malonic dialdehyde content in blood serum. After treatment with teturam content of ethanol, malonic dialdehyde and, especially, activity of the EOS were decreased in blood of the patients. After the treatment during 4 months activity of EOS was still distinctly higher in the patients than in healthy persons.

УДК 612.112.94.015.3:577.113]-08

Е. О. Морозова, М. Н. Блинов

**К ВОПРОСУ О ПОДБОРЕ АДЕКВАТНЫХ ИНГИБИТОРОВ
РИБОНУКЛЕАЗ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ПОЛИСОМ В ЛИМФОЦИТАХ
ЧЕЛОВЕКА**

Ленинградский НИИ гематологии и переливания крови

Ранее [2] было показано, что в лимфоцитах периферической крови относительное содержание полисом незначительно и в основном обнаруживаются моносомы. После трансформации лимфоцитов фитогемагглютинином (ФГА) большая часть рибосом находилась в составе полисом, что подтверждает существующие в литературе данные о соотношении полисом и моносом в стимулированных и нестимулированных лимфоцитах. В лейкозных же лимфоцитах больных хроническим лимфолейкозом, клетках, находящихся в состоянии физиологического покоя, обнаружено аналогичное стимулированным ФГА лимфоцитам содержание полисом. Поскольку известно, что в нестимулированных лимфоцитах высока активность рибонуклеаз, устойчивых к действию многих ингибиторов [6], возникло предположение, что полученные нами данные о низком отношении содержания полисом [2] могли быть обусловлены применением неадекватного для этих клеток ингибитора РНКаз из печени. Другие исследователи [4, 8, 9, 12], также констатирующие низкий уровень полисом в покоящихся лимфоцитах, почти не использовали ингибиторы рибонуклеаз.

В связи с вышеизложенным мы попытались оценить полисомные комплексы в нестимулированных лимфоцитах, применив в качестве ингибиторов

РНКаз природный белок — ингибитор из печени, гепарин и диэтилпирикарбонат (ДПК). Цель работы состояла также в том, чтобы показать необычность воздействия гепарина на рибосомный материал клеток лимфоидного ряда.

Методика

Лимфоциты изолировали из дефибрирированной крови доноров, из селезенки, аденоидов и из крови больных хроническим лимфолейкозом [2].

Для получения меченых полипептидов лимфоциты (10^7 клеток/мл) инкубировали 5 мин с ^3H -лейцином (20 мкКи/мл) в Кребс-Рингера фосфатном буфере pH 7,4 с гомологичной сывороткой IV группы. Инкубацию лимфоцитов с ^3H -уридином (5 мкКи/мл) в течение 20–24 ч проводили в тех же условиях.

Постмитохондриальную фракцию получали из лимфоцитов, суспендированных при 0°C в двух объемах 10 мМ трис-HCl буфера pH 7,5, содержащего 15 мМ KCl, 3 мМ MgCl_2 (ТКМ-буфер) и 0,25 М сахарозу, и добавляли коммерческий ингибитор РНКаз («Searle»), 2 ед/мл, либо клеточный сок печени ($\frac{3}{4}$ объема), гепарин, 100 мкг/мл, или ДПК до конечной концентрации 0,5–1 %. В качестве детергентов применяли тритон X-100 в конечной концентрации 1 % и смесь тритона X-100 с дезоксихолатом натрия в конечных концентрациях 0,5 %. Через 3–5 мин лизаты центрифугировали 10 мин при 27 000 g и 4 °C.

Для препаративного выделения рибосомного материала постмитохондриальную фракцию на-слаивали на 1 М сахарозу, приготовленную на ТКМ-буфере, и центрифугировали в течение 1 ч при 250 000 g. Осадок полисом растворяли в ТКМ-буфере и просветляли, центрифугируя

5 мин при 27 000 g. Полученные препараты представляли собой чистый рибосомный материал ($A_{260}/A_{280} = 1,6—1,8$ и $A_{260}/A_{235} = 1,3—1,6$), который фракционировали в градиенте плотности сахарозы. Необходимо заметить, что при использовании в качестве ингибитора РНКаз ДПК для выделения рибосомного материала этим способом количество клеток должно быть увеличено во много раз, по сравнению с таковым при использовании природного ингибитора и гепарина, вследствие образования нерастворимых конгломератов рибосом при ультрацентрифугировании, что в наших условиях практически было неосуществимо. Поэтому при использовании ДПК фракционированию в градиенте плотности сахарозы подвергали постмитохондриальную фракцию.

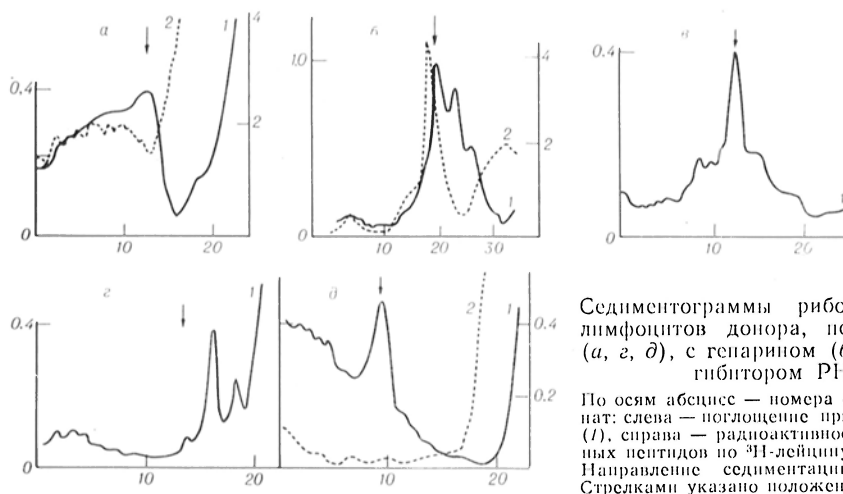
Рибосомный материал фракционировали в градиенте плотности сахарозы в роторе SW 25—1 или SW 40 (Спинко) в течение 80—360 мин. Оптическую плотность регистрировали на Увикорде, а радиоактивность полипептидов во фракциях градиента — после осаждения клетонеперастворимого материала 10 % ТХУ. Пробу просчитывали в сцинтилляционном счетчике СБС-1 или Марк-3. Относительное содержание полисом рассчитывали по оптической плотности, принимая за 100 % таковую суммарной фракции рибосомного материала, или планиметрически. При осуществлении реакции образования пептидил-пуromидина к постмитохондриальной фракции добавляли пуromидин в конечной концентрации 0,1 мМ и инкубировали 15 мин при 37 °С [7]. Далее лизат фракционировали в градиенте плотности сахарозы. Полноту реакции оценивали по освобождению из рибосом меченых растущих пептидов. Для оценки диссоциации рибосомный материал насланвали на градиент сахарозы, содержащий 0,5 М КСl.

Результаты и обсуждение

При исследовании профилей седиментации рибосомного материала лимфоцитов периферической крови доноров с разными ингибиторами РНКаз (природным белком-ингибитором из

печени, гепарином и ДПК) было показано, что только с ДПК удается идентифицировать полисомные комплексы в значительном количестве (более 70 %) (см. рисунок, а). С гепарином и ингибитором из печени полисомы определялись в незначительном количестве (см. рисунок, б и в).

При использовании 0,5 % ДПК полисомы обнаруживались как по оптическому поглощению, так и по радиоактивности растущих пептидов. Аналогичные профили распределения рибосомного материала по радиоактивности РНК мы получали при анализе лимфоцитов, предварительно инкубированных в течение суток с ^3H -уридин. Нам впервые удалось получить данные о высоком содержании полисом в лимфоцитах периферической крови благодаря использованию ДПК, который оказался сильным ингибитором РНКаз лимфоцитов. Следует отметить, что Соорег и соавт. [8] пытались выделить полисомы из лимфоцитов с помощью ДПК, тем не менее им не удалось получить их в значительном количестве. Вероятно, это было связано с применением слишком низкой концентрации ДПК (0,05 %). По нашим данным, для получения полисом из лимфоцитов необходимо добавлять ДПК в более высокой концентрации (0,5—1 %), а pH среды выделения полисом должен быть не ниже 7,8. Более низкие (0,05—0,1 %) концентрации ДПК недостаточно эффективно ингибировали РНКазы в лимфоцитах, а в буфере pH 7,5—7,6 полисомы из лимфоцитов определить не удавалось; при



сахарозы 15—40 % (а, б, г) и 12—30 % с 0,5 М КСl (в), 40 000 об/мин, 180 мин (а, б), 110 мин (г) и 240 мин (в); градиент сахарозы 10—35 % (б).

Седиментограммы рибосомного материала лимфоцитов донора, полученного с ДПК (а, г, д), с гепарином (б) и природным ингибитором РНКаз (в).

По осям абсцисс — номера фракций, по осям ординат: слева — поглощение при 260 нм (в ед. опт. пл.) (1), справа — радиоактивность вновь синтезированных пептидов по ^3H -лейцину (в имп/мин $\times 10^{-3}$) (2). Направление седиментации — справа налево. Стрелками указано положение моносом. Градиенты: 25 000 об/мин, 240 мин.

этом обнаруживались в основном моносомы. Существенное значение для успешного выделения полисом имеет выбор детергентов. Наиболее подходящими для этого оказались тритон X-100 в смеси с дезоксихолатом. При использовании одного тритона X-100 выход рибосомного материала из лимфоцитов был незначительным.

Для доказательства полисомной природы быстроседimentирующего УФ-поглощающего материала мы использовали следующие критерии. Рибосомы и полисомы, обработанные ДПК, в условиях высокой ионной силы полностью диссоциировали на субъединицы (см. рисунок, 2) и в области полисом почти отсутствовал УФ-поглощающий материал. Полная диссоциация рибосом происходила, скорее всего, вследствие полнанионных свойств ДПК [5]. Рибосомы постмитохондриального лизата осуществляли пептидилтрансферазную реакцию с пуромидином. В буфере с низкой ионной силой рибосомный материал распределялся в области полисом и моносом, а меченые полипептиды локализовались в верхней части градиента (рис. 2), высвобождаясь из 60S-субъединиц, что свидетельствует об отсутствии повреждения пептидилтрансферазной функции рибосом при использовании ДПК. И, наконец, содержание поли(А)РНК в полисомах составило, по нашим данным [3], 1—3 % от общей РНК, что хорошо согласуется с литературными данными [1].

Обращает на себя внимание необычность распределения рибосомного материала, выделенного с гепарином (100 мкг/мл; см. рисунок, 6). Помимо моносомного пика, обнаруживаются пики 60S- и 40S-субъединиц рибосом, что свидетельствует о диссоциации рибосом. При этом растущие полипептиды не освобождаются из моносом. Однако при повышении концентрации гепарина до 500 мкг/мл диссоциация моносом увеличивалась и частично освобождались растущие полипептиды. Дальнейшее повышение концентрации гепарина до 1 мг/мл не увеличивало диссоциации. Аналогичную картину распределения рибосомного материала при добавлении гепарина мы получали и для лимфоцитов, выделенных из периферической крови больных хроническим лимфолейкозом, а также из селезенки и аденоидов. Поэтому резуль-

таты наших опытов позволяют считать гепарин неподходящим ингибитором РНКаз при выделении полисом из клеток лимфоидного ряда.

Итак, представленные данные позволяют заключить, что среди выбранных ингибиторов РНКаз только ДПК дают возможность идентифицировать нативные полисомные комплексы лимфоцитов периферической крови. При использовании природного ингибитора из печени на долю полисом приходилось 20—25 % [1], а с ДПК мы определяли около 70 % полисом. Это свидетельствует о том, что ингибитор из печени не в полной мере блокирует РНКазную активность в периферических лимфоцитах. В лимфоцитах больных хроническим лимфолейкозом содержание полисом было одинаковым как с белком-ингибитором, так и с ДПК (50—70 %) [3]. Поскольку в популяции лимфоцитов, изолированных из периферической крови доноров, основную массу (около 70 %) составляют Т-лимфоциты, а при хроническом лимфолейкозе, напротив, — В-клетки, можно предположить, что ингибитор из печени в меньшей мере блокирует РНКазную активность в Т-лимфоцитах.

Гепарин оказался неадекватным ингибитором РНКаз во всех исследованных клетках лимфоидного происхождения, так как приводил к дезагрегации полисом и диссоциации рибосом. Похожее действие гепарина на рибосомный материал миеомных клеток мыши (линия Р3), приводящее к уменьшению константы седиментации полисом и появлению рибосом и субъединиц, описано в литературе [10]. Судя по литературным данным [11, 13—15], гепарин не оказывает диссоциирующего действия на полисомы и рибосомы в других тканях даже при очень высоких концентрациях (4 мг/мл). Исходя из этого можно предположить, что повышенная диссоциация рибосомного материала под влиянием гепарина обусловлена тканевыми особенностями лимфоидных клеток, нехарактерными для других известных тканей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гайцхоки В. С. Информационные РНК клеток животных. М., 1980, с. 47—96.
2. Морозова Е. О., Блинов М. Н. — Цитология, 1982, № 7, с. 764—769.
3. Морозова Е. О., Блинов М. Н. — Там же, 1984, № 12, с. 1384—1390.

4. Ahern T., Kay J. E. — Biochim. biophys. Acta, 1973, vol. 331, p. 91—101.
5. Anderson J. M., Key J. L. — Plant Physiol., 1971, vol. 48, p. 801—805.
6. Berger S. L., Birkenmeier C. S. — Biochemistry (Wash.), 1979, vol. 18, p. 5143—5149.
7. Castles J. J., Wood I. G. — In: Methods in Molecular Biology. New York, 1972, vol. 2, p. 1—28.
8. Cooper H. L., Berger S. L., Braverman R. — J. biol. Chem., 1976, vol. 251, p. 4891—4900.
9. Cooper H. L., Braverman R. — J. Cell. Physiol., 1977, vol. 93, p. 213—226.
10. Fredlin P. J., Patterson R. J. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1980, vol. 93, p. 521—527.
11. Goertz B. — Mech. Ageing Developm., 1979, vol. 10, p. 261—271.
12. Kay J. E., Ahern T., Atkins M. — Biochim. biophys. Acta, 1971, vol. 247, p. 322—334.
13. Meedel T. H., Levine E. M. — J. Cell. Physiol., 1978, vol. 94, p. 229—242.
14. Palmier R. D. — Biochemistry (Wash.), 1974, vol. 13, p. 3606—3615.
15. Roskam W. G., Gruber M., Greet A. B. — Biochim. biophys. Acta, 1976, vol. 435, p. 91—94.

Поступила 27.06.85

SEARCH FOR ADEQUATE INHIBITORS OF RIBONUCLEASES IN STUDIES OF POLYSOMES FROM HUMAN LYMPHOCYTES

E. O. Morozova, M. N. Blinov

Laboratory of Biochemistry, Institute of Hematology and Blood Transfusion, Leningrad

Polysome profiles are described for lymphocytes of donor peripheral blood treated with various inhibitors of RNAases. The most effective inhibitor was diethyl pyrocarbonate, which enabled to maintain high content of polysomes (up to 70 %) in these cells. Ribosomes, treated with diethyl pyrocarbonate, exhibited functional activity in the pyromyocine test. A natural inhibitor of RNAases from liver tissue inhibited incompletely the enzymatic activity in lymphocytes. Heparin proved to be an inadequate inhibitor of RNAases in all the cells of lymphoid origin (lymphocytes from peripheral blood of donors and of the patients with chronic lympholeukosis, lymphocytes isolated from adenoids and spleen tissue); it induced disaggregation of polysomes and dissociation of ribosomes.

УДК 616.895.4-085.252.433:547.945.1]-036.8

Т. А. Бельтюкова, Д. Л. Хмелевский, О. А. Гладышев

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ПАРЛОДЕЛА ПРИ РЕЗИСТЕНТНЫХ ДЕПРЕССИЯХ И ЕГО СВЯЗЬ С ВЛИЯНИЕМ НА ОБМЕН ДОФАМИНА

ВНИИ общей и судебной психиатрии им. В. П. Сербского, Москва

В исследованиях последних лет получены данные о непосредственной связи формирования аффективных расстройств с нарушениями метаболизма биогенных аминов [1, 8]. В частности, высказано предположение о том, что развитие депрессии сопровождается абсолютным или относительным снижением содержания катехоламинов в ЦНС [6].

Особое внимание исследователей привлекает дофамин, который не только является предшественником норадреналина, но и способен самостоятельно функционировать как медиатор в некоторых отделах мозга. Как показали экспериментальные и клинические исследования ряда авторов, положительный терапевтический эффект антидепрессантов сопровождается значительным повышением концентрации дофамина [2].

В связи с этим представляет несомненный интерес изучение психотропной активности агониста дофамина парло-

дела (бромокриптина). Парлодел (2-бром- α -эргокриптин метансульфонат) является синтетическим алкалоидом спорыньи [4]. Важным звеном механизма действия парлодела является способность этого препарата стимулировать постсинаптические дофаминовые рецепторы мозга, что приводит к торможению обмена дофамина и, таким образом, способствует повышению концентрации этого нейромедиатора в синаптической щели [5]. Сказанное выше позволяет предположить, что парлодел может оказаться эффективным при лечении больных депрессией с дефицитом дофамина.

Целью настоящего исследования было выявление сравнительной эффективности парлодела при резистентных состояниях — депрессиях различной клинической структуры, а также установление клинико-биохимических корреляций между антидепрессивной активностью препарата и содержанием катехоламинов в крови больных.