

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича

Архив журнала

## Вопросы медицинской химии

*ISSN 0042-8809*

1989 том 35 выпуск 3

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

## Voprosy meditsinskoï khimii

The journal archive

*ISSN 0042-8809*

1989 volume 35 issue 3

**Attention!** OCR has been performed automatically for search engines only. Be careful when copying, errors are possible.

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

ТОМ 35

ВЫПУСК 3

МАЙ — ИЮНЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

ВОПРОСЫ  
МЕДИЦИНСКОЙ  
ХИМИИ



МОСКВА · МЕДИЦИНА · 1989



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

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

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)

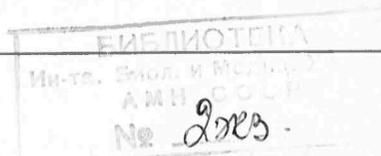
ТУРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)

ТЯХЕПЫЛД Л. Я. (Тарту)

ШАПОВ В. С. (Москва)

ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)

ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)



С. М. Ершиков

## ИНТЕНСИВНОСТЬ ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗА В ПЕЧЕНИ КРЫС В ВОССТАНОВИТЕЛЬНОМ ПЕРИОДЕ ПОСЛЕ ДЛИТЕЛЬНОЙ ГИПОКИНЕЗИИ

Кафедра биохимии Ярославского медицинского института

Исследование обмена веществ при гипокинезии и в периоде восстановления представляет значительный интерес для разработки рациональных мероприятий по профилактике и коррекции последствий гипокинетического синдрома [12]. Ранее [4] нами было показано, что в первые 7 сут гипокинезии происходит активация глюконеогенеза в печени крыс, обусловленная стрессовой реакцией на обездвиживание, сменяющаяся нормализацией скорости новообразования глюкозы на 15—30-е сутки. В настоящей работе приводятся данные о состоянии глюконеогенеза в печени крыс при 60-суточной гипокинезии и в восстановительном периоде.

### Методика

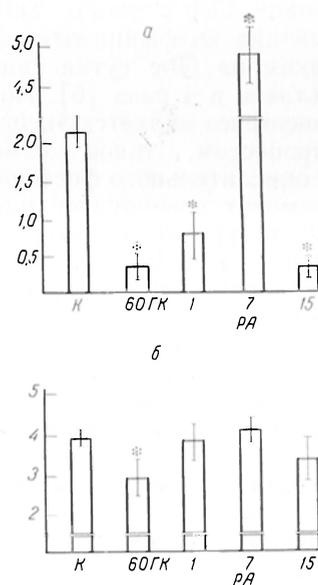
Опыты проводили на 60 белых беспородных крысах исходной массой 170—200 г (из них 32 — контрольная группа). Ограничения двигательной активности достигали содержанием животных в индивидуальных клетках-пеналах из органического стекла. После 60-суточного обездвиживания крыс переводили в общие клетки. Контрольные животные все время находились в обычных клетках вивария. Крыс декапитировали на 60-е сутки обездвиживания и на 1, 7 и 15-е сутки восстановительного периода. Перед умерщвлением крысы голодали в течение 16—18 ч. Интенсивность глюконеогенеза определяли при инкубации срезов печени в Krebs-рингеровском бикарбонатном буфере (рН 7,4) с добавлением одного из субстратов (L-аланин, L-аспарагиновая, L-глутаминовая,  $\alpha$ -кетоглутаровая, пировиноградная кислоты, глицерин) в конечной концентрации 0,01 М. Инкубацию осуществляли в аэробных условиях при 40 °С и постоянном покачивании в течение 1 ч, как описано ранее [4]. Количество глюкозы в инкубационной среде определяли глюкозооксидазным методом [3], содержание белка в срезах — по методу [17]. Скорость глюконеогенеза выражали в микромолях новообразованной глюкозы в час в расчете на 10 мг белка срезов [1]. В сыворотке крови исследовали содержание глюкозы [3], в печени — содержание гликогена [14, 15].

### Результаты и обсуждение

Проведенное исследование показало, что 2-месячное пребывание животных в условиях ограничения подвижности

приводит к значительному снижению интенсивности глюконеогенеза в печени, в наибольшей степени выраженному при использовании в качестве субстратов аланина и пирувата, в наименьшей — при использовании глутамата (см. таблицу). Содержание гликогена в печени также резко снижено, в сыворотке крови отмечается достоверная гипогликемия (см. рисунок).

Указанные изменения отражают метаболический статус, складывающийся в результате длительной гипокинезии. Быстрое истощение запасов углеводов в ранние сроки обездвиживания, переключение энергообмена тканей на преимущественно «жировой» тип, усиление катаболизма липидов приводят к значительному увеличению в крови содержания свободных жирных кислот [7]. Избыток этих метаболитов влечет за собой снижение скорости окисли-



Содержание гликогена (в г%) в ткани печени (а) и глюкозы (в ммоль/л) в сыворотке крови (б) крыс на 60-е сутки гипокинезии и в периоде реадaptации.

Звездочкой обозначены статистически достоверные различия с контролем. По оси абсцисс К — контрольные показатели, цифры — сроки (в сут) гипокинезии и реадaptации (РА).

**Образование глюкозы из различных субстратов срезами печени крыс при 60-суточной гипокинезии и в восстановительном периоде (в мкмоль/ч на 10 мг белка)**

Добавленный субстрат	Гипокинезия (60-е сутки)	Восстановительный период, сутки		
		1-е	7-е	15-е
Без субстрата:				
опыт	0,18±0,02* (5)	0,44±0,06 (7)	0,64±0,07* (7)	0,17±0,02* (9)
контроль	0,33±0,03 (8)	0,36±0,04 (8)	0,36±0,04 (24)	0,33±0,03 (8)
Аланин:				
опыт	0,23±0,01* (5)	1,08±0,12 (7)	1,00±0,17 (6)	0,21±0,03* (9)
контроль	0,63±0,08 (8)	1,01±0,07 (24)	1,01±0,07 (24)	0,63±0,08 (8)
Аспарагиновая кислота:				
опыт	0,38±0,04* (5)	1,78±0,24 (7)	1,78±0,13* (7)	0,28±0,05* (9)
контроль	0,72±0,07 (8)	1,29±0,09 (24)	1,29±0,09 (24)	0,72±0,07 (8)
Глутаминовая кислота:				
опыт	0,62±0,02* (5)	1,79±0,23 (7)	1,70±0,22 (7)	0,29±0,04* (9)
контроль	0,97±0,07 (8)	1,46±0,13 (24)	1,46±0,13 (24)	0,97±0,07 (8)
α-Кетоглутаровая кислота:				
опыт	0,34±0,02* (5)	1,52±0,19 (7)	1,83±0,16* (6)	0,25±0,04* (9)
контроль	0,79±0,07 (8)	1,29±0,09 (23)	1,29±0,09 (23)	0,79±0,07 (8)
Пировиноградная кислота:				
опыт	0,22±0,02* (5)	0,70±0,07* (7)	0,89±0,11* (7)	0,24±0,04* (8)
контроль	0,45±0,04 (8)	0,52±0,04 (24)	0,52±0,04 (24)	0,45±0,04 (8)
Глицерин:				
опыт	0,29±0,03* (5)	0,54±0,07 (7)	0,74±0,06* (7)	0,18±0,04* (8)
контроль	0,46±0,03 (8)	0,49±0,05 (20)	0,49±0,05 (20)	0,46±0,03 (8)

Примечание. Звездочка — достоверные различия с контролем, в скобках — число животных в серии.

тельного фосфорилирования в митохондриях [11] и, следовательно, понижение уровня АТФ в тканях. Так, в печени, величина коэффициента фосфорилирования на 60-е сутки гипокинезии снижалась в 4 раза [6]. Поскольку глюконеогенез является энергозависимым процессом, такое изменение скорости окислительного фосфорилирования тормозит новообразование глюкозы уже на уровне карбоксилирования пирувата [5]. В пользу наличия такого механизма ингибирования глюконеогенеза при длительном обездвижении свидетельствует понижение содержания оксалоацетата в печени гипокинетических крыс на 60-е сутки опыта, установленное в нашей лаборатории [2].

Возвращение животных к обычным условиям существования является поначалу новым экстремальным воздействием [13, 16], которому подвергается организм с уже измененным гормональным и метаболическим фоном. При переходе от гипокинезии к нормальному двигательному режиму резко возрастает нагрузка на мышечную и сердечно-сосудистую системы. Переход обмена веществ на новый уровень

энергетических потребностей вносит значительные коррективы в характер метаболических процессов в периоде восстановления. Поэтому реакция животных на возвращение к свободному содержанию сложна и протекает несколько иначе, чем реакция на обездвиживание [12].

В настоящем эксперименте на 1-е сутки периода реадaptации отмечено умеренное повышение интенсивности глюконеогенеза в печени из всех субстратов по сравнению с контролем. Однако следует учесть, что восстановление начинается с показателей более низких, свойственных 60-м суткам ограничения подвижности, поэтому фактическое увеличение скорости глюконеогенеза более значительно. Содержание гликогена в печени заметно повышается по сравнению с последними сутками гипокинезии, но не достигает показателей в контроле. Содержание глюкозы в сыворотке крови достоверно повышено (см. рисунок).

Восстановление интенсивности глюконеогенеза, сниженной в условиях длительной гипокинезии, представляется, на наш взгляд, одну из наиболее

важных задач в периоде реадaptации. Углеводы являются основным источником энергии, в том числе для мышечного сокращения; потребность в этих веществах возрастает в связи с переходом к нормальной двигательной активности.

Наиболее значительное увеличение интенсивности глюконеогенеза в печени наблюдалось на 7-е сутки восстановительного периода. Скорость новообразования глюкозы из  $\alpha$ -кетоглутарата, пирувата и глицерина при этом повышалась соответственно на 42, 71 и 51%. Однако в течение 1-й недели не происходило достоверного повышения интенсивности глюконеогенеза из аланина и глутамата. Ограниченное участие аминокислот в процессе новообразования глюкозы в раннем восстановительном периоде, вероятнее всего, отражает тенденцию преимущественного включения их в состав мышечных белков, синтез которых активируется в периоде реадaptации [12].

Ускорение процессов глюконеогенеза приводило к достоверному повышению содержания гликогена в ткани печени по сравнению с контролем. Подобное «сверхвосстановление» ресурсов гликогена в реадaptационном периоде было неоднократно описано [8—10, 13]. По всей вероятности, указанные изменения являются универсальными и отражают повышенную готовность организма к воздействию новых чрезвычайных раздражителей.

Содержание глюкозы в сыворотке крови на 7-е сутки реадaptации существенно не отличалось от контрольного. Видимо, новообразованная глюкоза преимущественно откладывается в виде гликогена и в меньшей степени выделяется в кровь.

На 15-е сутки восстановительного периода происходит резкое падение интенсивности глюконеогенеза в ткани печени (по ряду показателей — ниже уровня 60-х суток гипокинезии). Одновременно значительно снижается содержание гликогена в печени, обнаруживается тенденция к гипогликемии.

Известно, что нормализация биохимических показателей в восстановительном периоде далеко не всегда протекает в последовательности, обратной той, в которой произошло их изменение при гипокинезии [8]. По

всей вероятности, повторное снижение интенсивности глюконеогенеза и содержания гликогена в печени на 15-е сутки реадaptации свидетельствует о том, что по мере исчезновения необходимости функционирования стрессовых механизмов вновь становится доминирующей катаболическая направленность реакций, сложившаяся на протяжении длительного обездвиживания [16].

Таким образом, увеличение интенсивности глюконеогенеза в ранние сроки восстановительного периода непродолжительно и сменяется угнетением глюкозопродуцирующей способности печени. Указанные изменения, видимо, способствуют замедлению процессов реадaptации. Выявленные особенности течения восстановительного периода следует учитывать при разработке реабилитационных мероприятий.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Балябина М. Д., Ильин В. С. // Вопр. мед. химии. — 1967. — № 5. — С. 489—491.
2. Ганин Ю. А. // Изменения метаболизма у животных при гипокинезии. — Ярославль, 1984. — С. 4—18.
3. Городецкий В. К. // Современные методы в биохимии. — М., 1964. — Т. 1. — С. 311—316.
4. Ершиков С. М. // Вопр. мед. химии. — 1987. — № 2. — С. 87—90.
5. Кендыш И. Н. Регуляция углеводного обмена. — М., 1985.
6. Коваленко Е. А., Гуровский Н. Н. Гипокинезия. — М., 1980.
7. Лобова Т. М. // Изменения метаболизма у животных при гипокинезии. — Ярославль, 1984. — С. 18—29.
8. Лобова Т. М., Потапов П. П., Черный А. В. // Косм. биол. — 1984. — № 4. — С. 55—58.
9. Потапов П. П., Тихомирова Н. А. // Там же. — № 5. — С. 87—88.
10. Потапов П. П., Тихомирова Н. А. // Там же. — 1986. — № 3. — С. 85—87.
11. Скулачев В. П. Трансформация энергии в биомембранах. — М., 1972.
12. Федоров И. В. Обмен веществ при гипокинезии. — М., 1982.
13. Хасина Э. И., Дардымов И. В., Брехман И. И. // Косм. биол. — 1983. — № 5. — С. 55—58.
14. Good C. A., Kramer P., Somogyi M. // J. biol. Chem. — 1933. — Vol. 100, N 2. — P. 485—491.
15. Kemp A., Kils A. // Biochem. J. — 1954. — Vol. 56, N 4. — P. 646—648.
16. Khasina E. I., Kurilenko L. A., Kirillov O. I. // Z. mikrosk. anat. Forsch. — 1986. — Bd 100, N 3. — S. 410—418.
17. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265—275.

Поступила 21.04.88

# GLUCONEOGENESIS IN RAT LIVER TISSUE DURING THE RESTORATION PERIOD AFTER LONG-TERM HYPOKINESIA

S. M. Yershikov

Chair of Biochemistry, Medical School, Yaroslavl

Gluconeogenesis was studied in liver tissue of 60 rats within the period of readaptation after 60 days of hypokinesia. Biosynthesis of glucose from alanine, aspartic-, glutamic-,  $\alpha$ -ke-

toglutaric and pyruvic acids as well as from glycerol was distinctly inhibited as a result of long-term hypokinesia. Stimulation of gluconeogenesis was noted during the beginning of the readaptation period within 1-7 days, which caused the "superrestoration" of glycogen content in liver tissue. The rate of glucose synthesis was decreased within the later period (15 days) of readaptation. The specific properties of the restoration period should be considered in working out of the rehabilitation courses.

УДК 616.36-018.1:576.311.347]-02:615.919]-07

Л. В. Натанзон, Ю. В. Галаев

## ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЭНДОТОКСИНА НА АКТИВНОСТЬ МОНОАМИНОКСИДАЗЫ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ

Волгоградский медицинский институт

Моноаминоксидаза (МАО; КФ 1.4.3.4) — флавиносодержащий тиоловый фермент, локализованный преимущественно в мембранах митохондрий. Субстратная специфичность МАО зависит от уровня перекисного окисления липидов (ПОЛ), составляющих окружающую фермент мембрану. При высокой интенсивности ПОЛ окисляются SH-группы МАО, и фермент начинает дезаминировать диамины и полиамины [2].

Поскольку в первые часы после введения бактериальный эндотоксин локализуется преимущественно в печени экспериментальных животных [10] и в течение первых 8—9 ч интоксикации в печени активизируются процессы ПОЛ [9], представлялось интересным исследовать, насколько прочно удерживается в мембране фермент и как изменяются свойства МАО митохондрий печени.

### Методика

В работе использовали беспородных белых мышей обоего пола массой 20—23 г. Животным внутрибрюшинно вводили растворенный в 0,5 мл стерильного физиологического раствора эндотоксин в дозе 10 мг на 1 кг живой массы ( $LD_{50}$ ), выделенный по методу [8] из штамма № 79 *Salmonella thyphimurium*, полученного из ГНИИСКМБ им. Л. А. Тарасевича. Контрольным животным внутрибрюшинно вводили 0,5 мл стерильного физиологического раствора.

Контрольных и опытных животных декапитировали одновременно через 3, 6 и 9 ч после введения эндотоксина. Митохондрии выделяли сразу после декапитации животных в холодной камере (0—2 °С) с использованием охлажденной среды выделения (КС1 0,15 М,

К-фосфатный буфер 5 мМ pH 7,4).

Печень отмывали от крови средней выделения, помещали в гомогенизатор, добавляли среду выделения (при соотношении ткани и среды выделения 1:7), гомогенизировали в течение 30—40 с, дополнительно охлаждая гомогенизатор льдом. Полученный гомогенат на центрифуге ЦЛР-1 в течение 10 мин при 600 g. Для осаждения митохондриальной фракции супернатант центрифугировали в продолжении 15 мин при 6000 g. Отдельно отбирали надосадочную жидкость и суспензию митохондрий и замораживали при —24 °С. Активность МАО и уровень ПОЛ определяли на следующий день.

Активность МАО в митохондриальной фракции и надосадочной жидкости оценивали по количеству выделяемого аммиака. Состав проб: 0,9 мл 0,1 М К-фосфатного буфера (pH 7,4), 16 мл 100 мМ раствора субстрата, 0,04 мл суспензии митохондрий или 0,1 мл надосадочной жидкости. Объем проб доводили до 1,8 мл бидистиллированной водой. Инкубировали в течение 30 мин при 37 °С в атмосфере кислорода. В качестве субстратов использовали тирамина гидрохлорид («Merck», ФРГ) и кадаверин («Fergak», ФРГ).

Реакцию останавливали добавлением 0,2 мл 50 % трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Параллельно с опытными ставили контрольные пробы, в которые ТХУ добавляли до инкубации. Пробы центрифугировали в течение 5 мин при 6000 g, далее определение вели по методу [6].

Уровень ПОЛ в митохондриях определяли по количеству малонового диальдегида (МДА), образующего окрашенный комплекс с тиобарбитуровой кислотой, по методу [7]. Концентрацию белка определяли биуретовым методом [1]. Для обработки результатов использовали критерий Вилкоксона — Манна — Уитни [5].

### Результаты и обсуждение

Как видно из таблицы, уровень ПОЛ в митохондриях эндотоксемированных животных повышался уже через 3 ч