

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. И. 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)

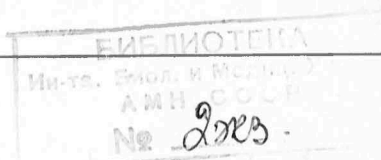
ТУРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)

ТЯХЕПЫЛД Л. Я. (Тарту)

ШАПОВ В. С. (Москва)

ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)

ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)



Б. Я. Хацернова, С. А. Силаева, В. А. Голенченко, А. Я. Николаев,
М. Я. Розкин, А. В. Некрасов, Т. З. Берестецкая, В. С. Ефимов

ГЕПАРИН И ЕГО АНТАГОНИСТ — ЧЕТВЕРТИЧНАЯ АММОНИЙНАЯ СОЛЬ ОЛИГОМЕРА-25-КОНИДИНА: РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ПО СУБКЛЕТОЧНЫМ ОРГАНЕЛЛАМ, ВЛИЯНИЕ НА СИНТЕЗ ДНК В РЕГЕНЕРИРУЮЩЕЙ ПЕЧЕНИ КРЫС

Кафедра биохимии I ММИ им. И. М. Сеченова, лаборатория фармакологии гемостаза
II ММИ им. Н. И. Пирогова, Институт иммунологии Минздрава СССР, Москва

В последние годы был получен ряд синтетических поликатионов, проявивших выраженный антагонизм к гепарину. К соединениям этой группы веществ принадлежит четвертичная аммонийная соль (ЧАС) монодисперсного олигомера конидина со степенью полимеризации 25 (ЧАС 0-25).

Фармакологические исследования этого поликонидина обнаружили его высокую антигепариновую активность, избирательность взаимодействия с гепарином и малую токсичность [3]. Показано также, что при последовательном внутривенном введении гепарина и ЧАС 0-25 конидина последний медленно выводится из организма, накапливаясь преимущественно в печени [2].

Ранее было установлено, что после введения крысам гепарина и ЧАС 0-25- ^{14}C -конидина меченный препарат самостоятельно или в составе комплекса с гепарином легко проникает из кровотока в клетки и субклеточные органеллы гепатоцитов [4]. В 1-е сутки после введения ЧАС 0-25- ^{14}C -конидин преимущественно локализуется в ДНП-фракции ядер и митохондрий и нарушает процессы репликации и транскрипции. Однако воздействие гепарина и его антагонистов на синтез макромолекул во времени не изучалось. Поэтому цель настоящей работы — исследование динамики распределения по субклеточным органеллам и влияния на синтез ДНК этих полиэлектролитов в условиях регенерации печени крыс после частичной гепатэктомии.

Методика

Работа проведена на крысах-самцах массой 100—150 г. В эксперименте использованы животные через 1,2 и 8 сут после однократного внутривенного введения в хвостовую вену

полиэлектролитов: гепарина фирмы «Рихтер» в дозе 5 мг/кг либо ^{35}S -гепарина фирмы «Amersham» в дозе 5 мг/кг (уд. радиоактивность 13,7 мКи/г) и ЧАС 0-25 конидина в дозе 3,8 мг/кг, либо ЧАС 0-25- ^{14}C -конидина в дозе 3,8 мг/кг (уд. радиоактивность 730 мКи/г). Все животные были разделены на 6 групп. Животные 1-й группы получали ^{35}S -гепарин, 2-й группы — ^{35}S -гепарин и ЧАС 0-25 конидин (последовательно, с интервалом в 10 мин), 3-й группы — гепарин и ЧАС 0-25- ^{14}C -конидина. 4, 5 и 6-й группы были контрольными: 4-й группе за 1 сут до забоя вводили ЧАС 0-25- ^{14}C -конидина, 5-й — гепарин, а 6-ю составляли интактные животные. За 20 ч до умерщвления крысам проводили частичную гепатэктомию, удаляя $\frac{2}{3}$ от общей массы печени, а за 1,5 ч до декапитации вводили ^3H -тимидин из расчета 100 мКи на 100 г массы тела. Методом [4] получали гомогенаты печени и селезенки, а также выделяли из печени фракции ядер и митохондрий.

Количественное определение ДНК и РНК осуществляли по модифицированному методу Шмидта и Тангаузера [5]. Интенсивность синтеза ДНК оценивали по включению ^3H -тимидина в кислотонерастворимую фракцию в пересчете на 1 мг ДНК. Оценку радиоактивности и определение содержания нуклеиновых кислот проводили в одних и тех же пробах. Белки постмитохондриальной фракции разделяли методом гель-фильтрации на колонке $25 \times 1,5$ мм с TSK-гелем HW-60 Fine. Для элюции использовали 0,01 М трис-HCl буфер с pH 8,0. Колонку калибровали следующими соединениями: голубым декстраном (М.м. 2 000 000), ферритином (М.м. 450 000), каталазой (М.м. 232 000), альбумином (М.м. 45 000), витамином B_{12} (М.м. 1355) и динитрофенилаланином (М.м. 320). В модельных опытах на колонку наносили препараты ЧАС 0-25- ^{14}C -конидина или гепарина и ЧАС 0-25- ^{14}C -конидина в оптимальных нейтрализующих соотношениях.

Результаты и обсуждение

Как видно из табл. 1, содержание ^{35}S -гепарина в гомогенатах печени и селезенки животных 1 и 2-й групп снижается довольно медленно: в гомогенатах печени к 8-м суткам — примерно на 30 %, а в гомогенатах селезенки сохраняется на уровне пер-

Т а б л и ц а 1

Включение [^{35}S]-гепарина и ЧАС 0-25- ^{14}C]-конидина в селезенку и регенерирующую печень крыс (в % от введенной дозы радиоактивности)

Объект исследования	Время после введения, сут	^{35}S -гепарин	^{35}S гепарин + ЧАС 0-25 конидина	Гепарин + ЧАС 0-25- ^{14}C]-конидина	ЧАС 0-25- ^{14}C]-конидина
Селезенка	1	$1,36 \pm 0,25$ (9)	$2,35 \pm 0,37$ (8)	$1,26 \pm 0,27$ (7)	$1,25 \pm 0,09$ (7)
	2	$1,28 \pm 0,005$ (4)	$3,57 \pm 0,18$ (4)	$1,18 \pm 0,1$ (3)	
	8	$1,28 \pm 0,06$ (4)	$2,93 \pm 0,10$ (4)	$0,77 \pm 0,13$ (3)	
Печень	1	$9,03 \pm 2,6$ (9)	$26,18 \pm 3,08$ (8)	$9,84 \pm 1,76$ (7)	$10,91 \pm 1,20$ (7)
	2	$5,50 \pm 0,21$ (4)	$10,55 \pm 0,06$ (4)	$7,88 \pm 1,27$ (6)	
	8	$6,04 \pm 0,49$ (4)	$16,80 \pm 1,50$ (4)	$9,75 \pm 2,03$ (6)	

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3 — в скобках указано количество животных.

вого дня. В тот же период времени содержание метки олигомера [^{14}C]-конидина в гомогенате селезенки уменьшается на 40 %, а в гомогенате печени на 2-е сутки на 20 % с последующим увеличением к 8-м суткам до исходного уровня. Обращает на себя внимание также и то, что при последовательном введении [^{35}S]-гепарина и олигомера количество поступающего в ткани меченого гепарина увеличивалось в 2—3 раза, тогда как количество олигомера [^{14}C]-конидина, включающегося в клетки самостоятельно или при комбинированном введении с гепарином, было практически одинаковым. Это указывает на более высокую скорость транспорта олигомера конидина в клетки, а также способность его подобно протаминам и полилизину увеличивать поступление в них полианионов [8]. Наблюдающиеся различия в выведении гепарина и ЧАС 0-25 конидина, видимо, объясняются тем, что гепарин, будучи природным метаболитом, может в организме подвергаться гидролитическому расщеплению, а поэтому распределение [^{35}S]-метки может отражать локализацию не только самого гепарина, но и продуктов его деградации. Согласно данным литературы период полужизни гепарина в плазме животных колеблется от 0,5 до 1,5 суток [6]. Напротив, ЧАС 0-25 конидин накапливается в печени, метаболически стабилен и медленно выводится из организма в практически неизменном виде [2]. В табл. 2 приведены данные по субклеточному распределению [^{35}S]-гепарина и ЧАС 0-25- ^{14}C]-конидина в печени. К 8-м суткам со-

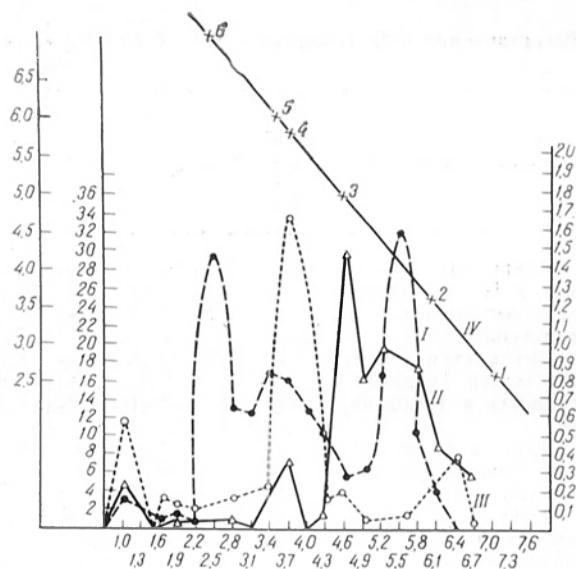
держание меченых препаратов в митохондриях и ядрах снижается в среднем на 30 %, а во фракции цитоплазматических белков степень включения [^{14}C]-конидина возрастает приблизительно в 2,5 раза. Кроме того, можно сделать вывод, что около половины меченых полиэлектролитов, поступающих в ядра, связываются с фракцией ДНП. При использовании [^{35}S]-гепарина метка выводится из этой фракции довольно активно и к 8-м суткам ее содержание снижается в 3—4 раза. Однако относительное количество ЧАС 0-25- ^{14}C]-конидина, связанного с фракцией ДНП, за этот же период времени достоверно не уменьшается.

Поскольку было установлено, что с увеличением времени после введения гепарина и олигомера их количество в постмитохондриальной фракции возрастает, а выведение из клеток не увеличивается, представлялось целесообразным выяснить, существует ли связывание полиэлектролитов с белками постмитохондриальной фракции, меняется ли оно в зависимости от сроков введения препаратов, а также исследовать возможность деградации гепарина в гепатоцитах.

На рис. 1 видно, что при гель-фильтрации компонентов постмитохондриальных фракций, выделенных из печени животных, которым вводили ЧАС 0-25- ^{14}C]-конидина или гепарин и ЧАС 0-25- ^{14}C]-конидина, на профиле элюции обнаруживается 3—4 пика радиоактивности. Один из них располагается в области надмолекулярных структур с М. м. 170 000 000, второй — в области белков с М. м.

Рис. 1. Распределение ЧАС 0-25- $[^{14}\text{C}]$ -конидина в постмитохондриальной фракции белков в печени.

I — кривая элюции белков, E_{280} ; II — кривая распределения ЧАС 0-25- $[^{14}\text{C}]$ -конидина во фракции белков от животных 4-й группы; III — кривая распределения ЧАС 0-25- $[^{14}\text{C}]$ -конидина во фракции белков от животных 3-й группы; IV — калибровка колонки соединениями с известной молекулярной массой; 1 — динитрофенилаланин, 2 — витамин B_{12} , 3 — альбумин, 4 — каталаза, 5 — ферритин. Здесь и на рис. 2 по оси абсцисс — отношение объема элюата к общему объему колонки; по осям ординат слева — белок (в lg mg), и радиоактивность (в $\text{имп/мин} \cdot 10^3$) соответственно, справа — белок (в мг/мл).



20 000—230 000, а третий — в области свободного ЧАС 0-25- $[^{14}\text{C}]$ -конидина. Результаты хорошо воспроизводились для фракций, полученных от животных, которые получали препараты на 1, 2 и 8-е сутки до умерщвления. У животных, которым вводили ЧАС 0-25- $[^{14}\text{C}]$ -конидина, около 50 % препарата выходило с колонки в свободном виде, тогда как последовательное введение гепарина и $[^{14}\text{C}]$ -олигомера конидина увеличивало долю связывания последнего с белками и снижало выход свободного поликатиона.

На рис. 2. представлены результа-

ты разделения белков, полученных от животных, которым вводили $[^{35}\text{S}]$ -гепарин или $[^{35}\text{S}]$ -гепарин и ЧАС 0-25 конидина за 1—2 сут до забоя. На кривой элюирования радиоактивности около 50 % метки определяется во фракциях соответствующих молекулярной массе неорганических сульфатов, что можно объяснить десульфатированием гепарина. Остальная часть радиоактивности связывается с белками разной молекулярной массы за счет переноса на них сульфогрупп либо за счет комплексообразования с нативным гепарином. Таким образом, последовательное введение $[^{35}\text{S}]$ -гепар-

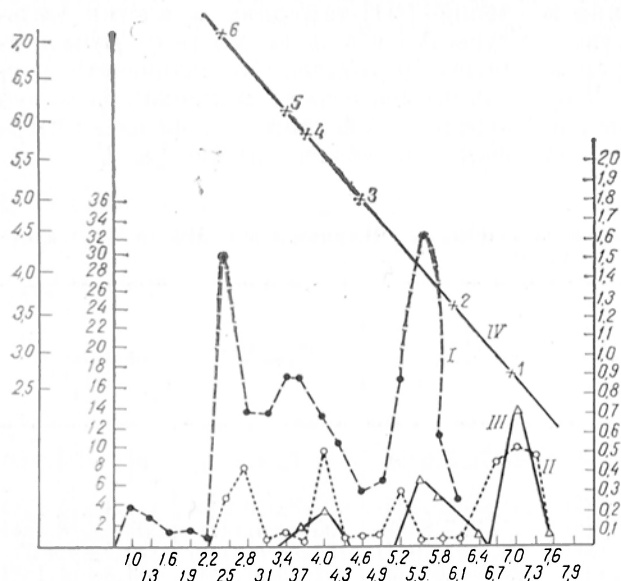


Рис. 2. Распределение $[^{35}\text{S}]$ -гепарина постмитохондриальной фракции белков печени.

I — кривая элюции белков, E_{280} ; II — кривая распределения $[^{35}\text{S}]$ -гепарина во фракции белков от животных 1-й группы. III — кривая распределения $[^{35}\text{S}]$ -гепарина во фракции белков от животных 2-й группы. IV — то же, что и на рис. 1.

Таблица 2

Распределение [^{35}S]-гепарина и ЧАС 0-25-[^{14}C]-конидина по субклеточным фракциям печени крыс

Объект исследования	Время после введения, сут	[^{35}S]-гепарин	[^{35}S]-гепарин + ЧАС 0-25 конидина	Гепарин + ЧАС 0-25-[^{14}C]-конидина	ЧАС 0-25-[^{14}C]-конидин
Микросомы + цитозол, в % от общей радиоактивности в гомогенате	1	26,60 \pm 3,64 (9)	26,11 \pm 0,99 (8)	24,71 \pm 5,23 (7)	40,93 \pm 4,10 (7)
	2	38,10 \pm 0,97 (4)	25,88 \pm 1,47 (4)	39,32 \pm 3,21 (6)	
	8	34,20 \pm 1,34 (4)	34,28 \pm 2,8 (4)	54,45 \pm 1,44 (6)	
Митохондрии, в % от общей радиоактивности в гомогенате	1	10,70 \pm 2,57 (9)	8,24 \pm 1,53 (8)	6,10 \pm 1,22 (7)	5,87 \pm 0,50 (7)
	2	14,0 \pm 0,41 (4)	15,60 \pm 1,16 (4)	7,52 \pm 2,21 (6)	
	8	7,33 \pm 0,31 (4)	9,73 \pm 1,15 (4)	4,17 \pm 1,06 (6)	
Ядра, в % от общей радиоактивности в гомогенате	1	51,10 \pm 4,7 (9)	55,18 \pm 1,36 (8)	62,14 \pm 2,62 (7)	37,07 \pm 2,24 (7)
	2	46,58 \pm 2,4 (4)	51,68 \pm 5,05 (4)	52,33 \pm 5,10 (6)	
	8	34,18 \pm 2,71 (4)	43,65 \pm 3,9 (4)	41,17 \pm 3,02 (6)	
ДНП, в % от радиоактивности во фракции ядер	1	33,34 \pm 5,66 (9)	49,58 \pm 5,86 (8)	47,08 \pm 2,49 (6)	64,60 \pm 13,3 (7)
	2	13,18 \pm 2,42 (4)	16,73 \pm 0,68 (4)	55,07 \pm 9,72 (6)	
	8	8,70 \pm 2,71 (4)	16,65 \pm 2,84	46,22 \pm 8,62 (6)	

рина и ЧАС 0-25 конидина не предохраняет гепарин от деградации. В то же время при изучении распределения радиоактивных фракций на кривой элюции обнаружен пик с М. м. около 200 000, соответствующий второму пику на рис. 1. Содержание в нем метки было невелико при введении только [^{35}S]-гепарина, но эта величина возрастала более чем вдвое при сочетании введения [^{35}S]-гепарина и ЧАС 0-25 конидина. Это указывает на существование в составе цитоплазматических белков фракций, обладающих сродством к полиэлектролитам и их комплексам. Имеются сообщения о том, что сильное сродство гепарина к протаминам и гистонам способствует его проникновению в ядра и связыванию с ядерным материалом [8]. Возможно, что в организме образование олигомерных комплексов служит для

более полной нейтрализации, транспорта, а возможно и деградации полиэлектролитов.

В табл. 3 приведены данные о влиянии гепарина, ЧАС 0-25-[^{14}C]-конидина и их обоих при последовательном поступлении на синтез суммарной ДНК в селезенке и печени крыс, а также на синтез ядерной и митохондриальной ДНК. Показано, что при введении гепарина за 1 сут до забоя включение [^3H]-тимидина в ДНК регенерирующей печени снижается на 30—40 %. Это соответствует имеющимся сведениям, согласно которым гепарин снижает интенсивность включения [^3H]-тимидина в клетки культуры А-1 и в зависимости от дозы тормозит митотическую активность клеток человеческого амниона, блокируя переход из поздней телофазы в интерфазу следующего цикла [1, 7].

Таблица 3

Влияние гепарина и олигомера 25 конидина на включение [^3H]-тимидина в ДНК (в % от контроля)

Исследуемые вещества	Время после введения, сут	Гомогенат селезенки	Гомогенат печени	Митохондрии печени	Ядра печени
Гепарин ЧАС 0-25-[^{14}C]-конидина Гепарин + ЧАС 0-25-[^{14}C]-конидина	1	54,1 \pm 1,1 (3)	43,7 \pm 5,6 (5)	71,7 \pm 7,1 (8)	64,5 \pm 23,1 (8)
	1	101,5 \pm 10,6 (7)	130,3 \pm 12,4 (5)	103,7 \pm 10,2 (5)	111,4 \pm 15,1 (6)
	1	83,7 \pm 14,1 (8)	57,3 \pm 7,8 (8)	95,9 \pm 6,4 (8)	93,6 \pm 18,1 (8)
	2	94,3 \pm 5,1 (8)	86,5 \pm 10,9 (7)	154,7 \pm 16,5 (6)	129,2 \pm 9,4 (7)
	8	89,9 \pm 9,1 (8)	122,3 \pm 16,4 (5)	122,0 \pm 24,1 (5)	144,8 \pm 14,1 (8)

Данные табл. 1 свидетельствуют, что последовательное введение [^{35}S]-гепарина и ЧАС 0-25 конидина более чем вдвое увеличивает поступление первого в клетки селезенки и печени. Однако по данным табл. 3 ингибирующий эффект гепарина на синтез ДНК при этом не возрастает. Более того, он сохраняется только в 1-е сутки, а на 2-е и 8-е сутки после введения обоих препаратов отмечается некоторая стимуляция включения [^3H]-тимидина по сравнению с контролем.

Полученные данные дают основания полагать, что ингибирование синтеза ДНК через 24 ч после внутривенного введения гепарина и ЧАС 0-25 конидина обусловлено гепариновым компонентом комплекса. Гепарин быстро десульфатируется и теряет свои биологические свойства. Этим, очевидно, и объясняется исчезновение ингибирующего действия комплекса на 2-е сутки после введения препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Блюмкин В. П., Ульянова Л. И. // Бюл. exper. биол. — 1976. — № 9. — С. 1119—1121.
2. Ефимов В. С., Середенин С. Б., Чернова О. В. и др. // Хим.-фарм. журн. — 1983. — № 1. — С. 55—59.
3. Ефимов В. С., Чернова О. В., Берестецкая Т. З., Некрасов А. В. // Фармакол. и токсикол. — 1983. — № 4. — С. 57—60.
4. Силаева С. А., Хацернова Б. Я., Николаев А. Я. и др. // Вopr. мед. химии. — 1985. — № 4. — С. 99—103.
5. Трудолобова М. Г. // Современные методы в биохимии. — М., 1977. — С. 313—316.

6. Ульянов А. М., Ляпина Л. А. // Успехи совр. биол. — 1977. — Т. 83, № 1. — С. 69—85.
7. Ульянова Л. И., Блюмкин В. П., Гошева А. Е. // Бюл. exper. биол. — 1974. — № 8. — С. 93—96.
8. Bayard B., Hisbal C., Leblen B. // Biochemistry (Wash.). — 1986. — Vol. 25, N 12. — P. 3730—3736.
9. Hildebrand C. E., Tobey R. A., Crekley G. R., Walters R. A. // Biochim. biophys. Acta. — 1978. — Vol. 517. — P. 486—499.

Поступила 21.11.87

HEPARIN AND ITS ANTAGONIST POLYCANIDINE: DISTRIBUTION IN SUBCELLULAR ORGANELLES, EFFECT ON DNA SYNTHESIS IN REGENERATING RAT LIVER TISSUE

B. Ya. Khatsernova, S. A. Silaeva, V. A. Golenchenko, A. Ya. Nikolaev, M. Ya. Rozkin, A. V. Nekrasov, V. G. Berestetskaya, V. S. Efimov

Chair of Biochemistry, I Medical School, Laboratory of Hemostasis Pharmacology, II Medical School, Institute of Immunology, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

Dynamics of distribution in subcellular organelles as well as effects on DNA synthesis of heparin, polycanidine (ChAS oligomer of 25 canidine) and their complexes were studied in regenerating rat liver tissue after partial hepatectomy. Polycanidine and heparin penetrated from circulation into hepatocyte cells, nuclei and mitochondria. After consecutive administration of polyelectrolites polycanidine increased 2-2.5-fold the amount of heparin entering into cells. Polycanidine formed stable complexes with DNP in nuclei. Heparin and its complexes with polycanidine decreased the DNA synthesis within first day. Heparin appears to be responsible for the inhibitory effect, whereas administration of polycanidine only into animals caused a slight increase in ^3H -thymidine incorporation into DNA as compared with controls.

УДК 615.917.015.4:612.351.11].07

А. И. Венгеровский, А. С. Саратиков

ВЛИЯНИЕ ГЕПАТОТОКСИНОВ НА АКТИВНОСТЬ ОРГАНЕЛЛОСПЕЦИФИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ И МЕТАБОЛИЗМ ЛИПИДОВ ПЕЧЕНИ

Кафедра фармакологии Томского медицинского института

Воздействие токсических агентов на печень сопровождается глубокими нарушениями метаболизма гепатоцитов. D-галактозамин, аллиловый спирт и парацетамол, вызывающие гепатит с некрозом паренхимы, снижают активность ферментов цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) и дыхательной цепи, лабилизируют лизосомы [2, 3, 15, 19]. При жировом гепатозе на фоне от-

равления гидразином и этанолом возникают накопление триглицеридов, холестерина, умеренное угнетение процессов биоэнергетики [4, 12]. Все токсиканты стимулируют перекисное окисление липидов (ПОЛ) [3, 9]; аллиловый спирт, гидразин и этанол изменяют количество фосфолипидов и соотношение их фракций [7, 10, 12]. В литературе отсутствует детальная