

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

Архив журнала

## **Вопросы медицинской химии**

*ISSN 0042-8809*

1989

**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*

1989

**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 35

БЫПУСК 5

СЕНТЯБРЬ — ОКТЯБРЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.



МОСКВА · МЕДИЦИНА · 1989

# ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. Б. СПИРИЧЕВ (зам. редактора), И. П. АШМАРИН, Т. Т. БЕРЕЗОВ, А. В. 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)  
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)  
ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)  
ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)

- Sci. USA. — 1967. — Vol. 57. — P. 1735—1739.
9. Kelley W. N., Meade J. C. // J. biol. Chem. — 1971. — Vol. 246. — P. 2953—2958.
  10. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
  11. McDonald J. E., Kelley W. N. // Science. — Vol. 171. — P. 689—681.
  12. Seegmiller J. E., Rosenbloom F. M., Kelley W. N. // Ibid. — 1967. — Vol. 155. — P. 1682—1684.
  13. Steyn L. M., Harley E. H. // J. biol. Chem. — 1984. — Vol. 299. — P. 338—342.
  14. Wilson J. M., Frossard P., Nussbaum R. L. et al. // J. clin. Invest. — 1983. — Vol. 72. — P. 767—772.
  15. Wilson J. M., Young A. B., Kelley W. N. // New Engl. J. Med. — 1983. — Vol. 309. — P. 900—910.
  16. Wilson J. M., Kelley W. N. // J. clin. Invest. — 1983. — Vol. 71. — P. 1331—1335.
  17. Wilson J. M., Stout J. T., Palella T. D. et al. // Ibid. — 1986. — Vol. 77. — P. 188—195.

Поступила 20.06.88

# PHYSICO-CHEMICAL AND CATALYTIC PROPERTIES OF HYPOXANTHINE GUANINE PHOSPHORIBOSYL TRANSFERASE IN THROMBOCYTES OF DONORS AND PATIENTS WITH HEMOPHILIA A

T. B. Marceva, Ya. M. Sokovnina, I. I. Votrin

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

Studies of some physico-chemical and catalytic properties of hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) in thrombocytes of donors and patients with hemophilia A showed that kinetic parameters ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ) of the enzyme were similar both under normal and pathological conditions. However, some differences were detected in thermostability and inhibition of HGPRT by purine metabolites: IMP, GMP and inosine. These data suggest that molecular impairment may occur in HGPRT under conditions of hemophilia A.

УДК 612.351.11:577.152.313].06:[612.273.2+612.391].086.833

С. Е. Никулина, О. Ю. Крылова, Т. М. Гончаренко, Н. С. Стволинская,  
Э. Д. Полякова, Б. Ф. Коровкин

## ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ цАМФ И АКТИВНОСТИ КИСЛОЙ ФОСФАТАЗЫ В МОНОСЛОЙНОЙ ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ ГЕПАТОЦИТОВ НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС В УСЛОВИЯХ АНОКСИИ И СУБСТРАТНОГО ГОЛОДАНИЯ

НИИ медицинской энзимологии АМН СССР, Москва

Несмотря на многочисленные исследования ответной реакции лизосомного аппарата клеток, в том числе и гепатоцитов, на экстремальные воздействия (гипоксию, аноксию, ишемию и т. д.), остается неясным значение циклических нуклеотидов в регуляции этого процесса. Имеются сведения о стабилизирующем действии цАМФ на мембраны лизосом, однако они основаны на экспериментах, выполненных при воздействии на целостный организм [3, 4, 10] или на изолированный орган [12, 23].

В настоящее время все больше исследований проводится на монослойных клеточных культурах [5, 13, 18]. При этом появляется возможность использовать достаточно однородную клеточную популяцию для изучения механизма действия как гормональных факторов, так и других биологически активных соединений. Предварительно нами была охарактеризована модель кислородного и субстратного голодания на первичной культу-

ре гепатоцитов новорожденных крыс. Подобраны такие условия, при которых в гепатоцитах наблюдались значительные, но обратимые изменения ферментативного аппарата лизосом с целью возможной коррекции этих изменений.

Для изучения регуляторного воздействия цАМФ на стабильность лизосомных мембран и как следствие изменения активности лизосомных ферментов можно использовать различные экспериментальные подходы: во-первых, воздействовать на уровень цАМФ, изменяя условия инкубации клеток; во-вторых, искусственно регулируя уровень цАМФ путем введения экзогенного цАМФ.

Целью настоящей работы явилось изучение взаимосвязи между состоянием лизосомного аппарата гепатоцитов и содержанием внутриклеточного цАМФ. Исследовали также возможность коррекции нарушений лизосомного аппарата с помощью цАМФ, заключенного в липосомы.

## Методика

Культуру гепатоцитов получали из печени 1—2-дневных крыс. Печень мацерировали в 0,05 % растворе коллагеназы, приготовленном на среде 199 с добавлением 10 мМ HEPES, 20 мМ Na пирувата при 37 °C в течение 1 ч. Гепатоциты рассевали в стеклянные чашки Петри, покрытые желатином, из расчета 1 млн клеток в 1 мл среды. Клетки выращивали в среде 199 с добавлением 10 мМ HEPES, 0,03 % глутамина и 5 % эмбриональной телячьей сыворотки при 37 °C в атмосфере, содержащей 5 % CO<sub>2</sub>. Через 4 ч после посева неприкрепившиеся и нежизнеспособные клетки удаляли путем смены среды. Среду меняли 1 раз в сутки.

Моделирование аноксии и субстратного голодания (метаболической ишемии) проводили на культуре гепатоцитов после 3 сут культивирования. В это время она представлена большими монослойными колониями, смыкающимися по периферии, и отдельно лежащими клетками. При этом гепатоциты составляли 70—80 % от общего количества клеток. Для моделирования аноксии культуру гепатоцитов в ростовой среде помещали в термостатируемую (37 °C) газопроточную камеру под постоянным протоком азота. При моделировании субстратного голодания ростовую среду заменяли на солевой раствор Хенкса, содержащий 20 мМ HEPES pH 6,9. После инкубации в атмосфере азота раствор Хенкса заменяли на ростовую среду и проводили реабилитацию культуры в термостате при 37 °C при нормальной аэрации в течение 1 ч.

Для приготовления гомогенатов клетки после промывки 0,25 М сахарозой собирали с поверхности чашек полихлорвиниловым скребком в раствор 0,25 М сахарозы pH 7,4, содержащий 1 мМ ЭДТА. Конечное разведение — 5 млн клеток в 1 мл.

Полученную суспензию клеток гомогенизировали в механическом гомогенизаторе (тефлон-тефлон) в течение 10 с на холоде в ледяной бане. В гомогенате определяли общую активность кислой фосфатазы.

Гомогенат подвергали дифференциальному центрифугированию. Надосадочную жидкость, освобожденную от ядер и тяжелых митохондрий, центрифугировали при 100 000 g 30 мин. Полученный осадок ресуспендировали в 0,25 М сахарозе, инкубировали 30 мин при 4 °C с тритоном X-100 в конечной концентрации 0,1 % и в этой фракции определяли связанную активность кислой фосфатазы. В надосадочной жидкости определяли активность свободного фермента.

Активность кислой фосфатазы определяли спектрофотометрически, используя в качестве субстрата *p*-нитрофенилфосфат [2].

Содержание цАМФ измеряли радиоиммунологическим методом с помощью наборов готовых реактивов — Cyclic AMP Immunoassay Kit (<sup>125</sup>I). цАМФ экстрагировали 0,1 М охлажденной HCl после разрушения клеток двукратным замораживанием — оттаиванием (от —70 °C до +4 °C).

Малые одноламеллярные липосомы, содержащие цАМФ или (<sup>3</sup>H)-цАМФ, получали по методу [21] с небольшой модификацией. Фосфатидилхолин, холестерин и цетилтриметиламмонийбромид в молярных соотношениях 7 : 3 : 1 использовали для приготовления липидной пленки. Липосомы с цАМФ или (<sup>3</sup>H)-цАМФ

отделяли от несвязавшегося нуклеотида с помощью гель-фильтрации на колонке (1×30 см) с сефадексом G-50. Эффективность включения (т.е. отношение цАМФ, инкапсулированного в липосомы, к общему количеству цАМФ, использованного для приготовления суспензии) составила в среднем 1,9—2 %. В опытах использовали липосомы, содержащие цАМФ в концентрации 0,2 мкМ на 1 мг фосфатидилхолина.

Липосомы с FITC-декстраном были приготовлены по аналогичной методике. Суспензию липосом с FITC-декстраном добавляли из расчета 0,05 мл на 1 мл культуральной среды (0,30 мкМ фосфатидилхолина/0,15 мг FITC-декстрана). В контрольные чашки добавляли свободный FITC-декстран (1,5 мг на 1 мл культуральной среды). После 1 ч инкубации образцы клеточных культур отмывали от инкубационной среды и просматривали под флуоресцентным микроскопом МЛ-2.

Содержание белка в гомогенатах клеток измеряли по методу [25]. В осадке ядер определяли ДНК по методу Дине [1]. Содержание неорганического фосфата в липосоме определяли по модифицированному методу Фiske — Субарроу.

Цифровой материал обработан статистически с помощью критерия Стьюдента.

## Результаты и обсуждение

В работе сделана попытка исследовать активность ферментов лизосом в культуре гепатоцитов в условиях, приближенных к патологии печени *in vivo*. При этом учитывали характерные для ишемии черты — недостаток кислорода, субстратов и закисление среды [13]. Культуру гепатоцитов инкубировали в условиях аноксии в солевом растворе Хенкса pH 6,9. С целью выяснения обратимости нарушений, вызываемых аноксическим воздействием, культуру гепатоцитов после метаболической ишемии возвращали в нормальные условия культивирования (так называемая реабилитация: инкубация клеток в ростовой среде pH 7,2, в течение 1 ч при нормоксии).

Одним из критериев оценки состояния мембран лизосом является величина соотношения свободной и связанной активности кислых гидролаз. При многих экстремальных состояниях (гипоксия, ишемия, экспериментальный инфаркт миокарда и т.д.) нарушается стабильность лизосомных мембран, что сопровождается повышением свободной и одновременным снижением активности кислых гидролаз во фракции, обогащенной лизосомами (связанная активность) [4, 9].

На рис. 1 представлено изменение свободной и связанной активности кислой фосфатазы, маркерного фер-

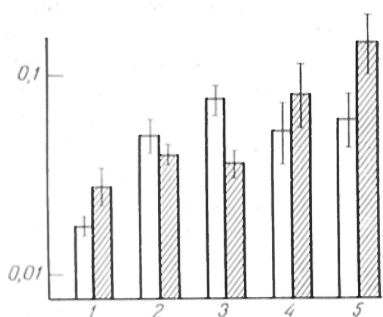


Рис. 1. Активность кислой фосфатазы (в мкмоль расщепленного субстрата на 1 мг ДНК за 1 мин) в первичной культуре гепатоцитов при аноксии и субстратном голодании, в условиях реабилитации и при добавлении липосом с цАМФ.

Светлые столбики — свободная, столбики со штриховкой — связанная активность кислой фосфатазы.

мента лизосом, в первичной культуре гепатоцитов поворожденных крыс в условиях аноксии на фоне субстратного голодания, а также при последующей реабилитации. Инкубация гепатоцитов в солевом растворе Хенкса (субстратное голодание) в условиях аноксии в течение 20 мин приводила к двукратному увеличению свободной активности кислой фосфатазы. Удлинение срока аноксии до 60 мин вызывало дальнейший прирост свободной активности. Повышение свободной активности кислой фосфатазы может свидетельствовать о дестабилизации мембран лизосом. Одновременное возрастание связанной активности кислой фосфатазы, по-видимому, может отражать как процесс активации фермента в лизосомах, так и стимуляцию функции лизосомного аппарата за счет образования первичных лизосом [23].

В период реабилитации свободная активность кислой фосфатазы имеет тенденцию к снижению, а связанная — резко возрастает. При этом соотношение свободной и связанной активности, составляющее в контроле 0,66, а на фоне аноксии и субстратного голодания — 1,47, в условиях реабилитации приближается к контрольному уровню — 0,81. Полученные результаты свидетельствуют об обратимости изменений, происходящих в гепатоцитах за 1 ч кислородного и субстратного голодания. Снижение свободной и повышение связанной активности кислой фосфатазы при реабилитации может свидетельствовать о стабилизации

мембран лизосом. Одновременное возрастание как свободной, так и связанной активности фермента свидетельствует в пользу более сложных изменений лизосомного аппарата (ускорение созревания первичных лизосом, изменение их локализации в клетке) или активации кислой фосфатазы.

На рис. 2 показана динамика уровня цАМФ в культуре гепатоцитов в период аноксии и реабилитации. После смены ростовой среды на раствор Хенкса и начала аноксии происходит постепенное снижение содержания внутриклеточного цАМФ, достигающее к 15 мин аноксии 50 % от исходного уровня. Затем уровень цАМФ повышается и к 60 мин аноксии и субстратного голодания превышает контрольный. Реабилитация, т. е. замена солевого раствора Хенкса на ростовую среду с добавлением 5 % сыворотки и восстановление нормальной аэрации, приводит к резкому подъему уровня цАМФ уже через 5 мин после прекращения аноксии и субстратного голодания. Резкий подъем уровня цАМФ отмечался на коротком временном промежутке, и уже к 15 мин реабилитации содержание цАМФ в гепатоцитах практически не отличалось от контрольного. Резкому повышению свободной активности фермента, отражающей дестабилизацию мембран лизосом, предшествует снижение уровня цАМФ. Напротив, подъем внутриклеточного уровня цАМФ в условиях реабилитации предшествует снижению свободной и повышению

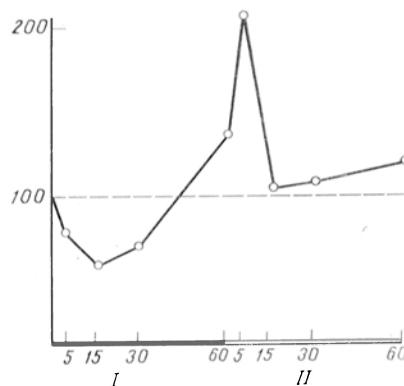


Рис. 2. Изменение уровня цАМФ (в % к контролю) в первичной культуре гепатоцитов при аноксии и субстратном голодании и последующей реабилитации.

По оси абсцисс — время (в мин). I — аноксия, II — реабилитация.

К ст. *Николаева* и соавт.

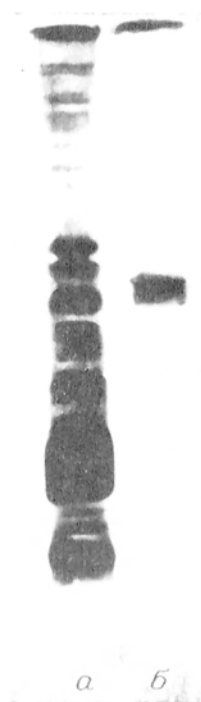


Рис. 2. Электрофорез ПБГ в 7 % ПААГ.  
а — образец экстракта предстательной железы;  
б — очищенный препарат ПБГ.

К ст. *Никулиной* и соавт.



Рис. 3. Выявление флюоресцентного свечения в гепатоцитах при инкубации клеточных культур с липосомами, нагруженными флюоресцентным метчиком FITC, пришитым к высокомолекулярному носителю — декстрану (об. 70, ок. 5).

связанной активности кислой фосфатазы. Таким образом, корреляция между изменением концентрации цАМФ и величиной соотношения свободной и связанной активности кислой фосфатазы позволяет говорить о существовании цАМФ-опосредованной регуляции состояния лизосомного аппарата в гепатоцитах.

Для проверки выдвинутого предположения было исследовано изменение свободной и связанной активности кислой фосфатазы в условиях аноксии и субстратного голодания на фоне повышенного содержания цАМФ. Инкубацию гепатоцитов проводили в присутствии липосом, содержащих цАМФ. Для повышения внутриклеточного содержания цАМФ обычно используют дибутирильные или другие аналоги цАМФ [8, 15, 28]. Однако действие этих веществ нельзя рассматривать как абсолютно идентичное цАМФ. Так, дибутирил-цАМФ не гидролизует фосфодиэстеразой и может накапливаться в клетке [16]. Известно, что для проявления действия цАМФ достаточно кратковременного повышения его уровня [11]. Применение липосом в качестве носителя цАМФ имеет ряд преимуществ — возможность преодоления клеточного барьера для цАМФ, доставка содержимого липосом непосредственно в цитоплазму клетки, а в случае эндоцитозного захвата липосом клеткой локальное повышение концентрации цАМФ вблизи лизосом.

В работе использовали малые одноплазмеллярные положительно заряженные жидкие липосомы. Данные о механизме их взаимодействия с гепатоцитами довольно противоречивы [7]. Имеются сведения о непосредственном попадании содержимого таких липосом в цитоплазму [22]. Полученные липосомы анализировали методом электронной микроскопии. Они имеют средний диаметр около 300 Å. Более 95 % липосом составляли одноплазмеллярные везикулы.

Для изучения возможности проникновения содержимого липосом внутрь клеток использовали липосомы с флюоресцентным метчиком (FiTC), пришитым к высокомолекулярному носителю — декстрану (мол. масса 40 кД). Инкубация гепатоцитов с одноплазмеллярными положительно

заряженными липосомами, нагруженными FiTC-декстраном, в течение 1 ч приводила к появлению флюоресцентного свечения цитоплазмы. Более ярко светились округлые включения, по локализации и размеру соответствующие лизосомам. Ядра оставались темными (рис. 3, см. вклейку). При инкубации гепатоцитов с FiTC-декстраном, не заключенным в липосомы, клетки оставались без изменений и не приобретали свечения, что подтвердило неспособность свободного декстрана проникать внутрь клетки. Результаты этой серии опытов показали, что приготовленные липосомы транспортируют FiTC-декстран непосредственно в цитоплазму гепатоцитов.

Инкубация культуры гепатоцитов с липосомами, содержащими цАМФ, в течение 1 ч приводит к повышению внутриклеточной концентрации цАМФ на два порядка (контрольный уровень до добавления липосом  $0,127 \pm 0,05$  нмоль на 1 мг белка, после инкубации с липосомами, нагруженными цАМФ,  $12,05 \pm 1,13$  нмоль на 1 мг белка). Клетки при этом сохраняют нормальную морфологию и жизнеспособность, что определяли по выведению из них трипанового синего [13]. Добавление липосом без цАМФ также приводило к повышению внутриклеточного уровня цАМФ ( $1,035 \pm 0,59$  нмоль на 1 мг белка). Имеются данные об изменении активности ферментов плазматических мембран, в том числе аденилатциклазы, под действием липосом [19]. По-видимому, значительный прирост содержания цАМФ при контакте липосом с цАМФ с гепатоцитами объясняется суммированием эффектов от воздействия самих липосом и введения экзогенного цАМФ.

При инкубации гепатоцитов с липосомами, содержащими цАМФ, в условиях аноксии в течение 1 ч (конечная концентрация липосомного цАМФ в среде инкубации составляла  $10^{-7}$ — $10^{-6}$  М) повышалась связанная активность кислой фосфатазы по сравнению с этой же активностью при аноксии и субстратном голодании без добавления липосом. Соотношение свободной и связанной активности приближалось к контрольной величине. Изменения активности кис-

лой фосфатазы при добавлении липосом аналогичным изменениям, происходящим в процессе реабилитации. Полученные данные свидетельствуют о выраженном защитном и стабилизирующем эффекте цАМФ на лизосомные мембраны. Однако тот факт, что величина свободной и связанной активности кислой фосфатазы на фоне липосом и в условиях реабилитации в 2 раза превышает контрольную, свидетельствует о сложном влиянии цАМФ на изменения активности лизосомного аппарата.

Одной из точек приложения цАМФ в регуляции лизосом может быть стабилизация мембран посредством фосфорилирования их структурных компонентов цАМФ-зависимыми протенинказами [14]. Можно предположить опосредованное участие цАМФ в регуляции активности  $Mg^{2+}$ -АТФазы — протонного насоса, локализованного в мембранах лизосом и обеспечивающего оптимальный кислый рН внутри этих органелл [20, 24].

В литературе есть данные о возможности фосфорилирования кислых гидролаз и белков лизосомных мембран с участием цАМФ-зависимых протенинказ [17]. Не исключается участие данного механизма в регуляции функций лизосом, особенно при патологических состояниях. Нельзя исключить, что под влиянием цАМФ происходит активация образования и транспорта первичных лизосом. Показано, что цАМФ-зависимые протенинказы участвуют в фосфорилировании тубулина микротрубочек [11], которые в свою очередь активизируют движение и выход первичных лизосом из аппарата Гольджи. Не исключено также участие цАМФ в регуляции созревания лизосом на более ранних этапах: синтезе молекул ферментов, процессинге мРНК, сборке функционально активных рибосом [26, 27].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков: Пер. с англ. — М., 1983.
2. Дингл Дж. // Лизосомы. Методы исследования: Пер. с англ. — М., 1980. — С. 125—137.
3. Колпакова С. Е., Виноградова Е. В., Молчанова Л. В. и др. // Вопр. мед. химии. — 1987. — № 5. — С. 89—92.
4. Коровкин Б. Ф., Полякова Э. Д., Стволинская Н. С. и др. // Там же. — С. 33—38.
5. Коровкин Б. Ф., Полякова Э. Д., Стволинская Н. С. и др. // Биохим. экскпер. биол. — 1988. — № 4. — С. 417—419.
6. Малыгин А. Е., Якобсон Г. С. // Пат. физиол. — 1986. — № 4. — С. 35—38.
7. Марголис Л. Б. // Биол. мембраны. — 1987. — Т. 4. — С. 453—467.
8. Нескормый А. Г., Горюхина О. А., Васильев В. Ю. // Биохимия. — 1987. — Т. 52. — С. 484—492.
9. Панин Л. Е., Маянская Н. Н. Лизосомы: Роль в адаптации и восстановлении. — Новосибирск, 1987.
10. Панченко Л. Ф., Меерсон Ф. З., Любимцева О. Н. // Структура и функции биологических мембран. — М., 1971. — С. 103—110.
11. Ткачук В. А. Введение в молекулярную эндокринологию. — М., 1983.
12. Acosta D., Puckett M., McMillin R. R. // Experientia (Basel). — 1978. — Vol. 34. — P. 1388—1389.
13. Bonventre J. V., Cheung J. Y. // Amer. J. Physiol. — 1985. — Vol. 249. — P. 149—159.
14. Collins C. A., Wells W. W. // J. biol. Chem. — 1982. — Vol. 257. — P. 827—831.
15. Connelly P. A., Parker B. L. II., Sisk R. B., Garrison J. C. // Ibid. — 1987. — Vol. 262. — P. 4324—4332.
16. Filler R., Litwack G. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1973. — Vol. 52. — P. 159—167.
17. Gasa S., Balbaa M., Nacamura M. et al. // J. biol. Chem. — 1987. — Vol. 62. — P. 1230—1238.
18. Jones D. P., Kennedy F. G., Andersson B. S. et al. // Molec. Physiol. — 1985. — Vol. 8. — P. 473—482.
19. Klein J., Moore L., Pastan J. // Biochim. biophys. Acta. — 1978. — Vol. 506. — P. 42—53.
20. Moriyama Y., Takano T., Ohkuma S. // J. Biochem. (Tokyo). — 1984. — Vol. 95. — P. 995.
21. Papahadjopoulos D., Poste G., Mayhew E. // Biochim. biophys. Acta. — 1974. — Vol. 363. — P. 404—418.
22. Poste G., Papahadjopoulos D. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1978. — Vol. 308. — P. 164—184.
23. Ridout R. M., Wildenthal K., Decker R. S. // J. molec. cell. Cardiol. — 1986. — Vol. 18. — P. 853—865.
24. Schneider D. L. // J. biol. Chem. — 1983. — Vol. 258. — P. 1833—1838.
25. Spector T. // Analyt. Biochem. — 1978. — Vol. 86. — P. 142—146.
26. Tonati E., Danchin A. // Molec. gen. Genet. — 1987. — Vol. 208. — P. 499.
27. Tonati E., Danchin A. // Biochimie. — 1987. — Vol. 69. — P. 215—222.
28. Ukai M., Ogawa K. // Circulat. Res. — 1984. — Vol. 48. — P. 247—253.

Поступила 13.07.88



# ALTERATIONS IN CYCLIC AMP LEVEL AND ACID PHOSPHATASE ACTIVITY IN PRIMARY MONOLAYER HEPATOCYTE CULTURE OF NEW BORN RATS UNDER CONDITIONS OF ANOXIA AND SUBSTRATE DEPRIVATION

*S. E. Nikulina, O. Y. Krylova, T. M. Goncharenko, N. S. Stvolinskaya, E. D. Polyakova, B. F. Korovkin*

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

Acid phosphatase activity and cAMP level were studied in primary hepatocyte culture of new born rats under conditions of anoxia and substrate deprivation (incubation of the cells in Hanks salt solution). Incubation of hepatocytes in Hanks salt solution within one hour under

conditions of anoxia caused a significant increase in free (cytosolic) enzyme activity. Substitution of Hanks salt solution by normal tissue culture medium and reoxygenation after 1 hr anoxia resulted in a decrease of free acid phosphatase activity, whereas activity of the enzyme in lysosomal fraction was increased. Content of cAMP was decreased distinctly after 15 min incubation of hepatocyte culture under conditions of anoxia and substrate deprivation and was increased above control values within 5 min of reoxygenation and substitution of Hanks salt solution by normal tissue culture media. Addition of cAMP-containing liposomes to hepatocyte culture under these experimental conditions led to a decrease in free acid phosphatase activity and to an increase of the enzyme activity in lysosomal fraction. cAMP appears to modulate the lability of hepatocyte lysosomal membrane. The mechanisms involved in these processes are discussed.

УДК 612.115.1.064.014.46:615.362.438

*Г. В. Андреев, И. П. Ашмарин, В. Д. Зажирей, В. А. Лившиц, Т. И. Серебрякова, Л. В. Подорольская*

## ВЛИЯНИЕ ТИМОПТИНА НА ПРОЦЕСС ФЕРМЕНТАТИВНОГО ФИБРИНОЛИЗА

Московский университет им. М. В. Ломоносова, ВНИИ технологии кровезаменителей и гормональных препаратов, Москва

Фибринолиз как один из важнейших процессов ограниченного протеолиза, кроме своей основной специфической роли, выполняет многочисленные другие физиологические функции, находясь под регулирующим влиянием нервной и гуморальных систем организма.

В настоящее время большое внимание уделяется исследованию неспецифических регуляторных воздействий. К их числу можно отнести действие факторов иммунной системы [9, 10]. О взаимосвязи иммунной и фибринолитической систем свидетельствуют данные литературы [13, 14]. Известны представления о так называемом «иммунологическом надзоре» за системами ограниченного протеолиза (гемостаза, фибринолиза, калликреин-кининовой системой, компонентов комплекса), осуществляемом тимусом посредством его гормонов (тимозины, тимопоэтины и др.). [4, 6].

Целью данной работы явилось дальнейшее изучение взаимосвязи иммунной и фибринолитической систем — исследование действия тимоптина, одного из тимусных пептидных препаратов, на процесс ферментативного фибринолиза.

### Методика

Использовали препарат тимоптин, полученный во ВНИИ технологии кровезаменителей и гормональных препаратов. Тимоптин представляет собой комплекс полипептидов, выделенный из тимуса млекопитающих. Исследовали 2 дозы препарата: 0,1 мкг/200 г и 1 мкг/200 г в соответствии с рекомендациями разработчиков препарата [3].

Белым беспородным крысам, разделенным на 3 группы, препарат вводили однократно внутривенно в яремную вену, многократно внутримышечно — ежедневно в течение 5 дней, а также подкожно — 5 инъекций через день.

В опытах по изучению предполагаемого действия тимоптина, предупреждающего тромбообразование после курса подкожных или внутривенных инъекций (5 раз по 0,1 мкг/200 г), проводили тромбиновую пробу. Тромбин вводили в большой дозе (100—200 ед.), вызывающей гибель 50 % контрольных животных. Затем тромбин инфузирвали подопытным животным в соответствии с их массой и подсчитывали процент погибших крыс.

В опытах по изучению предполагаемого тромболитического действия тимоптина использовали модель тромбоза в яремной вене. У животных под аминазиновым наркозом (1 мл 2,5 % раствора аминазина внутривенно) образовывали тромб, вводя в изолированный сегмент вены 0,02 мл тромбина с активностью 40 ед./мл. Степень лизиса рассматривали как максимальную (100 %) в случае полного растворения тромба либо как частичную, которую выражали величиной оставше-