

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)

## ПОКАЗАТЕЛИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА К ОКИСЛИТЕЛЬНОМУ СТРЕССУ

Казахский НИИ клинической и экспериментальной хирургии им. А. Н. Сызганова Минздрава Казахской ССР, Алма-Ата

Для исследования процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в тканях разработано большое количество разнообразных подходов, конечной целью которых является моделирование возникающего в тканях окислительного стресса. В качестве инициаторов перекисления используют факторы, далеко не соответствующие физиологическим и вызывающие нежелательные повреждения в исследуемом объекте: соли металлов переменной валентности [7], четыреххлористый углерод [9]. УФ-облучение [3], перекись водорода [8]. Изменения системы, регулирующей ПОЛ в целом и входящих в него компонентов, зависят от способа инициации перекиса. Для получения целостного представления о реакциях ПОЛ необходима информация об изменениях участвующих в этом процессе переменных: структурных факторов, активности антиокислительных ферментов и содержания продуктов ПОЛ. В этом случае требования к активирующему агенту намного выше — он не должен вносить погрешностей в определение всех показателей.

Цель данного исследования — выявить сопряженные с усилением ПОЛ изменения активности антиокислительных ферментов и образования продуктов перекисления, по которым можно судить об интенсивности процессов в клетках красной крови и их резистентности. В работе представлены результаты, полученные при инициации ПОЛ в суспензиях эритроцитов и их мембран молекулярным кислородом. Такой подход обусловлен тем, что взаимодействие эритроцитов с кислородом постоянно имеет место в физиологических условиях, а контакт с повышенными его концентрациями возникает при искусственном кровообращении, гипербарической оксигенации, искусственной вентиляции легких.

### Методика

Использована кровь 108 здоровых доноров. Исследовали отмытые 0,9 % раствором

NaCl эритроциты и очищенные мембраны. Активацию ПОЛ вызывали пропусканием через суспензию эритроцитов и их мембран молекулярного кислорода в течение 70 мин. Пробы для исследования отбирали через 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 и 70 мин контакта клеток с кислородом. Мембраны выделяли методом дифференциального центрифугирования при 350 00 g [6] на центрифуге J2-21M («Beckman», США). Липиды экстрагировали смесью гексан — изопропанол (2 : 1) [2]. Окислительный индекс (ОИ) рассчитывали как отношение поглощения липидного экстракта D<sub>233</sub>D<sub>212</sub> [12]. Содержание малонового диальдегида (МДА) определяли по методу [16], позволяющему исключить влияние гемоглобина и других веществ нелипидной природы на результаты реакции. Активность каталазы (КА) определяли кинетически по поглощению перекиси водорода в УФ-области [14] на спектрофотометре DU-7HS («Beckman»). Активность глутатионпероксидазы (ГП) определяли спектрофотометрически [15]; супероксиддисмутазы (СОД), глутатионредуктазы (ГР) и содержание холестерина (ХС) — с помощью биохимического анализатора «Labsystems FP-901» (Финляндия) [1]. Математическую обработку результатов проводили с использованием пакета прикладных программ на микрокомпьютере «Apple» (США). Для статистического анализа использовали традиционный критерий Стьюдента и непараметрический метод Манна — Уитни.

### Результаты и обсуждение

При контакте эритроцитов с молекулярным кислородом в течение 70 мин статистически значимое снижение ОИ наблюдалось к 60-й минуте, хотя общая тенденция проявлялась уже к 5—10-й минуте (табл. 1). Процесс не сопровождался достоверным увеличением содержания МДА, что могло свидетельствовать или о меньшем накоплении этого продукта, или о его утилизации в системе. Выявлена обратная корреляция между названными показателями в процессе индукции перекисления ( $r = -0,802$ ). Активность СОД возрастала на 21 % к 70-й минуте. Изменения системы, сопряженной с окислением восстановленного глутатиона, проходили через стадию некоторого торможения активности ферментов, но к 70-й минуте активность ГП возрастала на 19 %, а ГР — на 35 % от конт-

Влияние молекулярного кислорода на показатели ПОЛ эритроцитов ( $M \pm m$ )

Время контакта с кислородом, мин	МДА, нмоль в 1 мл эритроцитов	ОИ, отн. ед.	КА, ммоль $H_2O_2$ в 1 мл эритроцитов за 1 мин	СОД, ед. в 1 мл эритроцитов	ГП, мкмоль FSH в 1 мл эритроцитов в 1 мин	ГР, мкмоль НАДФ-П в 1 мл эритроцитов в 1 мин
Контроль	6,22±0,06	0,35±0,01	5,24±0,30	3427±244	0,64±0,04	1,14±0,07
5	6,19±0,06	0,31±0,01	5,48±0,46	3610±207	0,62±0,04	1,08±0,07
10	6,28±0,06	0,28±0,01	5,53±0,39	3449±224	0,63±0,04	1,09±0,06
20	6,47±0,06	0,27±0,01	5,61±0,42	3534±261	0,60±0,04	1,14±0,05
30	6,63±0,06	0,26±0,01	5,70±0,52	3712±283	0,64±0,04	1,11±0,05
40	6,57±0,06	0,25±0,01	5,94±0,42	3635±256	0,69±0,06	1,15±0,06
50	6,79±0,07	0,25±0,01	6,51±0,58*	3729±261	0,68±0,05	1,28±0,07
60	7,31±0,07	0,23±0,01	6,91±0,66*	3972±256	0,70±0,05	1,35±0,08*
70	7,53±0,08	0,23±0,01*	8,95±1,00**	4140±268*	0,76±0,05*	1,54±0,09**

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3: одна звездочка —  $p < 0,05$ , две —  $p < 0,01$ , три —  $p < 0,001$ .

рольных значений. Максимальное увеличение активности (в 1,7 раза) отмечено для КА. Ее активность при индукции ПОЛ коррелировала с изменениями ОИ ( $r=0,684$ ), МДА ( $r=0,924$ ), СОД ( $r=0,923$ ), ГР ( $r=0,973$ ), ГП ( $r=0,896$ ). Аналогичное повышение активности КА и СОД отмечено при инкубации изолированных легочных макрофагов в атмосфере 95 % кислорода под обычным давлением [5]. Значение антиокислительных ферментов в регуляции интенсивности ПОЛ в красных клетках крови, по-видимому, выразилось в отсутствии статистически значимого накопления МДА, поскольку инкубация плазмы крови человека, лишенной ферментных антиоксидантов, в атмосфере чистого кислорода под обычным давлением в течение 24 ч приво-

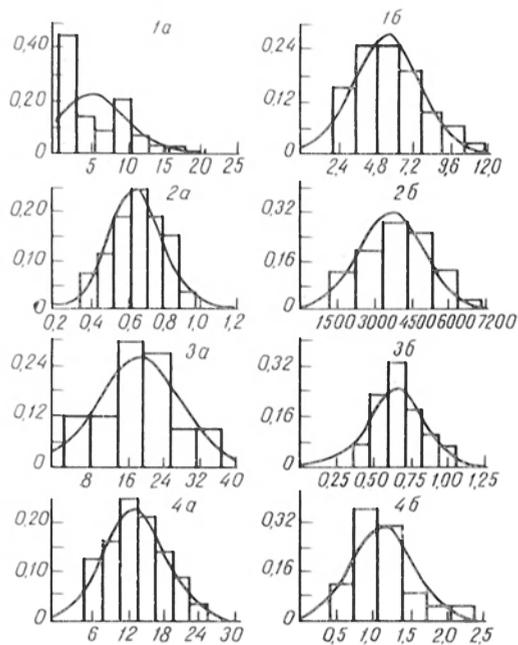
дила к накоплению МДА в 2,3 раза [13]. Учитывая, что в эксперименте при выдерживании животных в атмосфере 95 % кислорода под обычным давлением, так же как и в наших опытах, отмечена активация ГП и СОД [10], а радиорезистентность клеток связывают с их высокой каталазной активностью [18], можно полагать, что активация антиокислительных ферментов является первой реакцией организма на увеличение интенсивности ПОЛ. Наиболее чувствительным индикатором процесса следует считать КА.

Известно, что большая часть антиокислительных ферментов локализована в растворимой фазе клетки, в то время как процесс ПОЛ затрагивает в основном структурированные липиды мембранных образований. Представля-

Таблица 2

Изменение МДА и ОИ мембран эритроцитов при действии молекулярного кислорода ( $M \pm m$ )

Время контакта с кислородом, мин	Мембраны I типа		Мембраны II типа	
	МДА, нмоль на 1 мг белка	ОИ, отн. ед.	МДА, нмоль на 1 мг белка	ОИ, отн. ед.
Контроль	0,55±0,04	0,25±0,02	0,52±0,02	0,102±0,004
5	0,54±0,04	0,21±0,02	0,51±0,02	0,079±0,007**
10	0,55±0,02	0,19±0,02*	0,51±0,02	0,076±0,007**
20	0,60±0,03	0,20±0,01*	0,51±0,02	0,064±0,008***
30	0,63±0,02	0,19±0,02*	0,54±0,03	0,057±0,008***
40	0,55±0,02	0,19±0,02*	0,57±0,03	0,054±0,006***
50	0,63±0,05	0,18±0,01**	0,60±0,03*	0,044±0,004***
60	0,57±0,03	0,18±0,02**	0,64±0,03***	0,034±0,004***
70	0,60±0,02	0,18±0,01**	0,70±0,03***	0,043±0,005***



Распределение величин активности антиокислительных ферментов эритроцитов (а) и их мембран (б).

1 — КА; 2 — СОД; 3 — ГП; 4 — ГР.

лось целесообразным выяснить возможность участия ферментов в регуляции ПОЛ на мембране. Работая с очищенными мембранами эритроцитов, мы обнаружили, что в некоторых образцах мембран в отличие от интактных эритроцитов имело место накопление МДА при их контакте с кислородом (табл. 2). Мы предположили, что определенное значение в этом плане могла иметь КА, поскольку активность фермента, связанного с мембраной, изменялась в широких пределах — от 0,52 до 19,3 мкмоль  $\text{H}_2\text{O}_2$  на 1 мг белка за 1 мин. Изучение распределения активности КА мембран показало несоответствие гауссовому, построенному для соответствующих значений  $M$  и  $\delta$  (см. рисунок). В то же время в интактных эритроцитах распределение активности КА было нормальным. Значимость КА для окисляемости мембран подтверждалась тем, что распределение СОД, ГП и ГР в эритроцитах и изолированных мембранах было нормальным. Следует подчеркнуть, что при изучении активности и распределения СОД эритроцитов населения Японии также было отмечено нормальное распределение, не зависящее от пола и возраста обследованных [11]. На более значи-

тельные вариации активности КА по сравнению с СОД обращал внимание И. Фридович, изучая активность ферментов в аэробных организмах в филогенезе [4]. Наличие в распределении активности КА мембран двух максимумов со средними значениями  $9,05 \pm 0,76$  и  $1,78 \pm 0,22$  мкмоль  $\text{H}_2\text{O}_2$  на 1 мг белка за 1 мин послужило основанием для выделения двух типов мембран: с высокими (тип I) и низкими (тип II) значениями активности КА. Как видно на рисунке, мембраны II типа характерны для 60—65% обследованных лиц. Активность СОД в мембранах I типа была на 21% выше ( $p < 0,05$ ), а II — в 1,4 раза ( $p < 0,04$ ) ниже, чем в мембранах II типа (табл. 3). Достоверной разницы в активности ГР не обнаружено. Уровень ХС в мембранах I типа составил  $0,30 \pm 0,01$  мкмоль на 1 мг белка, а в мембранах II типа —  $0,37 \pm 0,01$  мкмоль на 1 мг белка ( $p < 0,001$ ). Таким образом, мембраны отличались не только по активности КА, но и по ряду других исследованных показателей. Выявлена обратная корреляция между содержанием ХС в мембране эритроцита и активностью КА в ней ( $r = -0,932$ ). Изучение природы связи КА и других антиокислительных ферментов с мембраной эритроцита показало, что увеличение числа отмывок с 3 до 7 не влияло на активность КА, СОД, ГП, ГР в мембранах эритроцитов. Однако после обработки мембран 0,6 М раствором КСI связанной с мембраной активности КА оставалось всего 19% от ее первоначальной величины ( $p < 0,001$ ), СОД — 4% ( $p < 0,001$ ), ГР и ГП — 84—100%. По-видимому, КА и СОД в отличие от ГР и ГП следует отнести к периферическим белкам эритроцитной мембраны, которые сорбируются и удерживаются на ней с помощью ионных взаимодействий, причем количество и активность сорбированного фермента определяются, вероятно, особенностями структуры мембраны.

Контакт мембран эритроцитов с молекулярным кислородом приводил к статистически значимому накоплению МДА только в мембранах II типа (см. табл. 2). Для подтверждения различий в динамике окислительного стресса в двух типах мембран экспериментальные данные о накоплении МДА при окислении мембран были описаны

Изменение активности антиокислительных ферментов мембран эритроцитов при действии молекулярного кислорода ( $M \pm m$ )

Время контакта с кислородом, мин	КА, мкмоль $H_2O_2$ на 1 мг белка за 1 мин	СОД, ед. на 1 мг белка	ГР, нмоль НАДФ-Н на 1 мг белка за 1 мин	ГП, нмоль FSH на 1 мг белка за 1 мин
<b>Мембраны I типа</b>				
Контроль	9,1±0,8	0,70±0,04	27,7±1,5	14,3±1,7
5	9,1±0,8	0,69±0,04	29,0±1,3	14,2±1,6
10	9,2±0,9	0,74±0,05	29,3±1,8	14,3±1,6
20	9,3±0,9	0,79±0,04	29,7±1,4	14,8±1,7
30	10,0±0,9	0,80±0,05*	29,7±1,9	16,2±2,0
40	10,4±0,9	0,89±0,05**	30,4±1,5	17,5±2,2
50	11,2±1,0*	0,93±0,15***	33,2±2,0*	17,2±1,9*
60	13,2±1,1**	0,98±0,07***	32,3±1,7*	18,7±2,2**
70	16,4±1,3***	1,11±0,05***	34,0±1,9*	20,7±2,4***
<b>Мембраны II типа</b>				
Контроль	1,78±0,22	0,58±0,02	29,7±1,4	20,5±2,3
5	1,87±0,28	0,58±0,03	29,5±1,3	22,3±2,3
10	1,90±0,25	0,61±0,02	29,9±1,8	21,8±2,2
20	2,00±0,24	0,62±0,04	30,1±1,4	22,5±2,6
30	2,96±0,26**	0,63±0,03	31,3±1,3	24,8±2,6
40	3,99±0,50***	0,66±0,03*	32,0±1,6	25,7±2,9
50	4,55±0,47***	0,66±0,04*	33,3±1,5	27,3±3,1*
60	6,40±0,87***	0,72±0,04**	35,4±1,4**	28,8±3,8**
70	8,35±1,11***	0,82±0,03***	40,3±1,6**	32,2±4,8**

уравнением:

$$MДА = A \cdot \exp(T/K),$$

где  $T$  — время контакта мембран с кислородом,  $A$  и  $K$  — коэффициенты, полученные методом наименьших квадратов [17]. Значения коэффициентов  $A$  и  $K$  составили соответственно  $0,097 \pm \pm 0,001$  и  $214 \pm 36$  для мембран с низкой активностью КА,  $0,112 \pm 0,002$  и  $900 \pm 69$  для мембран с высокой активностью КА. Очевидно, что коэффициенты  $A$ , характеризующие исходный уровень МДА в мембранах, были близки, в то время как коэффициенты  $K$ , отражающие скорость накопления МДА в процессе индукции ПОЛ, отличались более чем в 4 раза. ОИ в мембранах I типа статистически значимо снижался к 10-й минуте, в мембранах II типа — к 5-й минуте контакта с кислородом. Так же как и в эритроцитах, снижение ОИ мембран было обусловлено уменьшением поглощения липидного экстракта в области 233 нм. К 70-й минуте контакта мембран с кислородом ОИ составил 72 и 42% от контрольных значений соответственно для мембран I и II типа. Как и для интактных эритроцитов, обратная кор-

реляция ( $r = -0,764$ ) между изменением ОИ и МДА при перекислении липидов, выявлена только в мембранах с низкой активностью КА, что свидетельствовало о значимости каталазной реакции на промежуточных стадиях процесса и возможности регуляции активности фермента промежуточными продуктами ПОЛ. В мембранах I типа при действии молекулярного кислорода в течение 70 мин активность КА и СОД возрастала соответственно в 1,8 и 1,6 раза, в мембранах II типа активность СОД повышалась в 1,4 раза, КА — в 4,6 раза, не достигая тем не менее исходных величин, присущих мембранам I типа. Активность ферментов, сопряженных с окислением восстановленного глутатиона, в процессе индукции ПОЛ возрастала одинаково в обоих типах мембран. Однако значения активности ГП в мембранах I типа после 70 мин контакта с кислородом были ниже значений, полученных для II типа мембран до инициации в них ПОЛ.

Таким образом, в мембранах эритроцитов в присутствии молекулярного кислорода активировались процессы ПОЛ, в результате чего происходило

Коэффициенты корреляции между активностью антиокислительных ферментов, значениями ОИ и содержанием МДА в мембранах эритроцитов при индукции ПОЛ молекулярным кислородом

I тип II тип	КА	СОД	ГР	ГП	ОИ	МДА
КА	0	0,811*	0,870*	0,962*	-0,548	0,312
СОД	0,976*	—	0,656*	0,798*	-0,152	0,247
ГР	0,986*	0,988*	—	0,920*	-0,768*	0,512
ГП	0,967*	0,929*	0,938*	—	-0,679*	0,377
ОИ	-0,790*	-0,751*	-0,721*	-0,888*	—	-0,508
МДА	0,997*	0,969*	0,986*	0,957*	-0,764*	—

Примечание. Звездочка — коэффициенты корреляции достоверны.

снижение значений ОИ. Увеличение уровня МДА в системе свидетельствовало об активации ПОЛ только в мембранах с низкой активностью КА. Показателями резистентности эритроцитов к ПОЛ являлись высокая активность КА и низкая активность ГП в мембранах. С помощью корреляционного анализа установлено, что при инициации ПОЛ для мембран II типа имела место высокая корреляция между изменениями всех изученных показателей, в то время как для мембран I типа отмечено снижение зависимости между значениями активности антиокислительных ферментов и продуктов ПОЛ (табл. 4), что, по-видимому, указывало на накопление промежуточных продуктов, участвующих в регуляции их активности.

Для индукции ПОЛ в эритроцитах молекулярным кислородом характерно возрастание активности антиокислительных ферментов и снижение в них ОИ. На уровне мембраны эритроцита происходит более существенная активация процесса, степень которой зависит от структуры мембраны и первоначальной активности связанных с мембраной ферментов. КА и СОД лабильно, а ГП и ГР более жестко связаны с мембранами эритроцитов. В мембранах с высокой активностью КА антиокислительные свойства обеспечиваются за счет каталазной реакции. В мембранах с низкой каталазной активностью в защите от токсического действия перекисления участвуют системы окислительно-восстановительного перехода глутатиона. Низкая активность ГП при высокой активности КА и СОД служит показателем резистентности клетки к повреждающему действию кислорода, в то время как низкая активность КА и СОД при высокой активности ГП ука-

зывает на низкую резистентность мембраны к перекислению. Следовательно, КА имеет более важное значение в регуляции ПОЛ, чем ГП.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Верболович В. П., Подгорная Л. М. // Лаб. дело. — 1987. — № 2. — С. 17—20.
2. Верболович В. П., Теплова Л. Л., Подгорный Ю. К. Способ определения параметров перекисного окисления липидов в биологическом материале. — А. с. 1179222 СССР.
3. Конев В. В., Попов Г. А. // Биофизика. — 1978. — Т. 23. — № 3. — С. 456—461.
4. Фридович И. // Свободные радикалы в биологии / Под ред. У. Прайора: Пер. с англ. — М., 1979. — Т. 1. — С. 272—308.
5. Autor A. P. // Lipid Peroxides in Biology and Medicine. — New York, 1982. — P. 131—148.
6. Bretscher M. S. // J. molec. Biol. — 1971. — Vol. 58. — P. 775—781.
7. Cavallini L., Valente M., Binetali A. // Biochim. biophys. Acta. — 1984. — Vol. 795, N 3. — P. 466—472.
8. Clemens M. R., Einsele H., Waller H. D. // Biochem. Pharmacol. — 1985. — Vol. 34, N 8. — P. 1339—1341.
9. Corongiu F. P., Vargiolu S., Milia A., Cheeseman K. H. // Ibid. — N 3. — P. 397—398.
10. Frank L., Bucher J., Roberts R. // J. appl. Physiol. — 1978. — Vol. 45, N 5. — P. 699—704.
11. Kazuko U., Masana O. // Acta med. Okayama. — 1978. — Vol. 6. — P. 393—397.
12. Klein R. // Biochim. biophys. Acta. — 1970. — Vol. 210. — P. 486—489.
13. Kumio Y. // Lipid Peroxides in Biology and Medicine. — New York, 1982. — P. 223—243.
14. Mannheim B. // Biochem. Inform. — 1975. — Vol. 2. — P. 45—48.
15. Mills G. // J. biol. Chem. — 1959. — Vol. 234, N 3. — P. 502—506.
16. Chakawa H., Ohishi W., Jagi K. // Analyt. Biochem. — 1979. — Vol. 95. — P. 351—358.
17. Schiff J. D. // Int. J. Biomed. Comput. — 1985. — Vol. 16, N 2. — P. 143—148.
18. Vuillaume M. et al. // Rev. Gen. Nucl. — 1983. — N 6. — P. 465—471.

Поступила 06.12.88

## THE PATTERNS OF HUMAN ERYTHROCYTES RESISTANCE TO OXIDATIVE STRESS

V. P. Verbovolovich, Yu. K. Podgorny, L. M. Podgorny

Institute of Clinical and Experimental Surgery, Ministry of Public Health of the Kazakh SSR, Alma-Ata

Dynamics of alterations in activities of catalase, superoxide dismutase (SOD), glutathione-peroxidase (GPx) and reductase (GR) as well as shifts in content of malonic dialdehyde and in oxidative index values were studied in erythrocytes of 108 persons after the red blood cells contact with molecular oxygen within 70 min; a decrease in values of oxidative index and activation of the enzymatic activity studied were found. All the alterations observed

were distinctly higher in erythrocyte membranes and depended on the membranes structure and initial activity of the membrane-bound antioxidative enzymes. Treatment of erythrocyte membranes with solutions of high ionic strength showed that catalase and SOD were less rigidly bound to membrane as compared with GPx and GR. Distribution of SOD, GPx and GR activities was similar to normal values in the membranes, while the catalase activity distribution did not follow the Gauss equation. Thus, erythrocyte membranes were divided into two types, depending on the rate of catalase activity (high or low). The first type of membranes with high catalase activity were found to be resistant to peroxidation, exhibited high activity of SOD and low activity of GPx, content of cholesterol was decreased in these membranes.

УДК 615.357:577.175.53].033.1.07

Е. Ф. Конопля, Г. Н. Фильченков

## ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КОРТИКОСТЕРОИДОВ С ТРАНСПОРТНЫМИ БЕЛКАМИ КРОВИ

Институт радиобиологии АН БССР, Минск

В настоящее время показано, что специфические стероидсвязывающие гликопротеины крови человека — транскортин и секстероидсвязывающий глобулин — в комплексе со стероидами селективно и с высоким средством связываются плазматическими мембранами клеток органов-мишеней [1, 8, 19]. Наряду с этим известно, что с возрастом происходят перестройка эндокринной системы и изменение гормоначувствительности тканей и ряда других гормонзависимых процессов [4]. В связи с этим становится важным изучение возрастных особенностей взаимодействия глюкокортикоидных гормонов с транспортными белками крови как одного из факторов, влияющих на реализацию их биологического действия на периферии.

### Методика

Декапитацию животных проводили между 8 и 9 ч утра. Кровь собирали в пластиковые пробирки и центрифугировали при 20 000 g в течение 5 мин. Надосадочную фракцию сывороточных белков использовали непосредственно в эксперименте. Инкубационная среда в объеме 0,9 мл содержала буфер (0,02 M три-НСI, 0,01 M дигитроцитол, 10 % глицерин pH 7,5), различные концентрации сывороточного белка (от 0,2 до 26,0 мг/мл) и меченого кортизола или дезоксикортикостерона ( $0,3 \cdot 10^{-9}$ — $3,0 \cdot 10^{-5}$  M) совместно с мечеными аналогами ( $0,1 \cdot 10^{-9}$ — $0,5 \cdot 10^{-9}$  M)  $^3$ H-кортизола и  $^3$ H-дезоксикортикостерона («Amersham»,

Англия) с удельной радиоактивностью соответственно 80 и 45 Ки/ммоль. Через 1 ч инкубации при 0—4 °C не связавшийся с белками стероид удаляли добавлением в пробирки активированного угля, покрытого декстраном Т-80 в концентрации 5 мг/0,1 мл и после содержания на холоду в течение 5 мин осаждали центрифугированием. Для определения максимальной связывающей способности транспортных белков сыворотку обрабатывали активированным углем той же концентрации в объемном соотношении сыворотка — уголь, равном 1 : 0,5, в течение 1 ч при 37 °C с целью удаления связанных с белком стероидов. Величину специфического связывания определяли по разнице величин комплексированного радиоактивного стероида с сывороточными белками в отсутствие и при наличии избытка нерадиоактивного гормона. Анализ стероидсвязывающей способности сыворотки крови проводили в координатах Лайнувера — Бэрка [2], Скэтчарда [17] и Хилла [14]. Концентрацию белка определяли методом Лоурн [15], а концентрацию кортикостерона — с использованием наборов РИА.

### Результаты и обсуждение

С целью изучения свободного и занятого пулов кортикостероидсвязывающих участков транспортных белков крови использовали  $^3$ H-кортизол и обработку сыворотки крови активированным углем. Известно, что  $^3$ H-кортизол не вытесняет из комплекса с транскортином кортикостерон, поскольку константа ассоциации его с белком намного меньше [13], а концентрация транспортного белка значительно боль-