

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)

С. Э. Акопов, М. Р. Григорян, Э. С. Габриелян

# НЕКОТОРЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИЗМЕНЕНИЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ПОЛИМОРФНОЯДЕРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ

Ереванский медицинский институт

Изменение функционального состояния полиморфноядерных лейкоцитов (ПМЯЛ) в настоящее время рассматривается как одна из причин патогенеза нарушений регионарного кровообращения. Выброс из ПМЯЛ свободных радикалов и вазотропных факторов, их агрегация, способность влиять на агрегатное состояние крови делает внутрисосудистую активацию ПМЯЛ весьма опасной в плане развития вазомоторных и тромбоемболических расстройств [2, 15]. Показано, что у больных с нарушениями коронарного и церебрального кровообращения наблюдаются изменения функционального состояния ПМЯЛ, проявляющиеся, в частности, в виде их повышенной чувствительности к активирующим агентам, на воздействие которых ПМЯЛ отвечают мощным респираторным взрывом с высвобождением значительных количеств свободных радикалов и вазотропных факторов [2—5]. Все это требует исследования механизмов, которые приводят к подобным изменениям реактивности ПМЯЛ в патологии, причем особое внимание привлекает изучение процессов транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  в ПМЯЛ. Именно с его поступлением из внешней среды и из внутриклеточных депо связывают процесс активации ПМЯЛ самыми различными агентами [8, 9].

Целью настоящей работы явилось исследование особенностей процесса транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  в ПМЯЛ больных атеросклерозом сосудов мозга.

## Методика

Исследования проведены на ПМЯЛ, выделенных из крови 22 больных с церебральным атеросклерозом и развившейся на его фоне дисциркуляторной энцефалопатией. Контролем служила группа из 20 практически здоровых лиц. Возраст обследованных колебался от 30 до 65 лет.

ПМЯЛ выделяли из свежей цитратстабилизированной крови после осаждения эритроцитов декстраном Т-500 [7]. Клетки ресуспендировали в буфере Михаэлиса, содержащем 1 мМ  $\text{CaCl}_2$ . Рабочая суспензия содержала 500 тыс.

клеток в 1 мл. Клетки подсчитывали на счетчике частиц фирмы «Picoscale» (ВНР).

Внутриклеточную концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  оценивали с использованием флуоресцентного красителя квинна (Qin 2/AM), обладающего высоким сродством к  $\text{Ca}^{2+}$ , связывание с которым приводит к многократному увеличению квантового выхода хромофора [12, 13].

При измерении флуоресцентного параметра квинна в ПМЯЛ 100 мкл суспензии добавляли к 2 мл среды инкубации и регистрировали флуоресценцию при длине волны возбуждения 340 нм, флуоресценции — 495 нм. Измерения проводили на компьютеризованном спектрофлуориметре RF-500 фирмы «Shimadzu» (Япония) в кюветах с длиной оптического пути 1 см. Ширина щелей возбуждения — 5 нм, флуоресценции — 10 нм. По окончании измерений клетки разрушали в присутствии 1 мМ  $\text{CaCl}_2$  дигитонином (50 мкМ) и измеряли интенсивность флуоресценции квинна при его насыщении кальцием ( $F_{\text{max}}$ ), после чего к раствору добавляли  $\text{MnCl}_2$  (0,5 мМ), вытесняющий  $\text{Ca}^{2+}$  из комплекса с красителем и измеряли флуоресценцию квинна не связанного с  $\text{Ca}^{2+}$  ( $F_{\text{min}}$ ). Концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме ПМЯЛ рассчитывали по формуле:

$$\text{Ca}^{2+} = K_{\text{дис.}} (F - F_{\text{min}}) / (F_{\text{max}} - F),$$

где  $F$  — замеренный уровень флуоресценции квинна в ПМЯЛ, а  $K_{\text{дис.}} = 115 \text{ нМ}$  [14].

ПМЯЛ стимулировали  $\gamma$ -гексахлорциклогексаном (ГХЦГ), индуцирующим метаболический взрыв в клетке с образованием свободных радикалов, лизосомальных ферментов и других биологически активных веществ [11]. ГХЦГ добавляли в пробу до конечной концентрации 40 мкМ, что соответствует  $\text{EC}_{25}$  его активирующего действия.

Состояние липидной фазы мембран ПМЯЛ изучали по флуоресценции пирена, при этом исследовали состояние как липидов мембран в целом (длина волны возбуждения 334 нм), так и их прибрежной зоны (длина волны возбуждения 280 нм). Микровязкость мембраны характеризовали отношением флуоресценции мономеров и эксимеров пирена ( $F_m/F_s$ ) соответственно при длинах волн 470 и 395 нм [6]. Исследование проводили на суспензии ПМЯЛ в фосфатном буфере,  $10^6$  клеток в 1 мл.

## Результаты и обсуждение

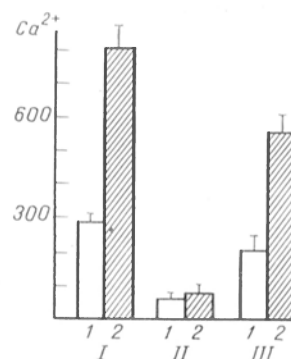
Исследования показали, что в неактивированных ПМЯЛ уровень ионизированного внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  существенно не отличается от контрольных цифр (табл. 1), хотя у некоторых больных (30 %) он был отно-

Транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  в ПМЯЛ здоровых лиц и больных атеросклерозом

Группа обследованных	Базальная концентрация внутриклеточного $\text{Ca}^{2+}$ , нмоль	Концентрация внутриклеточного $\text{Ca}^{2+}$ после стимуляции ГХЦГ, нмоль	Уменьшение прироста внутриклеточного $\text{Ca}^{2+}$ в присутствии модуляторов, %	
			нифедипин	ПГГ <sub>2</sub>
Больные атеросклерозом ( $n = 22$ )	$76,9 \pm 3,4$ $p > 0,05$	$854,2 \pm 17,7$ $p < 0,001$	$82,2 \pm 2,5$	$68,2 \pm 2,3$ $p < 0,05$
Здоровые лица ( $n = 20$ )	$63,5 \pm 2,9$	$293,2 \pm 33,6$	$92,1 \pm 1,7$	$85,3 \pm 4,4$

сительно высок. Однако при активации ГХЦГ в ПМЯЛ больных людей уровень  $\text{Ca}^{2+}$  возрастает в достоверно большей степени, чем в контроле (см. табл. 1). При этом отчетливое увеличение степени нарастания уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме клеток наблюдалось у 80 % обследованных больных. Такое увеличение уровня кальция в активированных ПМЯЛ может быть связано с изменением его поступления как извне, так и из внутренних депо. С целью уточнения этого вопроса у 4 здоровых лиц и у 4 больных с резко повышенной реакцией ПМЯЛ на ГХЦГ было проведено сравнение степени увеличения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме при инкубации ПМЯЛ в среде с  $\text{Ca}^{2+}$ , в безкальциевой среде и в присутствии антагониста внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  — ТМБ-8. Как видно из данных, приведенных на рисунке, в случае отсутствия  $\text{Ca}^{2+}$  в среде различия между здоровыми и больными людьми резко понижаются, что может рассматриваться как свидетельство ведущего значения поступления экзогенного  $\text{Ca}^{2+}$  [10]. В то же время присутствие ТМБ-8 способствует сохранению различий, что также подтверждает этот вывод. Таким образом, полученные данные свидетельствуют об усилении поступления  $\text{Ca}^{2+}$  в ПМЯЛ больных с церебральным атеросклерозом при их активации. Учитывая значение  $\text{Ca}^{2+}$ , одного из ведущих факторов, обеспечивающих активацию ПМЯЛ, приведенные выше данные позволяют именно с усилением его поступления извне связать нарушения функционального состояния ПМЯЛ при церебральном атеросклерозе. При этом важное значение могут иметь изменения не только функционального состояния ПМЯЛ, но и их чувствительности к корректирующим воздействиям. В качестве таковых можно указать на влияние про-

стациклина (ПГГ<sub>2</sub>), физиологического регулятора ПМЯЛ, а также на воздействие антагонистов кальция, прежде всего нифедипина, который может быть использован для фармакологической коррекции функционального состояния ПМЯЛ в патологии. Оба эти агента ограничивают степень повышения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в ПМЯЛ при их активации. Однако, как видно из табл. 1, эффективность их воздействия на ПМЯЛ больных людей понижается, особенно в отношении ПГГ<sub>2</sub>. Изменения эффективности этих воздействий на потоки  $\text{Ca}^{2+}$  в ПМЯЛ были неодинаковы у разных больных. Если у части больных она не отличалась от аналогичного показателя у здоровых лиц, то у 30 % больных в случае нифедипина и у 45 % больных в случае ПГГ<sub>2</sub> способность этих препаратов уменьшать потоки  $\text{Ca}^{2+}$  в ПМЯЛ снижается в 2—3 раза, а у 2 больных она практически исчезает. Следовательно, поступление  $\text{Ca}^{2+}$  в клетки ПМЯЛ при патологии изменяется вследствие по-



Прирост концентрации ионизированного кальция в ПМЯЛ здоровых людей (I) и больных с церебральным атеросклерозом (2).

Стимуляция ГХЦГ в присутствии  $\text{CaCl}_2$  (I) в безкальциевом растворе (II); в присутствии антагониста внутриклеточного кальция — ТМБ-8 (III). По оси ординат — содержание внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  (в нмоль).

Т а б л и ц а 2  
Исследование процесса эксимеризации пирена  
в ПМЯЛ здоровых лиц и больных атеросклерозом

Группа обследованных	$F_M/F_0$ пирена	
	$\lambda_{\text{возб}} = 280 \text{ нм}$	$\lambda_{\text{возб}} = 334 \text{ нм}$
Больные атеросклерозом ( $n=22$ )	$1,11 \pm 0,16$ $p < 0,05$	$2,08 \pm 0,13$ $p < 0,05$
Здоровые лица ( $n=20$ )	$0,60 \pm 0,06$	$1,43 \pm 0,01$

тери чувствительности ПМЯЛ к воздействию этих агентов по крайней мере у части больных. Возможно это связано с изменениями молекулярной организации Са-каналов на мембране ПМЯЛ. Транспорт ионов через плазмалемму ПМЯЛ и процесс их активации тесно связаны с конформационной перестройкой мембраны в ответ на влияние активирующего фактора, причем микровязкость мембран является важным элементом, определяющим реакцию клеток на то или иное воздействие [1]. Поэтому в поиске причин описанных выше изменений транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  в ПМЯЛ при активации у больных атеросклерозом было рассмотрено изменение микровязкости мембран клеток. Исследование эксимеризации пирена показало, что у больных по сравнению с контролем отличается увеличение отношения флуоресценции мономеров и эксимеров, что свидетельствует об увеличении их микровязкости (табл. 2). Причем особенно выраженными были изменения процесса эксимеризации пирена в приобелковых областях мембраны. Если увеличение отношения  $F_M/F_0$  для флуоресценции всего мембранного пирена составляет 45 %, то для приобелковых областей — 85 %. Не исключено, что это в какой-то мере отражает изменения организации ионных каналов в мембране, имеющих липопротенидную структуру.

Итак, проведенное исследование показало, что имеются нарушения кальциевого гомеостаза в ПМЯЛ больных атеросклерозом, которыми можно объяснить изменения их функционального состояния и реактивности. Однако помимо нарушений морфо-функционального состояния самих ПМЯЛ, разви-

тие их внутрисосудистой дисфункции в патологии может быть связано с воздействием факторов сыворотки. Известно, что при патологии, в частности при сердечно-сосудистых заболеваниях, сыворотка может приобрести способность изменять функциональное состояние клеток крови [2]. Поэтому было проведено исследование влияния сыворотки больных с церебральным атеросклерозом на функциональное состояние ПМЯЛ. При этом исследовали ПМЯЛ, выделенные из крови здоровых доноров. Изучали процессы транспорта в них  $\text{Ca}^{2+}$  в буфере и в буфере с добавлением тестируемой сыворотки в разведении 1 : 10. Оказалось, что сыворотка здоровых лиц не влияет при данных условиях на степень увеличения уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в ПМЯЛ, активированных ГХЦГ. Из 17 проб сыворотки больных с церебральным атеросклерозом в 10 случаях также не было обнаружено существенной реакции, однако в 7 случаях наблюдалось увеличение степени прироста  $\text{Ca}^{2+}$  в 1,5—2 раза. Аналогичная картина отмечалась и для сыворотки больных инфарктом мозга, однако в данном случае положительная реакция была в 11 случаях из 18. Интересно отметить, что у больных инфарктом мозга сыворотка не только увеличивала степень прироста  $\text{Ca}^{2+}$  в ПМЯЛ при активации, но и увеличивала его базальный уровень в клетках на 30—60 нмоль. По-видимому, это свидетельствует о появлении в сыворотке больных с церебральным атеросклерозом и при развитии на его фоне инфаркта мозга факторов, обладающих ионофорными свойствами и модулирующих Са-каналы мембран ПМЯЛ. При этом сыворотки больных, обладающие подобными свойствами, резко снижают (на 57 %) способность  $\text{PPi}_2$  предотвращать увеличение уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в ПМЯЛ при активации. Менее выраженным было их воздействие на эффект нифеидипина (24 %).

Можно заключить, что изменения функционального состояния ПМЯЛ у больных с атеросклерозом в определенной степени связаны с реорганизацией их мембран, приводящей к изменениям ее проницаемости для  $\text{Ca}^{2+}$ , а у части больных и с изменениями свойств сыворотки, приобретающей способность сенсibilизировать Са-транспортирующие системы ПМЯЛ к

воздействию активаторов. Эти же факторы могут определить изменения корригирующего влияния на ПМЯЛ физиологических регуляторов (ПГ<sub>12</sub>) и лекарственных средств (нифедипин).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бергельсон Д. Д. // Биол. мембраны. — 1985. — № 5. — С. 483—486.
2. Габриелян Э. С., Акопов С. Э. Клетки крови и кровообращение. — Ереван, 1985.
3. Габриелян Э. С., Акопов С. Э., Амроян Э. А., Григорян М. Р. // Современные проблемы нейробиологии. — Тбилиси, 1986. — С. 78—79.
4. Григорян М. Р., Бакунц Г. О., Габриелян Э. С. // Журн. exper. и клин. мед. — 1987. — № 4. — С. 365—368.
5. Клебанов Г. И., Туркменова Э. М., Крейнина М. В. и др. // Биол. мембраны. — 1987. — № 10. — С. 1084—1092.
6. Окунь И. М., Капер Г. В., Врлянец Т. М. и др. // Биохимия. — 1986. — Т. 51. — № 7. — С. 1132—1140.
7. Gabig T. G., Berman S. I., Babior B. // Blood. — 1979. — Vol. 53, N 6. — P. 1133—1139.
8. Gennazo R., Pozzan T., Romeo D. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1984. — Vol. 81, N 5. — P. 1416—1420.
9. Korchak H., Vienne K., Rutherford L., Weissmann G. // Fed. Proc. — 1984. — Vol. 43, N 2. — P. 2749—2754.
10. Lechi A., Lechi C., Bonadonna G. et al. //

Hypertension. — 1987. — Vol. 9, N 3. — P. 230—235.

11. Meade C., Harvey J., Boot J. R. // Biochem. Pharmacol. — 1984. — Vol. 33, N 2. — P. 289—293.
12. Rink T., Shmith S., Tsien R. // FEBS Lett. — 1982. — Vol. 148, N 1. — P. 21—26.
13. Tsien R. Y. // Nature. — 1981. — Vol. 290. — P. 527—528.
14. Tsien R. Y., Pozzan T., Rink T. J. // Cell Biol. — 1982. — Vol. 94, N 2. — P. 325—334.
15. Warzinger L., Blasberg P., Schmid-Schönhein H. // Vasa. — 1984. — Vol. 13, N 4. — P. 305—310.

Поступила 06.12.88

#### IMPAIRMENTS OF CA<sup>2+</sup> METABOLISM IN POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES FROM PATIENTS WITH ATHEROSCLEROSIS

S. E. Hakopov, M. R. Grigoryan, E. S. Gabrielyan

Medical School, Yerevan

Homeostasis of calcium was impaired in polymorphonuclear leukocytes of patients with atherosclerosis of cerebral vessels. Transformation of leukocyte membrane properties, related to Ca<sup>2+</sup> permeability, was observed. At the same time, in some of these patients alterations of blood serum characteristics were found, which acquired an ability to sensitize the leukocyte Ca<sup>2+</sup>-transport system to the effect of activators.

УДК 616.98:579.842]-078.73:543.544

Т. И. Маякова, Э. Э. Кузнецова, М. В. Лазарева, Г. С. Долгушина

#### КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛЕТУЧИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМ МЕТОДОМ ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ НЕКЛОСТРИДАЛЬНОЙ АНАЭРОБНОЙ ИНФЕКЦИИ

Институт хирургии Восточно-Сибирского филиала Сибирского отделения АН СССР, Иркутск

В последние годы произошли существенные изменения в этиологии хирургической инфекции. Грамположительная флора постепенно вытесняется грамотрицательными микробами, возрастает клиническое значение так называемых условно-патогенных микроорганизмов и сапрофитов [2, 13, 14]. Видное место среди них занимают анаэробные неспорообразующие грамотрицательные бактерии, главным образом бактероиды. Заметно возросший интерес к их изучению объясняется как увеличением удельного веса бактероидов в возникновении заболеваний человека, особенно при установлении этиологии легочных и плевраль-

ных нагноений [1, 3—5], так и усовершенствованием методов культивирования строгих анаэробов.

Выделение неклостридалиных анаэробов и их идентификация при использовании общепринятых микробиологических методов занимают обычно не менее недели, поэтому в последнее время все чаще применяется метод газожидкостной хроматографии. С его помощью возможно обнаружение в исследуемом материале летучих жирных кислот: уксусной (C<sub>2</sub>), пропионовой (C<sub>3</sub>), масляной (C<sub>4</sub>), изомасляной (иC<sub>4</sub>), валериановой (C<sub>5</sub>), изовалериановой (иC<sub>5</sub>), капроновой (C<sub>6</sub>), изокапроновой (иC<sub>6</sub>), являющихся конечны-